

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
2 de febrero de 2017 (02.02.2017)

WIPO | PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2017/017294 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
C07F 15/00 (2006.01) G01N 33/48 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:

PCT/ES2016/000081

(22) Fecha de presentación internacional:

21 de julio de 2016 (21.07.2016)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:

P201500550 24 de julio de 2015 (24.07.2015) ES

(71) Solicitantes: **UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID** [ES/ES]; Avda. Séneca, 2, 28040 Madrid (ES). **CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CBMSO)** [ES/ES]; Calle Serrano, 117, 28006 Madrid (ES).

(72) Inventores: **HERRERO DOMÍNGUEZ, Santiago**; Dpto. Química Inorgánica I, Facultad de CC. Químicas, Ciudad Universitaria, 28040 - Madrid (ES). **JIMENEZ APARICIO, Reyes**; Dpto. Química Inorgánica I, Facultad de CC. Químicas, Ciudad Universitaria, 28040 - Madrid (ES). **MARTÍNEZ SALAS, María Encarnación**; Dpto. Química Inorgánica I, Facultad de CC. Químicas, Ciudad

Universitaria, 28040 - Madrid (ES). **LOZANO CUBO, Gloria María**; Dpto. Química Inorgánica I, Facultad de CC. Químicas, Ciudad Universitaria, 28040 - Madrid (ES).

(74) Mandatario: **PONS ARIÑO, Angel**; Gta. de Rubén Dario, nº 4, 28010 Madrid (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT,

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: DIRUTHENIUM COMPOUNDS WITH OPEN-PADDLEWHEEL STRUCTURE AND THE INTERACTION THEREOF WITH NUCLEIC ACIDS

(54) Título : COMPUESTOS DE DIRRUTENIO CON ESTRUCTURA DE RUEDA DE PALETAS ABIERTA (OPEN-PADDLEWHEEL) Y SU INTERACCIÓN CON ÁCIDOS NUCLEICOS

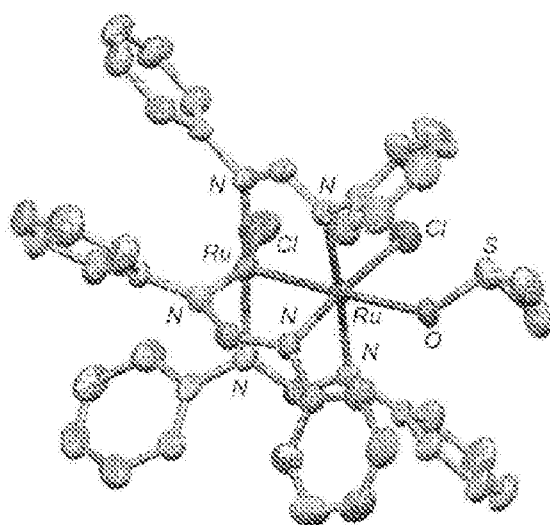


FIG 1

(57) Abstract: The invention relates to diruthenium compounds with an open-paddlewheel structure, to the stabilisation thereof, to the production method thereof, and to methods for using said compounds in the analysis of the secondary and tertiary structure of RNA, particularly in the determination of intersections between helices or the transition between helices and loops. The invention also relates to a kit containing diruthenium compounds with an open-paddlewheel structure and to the appropriate means for using same in the analysis of the structure of RNA.

(57) Resumen: La invención se refiere a compuestos de dirrutenio con estructura de rueda de paletas abierta (open-paddlewheel), su estabilización, su método de elaboración y métodos para utilizarlos en el análisis de la estructura secundaria y terciaria del ARN, particularmente en la determinación de las intersecciones entre hélices o en la transición entre hélices y bucles. La invención también se refiere a un kit que contiene compuestos de dirrutenio con estructura de rueda de paletas abierta (open-paddlewheel) y los medios adecuados para utilizarlos en el análisis de la estructura de! ARN.



RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— *antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))*

Publicada:

— *con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))*

Título

Compuestos de dirrutenio con estructura de rueda de paletas abierta (*open-paddlewheel*) y su interacción con ácidos nucleicos.

5 Sector de la técnica

La presente invención se encuadra en el sector químico, puesto que se trata de compuestos químicos y sus mezclas con distintos disolventes; asimismo, se encuadra en los sectores biotecnológico y farmacéutico por sus aplicaciones.

10

Estado de la técnica

Los ácidos nucleicos son depositarios de la información genética. En particular el ARN está implicado en numerosos procesos biológicos, entre otros, la síntesis de proteínas, la regulación genética, el mantenimiento de la estabilidad genómica, etc. La actividad del ARN está directamente relacionada con su estructura tridimensional. Por lo tanto, la determinación de su estructura es fundamental para comprender su función (Draper, Biopolymers 2013, 99, 1105-1113). La estructura del ARN se clasifica en distintos niveles: estructura primaria constituida por la secuencia nucleotídica, estructura secundaria compuesta por hélices, horquillas, bucles e intersecciones entre hélices, y estructura terciaria determinada por las interacciones establecidas entre los elementos anteriores. La estructura terciaria determina la conformación activa del ARN.

20

Existen varias aproximaciones biofísicas para determinar la estructura del ARN como la cristalografía, la resonancia magnética nuclear (RMN) o la microscopía crioelectrónica (cryo-EM). Estas metodologías suelen presentar limitaciones debido a la dificultad para obtener cristales de ARN, o complejos estables para cryo-EM, o debido al gran tamaño de las moléculas a estudiar por RMN. La conformación local de cada nucleótido de una molécula de ARN puede determinarse mediante abordajes químicos empleando DMS (dimetilsulfato), NMIA (anhidrido N-metilisatoico), 1M7 (anhidrido 1-metil-7-nitroisatoico), NAI (imidazolidina del ácido 2-metilnicotínico), etc. (Lozano y otros. FEBS J, 2014, 281, 3685-3700; Fernández-Miragall y otros. RNA 2006, 12, 223-234; Weeks y Mauger. Acc. Chem. Res. 2011, 44, 1280-1291; Spitale y otros; Nat. Chem. Biol. 2013, 9, 18-20). Estos compuestos reconocen

30

35

específicamente nucleótidos desemparejados, localizados en bucles o regiones de cadena sencilla.

Las intersecciones en el ARN se definen como el punto de conexión entre hélices, o bien entre hélices y bucles. Las intersecciones están implicadas en las propiedades autocatalíticas de algunas ribozimas, el reconocimiento de dominio de unión de interruptores de ARN (*riboswitches*), la iniciación interna de la traducción (elementos IRES), la interacción con proteínas, etc. Aunque se dispone de técnicas apropiadas para identificar horquillas y bucles, la determinación de las intersecciones es muy pobre (Laing y otros. JMB 2009, 393, 67-82) por lo que son necesarias nuevas herramientas que determinen los residuos localizados en dichas posiciones dentro de la estructura de los ácidos nucleicos.

15 Descripción detallada de la invención

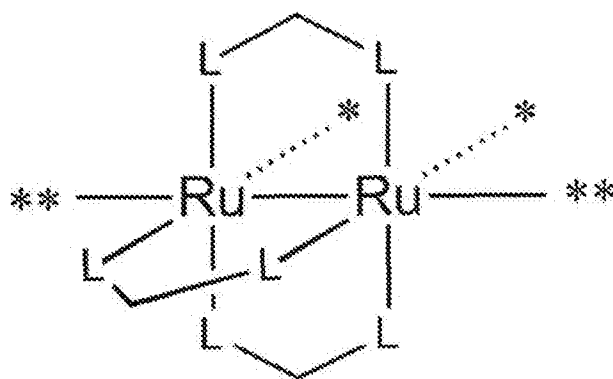
Compuestos de dirrutenio con estructura de rueda de paletas abierta (*open-paddlewheel*) y su interacción con ácidos nucleicos.

Un aspecto de la presente invención se refiere a compuestos de dirrutenio con estructura de rueda de paletas abierta (*open-paddlewheel*) y su aplicación al análisis estructural de moléculas de ARN que permita explicar, manipular o anular su función.

Los compuestos de dirrutenio con estructura de rueda de paletas abierta (i) de la presente invención constan de dos átomos de rutenio unidos por enlace metal-metal y soportados por tres ligandos puente (L-L) que forman, junto a los centros metálicos, un anillo, generalmente, de cinco eslabones (Barral y otros, Chem. Eur. J. 2007, 13, 10088-10095); en los compuestos de fórmula (i) las otras dos posiciones ecuatoriales (*) y las dos posiciones axiales (**) están libres u ocupadas por ligandos monodentados y/o bidentados quelato; con la salvedad de $[Ru_2(\mu\text{-PhNCHNPh})_3X_2]$ (cuando $X = Cl, Br, I, NO_3, CH_3CN$).

Los tres ligandos puente (L-L) se seleccionan del grupo formado por: formamidinato, guanidinato, triazenuro, aminopiridinato, amidato, carboxilato, hidroxipiridinato, acetamidinato y/o benzamidinato.

Los ligandos monodentados y/o bidentados quelatos se seleccionan del grupo formado por: haluros, pseudohaluros, sulfato, agua, etanol, DMSO, amoníaco, alcóxidos, alquilo.



En la presente invención se entiende por ligandos monodentados aquellos ligandos que poseen un único punto de anclaje al centro de coordinación. Por ligandos bidentados quelato se entiende aquellos ligandos que se coordinan a un único átomo central mediante dos grupos dadores. Asimismo, en esta memoria descriptiva, se entiende por ligandos puente aquellos ligandos que se enlazan simultáneamente a dos átomos centrales, es decir, los ligandos puente se unen a los dos átomos centrales para producir entidades de coordinación dinucleares.

Asimismo, en la presente invención, por capacidad coordinativa se entiende la tendencia que posee una especie para actuar como ligando con respecto a la posibilidad de ejercer de contracción o mantenerse libre.

Otro aspecto de la invención se refiere a un procedimiento para sintetizar compuestos de dirutenio con estructura de rueda de paletas abierta que comprende los siguientes pasos:

- a) Síntesis de compuestos de fórmula $[\text{Ru}_2(\text{carboxilato})(\text{L-L})_3\text{X}']$ ($\text{X}' = \text{Cl}, \text{Br}, \text{I}$) a partir de $[\text{Ru}_2(\text{carboxilato})_4\text{X}']$ mediante sustitución parcial de los grupos carboxilato, bien por calentamiento a reflujo o por síntesis solvothermal asistida por microondas.
- b) Síntesis de compuestos de fórmula $[\text{Ru}_2(\text{L-L})_3\text{X}'_2]$ ($\text{X}' = \text{Cl}, \text{Br}, \text{I}$) mediante la adición de ácido hidrácido (HX') a una suspensión de $[\text{Ru}_2(\text{carboxilato})(\text{L-L})_3\text{X}']$.

Opcionalmente, puede incluirse el siguiente paso:

- c) Síntesis de otros compuestos de fórmula $[Ru_2(L-L)_3X''_2]$ (X'' = azida, tiocianato y/o cianato) mediante intercambio de los ligandos haluro en $[Ru_2X'_2(L-L)_3]$ por ligandos pseudohaluro.

5

En este método, los ligandos puente (L-L) de los compuestos de dirrutenio con estructura de rueda de paletas abierta (*open-paddlewheel*) se seleccionan del grupo formado por: formamidinato, guanidinato, triazenuro, aminopiridinato, amidato, carboxilato, hidroxipiridinato, acetamidinato y/o benzamidinato.

10

Las disoluciones de los compuestos con estructura de rueda de paletas abierta sin ocupar las posiciones axiales generalmente no son muy estables, lo que dificulta su uso. En la presente invención, para solucionar este problema, se estabilizan los compuestos en dimetilsulfóxido (DMSO) o en etanol, que se coordinan a las posiciones axiales, lo que supone una mejora en la estabilidad de los compuestos en disolución y facilita su uso. De esta forma se mejora la estabilidad y manejo de los compuestos sin reducir su reactividad.

15

20

Si el compuesto de dirrutenio con estructura de rueda de paletas abierta es soluble en medio acuoso, se puede preparar directamente una disolución del compuesto en agua, pero esto no es lo habitual. En el caso de que el compuesto no sea suficientemente soluble en agua, la presente invención incluye disoluciones en DMSO o en etanol. Para ello, se disuelve el compuesto de dirrutenio en la mínima cantidad de DMSO o etanol y luego se diluye con agua hasta conseguir la concentración más adecuada para el procedimiento que se vaya a seguir.

25

30

Otro aspecto de la invención, por lo tanto, se refiere a un procedimiento para preparar las disoluciones, que comprende:

- a) Preparación de una disolución de $[Ru_2(L-L)_3X_2Y_n]$ (X = halogenuro, pseudohalogenuro u otro anión con capacidad coordinativa; Y = ligando neutro como agua, DMSO o etanol; $n = 1, 2$): Se pesan entre 1 y 5 mg de compuesto de dirrutenio $[Ru_2(L-L)_3X'_2]$ o de un compuesto de dirrutenio $[Ru_2(L-L)_3X''_2]$ y se disuelven en un disolvente que

35

estabilice el compuesto, como DMSO o etanol para formar disoluciones con una concentración entre 1.5 y 2.5 mM.

- b) La disolución de $[Ru_2(L-L)_3X_2Y_n]$ en DMSO o etanol se diluye en agua hasta conseguir concentraciones del orden de mil veces inferiores.

5

La invención también se refiere a un método para la determinación de las intersecciones entre hélices y/o de la transición entre hélices y bucles en moléculas de ARN que incluye:

- a) inducir el plegado en conformación nativa de ARN procedente de una muestra aislada o sintetizado *in vitro*,
10 b) tratar el ARN plegado con una disolución de compuesto de dirrutenio con estructura de rueda de paletas abierta,
c) utilizar el ARN tratado con dirrutenio con estructura de rueda de paletas abierta como molde en reacciones de transcripción reversa (RT) con cebadores marcados,
15 d) identificar las paradas específicas de la RT del paso c).

El compuesto de dirrutenio con estructura de rueda de paletas abierta de los pasos b) y c) se utiliza preferentemente en medio acuoso. En aquellos casos
20 en los que el compuesto de dirrutenio con estructura de rueda de paletas abierta no sea estable en agua, se estabiliza preferentemente en DMSO o bien con etanol para que actúen como ligandos y estabilizar el compuesto. Por otro lado, el tratamiento del ARN plegado se realiza preferentemente bajo condiciones controladas de pH, concentración de iones monovalentes y
25 divalentes, temperatura y tiempo. Una vez replegado el ARN en su conformación nativa, al tratarse con una mezcla del compuesto de dirrutenio con estructura de rueda de paletas abierta en medio acuoso, se establece una unión covalente entre la especie de dirrutenio y los nucleótidos del ARN localizados en el extremo o inmediatamente contiguos a una hélice, o bien en
30 la intersección entre hélices (figura 2).

Preferentemente el compuesto de dirrutenio con estructura de rueda de paletas abiertas de los pasos b) y c) es el compuesto de fórmula (i) donde los dos átomos de Ru, unidos por enlace metal-metal, están soportados por tres
35 ligandos puente (L-L) que forman, junto a los centros metálicos, un anillo; las otras dos posiciones ecuatoriales (*) y las dos posiciones axiales (**) están libres u ocupadas por ligandos monodentados y/o bidentados quelato.

Como control de la reacción se utiliza ARN plegado de la misma forma y diluido en el mismo medio acuoso (de aquí en adelante denominado ARN-control), conteniendo DMSO o etanol en la misma concentración a la que ese
5 disolvente se haya empleado para disolver el compuesto de dirrutenio en aquellos casos en que haya sido necesaria la adición de un disolvente.

En cuanto a las reacciones de RT, la incubación del ARN con el complejo de dirrutenio con estructura rueda de paletas abierta provoca la parada
10 específica de la enzima transcriptasa reversa (RT) en el nucleótido anterior a la posición reactiva a dirrutenio. Para la RT se utilizan cebadores marcados con un fluoróforo, o bien con ^{32}P en su extremo 5'.

Para identificar las paradas específicas de la RT, además del ARN-control, se
15 realizan reacciones de secuenciación del ARN con el mismo cebador utilizado para la RT pero marcado con otro fluoróforo. A continuación, se separan los productos de la secuenciación por electroforesis capilar junto con los productos de la RT. Otra opción es detectarlos en geles desnaturalizantes acrilamida-urea en el caso de que se hayan marcado los cebadores con ^{32}P .
20 La intensidad de los productos de parada de la RT en el ARN tratado es cuantificada y normalizada con respecto al ARN-control. La reactividad resultante se representa frente a la posición nucleotídica (figura 3). Finalmente, se adscriben los nucleótidos reactivos a dirrutenio en la estructura secundaria del ARN por comparación con datos de reactividad
25 obtenidos con compuestos conocidos en el estado de la técnica (por ejemplo, NMIA) que determinan la posición de bucles y regiones desapareadas, así como los nucleótidos no reactivos que forman enlaces de hidrógeno en regiones apareadas. La identificación de las paradas específicas de la RT, es decir, de los productos obtenidos en la RT con dirrutenio con estructura de
30 rueda de paletas abierta, permite identificar nucleótidos del ARN localizados en el extremo o inmediatamente contiguos a una hélice, o bien en la intersección entre hélices que es donde, específicamente, interaccionan los compuestos de la invención con el ARN.

35 Los resultados de reactividad del ARN a los compuestos de dirrutenio con estructura de rueda de paletas abierta (Figura 2, derecha) se han comparado con datos experimentales de determinación de estructura con agentes que

atacan nucleótidos localizados en bucles y, en general, regiones desapareadas (figura 2, izquierda). A su vez, resultados de análisis mutacional y datos de covariación de secuencia indican los nucleótidos que forman hélices. La combinación de todos los datos indicados nos han
5 permitido concluir que los sitios de ataque del compuesto de dirrutenio con estructura de rueda de paletas abierta se localizan en las intersecciones de hélices y/o en la transición entre hélices y bucles del ARN.

Las hélices son elementos básicos de la estructura secundaria del ARN que
10 sostienen la forma tridimensional de la molécula nativa y, por ello, determinan la función del ARN. A día de hoy no se dispone de metodologías capaces de identificar específicamente nucleótidos localizados en las intersecciones de hélices y/o en la transición entre hélices y bucles en ácidos nucleicos. Por ello, la disposición estructural de estos nucleótidos se modela a partir de
15 datos negativos, lo que ha supuesto limitaciones en su estudio. La invención presentada constituye una nueva herramienta en el estudio de la estructura de los ácidos nucleicos, por lo que es de gran interés científico inmediato y tecnológico a corto plazo, en el ámbito de la biología molecular y estructural.

20 Otro aspecto de la invención se refiere a las combinaciones de los complejos de dirrutenio con estructura de rueda de paletas abierta con ácidos nucleicos y, más concretamente con moléculas de ARN.

La existencia de interacciones específicas del ARN con compuestos de
25 dirrutenio con estructura de rueda de paletas abierta también puede utilizarse para mejorar la capacidad de cristalización de las moléculas de ARN para su estudio por difracción de rayos X. Además, la existencia de átomos pesados produce un aumento en la intensidad de las reflexiones, lo que facilita la obtención de datos cristalográficos.

30 Por último, este tipo de interacciones compuesto de dirrutenio-ARN puede utilizarse para deformar la estructura del ARN inhabilitándolo.

La invención también se refiere a un kit para el análisis de moléculas de ARN
35 que incluye: uno o varios compuestos de dirrutenio con estructura de rueda de paletas abierta, un tampón adecuado para el tratamiento del ARN y las instrucciones de uso. Preferentemente, el compuesto o los compuestos de

dirrutenio con estructura de rueda de paletas abierta incluidos en el kit tienen la fórmula (i) donde los dos átomos de Ru, unidos por enlace metal-metal, están soportados por tres ligandos puente (L-L) que forman, junto a los centros metálicos, un anillo; las otras dos posiciones ecuatoriales (*) y las dos posiciones axiales (**) están libres u ocupadas por ligandos monodentados y/o bidentados quelato.

Además, los ligandos puente de los compuestos de dirrutenio se seleccionan del grupo formado por: formamidinato, guanidinato, triazenuro, aminopiridinato, amidato, carboxilato, hidroxipiridinato, acetamidinato y/o benzamidinato. Por otro lado, el/los compuestos de dirrutenio que se incluyen en el kit pueden estar estabilizados con DMSO o con etanol. Adicionalmente, el kit puede contener un disolvente, preferentemente, DMSO o etanol.

15 Breve descripción de las figuras

Figura 1. Representación ORTEP de la estructura cristalina del compuesto $[\text{Ru}_2(\text{PhNCHNPh})_3\text{Cl}_2(\text{DMSO})]$ ($\text{PhNCHNPh} = \text{N,N'}$ -difenilformamidinato) en la que se indican los átomos de rutenio (Ru), nitrógeno (N), cloro (Cl), oxígeno (O) y azufre (S). Los átomos de carbono no están etiquetados y los átomos de hidrógeno han sido omitidos por claridad.

Figura 2. Modelo de la estructura secundaria del ARN en el que se muestra los valores de reactividad con NMIA (izquierda; tomado de Lozano y otros. FEBS J, 2014, 281, 3685-3700) y con el compuesto $[\text{Ru}_2(\text{PhNCHNPh})_3\text{Cl}_2(\text{DMSO})]$ (derecha) según la escala de grises.

Figura 3. Reactividad normalizada del ARN en función de la posición del nucleótido. La intensidad de la reactividad se cuantifica con la escala de grises que se muestra.

Modo de realización de la invención

Ejemplo 1. Preparación de los complejos de dirrutenio con estructura de rueda de paletas abierta.

1.1. Síntesis solvotermal activada por microondas de compuestos de fórmula $[\text{Ru}_2(\text{O}_2\text{CMe})(\text{L-L})_3\text{Cl}]$ ($\text{L-L} = \text{N,N'}$ -difenilformamidinato).

Se introdujeron 0,5 mmol de $[\text{Ru}_2(\text{O}_2\text{CMe})_4\text{Cl}]$, 1,5 mmol de N,N'-difenilformamidina, 0,5 mL de trietilamina y 3,5 mmol de LiCl en un recipiente de teflón de 85 mL con 8 mL de THF (tetrahidrofurano). El recipiente se cerró herméticamente y se introdujo en un horno microondas con control de temperatura y de presión. Se mantuvo la mezcla a 128 °C durante 60 min y a continuación se evaporaron los componentes volátiles de la mezcla. El residuo obtenido se trató con tolueno y la disolución se llevó a sequedad. El sólido se lavó con éter de petróleo. Rendimiento: 40-60%.

1.2. Síntesis solvothermal activada por microondas de compuestos de fórmula $[\text{Ru}_2(\text{O}_2\text{CMe})(\text{L-L})_3\text{Cl}]$ (L-L = N,N'-difeniltriazeno).

Se introdujeron 0,5 mmol de $[\text{Ru}_2(\text{O}_2\text{CMe})_4\text{Cl}]$, 1,5 mmol de N,N'-difeniltriazeno, 0,5 mL de trietilamina y 3,5 mmol de LiCl en un recipiente de teflón de 85 mL con 8 mL de THF (tetrahidrofurano). El recipiente se cerró herméticamente y se introdujo en un horno microondas con control de temperatura y de presión. Se mantuvo la mezcla a 128 °C durante 60 min y a continuación se evaporaron los componentes volátiles de la mezcla. El residuo obtenido se trató con éter etílico y la disolución se llevó a sequedad. El sólido se lavó con éter de petróleo. Rendimiento: 40-60%.

1.3-1.7. Preparación de compuestos con estructura de rueda de paletas abierta de fórmula $[\text{Ru}_2(\text{L-L})_3\text{Cl}_2]$ (L-L = N,N'-dianisilformamidinato, N,N'-difeniltriazenuro, trifenilguanidinato, 2,4,6-trimetilaminopiridinato, 6-cloro-2-oxopiridinato).

Se suspendieron 0,5 mmol de compuesto $[\text{Ru}_2(\text{O}_2\text{CMe})(\text{L-L})_3\text{Cl}]$ en 5-10 mL de un disolvente polar como metanol o agua y se añadieron 6-10 gotas de ácido clorhídrico al 35%. La mezcla se dejó agitando durante una hora a temperatura ambiente. El sólido se filtró y se lavó con éter etílico. Rendimiento: 35-65%.

Ejemplo 2. Preparación de las disoluciones

2.1.1. Preparación de una disolución de $[\text{Ru}_2(\text{PhNCHNPh})_3\text{Cl}_2(\text{DMSO})]$ en DMSO.

Se pesaron 2.5 mg de $[\text{Ru}_2(\text{PhNCHNPh})_3\text{Cl}_2]$, obtenido según el ejemplo 1.1., para formar 1.5 mL de disolución 1.94 mM en DMSO.

2.1.2. Preparación de una disolución de $[\text{Ru}_2(\text{PhNCHNPh})_3\text{Cl}_2(\text{DMSO})]$ en DMSO/agua.

La disolución preparada según el procedimiento descrito en 2.1.1. se diluyó con agua hasta conseguir una concentración 10 μM de $[\text{Ru}_2(\text{PhNCHNPh})_3\text{Cl}_2(\text{DMSO})]$.

2.2.1. Preparación de una disolución de $[\text{Ru}_2(\text{PhNNNPh})_3\text{Cl}_2(\text{DMSO})]$ en DMSO ($\text{PhNNNPh} = \text{N,N}'\text{-difeniltriazenuro}$).

Se pesaron 2.5 mg de $[\text{Ru}_2(\text{PhNNNPh})_3\text{Cl}_2]$, obtenido según el ejemplo 1.2., para formar 1.5 mL de disolución 1.94 mM en DMSO.

2.2.2. Preparación de una disolución de $[\text{Ru}_2(\text{PhNNNPh})_3\text{Cl}_2(\text{DMSO})]$ en DMSO/agua.

La disolución preparada según el procedimiento descrito en 2.2.1. se diluyó con agua hasta conseguir una concentración 10 μM de $[\text{Ru}_2(\text{PhNNNPh})_3\text{Cl}_2(\text{DMSO})]$.

La especie cristalizada a partir de las disoluciones de DMSO o de las disoluciones DMSO/agua obtenida según los ejemplos 2.1.1. y 2.1.2., respectivamente, es la misma: $[\text{Ru}_2(\text{PhNCHNPh})_3\text{Cl}_2(\text{DMSO})]$ (Figura 1).

Ejemplo 3. Tratamiento del ARN con compuestos de dirrutenio con estructura de rueda de paletas abierta (open-paddlewheel).

Se empleó el ARN ya utilizado en Lozano y otros. FEBS J, 2014, 281, 3685-3700. El ARN (2 pmol) se incubó con una disolución 10 μM del compuesto de dirrutenio $[\text{Ru}_2(\text{PhNCHNPh})_3\text{Cl}_2(\text{DMSO})]$.

Antes del tratamiento, el ARN sintetizado *in vitro* se replegó mediante desnaturalización a 95 °C durante 2 min en 5mM TRIS, pH 8, 0.5 mM EDTA y enfriamiento rápido en hielo durante 2 min, seguido de incubación en tampón de plegado (100 mM HEPES-KOH, pH 8.0, 0.5 mM MgCl_2 , 100 mM NaCl) durante 20 min a 37 °C en un volumen final de 18 μL (Lozano y otros. FEBS J, 2014, 281, 3685-3700). Seguidamente, el ARN se incubó con DMSO al 10% de concentración final (ARN-control) o con una disolución 10 μM de dirrutenio en DMSO/agua, preparado según el ejemplo 2, durante 15 minutos a 37 °C. Finalmente, el ARN tratado y el ARN-control se precipitaron con 2.5 volúmenes de etanol y se resuspendieron en 10 μL de 5 mM TRIS, pH 8, 0.5 mM EDTA.

Ejemplo 4. Reacción de extensión de cebador

El ARN tratado y el ARN-control (2 pmol) se incubaron, por separado, con un cebador de secuencia complementaria al ARN (2 pmol) y marcado en 5' con un fluoróforo (descrito en Lozano y otros. FEBS J, 2014, 281, 3685-3700) a 65 °C durante 5 min, después otros 5 min a 35 °C y, finalmente, se enfriaron 2 min con hielo. La reacción de extensión de cebador se realizó en un volumen final de 16 µL, en presencia de un tampón de transcriptasa reversa (50 mM TRIS-HCl, pH 8.3, 3 mM MgCl₂, 75 mM KCl, 8 mM DDT) y 1 µM de cada dNTP. La mezcla se calentó a 52 °C durante 1 min antes de añadir 100 U de Superscript III RT (Invitrogen) e incubar a 52 °C durante 30 min. En paralelo, se realizó una reacción de secuenciación con el mismo ARN bajo estudio (1 pmol), 0.1 mM ddCTP (terminador de cadena) y 0.5 mM cada dNTP. El cebador marcado con el fluoróforo NED (Applied Biosystems) se usó tanto para la muestra de ARN tratada como para el ARN-control, mientras que la reacción de secuenciación se realizó con el cebador marcado con fluoróforo FAM. Los productos resultantes de la RT junto con la reacción de secuenciación se resolvieron por electroforesis capilar.

Ejemplo 5. Análisis de los datos de la reacción de extensión de cebador

Los electroforegramas resultantes de la electroforesis capilar se analizaron mediante el programa QuSHAPE (Karabiber y otros, RNA 2013, 19, 63-67). Los valores de reactividad obtenidos para el nucleótido correspondiente del ARN-control se sustrajeron de los valores obtenidos para cada nucleótido del ARN tratado con el compuesto de dirrutenio con estructura de rueda de paletas abierta. La reactividad de al menos 3 experimentos independientes se utilizó para calcular la media ($\pm$ desviación estándar). Los valores de reactividad cuantitativos se normalizaron a una escala de 0 a 2, en la que 0 representa nucleótidos no reactivos y la intensidad media de los nucleótidos reactivos se ajusta a 1, tal y como se muestra en la figura 3.

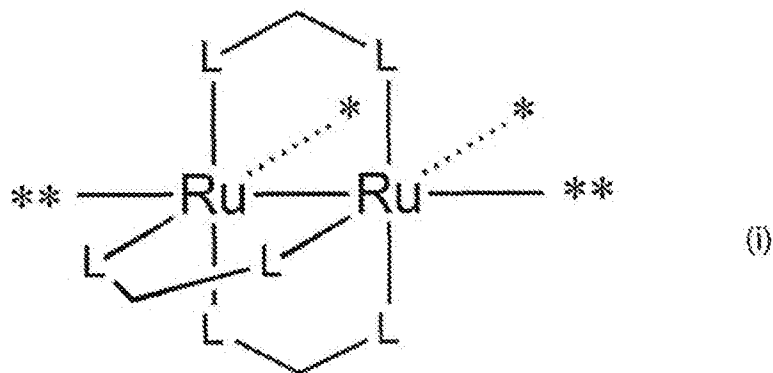
En la electroforesis por secuenciación capilar, se separa la escalera de secuenciación junto al ARN tratado o el ARN-control, dado que cada reacción lleva un fluoróforo diferente. Los picos de fluorescencia de la escalera obtenida con DDC (ver más arriba) marcan la posición de las guaninas en el ARN. Por ello, sirven para alinear los picos de la reacción de la RT con la posición nucleotídica correspondiente al ARN tratado.

En el caso de cebadores marcados con ^{32}P (como los descritos en Lozano y otros. FEBS J, 2014, 281, 3685-3700), la escalera de secuenciación se prepara con los cuatro terminadores de cadena (DDC, DDG, DDA y DDT), y se cargan en el gel de secuenciación en paralelo a la RT del ARN tratado y el ARN-control. Por lo tanto, se pueden identificar todos los nucleótidos del ARN. La movilidad de las paradas de la RT en el ARN tratado, y en el ARN-control, es coincidente en el gel desnaturizante con el nucleótido localizado en su misma posición.

REIVINDICACIONES

1. Compuestos de dirrutenio con estructura de rueda de paletas abierta (*open-paddlewheel*) de fórmula:

5



15 donde los dos átomos de Ru, unidos por enlace metal-metal, están soportados por tres ligandos puente (L-L) que forman, junto a los centros metálicos, un anillo; donde las dos posiciones ecuatoriales (*) y las dos posiciones axiales (**) están libres u ocupadas por ligandos monodentados y/o bidentados quelato; con la salvedad de $[Ru_2(\mu\text{-PhNCHNPh})_3X_2]$ (cuando X

20 = Cl, Br, I, NO_3 , CH_3CN).

2. Compuestos de dirrutenio con estructura de rueda de paletas abierta (*open-paddlewheel*) según la reivindicación 1 en los que los ligandos puente (L-L) se seleccionan del grupo formado por: formamidinato, guanidinato,

25 triazenuro, aminopiridinato, amidato, carboxilato, hidroxipiridinato, acetamidinato y/o benzamidinato.

3. Compuestos de dirrutenio con estructura de rueda de paletas abierta (*open-paddlewheel*) según cualquiera de las reivindicaciones 1-2 en los que

30 al menos una de las posiciones axiales (**) está ocupada por dimetilsulfóxido (DMSO) y/o etanol.

4. Disolución de un complejo de dirrutenio con estructura de rueda de paletas abierta (*open-paddlewheel*) según se define en la reivindicación 3, en medio

35 acuoso.

5. Método para elaborar compuestos de dirrutenio con estructura de rueda de paletas abierta (*open-paddlewheel*) que comprende los siguientes pasos:
- a) sintetizar compuestos de fórmula $[Ru_2(\text{carboxilato})(L-L)_3X']$ a partir de $[Ru_2(\text{carboxilato})_4X']$ ($X' = Cl, Br, I$) mediante sustitución parcial de los grupos carboxilato,
 - b) sintetizar compuestos de fórmula $[Ru_2(L-L)_3X'_2]$ ($X' = Cl, Br, I$) mediante la adición de ácido hidrácido (HX') a una suspensión de $[Ru_2(\text{carboxilato})(L-L)_3X']$,
y, opcionalmente,
 - c) sintetizar otros compuestos de fórmula $[Ru_2(L-L)_3X''_2]$ mediante intercambio de ligandos haluro X' por ligandos pseudohaluro X'' seleccionados del grupo formado por azida, tiocianato y/o cianato.
6. Método para elaborar compuestos de dirrutenio con estructura de rueda de paletas abierta (*open-paddlewheel*), según la reivindicación 5, en los que los ligandos puente (L-L) se seleccionan del grupo formado por: formamidinato, guanidinato, triazenuro, aminopiridinato, amidato, carboxilato, hidroxipiridinato, acetamidinato y/o benzamidinato.
7. Método para elaborar compuestos de dirrutenio con estructura de rueda de paletas abierta (*open-paddlewheel*), según cualquiera de las reivindicaciones 5-6, en el que el paso a) se realiza por síntesis solvotermal asistida por microondas.
8. Método para la determinación de las intersecciones entre hélices y/o de la transición entre hélices y bucles en moléculas de ARN que incluye:
- a) inducir el plegado en conformación nativa de ARN procedente de una muestra aislada o sintetizado *in vitro*,
 - b) tratar el ARN plegado con una disolución de compuesto de dirrutenio con estructura de rueda de paletas abierta (*open-paddlewheel*),
 - c) utilizar el ARN tratado con dirrutenio con estructura de rueda de paletas abierta como molde en reacciones de transcripción reversa (RT) con cebadores marcados,
 - d) identificar las paradas específicas de la RT del paso c).
9. Método según la reivindicación 8 en el que el compuesto de dirrutenio de los pasos b) y c) tiene la fórmula (i) donde los dos átomos de Ru, unidos por

enlace metal-metal, están soportados por tres ligandos puente (L-L) que forman, junto a los centros metálicos, un anillo; donde las dos posiciones ecuatoriales (*) y las dos posiciones axiales (**) están libres u ocupadas por ligandos monodentados y/o bidentados quelato.

5

10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 8-9 en el que ligandos puente de los compuestos de dirrutenio de los pasos b) y c) se seleccionan del grupo formado por: formamidinato, guanidinato, triazenuro, aminopiridinato, amidato, carboxilato, hidroxipiridinato, acetamidinato y/o benzamidinato.

10

11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 8-10 en el que el compuesto de dirrutenio de los pasos b) y c) está estabilizado con DMSO o con etanol.

15

12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 8-11 en el que el compuesto de dirrutenio de los pasos b) y c) se utiliza en medio acuoso.

13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 8-12 en el que se incluye un ARN-control plegado y diluido en el mismo medio que el ARN del paso a).

20

14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 8-13 en el que los cebadores utilizados en la RT están marcados con ^{32}P en su extremo 5'.

15. Método según cualquiera de las reivindicaciones 13-14 que incluye, en el paso d), las siguientes fases:

25

1) realizar reacciones de secuenciación del ARN procedente de la muestra aislada o sintetizado *in vitro*,

2) separar los productos de la secuenciación de la fase 1) junto con los productos de la RT del paso c),

30

3) detectar los productos de la secuenciación y los productos de la RT,

4) cuantificar la intensidad de los productos de parada de la RT con respecto al ARN-control.

16. Uso de complejos de dirrutenio con estructura de rueda de paletas abierta o de sus disoluciones en el estudio y análisis del ARN.

35

17. Combinaciones de ARN con compuestos de dirrutenio con estructura de rueda de paletas abierta.

5 18. Kit para determinar las intersecciones entre hélices y/o la transición entre hélices y bucles en moléculas de ARN que incluye uno o varios compuestos de dirrutenio con estructura de rueda de paletas abierta y un tampón adecuado para el tratamiento del ARN.

10 19. Kit según la reivindicación 18 en el que el/los compuestos de dirrutenio con estructura de rueda de paletas abierta tiene la fórmula (i) donde los dos átomos de Ru, unidos por enlace metal-metal, están soportados por tres ligandos puente (L-L) que forman, junto a los centros metálicos, un anillo; donde las dos posiciones ecuatoriales (*) y las dos posiciones axiales (**) están libres u ocupadas por ligandos monodentados y/o bidentados quelato.

15 20. Kit según la reivindicación 19 en el que los ligandos puente de los compuestos de dirrutenio se seleccionan del grupo formado por: formamidinato, guanidinato, triazenuro, aminopiridinato, amidato, carboxilato, hidroxipiridinato, acetamidinato y/o benzamidinato.

20 21. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 19-20 en el que el/los compuestos de dirrutenio están estabilizados con DMSO o con etanol.

25 22. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 19-21 que incluye un disolvente seleccionado del grupo formado por DMSO y etanol.

30

35

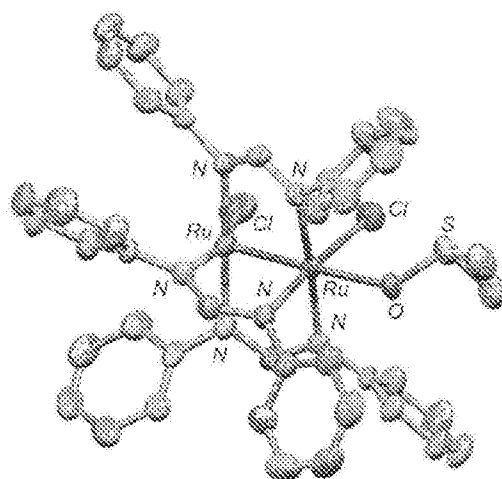


FIG 1

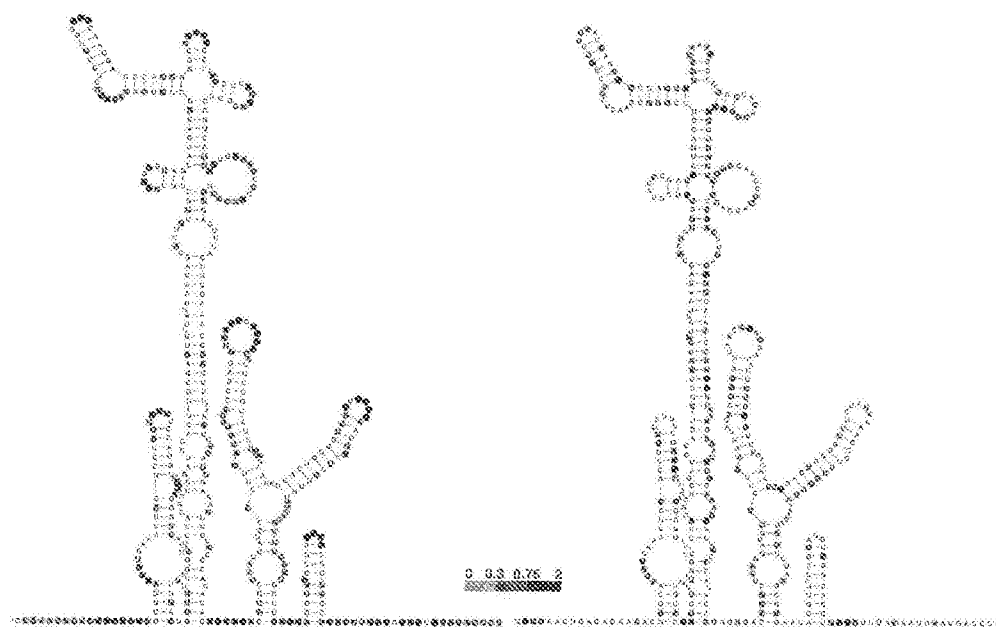


FIG 2

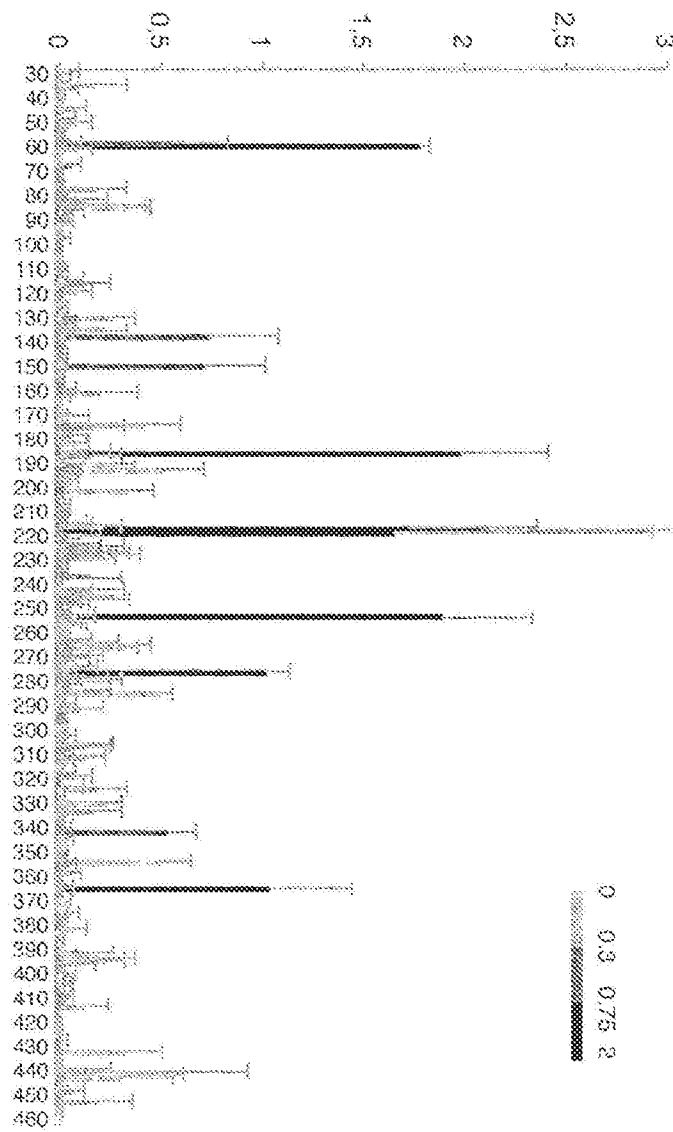


FIG 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2016/000081

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07F15/00 (2006.01)

G01N33/48 (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07F, G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

REGISTRY, HCAPLUS, EPODOC, INVENES, WPI

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BARRAL M CARMEN et al. The first open-paddlewheel structures in diruthenium chemistry: examples of intermediate magnetic behaviour between low and high spin in Ru ₂ ⁵⁺ species. Chemistry Eur. J. 2007, Vol. 13, No: 36, pages 10088 - 10095, ISSN 0947-6539 (Print), Doi: 10.1002/chem.200700494 pubmed:17907129	5-7
A		1-4, 8-22

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.	
"E" earlier document but published on or after the international filing date	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
16/11/2016

Date of mailing of the international search report
(22/11/2016)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer
E. Albarrán Gómez

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: 91 349 53 04

Telephone No. 91 3493038

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2016/000081

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BARRAL M C et al. Preparation, characterization, and crystal structure of [Ru2Cl(μ-O2CMe)(μ-PhNCHNPh)3]: a way to tris(formamidinato)diruthenium(II,III) complexes. INORGANIC CHEMISTRY COMMUNICATIONS, 2003.11.13, Vol. 7 , No. 1 , pages 42 - 46, ISSN 1387-7003, Doi:10.1016/j.inoche.2003.09.016. The whole document, in especial page 43, epígrafe 2.2.	5-7
A	BARRAL M C et al. Activation of isocyanate ligands in Ru ₂ ⁵⁺ complexes. JOURNAL OF MOLECULAR STRUCTURE, 12/11/2008, Vol. 890, No: 1-3 , pages 221 - 226, ISSN 0022-2860. Doi: 10.1016/j.molstruc.2008.04.018	1-22
P,X	LOZANO GLORIA et al. Fingerprinting the junctions of RNA structure by an open-paddlewheel diruthenium compound. RNA . Mar 2016, Vol. 22, No: 3, pages 330 - 338, ISSN 1469-9001 (Electronic). Doi: 10.1261/rna.054353.115 pubmed:26759454	1-22

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ES2016/000081

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C07F15/00 (2006.01)

G01N33/48 (2006.01)

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

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

C07F, G01N

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

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

REGISTRY, HCAPLUS, EPODOC, INVENES, WPI

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	BARRAL M CARMEN et al. The first open-paddlewheel structures in diruthenium chemistry: examples of intermediate magnetic behaviour between low and high spin in Ru ₂ ⁵⁺ species. Chemistry Eur. J. 2007, Vol. 13, N ^o 36, páginas 10088 - 10095, ISSN 0947-6539 (Print), DOI: 10.1002/chem.200700494 pubmed:17907129	5-7
A		1-4, 8-22

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

☐ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
16/11/2016

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
22 de noviembre de 2016 (22/11/2016)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
E. Albarrán Gómez
Nº de teléfono 91 3493038

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES2016/000081

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
A	BARRAL M C et al. Preparation, characterization, and crystal structure of [Ru ₂ Cl(μ-O ₂ CMe)(μ-PhNCHNPh) ₃]: a way to tris(formamidinato)diruthenium(II,III) complexes. INORGANIC CHEMISTRY COMMUNICATIONS, 2003.11.13, Vol. 7 , No. 1 , páginas 42 - 46, ISSN 1387-7003, Doi:10.1016/j.inoche.2003.09.016. Todo el documento, en especial página 43, epígrafe 2.2.	5-7
A	BARRAL M C et al. Activation of isocyanate ligands in Ru ₂ ⁵⁺ complexes. JOURNAL OF MOLECULAR STRUCTURE, 12/11/2008, Vol. 890, No: 1-3 , páginas 221 - 226, ISSN 0022-2860. Doi: 10.1016/j.molstruc.2008.04.018	1-22
P,X	LOZANO GLORIA et al. Fingerprinting the junctions of RNA structure by an open-paddlewheel diruthenium compound. RNA . Mar 2016, Vol. 22, No: 3, páginas 330 - 338, ISSN 1469-9001 (Electronic) . Doi: 10.1261/rna.054353.115 pubmed:26759454	1-22