



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 336 574**

51 Int. Cl.:
C07D 493/00 (2006.01)
A01N 1/02 (2006.01)
C07D 493/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05015467 .3**
96 Fecha de presentación : **24.06.1994**
97 Número de publicación de la solicitud: **1584622**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.10.2005**

54 Título: **Compuestos para la fotodescontaminación de patógenos en sangre.**

30 Prioridad: **28.06.1993 US 83459**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
14.04.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
14.04.2010

73 Titular/es: **Cerus Corporation**
2411 Stanwell Drive
Concord, California 94520, US

72 Inventor/es: **Wollowitz, Susan;**
Isaacs, Stephen;
Spielman, Hans Peter y
Rapoport, Henry

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 336 574 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

Compuestos para la fotodescontaminación de patógenos en sangre.

5 Campo de la invención

La presente invención proporciona psoralenos y procedimientos de síntesis de psoralenos nuevos que poseen una mayor capacidad de inactivar patógenos en hemoderivados en presencia de luz ultravioleta sin afectar significativamente a la función del hemoderivado ni presentar acción mutágena.

10 Antecedentes

La contaminación por patógenos en el suministro de sangre sigue siendo un problema médico importante en todo el mundo. Aunque los procedimientos de ensayo mejorados para la hepatitis B (HBV), hepatitis C (HCV) y el virus de inmunodeficiencia humana (HIV) han reducido marcadamente la incidencia de enfermedades asociadas a las transfusiones, el público está perdiendo confianza en la seguridad del suministro de sangre debido a la publicidad de casos de transmisión de estos virus relacionadas con las transfusiones.

Por ejemplo, la reciente introducción de un ensayo de sangre para HCV reducirá la transmisión de este virus; pero tiene una sensibilidad de sólo 67% para la detección de unidades de sangre probablemente infecciosa. El HCV es responsable del 90% de las hepatitis asociadas con las transfusiones. Melnick, J.L., en resúmenes de Virological Safety Aspects of Plasma; Cannes, 3-6 de noviembre (1992), pág. 9. Se estima que, usando este ensayo, el riesgo de infección es de 1 entre 3300 unidades transfundidas.

Análogamente, si bien hay disponibles ensayos serológicos más sensibles para HIV-1 y HBV, estos agentes pueden ser transmitidos a pesar de ello por donantes de sangre seronegativos. International Forum: Vox Sang 32:346 (1977). Ward, J. W. y otros, N. Engl. J. Med., 318:473 (1988). Hasta un 10% del total de las hepatitis relacionadas con transfusiones y un 25% de casos de ictericia grave son debidos a HBV transmitido por donantes negativos para el antígeno superficial de la hepatitis B (HBsAg). Hasta ahora, entre los receptores de sangre previamente ensayada como negativa de anticuerpo contra HIV-1, el Centro de Control de Enfermedades (CDC), ha dado cuenta de 15 casos de infecciones por HIV asociadas con la transfusión.

Además, rutinariamente no se realizan pruebas para otros virus, bacterias y agentes y siguen siendo una amenaza potencial para la seguridad de las transfusiones. Schumunis, G.A., Transfusion 31:547-557 (1992). Además, un ensayo no garantiza la seguridad del suministro de sangre frente a futuros patógenos desconocidos que pueden infectar a la población de donantes, lo que da por resultado una transmisión asociada a las transfusiones antes de que se puedan aplicar ensayos sensibles.

Incluso si los ensayos de seroconversión fueran una exploración suficiente, su aplicación puede no ser práctica. Por ejemplo, el Cytomegalovirus (CMV- un virus de herpes) y parvovirus B19 son habituales en los seres humanos. Cuando se presentan en adultos sanos inmunocompetentes, casi siempre producen una seroconversión asintomática. A causa de que una gran parte de la población es seropositiva, la exclusión de las unidades positivas provocaría una limitación sustancial del suministro de sangre.

Un enfoque alternativo para eliminar la transmisión de enfermedades virales a través de hemoderivados es el desarrollo de medios para inactivar los patógenos en los productos para transfusiones. El desarrollo de una tecnología eficaz para inactivar patógenos infecciosos en hemoderivados ofrece el potencial de mejorar la seguridad del suministro de sangre y, acaso, de ralentizar la introducción de nuevos ensayos, tales como el ensayo para HIV-2 recientemente introducido, para patógenos poco frecuentes. Finalmente, la tecnología de descontaminación podría reducir significativamente el coste de hemoderivados y aumentar la disponibilidad de los escasos hemoderivados.

Para ser útil, tal procedimiento de inactivación (i) no debe afectar perjudicialmente la función para la que se transfunde el hemoderivado, (ii) debe inactivar a fondo los patógenos existentes en el hemoderivado y (iii) no debe afectar perjudicialmente a los receptores del hemoderivado. Se ha dado cuenta de varios procedimientos para la inactivación o eliminación de agentes virales en hemoderivados exentos de eritrocitos. Sin embargo, la mayoría de estas técnicas son completamente incompatibles con el mantenimiento de la función de las plaquetas, un importante hemoderivado. Son ejemplos de estas técnicas: calor (Hilfenhous, J. y otros, J. Biol. Std. 70:589 (1987)), tratamiento con disolvente/detergente (Horowitz, B. y otros, Transfusion 25:516 (1985)), radiación γ (Moroff, G. y otros, Transfusion 26:453 (1986)), radiación ultravioleta (UV) combinada con propriolactona beta (Prince, A.M. y otros, Reviews of Infect. Diseases 5:92-107 (1983)), luz láser visible en combinación con hematoporfirinas (Matthews, J.L. y otros, Transfusion 28:81-83 (1988), North J. y otros, Transfusion 32:121-128 (1992)), uso de los tintes fotoactivos ftalocianina de aluminio y merocianina 540 (Sieber F. y otros, Blood 73:345-350 (1989), Rywkin, S. y otros, Blood 78 (supl. 1): 352a (Abstract) (1991) o UV sola (Proudouz, K. N. y otros, Blood 70:589 (1987)).

Otros procedimientos inactivan los agentes virales por tratamiento con furocumarinas, tales como los psoralenos, en presencia de luz ultravioleta. Los psoralenos son compuestos tricíclicos formados por condensación lineal de un anillo de furano con una cumarina. Los psoralenos se pueden intercalar entre los pares de base de ácidos nucleicos bicatenarios formando aductos covalentes con bases de pirimidina después de la absorción de luz ultravioleta de onda

larga (UVA). G. D. Cimino y otros, *Ann. Rev. Biochem.* 54:1151 (1985); Hearst y otros, *Quart. Rev. Biophys.* 17:1 (1984). Si hay una segunda pirimidina adyacente a un monoadducto de psoraleno y pirimidina y en la cadena opuesta, la absorción de un segundo fotón puede conducir a la formación de un diadducto que actúa en forma de un enlace entre cadenas. S. T. Isaacs y otros, *Biochemistry* 16:1058 (1977); S. T. Isaacs y otros, *Trends in Photobiology* (Plenum) págs. 279-294 (1982), J. Tessman y otros, *Biochem.* 24:1669 (1985), Hearst y otros, patentes de Estados Unidos N.º 4.124.598, 4.169.204 y 4.196.281.

Los psoralenos unidos covalentemente actúan como inhibidores de la replicación de DNA y tienen así el potencial de parar el proceso de replicación. Debido a esta capacidad de unirse a DNA, los psoralenos tienen un interés particular en cuanto a la resolución de los problemas inherentes a la creación y mantenimiento de un suministro de sangre sin patógenos. Algunos psoralenos conocidos han revelado que inactivan virus en algunos hemoderivados. H. J. Alter y otros, *The Lancet*, (ii:1446) (1988); L. Lin y otros, *Blood* 74:517 (1989) (descontaminan concentrados de plaquetas); G. P. Wisehahn y otros, las patentes de Estados Unidos N.º 4.727.027 y 4.748.120 describen el uso de una combinación de 8-metoxipsoraleno (8-MOP) e irradiación, P. Morel y otros, *Blood Cells* 18:276 (1992) señalan que 300 µg/ml de 8-MOP junto con 10 horas de irradiación con luz ultravioleta pueden inactivar eficazmente virus en suero humano. Otros investigadores han presentado estudios similares usando 8-MOP y psoraleno aminometiltrimetilico (AMT). Dodd RY y otros, *Transfusion* 31:483-490 (1991); Margolis-Nunno, H. y otros, *Thromb Haemostas* 65:1162. (Abstract) (1991). En efecto, se ha establecido la fotoinactivación de un amplio espectro de microorganismos, incluidos HBV, HCV y HIV, en condiciones diferentes de las usadas en la presente invención y usando derivados de psoraleno previamente conocidos. [Hanson, C. V., *Blood Cells*, 18:7-24 (1992); Alter, H. y otros, *The Lancet* ii: 1446 (1989); Margolis-Nunno, H y otros, *Thromb Haemostas* 65:1162 (Abstract) (1991)].

La fotoinactivación por psoraleno es sólo factible si la capacidad del psoraleno de inactivar virus es suficiente para asegurar un margen de seguridad en el que se producirá la inactivación completa. Por otra parte, el psoraleno no debe causar un daño al hemoderivado. Los procedimientos que acaban de describirse, cuando se aplican usando psoralenos conocidos, requieren el uso de procedimientos difíciles y caros para evitar daños a los hemoderivados. Por ejemplo, algunos compuestos y protocolos han necesitado la eliminación de oxígeno molecular de la mezcla de reacción antes de la exposición a la luz para evitar dañar los hemoderivados mediante los radicales de oxígeno producidos durante la irradiación. Véase Lin y otros, *Blood* 74:517 (1989); patente de Estados Unidos N.º 4.727.027, de Wisehahn. Este es un procedimiento costoso y que requiere tiempo.

Finalmente, algunos compuestos comúnmente conocidos usados en la descontaminación fotoquímica (PCD) exhiben una acción mutágena indeseable que parece que aumenta al crecer la capacidad de inactivar los virus. En otras palabras, cuanto más eficaces son los compuestos conocidos para inactivar los virus, más lesivos son los compuestos para el receptor y, por tanto, son menos útiles en cualquier punto de un sistema de inactivación de productos para uso *in vivo*.

Se necesita un nuevo compuesto psoraleno que tenga una capacidad mejorada de inactivar patógenos y una capacidad mutagénica baja, que no cause un daño significativo a los hemoderivados para los que se usa, y que no necesite eliminar el oxígeno, que asegure así una inactivación segura y completa de patógenos en los procedimientos de descontaminación de sangre.

LEE B L *ET AL*: "INTERACTION OF PSORALEN-DERIVATIZED OLIGODEOXYRIBONUCLEOSIDE METHYLPHOSPHONATES WITH SINGLESTRANDED DNA" *BIOCHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY*. EASTON, PA, US, vol. 27, n.º 9, 1988, páginas 3197-3203, divulga la síntesis de 4'-[N-(2-aminoetil)amino]metil]4,5',8-trimetilpsoraleno y 4'-[N-(2-aminobutil)amino]metil]-4,5',8-trimetilpsoraleno y dichos compuestos en sí.

El documento DE 38 04243 A1 divulga la síntesis de 4'-(9''-Amino-2'',6''-diazanonil)-4,5',8-trimetilpsoraleno a partir de 4'-Clorometil-4,5',8-trimetilpsoraleno y la amina correspondiente N,N-Bis-(diaminopropil)-aminometano y dicho compuesto *per se*.

LEE B L *ET AL*: "Interaction of psoralen-derivatized oligodeoxyribonucleoside methylphosphonates with synthetic DNA containing a promoter for T7 RNA polymerase". *NUCLEIC ACIDS RESEARCH* 25 NOV 1988, vol. 16, n.º 22,25 divulga el compuesto 4'-N(2-aminoetil)aminometil-4,5',8-trimetilpsoraleno.

OSER A *ET AL*: "Sensitive non-radioactive dot-blot hybridization using DNA probes labelled with chelate group substituted psoralen and quantitative detection by europium ion fluorescence" *NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB*, vol. 16, n.º 3, 1988, páginas 1181-1196, divulga la síntesis de 4'-(9''-amino-2'',6''-diazanonil)-4,5',8-trimetilpsoraleno y dicho compuesto *per se*.

THADEN J *ET AL*: "PHOTOAFFINITY BEHAVIOR OF A CONJUGATE OF OLIGONUCLEOSIDE METHYLPHOSPHONATE, RHODAMINE, AND PSORALEN IN THE PRESENCE OF COMPLEMENTARY OLIGONUCLEOTIES" *BIOCONJUGATE CHEMISTRY, ACS, WASHINGTON, DC, US*, vol. 4, n.º 5, 1993, páginas 386-394, divulga el compuesto 4'-[N-(2-aminoetil)aminometil]-4,5',8-trimetilpsoraleno [(ae(AMT))].

Sumario de la invención

La presente invención se define en las reivindicaciones y proporciona nuevos psoralenos y procedimientos de síntesis de nuevos psoralenos que tienen una mayor capacidad de inactivar patógenos en presencia de luz ultravioleta que no está relacionada con la actividad mutágena. La presente invención también proporciona procedimientos de usar compuestos nuevos y conocidos para inactivar patógenos en productos relacionados con la sanidad para emplear en medios sintéticos.

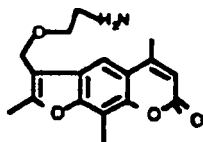
La presente invención contempla también procedimientos de síntesis de varios compuestos de la presente invención. En una realización, la presente invención contempla un procedimiento de síntesis de 4'-(ω -amino-2-oxa)alquil-4,5',8-trimetilpsoraleno, que comprende las etapas: (a) proporcionar 4'-(ω -hidroxi-2-oxa)alquil-4,5',8-trimetilpsoraleno; (b) tratar el 4'-(ω -hidroxi-2-oxa)alquil-4,5',8-trimetilpsoraleno con una base y cloruro de metanosulfonilo de manera que se produzca 4'-(ω -metanosulfonilo-2-oxa)alquil-4,5',8-trimetilpsoraleno; (c) tratar el 4'-(ω -metanosulfonilo-2-oxa)alquil-4,5',8-trimetilpsoraleno con azida sódica de manera que se produzca 4'-(ω -azido-2-oxa)alquil-4,5',8-trimetilpsoraleno, y (d) reducir 4'-(ω -azido-2-oxa)alquil-4,5',8-trimetilpsoraleno de manera que se produzca 4'-(ω -amino-2-oxa)alquil-4,5',8-trimetilpsoraleno. En una realización de este procedimiento de síntesis, el 4'-(ω -amino-2-oxa)alquil-4,5',8-trimetilpsoraleno es 4'-[(4-amino-2-oxa)butil-4,5',8-trimetilpsoraleno. En otra realización, en la etapa (d), el 4'-[(4-azido-2-oxa)butil-4,5',8-trimetilpsoraleno se reduce con trifenilfosina. La presente invención contempla además un compuesto de psoraleno producido por el procedimiento de síntesis descrito antes, que comprende 4'-[(4-amino-2-oxa)butil-4,5',8-trimetilpsoraleno.

La presente invención contempla un procedimiento para sintetizar otro compuesto de psoraleno que tiene un sustituyente R_1 en el carbono 4', que se selecciona a partir del grupo que comprende $-(CH_2)_w-O-(CH_2)_z-NH_2$, en el que $x = z$, y los sustituyentes R_5 , R_6 y R_7 en los átomos de carbono 4, 5' y 8, respectivamente, seleccionados independientemente entre el grupo que comprende H y $(CH_2)_vCH_3$, en el que v es un número entero de 0 a 5, que comprende las etapas de: (a) proporcionar un 4'-halometil-4,5',8-trimetilpsoraleno que se selecciona a partir del grupo que comprende 4'-clorometil-4,5',8-trimetilpsoraleno, 4'-bromometil-4,5',8-trimetilpsoraleno y 4'-yodometil-4,5',8-trimetilpsoraleno; (b) tratar el mencionado 4'-halometil-4,5',8-trimetilpsoraleno con $HO(CH_2)_xO(CH_2)_zOH$ de manera que se produzca 4'-(ω -hidroxi-2,n-dioxa)alquil-4,5',8-trimetilpsoraleno, en el que $n = x+3$; (c) tratar el mencionado 4'-(ω -hidroxi-2,n-dioxa)alquil-4,5',8-trimetilpsoraleno con una base y cloruro de metanosulfonilo de manera que se produzca 4'-(ω -metanosulfonilo-2,n-dioxa)alquil-4,5',8-trimetilpsoraleno; (d) tratar el 4'-(ω -metanosulfonilo-2,n-dioxa)alquil-4,5',8-trimetilpsoraleno con azida sódica, con lo que se produce 4'-(ω -azido-2,n-dioxa)alquil-4,5',8-trimetilpsoraleno y (e) reducir 4'-(ω -azido-2,n-dioxa)alquil-4,5',8-trimetilpsoraleno produciéndose 4'-(ω -amino-2,n-dioxa)alquil-4,5',8-trimetilpsoraleno. En una realización alternativa, la presente invención contempla un procedimiento de síntesis de 4'-(12-amino-8-aza-2,5-dioxa)dodecil-4,5',8-trimetilpsoraleno que comprende las etapas de (a) proporcionar un 4'-halometil-4,5',8-trimetilpsoraleno que se selecciona a partir del grupo que comprende 4'-clorometil-4,5',8-trimetilpsoraleno, 4'-bromometil-4,5',8-trimetilpsoraleno y 4'-yodometil-4,5',8-trimetilpsoraleno; (b) tratar el mencionado 4'-halometil-4,5',8-trimetilpsoraleno con dietilenglicol, con lo que se forma 4'-(7-hidroxi-2,5-dioxa)heptil-4,5',8-trimetilpsoraleno; (c) tratar el 4'-(7-hidroxi-2,5-dioxa)heptil-4,5',8-trimetilpsoraleno con una base y cloruro de metanosulfonilo, con lo que se produce 4'-(7-metanosulfonilo-2,5-dioxa)heptil-4,5',8-trimetilpsoraleno; (d) tratar 4'-(7-metanosulfonilo-2,5-dioxa)heptil-4,5',8-trimetilpsoraleno con 1,4-diaminobutano con lo que se forma 4'-(12-amino-8-aza-2,5-dioxa)dodecil-4,5',8-trimetilpsoraleno.

En una realización alternativa, la presente invención contempla un procedimiento de sintetizar 4'-(14-amino-2,6,11-triaza)tetradecil-4,5',8-trimetilpsoraleno, que comprende:

a) proporcionar 4,5',8-trimetilpsoralen-4'-carboxaldehído; b) tratar 4,5',8-trimetilpsoralen-4'-carboxaldehído con espermina y un agente reductor para producir 4'-(14-amino-2,6,11-triaza)tetradecano-4,5',8-trimetilpsoraleno.

La invención contempla un compuesto que tiene la fórmula



o una de sus sales. La invención contempla también un compuesto psoraleno que comprende: (a) un sustituyente R_1 en el átomo de carbono 4', seleccionado ente el grupo que comprende: $-(CH_2)_w-O-(CH_2)_z-NH_2$, $-(CH_2)_w-O-(CH_2)_x-R_3-(CH_2)_z-NH_2$, y $-(CH_2)_w-O-(CH_2)_x-R_3-(CH_2)_y-R_4-(CH_2)_z-NH_2$; en los que R_3 y R_4 se seleccionan independientemente entre el grupo que comprende O y NH, en el que w es un número entero de 1 a 5, x es un número entero de 2 a 5, y es un número entero de 2 a 5 y z es un número entero de 2 a 6; y (b) sustituyentes R_5 , R_6 y R_7 en los átomos de carbono 4, 5' y 8, respectivamente, seleccionados independientemente entre el grupo que comprende H y $(CH_2)_vCH_3$, en el que v es un número entero de 0 a 5; o una de sus sales. La presente invención contempla varias realizaciones de este compuesto, incluidos aquellos en los que: el sustituyente R_1 es $-CH_2-O-(CH_2)_2-NH_2$, y los sustituyentes R_5 , R_6 y R_7 son CH_3 ; en los que el sustituyente R_1 es $-CH_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-NH_2$ y los sustituyentes R_5 , R_6 y R_7 son CH_3 ; en los que el mencionado sustituyente R_1 es $-CH_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-NH-(CH_2)_4-NH_2$ y los sustituyentes R_5 , R_6 y R_7 son todos CH_3 ; en los que el mencionado sustituyente R_1 es $CH_2-NH-(CH_2)_4-NH_2$ y los sustituyentes R_5 , R_6 y R_7

ES 2 336 574 T3

son todos CH_3 ; y en los que el sustituyente R_1 es $-\text{CH}_2-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$ y los sustituyentes R_5 , R_6 y R_7 son CH_3 .

Finalmente, la presente invención contempla varias realizaciones de medios sintéticos de almacenamiento de plaquetas. En una realización, el medio sintético de almacenamiento de plaquetas comprende una solución acuosa de: cloruro sódico 45-100 mM; cloruro potásico 4-5 mM; citrato 10-15 mM; acetato sódico 20-27 mM; glucosa 0-2 mM, manitol 0-30 mM; fosfato sódico aproximadamente 20 mM; cloruro magnésico 2-3 mM; y un 4'-amino primario-psoraleno, a una concentración entre aproximadamente 1 y 250 μM . En otra realización, el medio sintético de almacenamiento de plaquetas comprende una solución acuosa de: cloruro sódico 45-100 mM; citrato 8-15 mM; acetato sódico 20-35 mM, fosfato sódico aproximadamente 26 mM; un 4'-amino primario-psoraleno a una concentración entre aproximadamente 1 y 250 μM . Específicamente, en una realización de este medio, el medio comprende cloruro sódico 86 mM, citrato 10 mM, acetato sódico 30 mM, fosfato sódico aproximadamente 26 mM y 4'-(4-amino-2-oxa)butil-4,5',8-trimetilpsoraleno a una concentración entre aproximadamente 1 y 250 μM .

15 Descripción de los dibujos

La Fig. 1 detalla el esquema de síntesis del compuesto de dos isómeros de bromometil-trialquilpsoraleno.

La Fig. 2 detalla el esquema de síntesis del compuesto de varios psoralenos 4'-amino primario sustituidos.

20 La Fig. 3 detalla el esquema de síntesis del compuesto de varios psoralenos 4'-amino primario sustituidos.

La Fig. 4 detalla el esquema de síntesis del compuesto de varios psoralenos que tienen una amina terminal unida al psoraleno en la posición 4' por una cadena alquilo

25 "Fig. 5 a 9" es numeración que no se emplea.

La Fig. 10A es un diagrama de rutas de síntesis y estructuras químicas de los compuestos 8, 13 y 14 de la presente invención.

30 La Fig. 10B es un diagrama de rutas de síntesis y estructuras químicas de los compuestos 2, 4 y 7 de la presente invención.

La Fig. 10C es un diagrama de rutas de síntesis y estructuras químicas de los compuestos 1, 5, 6, 9 y 10 de la presente invención.

35 La Fig. 10D es un diagrama de rutas de síntesis y estructuras químicas de los compuestos 12 y 15 de la presente invención.

La Fig. 10E es un diagrama de rutas de síntesis y estructuras químicas del compuesto 3 de la presente invención.

40 La Fig. 10F es un diagrama de rutas de síntesis y estructuras químicas de los compuestos 16 y 17 de la presente invención.

La Fig. 11 presenta el impacto de la concentración sobre el log de inactivación de R17 cuando se fotoactivan los compuestos 1-3 de la presente invención.

45 La Fig. 12 presenta el impacto de la concentración sobre el log de inactivación de R17 cuando se fotoactivan los compuestos 3-6 de la presente invención.

50 La Fig. 13 presenta el impacto de la concentración sobre el log de inactivación de R17 cuando se fotoactivan los compuestos 2 y 6 de la presente invención.

La Fig. 14 presenta el impacto de la concentración sobre el log de inactivación de R17 cuando se fotoactivan los compuestos 6 y 18 de la presente invención.

55 La Fig. 15 presenta el impacto de la concentración sobre el log de inactivación de R17 cuando se fotoactiva el compuesto 16 de la presente invención.

La Fig. 16 presenta el impacto de la variación de julios/cm² (vatios/cm²) de irradiación sobre el título logarítmico de R17 para el compuesto 6 de la presente invención.

60 La Fig. 17 presenta el impacto de la variación de julios/cm² de irradiación sobre el título logarítmico de R17 para los compuestos 7, 9 y 10 de la presente invención.

La Fig. 18 presenta el impacto de la variación de julios/cm² de irradiación sobre el título logarítmico de R17 para los compuestos 7 y 12 de la presente invención.

65 La Fig. 19 presenta el impacto de la variación de julios/cm² de irradiación sobre el título logarítmico de R17 para el compuesto 15 de la presente invención.

ES 2 336 574 T3

La Fig. 20 presenta el impacto de la variación de julios/cm² de irradiación sobre el título logarítmico de R17 para el compuesto 17 de la presente invención.

5 La Fig. 21 presenta el impacto de la variación de julios/cm² de irradiación sobre el título logarítmico de R17 para los compuestos 6 y 17 de la presente invención.

La Fig. 22 presenta el impacto de la variación de julios/cm² de irradiación sobre el título logarítmico de R17 para los compuestos 6 y 15 de la presente invención.

10 La Fig. 23 presenta el efecto de la variación de la concentración de los compuestos 2 y 6 de la presente invención en plasma.

La Fig. 24 presenta el efecto de la variación de la concentración de los compuestos 2 y 6 de la presente invención en medio sintético.

15 “Fig. 25” es numeración que no se emplea.

20 La Fig. 26A es un gráfico comparativo de un control de un día (C1), un control almacenado 5 días (D5), luz ultravioleta sola (uv) y tratamiento con luz ultravioleta y el compuesto 2 a 100 μ M (PCD) por sus efectos sobre la función de plaquetas medida por recuento de plaquetas. “n” representa el número de experimentos representado por el punto del dato.

25 La Fig. 26B es un gráfico comparativo de un control de un día (C1), un control almacenado 5 días (D5), luz ultravioleta sola (uv) y tratamiento con luz ultravioleta y el compuesto 2 a 100 μ M (PCD) por sus efectos sobre la función de plaquetas medida por la agregación de plaquetas. “n” representa el número de experimentos representado por el punto del dato.

30 La Fig. 26C es un gráfico comparativo de un control de un día (C1), un control almacenado 5 días (D5), luz ultravioleta sola (uv) y tratamiento con luz ultravioleta y el compuesto 2 a 100 μ M (PCD) por sus efectos sobre la función de plaquetas medida por la expresión de GMP-140. “n” representa el número de experimentos representado por el punto del dato.

35 La Fig. 26D es un gráfico comparativo de un control de un día (C1), un control almacenado 5 días (D5), luz ultravioleta sola (uv) y tratamiento con luz ultravioleta y el compuesto 2 a 100 μ M (PCD) por sus efectos sobre la función de plaquetas medida por el pH. “n” representa el número de experimentos representado por el punto del dato.

40 La Fig. 27A es un gráfico comparativo de un control de un día (C1), un control almacenado 5 días (D5), luz ultravioleta sola (uv) y tratamiento con luz ultravioleta y el compuesto 6 a 100 μ M (PCD) por sus efectos sobre la función de plaquetas medida por recuento de plaquetas. “n” representa el número de experimentos representado por el punto del dato.

45 La Fig. 27B es un gráfico comparativo de un control de un día (C1), un control almacenado 5 días (D5), luz ultravioleta sola (uv) y tratamiento con luz ultravioleta y el compuesto 6 a 100 μ M (PCD) por sus efectos sobre la función de plaquetas medida por agregación de plaquetas. “n” representa el número de experimentos representado por el punto del dato.

50 La Fig. 27C es un gráfico comparativo de un control de un día (C1), un control almacenado 5 días (D5), luz ultravioleta sola (uv) y tratamiento con luz ultravioleta y el compuesto 6 a 100 μ M (PCD) por sus efectos sobre la función de plaquetas medida por expresión de GMP-140. “n” representa el número de experimentos representado por el punto del dato.

55 La Fig. 27D es un gráfico comparativo de un control de un día (C1), un control almacenado 5 días (D5), luz ultravioleta sola (uv) y tratamiento con luz ultravioleta y el compuesto 6 a 100 μ M (PCD) por sus efectos sobre la función de plaquetas medida por el pH. “n” representa el número de experimentos representado por el punto del dato.

60 La Fig. 28A es un gráfico comparativo de un control de un día (C1), un control almacenado 5 días (D5), luz ultravioleta sola (uv) y tratamiento con luz ultravioleta y el compuesto 17 a 100 μ M (PCD) por sus efectos sobre la función de plaquetas medida por recuento de plaquetas. “n” representa el número de experimentos representado por el punto del dato.

65 La Fig. 28B es un gráfico comparativo de un control de un día (C1), un control almacenado 5 días (D5), luz ultravioleta sola (uv) y tratamiento con luz ultravioleta y el compuesto 17 a 100 μ M (PCD) por sus efectos sobre la función de plaquetas medida por agregación de plaquetas. “n” representa el número de experimentos representado por el punto del dato.

La Fig. 28C es un gráfico comparativo de un control de un día (C1), un control almacenado 5 días (D5), luz ultravioleta sola (uv) y tratamiento con luz ultravioleta y el compuesto 17 a 100 μ M (PCD) por sus efectos sobre la función de plaquetas medida por expresión de GMP-140. “n” representa el número de experimentos representado por el punto del dato.

ES 2 336 574 T3

La Fig. 28D es un gráfico comparativo de un control de un día (C1), un control almacenado 5 días (D5), luz ultravioleta sola (uv) y tratamiento con luz ultravioleta y el compuesto 17 a 100 μ M (PCD) por sus efectos sobre la función de plaquetas medida por el pH. “n” representa el número de experimentos representado por el punto del dato.

5 La Fig. 29A es un gráfico comparativo de un control de un día (C1), un control almacenado 5 días (D5), luz ultravioleta sola (uv) y tratamiento con luz ultravioleta y el compuesto 18 a 100 μ M (PCD) por sus efectos sobre la función de plaquetas medida por recuento de plaquetas. “n” representa el número de experimentos representado por el punto del dato.

10 La Fig. 29B es un gráfico comparativo de un control de un día (C1), un control almacenado 5 días (D5), luz ultravioleta sola (uv) y tratamiento con luz ultravioleta y el compuesto 18 a 100 μ M (PCD) por sus efectos sobre la función de plaquetas medida por agregación de plaquetas. “n” representa el número de experimentos representado por el punto del dato.

15 La Fig. 29C es un gráfico comparativo de un control de un día (C1), un control almacenado 5 días (D5), luz ultravioleta sola (uv) y tratamiento con luz ultravioleta y el compuesto 18 a 100 μ M (PCD) por sus efectos sobre la función de plaquetas medida por expresión de GMP-140. “n” representa el número de experimentos representado por el punto del dato.

20 La Fig. 29D es un gráfico comparativo de un control de un día (C1), un control almacenado 5 días (D5), luz ultravioleta sola (uv) y tratamiento con luz ultravioleta y el compuesto 18 a 100 μ M (PCD) por sus efectos sobre la función de plaquetas medida por el pH. “n” representa el número de experimentos representado por el punto del dato.

Descripción de la invención

25 La presente invención se define en las reivindicaciones y proporciona psoralenos novedosos y procedimientos de síntesis de nuevos psoralenos que tienen una mayor capacidad de inactivar patógenos en presencia de luz ultravioleta. Los nuevos psoralenos son eficaces contra una amplia variedad de patógenos. La presente invención también proporciona procedimientos de usar compuestos nuevos y conocidos para inactivar patógenos en productos sanitarios a emplear *in vivo* e *in vitro* y, en particular a hemoderivados, sin afectar significativamente a la función del hemoderivado ni exhibir acción mutágena.

30 La descripción de la invención se divide en las secciones siguientes: (I) Síntesis de Compuestos, (II) Unión de compuestos a Ácido Nucleico, (III) Inactivación de Contaminantes y (IV) Conservación de Propiedades Bioquímicas del Material Tratado.

I. Síntesis de compuestos

A. Compuestos con fotoactivación en general

40 La expresión “compuestos con fotoactivación” (o “compuestos fotorreactivos”) define una familia de compuestos que experimentan un cambio químico en respuesta a la radiación electromagnética. La Tabla 1 es una lista parcial de compuestos con fotoactivación.

45 TABLA 1

Compuestos con fotoactivación

50 Actinomicinas

Antraciclínonas

Antramícina

55 Benzodipironas

Fluorenos y Fluorenonas

Furocumarinas

60 Mitomicina

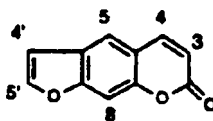
Azul Rápido de Monostral

65 Norfilina A

Muchos colorantes orgánicos no listados específicamente Fenantridinas, Sales de Fenazationio, Fenazinas, Fenotiazinas, Fenilazidas, Quinolininas, Tiaxantenonas.

ES 2 336 574 T3

Las especies preferidas de compuestos fotorreactivos descritos en este contexto comúnmente se denominan furocumarinas. En particular, la presente invención contempla los compuestos descritos como psoralenos: [7H-furo(3,2-g-(1)-benzo-piran-7-ona, o β -lactona del ácido 6-hidroxi-5-benzofuranacrílico], que son lineales:



y en los que los dos restos de oxígeno anexionados al resto central aromático tienen una orientación 1, 3 y, además, en los que el resto del anillo de furano está unido a la posición 6 del sistema de cumarina de dos anillos. Los derivados de psoraleno derivan por sustitución de la furocumarina lineal en las posiciones 3, 4, 5, 8, 4' o 5'.

El 8-metoxipsoraleno (conocido en la bibliografía bajo distintos nombres, por ejemplo, xantotoxina, metoxalen, 8-MOP) es un psoraleno natural con una unión fotoactivada relativamente baja a ácidos nucleicos y una acción mutágena baja en el ensayo de Ames, que se describe en la sección experimental siguiente. El 4'-aminometil-4,5',8-trimetilpsoraleno (AMT) es uno de los derivados de psoraleno que se unen a ácidos nucleicos más reactivos, que proporcionan hasta 1 aducto AMT por 3,5 pares de bases de DNA. S. T. Isaacs, G. Wiessehahn y L. M. Hallick, NCI Monograph 66:21 (1984). Sin embargo, el AMT también exhibe unos niveles de acción mutágena considerable. Se deseaba un nuevo grupo de psoralenos que tuviera las mejores características de 8-MOP y de AMT: baja acción mutágena y alta afinidad de unión a ácidos nucleicos con el fin de lograr una inactivación segura y meticulosa de patógenos. Los compuestos de la presente invención se diseñaron para que fueran esos compuestos.

Los "psoralenos 4'-amino primario-sustituídos" se definen como compuestos de psoraleno que tienen un grupo NH_2 unido a la posición 4' del psoraleno por una cadena de hidrocarburo que tiene una longitud total de 2 a 20 carbonos, en la que de 0 a 6 de esos carbonos están reemplazados independientemente por NH u O y cada punto de reemplazo está separado de cada uno de los otros puntos de reemplazo por al menos dos carbonos y está separado del psoraleno por al menos un carbono. Los psoralenos 4'-amino primario-sustituídos pueden tener sustituciones adicionales en las posiciones 4, 5' y 8 del psoraleno, sustituciones entre las que están, aunque no únicamente, los grupos siguientes: H y $(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$, en el que $n = 0-6$.

B. Síntesis de los psoralenos

La presente invención contempla procedimientos de síntesis de los nuevos compuestos de la presente invención, así como nuevos procedimientos de síntesis de intermedios conocidos. Específicamente, los nuevos compuestos son psoralenos 4'-amino primario-sustituídos monoalquilados, dialquilados o trialquilados. En las Fig. 10A-10F se presentan varios ejemplos de los esquemas descritos en esta sección. Para facilitar la referencia, la Tabla 2 expone la nomenclatura usada para los derivados de psoralenos descritos en el documento. Las estructuras de los compuestos 1-18 también están representadas en las Fig. 10A-10F. Nótese que en esta sección (titulada "B. Síntesis de los psoralenos") los números romanos usados para identificar compuestos se correlacionan sólo con los Esquemas 1-6 y no se correlacionan con los números de los compuestos que se dan en la Tabla 2 o las Fig. 10A-10F.

TABLA 2

nº.	Compuesto
1	4'-(4-amino-2-aza)butil-4,5',8-trimetilpsoraleno
2	4'-(4-amino-2-oxa)butil-4,5',8-trimetilpsoraleno
3	4'-(2-aminoetil)-4,5',8-trimetilpsoraleno
4	4'-(5-amino-2-oxa)pentil-4,5',8-trimetilpsoraleno
5	4'-(5-amino-2-aza)pentil-4,5',8-trimetilpsoraleno
6	4'-(6-amino-2-aza)hexil-4,5',8-trimetilpsoraleno
7	4'-(7-amino-2,5-oxa)heptil-4,5',8-trimetilpsoraleno

8	4'-(12-amino-8-aza-2,5-dioxa)dodecil-4,5',8-trimetilpsoraleno
9	4'-(13-amino-2-aza-6,11-dioxa)tridecil-4,5',8-trimetilpsoraleno
10	4'-(7-amino-2-aza)heptil-4,5',8-trimetilpsoraleno
11	4'-(7-amino-2-aza-5-oxa)heptil-4,5',8-trimetilpsoraleno
12	4'-(9-amino-2,6-diaza)nonil-4,5',8-trimetilpsoraleno
13	4'-(8-amino-5-aza-2-oxa)octil-4,5',8-trimetilpsoraleno
14	4'-(9-amino-5-aza-2-oxa)nonil-4,5',8-trimetilpsoraleno
15	4'-(14-amino-2,6,11-triaza)tetradecil-4,5',8-trimetilpsoraleno
Ref. 16	5'-(4-amino-2-aza)butil-4,4',8-trimetilpsoraleno
Ref. 17	5'-(6-amino-2-aza)hexil-4,4',8-trimetilpsoraleno
Ref. 18	5'-(4-amino-2-oxa)butil-4,4',8-trimetilpsoraleno

Lo más lógico es describir primeramente los intermedios útiles en la síntesis de muchos de los compuestos de la presente invención.

Síntesis de intermedios

Las síntesis anteriores de 4'-clorometil-4,5',8-trimetilpsoraleno (4'-CMT) y 4'-bromometil-4,5',8-trimetilpsoraleno (4'-BrMT) parten de 4,5',8-trimetilpsoraleno (5'-TMP) que es adquirible comercialmente (Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI) o se puede preparar en 4 etapas como se describe más adelante para otros psoralenos alquilados. 5'-TMP se convierte en 4'-CMT usando un gran exceso (20-50 equivalentes) de clorometil metiléter, muy carcinógeno y volátil. La halometilación de los 4,5',8-trialquilpsoralenos con clorometil metil éter o bromometil metil éter se describe en la patente de Estados Unidos N.º 4.124.598 de Hearst. El compuesto de bromo, 4'-BrMT, se prepara análogamente usando bromometil metil éter, que es algo menos volátil. Se obtienen rendimientos de sólo 30-60% del intermedio deseado. El 5'-clorometil-4,4',8-trimetilpsoraleno (5'-CMT) y 5'-bromometil-4,4',8-trimetilpsoraleno (5'-BrMT) se preparan de manera similar usando el compuesto isómero de partida 4,4',8-trimetilpsoraleno (4'-TMP) [patente de Estados Unidos N.º 4.294.822, de Kaufman; McLeod y otros, *Synthesis of Benzofuranoid Systems. I. Furocoumarins, Benzofurans and Dibenzofurans*, Tetrahedron Letters 237 (1972)]. Algunas figuras a las que se hace referencia en la descripción de la síntesis que sigue contienen números romanos usados para marcar estructuras que engloban más de un compuesto. Este sistema de numeración es distinto del sistema de numeración de la Tabla 2 anterior, que se usó para identificar varios compuestos específicos, y no ha de confundirse con aquel.

Se describe en esta memoria un procedimiento muy mejorado que permite la síntesis de cualquier isómero de los bromomonometil-trialquilpsoralenos a partir del mismo precursor de psoraleno mediante control cuidadoso de las condiciones de reacción. Véase la Fig. 1. En la Fig. 1, A₁ y A₂ se seleccionan independientemente entre el grupo que comprende H y una cadena alquilo que tiene 1-6 átomos de carbono. La reacción de la 4,8-dialquil-7-hidroxicumarina con 2-cloro-3-butanona en condiciones básicas típicas proporciona 4,8-dialquil-7-(1-metil-2-oxo)propiloxicumarina (I). Este material se cicla por calentamiento en NaOH acuoso para que resulte 4,8-dialquil-4',5'-dimetilpsoraleno (II). El tratamiento del psoraleno tetrasustituido y N-bromosuccinimida (NBS) en un disolvente a temperatura ambiente hasta 150°C conduce a la bromación en la posición 4' o 5', dependiendo de las condiciones usadas. Se puede añadir un catalizador tal como peróxido de dibenzóilo, pero no es necesario. Si el disolvente usado es tetracloruro de carbono a reflujo, se obtiene 4,8-dialquil-5'-bromometil-4'-etilpsoraleno (IV) con rendimientos de 50% o mayores. Si se usa cloruro de metileno a temperatura ambiente, sólo se obtiene 4,8-dialquil-4'-bromometil-5'-metilpsoraleno (III) con rendimientos $\geq 80\%$. También se puede hacer la bromación bencílica en otros disolventes, produciéndose uno de los productos isómeros solo o en una mezcla. Entre estos disolventes están incluidos, aunque no únicamente, 1,2-diclorometano, cloroformo, bromotriclorometano y benceno.

Esquema general de síntesis de psoralenos 4'-sustituidos

Se considera ahora la síntesis de una subclase de psoralenos lineales; los 4,5',8-trialquilpsoralenos se pueden producir como sigue. Las 4,8-dialquilcumarinas se preparan a partir de 2-alquilresorcinoles y un éster de 3-oxoalcanoato por reacción de Pechmann (Organic Reactions vol. VII, capít. 1, ed. Adams y otros, Wiley, NY (1953)). El grupo hidroxilo se trata con un agente de alquilación, CH₂=CHX-CH(R)Y, en el que X es un haluro o hidrógeno, Y es un haluro o sulfonato, y R es H o (CH₂)_vCH₃, en el que v es un número entero de 0 a 4. El reagrupamiento de Claisen del alil éter resultante da 4,8-dialquil-6-alil-7-hidroxicumarina. Las cumarinas se convierten en 4,5',8-trialquilpsoralenos usando

procedimientos similares a uno de los varios procedimientos descritos antes (esto es, véase Bender y otros, J. Org. Chem. 44:2176 (1979); Kaufman, patente de Estados Unidos N.º 4.235.781 y 4.216.154). El 4,5',8-trimetilpsoraleno es un producto natural y es adquirible comercialmente (Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI).

5 En la Fig. 2 se presentan varias rutas de síntesis. Partiendo de 4-HATP (en el que w es un número de 1 a 5; A₁, A₂ y A₃ se seleccionan independientemente entre el grupo que comprende H y (CH₂)_vCH₃, en el que v es un número de 0 a 5; y en el que X=Br, Cl o I), la reacción con un exceso de un compuesto bis-hidroxi, HO-(B)-OH, en el que B es: una cadena alquilo (por ejemplo, HO-(B)-OH es 1,3-propanodiol), un monoéter (por ejemplo, dietilenglicol) o un poliéter (por ejemplo, tetraetilenglicol), que tiene una longitud de 18 átomos de carbono o menos, puro o con un disolvente tal como acetona a 20-80°C, y una base para cadenas de carbono más largas que halometilo, da un (ω-hidroxi)alquilpsoraleno. El grupo hidroxilo terminal se puede transformar en un grupo amino en una variedad de condiciones (por ejemplo, véase Larock, *Comprehensive Organic Transformations*, VCH Publishers, NY, 1989). En particular, el grupo hidroxilo se puede convertir en el éster del ácido metanosulfónico (estructura VI) en presencia de cloruro de metanosulfonilo (CH₃SO₃Cl). Éste se puede convertir seguidamente en la azida en metanol a reflujo y la azida reducirse a la amina final, estructura VII (son ejemplos los compuestos 2, 4 y 7). El procedimiento aquí descrito utiliza trifenilfosfina y agua en tetrahidrofurano (THF) para la reducción, pero se contemplan otros procedimientos.

Un procedimiento preferido para la preparación de la estructura VII usa la reacción de 4'-HATP con un alcohol lineal primario que contiene una amina protegida (por ejemplo un grupo ftalimido) en la posición terminal, en un disolvente adecuado tal como DMF a 25-150°C para obtener V. La amina se desprotege luego en condiciones estándar (por ejemplo, hidracina o MeNH₂ acuosa para desproteger un grupo ftalimido [también se contemplan hidracinas de alquilos superiores, tales como bencilhidracinas]) para que resulte VII.

Por el contrario, se puede hacer reaccionar la estructura VI con diaminas, H₂N-(B')-NH₂ en la que B' es una cadena alquilo (por ejemplo, 1,4-butanodiamina), un monoéter (por ejemplo, 3-oxa-1,5-pentanodiamina) o un poliéter (por ejemplo, 3,6-dioxa-1,8-octanodiamina) para que resulte el producto final, compuesto VIII (son ejemplos de compuestos de esta estructura los compuestos 8, 13 y 14). Esta reacción se realiza con un exceso de diamina en acetonitrilo a reflujo, pero son igualmente posibles otros disolventes y temperaturas.

30 Se desean algunos compuestos finales en los que la cadena de carbono está unida a la posición 4'- del anillo de psoraleno por un grupo aminoalquilo [NH(CH₂)_w] y no por un grupo oxialquilo [O(CH₂)_w]. Las rutas de síntesis para estos compuestos se presentan en la Fig. 3. Cuando la unión entre este nitrógeno y el nitrógeno terminal contiene sólo subunidades CH₂ y oxígeno pero no otros nitrógenos (estructura X) (son ejemplos los compuestos 1, 5, 6, 9, 10 y 11), el producto puede prepararse convenientemente a partir de 4'-HATP y la diamina apropiada de estructura IX. Este procedimiento es también aplicable a productos finales que contienen más de dos nitrógenos en la cadena (estructura XIII) (son ejemplos los compuestos 12 y 15) a partir de poliaminas de estructura XII (por ejemplo, noespermidina o espermina [adquiribles comercialmente de Aldrich, Milwaukee, WI]); sin embargo, en este caso también se forman estructuras isómeras en cantidades considerables. El procedimiento preferido para la preparación de la estructura XIII es la aminación reductora del psoralen-4'-alcanal (XI) con una poliamina de estructura XII y un agente reductor tal como cianoborohidruro sódico. Esta aminación reductora es aplicable también a la síntesis de los compuestos X. Los carboxaldehídos (estructura XI, w=0) se han preparado previamente por hidrólisis de los compuestos de 4'-halometilo y posterior oxidación del compuesto de 4'-hidroximetilo resultante. (Isaacs y otros, J. Labelled Compds Radiopharm., 1982, 19, 345). Estos compuestos también se pueden preparar convenientemente por formilación de los compuestos de 4'-hidruro con una formamida y POCl₃ o con hexametilentetraamina en ácido. Los alcanales de cadena más larga se pueden preparar a partir de los compuestos 4'-HATP por conversión del grupo halo terminal en una función aldehído (por ejemplo, Durst, Adv. Org. Chem. 6:285 (1969)).

Otros productos finales tienen una amina terminal unida al psoraleno por una cadena alquilo. Como se presenta en la Fig. 4, estos compuestos (estructuras XIV) (un ejemplo es el compuesto 3) se preparan (1) por reacción del 4'-HATP con ftalimida o azida potásica y posterior liberación de la amina deseada como antes, por ejemplo, con hidracina, o (2) por conversión del 4'-HATP en el compuesto de cianuro, seguida de reducción, por ejemplo con NaBH₄-CF₃CO₂H.

La consideración sobre la conversión de 4,5',8-trialquilpsoralenos en 4'-amino funcionalizado-4,5',8-trialquilpsoralenos se aplica igualmente bien cuando la posición 4 y/u 8 está sustituida con sólo un hidrógeno, obteniéndose así 4'-amino primario sustituido-5' (4 u 8)-dialquilpsoralenos y 4'-amino primario sustituido-5'-alquilpsoralenos.

II. Unión de compuestos a ácido nucleico

La presente invención contempla la unión de compuestos nuevos a ácido nucleico, incluidos ácido nucleico viral y ácido nucleico bacteriano. Un enfoque de la presente invención para unir compuestos con fotoactivación a ácido nucleico es la fotounión. La fotounión se define como la unión de compuestos con fotounión en presencia de longitudes de onda de luz fotoactivantes. Los compuestos de fotounión son compuestos que se unen a ácidos nucleicos en presencia de longitudes de onda de luz fotoactivantes. La presente unión contempla procedimientos de fotounión con compuestos de fotounión de la presente invención.

Una realización del procedimiento de la presente invención para la fotounión supone las etapas: a) proporcionar un compuesto con fotounión de la presente invención; y b) mezclar el compuesto con fotounión con ácido nucleico en presencia de longitudes de fotoactivación de radiación electromagnética.

La invención además contempla un procedimiento para modificar ácido nucleico que comprende las etapas: a) proporcionar un compuesto con fotounión de la presente invención y ácido nucleico; y b) fotounir el compuesto con fotounión al ácido nucleico, de forma que se forme un complejo entre el compuesto y ácido nucleico. Sin pretender limitarse a ningún método por el que los compuestos de la presente invención previenen la replicación, se cree que la estructura de dicho complejo entre compuesto y ácido nucleico sirve para prevenir la replicación del ácido nucleico al evitar que actúe la polimerasa necesaria en la región en la que se unió el compuesto.

III. Inactivación de patógenos - Referencia

La presente invención contempla el tratamiento de un hemoderivado con un compuesto con fotoactivación y la irradiación para inactivar secuencias de ácidos nucleicos contaminantes de patógenos antes de usar el hemoderivado.

A. Inactivación en general

El término “inactivación” se define en esta memoria como la alteración del ácido nucleico de una unidad de patógeno para hacer que la unidad de patógeno sea incapaz de replicarse. Esto es diferente de “inactivación total”, en la que todas las unidades de patógeno presentes en una muestra dada se hacen incapaces de replicación, o “inactivación sustancial”, en la que la mayoría de las unidades de patógenos presentes se hacen incapaces de replicación. La “eficiencia de inactivación” de un compuesto se define como el nivel de inactivación del compuesto que se puede alcanzar a una concentración dada del compuesto o una dosis de irradiación dada. Por ejemplo, si 100 μ M de un hipotético compuesto X inactivan 5 logs de virus HIV mientras que, en las mismas condiciones experimentales, la misma concentración del compuesto Y inactiva sólo 1 log de virus, el compuesto X tendría una “eficiencia de inactivación” mejor que el compuesto Y.

Para apreciar si un procedimiento de “inactivación” puede lograr o no “inactivación total”, es útil considerar un ejemplo específico. Se dice que un cultivo bacteriano está inactivado si una parte alícuota del cultivo, cuando se pasa a una placa de cultivo fresca y se deja que se desarrolle, es indetectable después de un cierto período de tiempo. Para que una señal sea detectable, se debe aplicar a la placa un número mínimo de bacterias viables. Con el procedimiento de detección óptimo, este número mínimo es 1 célula bacteriana. Con un procedimiento de detección subóptimo, el número mínimo de células bacterianas aplicadas de manera que se observe una señal puede ser mucho mayor que 1. El procedimiento de detección determina un “umbral” por debajo del cual el “procedimiento de inactivación” parece ser completamente eficaz (y por encima del cual la “inactivación” es, de hecho, sólo parcialmente eficaz).

B. Inactivación de patógenos potenciales

Las mismas consideraciones de procedimiento de detección y umbral existen cuando se determina el límite de sensibilidad de un procedimiento de detección para ácidos nucleicos. También aquí, “inactivación” significa que una unidad de patógeno se convierte en incapaz de replicarse.

En el caso de los procedimientos de inactivación para material a usar por seres humanos, sea *in vitro* o *in vivo*, teóricamente, el procedimiento de detección a seguir puede ser la medición del nivel de infección con una enfermedad como resultado de la exposición al material. El umbral por debajo del cual el procedimiento de inactivación es completo se considera que es el nivel de inactivación que es suficiente para prevenir que se produzca enfermedad debida al contacto con el material. Se acepta que en este escenario práctico no es esencial que los procedimientos de la presente invención den por resultado la “inactivación total”. Esto es, la “inactivación sustancial” será adecuada en tanto que la porción viable sea insuficiente para causar la enfermedad. Así, “sustancialmente la totalidad” de un patógeno está inactivada cuando cualquier porción viable del patógeno que permanece sea insuficiente para causar enfermedad. El procedimiento de inactivación de la presente invención convierte en sustancialmente inactivado el ácido nucleico de los patógenos. En una realización, el procedimiento de inactivación convierte en sustancialmente inactivado el ácido nucleico de los patógenos en preparaciones hemáticas.

Sin que se pretenda quedar limitado a cualquier procedimiento por el que los compuestos inactivan patógenos, se cree que la inactivación resulta de la unión inducida por la luz de los psoralenos a ácido nucleico. Además, si bien no se asegura que el procedimiento de inactivación de la presente invención esté limitado por la naturaleza del ácido nucleico, se contempla que el procedimiento de inactivación convierta todas las formas de ácido nucleico (sea DNA, mRNA, etc.) en sustancialmente inactivadas.

Cuando los compuestos de fotoactivación se usan para modificar un ácido nucleico, la interacción del ácido nucleico del patógeno (sea DNA, mRNA, etc.) con el compuesto de fotoactivación preferiblemente previene la replicación del patógeno de manera que, si se expone una persona al patógeno tratado, no resultará una infección.

“Medio sintético” se define en esta memoria como un medio acuoso sintético de almacenamiento de sangre o un hemoderivado. En una realización, la presente invención contempla inactivar hemoderivados en un medio sintético que comprende una solución salina tamponada. Este procedimiento reduce el daño causado a hemoderivados y permite el uso de concentraciones mucho más bajas de compuestos con fotoactivación.

ES 2 336 574 T3

El procedimiento de fotoinactivación con psoralenos inactiva patógenos basados en ácido nucleico presentes en la sangre en un único procedimiento. Así, tiene potencial para eliminar bacterias, protozoos y virus. Si hubiera estado disponible un procedimiento de descontaminación eficaz antes de la llegada del SIDA, no se hubiera producido transmisión pandémica de HIV asociada a transfusiones. La descontaminación basada en psoralenos tiene el potencial de eliminar todos los agentes infecciosos del suministro de sangre, independientemente del patógeno involucrado. Adicionalmente, la descontaminación basada en psoralenos tiene la capacidad de esterilizar hemoderivados después de su recogida y procesamiento, lo que en el caso de concentrados de plaquetas podría resolver el problema de una contaminación bacteriana baja y dar por resultado una vida de almacenamiento extendida. Morrow, J. F. y otros, JAMA 266:555-558 (1991); Bertolini, F. y otros, Transfusión 32:152-156 (1992).

TABLA 3

Virus inactivados fotoquímicamente por psoralenos

Familia	Virus
Adeno	Adenovirus 2
Arena	Hepatitis canina Pichinde Lassa
Bunya	Turlock
Herpes	Encefalitis de California Herpes simple 1 Herpes simple 2 Citomegalovirus
Orothomyxo	Pseudorabia
Papova	Gripe
Paramyxo	SV-40 Rubéola Paperas
Picorna ¹	Parainfluenza 2 y 3 Poliovirus 1 y 2 Coxsackie A-9 Echo 11
Pox	Vaccinia
Reo	Viruela aviar Reovirus 3 Lengua azul
Retro	Fiebre de garrapata de Colorado HIV Sarcoma aviar Sarcoma murino Leucemia murino
Rhabdo	Virus de estomatitis vesticular
Toga	Encefalitis equina occidental Dengue 2 Dengue 4 Encefalitis de St, Luis
Hepadna	Hepatitis B
Bacteriófago	Lambda T2
(Rickettsia)	R. akari (rickettsiosis vareiforme)

En la Tabla 3 aparece una lista de virus que han sido inactivados fotoquímicamente por uno o más psoralenos. (De la Tabla 1 de Hanson, C.V., Blood Cells, 18:7 (1992)). En el artículo, se señala que los piconavirus fueron fotoinactivados sólo si los psoralenos estaban presentes durante el crecimiento del virus. Esta lista no es exhaustiva y es meramente

representativa de la gran variedad de patógenos que pueden inactivar los psoralenos. La presente invención contempla la inactivación de estos y otros virus por compuestos que se describen en las reivindicaciones. Los compuestos de la presente invención son particularmente adecuados para inactivar virus con cubierta tales como virus HIV.

5

C. Selección de compuestos con fotoinactivación para inactivar patógenos

Con el fin de evaluar un compuesto para decidir si sería útil en los procedimientos de descontaminación fotoquímica (PCD) de la presente invención, se deben considerar dos propiedades importantes: (1) la capacidad del compuesto de inactivar patógenos y (2) su acción mutágena. La capacidad de un compuesto de inactivar patógenos se puede determinar por varios procedimientos. Una técnica es realizar una exploración con bacteriófagos; un ensayo que determina la unión de ácido nucleico con los compuestos de ensayo. Una exploración de este tipo, una exploración con r-17, se describe detalladamente en el Ejemplo 12. Si la exploración con r-17 revela actividad de inactivación, es útil para ensayar directamente la capacidad del compuesto de inactivar un virus. Un procedimiento para realizar una exploración directa de inactivación viral se describe detalladamente en el Ejemplo 13 para HIV acelular.

La exploración con bacteriófagos de R17 se cree que predice la eficacia de inactivación de HIV, así como la eficacia de compuestos contra muchos otros virus. Se escogió el R17 porque se esperaba que fuera un patógeno muy difícil de inactivar. Es un fago de RNA pequeño, monocatenario. Sin que eso signifique una limitación a cualquier medio por el que actúa la presente invención, se espera que los trozos más cortos de ácido nucleico son más difíciles de inactivar porque requieren una frecuencia más alta de formación de aductos de psoraleno que los trozos más largos de ácido nucleico. Además, los patógenos de RNA monocatenarios son más difíciles de inactivar porque los psoralenos no se pueden intercalar entre pares de bases, como en los ácidos nucleicos bicatenarios, ni forman diaductos que actúan como enlaces entre cadenas. Así, se espera que, cuando se logre la inactivación de R17, estas mismas condiciones causarán la inactivación de muchos virus y bacterias.

La exploración con HIV acelular complementa la exploración con r-17 por afirmar que un compuesto dado que ha revelado ser positivo contra r-17 actuará eficazmente para inactivar virus. Así, si un compuesto revela actividad en la exploración de r-17, seguidamente se ensaya en la exploración de inactivación viral.

30

La segunda propiedad que es importante al ensayar un compuesto para uso en los procedimientos de la presente invención es la acción mutágena. El ensayo de exploración de mutágeno/carcinógeno más extendido es el ensayo de Ames. Este ensayo lo describen D.M. Maron y B.N. Ames en *Mutation Research* 113:173 (1983) y una exploración específica se describe detalladamente en el posterior Ejemplo 17. El ensayo de Ames utiliza varias cepas singulares de *Salmonella typhimurium* que son dependientes de histidina para el crecimiento y que carecen de las usuales enzimas de reparación de DNA. La frecuencia de mutaciones normales que convierten las bacterias en independientes de la histidina (esto es, la frecuencia de reversiones espontáneas) es baja. El ensayo permite evaluar el impacto de un compuesto sobre esta frecuencia de reversión.

A causa de que algunas sustancias no son mutagénicas en sí pero se convierten en mutágenas por acción metabólica, el compuesto a ensayar se mezcla con las bacterias en placas de agar junto con extracto de hígado. El extracto de hígado sirve para mimetizar la acción metabólica en un animal. Las placas de control tienen sólo las bacterias y el extracto.

Se deja incubar las mezclas. El crecimiento de bacterias (si lo hay) se comprueba contando colonias. Un ensayo de Ames positivo es uno en el que el número de colonias en las placas con mezclas que contienen el compuesto excede significativamente el número de las correspondientes placas de control.

Cuando se exploran de esta manera con el ensayo de Ames carcinógenos conocidos, aproximadamente 90% de ellos son positivos. Cuando se ensayan similarmente sustancias no carcinógenas conocidas, aproximadamente 90% de ellos son negativos.

Se puede evaluar un nuevo compuesto (X) como potencial compuesto de descontaminación de sangre, como se muestra en la siguiente Tabla 4. X se evalúa inicialmente en la Etapa I. X se explora en el ensayo r-17 a varias concentraciones diferentes entre 4 y 320 μM , como se explica en el Ejemplo 12. Si el compuesto revela una actividad de inactivación superior a 1 log inactivación de r-17 (inactivación logarítmica) en el ensayo con r-17 a cualquier concentración, el compuesto se explora luego en el ensayo con HIV acelular, como se explica en el Ejemplo 13. Si el compuesto presenta una actividad de inactivación superior a 1 log inactivación de HIV (inactivación logarítmica) en el ensayo HIV acelular, el compuesto y AMT se exploran luego en el ensayo de Ames. Finalmente, si el compuesto presenta una acción mutágena inferior a la de AMT en el ensayo de Ames, el nuevo compuesto se identifica como agente útil para la inactivación de patógenos.

65

TABLA 4

Etapa	Exploración	Resultado	Interpretación
1	r-17	inactivación logarítmica >1 a cualquier conc	compuesto con potencial para PCD, ir a etapa 2
		inactivación logarítmica <1	compuesto ineficaz como agente de inactivación
2	Inactivación viral	inactivación logarítmica >1 a cualquier conc.	compuesto con potencial para PCD, ir a etapa 3
		<1 log conc.	compuesto ineficaz como agente de inactivación
3	Ames	menos mutágeno que AMT	agente útil para PCD

5 Siguiendo estas instrucciones, una persona puede determinar rápidamente qué compuestos serían apropiados para
10 uso en los procedimientos de la presente invención.

D. Suministro de compuestos para fotoinactivación

15 La presente invención contempla varias formulaciones y vías diferentes por las que se pueden suministrar los
20 compuestos descritos tal como se definen en las reivindicaciones en un procedimiento de inactivación. Esta sección es
25 meramente ilustrativa y no tiene la finalidad de limitar la invención a ninguna forma ni un procedimiento de introducir
el compuesto.

30 Los compuestos de la presente invención se pueden introducir en un procedimiento de inactivación en varias
35 formas. Los compuestos se pueden introducir como solución acuosa en agua, solución salina o en medio sintético tal
como "Sterilyte™ 3.0" (cuyo contenido se indica al comienzo de la sección experimental más adelante) o una variedad
de otros medios. Los compuestos se pueden proporcionar además como formulaciones secas, con o sin coadyuvantes.

40 Los nuevos compuestos se pueden aportar también por varias rutas diferentes. Por ejemplo, el compuesto se puede
45 introducir en el recipiente de reacción, tal como una bolsa de sangre, en el momento de la producción. Alternativa-
mente, el compuesto se puede añadir al material a esterilizar después de haber puesto el material en el recipiente de
reacción. Además, los compuestos se pueden introducir solos o como mezcla de diferentes compuestos.

IV. Conservación de propiedades bioquímicas del material tratado - Referencia

50 Cuando se tratan compuestos de sangre a usar *in vivo*, dos factores tienen una importancia primordial en cuanto
a los procedimientos y compuestos a usar. Primero, se debe preguntar si el procedimiento o los compuestos usados
alteran la actividad *in vivo* del material tratado. Por ejemplo, la transfusión de plaquetas es un tratamiento eficaz bien
establecido para pacientes con hemorragia trombocitopénica. Sin embargo, si el tratamiento de descontaminación usa-
55 do reduce considerablemente la actividad coagulante de las plaquetas, el tratamiento no tiene valor práctico alguno.
Los psoralenos son útiles en procesos de inactivación porque la reacción se puede realizar a temperaturas compatibles
con el mantenimiento de las propiedades bioquímicas de la sangre y los hemoderivados. Hanson, C.V., Blood Cells
18:7 (1992). Pero no todos los psoralenos o procedimientos descontaminarán sin rebajar significativamente la activi-
60 dad biológica del material descontaminado. Los compuestos y protocolos anteriores han necesitado la eliminación de
oxígeno molecular de la reacción antes de y durante la exposición a la luz para evitar que los radicales de oxígeno
formados durante la irradiación dañen los hemoderivados. Véase L. Lin y otros, Blood 74:517 (1989); patente de Es-
tados Unidos N.º 4.727.027, de Wiesenhanh. La presente invención puede usarse para descontaminar hemoderivados
en presencia de oxígeno sin destruir la actividad para la que se preparan los hemoderivados. Además, con los proce-
65 dimientos de la presente invención no hay necesidad de reducir la concentración de oxígeno molecular. La presente
invención contempla que no se destruya ni rebaje significativamente la actividad *in vivo* de un hemoderivado si una
muestra de un hemoderivado que ha sido descontaminada por procedimientos de la presente invención da resultados
en los ensayos similares a los que daría una muestra que funcionara normalmente de un hemoderivado en ensayos
conocidos para determinar la función de un hemoderivado. Por ejemplo, en lo concerniente a plaquetas, la actividad

in vivo no se destruye ni se rebaja significativamente si los pH de las plaquetas son los mismos para plaquetas tratadas por los procedimientos de la presente invención almacenadas durante 5 días que para muestras de plaquetas no tratadas almacenadas durante 5 días. “Sustancialmente el mismo pH” significa que los valores están dentro del intervalo de error en torno a ese punto particular del dato.

5 El segundo factor es si los compuestos son tóxicos o mutagénicos para el paciente tratado. Un “compuesto que presenta una acción mutágena baja” se define como un compuesto que es menos mutagénico que AMT cuando se ensaya a concentraciones por debajo de 250 μM en el ensayo de Ames, descrito en la sección experimental siguiente. Los procedimientos de inactivación de la presente invención son especialmente útiles porque muestran la independencia entre la eficacia de la inactivación del patógeno y la acción mutágena. Los compuestos presentan una potente inactivación patógena sin un aumento concomitante de la acción mutágena. Los compuestos comúnmente conocidos ensayados según protocolos de inactivación, tales como el AMT, parece que exhiben una conexión entre eficacia de la inactivación del patógeno y la acción mutagénica que hasta ahora parecía indivisible.

15 Si bien no se pretende que la presente invención esté limitada por ninguna teoría según la cual la eficacia de la inactivación del patógeno no está unida a la mutagenia, se postula que el desacoplamiento se produce como resultado de la longitud de los grupos sustituidos en el psoraleno y la situación de cargas en los compuestos. Se postula que las cargas positivas en uno o ambos extremos de los compuestos mutagénicos tienen interacciones no covalentes con el esqueleto de fosfato del DNA. Se presume que esas interacciones se producen independientemente de la presencia de luz (llamada “unión oscura”). En teoría, de esta manera, el psoraleno bloquea estéricamente la polimerasa para que no abra el DNA, causando acción mutágena. Por el contrario, los compuestos de la presente invención tienen una carga positiva o neutra en un grupo sustituido largo. Estos grupos sustituidos forman una barrera estérica durante la unión oscura que es mucho más fácil de liberar del DNA, lo que permite el paso de la polimerasa. Por tanto, no se produce acción mutágena.

25

Sección experimental

Los ejemplos siguientes sirven para ilustrar ciertas realizaciones y aspectos preferidos de la presente invención y no ha de interpretarse que limitan su ámbito.

En la descripción experimental que sigue, se usan las abreviaturas siguientes: eq (equivalentes); M (molar); μM (micromolar); N (normal); mol (moles); mmol (milimoles); μmol (micromoles); nmol (nanomoles); g (gramos); mg (miligramos); μg (microgramos); kg (kilogramos); l (litros); ml (mililitros); μl (microlitros); cm (centímetros); mm (milímetros); μm (micrómetros); nm (nanómetros); J (julio, también vatio; nótese que en las Fig. 11, 13-22 Julios o J se refiere a Julios/cm²); °C (grados centígrados); TLC (cromatografía en capa fina); EAA (acetoacetato de etilo); EtOH (etanol); HOAC (ácido acético); W (vatios); mW (miliwats); RMN (resonancia magnética nuclear; espectros obtenidos a temperatura ambiente en un espectrómetro con transferencia de Fourier Varian Gemini 200 MHz); p.f. (punto de fusión); UV (luz ultravioleta); THF (tetrahidrofurano); DMEM (medio Eagle modificado de Dulbecco); FBS (suero bovino fetal); LB (caldo Luria); EDTA (ácido etilendiaminetetraacético); miristatoacetato de forbol (PMA); solución salina tamponada con fosfato (PBS); BSA (albúmina de suero bovino); PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Además, en los ejemplos que describen la síntesis de compuestos, los rendimientos presentados son sólo para la etapa precedente y no para la síntesis entera.

45 Para facilidad de referencia, a algunos compuestos se les ha asignado un número de 1 a 18. Los números de referencia se asignan en la Tabla 2. Sus estructuras aparecen en las Fig. 10A-10F. Los números de referencia se usan a la largo de la sección experimental.

50 Cuando se aíslan los compuestos en forma de sal de adición de ácido, el ácido se selecciona preferiblemente de manera que contenga un anión que sea no tóxico y farmacéuticamente aceptable, al menos en las dosis terapéuticas usuales. Son sales representativas que se incluyen en este grupo preferido los hidrocloruros, hidrobromuros, sulfatos, acetatos, fosfatos, nitratos, metanosulfonatos, etanosulfonatos, lactatos, citratos, tartratos o bitartratos y maleatos. Otros ácidos son análogamente adecuados y se pueden usar según se desee. Por ejemplo, también pueden usarse como ácidos que forman sales de adición los ácidos fumárico, benzoico, ascórbico, succínico, salicílico, bismetilensalicílico, propiónico, glucónico, málico, malónico, mandélico, cinámico, citracónico, esteárico, palmítico, itacónico, glicólico, benenosulfónico y sulfámico.

Uno de los ejemplos siguientes se refiere al tampón HEPES. Este tampón contiene 8,0 g de NaCl 137 mM, 0,2 g de KCl 2,7 mM, 0,203 g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1 mM, 1,0 g de glucosa 5,6 mM, 1,0 g de albúmina de suero bovino (ABS) de 1 mg/ml (adquirible de Sigma St. Louis, MO) y 4,8 g de HEPES 20 mM (asequible de Sigma, St. Louis, MO).

En uno de los ejemplos siguientes, para el tratamiento de plaquetas se formula un medio sintético tamponado con fosfato. Este puede formularse en una etapa, resultando una solución de pH equilibrado (por ejemplo, pH 7,2) combinando los reactivos siguientes en 2 litros de agua destilada:

65

ES 2 336 574 T3

Preparación de Sterilyte™ 3,0			
	Fórmula W	mMolaridad	Gramos/2 l
Acetato sódico•3H ₂ O	136,08	20	5,443
Glucosa	180,16	2	0,721
D-manitol	182,17	20	7,287
KCl	74,56	4	0,596
NaCl	58,44	100	11,688
Citrato Na ₃	294,10	10	5,882
Na ₂ HPO ₄ •7H ₂ O	268,07	14,46	7,752
NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O	137,99	5,54	1,529
MgCl ₂ •6H ₂ O	203,3	2	0,813

La solución se mezcla luego, se filtra estéril (filtro de 0,2 μm) y se refrigera.

Otro medio sintético útil en la presente invención contiene los reactivos siguientes:

Preparación de medio sintético + fosfato			
	Fórmula W.	mMolaridad	Gramos/litro
Acetato sódico•3H ₂ O	136,08	30	4,08
NaCl	58,44	86	5,02
Citrato•2H ₂ O	294,10	10	2,94
Na ₂ HPO ₄	142,07	19,8	2,81
NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O	137,99	6,2	0,858

La reacción en cadena de polimerasa (PCR) se usa en uno de los ejemplos para medir si la inactivación viral por algunos compuestos era completa. La PCR es un procedimiento para aumentar la concentración de un segmento de una secuencia diana en una mezcla de DNA genómico sin clonación o purificación. Véase K.B. Mullis y otros, patentes de Estados Unidos N.º 4.683.195 y n.º. 4.683.202. En este procedimiento, para amplificar la secuencia diana se introduce un gran exceso de dos cebadores oligonucleótidos en la mezcla de DNA que contiene la secuencia diana deseada, a lo que sigue una secuencia precisa de ciclado térmico en presencia de una DNA polimerasa. Los dos cebadores son complementarios a sus respectivas cadenas de la secuencia diana bicatenaria. Para efectuar la amplificación, se desnatura la mezcla y los cebadores se hibridan luego a sus secuencias complementarias dentro de la molécula diana. Después de la hibridación, los cebadores se extienden con una polimerasa para formar un nuevo par de cadenas complementarias. Las etapas de desnaturalización, hibridación del cebador, y extensión con polimerasa se pueden repetir muchas veces (es decir, desnaturalización, hibridación y extensión constituyen un “ciclo”; puede haber numerosos ciclos) para obtener una concentración alta de un segmento amplificado de la secuencia diana deseada. La longitud del segmento amplificado de la secuencia diana deseada está determinada por las posiciones relativas entre sí de los cebadores y, por tanto, esta longitud es un parámetro controlable. A causa del aspecto repetitivo del procedimiento, los inventores lo denominaron “reacción en cadena de polimerasa”. Dado que los segmentos amplificados deseados de la secuencia diana llegan a ser las secuencias predominantes (en términos de concentración) de la mezcla, se dice que son “amplificados por PCR”.

ES 2 336 574 T3

Con la PCR es posible amplificar una copia individual de una secuencia diana específica en DNA genómico a un nivel detectable por varias metodologías diferentes (por ejemplo, hibridación con una sonda marcada; incorporación de cebadores biotinilados seguida de detección de conjugado de avidina-enzima; incorporación de desoxinucleótido trifosfatos marcados con ^{32}P , por ejemplo, dCTP o dATP en el segmento amplificado). Además de DNA genómico, se puede amplificar cualquier secuencia de oligonucleótido con el conjunto apropiado de moléculas de cebador.

Es sabido que procedimiento de amplificación por PCR alcanza una meseta de secuencias diana específicas de aproximadamente 10^{-8} M. Un volumen de reacción típico es $100\ \mu\text{l}$, que corresponde a un rendimiento de 6×10^{11} moléculas de producto bicatenario.

PCR es un protocolo de amplificación de polinucleótidos. El factor de amplificación que se observa está relacionado con el número (n) de ciclos de PCR que ha habido y la eficacia de replicación de cada ciclo (E) que, a su vez, está en función de las eficacias de cebado y extensión durante cada ciclo. Se ha observado que la amplificación sigue la forma E^n hasta que se logran concentraciones altas del producto de la PCR. A estas concentraciones altas (aproximadamente de 10^{-8}) la eficacia de replicación disminuye drásticamente. Probablemente esto es debido al desplazamiento de los cebadores oligonucleotídicos cortos por las cadenas complementarias más largas del producto de PCR. A concentraciones por encima de 10^{-8} M, la velocidad de las dos hebras producto amplificadas por PCR que se encuentran mutuamente durante las reacciones de cebado llegan a ser tan rápidas que ésta se produce antes de, o concomitantemente con, la etapa de extensión del procedimiento de PCR. Esto conduce finalmente a una eficacia reducida de cebado y, por tanto, una eficacia reducida de los ciclos. Los ciclos continuados de PCR conducen a aumentos menguantes de las moléculas producto de PCR. Finalmente, las moléculas de producto de PCR alcanza una concentración meseta.

Las secuencias de los cebadores de polinucleótidos usados en esta sección experimental son las siguientes:

DCD03: 5' ACT AGA AAA CCT CGT GGA CT 3'
DCD05: 5' GGG AGA GGG GAG CCC GCA CG 3'
DCD06: 5' CAA TTT CGG GAA GGG CAC TC 3'
DCD07: 5' GCT AGT ATT CCC CCG AAG GT 3'

Con DCD03 como cebador directo común, los pares generan amplicones con longitudes de 127, 327 y 1072 bp. Estos oligos se seleccionaron entre regiones que están absolutamente conservadas entre 5 aislados diferentes de DHBV (DHBV1, DHBV3, DHBV 16, DHBV 22 y DHBV26), así como de HBV de garza (HHBV4).

Los ejemplos siguientes sirven para ilustrar ciertas realizaciones preferentes y aspectos de la presente invención.

“Ejemplo 1” es numeración que no se emplea.

Ejemplo 2

Síntesis de 4'-bromometil-4,5',8-trimetilpsoraleno

En este ejemplo se describe la síntesis de 4'-bromometil-4,5',8-trimetilpsoraleno. La síntesis se realiza sin una etapa de bromometilación, lo que hace que sea más segura que los procedimientos de síntesis conocidos.

Etapa 1

Se añade 3-cloro-2-butanona (29,2 ml, 0,289 mol) a una suspensión agitada mecánicamente de 7-hidroxi-4,8-dimetilcumarina (50,00 g, 0,263 mol) y K_2CO_3 en polvo (54 g, 0,391 mol) en acetona (500 ml). La suspensión se mantuvo a reflujo durante 15 horas y luego se eliminó el disolvente. Para eliminar la sal, el sólido se agitó en 1,2 l de agua, se filtró y se enjuagó con agua hasta que el pH de las aguas madre fue neutro (pH 5-7). El filtrado de color marrón se disolvió en metanol a ebullición (150 ml), se dejó enfriar a temperatura ambiente para formar una pasta espesa y se enjuagó con metanol frío (hielo) para eliminar la mayor parte de la impureza marrón, obteniéndose 4,8-dimetil-7-(1-metil-2-oxo)propiloxi-cumarina (67,7 g, rend. de 99,9%) en forma de un sólido blancuzco. p.f. 95-96°C. RMN: δ 1,57 (d, J = 6,7 Hz, 3H), 2,19 (s, 2H), 2,39 (s, 6H), 4,73 (q, J = 6,9 Hz, 1H), 6,17 (s, 1H), 6,63 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 7,38 (d, J = 8,9 Hz, 1H).

Etapa 2

Se calentó durante 2-4 horas a 70-85°C una suspensión de 4,8-dimetil-7-(1-metil-2-oxo)propiloxi-cumarina (67,5 g, 0,260 mol), NaOH acuoso al 10% (114 ml, 0,286 mol) y agua (900 ml). Se dejó luego enfriar la mezcla a temperatura ambiente. Se filtró el sólido y luego se enjuagó con agua fría (1,5 l) hasta que las aguas madre eran incoloras y el pH era neutro (pH 5-7). El producto se secó al aire y en vacío, obteniéndose 4,4',5',8-tetrametilpsoraleno (56,3 g, 89,5%) en forma de un sólido blanco. p.f. 197-199°C. RMN: δ 2,19 (s, 3H), 2,42 (s, 3H), 2,51 (s, 3H), 2,56 (s, 3H), 6,23 (s, 1H), 7,40 (s, 1H).

ES 2 336 574 T3

Etapa 3

Se disolvió 4,4',5',8-tetrametilpsoraleno seco (10,00 g, 41,3 mmol) en cloruro de metileno (180 ml) a temperatura ambiente. Se añadió N-bromo-succinimida (8,09 g, 45,3 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 4,5 horas. Se eliminó completamente el disolvente y el sólido resultante se agitó con agua (200 ml) durante 0,5-1 h, se filtró y se trituró en frío con más agua (aproximadamente 500 ml) para eliminar completamente el subproducto de succinimida. El producto en bruto (esto es, 4'-bromometil-4,5',8-trimetilpsoraleno) se secó en un desecador a vacío con P₂O₅ y luego se recrystalizó, obteniéndose 4'-bromometil-4,5',8-trimetilpsoraleno (10,2 g), un sólido de color amarillo pálido. Se limpiaron las aguas madre y se recrystalizó nuevamente con tolueno (660 ml), obteniéndose una segunda cosecha de producto (1,08 g, rend. combinado 85,1%, pureza > 99% por RMN). p.f. 206-207°. RMN: δ 2,50 (s, 3H), 2,54 (d, J = 1,2 Hz, 3H), 2,58 (s, 3H), 4,63 (s, 2H), 6,28, (q aparente, J = 1,3 Hz, 1H), 7,59 (s, 1H).

“Ejemplo 3” es numeración que no se emplea.

15 Ejemplo 4

Síntesis de hidroclicuro de 4'-(4-amino-2-oxa)butil-4,5',8-trimetilpsoraleno (compuesto 2) y compuestos relacionados (compuesto 4)

20 En este ejemplo se describen dos procedimientos de síntesis del compuesto 2. El primer procedimiento se realizó como sigue:

Etapa 1

25 Se agitaron en dimetilformamida seca (65 ml) 4'-bromometil-4,5',8-trimetilpsoraleno (3,09 g, 9,61 mmol) (síntesis descrita en el Ejemplo 2) y N-(2-hidroxietil)ftalimida (4,05 g, 21,2 mmol). Se hizo burbujear nitrógeno gas seco suavemente en la mezcla de reacción. La mezcla de reacción se agitó a 100°C durante 4,5 horas y luego se dejó que enfriara a temperatura ambiente y se mantuvo en la nevera durante varias horas. Se filtró el producto cristalino y se lavó con MeOH y seguidamente con H₂O. El sólido se trituró con MeOH (100 ml) para eliminar las impurezas. El producto en bruto se secó al aire y se disolvió en CHCl₃ (150 ml). Se añadió carbono activado y gel de sílice para decolorar y se eliminó completamente el CHCl₃. El producto blanco resultante, 4'-[4-(N-ftalimido)-2-oxa]butil-4,5',8-trimetilpsoraleno, (1,56 g, rend. 37,5%) tenía una pureza >99% tanto por RMN como por HPLC. p.f. 224-225°C. RMN.(CDCl₃): δ 2,37 (s, 3H), 2,47 (s, 3H), 2,48 (s, 3H), 3,78 (s, 4H), 4,59 (s, 2H), 6,22 (s, 1H), 7,42 (s, 1H), 7,50 (m, 4H).

35 Etapa 2

Se puso en suspensión 4'-[4-(N-ftalimido)-2-oxa]butil-4,5',8-trimetilpsoraleno (1,56 g, 3,61 mmol) en tetrahydrofurano (75 ml) a temperatura ambiente. A la suspensión se añadió metilamina (solución acuosa al 40%, 25 ml, 290 mmol) y se agitó durante la noche. Se eliminaron completamente el disolvente y la metilamina. El sólido resultante se recibió en solución acuosa 0,3N de HCl (25 ml). La suspensión ácida se enjuagó tres veces con 40 ml de CHCl₃ y luego se llevó a pH 11 con NaOH acuoso al 20%. Se usó CHCl₃ (3x60 ml para extraer el producto (esto es, 4'-(4-amino-2-oxa)butil-4,5',8-trimetilpsoraleno) de la capa basificada. Se combinaron las capas de CHCl₃ y la combinación se lavó con H₂O (100 ml) y seguidamente con salmuera (100 ml), se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentró, obteniéndose 4'-(4-amino-2-oxa)butil-4,5',8-trimetilpsoraleno. p.f. 139-141°C. La pureza era mayor que 99% por RMN. RMN (CDCl₃): δ 2,50 (s, 6H), 2,58 (s, 3H), 2,90 (t, J = 5,27 Hz, 2H) 3,53 (t, J = 5,17 Hz, 2H), 4,66 (s, 2H), 6,25 (s, 1H), 7,61 (s, 1H). El 4'-(4-amino-2-oxa)butil-4,5',8-trimetilpsoraleno se disolvió en etanol absoluto (150 ml), se añadió una solución 1,0M de HCl en éter (10 ml) y la solución se enfrió durante la noche en nevera. Después de filtración y lavado con éter, el sólido se secó en vacío, obteniéndose cristales de color amarillo pálido (0,76 g, rend. de 62%). p.f. 235-236°C.

50 Alternativamente, la Etapa 2 se puede realizar usando hidracina o butilamina en vez de metilamina. Para síntesis a gran escala se prefiere el procedimiento que usa butilamina porque, si bien es cierto que se necesita un exceso de metilamina debido a volatilización, no éste el caso para la butilamina. El procedimiento usando butilamina se realizó como sigue: se han desprotegido con n-butilamina en propanol 28,3 g de ftalimida. La solución de reacción en bruto se trata luego con HCl para precipitar el producto. Así, la mezcla de reacción en 285 ml de 1-propanol se trató con gas HCl a pH 2. La mezcla se agitó a 5°C durante 0,5 horas, luego se filtró y lavó con disolvente frío (3x15 ml), obteniéndose 20,5 g de 4'-(4-amino-2-oxa)butil-4,5',8-trimetilpsoraleno en bruto (rend. de 92%).

60 El procedimiento que usa hidracina se realizó como sigue. Se desprotegió con hidracina el precursor de ftalimida (6 mol) y, después de concentración y extracciones ácido-base, se obtuvo la amina en bruto en 30 l de dicloruro de etileno. A éste se añadió Gas HCl (0,14 kg) mediante un tubo de dispersión durante 40 min manteniendo la temperatura a 15-25°C. La suspensión resultante se agitó durante 1 hora más. Se recogieron los sólidos en un embudo Buchner. Después de secar en un secador de aire a 80°C durante 2 horas, se obtuvieron 0,945 kg de 4'-(4-amino-2-oxa)butil-4,5',8-trimetilpsoraleno en bruto. 0,94 kg de producto en una mezcla de 7,5 kg de isopropanol y 1,88 kg de agua se mantuvo a reflujo durante 30 min y luego se filtró en caliente. La solución se enfrió a temperatura ambiente durante 1 hora y luego se enfrió a 15-20°C durante 0,5 horas. Los sólidos se recogieron en un embudo Buchner y luego se lavaron con isopropanol frío (0,3 l). Los sólidos húmedos se pasaron a bandejas de vidrio y se secaron en vacío (\geq 28 min) a aproximadamente 75°C durante 11,5 horas. El contenido de humedad era de 0,5%. Se obtuvieron 0,758 g (rend.

ES 2 336 574 T3

de 81%). El 4'-(4-amino-2-oxa)butil-4,5',8-trimetilpsoraleno era analíticamente puro. Según RMN, el isopropanol residual era de aproximadamente 1700 ppm.

El primer procedimiento es una realización preferente de la presente invención a causa de su alto rendimiento y pureza.

El segundo procedimiento se inicia con la preparación de 4'-clorometil-4,5',8-trimetilpsoraleno a partir de 4,5',8-trimetilpsoraleno comercial como se ha descrito antes. La síntesis de hidrocloreto de 4'-(4-amino-2-oxa)butil-4,5',8-trimetilpsoraleno se hace en 4 etapas.

Etapa 1

4'-clorometil-4,5',8-trimetilpsoraleno (550 mg, 1,99 mmol) y etilenglicol (6,8 ml, 121,9 mmol) se calentaron en acetona (6 ml) a 50-60°C durante 3,5 h. Después de calentar durante 2 h, la suspensión blanca se había convertido en una solución ligeramente amarilla. Se eliminaron la acetona y el etilenglicol en un rotoevaporador y al residuo se añadió agua (50 ml). La suspensión resultante se filtró, se lavó con agua fría y luego se secó en horno de vacío, obteniéndose 574 mg (96%) de 4'-(4-hidroxi-2-oxa)butil-4,5',8-trimetilpsoraleno. RMN (CDCl₃) δ: 2,51 (s, 6H), 2,58 (s, 3H), 3,62 (t, J = 4,5 Hz, 2H), 3,78 (t, J = 4,9 Hz, 2H), 4,70 (s, 2H), 6,26 (d, J = 1,1 Hz, 1H), 7,61 (s, 1H).

Etapa 2

Se disolvió 4'-(4-hidroxi-2-oxa)butil-4,5',8-trimetilpsoraleno (574 mg, 1,9 mmol) en CH₂Cl₂ (6 ml) bajo nitrógeno a ≤10°C. Se añadió trietilamina (359 mg, 3,55 mmol). Se añadió lentamente gota a gota cloruro de metanosulfonilo (305 mg, 266 mmol) manteniendo la temperatura por debajo de 10°C. Finalizada la adición, la mezcla se agitó durante 15 min más y luego se agitó a temperatura ambiente durante 10 horas. A la suspensión que había reaccionado se añadió CH₂Cl₂ (45 ml) y la mezcla se lavó con agua (3x20 ml), luego se secó sobre Na₂SO₄ anhidro. La concentración a 30°C o menos seguida de secado en vacío dio 4'-[(4-metanosulfoniloxi-2-oxa)butil-4,5',8-trimetilpsoraleno en forma de un sólido amarillo (706 mg, 98%). p.f. 138-140°C. RMN δ: 2,51 (s, 3H), 2,52 (d, 3H), 2,58 (s, 3H), 2,99 (s, 3H), 3,77 (m, 2H), 4,39 (m, 2H), 4,71 (s, 2H), 6,26 (s, 1H), 7,62 (s, 1H).

Etapa 3

Se mantuvieron a reflujo durante 8 horas en alcohol etílico al 95% 4'-[(4-metanosulfoniloxi-2-oxa)butil-4,5',8-trimetilpsoraleno (706 mg, 1,86 mmol) y azida sódica (241 mg, 3,71 mmol). La solución de reacción se enfrió y se añadió agua fría (55 ml). El sólido blancuzco se filtró y se lavó con agua fría. Después de secar en vacío, se obtuvo la azida (esto es, 4'-(4-azido-2-oxa)butil-4,5',8-trimetilpsoraleno) en forma de un sólido ligeramente amarillento (575 mg, 95%). p.f. 105-106°C. RMN δ: 2,51 (s, 6H), 2,58 (s, 3H), 3,41 (t, J = 4,9 Hz, 2H), 3,67 (t aparente, J = 4,9 Hz, 2H), 4,70 (s, 2H), 6,26 (s, 1H), 7,66 (s, 1H).

Etapa 4

El 4'-(4-azido-2-oxa)butil-4,5',8-trimetilpsoraleno (1,65 g, 5,03 mol) se disolvió en tetrahidrofurano (10 ml). A la solución anterior se añadieron trifetilfosfina (1,59 g, 6,08 mmol) y seis gotas de agua. Después de agitar a temperatura ambiente durante la noche, se concentró la solución de color amarillo claro. El residuo se disolvió en CHCl₃ (90 ml) y se sometió a extracción con HCl acuoso 0,3N (30 ml, luego 2x5 ml). La combinación de las capas de HCl se trató cuidadosamente con K₂CO₃ hasta saturación. La solución básica se sometió a extracción con CHCl₃ (3x60 ml). Las capas de CHCl₃ combinadas se lavaron con 60 ml de agua, 60 ml de de salmuera y se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro. Después de concentración y secado en vacío, se obtuvo la amina en forma de un sólido amarillo (1,25 g, 82%). p.f. 139-141°C. RMN δ 2,48 (s, 6H), 2,55 (s, 3H), 2,89 (t, J = 6 Hz, 2H), 3,52 t, J = 6 Hz, 2H), 4,64 (s, 2H), 6,22 (s, 1H), 7,59 (s, 1H).

La amina se disolvió en etanol absoluto (40 ml) y se añadieron 20 ml de HCl 1N en etil éter. Después de dejar en reposo durante la noche a 5°C, se filtró el precipitado y se enjuagó con éter, obteniéndose 1,25 g del compuesto 2. p.f. 236°C (descomp.). RMN ¹³C: 8,54, 12,39, 19,18, 38,75, 62,26, 65,80, 108,01, 112,04, 112,42, 112,97, 116,12, 125,01, 148,76, 153,97, 154,37, 155,76, 160,34.

Análisis calculado para C₁₇H₂₀CINO₄: C 60,45; H 5,97; N 4,15. Hallado: C 60,27; H 5,88; N 4,10.

Se preparó análogamente, haciendo reaccionar 4'-CMT con 1,3-propanodiol según la Etapa 1 y procediendo análogamente a lo largo de la Etapa 4, 4'-(5-amino-2-oxa)pentil-4,5',8-trimetilpsoraleno (compuesto 4). p.f. 212-214°C (descomp.). RMN de la base libre: δ 1,73 (pent, J = 6,4 Hz, 2H), 2,45 (s, 3H), 2,51 (s, 3H), 2,78 (t, J = 6,8 Hz, 2H), 3,54 (t, J = 6,3 Hz, 2H), 4,59 (s, 2H), 6,18 (s, 1H), 7,54 (s, 1H).

“Ejemplo 5” es numeración que no se emplea.

ES 2 336 574 T3

Ejemplo 6

Síntesis de hidrocloreuro de 4'-(7-amino-2,5-oxa)heptil-4,5',8-trimetilpsoraleno (Compuesto 7)

5 En este ejemplo se describe la síntesis del compuesto 7. La síntesis de hidrocloreuro de 4'-(7-amino-2,5-oxa)heptil-4,5',8-trimetilpsoraleno se realiza en 4 etapas:

Etapa 1

10 Se calentaron a reflujo durante 11,5 horas 4'-clorometil-4,5',8-trimetilpsoraleno (589 mg, 2,13 mmol), dietilenglicol (15,4 g, 145 mmol) y acetona (13 ml). La solución de reacción se concentró para eliminar la acetona y parte del dietilenglicol. A la solución marrón claro resultante se añadió CHCl_3 (40 ml), luego se lavó con agua varias veces. La capa de CHCl_3 se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y se concentró, resultando 781 mg de producto, 4'-(7-hidroxi-2,5-oxa)heptil-4,5',8-trimetilpsoraleno ($\approx 100\%$). RMN δ 2,46 (d, 3H), 2,47 (s, 3H), 2,51 (s, 3H), 3,58-3,67 (m, 8H), 4,67 (s, 2H), 6,18 (s, 1H), 7,57 (s, 1H).

Etapa 2

20 Se disolvió 4'-(7-hidroxi-2,5-oxa)heptil-4,5',8-trimetilpsoraleno (781 mg, 2,25 mmol) en CH_2Cl_2 (2,5 ml) bajo corriente de N_2 a menos de 10°C . Se añadió trietilamina (363 mg, 3,59 mmol). Se añadió lentamente cloruro de metanosulfonilo (362 mg, 3,16 mmol) gota a gota manteniendo la temperatura por debajo de 10°C . Terminada la adición, la mezcla se mantuvo por debajo de 10°C durante 15 minutos más. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche y luego se añadió CH_2Cl_2 (50 ml). La solución se lavó con agua (3x60 ml), se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y se concentró a $\leq 30^\circ\text{C}$. Después de secado en vacío, se obtuvo un líquido espeso de color marrón claro [4'-(7-metanosulfonilo-2,5-oxa)heptil-4,5',8-trimetilpsoraleno]; 437 mg (76%). RMN δ 2,50 (s, 3H), 2,51 (s, 3H), 2,58 (s, 3H), 3,01 (s, 3H), 3,66 (m, 4H), 3,77 (t, J = 4,6 Hz, 2H), 4,37 (t, J = 6 Hz, 2H), 4,69 (s, 2H), 6,25 (s, 1H), 7,61 (s, 1H).

Etapa 3

30 Se tuvieron a reflujo en 3 ml de alcohol etílico al 95% durante 8 horas [4'-(7-metanosulfonilo-2,5-oxa)heptil-4,5',8-trimetilpsoraleno] (288 mg, 0,678 mmol) y azida sódica (88,2 mg, 1,36 mmol). Se dejó enfriar la solución de reacción y se añadió agua fría (50 ml). Se desechó la capa de agua. El material en bruto se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (con cloroformo como eluyente) en un cromatógrafo Chromatotron (Harrison Research, Inc., Palo Alto, CA) y se secó en vacío para obtener un líquido espeso ligeramente amarillo, 4'-(7-azido-2,5-oxa)heptil-4,5',8-trimetilpsoraleno (123 mg, 49%). RMN δ 2,50 (s, 6H), 2,57 (s, 3H), 3,39 (t, J = 5,2 Hz, 2H), 3,68 (m, 6H), 4,70 (s, 2H), 6,24 (s, 1H), 7,62 (s, 1H).

Etapa 4

40 Se disolvieron 4'-(7-azido-2,5-oxa)heptil-4,5',8-trimetilpsoraleno (122 mg, 0,33 mmol), trifetilfosfina (129 mg, 0,49 mmol) y varias gotas de agua en tetrahidrofurano (2 ml). La solución transparente de color ligeramente amarillo se agitó a temperatura ambiente durante el fin de semana; no se detectó por TLC material de partida. Se concentró la solución de reacción y el residuo se disolvió en CHCl_3 (20 ml). La solución se sometió a extracción con solución acuosa 0,15N de HCl (10 ml, luego 2x5 ml) y las capas de HCl se llevaron a pH 13 añadiendo solución acuosa de NaOH al 20%. La solución básica se sometió a extracción con CHCl_3 (3x15 ml). Se combinaron las capas de CHCl_3 y la combinación se lavó con agua, se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se concentró y se secó en vacío, obteniéndose 63,9 mg de producto, 4'-(7-amino-2,5-oxa)heptil-4,5',8-trimetilpsoraleno (56%). La TLC reveló sólo una mancha. RMN δ 2,50 (s, 3H), 2,50 (s, 3H), 2,50 (s, 3H), 2,57 (s, 3H), 2,86 (t, J = 5,3 Hz, 2H), 3,50 (t, J = 5,3 Hz, 2H), 3,63 (s, 4H), 4,70 (s, 2H), 6,24 (s, 1H), 7,62 (s, 1H). p.f. 170-173°C.

50 El sólido se disolvió en etanol absoluto. Luego se añadió HCl 1M en etil éter, se filtró la suspensión y el producto se enjuagó con éter y se secó.

Ejemplo 7

Síntesis de dihidrocloreuro de 4'-(12-amino-8-aza-2,5-dioxa)dodecil-4,5',8-trimetilpsoraleno (compuesto 8)

60 La síntesis de dihidrocloreuro de 4'-(12-amino-8-aza-2,5-dioxa)dodecil-4,5',8-trimetilpsoraleno se realiza en una etapa a partir del producto del Ejemplo 5, procedimiento 2, Etapa 2: Una solución de 4'-(7-metanosulfonilo-2,5-oxa)heptil-4,5',8-trimetilpsoraleno (108 mg, 0,253 mmol) en 8 ml de acetonitrilo se añadió lentamente a 1,4-diaminobutano (132 mg, 1,49 mmol) en 2,8 ml de acetonitrilo. Después de calentar a reflujo durante 8 horas, no quedaba material de partida según TLC. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se añadió CHCl_3 (25 ml) y solución acuosa 1N de NaOH (25 ml). Se separaron las capas y se usó CHCl_3 (2x10 ml) para lavar la capa acuosa. Para extraer el producto de las capas orgánicas combinadas se usó HCl acuoso (0,3N, 3x10 ml). Las capas de HCl se trataron con solución acuosa de NaOH al 20% hasta pH 13. La combinación de capas básicas se sometió luego a extracción con CHCl_3 (3x20 ml). La capa de CHCl_3 se lavó con solución acuosa saturada de NaCl (10 ml) y luego se secó sobre Na_2SO_4 anhidro. Después de concentración y secado en vacío, se obtuvieron 63 mg de producto, dihidrocloreuro de 4'

ES 2 336 574 T3

(12-amino-8-aza-2,5-dioxa)dodecil-4,5',8-trimetilpsoraleno (60%). RMN δ 1,45 (m, 2H), 2,49 (s, 6H), 2,55 (s, 3H), 2,58 (t, 2H), 2,66 (t, J = 5,6 Hz, 2H), 2,76 (m, 4H), 3,55-3,61 (m, 6H), 4,68 (s, 2H), 6,22 (s, 1H), 7,61 (s, 1H).

Ejemplo 8

5

Síntesis de hidrocloreto de 4'-(2-aminoetil)-4,5',8-trimetilpsoraleno (compuesto 3)

La síntesis de 4'-(2-aminoetil)-4,5',8-trimetilpsoraleno se efectúa en una etapa: se obtuvo trifluoroacetoxiborohidruro sódico añadiendo ácido trifluoroacético (296 mg, 2,60 mmol) en 2 ml de THF a una suspensión en agitación de borohidruro sódico (175 mg, 4,63 mmol) en 2 ml de THF a lo largo de 10 minutos a temperatura ambiente. La suspensión resultante se añadió a una suspensión de 4'-cianometil-4,5',8-trimetilpsoraleno (Kaufman y otros, J. Heterocyclic Chem. 19:1051 (1982)) (188 mg, 0,703 mmol) en 2 ml de THF. La mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente. A la solución transparente ligeramente amarilla resultante de la reacción se añadieron varias gotas de agua a menos de 10°C para descomponer el exceso de reactivo. La mezcla resultante se concentró y se añadió solución acuosa 1N de NaOH (30 ml). Se usó luego cloroformo (30 ml, después 10 ml, 5 ml) para extraer la amina resultante. Se combinaron las capas de CHCl₃ y la combinación se secó con solución saturada de NaCl. La amina se extrajo luego en HCl 0,3N (10, 5, 5 ml) y las capas ácidas se llevaron a pH 13 con solución acuosa de NaOH al 20%. Se usó CHCl₃ (3x10 ml) para extraer la amina de la combinación de capas básicas, luego se lavó con agua (2 ml) y se secó sobre sulfato sódico anhidro. Después de concentración y secado en vacío se obtuvo la amina en forma de un sólido; pureza >95% según RMN. RMN δ 2,45 (s, 3H), 2,47 (s, 3H), 2,53 (s, 3H), 2,78 (t, J = 6,6 Hz, 2H), 3,00 (t, J = 6,5 Hz, 2H), 6,20 (s, 1H), 7,44 (s, 1H). El sólido se disolvió en etanol absoluto. Se añadió una solución de cloruro de hidrógeno en dietil éter (1N, 1 ml). La suspensión se filtró para obtener el compuesto 3, un sólido morado claro (32,7 mg, rend. 15%). p.f. > 237°C (descomp.).

Ejemplo 9

(Referencia)

Dihidrocloreto de 4'-(6-amino-2-aza)hexil-4,5',8-trimetilpsoraleno (compuesto 6)

30

La síntesis de 4'-(6-amino-2-aza)hexil-4,5',8-trimetilpsoraleno se efectúa en una etapa como sigue: Se añadió una solución de 4'-clorometil-4,5',8-trimetilpsoraleno (188 mg, 0,68 mmol) en 30 ml de acetonitrilo a una solución de 1,4-diaminobutano (120 mg, 1,4 mmol) en 7 ml de acetonitrilo. Después de agitar durante la noche, se eliminó el disolvente a presión reducida. Al residuo se añadió cloroformo (10 ml) y NaOH 1N (10 ml) y la mezcla se sacudió y separó. La solución acuosa se sometió a extracción con más CHCl₃ (2x10 ml) y la combinación de los extractos se enjuagó con agua. El producto se extrajo luego de la solución de CHCl₃ con HCl acuoso 0,3N y la capa ácida se llevó a pH 12 con solución concentrada de NaOH. La suspensión básica se sometió a extracción con CHCl₃ que luego se enjuagó con agua, se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró a presión reducida, obteniéndose la amina como base libre. RMN (CDCl₃): δ 1,33 (m, 3H), 1,52 (m, 4H), 2,47 (s, 3H), 2,49 (d, J = 1,1 Hz, 3H), 2,54 (s, 3H), 2,68 (q, J = 6,5 Hz, 4H), 3,86 (s, 2H), 6,21 (d aparente, J = 1,1 Hz, 1H), 7,60 (s, 1H).

40

La base libre, disuelta en aproximadamente 6 ml de etanol absoluto, se trató con una solución de HCl en éter (1,0M, 3 ml). La sal HCl resultante se filtró, se enjuagó con EtOH absoluto y se secó en vacío, obteniéndose 150 mg del compuesto 6 (55%). p.f. 290°C (descomp.). Análisis calculado para C₁₉H₂₆C₁₂N₂O₃·H₂O: C 54,42; H 6,73; N 6,68. Hallado: C 54,08; H 6,45; N 6,65.

45

De manera similar se prepararon los compuestos siguientes, indicándose las diferencias en la síntesis:

(a) dihidrocloreto de 4'-(4-amino-2-aza)butil-4,5',8-trimetilpsoraleno (compuesto 1). p.f. 320-322°C (descomp.). En esta síntesis se usó etilendiamina como diamina.

50

(b) dihidrocloreto de 4'-(5-amino-2-aza)pentil-4,5',8-trimetilpsoraleno (compuesto 5). p.f. 288°C (descomp.). RMN de la base libre: δ 1,33 (s anc, 3H), 1,66 (pent, J = 6,8 Hz, 2H), 2,47 (s, 3H), 2,50 (d, J = 1 Hz, 3H), 2,55 (s, 3H), 2,6-2,85 (m, 4H), 3,89 (s, 2H), 6,22 (d aparente, J = 1 Hz, 1H), 7,62 (s, 1H). Para esta síntesis se usó 1,3-diaminopropano como diamina.

55

(c) dihidrocloreto de 4'-(7-amino-2-aza)heptil-4,5',8-trimetilpsoraleno (compuesto 10). p.f. 300°C (descomp.). RMN de la base libre: δ 1,22 (s anc), 1,3-1,6 (m, total 9H), 2,44 (s), 2,50 (s, total 9H), 2,63 (m, 4H), 6,17 (s, 1H), 7,56 (s, 1H). Aquí se usó 1,5-diaminopentano como diamina.

60

“Ejemplo 10” es numeración que no se emplea.

Ejemplo 11

Tetrahidrocloreto de 4'-(14-amino-2,6,11-triaza)tetradecil-4,5'-8-trimetilpsoraleno (compuesto 15)

65

La síntesis de tetrahidrocloreto de 4'-(14-amino-2,6,11-triaza)tetradecil-4,5'-8-trimetilpsoraleno se realiza en una (1) etapa como sigue: A una solución de 0,5 g (2,5 mmol) de espermina (Aldrich, Milwaukee, WI) en 10 ml de metanol

ES 2 336 574 T3

se añadió una solución metanólica 5N de HCl (HCl concentrado diluido con HCl a 5N) para ajustar el pH a 5-6 y seguidamente 0,128 g (0,5 mmol) de 4,5',8-trimetilpsoralen-4'-carboxaldehído, 20 mg (0,3 mmol) de NaBH₃CN y 3 ml de MeOH. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se añadió una solución metanólica 5N de HCl hasta pH<2 y se eliminó el metanol a presión reducida. El residuo se recibió en aproximadamente 100 ml de agua y se enjuagó con tres porciones de CHCl₃. La solución acuosa se llevó a pH > 10 con NaOH concentrado y se extrajo con tres porciones de CHCl₃. Se combinaron estos extractos finales y la combinación se lavó con agua, se secó (Na₂SO₄) y se evaporó, obteniéndose la base libre de la amina. Pureza ≥ 95% por RMN. RMN (CDCl₃): δ 1,31 (m, 5H), 1,45 (pent, J = 3,41 Hz, 4H), 1,65 (m, 4H), 2,46 (s, 3H), 2,49 (d, J = 1,14 Hz, 3H), 2,66 (m, 15H), 3,85 (s, 2H), 6,21 (s, 1H), 7,60 (s, 1H).

La amina libre se disolvió en etanol absoluto y se añadió HCl (anhidro, 1N en etil éter). Se filtró la sal hidrocloreto, se lavó con etanol absoluto y se secó a vacío a temperatura ambiente, obteniéndose 80,2 mg de producto, tetrahidrocloreto de 4'-(14-amino-2,6,11-triazatetradecil-4,5'-8-trimetilpsoraleno, en forma de un sólido de color amarillo pálido.

15 Ejemplo 12

Se usó en este ejemplo un ensayo del bacteriófago r-17 para predecir la eficacia de inactivación del patógeno y determinar la unión a ácido nucleico de los compuestos de unión fotorreactivos de la presente invención. En el ensayo de r-17, el bacteriófago se puso en solución con cada compuesto ensayado y luego se irradió. Se midió la capacidad del fago de infectar seguidamente bacterias e inhibir su crecimiento. El bacteriófago se seleccionó por su ácido nucleico relativamente accesible de manera que la inhibición del crecimiento del cultivo reflejaría con precisión el daño del ácido nucleico por los compuestos a ensayar. El ensayo de bacteriófago para unir ácido nucleico a compuestos a ensayar ofrece un procedimiento seguro y barato para identificar compuestos que probablemente presentan una inactivación eficaz de patógenos. Experimentos anteriores revelan que el ensayo de r-17 mide con precisión la sensibilidad de HIV-1 a compuestos similares.

Se hizo crecer r-17 en bacterias Hfr 3000, de título aproximadamente 5x10¹¹ (R17 y Hfr 3000 se obtuvieron de la American Tissue Culture Collection (ATCC), Washington, DC). La solución madre de fago R17 se añadió a una solución de suero fetal bovino al 15% en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) a una concentración final de fagos de 10⁹/ml. Se pasó una parte alícuota (0,5 ml) a un tubo de polietileno de 1,5 ml de cierre superior de apertura rápida. Se añadió al tubo una parte alícuota (0,004-0,040 ml) de la solución madre del compuesto a ensayar preparada en agua, etanol o sulfóxido de dimetilo a 0,80-8,0 mM. Los compuestos se ensayaron a concentraciones entre 4 μM y 320 μM. (AMT es asequible comercialmente de HRI Inc., Concord, CA; 8-MOP es asequible comercialmente de Sigma, St. Louis, MO). Los tubos se pusieron en un dispositivo de luz como se describe en el Ejemplo 1 y se irradiaron entre 1 y 10 minutos. Se prepararon tubos de dilución de 13 ml estériles; cada compuesto de ensayo requería un tubo con 0,4 ml de caldo Luria (LB) y 5 tubos que contenían 0,5 ml de caldo LB. Para hacer las diluciones, se añadió una parte alícuota de 0,100 ml de la solución irradiada de fago y compuesto a ensayar al primer tubo de dilución de 0,4 ml de medio y luego se añadieron 0,020 ml de esta solución al segundo tubo de 0,5 ml de medio (1:25). Luego se diluyó serialmente (1:25) la segunda solución en los tubos restantes. A cada muestra diluida se añadieron 0,050 ml de bacterias Hfr 3000 cultivadas durante la noche y 3 ml de agar de cobertura de LB, y los materiales mezclados se vertieron en placas de caldo LB. Después de que hubiera endurecido el agar de cobertura, se incubaron las placas a 37°C durante la noche. Se contaron a la mañana siguiente las unidades que formaban placas y se calculó el título de los fagos remanentes después del fototratamiento basándose en los factores de dilución.

Se realizaron los controles siguientes: el "fago solo", en el que no se trató el fago con el compuesto a ensayar y no se irradió (designado "título de partida" en las tablas siguientes); el "UV sola", en el que el fago se irradió sin estar presente el compuesto a ensayar; y el control "oscuro", en el que la solución de fago/compuesto a ensayar no se irradió antes de que se diluyera y plaqueara.

La Tabla 5 que sigue presenta tres experimentos diferentes en los que se ensayó el compuesto 1 de acuerdo con el protocolo de R17 que acaba de describirse. Una comparación de los valores para las muestras de control en las tandas 1-3 (valores en negrita) revela que ni los controles "UV sola" ni "oscuro" dan por resultado una mortalidad significativa de bacterias. (como máximo 0,3 logs inactivados en el control "UV sola" y 0,1 logs inactivados en el control "oscuro").

El control "UV sola" se repitió en muchos experimentos similares con otros compuestos de la presente invención y consistentemente no presentó mortalidad significativa. (No se muestran datos). Así, el control "UV sola" no se presenta en las tablas y figuran siguientes, aunque se realizó en cada experimento de este ejemplo. Para el control "oscuro", después de muchos intentos con varios compuestos de la presente invención, era obvio que no se observó inactivación bacteriana significativa experimentalmente sin irradiación independientemente del tipo de sustitución en la posición 4' del psoraleno. (No se muestran datos). Por ejemplo, en la Tabla 5, el experimento 1 muestra 0,1 logs inactivados. Con el compuesto 1 a oscuras. Por el contrario, cuando el compuesto 1 se irradió durante solamente 1 minuto, la caída del título resultante es >6,7 logs. Por tanto, los controles "oscuros" no se realizaron para compuestos ensayados más tarde y no se presentan en las tablas y cifras que siguen.

ES 2 336 574 T3

TABLA 5

Experimento	Tratamiento	log título	logs inactivados
nº. 1	Fago solo	7,7	-
	uva sola (10')	7,4	0,3
	Compuesto solo (32 μ M)	7,6	0,1
	Comp., 32 μ M, 1' de uva	<1	>6,7
nº.2	Comp., 32 μ M, 10' de uva	<1	>6,7
	Fago solo	7,8	-
		7,6	0,2
		7,7	0,1
uva sola (10')	6,9	0,9	
nº. 3	Compuesto solo (3,2 μ M)	6,1	1,7
	Comp., 3,2 μ M, 1' de uva	7,3	-
	Comp., 3,2 μ M, 10' de uva	7,3	0
	Fago solo	7,3	0
		6,3	1,0
	uva sola (1')	5,6	1,7
	Compuesto solo (16 μ M)	3,9	3,4
	Comp., 4 μ M, 1' de uva		
Comp., 8 μ M, 1' de uva			
Comp., 16 μ M, 1' de uva			

Las siguientes Tablas 6-9 y Fig. 11-13 presentan los resultados del ensayo de R17 para varios compuestos de psoraleno 4'-sustituidos con amino primario. Los datos de las Tablas 7 y 8 aparecen en las Fig. 11 y 12, respectivamente. Los compuestos de psoraleno 5'-sustituidos con amino primario (ejemplos comparativos) que tienen sustituciones en la posición 5' similares a los compuestos de psoraleno 4'-sustituidos con amino primario, se ensayaron también a concentraciones variables, como se ha descrito antes en este ejemplo, y presentan una eficacia de inactivación comparable. Los resultados de estos compuestos se presentan en las Fig. 14 y 15.

ES 2 336 574 T3

Los compuestos de la presente invención que tienen sustituciones en la posición 4' del anillo de psoraleno demostraron ser activos para inactivar R17 como se muestra en las tablas siguientes:

TABLA 6

Título de partida de R17: aprox. 7,5 logs 1 minuto de irradiación	
Compuesto	R17, inactivación logarítmica (32 μ M)
AMT	>6,7
8-MOP	0
1	>6,6

TABLA 7

Título de partida: aprox. 7,2 logs R17 1 minuto de irradiación			
Compuesto	R17 log mort		
	8 μ M	16 μ M	32 μ M
AMT	2,7	4,6	>6,2
1	1,7	2,8	5,3
2	3,8	>6,2	>6,2
3	>6,2	>6,2	>6,2

TABLA 8

Título de partida: aprox. 7,1 logs 1 minuto de irradiación = 1,2 J/cm ²				
Compuesto	R17 log mort			
	8 μ M	16 μ M	32 μ M	64 μ M
AMT	-	4,5	4,8	-
3	5,6	>6,1	-	-
4	-	2,3	4,3	>6,1
5	-	5,6	>6,1	>6,1
6	-	>6,1	>6,1	>6,1

ES 2 336 574 T3

TABLA 9

Título de partida: aprox. 7,1 logs				
1 minuto de irradiación				
	R17		log	mort
Compuesto	8 µM	16 µM	32 µM	64 µM
AMT	-	>6	>6	-
6	>6	>6	-	-
7	-	>6	>6	>6

En la Tabla 7 es aparente que el compuesto 1 exhibe una eficacia de inactivación de R17 mucho más alta que 8-MOP. Como se ve en la Tabla 7 y la Fig.11, el compuesto 1 es uno de los compuestos menos activos. Ambos compuestos, 2 y 3, presentan un log de inactivación más alto que el compuesto 1 en cada punto de concentración. Estos resultados apoyan la teoría de que generalmente los compuestos son mucho más activos que el 8-MOP.

Los compuestos de la presente invención tienen también una eficacia de inactivación de R17 similar o mejor que AMT. En las Tablas 7 y 8 y las Fig. 11-15, todos los compuestos de la presente invención consiguen un log de inactivación de R17 a niveles comparables a los de AMT. Los compuestos 2 y 3 (Tabla 6, Fig. 11), los compuestos 5 y 6 (Tabla 8, Fig. 12) y el compuesto 16 (Fig. 15) presentan una eficacia de inactivación significativamente más alta que AMT.

Los compuestos de la presente invención se ensayaron también a niveles constantes para dosis variables de luz UV. Se prepararon tres conjuntos de tubos de 1,5 ml que contenían partes alícuotas de 0,6 ml de R17 en DMEM (preparado como se ha descrito antes). El compuesto ensayado se añadió a la concentración deseada y las muestras se agitaron en un vórtice. Las muestras se irradiaron luego a intervalos de 1,0 J/cm² hasta alcanzar 3,0 J/cm². Entre cada intervalo de 1,0 J/cm² se extrajeron de cada muestra 100 µl y se pusieron en el primer tubo de dilución correspondiente. Luego se realizaron 5 diluciones secuenciales para cada compuesto ensayado, a las 3 dosis de irradiación, como se ha descrito antes en este ejemplo.

Luego se añadieron a cada tubo 50 µl de bacterias Hfr 3000, 3 ml de agar de cobertura y se volvió a agitar en un vórtice el contenido de los tubos. El contenido de cada tubo se vertió en su propia placa de LB y las placas se incubaron durante la noche a 37°C. Se hizo el recuento de las placas por inspección visual a la mañana siguiente.

En las Fig. 16-22 se presentan los resultados del ensayo para varios compuestos de psoraleno 4'- y 5'-amino primario-sustituídos. Estos datos confirman además que los compuestos son comparables con AMT en cuanto a su capacidad de inactivar R17. Además, los compuestos 6 (Fig. 16), 10 (Fig. 17), 12 (Fig. 18), 15 (Fig. 19 y 22) y el compuesto 17 (Fig. 20) eran más eficaces en la para inactivación de R17 que AMT.

Ejemplo 13

Se evaluó la eficacia de inactivación de patógenos de varios compuestos de la presente invención examinando la capacidad de los compuestos para inactivar virus acelulares (HIV). La inactivación de HIV acelular se realizó como sigue:

Como en el ensayo de R17, se añadieron pequeñas partes alícuotas de los compuestos de las Tablas 10 y 11, siguientes a las concentraciones dadas en las tablas, a una solución madre de HIV-1 a un total de 0,5 ml. La solución madre de HIV (10⁵-10⁷ unidades/ml que forman placa) estaba en DMEM/FBS al 15%. Las partes alícuotas de 0,5 ml se pusieron en placas de cultivo de poliestireno de 24 pocillos y se irradiaron con 320-400 nm (20 mW/cm²) durante 1 min en un dispositivo similar al dispositivo del Ejemplo 1. El dispositivo de fotoactivación usado aquí se ensayó previamente y se encontró que daba resultados de exposición a la luz comparables con los del dispositivo del Ejemplo 1. (No se muestran datos). Los controles incluían la solución madre de HIV-1 solo, HIV-1 más UVA sola y HIV-1 más la máxima concentración de cada psoraleno ensayado, sin UVA. Después de la irradiación, todas las muestras se almacenaron congeladas a -70°C hasta que se ensayaron para determinar a la capacidad de infección por el ensayo en placa de microtitulación. Se separaron las partes alícuotas para la medición de la capacidad de infección por HIV en las muestras tratadas con un compuesto de la presente invención y se cultivaron.

ES 2 336 574 T3

La capacidad residual de infección de HIV se ensayó usando un ensayo de capacidad de infección MT-2. (Descrito previamente por Hanson, C.V., Crowford-Miksza, L y Sheppard, H.W., J. Clin. Micro 28:2030 (1990)). El medio de ensayo era DMEM al 85% (con una concentración alta en glucosa) que contenía 100 μg de estreptomina, 100 U de penicilina, 50 μg de gentamicina y 1 μg de anfotericina B por ml, 15% de FBS y 2 μg de Polybrene (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo) por ml. Las muestras de ensayo y las de control del procedimiento de inactivación se diluyeron en 50% de medio de ensayo y 50% de plasma normal humano combinado. Las muestras se diluyeron serialmente directamente en placas de 96 pocillos (Corning Glass Works, Corning, N.Y.). Las placas se mezclaron en una mesa con agitación oscilante durante 30 segundos y se incubaron a 37°C en atmósfera con 5% de CO₂ durante 1-18 horas. A cada pocillo se añadieron células MT-2 (0,025 ml) [clon alfa-4, asequibles (nº. de catalogo 237) de National Institutes of Health AIDS Research and Reference Reagent Program, Rockville, Md] para obtener una concentración de 80.000 células por pocillo. Después de 1 hora más de incubación a 37°C en atmósfera con 5% de CO₂, se añadieron a cada pocillo 0,075 ml de medio de ensayo que contenía 1,6% de agarosa SeaPlaque (FMC Bioproducts, Rockland, Maine), precalentado a 38,5°C. Las placas se mantuvieron a 37°C durante unos pocos minutos hasta que se habían acumulado varias placas y luego se centrifugaron en soportes de placas a 600xg durante 20 min en una centrifugadora preenfriada a 10°C. En la centrifugadora se formaron monocapas de células antes de que gelificara la capa de agarosa. Las placas se incubaron a 37°C durante 5 días en atmósfera con 5% de CO₂ y se tiñeron añadiendo a cada pocillo 0,05 ml de yoduro de propidio (Sigma Chemical Co.) en solución salina tamponada con fosfato (pH 7,4). Después de 24 a 48 horas, se examinaron visualmente las microplacas teñidas en rojo por fluorescencia poniendo las placas en una caja de luz ultravioleta de 304 nm de 8.000 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ (Fotodyne, Inc., New Berlin, Wis.). Las placas se contaron a un aumento de x20 a x25 con un estereomicroscopio. Los resultados se presentan en las siguientes Tablas 10 y 11. "n" representa el número de tandas para las que el punto de datos es una media.

Los resultados revelan que los compuestos son eficaces para inactivar HIV. De hecho, los datos para concentraciones de 64 μM de compuesto o más altas sugieren que los compuestos 2 y 3 son significativamente más activos que AMT, que anteriormente se había pensado que era uno de los psoralenos antivirales más activos. A concentraciones más bajas, el compuesto 6 es capaz de matar un log de HIV más alto (3,1 logs a 32 μM) que el AMT (2,5 logs a 32 μM). Los otros compuestos de la Tabla 9 presentan una eficacia de inactivación del mismo intervalo que AMT.

TABLA 10

1 minuto de irradiación . Título de partida HIV: aprox. 5 logs				
Compuesto	HIV inactivación logarítmica			
	16 μM	32 μM	64 μM	128 μM
AMT	1,4	1,9->3,6	3,9->3,6	>4,1
1	-	-	2,1	>28
2	1,4	3,8	>4,5	>4,5
3	-	2,7	>3,8	>3,8
4	-	2,2	>3,6	>3,6
5	0,9	1,3	>2,6	-
6	2,0	3,1	>3,8	-
7	0,8	2,1	3,5	-
8	1,1	1,9	3,7	>3,7

ES 2 336 574 T3

TABLA 11

Título de partida de HIV: aprox. 5,4 logs. 1 minuto de irradiación			
Compuesto	HIV inactivación logarítmica		
	16 μ M	32 μ M	64 μ M
6	2,1	3,2	>2,8
9	0,8	1,4	2,7
10	2,0	>3,5	>3,5
12	0,4	0,8	1,3
17	1,2	2,9	3,4
18	1,0	1,0	3,1

Ejemplo 14

Este ejemplo describe el protocolo de inactivación del virus de hepatitis B de pato (DHBV), un modelo para el virus de hepatitis B, usando compuestos de la presente invención.

Se añadió DHBV en yema de huevo de pato a un concentrado de plaquetas (PC) a una concentración final de 2×10^7 partículas por ml y se mezcló sacudiendo suavemente durante 15 min o más. Se añadieron los psoralenos S-70, S-59 AMT a partes alícuotas de 3 ml de PC en minibolsa de Teflón™ a concentraciones de 35, 70 y 100 mM. Las muestras, incluidos los controles sin psoraleno añadido, se irradiaron con 5 J/cm² de UVA, mezclando a incrementos de 1J/cm². Después de la irradiación, se separaron por centrifugación los leucocitos y las plaquetas del virus. El material sobrenadante que contenía DHBV se digirió a 55°C durante la noche con 50 μ g/ml de proteinasa K en un tampón que contenía 0,5% de dodecilsulfato sódico, tampón Tris 20 mM, pH 8,0, y EDTA 5 mM. Las muestras se sometieron a extracción con fenol-cloroformo y cloroformo, a lo que siguió precipitación con etanol. Se usó luego DNA purificado en reacciones de amplificación por PCR con una cantidad inicial de 10^6 genomas DHVD de cada muestra. Los amplicones de PCR se generaron usando pares de cebadores DCD03/DCD05 (127 bp), DCD03/DCD06 (327 bp) y DCD03/DCD07 (1072 bp). La PCR se realizó en tampón estándar de PCR que contenía 0,2 mM de cada desoxinucleósido 5'-trifosfato (dATP, dGTP, dCTP y dTTP), 0,05 mM de cada cebador y 0,5 unidades de Taq polimerasa por 100 ml de reacción. Se realizaron 30 ciclos de amplificación con el siguiente perfil térmico: 95°C 30 s, 60°C 30 s, 72°C 1 min. A la amplificación siguió una incubación durante 7 min a 72°C para que resultaran productos de longitud entera. Se añadió [λ -³²P] dCTP en una cantidad de 10 mCi por 100 ml con el fin de detectar y cuantificar los productos resultantes. Los productos se separaron por electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida y se contaron. La ausencia de señal en una reacción dada se tomó como indicación de inactivación eficaz de DHBV.

Los resultados revelaron que los amplicones menores mostraban una inactivación creciente en función de la concentración de psoraleno para todos los psoralenos ensayados. A las mismas concentraciones, S-59 y S-70 inhibían la PCR de los amplicones menores mejor que el AMT. Para el amplicón de 1072 bp, se observó inhibición completa de PCR a todas las concentraciones de S-59 y S-70, mientras que la muestra sin psoraleno dio una señal fuerte. AMT inhibía la amplificación por PCR del amplicón de 1072 bp a los niveles de 70 y 100 mM, pero se pudo detectar una señal cuando se usó AMT a una concentración final de 35 mM.

Ejemplo 15

En el Ejemplo 13, se ensayaron los compuestos en cuanto a su capacidad para inactivar virus en DMEM/FBS al 15%. En este ejemplo, los compuestos se ensayan en 100% de plasma y en medio predominantemente sintético para demostrar que los procedimientos de la presente invención no están restringidos a un tipo particular de medio.

Para las muestras en medio sintético, se centrifugaron concentrados de plaquetas humanas estándar para separar el plasma. Luego se expresó 85% del plasma y se reemplazó con un medio sintético (denominado "Sterilyte™ 3.0") que contenía acetato sódico 2 mM, glucosa 2 mM; KCl 4 mM, NaCl 100 mM, citrato trisódico 10 mM, NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ 20 mM y MgCl₂ 2 mM. Se añadieron células H9 infectadas con HIV a los concentrados de plaquetas en Sterilyte™ 3,0 al 85% o a concentrados de plaquetas humanas estándar ($2,5 \times 10^7$ células por concentrado) a una concentración final de 5×10^5 células/ml. Los concentrados de plaquetas se pusieron en FL20 modificado con Teflón™ o minibolsas

ES 2 336 574 T3

de Teflón™ (American Fluoroseal Co., Silver Springs, MD), se trataron con uno de los compuestos de la Fig. 23 y 24 a las concentraciones indicadas y luego se irradiaron con 320-400 nm (20 mW/cm²) para 5 J/cm² (para muestras de plasma) o 2 J/cm² (para muestras con 85% de Sterilyte™) en un dispositivo similar al del Ejemplo 1. El dispositivo de fotoactivación usado en este ejemplo había sido ensayado previamente y se encontró que daba por resultado una exposición a la luz comparable a la del dispositivo del Ejemplo 1. (No se muestran datos). Se separaron y cultivaron partes alícuotas para medir la capacidad infectiva del HIV residual en las muestras tratadas con un compuesto de la presente invención.

Para muestras en plasma: células H9 infectadas con HIV se añadieron a concentrados de plaquetas humanas estándar (2,5 x 10⁷ células por concentrado), concentración final 5 x 10⁵ células/ml. Se pusieron en cámaras de Pyrex con camisa de agua partes alícuotas (5 ml) de concentrados de plaquetas contaminadas con HIV. Las cámaras habían sido revestidas previamente en el interior con silicio. Los concentrados de plaquetas se trataron con uno de los compuestos de las Tablas 10 y 11 a las concentraciones dadas en las tablas, y luego se irradiaron con 320-400 nm (20 mW/cm²) durante 1 min en un dispositivo similar al del Ejemplo 1. El dispositivo de fotoactivación usado en este ejemplo había sido previamente ensayado y se encontró que daba una exposición a la luz comparable a la del dispositivo del Ejemplo 1. (No se muestran datos). Se separaron y cultivaron partes alícuotas para medir la capacidad infectiva del HIV residual en las muestras en plasma y Sterilyte™ al 85% usando un ensayo de capacidad infectiva MT-2 (detallado en el Ejemplo 13 y descrito anteriormente por Hanson, C.V y otros, J. Clin. Micro 28:2030 (1990)). Los resultados se dan en las Fig. 23 y 24.

Los resultados revelan que los compuestos de la presente invención son eficaces para inactivar HIV en plasma y en medio sintético. Comparando las Fig. 18 y 19, parecen ambas curvas de inactivación iguales, logrando ambas aproximadamente 5 logs de inactivación a concentraciones 64 μM de compuesto. Sin embargo, la inactivación en medio sintético se realizó con solo 2 J/cm² de irradiación, 3 J/cm² menos que la requerida para alcanzar la misma inactivación en plasma. Así, parece a la vista de estos datos que el medio sintético facilita los procedimientos de inactivación de la presente invención.

Ejemplo 16

En este ejemplo se midió, en función de la capacidad de las bacterias de replicar posteriormente, la inactivación bacteriana por los compuestos fotorreactivos que se unen a ácido nucleico. Se escogió una bacteria gram negativa como representativa de las cepas de bacterias más difíciles de inactivar.

La bacteria, una cepa de *Pseudomonas*, se inoculó en LB con un lazo estéril y se hizo crecer durante la noche en una mesa oscilante a 37°C. Basándose en el supuesto aproximado de que una DO a 610 nm es equivalente a 5 x 10⁸ unidades formadoras de colonias (ufc)/ml, se midió una dilución 1:10 del cultivo en un espectrómetro (fabricado por Shimatsu). El cultivo de bacterias se añadió a una solución de 15% de suero fetal bovino en DMEM a una concentración final de bacterias de aproximadamente 10⁶/ml. Se pasó una parte alícuota (0,8 ml) a un tubo de polietileno de 1,5 ml con cierre superior de apertura rápida. Se añadió al tubo una parte alícuota (0,004-0,040 ml) de la solución madre del compuesto a ensayar preparada en agua, etanol o sulfóxido de dimetilo a 0,80-8,0 mM. Los compuestos se ensayaron a una concentración de 16 μM. Los tubos se pusieron en un dispositivo lumínico como se ha descrito en el Ejemplo 1 y se irradiaron con 1,3 J/cm², 1,2 J/cm² y finalmente 2,5 J/cm², con un total de 5 J/cm². Se tomaron 150 μl para las pruebas después de cada período de pulsación. Se prepararon tubos de dilución de 13 ml estériles; cada compuesto a ensayar requería un tubo con 0,4 ml de caldo LB y 4 tubos que contenían 0,5 ml de caldo LB. Para hacer las diluciones, se añadieron al primer tubo de dilución de 0,5 ml de medio, una parte alícuota de 0,050 ml de la solución de fago irradiada y luego, 0,050 ml de la solución así diluida se añadieron a un segundo tubo de dilución de 0,5 ml de medio (1:10). La segunda solución se diluyó luego serialmente (1:10) en los tubos restantes. Se cultivaron separadamente 100 μl de la muestra original y cada dilución sobre placas de agar con LB y se incubaron durante la noche a 37°C. La mañana siguiente se hizo el recuento de las unidades formadoras de colonias y, basándose en los factores de dilución, se calculó el título del fago remanente después del fototratamiento.

Se hicieron los controles siguientes: "bacteria sola", en el que la bacteria no se trató con el compuesto a ensayar y no se irradió (indicado "título de partida" en las tablas); "UV sola", en el que la bacteria se irradió en ausencia de compuesto a ensayar. No se hicieron controles oscuros por las razones expuestas en el anterior Ejemplo 12.

Los resultados fueron como sigue: El título de partida de las bacterias era de 6,5 logs. Después de 5 j/cm² de irradiación, la inactivación logarítmica para los diversos compuestos ensayados fueron los siguientes: 8-MOP - 1,9 logs; AMT - 5,2 logs, compuesto 2 - >5,5, compuesto 6 - >5,5. Es evidente según estos resultados que los compuestos son más eficaces que AMT y 8-MOP para inactivar una bacteria gram negativa.

Ejemplo 17

En los ejemplos anteriores, los psoralenos de la presente invención han demostrado ser eficaces para inactivar patógenos tales como bacterias (*pseudomonas*), bacteriófagos (R17) y virus (HIV y DHBV). Sin que ello suponga limitarse a cualquier procedimiento por el que los compuestos inactivan patógenos, se cree que la inactivación es resultado de la unión inducida por la luz de los psoralenos al ácido nucleico de los patógenos. Como se ha discutido en lo anterior, el AMT es conocido por su eficacia de inactivación de patógenos y su acción mutagénica acompañante en la oscuridad a concentraciones bajas. A diferencia, los psoralenos menos activos, tales como 8-MOP, que se han

ES 2 336 574 T3

examinado antes, presentan una acción mutágena significativamente menor. Este ejemplo establece que la fotounión y la acción mutágena no son fenómenos ligados en los compuestos de la presente invención. Los psoralenos de la presente invención tienen una eficacia excepcional de inactivación de patógenos mientras que presentan sólo una acción mutágena mínima.

5

En este ejemplo, los compuestos se ensayan en cuanto su acción mutágena sin haber sido irradiados usando el ensayo de Ames. Se siguieron exactamente los procedimientos usados para el ensayo de acción mutágena de Salmonella descrito detalladamente por Maron y Ames. Maron, D.M. y B.N. Ames, Mutation Research 113:173 (1983). Se describe aquí brevemente cada procedimiento. Las cepas para el ensayo TA97a, TA98, TA100, TA102, TA1537 y TA1538 se obtuvieron del Dr. Ames. TA97a, TA98, TA1537 y TA1538 son cepas para analizar el desplazamiento de marco. TA100 y TA102 son cepas para analizar la sustitución de bases. Después de recibirlas, cada cepa se cultivó en una variedad de condiciones para confirmar los genotipos específicos para las cepas.

10

Las cepas de ensayo de Salmonella estándar usadas en este estudio requieren histidina para crecer dado que cada cepa de ensayo contiene un tipo de mutación diferente en el operón de histidina. Además, de la mutación para la histidina estas cepas de ensayo contienen otras mutaciones, que se describen seguidamente, que aumentan mucho su capacidad de detectar mutágenos.

15

Dependencia de la histidina: La necesidad de histidina se ensayó extendiendo primeramente cada cepa en un cultivo mínimo de glucosa suplementada sólo con biotina y luego en un cultivo mínimo de glucosa suplementada con biotina e histidina. Todas las cepas crecieron revelando la falta de crecimiento de las cepas en ausencia de histidina.

20

Mutación de rfa: Se confirmó una mutación que causa pérdida parcial de la barrera de lipopolisacárido que reviste la superficie de la bacteria aumentando así la permeabilidad para moléculas grandes, exponiendo una placa de agar con nutrientes plaqueada con la cepa de ensayo a violeta cristal. Primeramente se añadieron 100 μ l de cada cultivo a 2 ml de agar de cobertura mínima fundido y se vertió sobre una placa nutriente con agar. Luego se puso un disco de papel de filtro estéril saturado con violeta cristal en el centro de cada placa. Después de 16 horas de incubación a 37°C, se almacenaron las placas y se encontró en torno al disco una zona clara sin crecimiento bacteriano, lo que confirmó la mutación de rfa.

25

Mutación de uvrB: Tres cepas usadas en este estudio contienen un sistema diferente de reparación contra UV (TA97a, TA98, TA100, TA1537 y TA1538). Este rasgo se ensayó extendiendo las cepas sobre una placa de agar nutriente que cubría la mitad de la placa e irradiando la cara expuesta de la placa con lámparas germicidas. Después de la incubación, se vió desarrollo sólo en la cara de la placa protegida contra la irradiación UV.

30

Factor R: Las cepas de ensayo (TA97a, TA98, TA100 y TA102) contienen el plásmido pKM101 que aumenta su sensibilidad a mutágenos. El plásmido confiere también a las bacterias resistencia a la ampicilina. Esto fue confirmado por el crecimiento de cepas en presencia de ampicilina.

35

PAQ1: La cepa TA 102 contiene también el plásmido pAQ1 que aumenta más su sensibilidad a mutágenos. Esta plásmido también codifica la resistencia a la tetraciclina. Para ensayar la presencia de este plásmido, se extendió TA102 sobre una placa de glucosa mínima que contenía histidina, biotina y tetraciclina. La placa se incubó durante 16 h a 37°C. La cepa presentó un crecimiento normal que revelaba la presencia del plásmido pAQ1.

40

Los mismos cultivos usados para el ensayo de genotipos se cultivaron nuevamente y partes alícuotas se congelaron en condiciones controladas. Los cultivos se ensayaron de nuevo en cuanto al genotipo para confirmar la fidelidad del genotipo después de la manipulación en la preparación de muestras permanentes congeladas.

45

Los primeros ensayos hechos con las cepas eran para determinar el intervalo de reversión espontánea para cada una de las cepas. Con cada experimento de acción mutágena se midió la reversión espontánea de las cepas de ensayo a la independencia de la histidina y se expresó en términos del número de agentes de reversión espontánea por placa. Estos sirvieron como controles de fondo. En cada cepa de ensayo se incluyó un control positivo de mutagénesis usando un mutágeno de diagnóstico adecuado para esa cepa (2-aminofluoreno a 5 mg/placa para TA98 y azida sódica a 1,5 mg/placa para TA 100).

50

Para todos los experimentos se usó el procedimiento de preincubación. En este procedimiento se descongeló un vial de cada cepa de ensayo y 20 μ l de este cultivo se añadieron a 6 ml de caldo Oxoid Nutrient n°. 2. Esta solución se agitó durante 10 horas a 37°C. En el procedimiento de preincubación, se añadió 0,1 ml de este cultivo durante toda la noche a cada uno de un número requerido de tubos de ensayo estériles. A la mitad de los tubos, se añadieron 0,5 ml de una solución al 10% de S-9 que contenía extracto de hígado de rata inducido con Aroclor 1254 (Molecular Toxicology Inc, Annapolis, MD), y se añadió MgCl₂, KCl, glucosa 6-fosfato, NADP y tampón de fosfato sódico (Sigma, St. Luis, Missouri). En la otra mitad de los tubos se usaron 0,5 ml de tampón de fosfato sódico 0,2M, pH 7,4, en vez de la mezcla de S-9 (muestras -S9). Finalmente, se añadieron 0,1 ml de la solución de ensayo que contenía 0, 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 50, 100, 250 o 500 μ g/ml del compuesto a ensayar. La mezcla de 0,7 ml se agitó en un vórtice y luego se preincubó mientras que se agitaba durante 20 min a 37°C. Después de haber sido agitada, a la mezcla de 0,7 ml se añadieron 2 ml de agar de cobertura fundido suplementado con histidina y biotina e inmediatamente se vertió en una placa de agar con glucosa mínima (el volumen de agar de base era de 20 ml). Se dejó durante 30 min que solidificara el agar de cobertura y luego se invirtieron las placas y se incubaron a 37°C durante 44 horas. Después de la incubación, se contó

55

60

65

ES 2 336 574 T3

el número de colonias que revierten en cada placa. Los resultados aparecen en las Tablas 12(A)-18 (B) seguidamente (“n” representa el número de replicados realizados para cada punto de datos).

5

TABLA 12 (A)

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

CEPA	TA97a -S9	TA97a +S9	AMT TA98 -S9	TA98 +S9	TA100 - S9	TA100 +S9
Dosis µg/placa						
0	109 n = 23	158 n =39	20 n =38	25 n =53	126 n =41	123 n =56
0,1	14 n =3	-23 n =6	3 n =3	1 n =6	-10 n =3	16 n =6
0,5	9 n =3	32 n =6	5 n =3	3 n =6	13 n =3	-12 n =6
1	54 n =3	32 n =6	5 n =3	21 n =6	17 n =3	-19 n =6
5	73 n =3	149 n =6	16 n =6	232 n =9	59 n =9	-6 n =12
10			20 n =9	403 n =9	105 n =15	17 n =15
50			69 n =9	620 n =9	73 n =9	52 n =9
100			114 n =9	745 n =9	75 n =9	85 n =9
250			112 n =6	933 n =6	24 n =6	89 n =6
		5 µg/placa		5 µg/placa	1,5 µg/placa	
Control positivo		2-amino fluoreno		2-amino fluoreno	Azida sódica	
		808		1154	965	
		n=21		n=35	n=38	

65

ES 2 336 574 T3

TABLA 12 (B)

5	CEPA	TA102	TA102	AMT TA1537	TA1537	TA1538	TA1538
		-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
10	Dosis µg/placa						
	0	346	404	9	9	15	19
		n = 26	n =41	n =30	n =45	n =30	n =42
15	0,1	27	-20	0	2	3	3
		n =3	n =6	n =3	n =6	n =3	n =6
20	0,5	47	5	3	2	4	13
		n =3	n =6	n =9	n =12	n =9	n =12
	1	88	-17	5	3	4	37
25		n =3	n =6	n =9	n =12	n =9	n =12
	5	266	51	44	22	13	177
		n =3	n =6	n =9	n =12	n =18	n =21
30	10			52	30	14	255
				n =9	n =9	n =9	n =9
35	50			2688	94		
				n =9	n =9		
	100			2058	686		
40				n =9	n =9		
	250			434	3738		
				n =9	n =12		
45		10µg/placa		10µg/placa	10µg/placa		5µg/placa
50	Control positivo	Peróxido de hidrógeno		9- aminoacridina	2-amino fluoreno		2-amino fluoreno
		660		284	73		1064
55		n=23		n=6	n=24		n=30

60

65

ES 2 336 574 T3

TABLA 13 (A)

8-MOP				
CEPA	TA102-S9	TA102 +S9	TA1537 – S9	TA1537 +S9
Dosis µg/placa				
0	346	404	9	9
	n = 26	n =41	n =30	n =45
1	-55	-46		
	n =14	n =17		
10	-57	-27		
	n =14	n =17		
30			5	1
			n =3	n =6
60			3	1
			n =3	n =6
90			-1	-4
			n =3	n =6
100	217	290		
	n=14	n=17		
500	781	1179		
	n=11	n=11		
Control positivo	10µg/placa		10µg/placa	10µg/placa
	Peróxido de hidrógeno		9- aminoacridina	2-amino fluoreno
	660		284	73
	n=23		n=6	n=24

ES 2 336 574 T3

TABLA 13 (B)

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

8-MOP				
CEPA	TA102-S9	TA102 +S9	TA1537 – S9	TA1537 +S9
Dosis µg/placa				
0	346	404	9	9
	n = 26	n =41	n =30	n =45
1	-55	-46		
	n =14	n =17		
10	-57	-27		
	n =14	n =17		
30			5	1
			n =3	n =6
60			3	1
			n =3	n =6
90			-4	-1
			n =3	n =6
100	217	290		
	n=14	n=17		
500	781	1179		
	n=11	n=11		
Control positivo	10µg/placa		10µg/placa	10µg/placa
	Peróxido de hidrógeno		9- aminoacridina	2-amino fluoreno
	660		284	73
	n=23		n=6	n=24

ES 2 336 574 T3

TABLA 14

Compuesto 1				
CEPA	TA100-S9	TA100 +S9	TA1538 – S9	TA1538 +S9
Dosis µg/placa				
0	126 n = 41	123 n =56	15 n =30	19 n =42
5	292 n =3	-24 n =3	10 n =3	21 n =3
10	337 n =3	-22 n =3	12 n =3	22 n =3
Control positivo	1,50µg/placa			5 µg/placa
	Azida Sódica			2-amino fluoreno
	965 n=38			1064 n=30

TABLA 15 (A)

Compuesto 2				
CEPA	TA98 -S9	TA98 +S9	TA100 – S9	TA100 +S9
Dosis µg/placa				
0	20 n = 35	25 n =50	126 n =41	123 n =56
5			103 n=3	-18 n=3
10	28 n =3	24 n =3	46 n =3	1 n =3
50	52 n =3	35 n =3	182 n =3	115 n =3

ES 2 336 574 T3

	100	39	53	121	96
		n =6	n =6	n =3	n =3
5	250	29	69		
		n =3	n =3		
10	500	6	63		
		n =3	n =3		
15	Control positivo	10µg/placa	10µg/placa		5 µg/placa
		9-aminoacridina	2-amino fluoreno		2-amino fluoreno
20		284	73		1064
		n=6	n=24		n=30

TABLA 15 (B)

Compuesto 2				
CEPA	TA1537 -S9	TA1537 +S9	TA1538 – S9	TA1538 +S9
Dosis µg/placa				
0	9	9	15	19
	n = 30	n =45	n =30	n =42
5			-8	2
			n=3	n=3
10	36	5	-13	4
	n =3	n =3	n =3	n =3
50	282	40		
	n =3	n =3		
100	258	88		
	n =3	n =3		
250	176	744		
	n =3	n =3		
500	114	395		

ES 2 336 574 T3

	n =3	n =3		
Control positivo	10µg/placa	10µg/placa		5 µg/placa
	9-aminoacridina	2-amino fluoreno		2-amino fluoreno
	284	73		1064
	n=6	n=24		n=30

TABLA 16

Compuesto 3				
CEPA	TA100-S9	TA100 +S9	TA1538 – S9	TA1538 +S9
Dosis µg/placa				
0	126	123	15	19
	n = 41	n =56	n =30	n =42
5	47	-19	0	1
	n =3	n =3	n =3	n =3
10	47	8	-6	9
	n =3	n =3	n =3	n =3
Control positivo	1,50µg/placa			5 µg/placa
	Azida Sódica			2-amino fluoreno
	965			1064
	n=38			n=30

ES 2 336 574 T3

TABLA 17

Compuesto 4				
CEPA	TA100-S9	TA100 +S9	TA1538 – S9	TA1538 +S9
Dosis µg/placa				
0	126 n = 41	123 n =56	15 n =30	19 n =42
5	-41 n =3	-10 n =3	-2 n =3	7 n =3
10	3 n =3	-3 n =3	-2 n =3	-2 n =3
Control positivo	1,50µg/placa			5 µg/placa
	Azida Sódica			2-amino fluoreno
	965 n=38			1064 n=30

TABLA 18 (A)

Compuesto 6				
CEPA	TA98 -S9	TA98 +S9	TA100 – S9	TA100 +S9
Dosis µg/placa				
0	20 n = 38	25 n =53	126 n =41	123 n =56
5			-32 n=3	12 n=3
10	12 n =3	-5 n =3	3 n =9	-5 n =9
50	12 n =3	2 n =3	2 n =6	24 n =6

ES 2 336 574 T3

100	22	20	-18	-2
	n =6	n =6	n =6	n =6
250	12	40		-38
	n =3	n =3		n =3
500	9	52		
	n =3	n =3		
Control positivo		5µg/placa		1,5 µg/placa
		2-amino fluoreno		Azida sódica
		1154		965
		n=35		n=38

TABLA 18 (B)

Compuesto 6				
CEPA	TA1537 -S9	TA1537 +S9	TA1538 – S9	TA1538 +S9
Dosis µg/placa				
0	9	9	15	19
	n = 30	n =45	n =30	n =42
5			-5	0
			n=3	n=3
10	141	-1	-2	8
	n =6	n =6	n =3	n =3
50	2010	17		
	n =6	n =6		
100	795	35		
	n =6	n =6		
250	228	99		
	n =6	n =6		
500	43	369		
	n =3	n =3		

ES 2 336 574 T3

Control positivo	10µg/placa	10µg/placa		5 µg/placa
	9-aminoacridina	2-amino fluoreno		2-amino fluoreno
	284	73		1064
	n=6	n=24		n=30

TABLA 19 (A)

Compuesto 18		
CEPA	TA98 -S9	TA98 +S9
Dosis µg/placa		
0	17 n=3	28 n=3
5		
10	21 n=3	8 n=3
50	303 n=3	6 n=3
100	390 n=3	26 n=6
200	225 n=3	42 n=3
500		
Control positivo		5µg/placa de 2-aminofluoreno 2589 n=3

ES 2 336 574 T3

TABLA 19 (B)

Compuesto 18		
CEPA	TA1537 -S9	TA1537 +S9
Dosis µg/placa		
0	8 n=3	7 n=3
5		
10	21 n=3	8 n=3
50	303 n=3	6 n=3
100	390 n=3	26 n=3
200	225 n=3	42 n=3
500		
	100 µg/placa de ATM 608 n=3	100 µg/placa de AMT 500 n=3

50 Maron y Ames (1983) describen los puntos de vista conflictivos en cuanto al tratamiento estadístico de datos generados en el ensayo. A la luz de ello, este ejemplo adopta el modelo simple de acción mutágena que se caracteriza por un aumento de dos veces o más en el número de agentes que revierten por encima del ruido de fondo (en negrita en las tablas), así como la respuesta mutagénica dependiente de la dosis al fármaco.

55 En cuanto a 8-MOP, la única respuesta mutagénica detectada fue un mutágeno débil de sustitución de una base en TA102 a 500 µg/placa (Tabla 13 (B)).

60 En claro contraste, el AMT (Tabla 12 (A) y 12 (B)) presentaba una acción mutágena de desplazamiento de marco entre 5 y 10 µg/placa en TA97a y TA98, a 5 µg/placa en TA1537 y a 1 µg/placa a TA1538. El AMT no presentaba mutaciones significativas de sustitución de bases.

65 En cuanto al compuesto 1, la única respuesta mutagénica detectada fue un mutágeno débil de desplazamiento de marco en TA1538 a 5 µg/placa en presencia de S9. El compuesto 1 presentó también mutación en la cepa TA100, pero sólo en ausencia de S9. El compuesto 2 también presentó acción mutágena débil de desplazamiento de marco en presencia de S9 en TA98 y TA1537. Los compuestos 3 y 4 no presentaban acción mutágena. El compuesto 6 no tenía acción mutágena de sustitución de bases pero presentaba una respuesta de desplazamiento de marco en TA98 en pre-

sencia de S9 a concentraciones de 250 $\mu\text{g/placa}$ y superior. También presentó una respuesta a 50 $\mu\text{g/placa}$ en TA1537 en presencia de S9. El compuesto 18 presentó sólo una respuesta débil a concentraciones altas en presencia de S9 en las cepas TA 90 y TA 1537. La respuesta era más alta en ausencia de S9, pero todavía seguía siendo significativamente inferior a la de AMT, que presentaba acción mutágena a concentraciones mucho menores (5 $\mu\text{g/placa}$).

Se deduce claramente de estos datos que los compuestos son menos mutagénicos que el AMT, según el ensayo de Ames. Al mismo tiempo, estos compuestos presentan una eficacia de inactivación mucho más alta que el 8-MOP, como se ve en los Ejemplos 12 y 16. Estos dos factores demuestran que los compuestos combinan los mejores rasgos de AMT y 8-MOP, alta eficacia de inactivación y baja acción mutágena.

Ejemplo 18

En el Ejemplo 15, los compuestos de la presente invención presentan la capacidad de inactivar patógenos en medios sintéticos. Este ejemplo describe procedimientos en los que se pueden introducir y usar medios sintéticos y compuestos de la presente invención para inactivar patógenos en sangre. La Fig. 25A presenta esquemáticamente el enfoque de separación de productos estándar de sangre usado actualmente en bancos de sangre. Se unen tres bolsas con tubos flexibles para hacer un ensamblaje de transferencia de sangre (200) (por ejemplo, adquirible comercialmente de Baxter, Deerfield, Ill.). Después de introducir sangre en la primera bolsa (201), se somete a centrifugación el dispositivo entero (por ejemplo, la centrifugadora de rotor oscilante Sorvall™, Dupont), lo que da por resultado glóbulos rojos empaquetados y plasma rico en plaquetas en la primera bolsa. El plasma se extrae por exclusión de la primera bolsa (201) (por ejemplo, usando un dispositivo Fenwall™ para extracción de plasma) a través de los tubos y a la segunda bolsa. Se separa luego la primera bolsa (201) y el conjunto de dos bolsas se centrifuga para crear concentrado de plaquetas y plasma pobre en plaquetas; éste último se saca de la segunda bolsa (202) a la tercera bolsa (203).

La Fig. 25B representa esquemáticamente una realización de la presente invención con la que el medio sintético y el compuesto de fotoactivación se introducen en el concentrado de plaquetas como se indica en la Fig. 25A. Un conjunto de dos bolsas (300) ha sido acoplado de forma estéril con la bolsa de concentrado de plaquetas (202) (indicado como "P.C"). El acoplamiento estéril es bien conocido en la técnica. Véase, por ejemplo, patente de Estados Unidos N.º 4.412.835, de D.W.C. Spencer. Véanse también las patentes de Estados Unidos N.º 4.157.723 y n.º. 4.265.280. Los dispositivos de acoplamiento estéril son asequibles comercialmente (por ejemplo, Terumo, Japón).

Una de las bolsas (301) del conjunto de dos bolsas (300) contiene una formulación de medio sintético (indicado como "STERILYTE"). En la segunda etapa representada en la Fig. 25B, el concentrado de plaquetas se mezcla con el medio sintético pasando el concentrado de plaquetas a la bolsa con medio sintético (301) por paso del concentrado de plaquetas desde la primera bolsa de sangre a la segunda bolsa de sangre a través del medio de conexión estéril. El compuesto de fotoactivación puede estar en la bolsa que contiene medio sintético (301), añadido en el momento de la producción. Alternativamente, el compuesto se puede mezclar con la sangre en el punto de extracción, si el compuesto se añade a la bolsa de recogida de sangre (Fig. 25A, 201) en el momento de la producción. El compuesto puede estar en forma seca o en una solución compatible con la conservación de la sangre.

La Fig. 25C representa esquemáticamente una realización del enfoque de descontaminación de la presente invención aplicada específicamente a un concentrado de plaquetas diluido con medio sintético según la Fig. 25B. En esta realización, las plaquetas se han pasado a una bolsa (301) con medio sintético. El compuesto de fotoactivación ha sido introducido ya en la bolsa de recogida de sangre (201) o, está en la bolsa (301) de medio sintético. Entonces, las plaquetas se pasan a la bolsa de medio sintético a través del medio estéril de conexión o el medio sintético se pasa a la bolsa de plaquetas. Luego, la bolsa que contiene la mezcla de concentrado de plaquetas y medio sintético (301), que tiene unas propiedades de transmisión de luz UV y otras características adecuadas para la presente invención, se pone en un dispositivo (tal como el descrito en el Ejemplo 1) y se ilumina.

Seguidamente al fototratamiento, las plaquetas descontaminadas se pasan desde la bolsa (301) de medio sintético a la bolsa de almacenamiento (302) del conjunto de dos bolsas (300). La bolsa de almacenamiento puede ser una bolsa de almacenamiento disponible en el comercio (por ejemplo, la bolsa CLX de Cutter).

La Fig. 25D representa esquemáticamente una realización del enfoque de descontaminación de la presente invención que incluye un dispositivo de captura para eliminar el compuesto de fotoactivación del material tratado después del fototratamiento. La presente invención contempla varios materiales absorbentes que se pueden usar en un dispositivo de captura para eliminar compuestos de inactivación de los que los siguientes son una lista no exclusiva: Amberlite XAD-4 (asequible de Rohm and Haas Ltd., Croydon, Surrey, RU) ("Resin hemoperfusion for Acute Drug Intoxication", Arch Intern Med 136:263 (1976)); Amberlite XAD-7 ("Albumin-Coated Amberlite XAD-7 Resin for Hemoperfusion in Acute Liver Failure", Artificial Organs, 3:20 (1979); Amberlite 200, Amberlite DP-1, Amberlite XAD-2, Amberlite XAD-16; carbonos activados ("Charcoal hemoperfusion in Drug Intoxication", British J. Hospital Med. 49:493 (1993); sílice ("In vitro Studies of the Efficacy of Reversed Phase Silica Gel as a Sorbent for Hemo- and Plasmaperfusion", Clinical Toxicology 30:69 (1992)). En una realización, la presente invención contempla un material absorbente que actúa junto con un medio filtrante para eliminar compuestos.

Ejemplo 19

Este Ejemplo implica una estimación del impacto de los procedimientos de la presente invención sobre la función de las plaquetas. Se emplearon cuatro indicadores de la viabilidad y función de las plaquetas: (1) expresión de GMP-140, (2) mantenimiento del pH; (3) agregación de plaquetas y (4) recuento de plaquetas.

Para medir los efectos de los presentes compuestos y procedimientos de descontaminación sobre la función de las plaquetas usando estos cuatro indicadores, se prepararon cuatro muestras de cada compuesto ensayado, dos muestras de control y dos que contenían compuesto. Se obtuvieron tres unidades de plaquetas humanas de Sacramento Blood Centre, Sacramento, CA. Cada una de éstas se pasó en condiciones estériles a un tubo de centrifugadora de 50 ml y luego partes alícuotas de cada unidad se pasaron a una segunda serie de tubos estériles de 50 ml de centrifugadora. A cada tubo de centrifugadora que contenía concentrado de plaquetas (PC) se añadió una parte alícuota de la solución madre de compuesto para tener una concentración final de 100 µg de compuesto. Los compuestos ensayados en este experimento fueron el compuesto 2 (36 µl de 10 mM de la solución madre añadidos a 4 ml de PC), el compuesto 6 (173,5 µl de 9,8 mM de la solución madre añadidos a 16,8 ml de PC), el compuesto 17 (2,0 ml de 1 mM de la solución madre añadidos a 18 ml de PC), y el compuesto 18 (0,842 ml de 2,0 mM de la solución madre añadidos a 16 ml de PC). Las muestras se pipetearon suavemente hacia arriba y abajo para mezclar. Luego se pasaron partes alícuotas (de 3 ml u 8 ml) de cada muestra a dos Medi-bags™ de Teflon™ estériles (American Fluoroseal Co., Silver Springs, DM) (actualmente propiedad de The West Company, Lionville, PA). Las muestras se trataron en una de dos bolsas de diferente tamaño que tenían 3 ml u 8 ml de capacidad. Las bolsas tenían aproximadamente la misma relación de superficie a volumen, y experimentos previos han demostrado que las dos bolsas tienen aproximadamente propiedades equivalentes durante la irradiación de las muestras. (No se muestran datos). Para cada compuesto ensayado, se prepararon dos muestras de control extrayendo partes alícuotas de concentrado de plaquetas (17 ml si se usaba una bolsa de 8 ml, 4 ml si se usaba una bolsa de 3 ml) de la misma primera serie de tubos de centrifugadora de 50 ml de la que se extrajo la muestra de compuesto, y dividiéndola, como antes, en las Medibags. Una de cada par de Medibags que contenían compuesto y una de cada par de Medibags de control se iluminaron con 5 Julios/cm² en el dispositivo descrito antes en el Ejemplo 1. Luego, todas las Medibags experimentales y de control se pusieron en un agitador de plaquetas para almacenarlas durante 5 días. Los mismos experimentos se repitieron varias veces para obtener más datos estadísticamente significativos, indicados como “n”, el número de puntos de datos representados, en los gráficos de las Fig. 26-29 que se discuten más adelante. También en las Fig. 26-29, “C1” representa un control no tratado del día 1, “D5” representa un control no tratado después de almacenamiento durante 5 días, “uv” representa una muestra que ha sido tratada sólo con luz ultravioleta y “PCD” representa la muestra de ensayo tratada con luz ultravioleta y un compuesto de la presente invención.

Para obtener datos para muestras de control el día 1, se extrajeron aproximadamente 3 ml del volumen restante de cada una de las tres unidades y se dividieron en dos tubos de 1,5 ml. Estas muestras se ensayaron en cuanto al pH como se describe seguidamente. También se hizo un recuento de plaquetas a una dilución 1:3 como se describe luego. El concentrado residual de plaquetas de cada unidad se agitó durante 10 min a 3800 rpm (3000 g) en una centrifugadora Sorval RC3B (DuPont Company, Wilmington, Delaware) a plaquetas sedimentadas. Luego se decantó el plasma en 2 tubos estériles de 50 ml (uno el día 1 y el otro almacenado a 4°C para el día 5) para uso en el ensayo de agregación.

1. Expresión de GMP-140

Cuando se activaron las plaquetas, una glucoproteína de membrana de gránulo alfa, denominada p-selectina (GMP140), queda expuesta en la superficie de la plaqueta. Menos de 5% de plaquetas normales no estimuladas, frescas, expresan por citometría de flujo niveles detectables de GMP. Véase en general M.J. Metzelaar, *Studies on the Expression of Activation-Markers on Human Platelets* (Tesis 1991).

Para medir GMP-140, una pequeña parte alícuota de plasma rico en plaquetas se pone en tampón HEPES que contiene un anticuerpo que se une a GMP 140 o un Isótopo de control de IgG de ratón. CD62 es un anticuerpo monoclonal disponible comercialmente que se une a GMP 140 (adquirible de Sanbio, Ud, Países Bajos; Caltag Labs, So. San Francisco, CA, y Becton Dickinson, Mountain View, CA). Después de una incubación a temperatura ambiente durante 15 min, se añade al tubo, en cantidades de saturación, F(ab')₂ de cabra contra IgG de ratón conjugado a FTTC (Caltag Laboratories, So. San Francisco, CA) y se deja que incube a temperatura ambiente (RT) durante 15 min. Finalmente, las células se diluyen en 1% de paraformaldehído en solución salina tamponada con fosfato y se analiza en un FACSCAN™ (Becton Dickinson, Mountain View, CA). El control positivo se hace añadiendo al sistema, a una concentración final de 2 x 10⁻⁷M, miristato acetato de forbol (PMA).

En este ejemplo se empleó CD62 para medir el impacto, si hubiera, de la radiación en presencia de varios compuestos de la presente invención sobre la activación de plaquetas. El anticuerpo se mezcló con tampón HEPES (10 µl de anticuerpo [0,1 mg/ml]:2,49 ml de tampón) y se almacenó en 50 µl de alícuotas a -40°C antes de uso. Un control positivo estaba constituido por: 10 µl de CD62, 8 µl de PMA y 2,482 ml de tampón HEPES. También se empleó un concentrado 5x de control de IgG1 de ratón (0,05 mg/ml) (Becton Dickinson, Mountain View, CA #9040). El anticuerpo se diluyó en tampón HEPES (20 µl de anticuerpo:2,48 ml de tampón) y se almacenó a -40°C. Se almacenó miristato acetato de forbol (PMA) (Sigma, St. Louis, MO). Al usarlo, éste se diluyó en DMSO (la concentración de trabajo era de 10 µg/ml).

ES 2 336 574 T3

Se preparó paraformaldehído al 1% (PFA) (Sigma, St. Louis, MO) añadiendo 10 g de paraformaldehído a 1 l de PBS. La mezcla se calentó a 70°C y luego se añadió a gotas NaOH 3M hasta que la solución era transparente. Se enfrió la solución y el pH se ajustó a 7,4 con HCl 1N. La solución se filtró y almacenó.

5 El procesamiento de cada una de las muestras de concentrados de plaquetas después de tratamiento implicaba la adición de 5 microlitros de concentrado de plaquetas, diluido 1:3 en tampón HEPES, a cada tubo de centrifugadora que contenía el anticuerpo CD62 y los reactivos apropiados y una mezcla suave por remolinado. Las muestras se incubaron luego durante 15 min a temperatura ambiente.

10 A cada tubo se añadieron (5 microlitros) el IgG-FITC antirratón de cabra y la solución se mezcló en un vórtice suavemente. Las muestras se incubaron durante 15 min más a temperatura ambiente. Seguidamente, a cada tubo se añadió 1 ml de PFA al 1% en PBS y se mezcló suavemente. Se analizaron las plaquetas en el FACSCAN™. Los resultados se presentan en las Fig. 26C, 27C, 28C y 29C (las Fig. 26 corresponden al compuesto 2, las Fig. 27 corresponden al compuesto 6, las Fig. 28 corresponden al compuesto 17 de referencia y las Fig. 29 corresponden al
15 compuesto 18 de referencia). Claramente, tres de los cuatro compuestos ensayados, 2, 6 y 17, presentan una diferencia pequeña o no presentan diferencia entre el control no tratado el día 5 (D5) y la muestra tratada con luz y compuesto psoraleno (PCD). Sólo el compuesto 18 presentaba un aumento notable por encima del control. Pero el valor seguía siendo inferior al valor de control positivo.

20 2. Mantenimiento del pH

Los cambios del pH de plaquetas en el concentrado pueden alterar sus características morfológicas y su supervivencia después de transfusión. Moroff, G. y otros, *Factors Influencing Changes in pH during Storage of Platelet Concentrates at 20-24°C*, Vox Sang. 42:33 (1982). El intervalo de pH en el que funcionan normalmente las plaquetas
25 es de aproximadamente 6,0-6,5 a 7,6. Stack, G. y E.L. Snyder, *Storage of Platelet Concentrate*, Blood Separation and Platelet Fractionation 99 a 107 (1991). Para medir el pH de las muestras se usó un analizador CIBA-CORNING 238 pH/Blood Gas (CIBA-CORNING, Norwood, MA). Se introdujo en el analizador de pH/gas de sangre una pequeña cantidad de concentrado de plaquetas de cada muestra.

30 Las mediciones de pH se hicieron para todas las muestras al tiempo cero y después de 5 días de almacenamiento. Las Fig. 26D, 27D, 28D y 29D son gráficos de barras que indican los resultados del pH para un control oscuro, un control con luz y un compuesto experimental de luz más compuesto. Estos gráficos indican que el pH de las muestras de concentrado de plaquetas después de iluminación en presencia de cualquiera de los compuestos permanece por encima de pH 6,5. Así, las plaquetas permanecen a pH aceptable para plaquetas almacenadas después del tratamiento
35 de fotoinactivación usando compuestos de la presente invención.

3. Agregación

La agregación de plaquetas se mide por el cambio de la transmisión óptica que una muestra de plaquetas exhibe
40 después de estimular la agregación. La agregación de plaquetas se midió usando un Whole Blood Aggregometer (Chrono-Log Corp., Havertown, PA, modelo 560 VS). Se controló el número de plaquetas de cada muestra para que fuera constante para cada medida. Se usó un contador de células Sysmex modelo F800 (Toa Medical Electronics, Kobe, Japón) para el recuento de plaquetas en las muestras de plaquetas y se usó plasma autólogo para ajustar a 300.000/ml el número de plaquetas del concentrado de plaquetas.

45 Para el proceso, todas las muestras se incubaron en un tubo de plástico con tapón durante 30 min a 37°C para la activación. El agregómetro se calentó a 37°C. Para medir la agregación de plaquetas se usó el canal óptico. La velocidad magnética del agregómetro se fijó a 600 rpm/min. El concentrado de plaquetas restante, del que no se extrajo muestra para tratamiento, se centrifugó a alta velocidad (14.000 g) con una microcentrifugadora durante 5 min para obtener
50 recipientes de plasma pobre en plaquetas autólogo a la muestras experimentales.

Para comenzar, se añadieron 0,45 ml del plasma autólogo pobre en plaquetas junto con 0,5 ml de solución salina a una cubeta de vidrio y se pusieron en el canal de PPP. Luego se añadieron a una cubeta de vidrio (que contenía un imán pequeño) 0,45 ml del concentrado muestra de plaquetas y 0,50 ml de solución salina. Después de un minuto, se
55 añadieron a la cubeta de la muestra los reactivos ADP y colágeno (10 µl). La concentración final de ADP era de 10 µM y la concentración final de colágeno era de 5 µg/ml. La agregación de plaquetas se registró durante aproximadamente 8-10 min o hasta que se alcanzó la lectura máxima.

Los resultados aparecen en las Fig. 26B, 27B, 28B y 29B. La línea de 100% de agregación es el nivel al que el
60 registrador se puso a cero. La línea de 0% de agregación es el nivel al que transmitían las plaquetas antes de haber añadido ADP y colágeno. El valor de agregación de plaquetas de la muestra se determina tomando el valor máximo de agregación como porcentaje del intervalo total. Tres o cuatro compuestos ensayados presentaban una diferencia pequeña o no presentaban diferencia en los niveles de agregación entre las muestras tratadas con compuesto y las muestras no tratadas que se almacenaron durante 5 días. El compuesto 2 presentaba una pequeña reducción de la agregación,
65 de aproximadamente 8% desde el control el día 1. La agregación para la muestra tratada con compuesto y uv era la misma que la de la muestra tratada sólo con uv. Esto soporta la evidencia de que los compuestos descontaminantes ensayados no tienen efecto significativo sobre la agregación de plaquetas cuando se usan en los procedimientos de la presente invención.

4. Recuento

Para el recuento de plaquetas se usó un contador de células Sysmex. Las muestras se diluyeron 1:3 en solución salina de banco de sangre.

Los resultados de las mediciones del recuento de plaquetas aparecen en las Fig. 26A, 27A, 28A y 29A. Para cada uno de los compuestos, las muestras no presentan una caída, o presentan una caída pequeña, del número de plaquetas entre el control del día 5 y la muestra tratada el día 5. Es interesante que las muestras tratadas con los compuestos 6, 17 de referencia y 18 de referencia presentan un número de plaquetas más alto que las muestras tratadas sólo con luz. Por ejemplo, las muestras tratadas con el compuesto 6 tenían unos recuentos equivalentes al del control del día 5, pero las muestras tratadas sólo con luz ultravioleta tenía una reducción de aproximadamente 33% en el recuento de plaquetas. Así, el tratamiento con los compuestos de la presente invención no sólo es compatible con el mantenimiento del número de plaquetas, sino que realmente evita la caída del número de plaquetas causada por la exposición a la luz ultravioleta.

Ejemplo 20

Un compuesto preferido para descontaminar sangre a usar posteriormente *in vivo* no debe ser mutagénico para el receptor de la sangre. En la primera parte de este experimento, se exploraron algunos compuestos para determinar su nivel de genotoxicidad en comparación con el aminometiltrimetilpsoraleno. En la segunda parte, se midió la capacidad clastógena *in vivo* de algunos compuestos de la presente invención observando la formación de micronúcleos en reticulocitos de ratón.

1. Genotoxicidad

Los cultivos de células mamíferas son herramientas valiosas para estimar el potencial clastógeno de productos químicos. En tales estudios, las células se exponen a los productos químicos con y/o sin sistema de activación metabólica de rata S-9 (S-9) y luego se examinan para determinar la supervivencia de las células (para exploración de la genotoxicidad) o cambios en la estructura del cromosoma (para un ensayo de aberración de cromosomas).

Se usaron células de ovario de hámster chino (CHO; ATCC CCL 61 CHO-K1) para los ensayos de genotoxicidad y aberración cromosómica. Las células CHO se usan extensamente para el ensayo citógeno porque tienen un número relativamente bajo de cromosomas ($2n=20$) y una velocidad de multiplicación rápida (12 a 14 horas dependiendo de las condiciones de cultivo). Las células crecieron en una atmósfera con 5% de CO₂ a aproximadamente 37°C en medio de McCoy's 5a con 15% de suero fetal bovino (FBS), L-glutamina 2 mM y solución de 1% de penicilina-estreptomicina para mantener un crecimiento exponencial. Este medio se usó también durante la exposición de las células al compuesto a ensayar cuando no se usó S-9. Se mantuvieron los cultivos de células y las exposiciones de células se realizaron en matraces T-75 o T-25.

Cada uno de los compuestos de muestra se ensayó a siete diluciones, 1, 3, 10, 33, 100, 333 y 1000 µg/ml. El compuesto se añadió en medio McCoy's 5a completo. Después de haber añadido el compuesto, se hicieron crecer las células en la oscuridad a aproximadamente 37°C durante aproximadamente 3 horas. Luego se aspiró el medio que contenía el compuesto, se lavaron las células tres veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) a aproximadamente 37°C y se añadió medio McCoy's 5a completo fresco. El control positivo era metilmetanosulfonato. El control disolvente era sulfóxido de dimetilo (DMSO) diluido en medio de cultivo. Para los ensayos en que se usaba activación metabólica (véase seguidamente) la mezcla de activación se añadió también al control de disolvente. Los cultivos se incubaron luego durante un tiempo adicional de aproximadamente 12 horas antes de la cosecha. Se añadió colquicina (concentración final, 0,4 µg/ml) aproximadamente 2,5 horas antes de la cosecha.

Después de aproximadamente 2,5 horas en colquicina, se cosecharon las células. Las células se eliminaron de la superficie de los matraces usando un rascador de células. La suspensión de células resultante se centrifugó, se aspiró el material sobrenadante y se añadieron 4 ml de una solución hipotónica de KCl 0,075M a las células durante 15 min a aproximadamente 37°C. Luego se centrifugaron las células, se aspiró el material sobrenadante y las células se pusieron en suspensión en un fijador de metanol:ácido acético (3:1). Después de cambiar tres veces el fijador, se prepararon muestras sobre portaobjetos con células de todos los matraces, que se secaron al aire. La densidad de células y la calidad de la metafase en el portaobjetos inicial de cada matraz se controlaron usando un microscopio de contraste de fase; de cada matraz se prepararon al menos dos portaobjetos. Los portaobjetos se tiñeron en Giemsa al 3% durante 3 min, se enjuagaron en agua desionizada y se pasaron por xileno. Se montaron cubreobjetos con Permout. Las muestras se examinaron luego para determinar qué concentración de cada compuesto a ensayar representaba una dosis tóxica.

Un análisis de los resultados reveló que el AMT era genotóxico a 30 µg/ml. Por el contrario, los compuestos 2 y 6 eran genotóxicos sólo a 100 µg/ml, más de tres veces la dosis tóxica de AMT.

En este experimento se ensayó también un compuesto psoraleno con una estructura distinta de la de los compuestos usados en la presente invención, 8-aminometil-4,4',5'-trimetilpsoraleno, que reveló ser tóxico a 10 µg/ml. Si bien el compuesto aminometil-8-sustituido y estructuras similares pueden no ser adecuados para los procedimientos de la

ES 2 336 574 T3

presente invención, pueden ser útiles para fines alternativos. A la luz de la capacidad de los compuestos de prevenir la replicación de ácidos nucleicos en combinación con su extrema toxicidad, los compuestos podrían usarse, por ejemplo, para tratar enfermedades caracterizadas por un crecimiento celular incontrolado, tales como cáncer.

5 2. Protocolo del ensayo de micronúcleos

Se prepararon soluciones salinas para los compuestos 2, 6, 17 de referencia y 18 de referencia a varias concentraciones. Se inyectaron 0,1 ml de una solución de compuesto en vena de la cola a ratones Balb/c macho. Al menos se inyectaron 3 ratones por nivel de dosis. La solución salina sólo se usó como control negativo. Para control positivo se administró ciclofosfamida (cicloPP) a una dosis de 30 mg/kg. En el grupo experimental, las inyecciones se repitieron una vez al día durante 4 días. En el grupo de control positivo, la muestra se administró sólo una vez, el día 3. El día 5 se extrajeron varios microlitros de sangre de cada sujeto y se esparcieron sobre un portaobjetos de vidrio. Las células se fijaron en etanol absoluto y se almacenaron en una gradilla de portaobjetos.

Para el análisis, las células se tiñeron con naranja de acridina y se examinaron con un microscopio de fluorescencia por recuento de: (i) el número de reticulocitos por 5000 eritrocitos, y (ii) el número de reticulocitos micronucleados por 1000 reticulocitos. Los reticulocitos se distinguían por su fluorescencia roja debida a la presencia de RNA. Se distinguían micronúcleos por su fluorescencia verde debida a la presencia de DNA. Se calculó luego el porcentaje de reticulocitos (%PCE). Una disminución de la frecuencia de eritrocitos, representada por un aumento del porcentaje de reticulocitos, es una indicación de toxicidad en la médula ósea. Se calculó también el valor porcentual de reticulocitos con micronúcleos (%PCE con MN). Un aumento de %PCE con MN es una medida de clastogenia.

Después de haber determinado los resultados iniciales, se repitió el experimento usando niveles de dosis aumentados, hasta que: (i) se vio formación de micronúcleo, (ii) se observó toxicidad en médula ósea, o (iii) se alcanzó la dosis letal, o (iv) se administró una dosis de 5 g/kg. Para los ensayos con cada uno de los compuestos 2, 6, 17 y 18, se alcanzó la dosis letal antes de que hubiera señales de toxicidad en médula ósea o formación de micronúcleo. Los resultados del experimento se presentan en la Tabla 20. De los datos de la tabla se deduce de no se observó toxicidad en la médula ósea para ninguno de los compuestos en las dosis ensayadas. El valor porcentual de reticulocitos para tratamiento con cada compuesto permanecía próximo al valor de control negativo. Esto contrasta con una caída de aproximadamente 2-2,5%PCE/RBC vista en el control positivo, lo que representa un empobrecimiento de eritrocitos debido a la toxicidad en médula ósea. Ninguno de los compuestos presentó acción clastogena.

TABLA 20

Compuesto	Dosis (mg/kg)	PCE/RBC (%)	PCE+MN (%)	nº de duplicados
2	40	3,08±0,82	0,20±0,1	4
2	25	3,46±0,32	0,25±0,11	6
CicloPP	30	1,65±0,64	1,98±0,40	6
Sol. salina		3,49±0,55	0,18±0,13	6
6	45	3,79±0,41	0,36±0,14	3
6	30	3,61±0,12	0,27±0,38	3
17*	45	5,7±2,14	0,31±0,07	3
17*	30	3,47±0,83	0,30±0,17	3
CicloPP	30	0,99±0,33	1,76±0,64	3
Sol. Salina		3,47±0,44	0,23±0,15	3
18*	20	3,48±0,79	0,17±0,06	3
18*	7,5	3,59±0,33	0,43±0,12	3
18*	3,75	3,61±1,14	0,17±0,12	3
CicloPP	30	1,39±0,41	2,09±0,17	3
Sol. salina		3,31±0,63	0,36±0,11	3

* Referencia

Ejemplo 21

En el Ejemplo 13 se muestra la inactivación de virus HIV acelular usando los procecimientos de la invención. Este ejemplo presenta la inactivación de HIV asociado a células usando también compuestos de la presente invención.

5 Se usaron células H9 infectadas crónicamente con HIV_{IIIb}. (H9/HTLV-III-B-NIH 1983, n° de catál. 400). Cultivos de estas células se mantuvieron en medio Eagle Modificado de Dulbecco suplementado con L-glutamina 2 mM, 200 u/ml de penicilina, 200 µg/ml de estreptomycin y 9% de suero fetal bovino (Intergen Company, Purchase, NY). Para el mantenimiento, el cultivo se dividió una vez a la semana a una densidad de 3 x 10⁵ a 4 x 10⁵ células/ml y
10 aproximadamente cuatro días después de dividirlo se añadió bicarbonato sódico al 3,3% según era necesario. Para el proceso de inactivación, las células se usaron tres días después de que fueran divididas. Se sedimentaron a partir del medio de cultivo a 400 g x 10 min, el material sobrenadante se descartó y se volvió a poner en suspensión las células en un concentrado de plaquetas humanas de 1-5 días (PC) (pH 7,5-7,6) a una concentración de 2 x 10⁶ células/ml. Se hicieron partes alícuotas de la suspensión de células infectadas con PC para controles oscuros libres de psoraleno, para
15 soluciones sólo con UVA sin psoraleno, para controles oscuros con psoraleno y para la muestra experimental de psoraleno más UVA. Se diluyeron con agua soluciones madre concentradas esterilizadas por filtración de cada psoraleno en las proporciones adecuadas para una concentración final de 150 µM. (Una Solución madre 10 mM del compuesto 18 se diluyó aproximadamente 67 veces y una solución madre 2 mM del compuesto 2 se diluyó aproximadamente 13 veces). Después de un período de equilibrado de aproximadamente 30 min a temperatura ambiente, 0,5 ml de cada uno de los controles oscuros se puso en un criovial y se almacenó en la oscuridad a -80°C. Para iluminación con UVA,
20 8 ml de la alícuota exenta de psoraleno y 8 ml de cada alícuota que contenía psoraleno se introdujeron en una bolsa de Teflon™ F120 modificada (modificada para que tuviera una superficie total de 92 cm², The West Co., Phoenixvill, PA) con una jeringa de plástico desechable de 10 ml conectada a uno de los puertos de polipropileno de la bolsa. Esto dio una longitud media del paso de 0,17 cm. Las bolsas se iluminaron luego a una exposición total de 3 Julios/cm² en el dispositivo descrito en el Ejemplo 1, unido a un ensamblaje de refrigeración con baño de agua circulante fijado a 4°C que mantenía la temperatura en la bolsa a aproximadamente 22-25°C. Durante la exposición, el dispositivo se sacudió sobre una mesa de sacudidas de plaquetas (Helmer Labs, Noblesville, IN). Después de la exposición, los contenidos de las bolsas se extrajeron con una jeringa fresca a través del otro puerto, no usado, de la bolsa y se pusieron en crioviales para almacenamiento a -80°C hasta su análisis.

30 Las muestras almacenadas se descongelaron a 37°C, luego se titularon en un ensayo de microplaca descrito por Hanson, C.V., Crawford-Miksza, L. y Sheppard, H.W., J. Clin. Micro 28:2030 (1990), descrito en el Ejemplo 13 anterior, con las modificaciones siguientes. La eliminación de coágulos de cada muestra se realizó antes de cultivo. A causa de que se deseaba el cultivo de un volumen diana de 4 ml después de eliminar el coágulo, se pasó un exceso de la muestra (6 ml) a un tubo de polipropileno y se diluyó a un volumen total de 60 ml con muestras de ensayo y control del proceso de inactivación que se diluyeron en 50% de medio de ensayo y 50% de plasma humano normal combinado. Las muestras se diluyeron serialmente en placas de 96 pocillos (Corning Glass Works, Corning, NY). Las placas se mezclaron en una mesa de sacudidas oscilante durante 30 segundos y se incubaron a 37°C en atmósfera con 5% de CO₂ durante 1-18 horas. A cada pocillo se añadieron células MT-2 (0,025 ml) [clon alfa-4, obtenible (n° de catálogo 237) de los National Institutes of Health AIDS Research and Reference Reagent Program, Rockville, Md.] para obtener una concentración de 80.000 células por pocillo. Después de 1 hora más de incubación a 37°C en atmósfera con 5% de CO₂, se añadieron a cada pocillo 0,075 ml de medio de ensayo que contenía 1,6% de agarosa SeaPlaque (FMC Bioproducts, Rockland, Maine) y precalentado a 38,5°C. Las placas se mantuvieron a 37°C durante unos pocos minutos hasta que se habían acumulado varias placas y luego se centrifugaron en soportes de placas a 600 x g a 37°C durante 20 minutos en una centrifugadora preenfriada a 10°C. En la centrifugadora se formaron monocapas antes de que gelificara la capa de agarosa. Las placas se incubaron a 37°C durante 5 días en atmósfera con 5% de CO₂ y se tiñeron añadiendo a cada pocillo 0,05 ml de yoduro de propidio (Sigma Chemical Co.) 50 µg/ml en solución salina tamponada con fosfato (pH 7,4). Después de 24-48 horas, se examinaron visualmente las microplacas teñidas en rojo por fluorescencia poniendo las placas en una caja de luz UV de 304 nm de 8.000 µW/cm² (Fotodyne, Inc., New Berlin, Wis.). El recuento de las placas se hizo a un aumento de 20x a 25x con un estereomicroscopio.

55 Los resultados fueron como sigue: El compuesto 2 (150 µM) inactivó >6,7 logs de HIV después de irradiación de 3 Julios/cm² (en comparación con controles oscuro y con luz de 0 log de inactivación, a partir de título logarítmico de 6,1 unidades/ml que forman placa). A la misma concentración e igual tiempo de irradiación, el compuesto 18 inactivó >7,2 logs de HIV (en comparación con un control oscuro de 0 logs y un control de luz de 0,1 logs, a partir del título 6,6). Este ejemplo confirma que los compuestos de la presente invención son eficaces para inactivar virus asociados a células.

60 Ejemplo 22

Este ejemplo implica una estimación de formulaciones de medios sintéticos mediante los siguientes ensayos de la función de plaquetas *in vitro*: (1) mantenimiento del pH; (2) agregación de plaquetas ("Agg") y (3) expresión de GMP-40. Los ensayos para cada uno de estas determinaciones han sido descritos antes.

65

ES 2 336 574 T3

TABLA 21*

	S2.19	S2.22	S3.0	S4.0
5	Gluconato sódico	23	0	0
	Acetato sódico	27	20	20
10	Glucosa	0	2	2
	Manitol	30	20	20
	KCl	5	4	4
15	NaCl	45	80	100
	Citrato Na ₃	15	15	10
	Fosfato sódico	20	20	20
20	MgCl ₂	0	3	2

* Cantidades en mM.

25 Se prepararon cuatro formulaciones: S 2.19, S 2.22, S 3.0 y S 4.0. La composición de estas formulaciones se recoge en la Tabla 21.

30 Una unidad de plasma humano rico en plaquetas (PRP) se obtuvo del banco de sangre de Sacramento. La unidad se centrifugó a temperatura ambiente durante 6 minutos a 4000 rpm y luego se pasó a una unidad de prensado. Usando una línea de transferencia conectada, se extrajo el plasma de la unidad dejando aproximadamente 9,4 ml de plasma residual.

35 Se dejó la unidad en reposo durante 1 hora y después se amasó suavemente para poner las plaquetas en suspensión. A 0,6 ml de la suspensión se añadieron 2,4 ml de plasma y el contenido total se pasó a una minibolsa de Teflon™. Se determinó el pH de la unidad reconstituida y se hicieron otros ensayos el día siguiente con los resultados siguientes:

40	pH	7,19
	GMP140	62%
45	Agg	58%

Agg = agregación

50 El resto de la unidad se usó luego para evaluar el medio sintético en cuanto al almacenamiento de plaquetas con y sin fotodescontaminación. A cada formulación se añadieron partes alícuotas (0,8 ml) de la unidad en tubos. 3 ml de cada mezcla se pasaron a una minibolsa de Teflon™ (concentración final de plasma 20%).

Cinco días después se evaluó la función de las plaquetas usando la batería de ensayos descrita antes. En la siguiente Tabla 22 se presentan los resultados para cada una de las formulaciones de medios sintéticos.

55 style="text-align: center;">TABLA 22

	Sin luz		Con luz	
	S2.19	S2.22	S2.19	S2.22
60	PH	6,86	6,82	6,83
	GMP140	87%	74%	90%
65	Agg	30	48	16
				31

ES 2 336 574 T3

Como se ve, el medio sintético que contenía glucosa 2 mM (esto es, S2.22) mantenía la función de las plaquetas, medida por GMP140 y la agregación, mejor que el medio sintético que no contenía glucosa (esto es, S2.19).

5 Para confirmar este hallazgo, se repitieron los experimentos (siendo “n” el número de experimentos repetidos) con estas formulaciones así como con formulaciones adicionales exentas de glucosa (3.0 y 4.0). La función de las plaquetas se evaluó antes y después de almacenamiento y junto con descontaminación. En las siguientes Tablas 4, 5 y 6 se presenta un resumen de los resultados.

10

TABLA 23*

15

	Plasma	S2.22	S3.0	S4.0	S2.19
	n = 17	n = 22	n = 4	n = 4	n = 23
pH	7,31	7,14	7,12	7,13	7,04
Agg	82	83	76	78	81
GMP-140	52	49	46	45	68

20

* Sin UVA: Día 1 de almacenamiento

25

TABLA 24*

30

	Plasma	S2.22	S3.0	S4.0	S2.19
	n = 18	n = 20	n = 4	n = 4	n = 23
pH	7,03	6,92	6,93	6,93	6,96
Agg	75	70	67	70	64
GMP-140	61	63	63	64	74

35

40

* Sin UVA: Día 5 de almacenamiento

45

TABLA 25*

50

	S2.22	S3.0	S4.0	S2.19
	n = 20	n = 4	n = 4	n = 22
pH	6,80	6,78	6,79	6,95
Agg	59	54	54	58
GMP-140	73	76	76	83

55

60

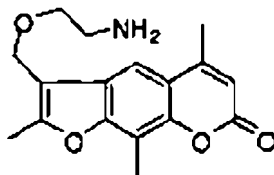
* 3 Julios de UVA. Día 5 de almacenamiento.

65

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para sintetizar 4'-(ω -amino-2-oxa)alquil-4,5',8-trimetilpsoraleno, que comprende las etapas de:
- proporcionar 4'-(ω -hidroxi-2-oxa)alquil-4,5',8-trimetilpsoraleno;
 - tratar 4'-(ω -hidroxi-2-oxa)alquil-4,5',8-trimetilpsoraleno con una base y cloruro de metanosulfonilo de forma que se produzca 4'-(ω -metanosulfoniloxi-2-oxa)alquil-4,5',8-trimetilpsoraleno;
 - tratar 4'-(ω -metanosulfoniloxi-2-oxa)alquil-4,5',8-trimetilpsoraleno con azida sódica, de forma que se produzca 4'-(ω -azido-2-oxa)alquil-4,5',8-trimetilpsoraleno; y
 - reducir 4'-(ω -azido-2-oxa)alquil-4,5',8-trimetilpsoraleno de forma que se produzca 4'-(ω -amino-2-oxa)alquil-4,5',8-trimetilpsoraleno.
2. El procedimiento de síntesis que se describe en la reivindicación 1, en el que dicho 4'-(ω -amino-2-oxa)alquil-4,5',8-trimetilpsoraleno es 4'-(4-amino-2-oxa)butil-4,5',8-trimetilpsoraleno.
3. El procedimiento de síntesis que se describe en la reivindicación 2, en el que, en la etapa (d) 4'-(4-azido-2-oxa)butil-4,5',8-trimetilpsoraleno se reduce con trifenilfosfina.
4. Un compuesto de psoraleno que puede obtenerse mediante el procedimiento de síntesis que se describe en la reivindicación 1, que comprende 4'-(4-amino-2-oxa)butil-4,5',8-trimetilpsoraleno.
5. Un procedimiento de sintetizar un compuesto de psoraleno que tiene un sustituyente R_1 en el átomo de carbono 4', que se selecciona a partir del grupo que comprende $-(CH_2)_x-O-(CH_2)_z-NH_2$, donde $x = z$ y x es un número entero de 2 a 5, y los sustituyentes R_5 , R_6 y R_7 de los átomos de carbono 4', 5' y 8 respectivamente, se seleccionan independientemente a partir del grupo que comprende H y $(CH_2)_vCH_3$ donde v es un número entero de 0 a 5, que comprende las etapas de:
- proporcionar un 4'-halometil-4,5',8-trimetilpsoraleno que se selecciona a partir del grupo que comprende 4'-clorometil-4,5',8-trimetilpsoraleno, 4'-bromometil-4,5',8-trimetilpsoraleno y 4'-yodometil-4,5',8-trimetilpsoraleno;
 - tratar dicho 4'-halometil-4,5',8-trimetilpsoraleno con $HO(CH_2)_xO(CH_2)_zOH$ de forma que se produzca 4'-(ω -hidroxi-2,n-dioxa)alquil-4,5',8-trimetilpsoraleno, en el que $n = x+z$;
 - tratar dicho 4'-(ω -hidroxi-2,n-dioxa)alquil-4,5',8-trimetilpsoraleno con una base y cloruro de metanosulfonilo de forma que se produzca 4'-(ω -metanosulfoniloxi-2,n-dioxa)alquil-4,5',8-trimetilpsoraleno;
 - tratar el 4'-(ω -metanosulfoniloxi-2,n-dioxa)alquil-4,5',8-trimetilpsoraleno con azida sódica, de forma que se produzca 4'-(ω -azido-2,n-dioxa)alquil-4,5',8-trimetilpsoraleno y
 - reducir 4'-(ω -azido-2,n-dioxa)alquil-4,5',8-trimetilpsoraleno de forma que se produzca 4'-(ω -amino-2,n-dioxa)alquil-4,5',8-trimetilpsoraleno.
6. Un procedimiento de sintetizar 4'-(12-amino-8-aza-2,5-dioxa)dodecil-4,5',8-trimetilpsoraleno, que comprende las etapas de:
- proporcionar un 4'-halometil-4,5',8-trimetilpsoraleno que se selecciona a partir del grupo que comprende 4'-clorometil-4,5',8-trimetilpsoraleno, 4'-bromometil-4,5',8-trimetilpsoraleno y 4'-yodometil-4,5',8-trimetilpsoraleno;
 - tratar dicho 4'-halometil-4,5',8-trimetilpsoraleno con dietilenglicol, de manera que se produzca 4'-(7-hidroxi-2,5-dioxa)heptil-4,5',8-trimetilpsoraleno;
 - tratar el 4'-(7-hidroxi-2,5-dioxa)heptil-4,5',8-trimetilpsoraleno con una base y cloruro de metanosulfonilo, de manera que se produzca 4'-(7-metanosulfoniloxi-2,5-dioxa)heptil-4,5',8-trimetilpsoraleno;
 - tratar 4'-(7-metanosulfoniloxi-2,5-dioxa)heptil-4,5',8-trimetilpsoraleno con 1,4-diaminobutano de manera que se produzca 4'-(12-amino-8-aza-2,5-dioxa)dodecil-4,5',8-trimetilpsoraleno.
7. Un procedimiento de sintetizar 4'-(14-amino-2,6,11-triaza)tetradecil-4,5',8-trimetilpsoraleno, que comprende:
- proporcionar 4,5',8-trimetilpsoralen-4'-carboxaldehído;
 - tratar 4,5',8-trimetilpsoralen-4'-carboxaldehído con espermina y un agente reductor para producir 4'-(14-amino-2,6,11-triaza)tetradecano-4,5',8-trimetilpsoraleno.

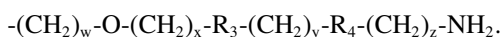
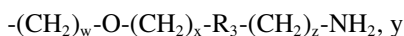
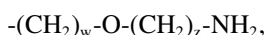
8. Un compuesto de fórmula:



o una sal del mismo.

9. Un compuesto de psoraleno, que comprende:

a) un sustituyente R_1 en el átomo de carbono 4', que se selecciona a partir del grupo que comprende:



en las que R_3 y R_4 se seleccionan independientemente a partir del grupo que comprende O y NH, w es un número entero de 1 a 5, x es un número entero de 2 a 5, y es un número entero de 2 a 5, y z es un número entero de 2 a 6; y b) los sustituyentes R_5 , R_6 y R_7 en los átomos de carbono 4, 5' y 8 respectivamente, se seleccionan independientemente a partir del grupo que comprende H y $(CH_2)_vCH_3$, en el que v es un número entero de 0 a 5; o una sal del mismo.

10. Un compuesto de la reivindicación 9, en el que R_3 y R_4 son O.

11. Un compuesto de la reivindicación 9, en el que dicho sustituyente R_1 es $-CH_2-O-(CH_2)_2-NH_2$, y en el que dichos sustituyentes R_5 , R_6 y R_7 son todos CH_3 .

12. Un compuesto de la reivindicación 9, en el que dicho sustituyente R_1 es $-CH_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-NH_2$ y en el que dichos sustituyentes R_5 , R_6 y R_7 son todos CH_3 .

13. Un compuesto de la reivindicación 9, en el que dicho sustituyente R_1 es $-CH_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-NH-(CH_2)_4-NH_2$ y en el que dichos sustituyentes R_5 , R_6 y R_7 son todos CH_3 .

14. Un medio sintético para el almacenamiento de plaquetas, que comprende una solución acuosa de aproximadamente:

cloruro sódico 45-100 mM;

citrato sódico 8-15 mM;

acetato sódico 20-35 mM;

fosfato sódico monobásico 5-7 mM; y

fosfato sódico dibásico 14-22 mM;

y que además comprende 4'-(4-amino-2-oxa)butil-4,5',8-trimetilpsoraleno a una concentración de entre 0,1 y 250 mM.

15. El medio sintético para el almacenamiento de plaquetas de la reivindicación 14, que comprende aproximadamente:

cloruro sódico 84 mM;

citrato sódico 10 mM;

acetato sódico 30 mM;

fosfato sódico monobásico 6,2 mM; y

fosfato sódico dibásico 19,8 mM.

ES 2 336 574 T3

16. El medio sintético para el almacenamiento de plaquetas de la reivindicación 14, que comprende aproximadamente:

- 5 cloruro sódico 77 mM;
- citrato sódico 11 mM;
- acetato sódico 32 mM;
- 10 fosfato sódico monobásico 6,7 mM; y
- fosfato sódico dibásico 19,8 mM.

17. El medio de la reivindicación 14, que además comprende aproximadamente:

- 15 cloruro potásico 4-5 mM;
- glucosa 0-2 mM;
- mannitol 0-30 mM;
- 20 cloruro magnésico 2-3 mM.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

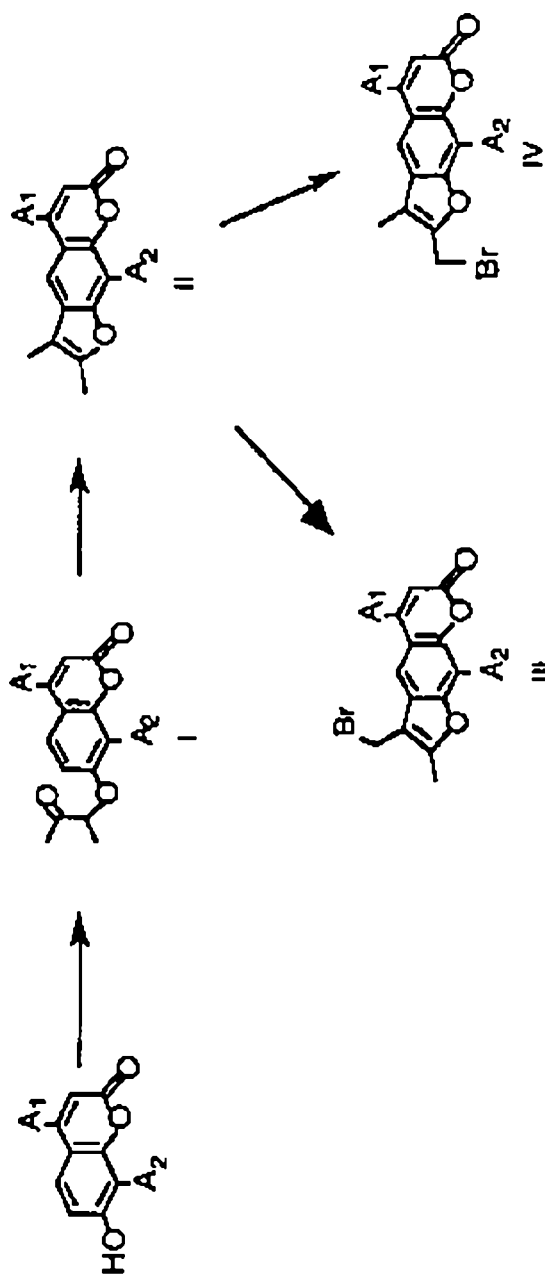


FIG. 1

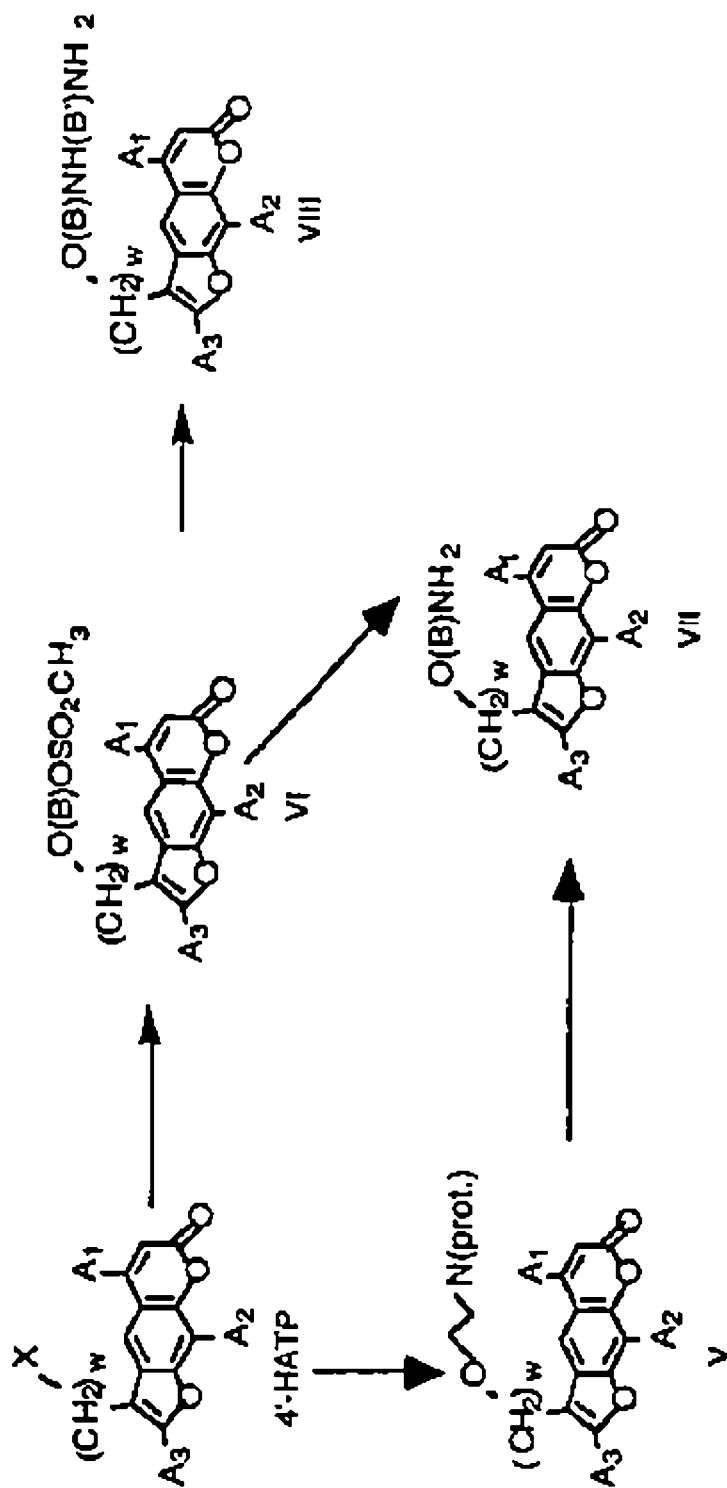


FIG. 2

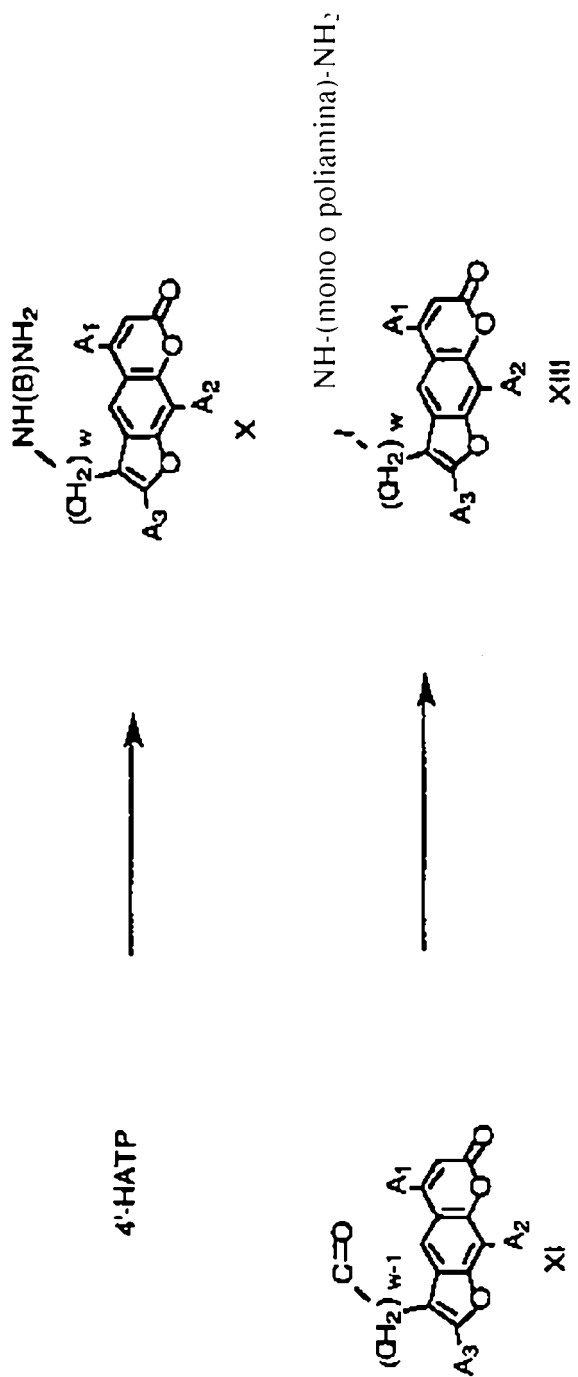
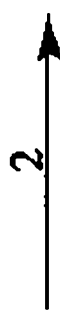
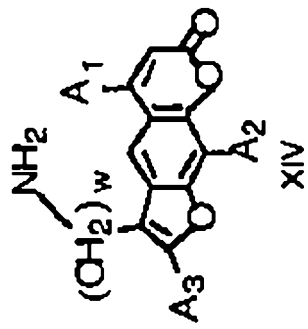


FIG. 3



4'-HATP

FIG. 4

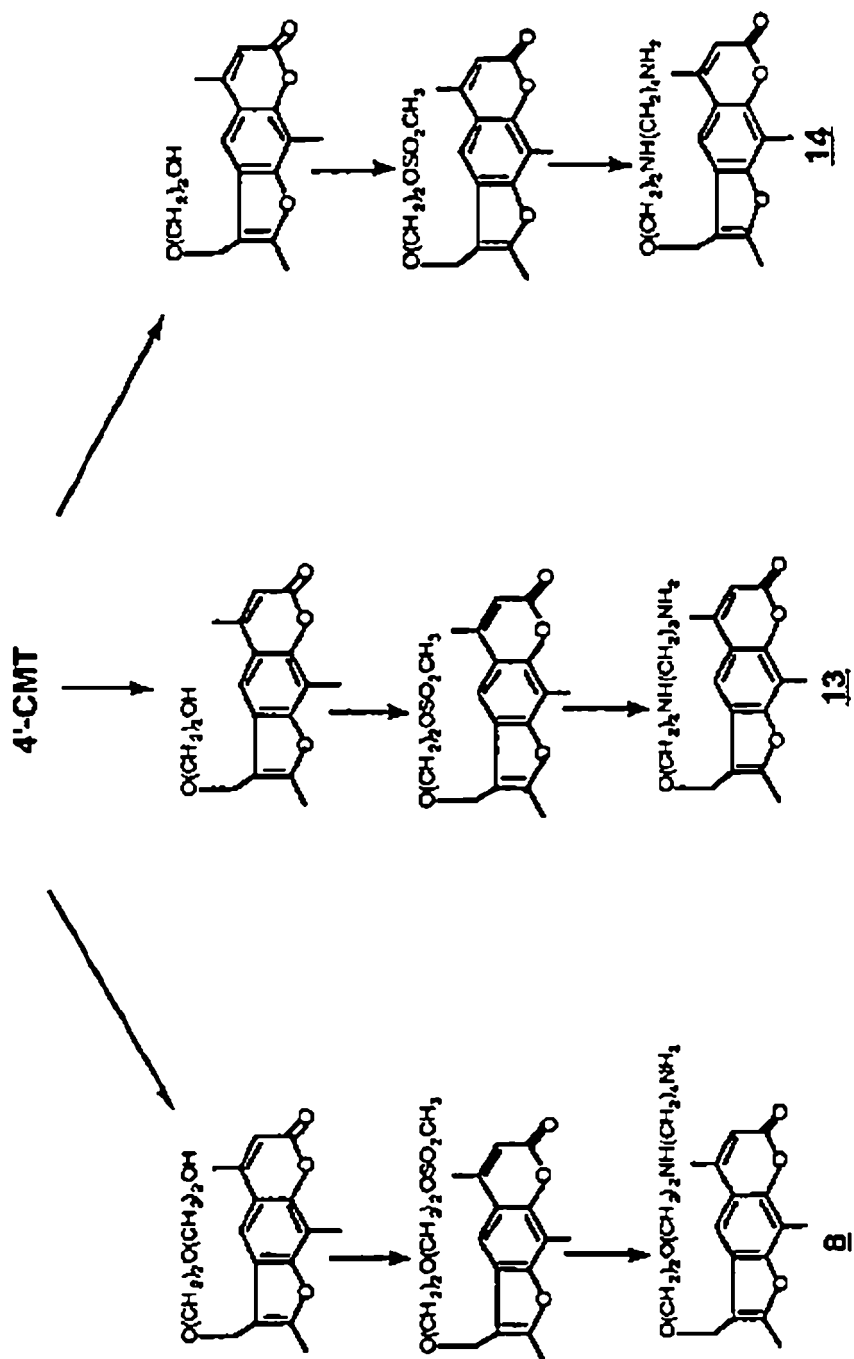


FIG. 10A

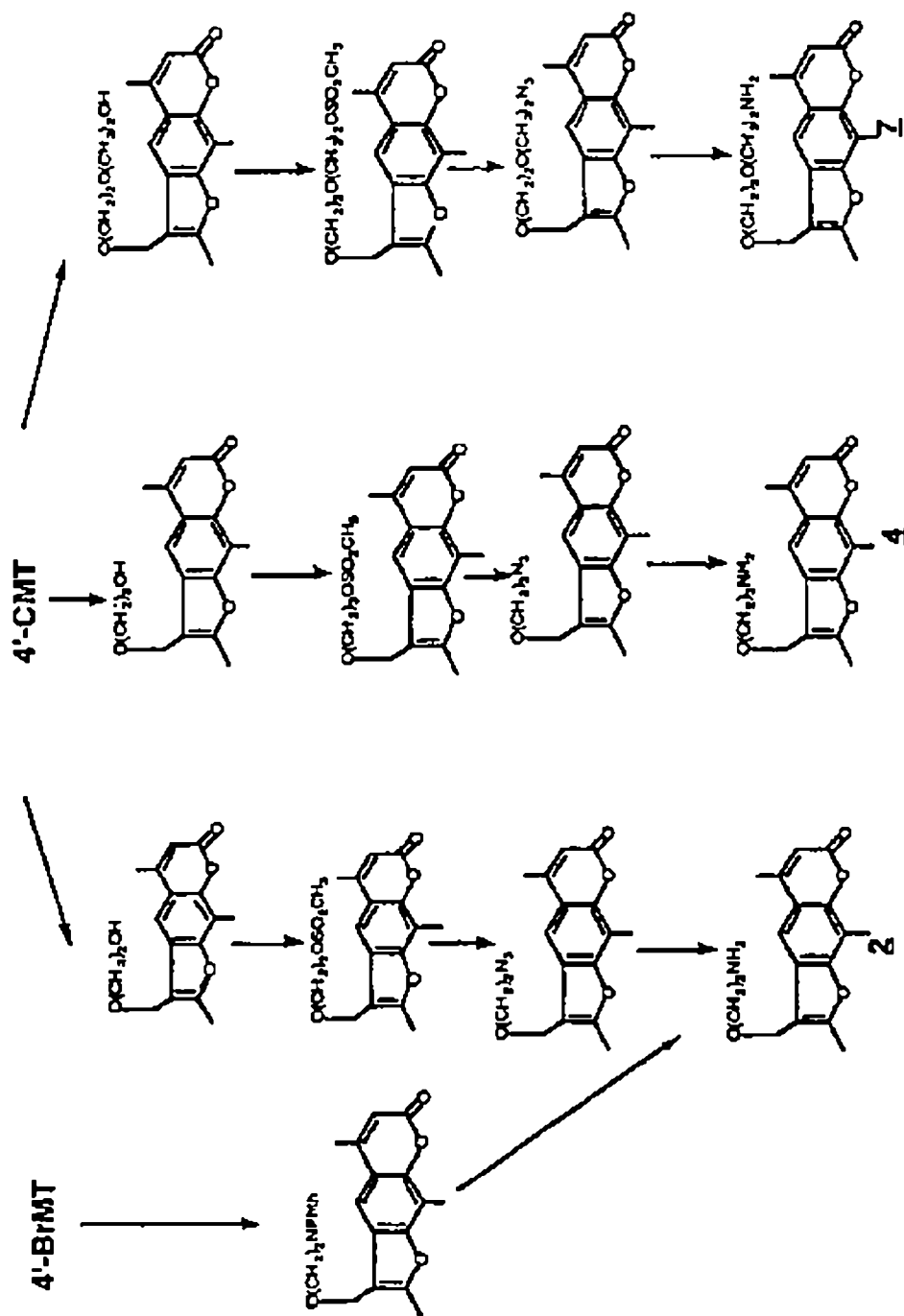


FIG. 10B

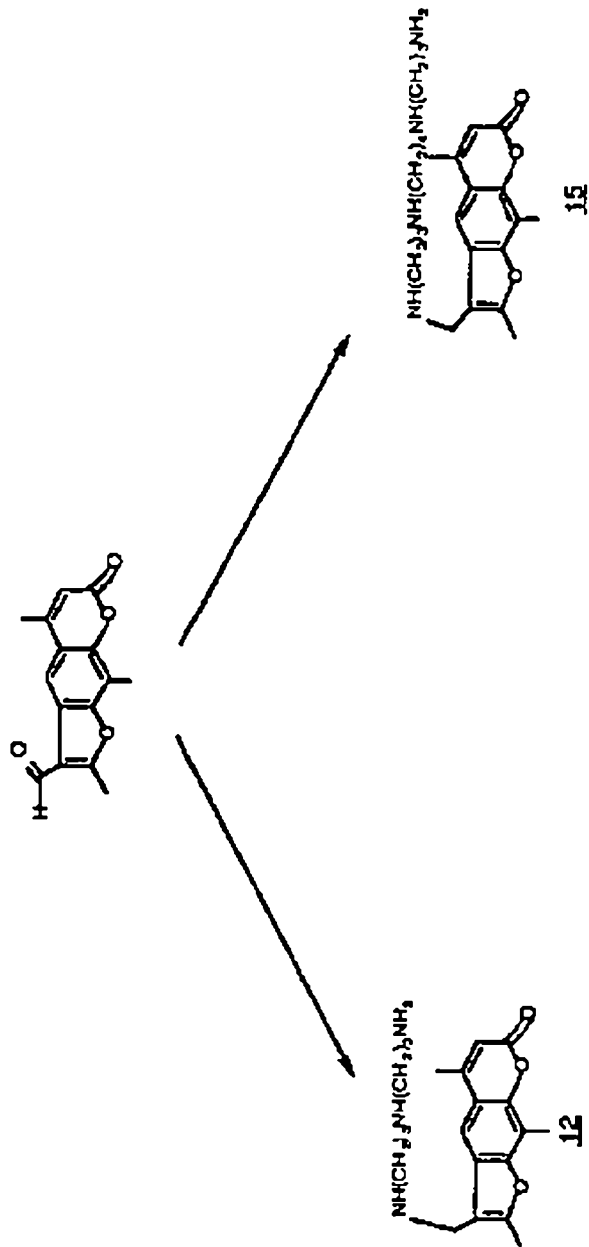


FIG. 10D

4'-CMT

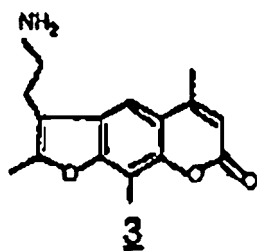
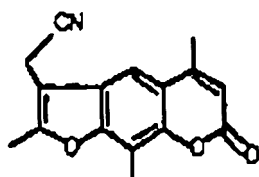


FIG. 10E

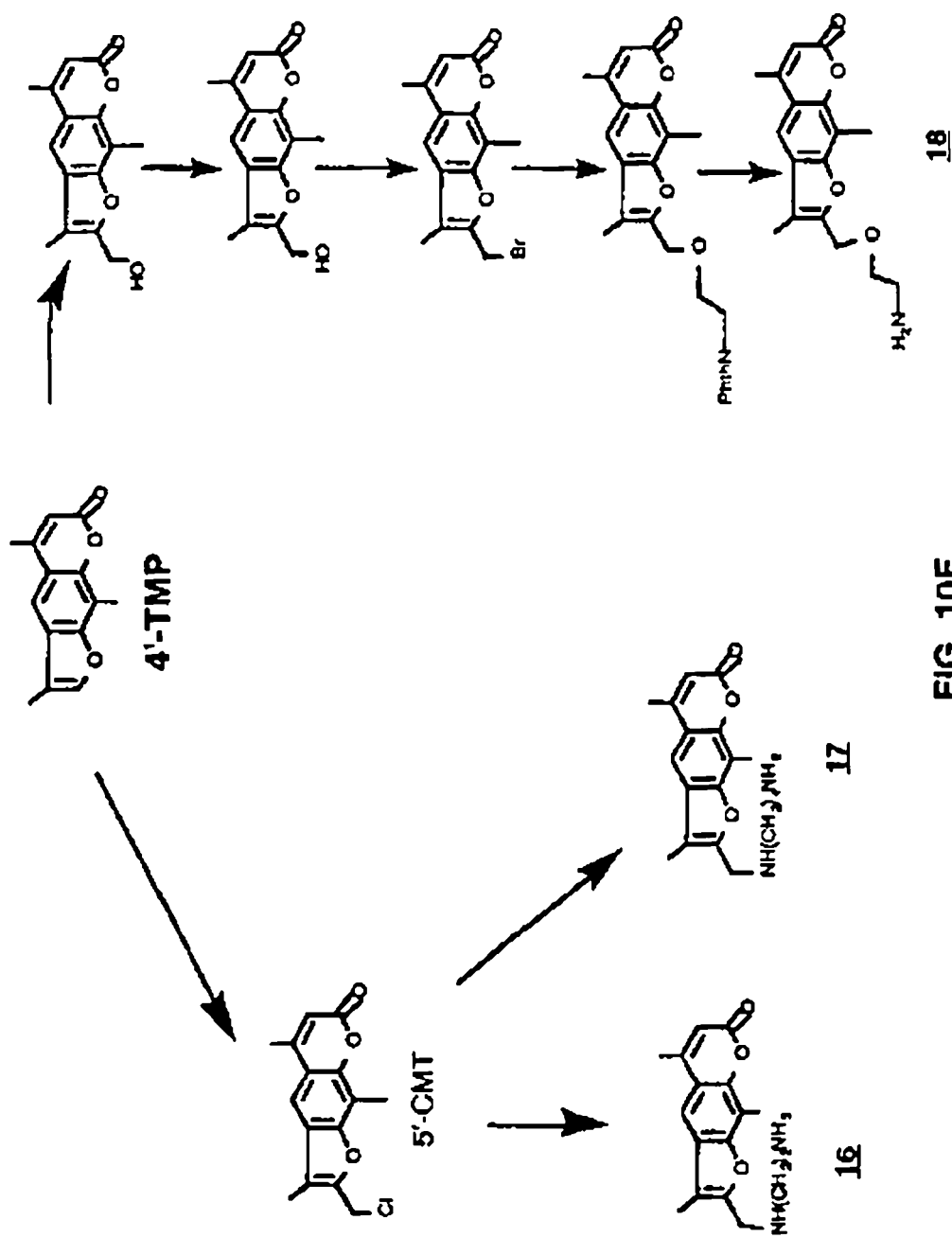


FIG. 10F

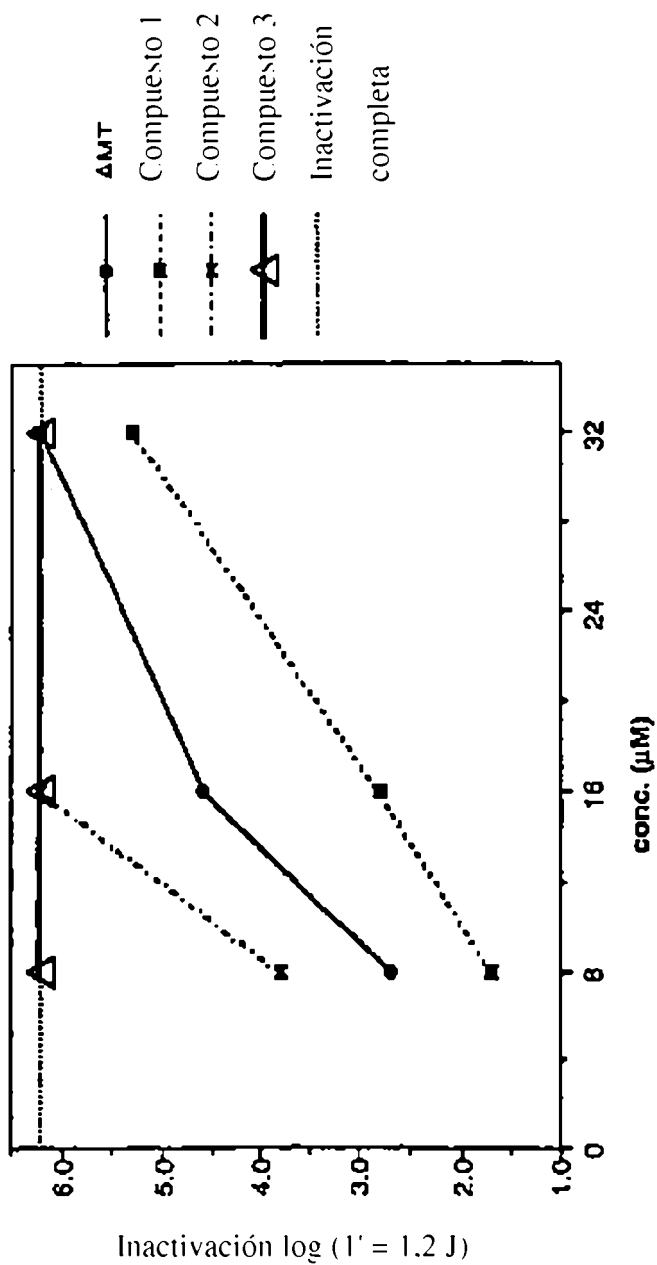


FIG. 11

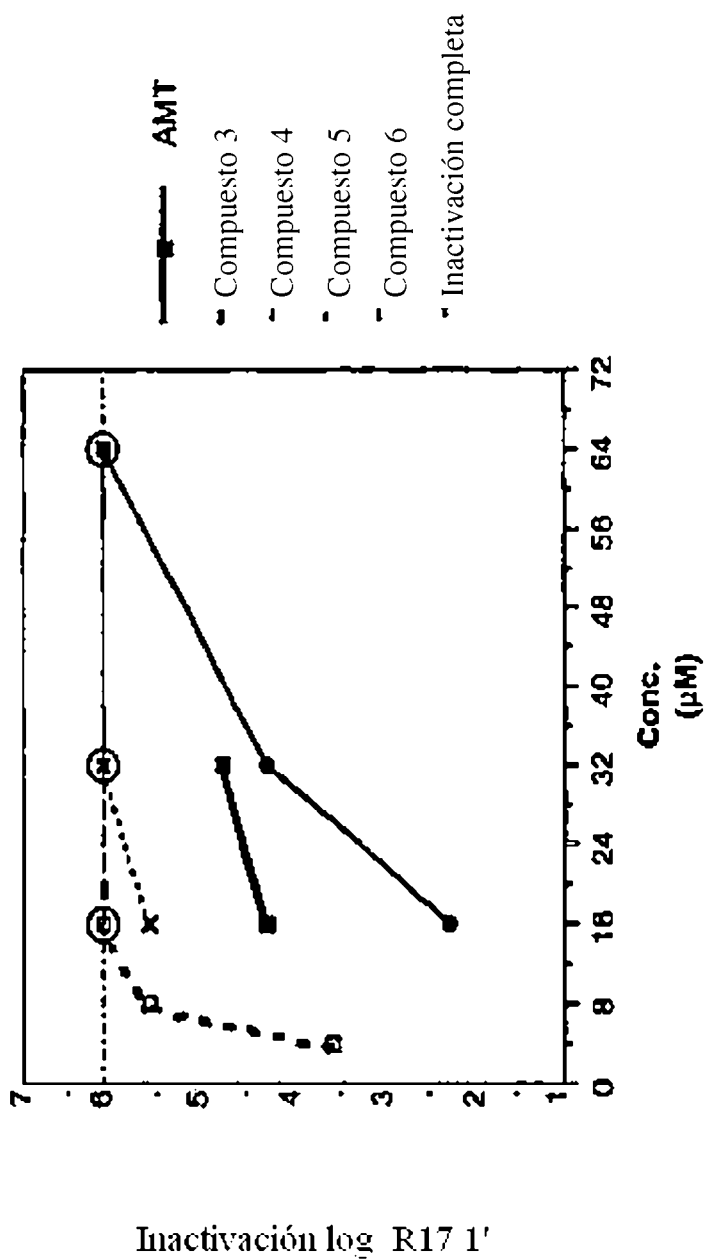


FIG. 12

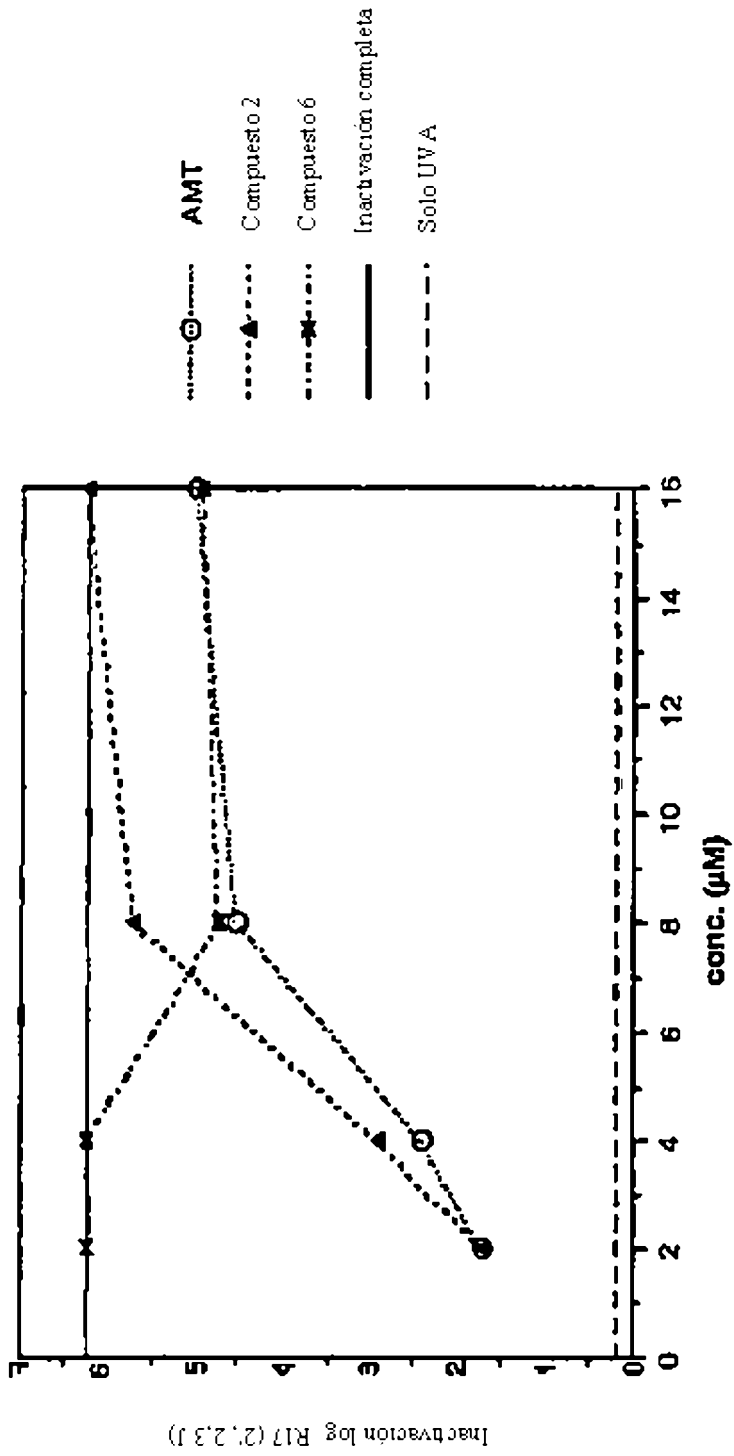


FIG. 13

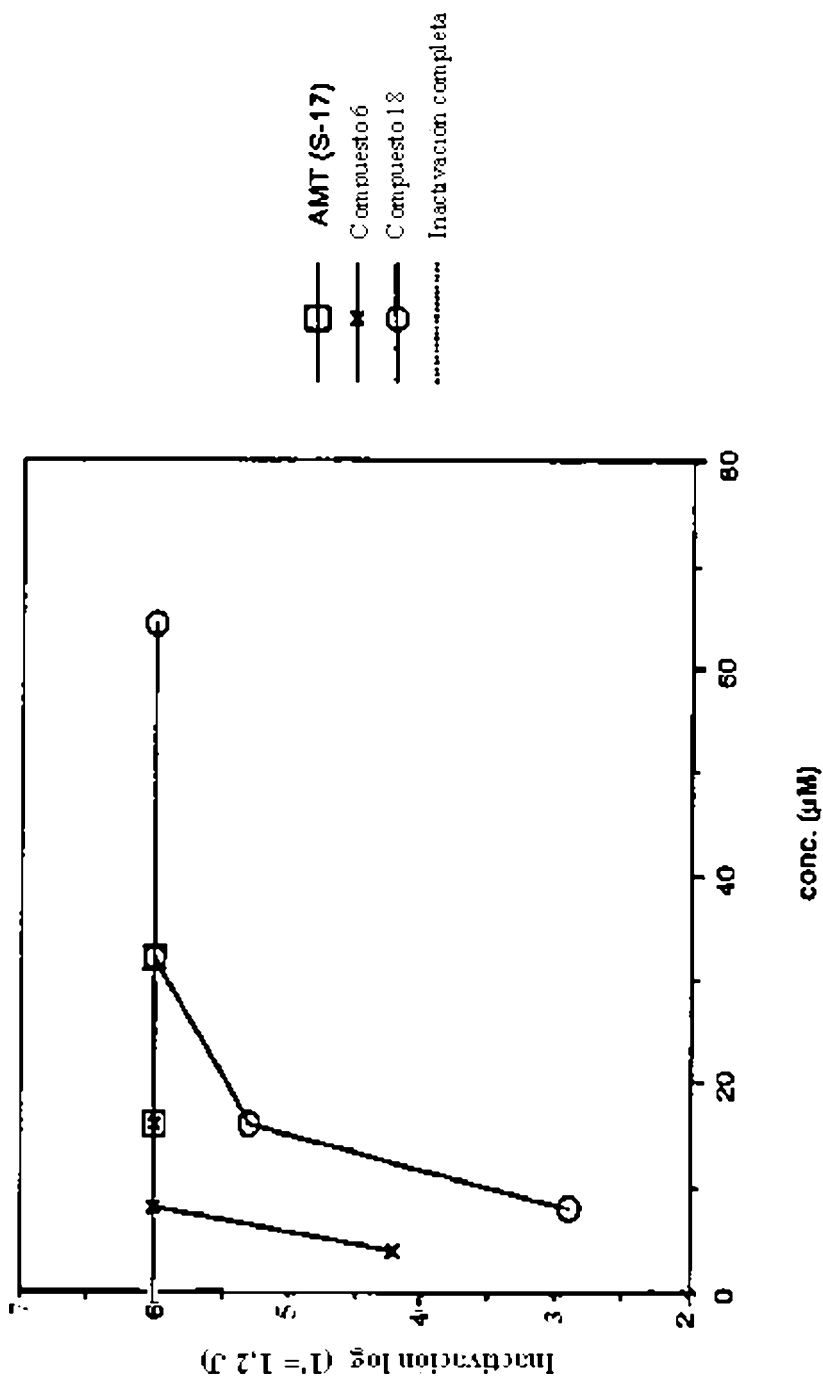


FIG. 14

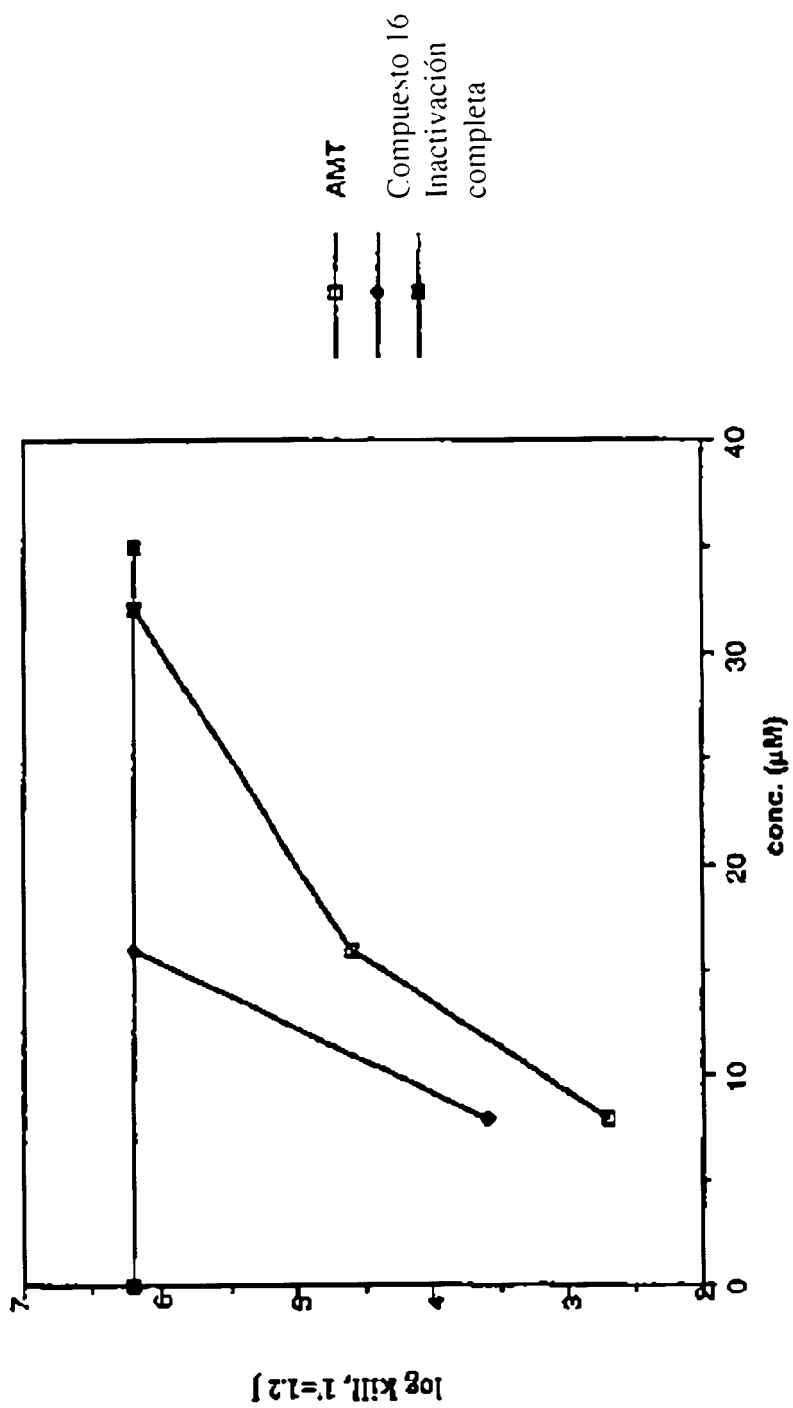


FIG. 15

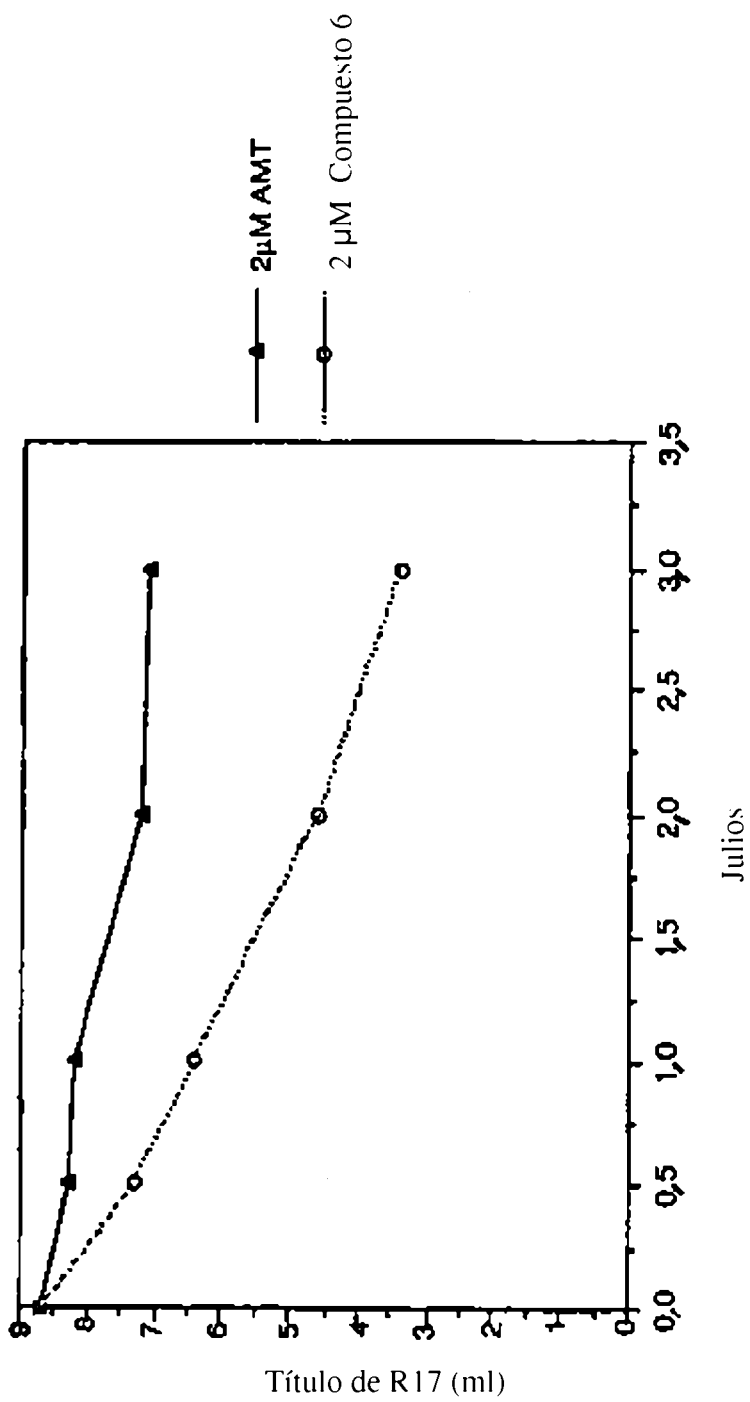


FIG. 16

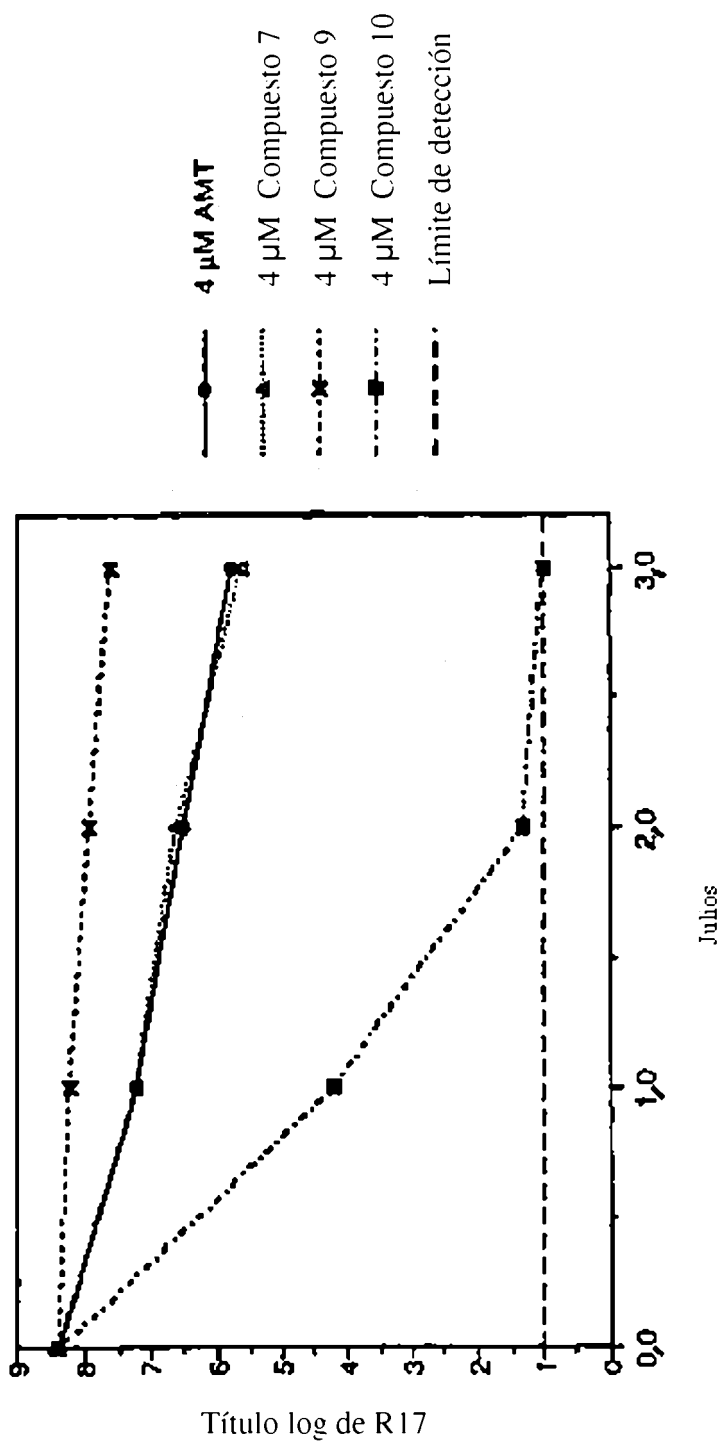


FIG. 17

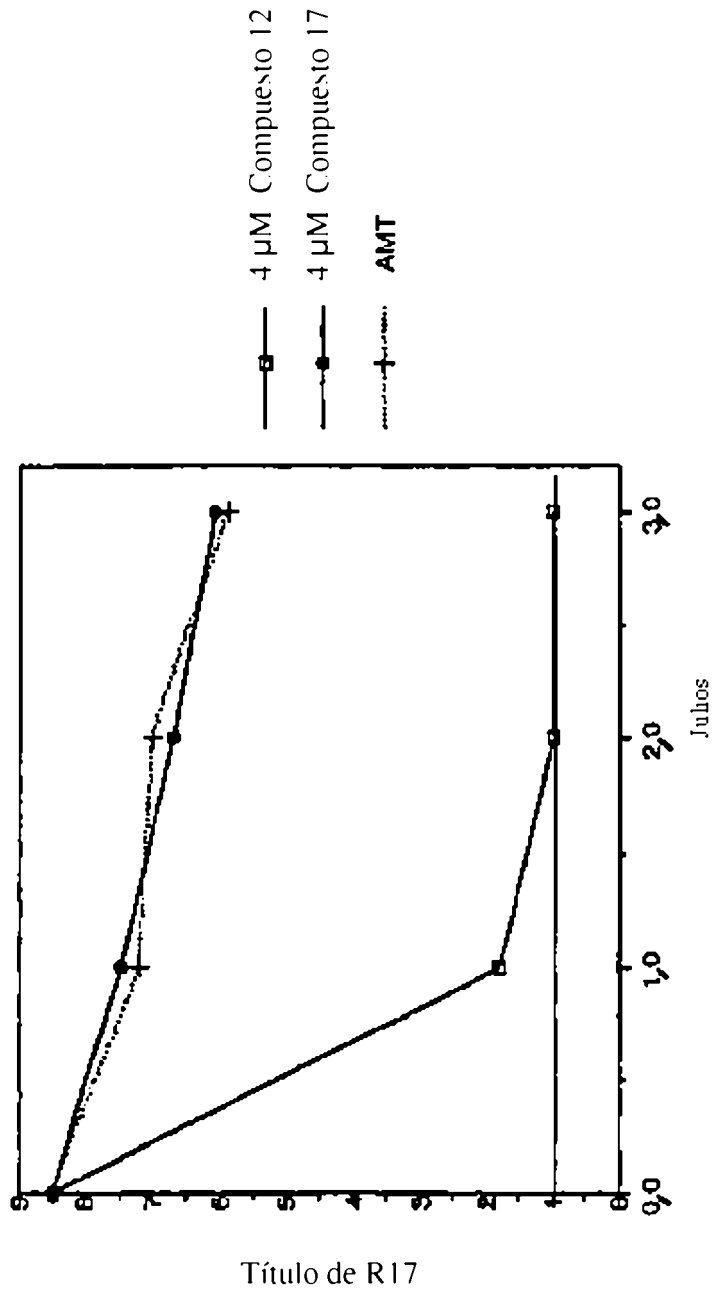


FIG. 18

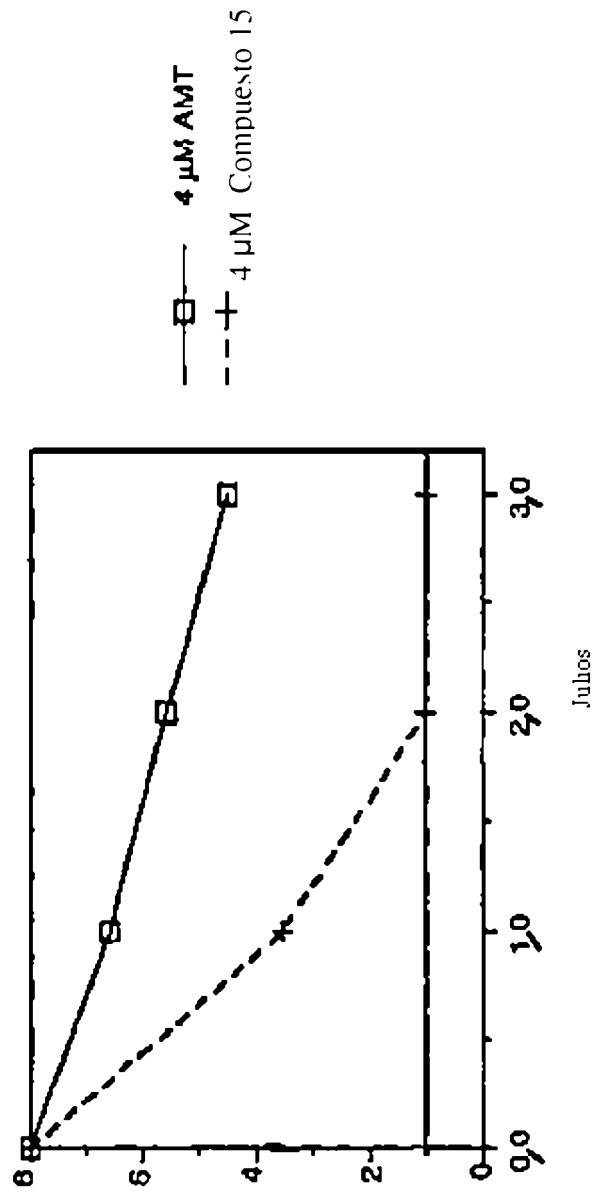


FIG. 19

Título de R17 (logs restantes)

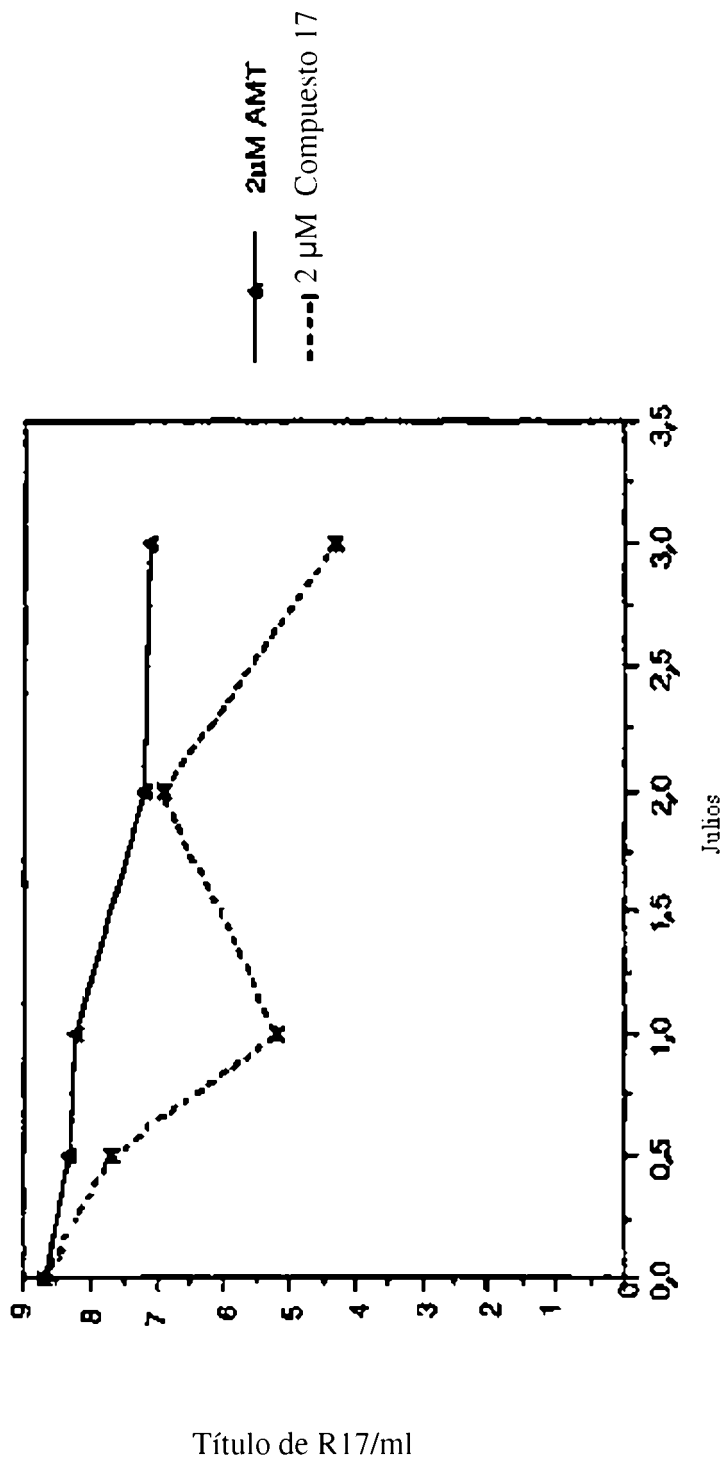


FIG. 20

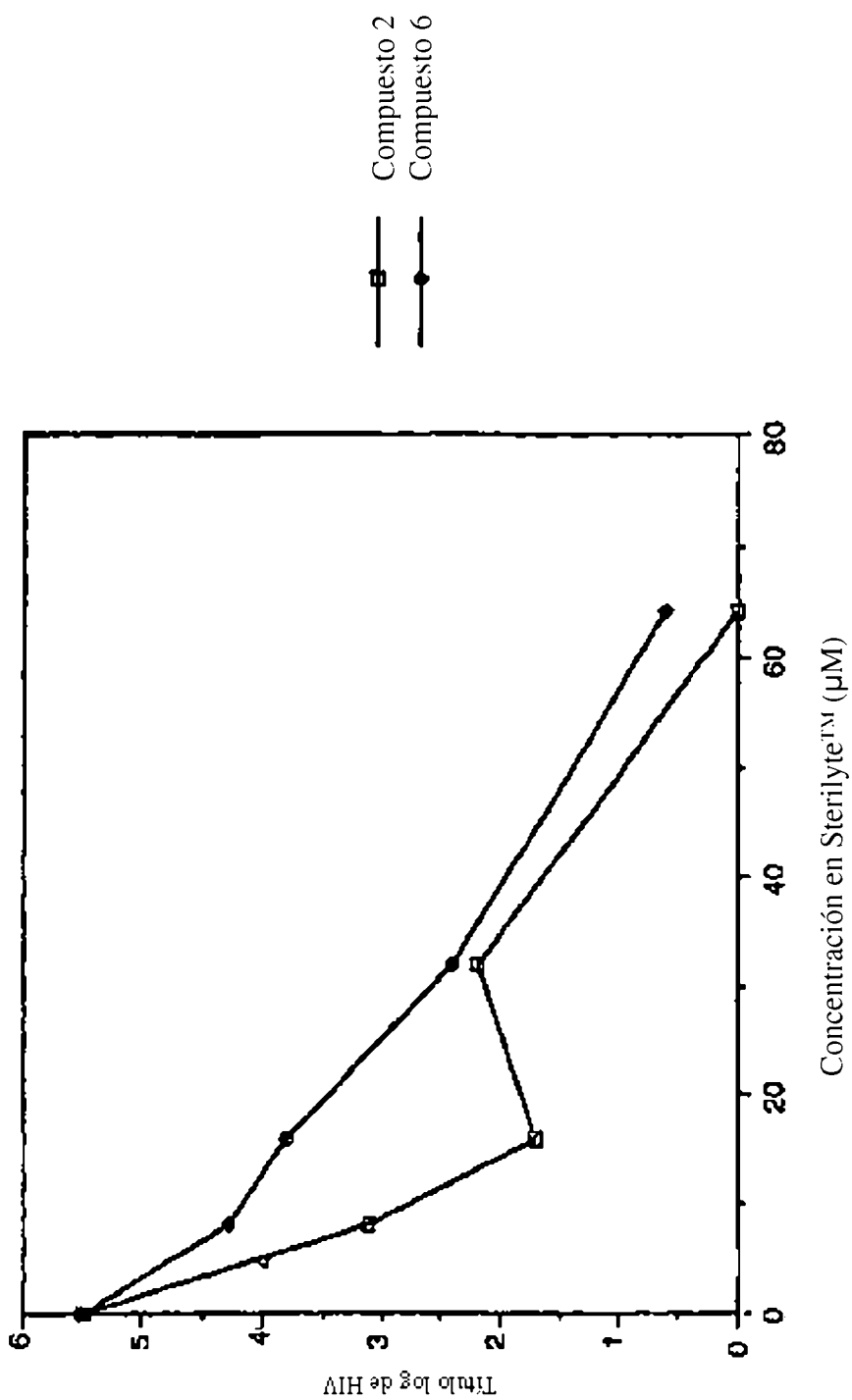


FIG. 24

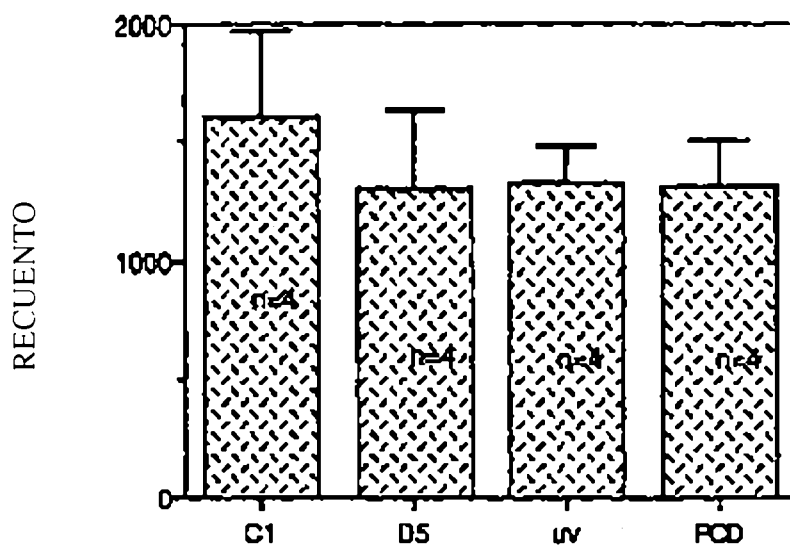


FIGURA 26A

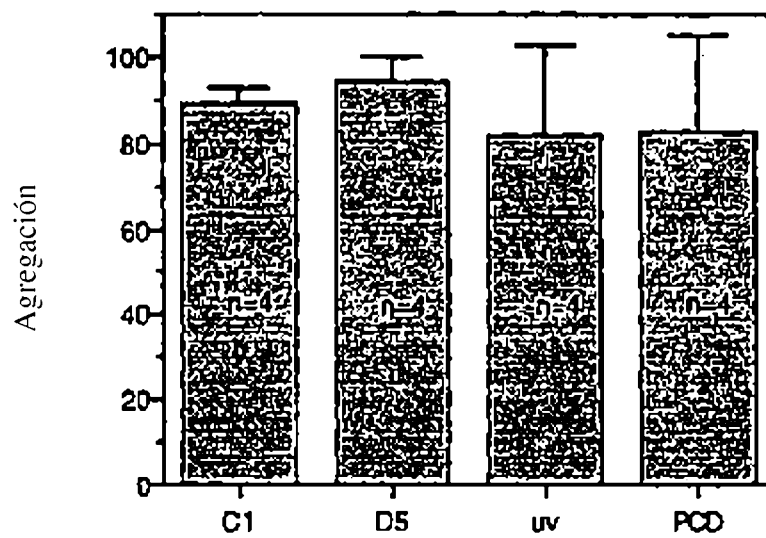


FIGURA 26B

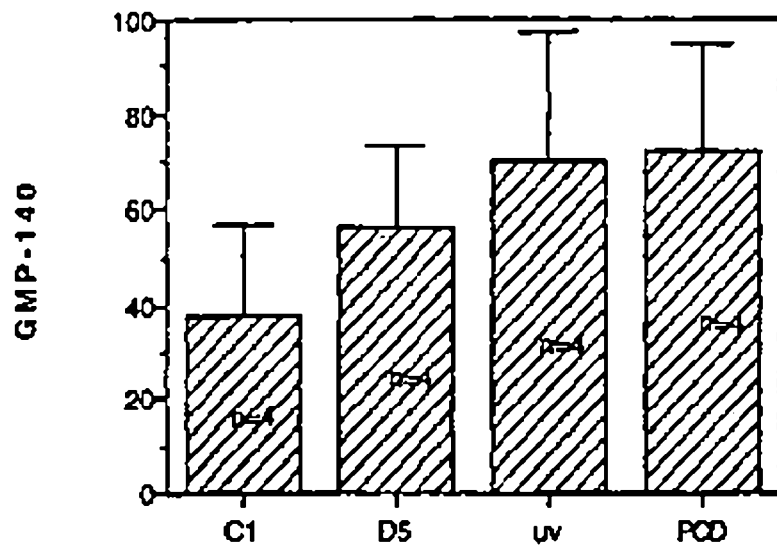


FIGURA 26C

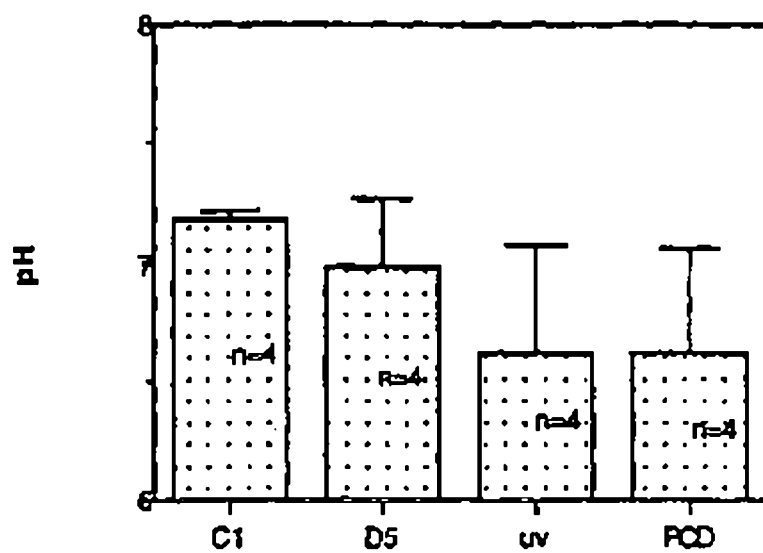


FIGURA 26D

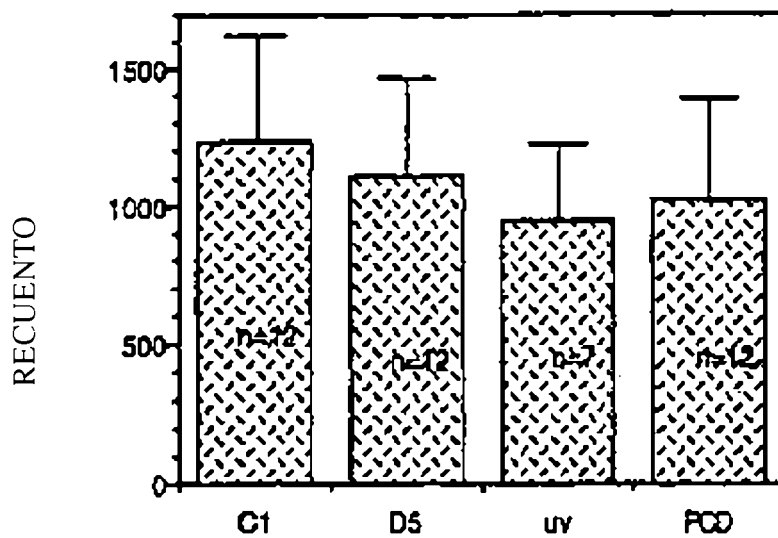


FIGURA 27A

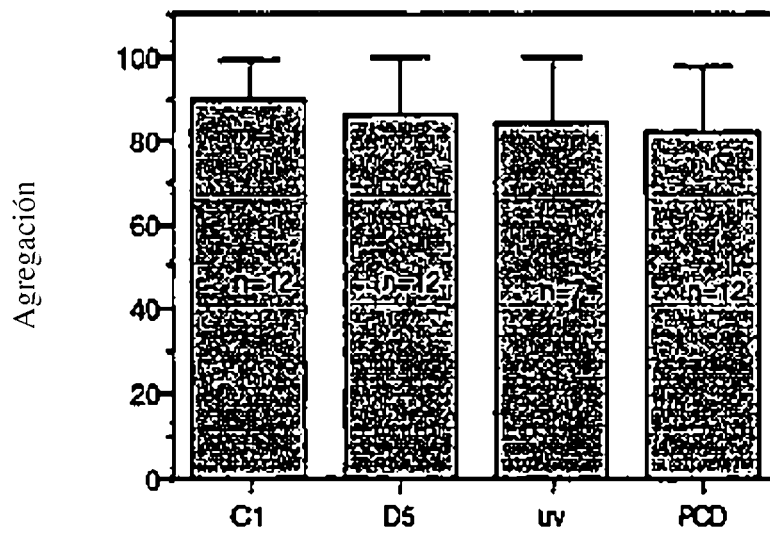


FIGURA 27B

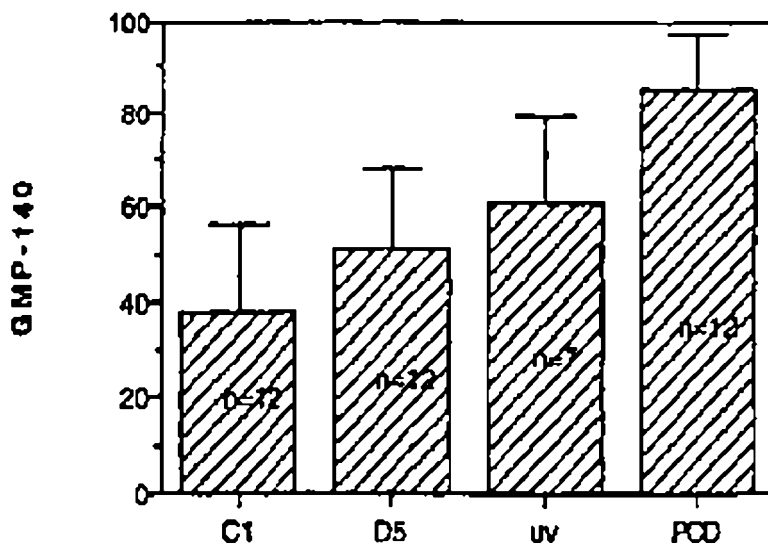


FIGURA 27C

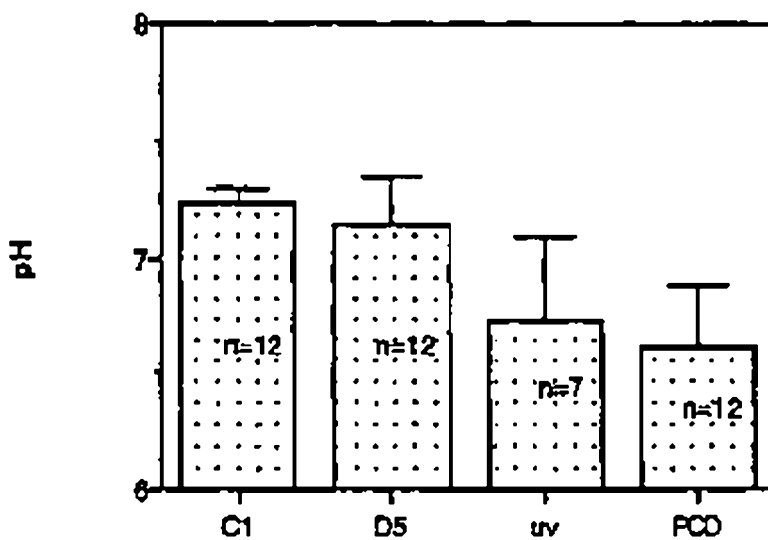


FIGURA 27D

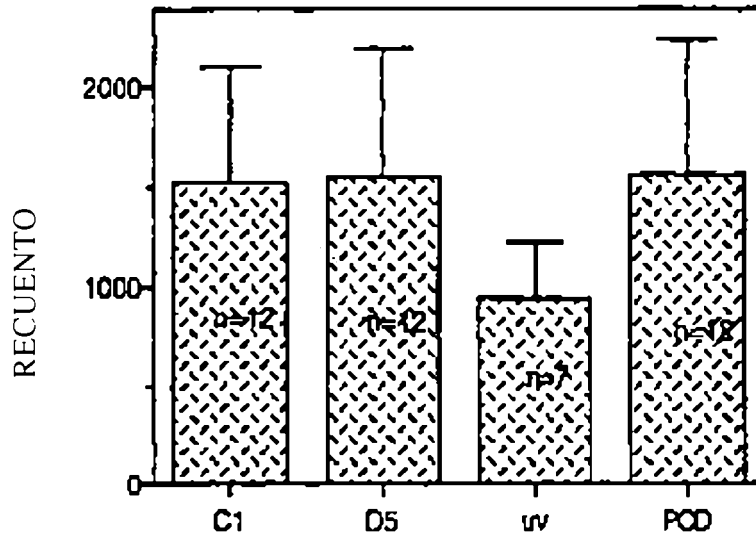


FIGURA 28A

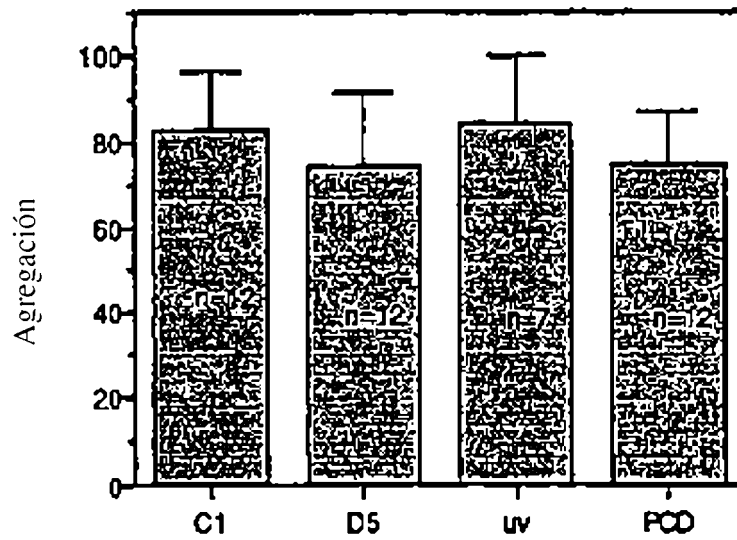


FIGURA 28B

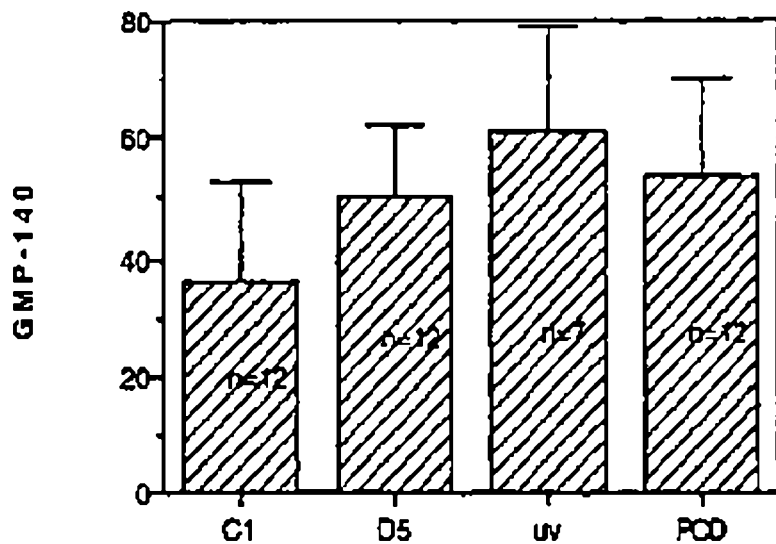


FIGURA 28C

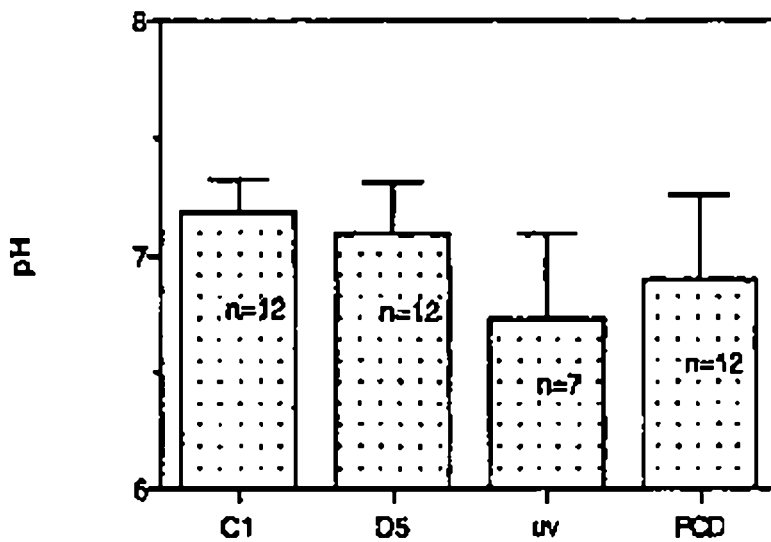


FIGURA 28D

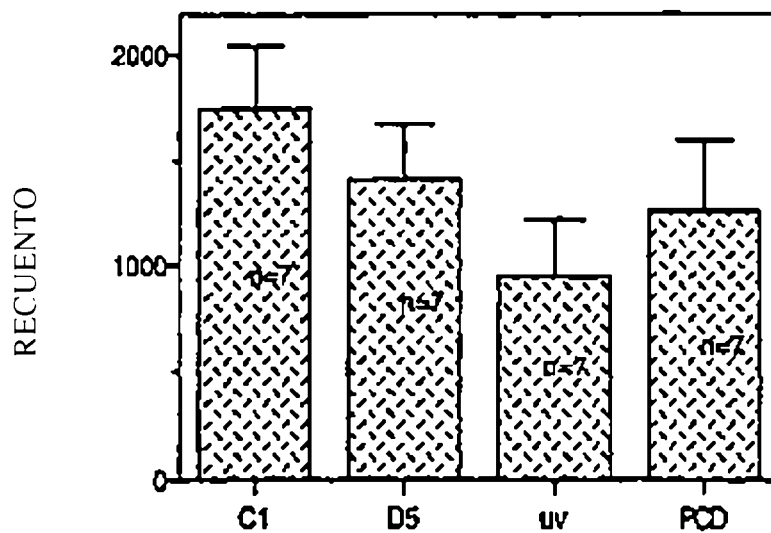


FIGURA 29A

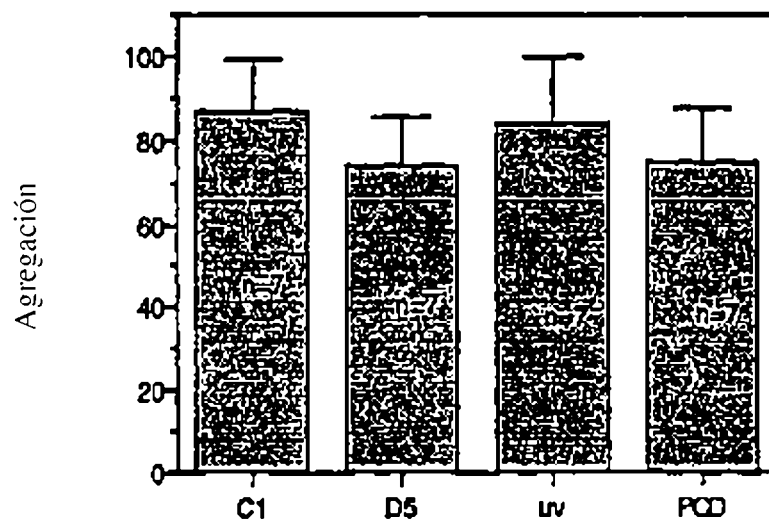


FIGURA 29B

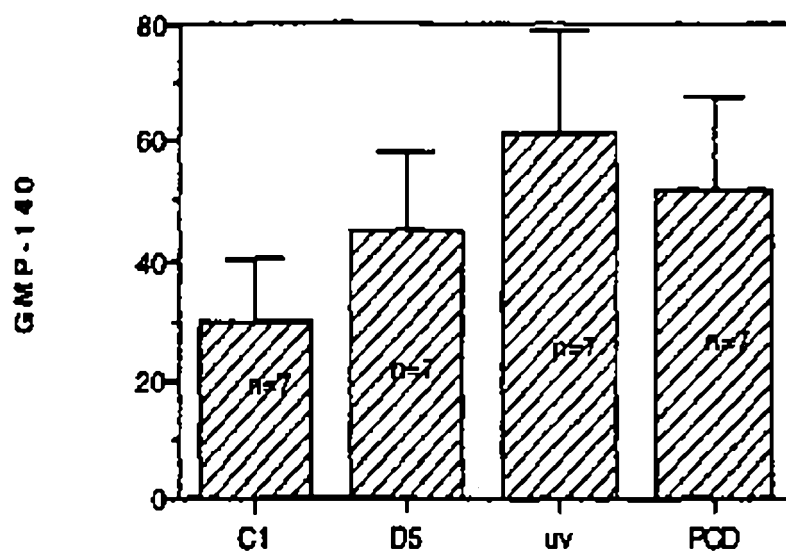


FIGURA 29C

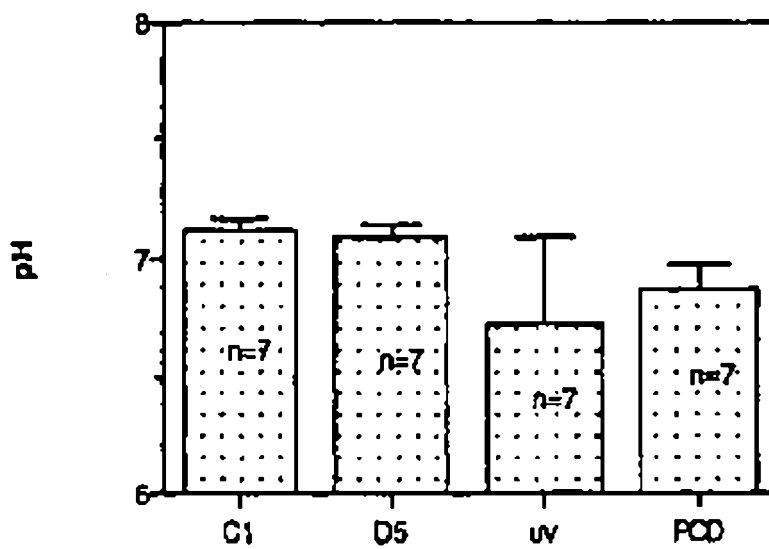


FIGURA 29D