



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 249 986**

② Número de solicitud: 200401611

⑤ Int. Cl.:

C07D 498/12 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

G01N 33/533 (2006.01)

C09K 11/06 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **02.07.2004**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.04.2006**

Fecha de la concesión: **20.11.2006**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **01.02.2007**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:
01.02.2007

⑰ Titular/es: **Universidad Complutense de Madrid
Rectorado - Avenida de Séneca, nº 2
28040 Madrid, ES**

⑱ Inventor/es: **Cañadas Benito, Olga;
Casals Carro, Cristina;
Asunción Becerro, María Jesús de la;
Orellana Moraleda, Guillermo y
Sáenz Martínez, Alejandra**

⑲ Agente: **No consta**

⑳ Título: **Síntesis de derivados fluorescentes de tacrolimus (FK506) y su uso en la caracterización de la interacción de FK506 con proteínas de unión a FK506.**

㉑ Resumen:

Síntesis de derivados fluorescentes de tacrolimus (FK506) y su uso en la caracterización de la interacción de FK506 con proteínas de unión a FK506.

Se describe la síntesis, purificación y caracterización de derivados fluorescentes de tacrolimus (FK506) que tienen aplicación, entre otras, al estudio de proteínas de unión de FK506 presentes, entre otros medios, en fluidos extracelulares para determinar su contribución favorable o desfavorable en el transporte, unión e internación celular de este fármaco. El método analítico se basa, si bien no está limitado a ello, en la determinación de la unión del derivado fluorescente del FK506 a la proteína objeto del estudio, mediante el seguimiento de los cambios en uno o varios de los siguientes parámetros de la fluorescencia de dicho derivado fluorescente: la intensidad de emisión de fluorescencia y/o la polarización de fluorescencia en estado estacionario, los desplazamientos espectrales (máximos de absorción y/o emisión), la cinética de extinción de la intensidad fluorescencia y/o la polarización de fluorescencia, así como cambios en alguno o varios de dichos parámetros por existir fenómenos de transferencia de energía resonante (FRET) a un aceptor o desde un dador.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Síntesis de derivados fluorescentes de tacrolimus (FK506) y su uso en la caracterización de la interacción de FK506 con proteínas de unión a FK506.

5 **Sector de la técnica**

La invención se refiere a los campos bioquímico/biotecnológico/biológico (estudios de interacción de proteínas con moléculas pequeñas de actividad farmacológica), médico-farmacéutico (estudio de los mecanismos de acción de fármacos), químico-analítico (métodos de cuantificación de la unión de proteínas a moléculas sintéticas) y químico-orgánico (métodos de síntesis de moléculas orgánicas con propiedades fluorescentes).

Estado de la técnica

15 El tacrolimus, también conocido en la bibliografía como FK506, es un macrólido de nombre químico 1R,9S,12S, 13R,14S,17R,18E,21S,23S,24R, 25S,27R)-17-alil-1,14-dihidroxi-12-[(E)-2-[(1R, 3R, 4R)-4-hidroxi-3-metoxiciclohexil]-1-metilvinil]-23,25-dimetoxi-13,19,21, 27-tetra-metil-11,28-dioxa-4-azatriciclo[22.3.1.0^{4,9}]octacos-18-eno-2,3, 10, 16-tetrona (obtenido habitualmente en forma de hidrato), producido por *Streptomyces Tsukubaensis* (T. Kino y col., *J. Antibiot.* 1987, 40, 1249). La estructura del tacrolimus se muestra en la Figura 1.

20 Tacrolimus es un potente inmunosupresor que se emplea en medicina clínica en trasplantes de hígado, riñón y pulmón (L.J. Scott y col., *Drugs*, 2003, 63, 1247). Además de su efecto inmunosupresor, el FK506 puede actuar como agente antiinflamatorio o antialérgico (J. Clardy, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1995, 92, 56; N. Keicho y col., *Cell Immunol* 1991, 132, 285; M.F. Sakr y col., *J. HepatoL* 1993, 17, 301).

25 La actividad inmunosupresora del tacrolimus es particularmente importante ya que ha demostrado ser entre 50 y 100 veces más potente que el inmunosupresor ciclosporina A en la inhibición de la activación de las células T (T. Kino y col., *J. Antibiot.* 1987, 40, 1249), por lo que resulta ser una alternativa efectiva a la ciclosporina tanto en inmunosupresión primaria después del trasplante de órganos sólidos, como en terapias de rescate en pacientes que presentan rechazo (A.D. Mayer y col., *Transplantation* 1997, 64, 436). El tacrolimus inhibe la activación de las células T al unirse, una vez internalizado en la célula T, a una proteína citosólica llamada FKBP (del inglés, *FK506 binding protein*). El complejo fármaco-proteína de unión se asocia a su vez con calcineurina, inhibiendo la actividad de este enzima dependiente de calcio, lo que da lugar a la inhibición de la activación de la expresión de linfocinas. (G. Wiederrecht y col., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1993, 696, 9).

35 El tacrolimus se administra por vía oral o intravenosa. Una vía alternativa, no ensayada todavía, es la vía inhalatoria, que sería especialmente eficaz en trasplante de pulmón. El FK506 es bastante insoluble en agua (< 0.003 mg/mL a 25°C) (K. Hane y col., *Iyakuhi Kenkyu* 1992, 23, 33), por lo que las dosis comerciales intravenosas de tacrolimus contienen habitualmente un agente solubilizante, como el aceite de castor polioxiethylado, que es tóxico. El principal efecto secundario asociado a la administración clínica del tacrolimus es la nefrotoxicidad. También puede producir neurotoxicidad, asociada a dolor de cabeza, temblores, insomnio, dolor y otros síntomas.

45 La unión de fármacos a proteínas de fluidos como la seroalbúmina humana del plasma o la proteína A del surfactante pulmonar (SP-A) en el fluido alveolar, puede modificar las propiedades de dichos fármacos, disminuyendo a su vez la cantidad de fármaco libre (D. Silva y col., *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2004, 60, 1215) y obligando a aumentar las dosis administradas para obtener el efecto deseado con el consecuente aumento de toxicidad. Alternativamente, las potenciales proteínas de unión presentes en fluidos extracelulares podrían facilitar el transporte del fármaco y su internalización en las células diana. La unión del FK506 a proteínas de fluidos extracelulares se desconoce hasta ahora.

50 La mayoría de los estudios de interacción de fármacos con proteínas se realizan utilizando técnicas que requieren condiciones no fisiológicas tales como elevadas concentraciones de dichas proteínas, disolventes deuterados o proteínas en estado cristalino. Una aproximación para investigar la unión de tacrolimus a proteínas es preparar un derivado o análogo de tacrolimus en el que se una químicamente, de forma covalente, una estructura fluorescente a la molécula, como se ha descrito para otras moléculas de posible o reconocida actividad farmacológica (ver, p.e., G. Orellana et al. *Patente* ES 2197811; M.P. Lillo, y col., *Biochemistry* 2002, 41, 12436; F. Amat et al, *Patente* ES 2105983; J.A. Evangelio y col. *Cell Motil Cytoskeleton* 1998, 39, 73; G. Turcatti y col. *J. BioL Chem.* 1997, 272, 21167; Han y col., *Biochemistry* 1996, 35, 14173; J.-M. Frére y col. *Biochem. J.* 1994, 300, 14 y *Biochem. J.* 1993, 291, 19; C.D. Niebylski y H.R. Petty, *Biophys. J.* 1993, 64, 701; Teng y col., *Biochemistry* 1991, 30, 7894). Ninguna de estas publicaciones, sin embargo, revela ni menciona la posibilidad de marcar fluorescentemente la molécula de tacrolimus.

65 La fluorescencia, y en particular las técnicas de polarización (anisotropía) de fluorescencia, son herramientas muy útiles en el estudio de la mayoría de las interacciones biomoleculares y macromoleculares, tales como ADN-proteína, ADN-fármaco, proteína-fármaco, proteína-proteína o la unión de antígenos a anticuerpos (ver, por ejemplo, W.B. Dandliker y col., *Methods Enzymol.* 1981, 74 Part C, 3). A diferencia de otras técnicas analíticas, la fluorescencia no requiere la separación física de las especies unidas y libres, permitiendo medir directamente la relación de ligando unido y libre, incluso en presencia de ligando libre. Al no ser necesario separar el ligando libre del unido, todas las medidas de fluorescencia y polarización de fluorescencia se realizan directamente en disolución, tras alcanzar el equilibrio.

Además, como las medidas de fluorescencia y polarización de fluorescencia no adulteran las muestras, éstas pueden ser recuperadas para elucidar el efecto en la unión ligando-biomolécula de cambios en parámetros tales como pH, temperatura y concentración salina. Así, la interacción del tacrolimus con su proteína de unión o con proteínas de fluidos puede seguirse por cambios en la intensidad de emisión de fluorescencia y en la polarización de fluorescencia en estado estacionario, desplazamientos de los espectros de absorción, excitación y/o emisión, variaciones en los perfiles cinéticos de extinción de fluorescencia y/o polarización de fluorescencia, así como los cambios de fluorescencia inducidos por transferencia de energía resonante (FRET) ayo desde terceras partes.

El uso de aminonaftalensulfonatos sustituidos como sondas fluorescentes en proteínas y otras macromoléculas es bien conocido (L. Stryer, *J.Mol. Biol.* 1965, 13, 482; W.O. McClure y G.M. Edelman, *Biochemistry* 1966, 5, 1908; W.O. McClure y G.M. Edelman, *Biochemistry* 1967, 6, 559; W.O. McClure y G.M. Edelman, *Biochemistry* 1967, 6, 567; R.F. Chen y J.C. Kernochan, *J. Biol. Chem.* 1967, 242, 5813; J.R. Lakowicz, *Principies of Fluorescence Spectroscopy* 2ª edición, Kluwer, New York, 1999). Estos compuestos muestran cambios característicos en la localización de sus máximos de emisión de fluorescencia e intensidad de fluorescencia en función de la polaridad del disolvente que han permitido su uso para determinar sitios “polares” y “no polares” cuando interaccionan con macromoléculas. También son susceptibles de ser interrogados mediante técnicas de polarización de fluorescencia para el estudio de interacción de pequeñas moléculas con proteínas, para inmunoensayos fluorescentes o para el estudio de la microfluidéz de membranas celulares.

K.C. Kasper *et al.* (Patente WO 01/09190) describen el uso de tacrolimus y derivados del tacrolimus unidos a proteínas de alto peso molecular o anticuerpos para el desarrollo de métodos inmunológicos analíticos para la determinación de tacrolimus. Sin embargo, si bien dichos derivados o análogos de tacrolimus son útiles para el desarrollo de dichos métodos y/o la producción de anticuerpos monoclonales para tacrolimus, los autores no preparan, mencionan o reivindican ningún derivado fluorescente de tacrolimus para el estudio de su unión a proteínas presentes en fluidos extracelulares u otros medios, ni dichos derivados podrían utilizarse en modo alguno para el estudio de la unión de tacrolimus a proteínas, lo que constituye el objeto de la presente invención.

Asimismo, Bakhtiar y Stearns han descrito un procedimiento para investigar la unión del tacrolimus a proteínas (*Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1995, 9, 240). Sin embargo, el procedimiento para tal fin descrito en esta publicación emplea la técnica de espectrometría de masas con ionización por electropulverización, la cual es de aplicación restringida a moléculas proteicas de determinada magnitud y requiere de instrumentación sofisticada y cara, lo que limita su aplicabilidad. Por el contrario, las técnicas de estudio de unión a proteínas u otras biomoléculas, basadas en la monitorización de la fluorescencia del fármaco marcado han demostrado una versatilidad, eficacia coste/prestaciones, sencillez, resolución, seguridad, fiabilidad y rapidez difícilmente superables (ver, por ejemplo, R. Kraayenhof *et al.* (eds.), *Fluorescence Spectroscopy, Imaging and Probes*, Springer, Berlin-Heidelberg, 2002; B. Valeur y J.-C. Brochon (eds.), *New Trends in Fluorescence Spectroscopy: Applications to Chemical and Life Sciences*, Springer, Berlin-Heidelberg, 2001; A. Prasanna de Silva *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999, 96, 8336).

La presente invención describe la posibilidad de marcar fluorescentemente el tacrolimus en una posición que no afecta a su unión a proteínas. El tacrolimus así etiquetado se ha empleado en el estudio de las proteínas que se unen a tacrolimus, particularmente aquellas que están presentes en fluidos extracelulares, sin quedar con ello restringido a dichos medios.

Descripción de la invención

Síntesis de derivados fluorescentes de tacrolimus (FK506) y su uso en la caracterización de la interacción de FK506 con proteínas de unión a FK506

La presente invención se refiere a la síntesis, aislamiento y caracterización de derivados altamente fluorescentes de tacrolimus (FK506) que tienen aplicación, sin estar restringido en modo alguno a ella, a la elucidación y caracterización de la interacción del tacrolimus con proteínas de unión a tacrolimus (FKBPs). Las proteínas pueden encontrarse preferentemente en fluidos extracelulares, pero en modo alguno la metodología analítica que aquí se describe queda restringida a tales lugares.

Más concretamente, la invención describe la preparación y el empleo de derivados o análogos del fármaco tacrolimus en cuya estructura química se ha introducido otra entidad o sub-estructura molecular que emite luz (fluorescencia) ultravioleta o visible al ser excitada o iluminada con luz ultravioleta o visible, sin afectar a la capacidad de unirse a proteínas de la molécula original. Los derivados fluorescentes que aquí se revelan se obtienen, en general, por procedimientos químicos que comprenden tres etapas de síntesis, a partir del tacrolimus original y una molécula fluorescente apropiada, siempre que esta última contenga en su estructura molecular un grupo amino libre o pueda incorporarse previamente dicho grupo funcional.

La síntesis de los derivados de tacrolimus que incluyen una molécula fluorescente o fluorogénica en su estructura, como pueden ser, aunque sin estar restringidos a ellas, el dansilo (5-(dimetilamino)-1-naftalenosulfonilo) o la fluoresceína (9-(o-carboxifenil)-6-hidroxi-3-isoxantenona) derivatizadas por introducción de al menos un grupo aminoalquilo, consta de tres etapas. En la primera, tiene lugar con excelente rendimiento la incorporación de un grupo carboxilo al tacrolimus a través de la reacción del grupo carbonilo C-22 del tacrolimus (marcado con una flecha en la Figura 1) con la carboximetoxilamina, de forma análoga al procedimiento convencional descrito por K.C. Kasper *et al.*

(Patente WO 01/09190). Seguidamente, los derivados carboxilados del tacrolimus se activan, para un más eficaz ataque nucleófilo por el grupo amino que porta la molécula fluorescente derivatizada, con *N*-hidroxisuccinimida o *N,N*-dodiclohexilcarbodiimida comerciales, entre otros agentes descritos en la bibliografía para tal fin solubles en medios no acuosos (R. P. Hughland, editor, *Handbook of Fluorescent Probes and Research Products*, 8ª edición, Molecular Probes, Eugene, OR, EEUU, 2002).

En la tercera etapa tiene lugar la unión o condensación entre el derivado activado del ácido carboxílico obtenido previamente y el derivado aminoalquil sustituido de la molécula fluorescente elegida (comercial o sintetizada previamente). Esta etapa se lleva a cabo, preferiblemente, en ausencia de luz con el fin de evitar fotodegradaciones del grupo fluorogénico y controlando cuidadosamente la rigurosa ausencia de agua en el medio de reacción, a fin de evitar la hidrólisis indeseable del tacrolimus activado obtenido en la etapa anterior.

La única limitación encontrada a estas reacciones es que no deben alterar la estructura molecular fundamental (responsable de su actividad como tal y de su unión a proteínas) del tacrolimus precursor, excepto en lo que se refiere al grupo carbonilo C-22 del mismo.

Además, la patente revela la aplicación del derivado fluorescente del tacrolimus al estudio de la interacción del mismo con proteínas de unión a tacrolimus empleando, aunque sin estar de ningún modo restringidas a ellas, las técnicas de emisión de fluorescencia en estado estacionario, polarización de fluorescencia en estado estacionario y polarización de fluorescencia con resolución temporal. Asimismo, estas técnicas de fluorescencia pueden utilizarse, sin estar restringido a ello, para elucidar la interacción con proteínas presentes en espacios extracelulares.

Breve descripción de las figuras

La invención incluye unas figuras que con carácter representativo muestran:

La Figura 1 representa la estructura química del Tacrolimus (FK506). La flecha indica el grupo funcional carbonilo a través del cual se realiza la unión de las estructuras fluorescentes que confieren esta propiedad a las moléculas resultantes.

La Figura 2 muestra la reacción química de formación de la carboximetoxiloxima del tacrolimus en el C-22 que permite introducir un grupo carboxilo reactivo en el tacrolimus no existente en la molécula original, en una posición que no altera significativamente la estructura química del fármaco.

La Figura 3 muestra la activación con diciclohexilcarbodiimida (DCC) de la carboximetoxiloxima del tacrolimus en el C-22 para hacer posible la reacción del grupo carboxilo con el grupo amino que porta la molécula fluorescente que se desea introducir.

La Figura 4 representa la unión covalente de la dansilcadaverina a la carboximetoxiloxima activada del tacrolimus mediante la formación de un grupo carboxamida.

La Figura 5 muestra el efecto de la proteína SP-A del fluido alveolar sobre los espectros de emisión ($\lambda_{exc} = 340$ nm) (A) y de excitación ($\lambda_{em} = 505$ nm) de 5×10^{-4} mM dansil-FK506. Las líneas continuas representan los espectros de Dansil-FK506 en tampón 5 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, pH 7.4. Las líneas discontinuas representan los espectros de excitación y emisión de dansyl-FK506 en presencia de proteína.

La Figura 6 muestra que la proteína SP-A del fluido alveolar no tiene ningún efecto sobre los espectros de emisión ($\lambda_{exc} = 340$ nm) (A) y de excitación ($\lambda_{em} = 505$ nm) de 5×10^{-4} mM dansilcadaverina (sonda fluorescente libre). Las líneas continuas (—) representan los espectros de dansilcadaverina en tampón 5 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, pH 7.4. Las líneas discontinuas (----) representan los espectros de excitación y emisión de dansilcadaverina en presencia de proteína.

La Figura 7 muestra el efecto de distintas concentraciones de la proteína SP-A del fluido alveolar (panel A) y de la albúmina del plasma sanguíneo (panel B) sobre la anisotropía de emisión de fluorescencia de dansil-FK506 en tampón 5 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, pH 7.4; ($\lambda_{exc} = 340$ nm, $\lambda_{em} = 505$ nm, 25°C).

Modo de realización de la invención

La molécula del tacrolimus (FK506), si bien dispone de gran número de grupos funcionales (Figura 1), no se puede derivatizar o funcionalizar fácilmente. En efecto, algunos de ellos son escasamente reactivos, intrínsecamente (como la carboxamida C8) o por impedimentos estéricos (como el hidroxilo en C10). Otros darían lugar a poliderivatización (e.g. los hidroxilos en C24 y en el anillo ciclohexánico, o los dos grupos alqueno presentes en el fármaco), mientras que ciertas funcionalizaciones probablemente darían lugar a la pérdida de su actividad o conformación. Recientemente Kasper, *et al.* (Patente WO 01/09190) han descrito un procedimiento adecuado para incorporar derivados al tacrolimus en una posición que no interfiere en la producción de anticuerpos contra el mismo (C22), lo que llevó a pensar que dicha posición también podría ser útil para introducir un grupo o molécula fluorescente que permitiera estudiar la unión del análogo de tacrolimus a proteínas.

En esencia, el procedimiento que describe esta patente se basa en la conocida reacción del tacrolimus con carboximetoxilamina para dar lugar a la correspondiente carboximetoxiloxima del fármaco en del carbonilo C-22. De esta forma, queda incorporado al FK506 un grupo *carboxilo* ligeramente separado de la estructura base (un metileno), susceptible de ser convenientemente activado para su reacción con grupos nucleofílicos (típicamente *amina*) presentes en moléculas pequeñas fluorescentes o fluorogénicas (Figuras 2-4). La *amida* resultante de la unión del fluoróforo (molécula o sub-estructura fluorescente) al tacrolimus es suficientemente estable para que el conjugado pueda utilizarse, en un gran número de condiciones experimentales y medios solventes, para estudiar su unión a proteínas.

Con el fin de ilustrar el procedimiento de marcaje del fármaco FK506, se seleccionó, en primer lugar, el fluoróforo dansilo como etiqueta, dada la asequibilidad y bajo coste del mismo, la extensa bibliografía disponible como marcador de biomoléculas, así como su sensibilidad al microentorno, que permite al “reportero” informar sobre su localización cuando se encuentra en medios (micro)heterogéneos. Una vez puesto a punto el procedimiento de marcaje del FK506, podrían introducirse, sin más limitación que la de poseer en su estructura química al menos un grupo amino y no alterar la estructura fundamental del tacrolimus, otras sondas fluorescentes tales como las aminoderivadas del amarillo lucifer (*lucifer yellow*), dipirrometeno o la fluoresceína, entre otras, convenientemente funcionalizadas y disponibles comercialmente (por ejemplo, las sondas moleculares reactivas con grupos carboxilo fabricadas y comercializadas por Molecular Probes, Eugene, OR, Estados Unidos, cuyas estructuras químicas se pueden encontrar en el libro de R. P. Hughland, editor, *Handbook of Fluorescent Probes and Research Products*, 8ª edición, Molecular Probes, Eugene, OR, EEUU, 2002).

A título ilustrativo y sin que sea considerado como limitación al alcance de la presente invención, se explican a continuación ejemplos de la obtención de un derivado fluorescente del tacrolimus (Figuras 1-4), así como el empleo del mismo para el estudio de su unión a proteínas mediante técnicas de fluorescencia (Figuras 6-7). El tacrolimus está fabricado por los laboratorios farmacéuticos Fujisawa (Japón). La proteína SP-A humana se purifica, a partir del surfactante pulmonar aislado del lavado broncoalveolar, mediante extracciones secuenciales con *n*-octilglucósido y butanol (C. Casals y col., *Biochem. J.* 1993, 296, 585; García-Verdugo *et al.*, *Biochemistry* 2002, 41, 14041; García-Verdugo *et al.*, *Biochemistry* 2003, 42, 9532). La pureza de la proteína se comprueba utilizando electroforesis SDS-PAGE unidimensional en un gel con un 12% de poliacrilamida en condiciones reductoras (50 mM ditiotretitol). La cuantificación de SP-A se realiza mediante análisis de aminoácidos en un analizador Beckman System 6300 de alta resolución. Tanto la proteína de unión de tacrolimus (FKBP) como la seroalbúmina humana (HSA) se obtienen de Sigma (St. Louis, MO). Los reactivos químicos y disolventes que se mencionan en los ejemplos están disponibles comercialmente de uno o más fabricantes entre los que se encuentran, por ejemplo, Sigma-Aldrich, Fluka, Merck, Avocado, Molecular Probes, etc.

Ejemplo 1

Formación de la carboximetoxiloxima del tacrolimus en el C22

A una disolución de 0,061 mmol de FK506 (Fujisawa) en 10 mL de MeOH anhidro (grado HPLC, SDS) se añaden 0,34 mmol de acetato sódico (anhidro, PANREAC) y 0,31 mmol de clorhidrato de carboximetoxilamina (98%, ALDRICH). El sistema se dispone bajo atmósfera inerte (argon) y se mantiene agitando a temperatura ambiente durante 16 horas. La evolución de la reacción se sigue por cromatografía en capa fina (CCF) usando como eluyente una mezcla cuaternaria CH₂Cl₂-AcOEt-MeOH-HOAc (30:70:11:0.6, v/v/v/v) y como revelador el vapor de yodo. Transcurrido ese tiempo, se rotaevapora el MeOH y se adiciona cloroformo, observando la disolución parcial del crudo de reacción. El residuo insoluble está constituido por una mezcla del clorhidrato de la carboximetoxilamina (se utiliza en exceso) y acetato sódico, mientras que en la fase líquida se encuentra la oxima buscada, en forma de dos isómeros (*anti* y *sin*) como demuestra la CCF y la ¹H-RMN (200 MHz). Una vez extraída cuantitativamente la oxima por el cloroformo, se elimina el disolvente a presión reducida, apareciendo un sólido blanco (65 mg) que se identifica como la oxima objetivo (Figura 2) por su espectro de ¹H-RMN y su pureza se confirma por CCF (ausencia de otros productos secundarios).

Ejemplo 2

Activación de la carboximetoxiloxima con N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC)

La oxima obtenida en la etapa anterior (0,074 mmol) se disuelve en 5 mL de DMF anhidra (99,5%, FLUKA) y se coloca en un matraz de dos bocas. A continuación se añaden 0,12 mmol de DCC (Aldrich) y el sistema se deja bajo atmósfera inerte y con agitación durante 1,5 h. La evolución de la reacción se sigue por CCF usando como eluyente una mezcla cuaternaria CH₂Cl₂-AcOEt-MeOH-HOAc (30:70:11:0.6, v/v/v/v), observando que las dos manchas que se observan tras la primera etapa (isómeros de la oxima) prácticamente desaparecen y, en su lugar, se detecta un producto nuevo cuyo aislamiento no se intentó y cuya naturaleza corresponde al carbamato resultante de la activación del grupo carboxilo introducido en la etapa anterior (Figura 3) como se elucida por espectroscopía infrarroja.

ES 2 249 986 B1

Ejemplo 3

Unión de la dansil cadaverina a la oxima activada del tacrolimus

5 Sobre una disolución de 0.108 mmol (36,25 mg) de dansil cadaverina (Molecular Probes) en 2 mL de DMF anhidra bajo atmósfera inerte, se añade mediante cánula la disolución que contiene la oxima activada (0,074 mmol), manteniendo el sistema bajo argón y con agitación. La evolución de la reacción se sigue por CCF usando como eluyente una mezcla ternaria *n*-PrOH-AcOH-H₂O (7:3:4, v/v/v). Se deja a temperatura ambiente durante 72 horas y, al no observar transformación alguna, se procede a calentar la mezcla de reacción a 90°C. Transcurridas 18 h desde el comienzo de la calefacción no se observa ya evolución por CCF y se detiene la misma. Se deja alcanzar temperatura ambiente y se rotaevapora la DMF. El residuo resultante se disuelve en 50 mL de CHCl₃ y se extrae con HCl al 10% (5 x 20 mL) y se lava con H₂O (3 x 20 mL). Los extractos orgánicos combinados se secan sobre MgSO₄ anhidro y, a continuación, se elimina el disolvente a presión reducida. Se obtiene así un sólido amarillo (52 mg) que, tras analizarlo por espectroscopia de absorción UV-VIS (MeOH; $\lambda_{\text{máx}}$ 333 nm), ¹H-RMN (200 MHz), ¹³C-RMN (50 MHz) y de masas (ESI-MS, detección de iones positivos), se identifica como el producto buscado (dansil-FK506). Para finalizar, el producto se seca a vacío (0,1 Torr).

Ejemplo 4

20 *Unión de dansil-FK506 a proteínas detectada por cambios en la intensidad de fluorescencia y desplazamientos espectrales*

La interacción del derivado fluorescente de tacrolimus, DNS-FK506, con proteínas puede estudiarse a partir de los cambios en la intensidad y desplazamiento del máximo de emisión de fluorescencia del ligando fluorescente. La intensidad de fluorescencia se mide a 90° de la dirección del haz de excitación, seleccionando la longitud de onda de emisión. Los espectros de emisión del derivado fluorescente de tacrolimus se obtienen midiendo la intensidad de fluorescencia, para una longitud de onda de excitación de 340 nm, entre 420 y 650 nm. El compartimento de la muestra se termostatiza con un baño, como por ejemplo el que comercializa Julabo con la referencia F30-C. Se utilizan cubetas de cuarzo como por ejemplo las de la empresa Hellma (111.057-QS) rectangulares de 0.5 cm de paso óptico. Para estudiar la variación de la intensidad de fluorescencia a una longitud de onda dada así como la posición del máximo del espectro de emisión en función de la relación molar tacrolimus fluorescente/proteína, es necesario determinar en primer lugar el valor de dichos parámetros en ausencia de proteína. Para ello se añaden 2 x 10⁻³ mL de DNS-FK506 0.125 mM disuelto en MeOH para espectroscopía de Merck (de manera que la cantidad final de alcohol en la disolución 0.4% (v/v) no afecte a las proteínas) a 0.5 mL de un tampón fisiológico como PBS o en tampón 5 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, (Merck, Alemania) pH 7.4. Se recoge el espectro de emisión de fluorescencia del fármaco etiquetado con dansilo y, a continuación, se registran los espectros de fluorescencia de muestras en las que varía la relación molar tacrolimus/proteína, fijando la concentración de fármaco y cambiando la de proteína o viceversa. La contribución de la emisión procedente de las impurezas del disolvente y la luz difusa debida a las proteínas se corrigen restando la emisión del disolvente y de las distintas concentraciones de proteína medidas en las mismas condiciones que la muestra. Para eliminar el efecto de autoabsorción de la emisión en las medidas de intensidad de fluorescencia se trabaja con disoluciones de proteína óptimamente diluidas (absorbancia a la longitud de onda de excitación < 0.01 u.a., 0.5 cm de paso óptico). Para corregir la deformación de los espectros debida a las características intrínsecas del sistema de medida se divide la intensidad experimental o espectro aparente por una función de corrección que incluye la distinta sensibilidad del sistema monocromador de emisión-fotomultiplicador.

En la Figura 5 se muestra el estudio de la interacción de la proteína del fluido alveolar SP-A con un análogo dansilado de tacrolimus (abreviadamente dansil-FK506 o DNS-FK506). Dicha interacción puede determinarse por cambios en la intensidad de fluorescencia y del máximo de emisión de DNS-FK506. La unión de la proteína SP-A (7.5 x 10⁻⁴ mM) a DNS-FK506 (5 x 10⁻⁴ mM) da lugar a un incremento de la intensidad de fluorescencia de DNS-FK506, acompañado de un desplazamiento del máximo de emisión hacia longitudes de onda menores, desde 545 a 500 nm (Figura 5A). Esto indica que la polaridad del medio alrededor del grupo fluorescente disminuye tras la interacción DNS-FK506/SP-A. La figura 5B indica que la unión de la proteína SP-A a DNS-FK506 da lugar a un desplazamiento hacia el rojo del espectro de excitación, confirmando un ambiente diferente del fluoróforo en presencia de la proteína. La figura 6 (paneles A y B), demuestra que los cambios observados en los espectros de emisión y excitación de fluorescencia de DNS-FK506 tras su interacción con la proteína SP-A no se deben a una interacción inespecífica de la proteína SP-A con la sonda fluorescente (dansilcadaverina). La figura 6 muestra claramente que el espectro de emisión (panel A) y de excitación (panel B) de fluorescencia de la dansilcadaverina no se modifica en presencia de la proteína SP-A.

Ejemplo 5

Determinación de la unión de dansil-FK506 a proteínas mediante anisotropía de fluorescencia

65 Otra forma posible de estudiar la interacción de tacrolimus con proteínas consiste en seguir los cambios en la anisotropía de fluorescencia del fármaco etiquetado fluorescentemente utilizando polarizadores. Para ello las muestras, preparadas como se ha descrito previamente, se excitan con luz linealmente polarizada (vertical) y se miden las componentes de la intensidad de fluorescencia polarizada en las direcciones paralela y perpendicular al plano de polarización

ES 2 249 986 B1

de la luz de excitación de forma alternada. Para unas condiciones determinadas de longitud de onda de excitación (340 nm) y de emisión (505 nm), la anisotropía se calcula según la expresión (A. Jablonski, *Acta Phys. Polon.*, 1957, 26, 471):

$$\bar{r} = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}G}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}G}$$

donde G es un factor de corrección que tiene en cuenta la diferente sensibilidad del sistema de detección a la luz polarizada vertical y horizontalmente.

La figura 7 (panel A) muestra que la anisotropía de fluorescencia del fármaco fluorescente dansil-FK506 aumenta tras su interacción con concentraciones crecientes de la proteína SP-A. Este experimento indica que la unión de la proteína SP-A a DNS-FK506 causa restricciones mecánicas en la movilidad rotacional del grupo dansilo, resultando en un incremento significativo de la emisión de anisotropía de dansil-FK506 que incrementa con el aumento de la concentración de SP-A. Paralelamente se realizan experimentos control con dansilcadaverina (sonda fluorescente libre) en ausencia y presencia de SP-A. La anisotropía de fluorescencia de la dansilcadaverina en tampón a 25°C es 0.002 ± 0.001 ($\lambda_{\text{ex}} = 340$ nm; $\lambda_{\text{em}} = 505$ nm) y dicho valor no se modifica significativamente en presencia de concentraciones crecientes de la proteína SP-A, lo que indica que el efecto de la proteína SP-A sobre la anisotropía de fluorescencia de DNS-FK506 se debe a la unión de la proteína al fármaco FK506. La figura 7 (panel B) muestra un experimento similar realizado con albúmina humana de suero.

Ejemplo 6

Determinación de la unión de dansil-FK506 a proteínas mediante cinéticas de extinción de la intensidad y/o polarización de fluorescencia

Una tercera manera de estudiar la interacción DNS-FK506 con proteínas es seguir la evolución temporal de la fluorescencia (decaimiento de intensidad de fluorescencia). La medida del perfil de los pulsos de excitación, $L(t)$, se determina registrando la radiación difusa producida con agua purificada (Millipore MilliQ) a la longitud de onda de excitación, recogiendo de forma consecutiva el decaimiento de fluorescencia y el perfil del láser. Los decaimientos de fluorescencia así obtenidos se analizan con un método de convolución iterativa basado en el ajuste de mínimos cuadrados no lineal, obteniendo las distribuciones de vidas medias correspondientes a cada muestra.

Si la interacción DNS-FK506/proteína se quiere seguir a partir de los decaimientos de anisotropía de fluorescencia, la muestra fluorescente se excita con pulsos de picosegundos de luz polarizada verticalmente. Se selecciona primero con el polarizador de emisión la fracción de la intensidad de fluorescencia polarizada paralelamente a la dirección del haz de excitación, intensidad de fluorescencia polarizada verticalmente, $i_{\parallel}(t)$, y después la fracción de fluorescencia polarizada horizontalmente, $i_{\perp}(t)$. Las intensidades de fluorescencia polarizadas medidas, $i_{\parallel}(t)$ e $i_{\perp}(t)$, se acumulan de forma alternada y durante el mismo tiempo junto con la función instrumental, $L(t)$. Los decaimientos de despolarización de fluorescencia así obtenidos se analizan con un método de convolución iterativa/mínimos cuadrados no lineales para obtener los tiempos de correlación rotacional, ϕ_i , y los valores de anisotropía límite, r_{∞} .

Ejemplo 7

Determinación de la unión de dansil-FK506 a proteínas mediante transferencia de energía resonante (FRET)

Otra forma de estudiar la unión de DNS-FK506 con proteínas es utilizar la transferencia de energía resonante tipo Förster (FRET) entre los triptófanos de las proteínas y la molécula de dansilo (S.J. Nannepaga y col., *Biochemistry* 2004, 43, 550; J.K. Davies y col., *J. Biol. Chem.* 2002, 277, 48395). El aumento en la intensidad de fluorescencia de DNS-FK506 debido a la transferencia de energía de los triptófanos se sigue midiendo por la emisión entre 490 y 650 nm con excitación a 285 nm.

REIVINDICACIONES

5 1. Derivados de tacrolimus (FK506) **caracterizados** porque contienen en su molécula un grupo fluorogénico o fluorescente.

2. Derivados de tacrolimus (FK506) según reivindicación 1, **caracterizados** porque emiten fluorescencia ultravioleta o visible al ser iluminados por luz de menor longitud de onda que la emitida.

10 3. Procedimiento de obtención de derivados de tacrolimus (FK506) que contiene en su estructura un grupo fluorogénico o fluorescente **caracterizado** porque la síntesis posee tres etapas: (1) introducción de un ácido carboxílico en la molécula de tacrolimus, (2) activación del grupo carboxilo y (3) unión de la molécula fluorescente portadora de al menos un grupo amino reactivo al tacrolimus activado.

15 4. Procedimiento de obtención de derivados de tacrolimus (FK506) que contienen en su molécula un grupo fluorogénico o fluorescente, según reivindicación 3, **caracterizado** porque el grupo fluorogénico o fluorescente puede ser cualquiera que contenga en su estructura molecular un grupo amino libre.

20 5. Procedimiento de obtención de derivados de tacrolimus (FK506) que contienen en su molécula un grupo fluorogénico o fluorescente, según reivindicación 4, **caracterizado** porque el grupo fluorogénico es dansilo o fluoresceína.

6. Uso de los derivados de tacrolimus (FK506), según las reivindicaciones 1 y 2, para la elucidación o estudio de la unión de dichos derivados a proteínas utilizando técnicas de fluorescencia.

25 7. Uso de los derivados de tacrolimus (FK506), según la reivindicación 6, donde las proteínas son proteínas presentes en el espacio extracelular.

30 8. Uso de los derivados de tacrolimus (FK506), según la reivindicación 6, **caracterizado** porque dichas técnicas están basadas en el seguimiento de los cambios en uno o varios de los siguientes parámetros de la fluorescencia de dicho derivado fluorescente: la intensidad de emisión de fluorescencia y/o la polarización de fluorescencia en estado estacionario, los desplazamientos espectrales (máximos de absorción y/o emisión), la cinética de extinción de la intensidad fluorescencia y/o la polarización de fluorescencia, así como cambios en alguno o varios de dichos parámetros por existir fenómenos de transferencia de energía resonante (FRET) a un aceptor o desde un dador.

35

40

45

50

55

60

65

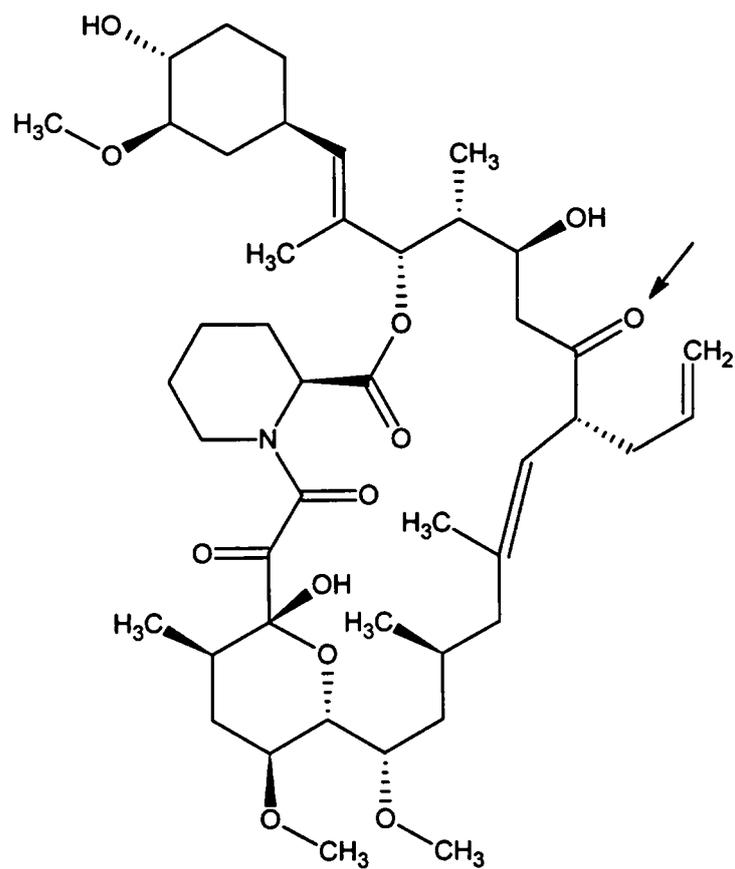


FIGURA 1

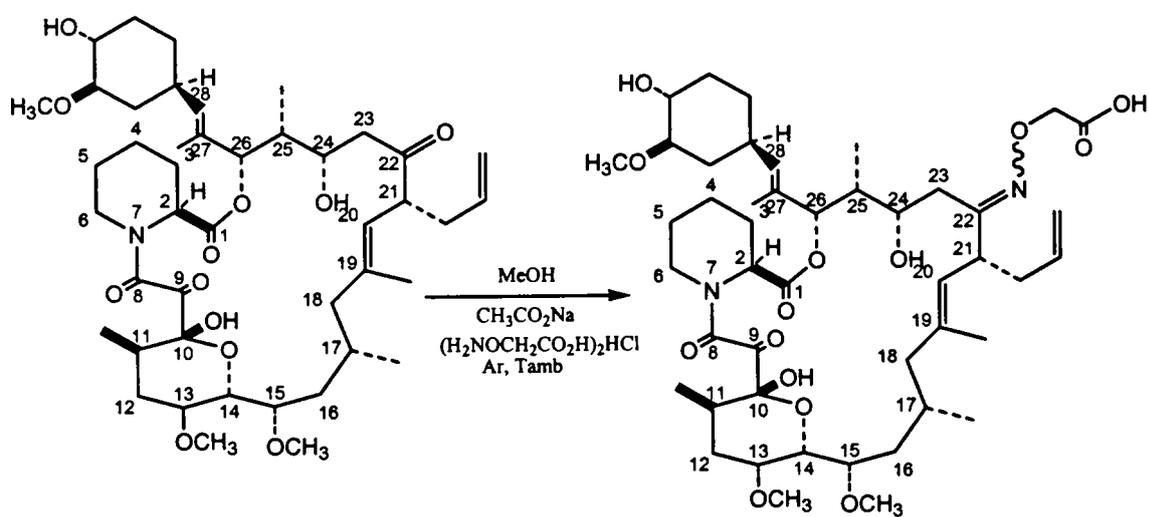


FIGURA 2

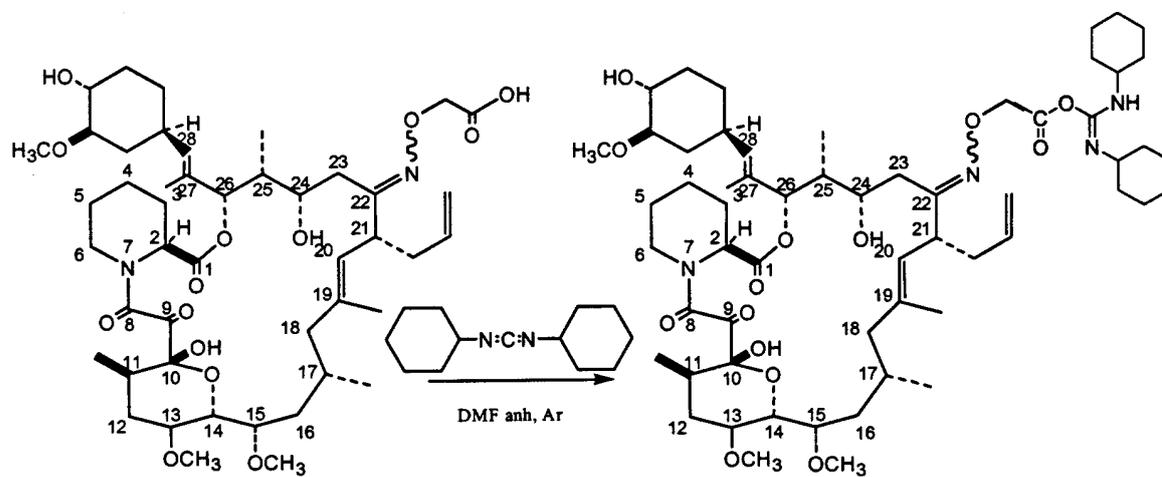


FIGURA 3

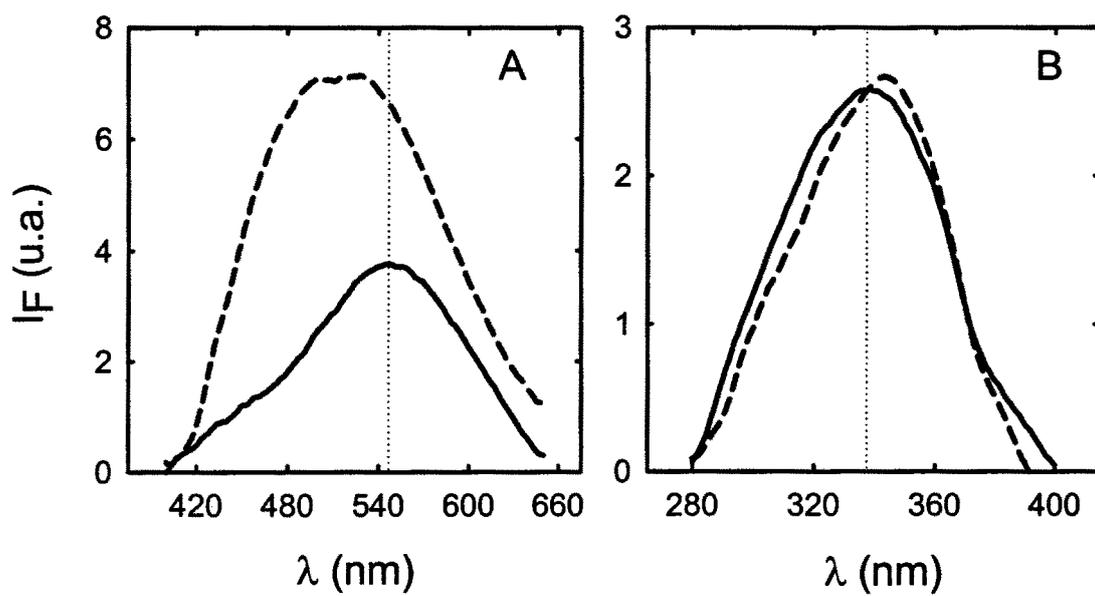


FIGURA 5

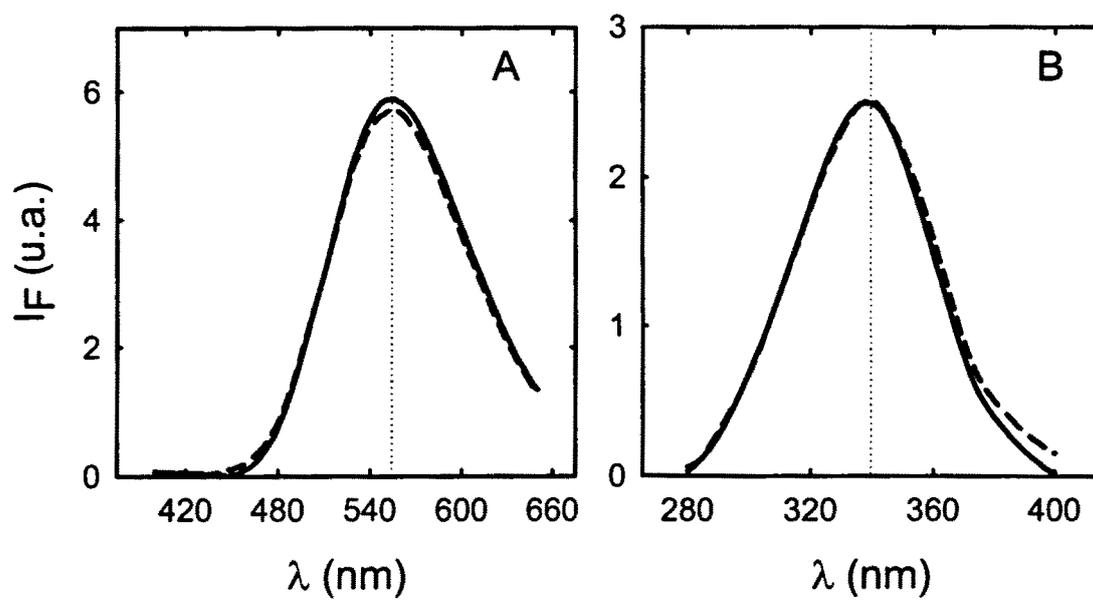


FIGURA 6

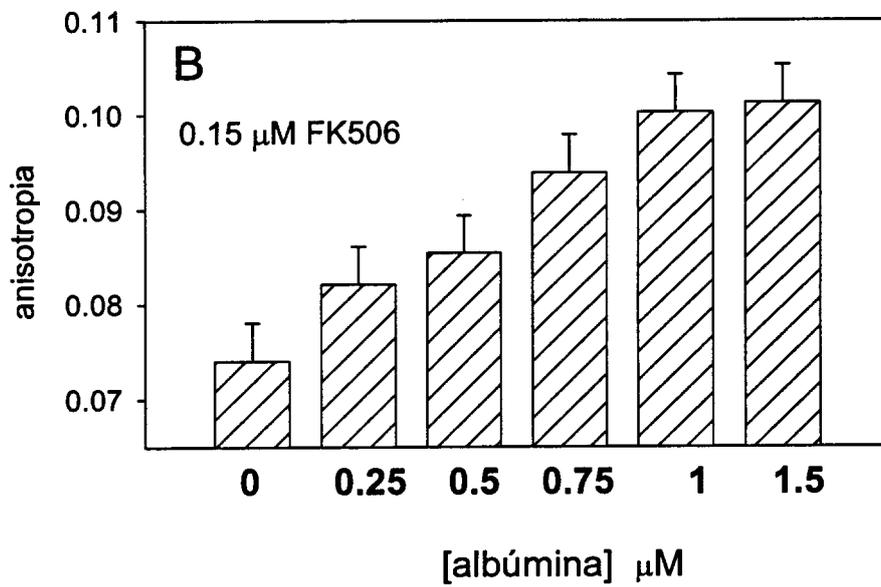
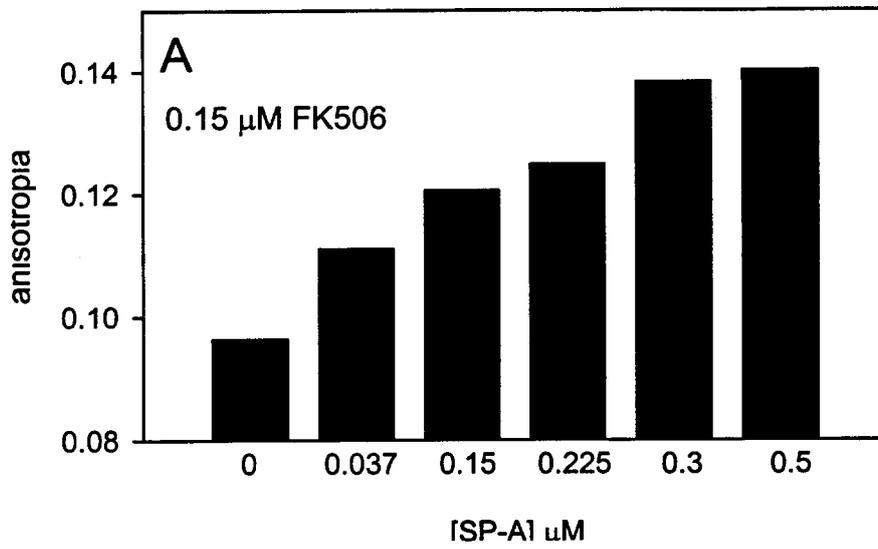


FIGURA 7



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 249 986

② Nº de solicitud: 200401611

③ Fecha de presentación de la solicitud: 02.07.2004

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 1997031898 A1 (ARIAD GENE THERAPEUTICS, INC.) 04.09.1997, página 38, línea 27 - página 39, línea 10; página 97, línea 1 - página 101, línea 21; intermedio 4.	1-8
X	BEYSENS, A. J. et al. Determination of Tacrolimus (FK 506) in Whole Blood Using Liquid Chromatography and Fluorescence Detection. Chromatographia, Octubre 1994, Volumen 39, Números 7/8, páginas 490-496.	1,2,6-8
X	WO 1991017439 A1 (CHILDREN'S RESEARCH INSTITUTE) 14.11.1991, página 5, líneas 4-27; página 17, líneas 4-15.	1,2,6-8
A	DUBOWCHIK, G. M. et al. Fluoresceinated FKBP12 Ligands for a High-Throughput Fluorescence Polarization Assay. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2000, Volumen 10, páginas 559-562.	1-8
A	WO 1998041866 A1 (MERCK & CO., INC.) 24.09.1998, todo el documento.	1-8

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

27.02.2006

Examinador

G. Esteban García

Página

1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C07D 498/12 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

G01N 33/533 (2006.01)

C09K 11/06 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)