

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 476 601**

51 Int. Cl.:

A61K 49/00 (2006.01)

G01N 33/52 (2006.01)

G01N 33/542 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.09.2008 E 08290835 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.04.2014 EP 2033663**

54 Título: **Sustratos fluorescentes sacarídicos, su procedimiento de preparación y sus utilizaciones**

30 Prioridad:

10.09.2007 FR 0706313

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

15.07.2014

73 Titular/es:

**COMMISSARIAT À L'ÉNERGIE ATOMIQUE ET
AUX ÉNERGIES ALTERNATIVES (100.0%)
Bâtiment "Le Ponant D" 25, rue Leblanc
75015 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**DURRAT, FRANÇOIS;
TEXIER-NOGUÉS, ISABELLE y
ROBERT, VÉRONIQUE**

74 Agente/Representante:

DURÁN MOYA, Carlos

ES 2 476 601 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

Sustratos fluorescentes sacarídicos, su procedimiento de preparación y sus utilidades

5 La presente invención se refiere a sustratos enzimáticos fluorescentes de naturaleza sacarídica que presentan un brazo separador autodivisible, funcionalizado por un fluoróforo F y, como mínimo, por un inhibidor de la fluorescencia de F, haciendo referencia también a su utilización para la preparación de un reactivo de diagnóstico para la formación de imágenes funcionales *in vivo*, así como al reactivo de diagnóstico para la formación de imágenes funcionales que comprende, como mínimo, dicho sustrato enzimático.

10 La fluorescencia es una técnica muy utilizada para la detección de actividades enzimáticas *in vitro*. Es una técnica poco costosa, rápida y, en general, muy sensible. Numerosas enzimas de importancia biológica significativa tienen por sustratos derivados sacarídicos que pueden ser utilizados, en especial, para efectuar dosificaciones enzimáticas sobre muestras biológicas (sangre, orina, etc.) sobre células (fijadas o en cultivo) o, asimismo, sobre tejidos (tejidos de animales sacrificados, biopsias).

15 Son aplicaciones que parecen igualmente prometedoras las aplicaciones *in vivo*, en especial, para la formación de imágenes de fluorescencia de animales pequeños. En efecto, genes informadores que expresan diferentes enzimas tales como β -galactosidasa (β -gal), β -glucuronidasa (β -glu), cloramfenicol, acetiltransferasa, luciferasa, proteínas fluorescentes tales como "Green Fluorescent Protein" (GFP), son muy utilizadas en la actualidad en biología para estudiar la expresión de genes (transcripción y traducción de ADN en proteínas), la transfección, u otros procesos biológicos. Los genes informadores pueden servir de testigos para demostrar la introducción y la transcripción de otro gen de interés situado en la misma parte codificante del ADN. Las construcciones de ADN que contienen los genes informadores son introducidas en el animal para formar animales transgénicos. Por ejemplo, el número de ratones transgénicos ya construidos es muy importante y aumenta con rapidez. En un número muy grande de casos, el gen marcador utilizado es el gen *lacZ* que codifica para la β -gal de *E. coli*. Otro ejemplo de gen marcador igualmente utilizado es el gen *gusA* que codifica para la β -glu de *E. coli*. No obstante, los sustratos de las enzimas expresadas por algunos de estos genes y, en particular, por los genes *lacZ* y *gusA* son derivados sacarídicos. Es, por lo tanto, muy importante poder disponer de sustratos sacarídicos para poder detectar la actividad de estas enzimas.

Numerosos sustratos de naturaleza sacarídica existen ya para detectar actividades enzimáticas, tales como, por ejemplo, las actividades enzimáticas de β -gal y β -glu. Estos sustratos enzimáticos pueden ser especialmente:

- 35 - sustratos para la formación de imágenes de tipo nuclear,
- sustratos quimioluminiscentes tales como los sustratos comercializados con las denominaciones comerciales Lumi-Gal © 530 por la sociedad Lumigen Inc. (USA) y Galacton-Star © por la sociedad Applied-Biosystems (USA);
- 40 - sustratos para la detección dielectroforética,
- sustratos para IRM,
- sustratos que forman precipitados,
- sustratos para dosificaciones espectrofotométricas, entre ellos el sustrato X-gal (5-bromo-4-cloro-3-idolil-beta-D-galactopiranos) vendido, por ejemplo, con la denominación comercial *Blue Tech* © por la sociedad Mirador DNA Design Inc; y
- 45 - sustratos fluorescentes.

De modo ideal, estos sustratos deben tener las propiedades siguientes:

- 50 - una cinética de reacción enzimática rápida,
- una débil constante de Michaelis,
- una diferencia grande de las propiedades de interés del sustrato y las de su producto o productos (propiedades de interés: absorción para un sustrato cromogénico, fluorescencia para un sustrato fluorogénico, etc...).

55 El interés de los sustratos fluorescentes, con respecto a otros sustratos que se han descrito anteriormente, es su sensibilidad de detección y el reducido coste de instrumentación necesario para utilizarlos. Permiten, de igual manera que el IRM y, en ciertas condiciones, realizar una detección enzimática *in vivo*.

60 De manera general, los sustratos enzimáticos fluorescentes funcionan según el principio siguiente: un sustrato no fluorescente en la gama de longitud de onda de detección facilita un producto fluorescente en esta misma gama de longitud de onda cuando es puesto en presencia de una enzima de la que se desea detectar la actividad, y que es específica del sustrato utilizado. Por lo tanto, es necesario encontrar fluoróforos cuya fluorescencia es inhibida inicialmente cuando son injertados en el sustrato, y que sean capaces de liberarse después de reacción con la enzima de la que se desea detectar la actividad. La elección de los fluoróforos disponibles comercialmente se encuentra, por lo tanto, limitada por esta condición de inhibición inicial de la fluorescencia cuando el fluoróforo está fijado sobre el sustrato enzimático.

In vivo, el desarrollo reciente de métodos ópticos abre nuevos horizontes para la formación funcional de imágenes. Actualmente, es posible seguir, en tiempo real y de forma no invasiva la expresión de los genes en animales, en particular, ratones, después de anestesia. La formación de imágenes ópticas presenta un cierto número de ventajas con respecto a otras técnicas de formación de imágenes funcionales, tales como formación de imágenes por resonancia magnética (IRM), imágenes por tomografía de emisión de positrones (TEP) y formación de imágenes por emisión monofotónica (SPECT):

- evita la manipulación de moléculas radiactivas, evitando de esta manera las limitaciones y riesgos relacionados con las mismas (radio-protección, gestión de desperdicios, fuente de sincrotrón para los marcadores TEP);
- no requiere una gran inversión en instrumentación;
- presenta una buena sensibilidad con respecto a IRM en términos de cantidad de marcador inyectado.

La formación de imágenes ópticas utiliza sustratos enzimáticos fluorescentes.

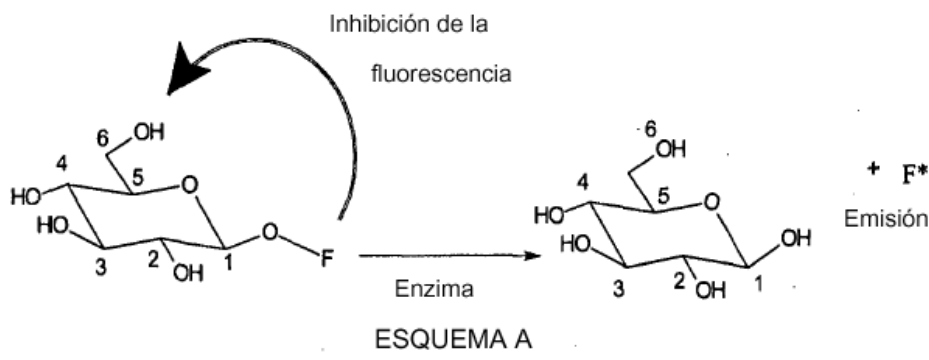
Cuando se desea detectar la presencia de una actividad enzimática *in vivo*, por ejemplo, en un animal de laboratorio de pequeñas dimensiones, tales como ratones, pocas moléculas fluorescentes se encuentran a disposición para esta aplicación. En efecto, para que la luz de excitación y la luz emitida por el fluoróforo puedan atravesar los tejidos, es necesario utilizar fluoróforos que absorban y emitan en los infrarrojos próximos, es decir, en una longitud de onda comprendida entre 640 y 900 nm. No obstante, se encuentran muy pocas moléculas fluorescentes en este dominio de longitudes de onda actualmente disponibles comercialmente (limitación esencialmente a cianinas). La doble limitación, es decir, inhibición inicial de la fluorescencia cuando el fluoróforo está fijado sobre el sustrato, y utilización de un fluoróforo que absorbe y emite en los infrarrojos próximos se encuentra, sin duda, en el origen de la ausencia de sustrato enzimático fluorescente de naturaleza sacarídica en este dominio de longitudes de onda.

En efecto, la mayor parte de los sustratos enzimáticos fluorescentes de naturaleza sacarídica actualmente disponibles en el mercado no está construida a partir de agrupaciones de fluoróforos absorbentes y ni emiten en los infrarrojos próximos. Por ejemplo, resulta posible conseguir:

- sustratos a base de fluoresceína para la detección de la actividad β -gal, entre los que se pueden mencionar, por ejemplo, el FDG (fluorescein-di- β -D-galactopiranososa) (excitación 490 nm / emisión 514 nm) o uno de sus derivados;
- sustratos a base de cumarinas o de umbeliferonas para la detección de actividades de β -gal, β -glu o fosfatasa, tales como los sustratos MUG (4-metilumbeliferona β -galactopiranososa), DiFMUG (6,8-difluoro-4-metilumbeliferil β -D-galactopiranososa), MUP (4-metilumbeliferona fosfato), DiFMUP (6,8-difluoro-4-metilumbeliferil fosfato) y derivados (excitación 350-380 nm / emisión 450-470 nm); o incluso
- sustratos a base de resorufina y derivados, en especial para la detección de lipasa (excitación 570 nm / emisión 585).

El documento US 2007/09980 describe dichos sustratos enzimáticos fluorescentes sin comprender grupos fluoróforos que absorban y emitan en los infrarrojos próximos.

La mayor parte de los sustratos fluorescentes comercializados actualmente, funcionan según el principio representado en el siguiente esquema A:



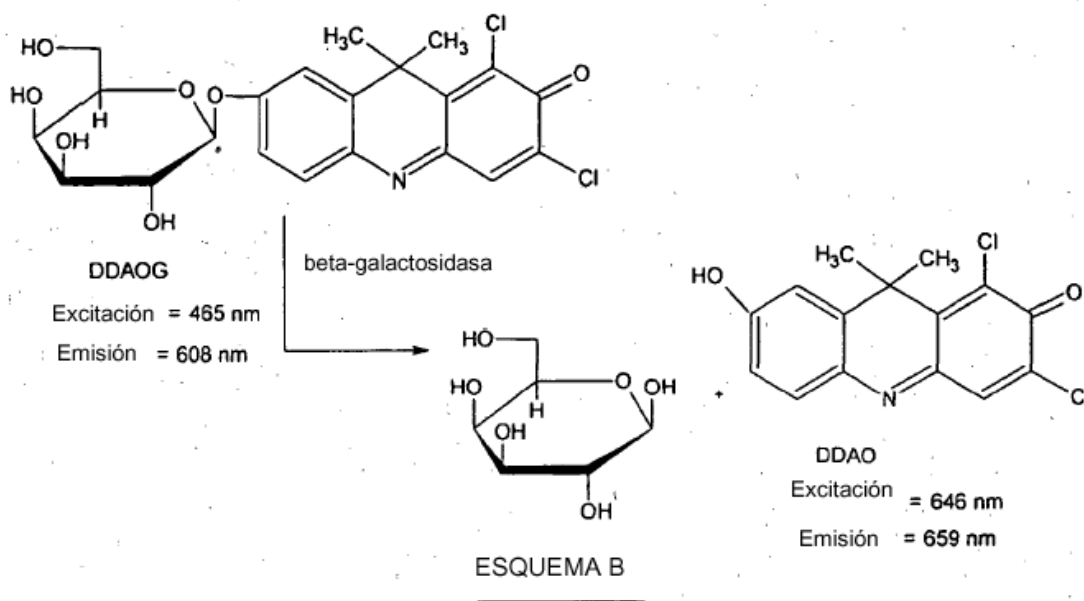
En este esquema, el fluoróforo F está insertado en la posición anomérica 1 (enlace anomérico de configuración β) sobre un monosacárido, la β -glucopiranososa, para formar el sustrato enzimático. Este sustrato debe ser débilmente fluorescente antes de la reacción con la enzima. Los grupos fluoróforos deben ser escogidos, por lo tanto, de manera tal que su fluorescencia puede ser inhibida inicialmente por el monosacárido. La reacción enzimática induce

un fraccionamiento del enlace anomérico y libera el grupo fluoróforo. Cuando el grupo fluoróforo está alejado del monosacárido, su fluorescencia ya no es inhibida y, entonces, puede emitir una señal que es detectada con ayuda de un espectrofluorímetro. La señal emitida refleja la actividad enzimática y, dentro de un cierto dominio de concentraciones, es proporcional a la concentración de la enzima.

5 Los sustratos que funcionan según el principio indicado en el esquema A presentan, no obstante, una serie de inconvenientes:

- 10 - la selección del grupo fluoróforo está limitada por el hecho de que su fluorescencia debe poder ser inhibida por su injerto en el azúcar; todos los grupos fluoróforos no tienen esta propiedad, en particular, en el dominio de los infrarrojos próximos cuando se desea poder hacer una detección *in vivo* (ver más adelante). De este modo, los sustratos fluorogénicos comerciales presentan en todos los casos fluoróforos de iguales familias: cumarinas, umbeliferonas, fluoresceínas, resorufinas. En especial, en el dominio de los infrarrojos próximos, esta limitación es todavía más engorrosa por el hecho del número ya reducido de moléculas ya existentes en este dominio de longitudes de onda.
- 15 - si la inhibición de la fluorescencia por el azúcar no es completa, la sensibilidad de detección del sistema es mediocre. Para solucionar este problema, algunos fabricantes proponen sustratos en los que el grupo fluoróforo está conectado a dos unidades sacarídicas para la posición anomérica 1. Un ejemplo de este tipo de sustrato es el FDG. Multiplicando por 2 el número de unidades sacarídicas conectadas a un grupo fluoróforo se aumenta de manera efectiva la inhibición inicial de la fluorescencia. No obstante, la liberación del grupo fluoróforo y, por lo tanto, de la fluorescencia, requiere entonces igualmente dos cortes enzimáticos en lugar de uno solo y, por lo tanto, la sensibilidad de la detección mejora solamente poco en dicho sistema.

25 El único sustrato enzimático comercialmente disponible que absorbe y emite en el dominio de infrarrojos próximos, es el sustrato DDAOG, que es un conjugado de β -galactosida (G) y de 7-hidroxi-9H-(1,3-dicloro-9,9-dimetilacridin-2-ona) (DDAO) utilizado para la detección de la actividad β -gal y comercializado por la sociedad Molecular Probes (USA). Este sustrato absorbe en 465 nm y emite en 660 nm. Su forma de funcionamiento, tal como describe Tung C.-H. y otros, Cancer Research, 2004, 64, 1579-1583, está representado por el siguiente esquema B:



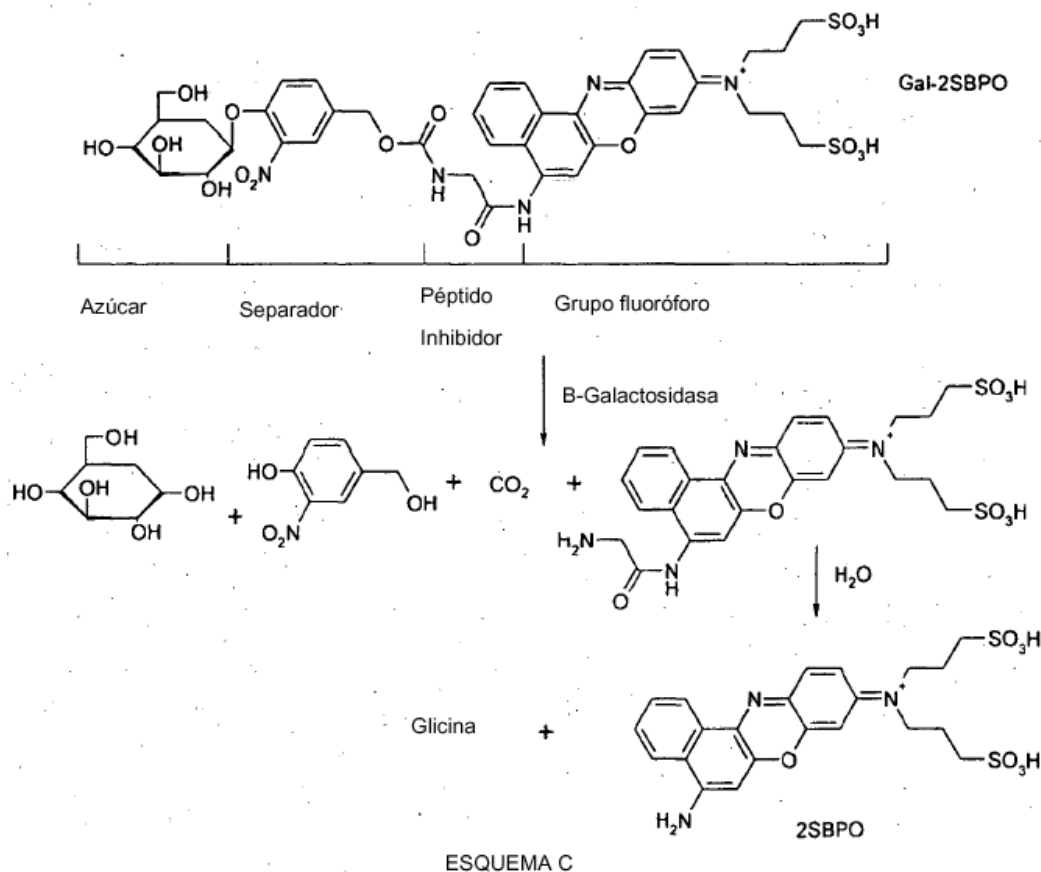
30 No obstante, si bien absorbe y emite en el dominio de los infrarrojos próximos, este sustrato específico presenta también un cierto número de inconvenientes:

- 35 - su fluorescencia, cuando el grupo fluoróforo está conectado a la unidad sacarídica, no es inhibida totalmente, lo que facilita un ruido de fondo inicialmente no despreciable y disminuye la sensibilidad de detección. De este modo, se puede comprobar en la experiencia *in vivo* indicada en el artículo de Tung C.-H. y otros (antes citado) que la dosis de DDAOG inyectada (0,5 mg) y el tiempo de exposición necesario (2 minutos) son muy importantes con respecto a las cantidades y tiempo de exposición clásicos para este tipo de aplicaciones (en general, 10-50 μ g de sustrato inyectado para un tiempo de exposición de 20 a 100 ms);
- 40 - los espectros de absorción y de emisión de DDAO son muy estrechos y muy próximos unos de otros, lo que requiere un muy buen filtrado óptico para la detección de la señal con respecto al ruido de fondo inicial;
- los espectros de absorción y de emisión del DDAO no están bastante desplazados en el rojo para encontrarse en una ventana óptica óptima para llevar a cabo la formación de imágenes *in vivo*.

Igualmente se han propuesto, especialmente en la solicitud de patente FR 2 888 938 sustratos fluorescentes que presentan un esqueleto sacarídico que lleva en la misma unidad sacarídica un grupo fluoróforo por una parte, y un grupo inhibidor de la fluorescencia del grupo fluoróforo por otra, debiéndose entender que uno de estos dos grupos ocupa la posición anomérica de la unidad sacarídica sobre la que están fijados ambos, ocupando el otro grupo cualquier otra posición de la unidad sacarídica.

Estos sustratos fluorescentes permiten la fijación de una mayor variedad de grupos fluoróforos que absorben y emiten en los infrarrojos próximos y por lo tanto, son utilizables *in vivo*. No obstante, no facilitan una satisfacción completa, en particular por el hecho de que la afinidad de las enzimas para estos sustratos resulta muy reducida y hace el proceso muy poco eficaz.

Finalmente y muy recientemente, se ha desarrollado una sonda sacarídica llamada Gal-2SBPO que es el resultado de la conjugación del sustrato de la β -galactosidasa (la β -D-galactopiranososa: Gal) y un colorante hidrosoluble fluorescente, el perclorato de 9-di-3-disulfonil propilaminobenzo[a]fenoxazonio (2SBPO) con intermedio de un brazo separado que incluye un péptido. En este sustrato enzimático, la fluorescencia es inhibida por el péptido (glicina) incluido en el brazo separador que conecta la unidad sacarídica Gal y el grupo fluoróforo 2SBPO propiamente dicho (HO, N.-H. y otros, Chem. Bio. Chem., 2007, 8, 560-566). La actividad enzimática de la β -galactosidasa induce un fraccionamiento entre el azúcar y el brazo separador, pudiendo entonces el grupo fluoróforo mostrar fluorescencia después de una última hidrólisis que le separa de su péptido inhibidor. El modo de funcionamiento de esta sonda enzimática puede ser representado por el siguiente esquema C:



No obstante, este sistema presenta todavía una serie de limitaciones:

- la elección del fluoróforo se limita únicamente al perclorato de 9-di-3-disulfonil propilaminobenzo[a]fenoxazonio que en la actualidad parece ser el único grupo fluoróforo cuya fluorescencia puede ser inhibida por la presencia de un ácido aminado, tal como la glicina (HO, N.-H. y otros, Tetrahedron, 2006, 62, 578-585).
- La intensidad de la fluorescencia, después de la actividad enzimática, solamente aumenta por un factor 7, lo que representa una relación débil para prever la utilización de este marcador fluorescente en la formación de imágenes *in vivo* en el estado actual de las posibilidades de los instrumentos de medición.

Por lo tanto, con la finalidad de solucionar el conjunto de estos problemas, los inventores han puesto en práctica el objeto de la presente invención.

5 Los inventores se han fijado como objetivo dar a conocer un sustrato enzimático fluorescente con naturaleza sacarídica que no tiene los inconvenientes de los sustratos de la técnica anterior y que en particular, esté bien adaptado, en caso deseado, para su utilización para la detección de actividades enzimáticas *in vivo*.

10 La presente invención tiene, por lo tanto, por objetivo un sustrato enzimático fluorescente, tal como se ha definido en las reivindicaciones adjuntas.

De manera más precisa, el sustrato enzimático de la invención se caracteriza por el hecho de que responde a la estructura (I) siguiente:

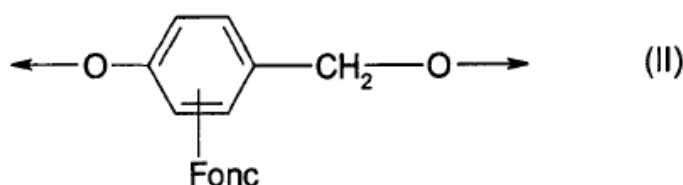


15

en la que:

- 20 - S es un esqueleto de naturaleza sacarídica constituida por, como mínimo, una unidad sacarídica y escogida entre los monosacáridos, los oligosacáridos que tienen de 2 a 9 unidades sacarídicas y los polisacáridos que tienen, como mínimo, 10 unidades sacarídicas;
- F es un grupo fluoróforo soportado por el brazo separador B;
- I es un grupo inhibidor de la fluorescencia de F; siendo dicho grupo I un sustituyente lateral de, como mínimo, una subunidad del brazo separador B;
- 25 - debiéndose entender que ningún enlace covalente conecta directamente el grupo fluoróforo al grupo inhibidor;
- n es un número entero igual a 1 ó 2;
- B representa un brazo separador autodivisible constituido por una o varias subunidades, estando fijado dicho brazo B en posición anomérica de dicha unidad sacarídica S, encontrándose el enlace anomérico indiferentemente en posición α o en posición β , correspondiendo dicho brazo B a un lugar reconocido y fraccionado por una enzima y que comprende una subunidad B1 escogida entre:
- 30

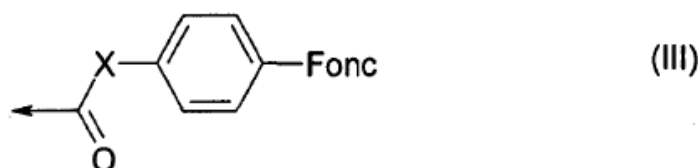
i) los grupos aromáticos monocíclicos de la siguiente fórmula (II):



35

en la que:

- 40 - Fonc es una función química reactiva con respecto a una función química complementaria de un grupo fluoróforo F o respectivamente de un grupo inhibidor de la fluorescencia de un grupo fluoróforo F;
- la flecha que sale del átomo de oxígeno directamente soportado por el ciclo fenilo representa el punto de unión de dicha subunidad B1 con una unidad sacarídica del brazo separador con intermedio de un enlace covalente por el átomo de carbono situado en posición anomérica 1 de dicha unidad sacarídica,
- la flecha que sale del átomo de oxígeno unido al radical $-\text{CH}_2-$ representa el punto de acoplamiento de dicha subunidad B1 con una subunidad B2 escogida entre los grupos aromáticos de la siguiente fórmula (III):
- 45

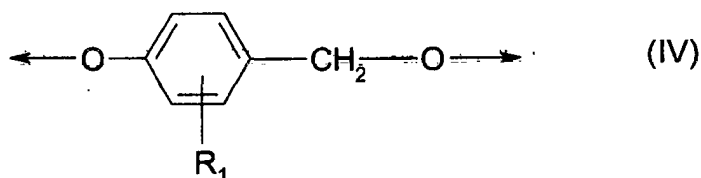


en la que:

- 50 - Fonc es una función química reactiva con respecto a una función química complementaria de un grupo inhibidor de la fluorescencia del grupo F o bien de un grupo fluoróforo F;

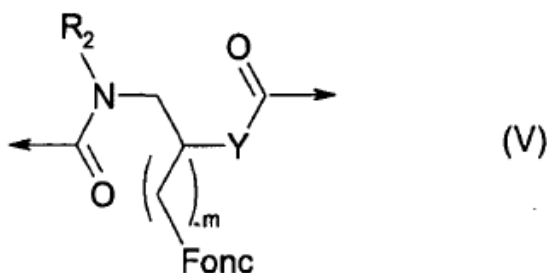
- la flecha representa el punto de acoplamiento de dicha subunidad B2 con la subunidad B1 con intermedio de un enlace covalente con el átomo de oxígeno de la subunidad B1;
- X es O, NH ó S; y

5 ii) los grupos aromáticos monocíclicos de la siguiente fórmula (IV):



en la que:

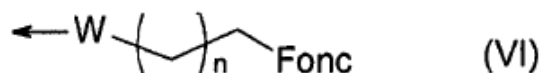
- 10
- R_1 se escoge entre los grupos nitro, sulfato, amina y amina protegida por un grupo protector,
 - la flecha que sale del átomo de oxígeno directamente soportado por el átomo de carbono del ciclo fenilo, representa el punto de acoplamiento de dicha subunidad B1 con una unidad sacarídica del brazo separador con intermedio del enlace covalente con el átomo de carbono situado en posición anomérica 1 de dicha unidad sacarídica,
- 15
- la flecha que sale del átomo de oxígeno unida al radical $-CH_2-$ representa el punto de acoplamiento de dicha subunidad B1 con una subunidad B2 escogida entre los grupos de fórmula siguiente (V):



20 en la que:

- R_2 es un átomo de hidrógeno o un radical alquilo en C_1-C_4 ,
 - Fonc es una función química reactiva con respecto a una función química complementaria de un grupo fluoróforo F o bien de un grupo inhibidor de la fluorescencia de un grupo fluoróforo F;
- 25
- m es un número entero de 1 a 10;
 - Y es O, NH ó S;
 - las flechas representan el punto de acoplamiento de dicha subunidad B2, por una parte con la subunidad B1, y por otra parte, con un átomo de nitrógeno o de oxígeno soportado por una subunidad B3 de fórmula siguiente (VI):

30



en la que:

- 35
- W representa O, NH ó S;
 - la flecha representa el punto de acoplamiento del átomo de nitrógeno, de azufre o de oxígeno designado por W, con intermedio de un enlace covalente con un átomo de carbono de la subunidad B2;
 - n es un número entero de 1 a 10;
- 40
- Fonc es una función química reactiva con respecto a la función química complementaria de un grupo fluoróforo F, o bien de un grupo inhibidor de la fluorescencia del grupo fluoróforo F. En estos sustratos enzimáticos con la fórmula anterior (I), el brazo separador B autodivisible que conecta el esqueleto sacarídico al grupo fluoróforo F presenta la particularidad de dislocarse espontáneamente en una o varias unidades distintas según la actividad enzimática, es decir, después de que la enzima haya provocado el

corte del enlace que conecta dicho brazo separador al esqueleto sacarídico. Esta dislocación provoca la rotura del enlace que conecta, por una parte, el brazo separador al grupo fluoróforo, y por otra parte, del enlace que conecta el brazo separador al grupo inhibidor de la fluorescencia, liberando de este modo la fluorescencia del grupo F.

5 Los sustratos enzimáticos, de acuerdo con la invención y que se han descrito anteriormente, presentan una inhibición inicial muy satisfactoria de la fluorescencia teniendo en cuenta la presencia de uno o dos grupos I a título de sustituyente lateral del brazo separador. Esta configuración permite especialmente, con respecto a los sustratos conocidos en el estado de la técnica:

- 10
- aumentar la selección de grupos fluoróforos utilizables: la selección de un grupo de este tipo no está limitada a los grupos en los que se debe inhibir inicialmente la fluorescencia por el esqueleto S o por un péptido que forma parte integrante de un brazo separador. La selección de los grupos fluoróforos disponibles es, por lo tanto, mucho mayor, y se puede extender en especial a los grupos fluoróforos que
 - 15 emiten en los infrarrojos próximos;
 - aumentar adicionalmente la sensibilidad de detección de la actividad enzimática; en efecto, la fluorescencia del grupo fluoróforo es inhibida por un objeto cuyo papel es específico, y que es de este modo mucho más eficaz que cuando la inhibición se debe realizar por el esqueleto sacarídico o un péptido;
 - permitir una mejor afinidad para la enzima diana: en efecto, el hecho de injertar el fluoróforo y el inhibidor de fluorescencia sobre la parte aglicona divisible, permite una mejor afinidad para la enzima puesto que todos
 - 20 los lugares de reconocimiento se encuentran libres,
 - aumentar la solubilidad del sustrato por la utilización de grupos fluoróforos mucho más solubles que los grupos fluoróforos actualmente disponibles en el comercio y que son generalmente hidrófobos,
 - facilitar las condiciones de utilización del sustrato enzimático por la utilización de fluoróforos, por ejemplo,
 - 25 insensibles al pH o al potencial redox y, por lo tanto, más fácilmente utilizables *in vivo*. En efecto, ciertos fluoróforos utilizados actualmente, tales como la fluoresceína, tienen propiedades de emisión que dependen en un grado elevado del pH, y difícilmente compatibles con una utilización *in vivo*, en la que las condiciones intracelulares no pueden ser modificadas. Utilizando otros fluoróforos, cuyas propiedades de emisión son poco dependientes del pH, del potencial redox o de la concentración de iones, se facilitan las condiciones
 - 30 de captación de la señal y la sensibilidad *in vivo*.

Las unidades sacarídicas del esqueleto S de los sustratos de estructura (I), según la invención, pueden ser escogidas especialmente entre la galactosa, manosa, idosa, talosa, ramnosa, glucosa, ribosa, fucosa, y sus derivados aminados o ácidos entre los cuales se puede citar especialmente la galactosamina, glucosamina,

35 lactosamina, ácido glucurónico, ácido idurónico, y ácido siálico. Se escogen preferentemente entre glucosamina, galactosa y ácido glucurónico.

Cuando el esqueleto S es un monosacárido, estas unidades sacarídicas son utilizadas unitariamente. Por el contrario, están conectadas entre sí por enlaces glicosídicos cuando el esqueleto S es un oligosacárido o un polisacárido.

40

Según la invención, cuando el esqueleto S es un oligosacárido, se escoge preferentemente entre los oligosacáridos que presentan de 4 a 9 unidades sacarídicas.

45 Las posiciones libres de las unidades sacarídicas del esqueleto S, que no comportan el brazo separador y que no están involucradas en un enlace glicosídico, pueden ser indiferentemente no sustituidas (-HO ó -OH) o bien pueden ser sustituidas, por ejemplo, por una función amina o por un grupo resultante de la interacción de una función hidroxilo o de una función amina con un grupo protector, tal como los clásicamente utilizados en química orgánica y que se describen, por ejemplo, en la obra T. W. Greene y otros, "Protective Groups in Organic Synthesis" tercera

50 edición, Wiley Science (1999). Entre estos grupos protectores, se pueden citar especialmente los grupos acetilo, bencilo, arilo, y en particular, los grupos arilo sustituidos por un radical escogido entre las cadenas alquilo, que tienen de 1 a 40 átomos de carbono; 2,2,2-tricloroetiloxicarbonilo (Troc); benciloxicarbonilo (BzC); tricloroacetamidato (TCA); tertbutiloxicarbonilo (BOC), fluoranilmetoxicarbonilo (Fmoc), así como los grupos sililados tales como, por ejemplo, los grupos t-butildimetilsililo (tBDMS) y trimetilsililo (TMS), o también cadenas de polietileno glicol (PEG). De manera ventajosa, la presencia de un grupo acetilo puede permitir una mejor penetración de los sustratos en las células y la presencia de un PEG permite por otra parte ajustar las propiedades farmacocinéticas de los sustratos según la invención.

55

La o las subunidades que pueden constituir el brazo separador de los sustratos enzimáticos de fórmula (I) es una cadena de hidrocarburo lineal o ramificado, saturada o no saturada, sustituida o no sustituida, interrumpida y/o terminada por uno o varios heteroátomos escogidos entre N, O y S, y/o por uno o varios grupos escogidos entre los radicales alquilo en C₁-C₄, alcoxi en C₁-C₄, arilo, o por una o varias funciones escogidas entre las funciones éter, éster, amida, carbonilo, carbamato, urea, tiourea y bisulfuro.

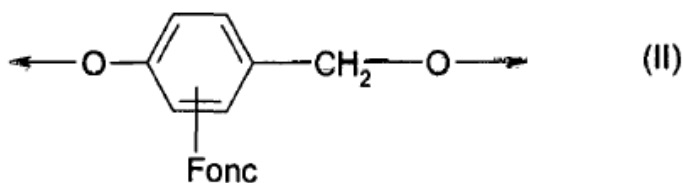
60

De hecho, se excluyen de esta definición todos los brazos separadores que comportarían (o que estarían constituidos por) una cadena fosfato, una unidad sacarídica, o una base nitrogenada.

65

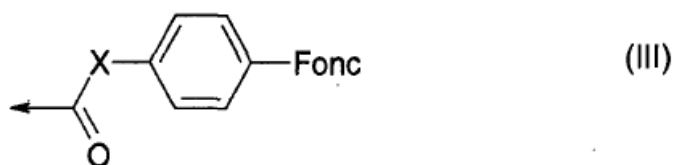
5 El brazo separador puede estar constituido también, como mínimo, por dos subunidades bifuncionales B1 y B2 tales que uno de los extremos de la subunidad B1 o bien B2 es una función reactiva con respecto a grupos clásicos de activación de la posición anomérica de la unidad sacarídica sobre la que deben estar fijadas (ejemplos notables de grupos de activación de la posición anomérica: -Br, -SPh con Ph = fenilo; ejemplo notable de función reactiva con respecto a estos grupos de activación: en particular -OH), siendo el otro extremo de la subunidad B1 una función (por ejemplo, amina o tiol) reactiva con respecto a una función complementaria soportada por uno de los extremos de la subunidad B2, cuya subunidad B2 comporta en su otro extremo, una función (por ejemplo, amina o tiol) reactiva con respecto de una función de injerto soportada por el grupo fluoróforo F (tal como, por ejemplo, una función N-hidroxisuccinimidilo, isotiocianato, éster de sulfotetrafluorofenilo (STP-éster), maleimida o haloacetamida).

Sin embargo, según una primera forma de realización de la invención, el brazo separador comprende una subunidad B1 escogida entre los grupos aromáticos monocíclicos de la siguiente fórmula (II):



15 en la que:

- 20 - Fonc es una función química reactiva con respecto a una función química complementaria de un grupo fluoróforo F o bien de un grupo inhibidor de la fluorescencia de un grupo fluoróforo F,
- la flecha que sale del átomo de oxígeno directamente soportada por el ciclo fenilo, representa el punto de acoplamiento de dicha subunidad B1 con una unidad sacarídica del brazo separador con intermedio del enlace covalente con el átomo de carbono situado en posición anomérica 1 de dicha unidad sacarídica,
- 25 - la flecha que sale del átomo de oxígeno conectado al radical -CH₂- representa el punto de acoplamiento de dicha subunidad B1 con un grupo inhibidor de la fluorescencia del grupo F o con una subunidad B2 escogida entre los grupos aromáticos de fórmula siguiente (III):

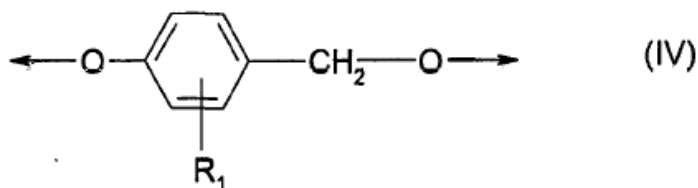


30 en la que:

- Fonc es una función química reactiva con respecto a una función química complementaria de un grupo inhibidor de la fluorescencia de un grupo F o bien de un grupo fluoróforo F;
- la flecha representa el punto de acoplamiento de dicha subunidad B2 con la subunidad B1 con intermedio de un enlace covalente con el átomo de oxígeno de la subunidad B1;
- 35 - X es O, NH ó S.

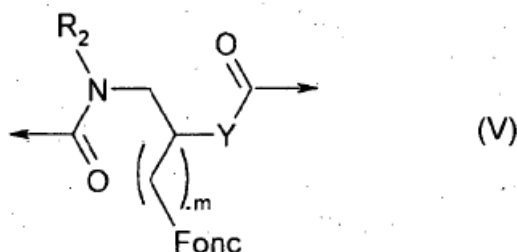
En la subunidad B1 de fórmula (II) anteriormente indicada, el grupo Fonc se encuentra preferentemente en posición orto con respecto al átomo de carbono cíclico portador del átomo de oxígeno.

40 Según una segunda forma de realización de la invención, el brazo separador comprende una subunidad B1 escogida entre los grupos aromáticos monocíclicos de fórmula siguiente (IV):



en la que:

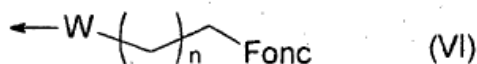
- 5
- R_1 se escoge entre los grupos nitro, sulfato, amina, y amina protegida por un grupo protector,
 - la flecha que sale del átomo de oxígeno directamente soportado por el átomo de carbono del ciclo fenilo representa el punto de acoplamiento de dicha subunidad B1 con una unidad sacarídica del brazo separador con intermedio de un enlace covalente con el átomo de carbono situado en posición anomérica 1 de dicha unidad sacarídica,
- 10
- la flecha que sale del átomo de oxígeno conectado al radical $-CH_2-$ representa el punto de acoplamiento de dicha subunidad B1 con la subunidad B2 escogida entre los grupos de fórmula siguiente (V):



15 en la que:

- R_2 es un átomo de hidrógeno o un radical alquilo C_1-C_4 ,
 - Fonc es una función química reactiva con respecto a una función química complementaria de un grupo fluoróforo F o bien de un grupo inhibidor de la fluorescencia de un grupo fluoróforo F;
- 20
- m es un número entero de 1 a 10;
 - Y es O, NH ó S;
 - las flechas representan el punto de acoplamiento de dicha subunidad B2, por una parte, con la subunidad B1 y por otra parte, con un átomo de nitrógeno o de oxígeno soportado por una subunidad B3 de fórmula siguiente (VI):

25



en la que:

- 30
- W representa O, NH ó S;
 - la flecha representa el punto de acoplamiento del átomo de nitrógeno, de azufre o de oxígeno designado por una W, con intermedio de un enlace covalente con un átomo de carbono de la subunidad B2,
 - n es un número entero de 1 a 10;
 - Fonc es una función química reactiva con respecto a una función química complementaria de un grupo fluoróforo F o bien de un grupo inhibidor de la fluorescencia de un grupo fluoróforo F.
- 35

De este modo, en función de la naturaleza de los átomos designados por X, Y y Z las diferentes subunidades de fórmulas (II) a (VI) pueden constituir el brazo separador de los sustratos enzimáticos de fórmula (I) de acuerdo con la presente invención, comprendiendo el brazo separador una o varias funciones amida, carbonato, carbamato, urea o tiourea, que son apropiados para hidrolizarse espontáneamente después de fraccionamiento enzimático del enlace con la unidad sacarídica. De manera más precisa:

40

- la función que conecta entre sí las subunidades B1 de fórmula (II) y B2 de fórmula (III) puede ser una función carbonato ($X = O$) o una función carbamato ($X = NH$);

- la función que conecta, entre sí, las subunidades B1 de fórmula (IV) y B2 de fórmula (V) es una función carbamato;
- la función que conecta, entre sí, las subunidades B2 de fórmula (V) y B3 de fórmula (VI) puede ser una función carbonato; (Y = W = O), carbamato (Y = O con W = NH ó Y = NH con W = O), urea (Y = W = NH), o también tiourea (Y=S con W=NH ó Y=NH con W=S).

5 En las subunidades de fórmulas (II), (III), (V) y (VI), la función Fonc es preferentemente escogida entre las funciones amina primaria y tiol.

10 Entre estas funciones, la función amina primaria es particularmente preferente.

Entre las subunidades de fórmula (II) anteriormente indicadas, son preferibles aquellas en las que Fonc está situada en posición orto del átomo de carbono portador del átomo de oxígeno.

15 Entre las subunidades de fórmula (III) anteriormente indicadas, son preferibles aquellas en las que:

- X es un átomo de oxígeno y Fonc es una función amina primaria o tiol,
- X es un átomo de nitrógeno y Fonc es una función amina primaria o tiol

20 Entre las subunidades de fórmula (IV) anteriormente indicadas, son preferibles aquellas en las que R₁ está situado en posición orto del átomo de carbono portador del átomo de oxígeno.

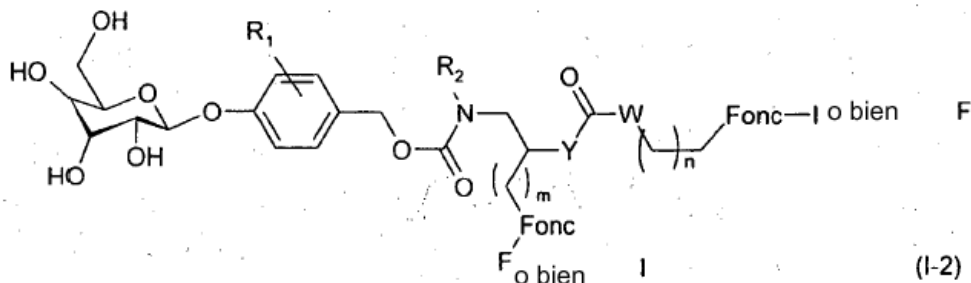
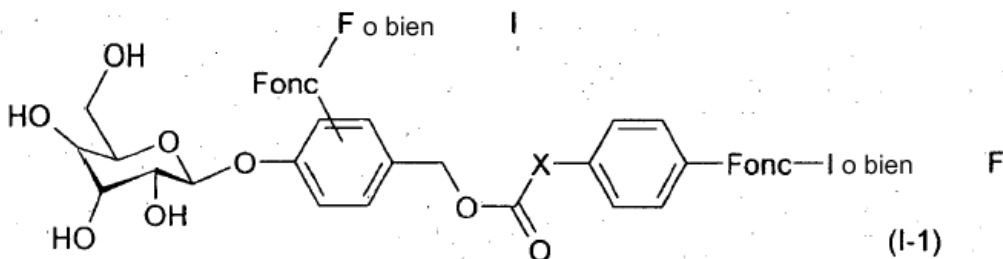
Entre las subunidades de fórmula (V) indicadas, son preferibles aquellas en las que:

- R₂ es un radical metilo, m=1, Fonc es una función amina primaria e Y es un átomo de oxígeno,
- R₂ es un radical metilo, m=1, Fonc es una función amina primaria e Y=NH.

25 Entre las subunidades de fórmula (VI) indicadas, son preferibles aquellas en las que:

- W es un átomo de oxígeno, n=1, Fonc es una función amina primaria e Y es un átomo de oxígeno,
- W representa NH, n=1, Fonc es una función amina primaria e Y es un átomo de oxígeno,
- W es un átomo de azufre, n=1, Fonc es una función amina primaria e Y es un átomo de oxígeno.

30 Según una forma de realización particularmente preferente de la invención, los sustratos enzimáticos de fórmula (I), de acuerdo con la invención, se escogen entre los compuestos de fórmulas (I-1) y (I-2) siguientes:



35 en las que F, I, Fonc, X, Y, W, R₁, R₂, m y n tienen los mismos significados que se han indicado anteriormente.

40 Entre los grupos fluoróforos F se pueden citar especialmente la fluoresceína (fluoresceinato de sodio) y sus derivados, tales como el isotiocianato de fluoresceína (FITC) y la 6-carboxifluoresceína (6-Fam); los colorantes fluorescentes que absorben y emiten en los infrarrojos próximos ("Near InfraRed": NIR) tales como los comercializados con las denominaciones Fluorescent Red NIR 700 (longitud de onda de excitación: 672 nm; longitud de emisión: 735 nm) y Fluorescent Red NIR 730 (longitud de onda de excitación: 680 nm; longitud de emisión: 755 nm) por la sociedad Sigma-Aldrich; las cianinas fluorescentes tales como Cy5 (n=2) y el Cy7 (n=3) (Amersham); la 7-hidroxi-9H-(1,3-dicloro-9,9-dimetilacridin-2-ona) (DDAO); la rodamina y sus derivados, tales como el isotiocianato

de tetrametil rodamina (TRITC); los colorantes fluorescentes con aminas reactivas, tales como las cumarinas, entre las que se puede citar en especial el éster succinimidil del ácido 6-((7-amino-4-metilcumarin-3-acetil)amino) hexanoico (AMCA); los difluoruros de boro de dipirrometeno comercializados con los nombres comerciales BODIPY®, tales como BODIPY® FR-Br₂, BODIPY® R6G, BODIPY®TMR, BODIPY® TR y BODIPY® 530/550 (longitud de onda de excitación/longitud de onda de emisión, en nm), 558/568, 564/570, 576/589, 581/591, 630/650 y 650/665 comercializados por la sociedad Bio-Rad Inc. (EEUU), IRDye® 800 comercializados por la sociedad LICOR y Alexa Fluor® 750 comercializado por la sociedad Molecular Probes; las porfirinas; las cianinas; las oxacinas; los fluoróforos derivados del pireno, tales como por ejemplo, los colorantes Cascade Blue (comercializados, por ejemplo, por las sociedades Trilink Bio Technologies (EEUU) o Invitrogen; los derivados diazoicos, tales como el DABCYL®; los derivados de dansilo, tales como EDANS® (Eurogentec, BE); la eosina; la eritrosina y los derivados de sulfuro de amina, tales como el cloruro/sulfonilo de sulfurohodamina 101 igualmente conocido con el nombre de TexasRed y las nanopartículas fluorescentes, es decir, que tienen propiedades de emisión tales como los "quantum dots", las nanopartículas de oro, las nanopartículas a base de polímeros y las nanopartículas de óxidos.

Según una forma de realización particularmente preferente de la invención, el grupo F es escogido entre los grupos fluoróforos que absorben y emiten en los infrarrojos próximos, es decir, que emiten y absorben con una longitud de onda comprendida entre 640 y 900 nm. Entre dichos grupos, se puede citar en particular, los grupos fluoróforos siguientes: los colorantes fluorescentes comercializados con las denominaciones Fluorescent Red NIR 700 (longitud de onda de excitación (Ex.): 672 nm/longitud de emisión (Em.): 735 nm) y Fluorescent Red NIR 730 (Ex. 680 nm/Em.: 755 nm) por la sociedad Sigma-Aldrich; el Cy5 (n = 2; Ex.: 680 nm / Em.: 755 nm), el Cy5,5 (Ex.: 675 nm / Em.: 694 nm) y el Cy7 (n = 3 : Ex.: 747 nm / Em.: 775 nm) (Amersham); el 7-hidroxi-9H-(1,3-dicloro-9,9-dimetilacridin-2-ona) (DDAO) (Ex.: 646 nm / Em.: 659 nm), el IRDye® 800 (Ex.: 778/EM.: 806 nm), el Alexa Fluor® 647 (Ex.: 651 nm / Em.: 672 nm), el Alexa Fluor® 660 (Ex.: 668 nm / Em.: 698 nm), el Alexa Fluor® 680 (Ex.: 684 nm / Em.: 707 nm), y el Alexa Fluor® 700 (Ex.: 702 nm / Em.: 723 nm) y el Alexa Fluor® 750 (Ex.: 749 nm / Em.: 774 nm).

Según una forma de realización particular de la invención, el grupo fluoróforo F puede ser funcionalizado además por una o varias funciones amida o urea y/o por uno o varios grupos escogidos entre las cadenas lipófilas, los fosfolípidos y los péptidos. Funcionalizados de este modo, los grupos fluoróforos F presentan una mayor afinidad para las células de los tejidos de animales.

Según la invención, el grupo I puede ser escogido entre todos los compuestos que aceptan la fluorescencia del grupo F, es decir, que permiten la disminución o desaparición completa de la fluorescencia del grupo F cuando están los dos fijados sobre el brazo separador de los sustratos enzimáticos de fórmula (I). Este compuesto, de naturalezas diversas, puede ser especialmente un grupo cromóforo, fluorescente o no fluorescente o una nanopartícula.

Cuando el grupo I es en sí mismo un grupo fluorescente, entonces es escogido entre los grupos cuya fluorescencia inhibe la del grupo F. El grupo I puede ser idéntico al grupo F (se habla entonces de autoinhibición de la fluorescencia) y es preferentemente escogido entre la cianinas fluorescentes, tales como Cy5, Cy5,5 y Cy7, el IRDye® 800 y las Alexa Fluor® 647, 660, 680, 700 y 750. A título de grupo I, se puede utilizar igualmente un grupo fluorescente diferente del grupo F, que absorbe la fluorescencia del grupo F por transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET). En este caso, se prefiere utilizar los pares F/I siguientes: Cy5/Cy7 (o Cy7Q); Cy5/Alexa Fluor® 750; Cy7/IRDye® 800; Alexa Fluor® 750/IRDye® 800.

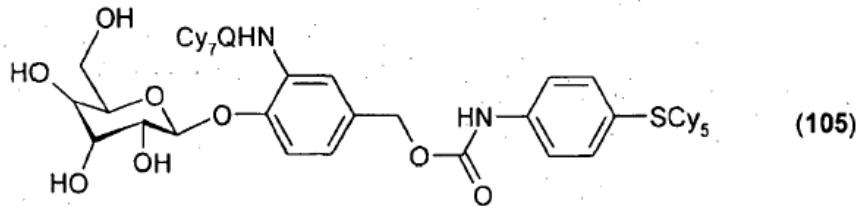
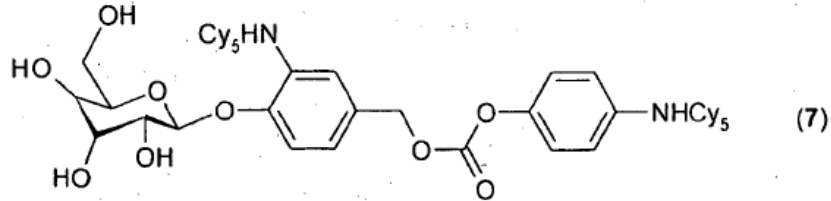
Cuando el grupo I es un grupo no fluorescente, es decir, un inhibidor de fluorescencia propiamente dicho ("Quencher"), entonces es escogido preferentemente entre los compuestos comercializados con las denominaciones comerciales DABCYL® y derivados Black Hole Quencher® (BHQ) tales como BHQ1, BHQ2 ó BHQ3 (Biosearch Technologies), Nanogold Particules® (Nanoprobes), Eclipse Dark Quencher® (Epoch Bioscience), Elle Quencher® (Oswell), Cy7Q (Amersham) y los colorantes QSY®, tales como los QSY® 7, QSY® 9 y QSY® 21 (Molecular Probes).

Entre los sustratos enzimáticos de fórmula (I) conformes a la invención, son preferibles particularmente los compuestos de fórmula (I) en los que:

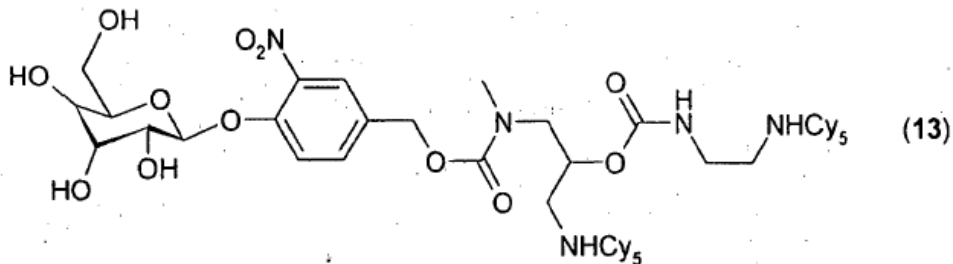
- i) el esqueleto S es una galactosamina, el brazo separador está constituido por una subunidad B1 de fórmula (II) y por una subunidad B2 de fórmula (III) y F e I son idénticos. En este caso, F e I se escogen, por ejemplo, entre los grupos Cy5, Cy5,5 y Cy7, los Alexa Fluor® 647, 660, 680, 700 et 750, e IRDye® 800, siendo soportados estos grupos, respectivamente e indiferentemente, por las subunidades B1 y B2;
- ii) el esqueleto S es una galactosamina, el brazo separador está constituido por una subunidad B1 de fórmula (IV), por una subunidad B2 de fórmula (V) y una subunidad B3 de fórmula (VI) y F e I son idénticas. En este caso, F e I son escogidos, por ejemplo, entre los grupos Cy5, Cy5,5 y Cy7, los Alexa Fluor® 647, 660, 680, 700 et 750, e IRDye® 800, los cuales son soportados, respectivamente e indiferentemente, por las subunidades B2 y B3;
- iii) el esqueleto S es una galactosamina, el brazo separador está constituido por una subunidad B1 de fórmula (IV), por una subunidad B2 de fórmula (III) y F e I son diferentes. En este caso, F e I se escogen, por ejemplo, entre los pares de grupos siguientes Cy5/Cy7 (o Cy7Q); Cy5/Alexa Fluor® 750, Cy7/IRDye® 800, Alexa

Fluor®750/IRDye® 800, los cuales son soportados, respectivamente e indiferentemente, por las subunidades B2 y B3;

5 Según una forma de realización particularmente preferente de la invención, los sustratos enzimáticos de fórmula (I-1) se escogen entre los compuestos siguientes:

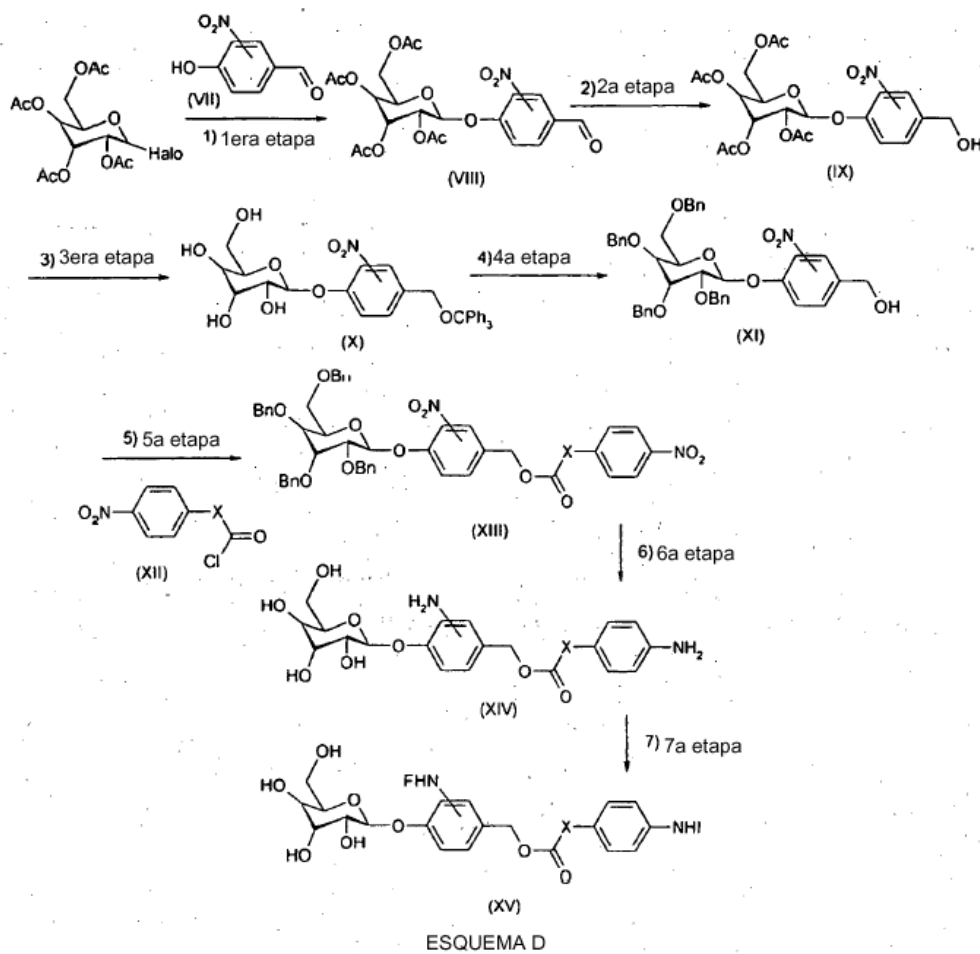


A título de sustratos enzimáticos de fórmula (I-2), se puede mencionar, en particular, el compuesto siguiente:



10 Los sustratos enzimáticos de fórmula (I), de acuerdo con la invención, pueden ser preparados fácilmente según una sucesión de etapas distintas, clásicas y conocidas por los técnicos en la materia.

15 En particular, los sustratos enzimáticos de fórmula (I), de acuerdo con la invención, en los que las subunidades B1 y B2 son escogidas, respectivamente, entre las subunidades de fórmulas (II) y (III) (compuestos de fórmula (I-1)) y en los cuales F e I representan un grupo fluoróforo idéntico, pueden ser preparados, por ejemplo, según el procedimiento (P1), tal como se ha representado en el esquema siguiente D:

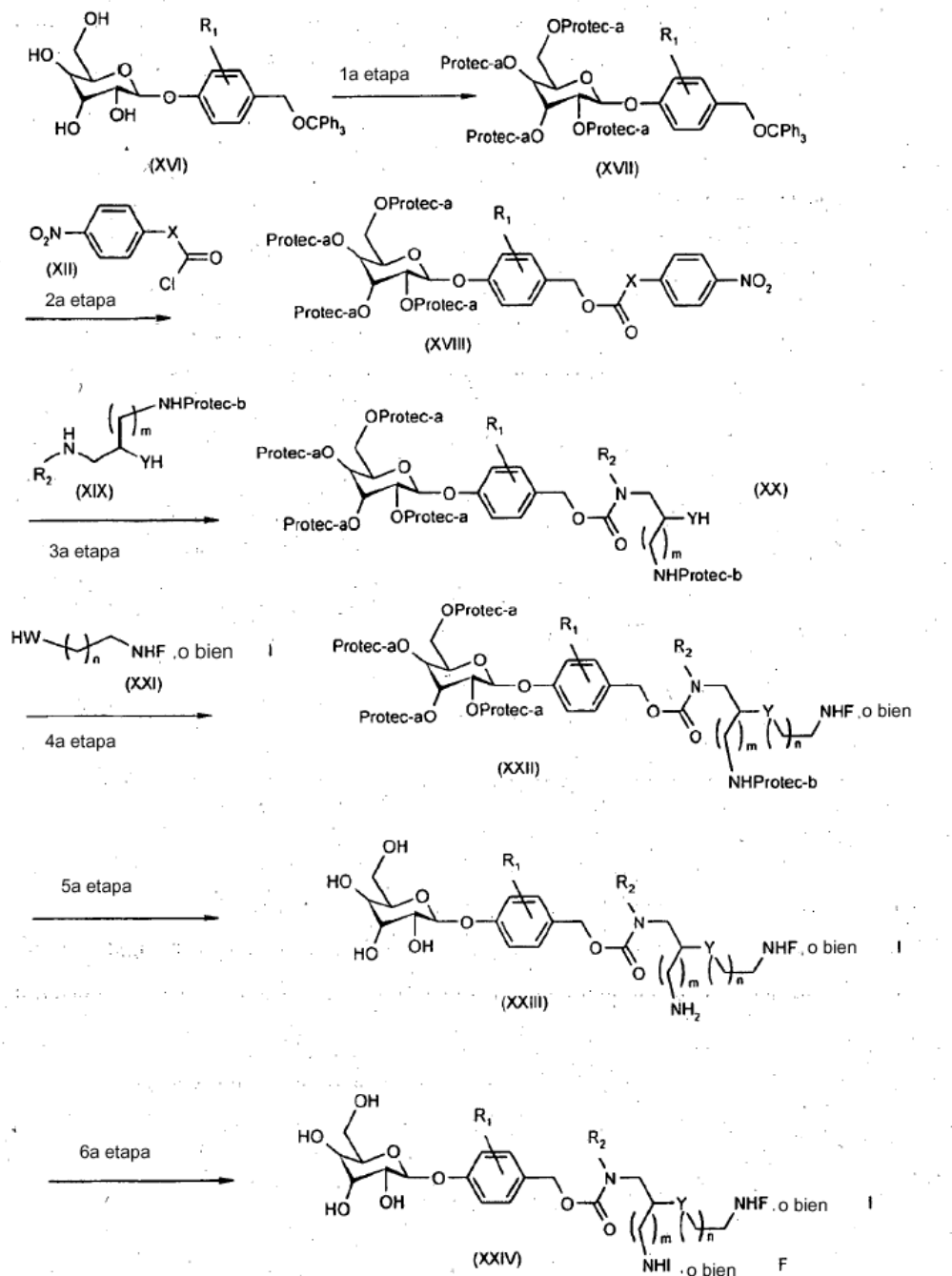


según el cual:

- 1) en una primera etapa se hace reaccionar en un disolvente orgánico, tal como por ejemplo acetonitrilo anhidro y en presencia de un agente oxidante, un esqueleto sacarídico que presenta, como mínimo, una unidad sacarídica en la cual la posición 1 anomérica está halogenada y cuyas funciones hidróxilo están acetiladas con un 4-hidroxi-nitrobenzaldehído de fórmula (VII) para conducir a un compuesto de fórmula (VIII) en el que "Ac" significa acetilo, comprendiendo que en los compuestos de fórmula (VII) y (VIII) el grupo nitro puede ocupar cualquier posición del ciclo benzénico;
- 2) en una segunda etapa, se efectúa en un disolvente orgánico, tal como por ejemplo cloroformo, isopropanol o su mezcla, una reducción del compuesto de fórmula (VIII) obtenido anteriormente en la etapa precedente en presencia de un agente reductor para conducir a un compuesto de fórmula (IX);
- 3) en una tercera etapa, se hace reaccionar en un disolvente orgánico, tal como por ejemplo diclorometano, el compuesto de fórmula (IX) obtenido anteriormente en la etapa precedente, con cloruro de tritilo, a continuación se hidrolizan los grupos acetilo para conducir a un compuesto de fórmula (X) en el que "Ph" significa fenilo;
- 4) en una cuarta etapa, se hace reaccionar en un disolvente orgánico, tal como por ejemplo dimetilformamida, el compuesto de fórmula (X) obtenido anteriormente en la etapa precedente con un haluro de bencilo y a continuación se hidroliza el grupo tritilo para liberar la función hidróxilo y conducir a un compuesto de fórmula (XI) en el que "Bn" significa bencilo;
- 5) en una quinta etapa se hace reaccionar en un disolvente orgánico, tal como por ejemplo diclorometano, el compuesto de fórmula (XI) obtenido anteriormente en la etapa precedente con un compuesto de fórmula (XII) para conducir a un compuesto de fórmula (XIII) en el que "Bn" significa bencilo; debiéndose comprender que en los compuestos de fórmula (XII) y (XIII), X representa O, o bien NH;
- 6) en una sexta etapa, se lleva a cabo una reducción de los grupos nitro del compuesto de fórmula (XIII) obtenido anteriormente en la etapa precedente en presencia de un agente reductor, para conducir a un compuesto de fórmula (XIV); y
- 7) en una séptima etapa, se hace reaccionar en un disolvente orgánico, tal como por ejemplo, dimetilformamida anhidra, el compuesto de fórmula (XIV) obtenido anteriormente en la etapa precedente

con un compuesto fluoróforo previamente funcionalizado por un grupo NHS para conducir a un compuesto de fórmula (XV) en el que F=I (compuesto de tipo (I-1)).

5 Por otra parte, los compuestos enzimáticos de fórmula (I) de acuerdo con la invención, en los que el brazo separador comprende, como mínimo, una subunidad B1 de fórmula (IV), una subunidad B2 de fórmula (V) y una subunidad B3 de fórmula (VI) (compuesto de fórmula (I-2)) y en los que F e I representan un grupo fluoróforo idéntico, pueden ser preparados por ejemplo, según el procedimiento (P2), tal como se ha representado en el siguiente esquema E:



ESQUEMA E

10 en el que:

1) en una primera etapa se hace reaccionar en un disolvente orgánico, tal como, por ejemplo, diclorometano, un compuesto de fórmula (XVI) en el que R₁ tiene la misma significación que la que se ha indicado anteriormente para la subunidad B1 de fórmula (IV) i "Ph" significa fenilo, con un grupo protector "Protect-a" tal como, por

ejemplo, el *tert*-butildimetilclorosilano (TBDMS) en presencia de un compuesto imidazol, para conducir a un compuesto de fórmula (XVII);

2) en una segunda etapa, se hace reaccionar en un disolvente orgánico tal como, por ejemplo, diclorometano, el compuesto de fórmula (XVII) obtenido anteriormente en la etapa precedente, con un compuesto de fórmula (XII), tal como el definido anteriormente en la quinta etapa del procedimiento P1, para conducir un compuesto de fórmula (XVIII);

3) en una tercera etapa, se hace reaccionar, en un disolvente orgánico tal como, por ejemplo, diclorometano, el compuesto de fórmula (XVIII) obtenido anteriormente en la etapa precedente, con un compuesto de fórmula (XIX) en el que R₂, Y y m tienen los mismos significados que los indicados anteriormente para la subunidad B2 de fórmula (V) y Protect-b es un grupo protector tal como, por ejemplo, Fmoc, para conducir un compuesto de fórmula (XX);

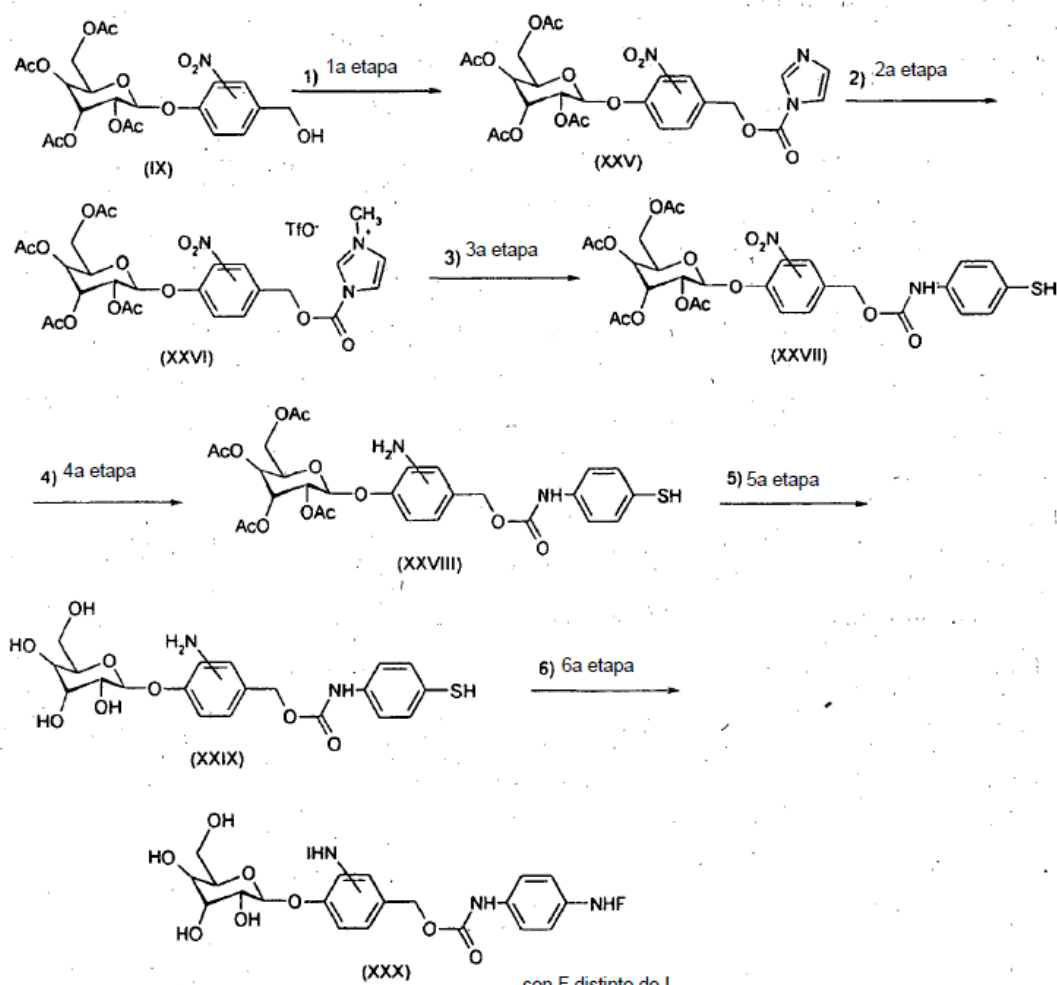
4) en una cuarta etapa, se hace reaccionar en un disolvente orgánico, tal como, por ejemplo, diclorometano anhidro, el compuesto de fórmula (XX) obtenido anteriormente en la etapa precedente, con un compuesto de fórmula (XXI), en el que W, F, I y n tienen los mismos significados que se han indicado anteriormente para la subunidad B3 de fórmula (VI), para conducir un compuesto de fórmula (XXII);

5) en una quinta etapa, se desprotege completamente en un disolvente orgánico tal como, por ejemplo, diclorometano anhidro el compuesto de fórmula (XXII) obtenido anteriormente en la etapa precedente, en presencia de piperidina y después de fluoruro de tetrabutilamonio, para conducir el compuesto de fórmula (XXIII);

6) en una sexta etapa, se hace reaccionar, en un disolvente orgánico tal como, por ejemplo, el compuesto DMF anhidro, el compuesto de fórmula (XXIII) obtenido anteriormente en la etapa precedente con un compuesto F o bien I, previamente funcionalizado por un grupo NHS para conducir a un compuesto de fórmula (XXIV) (compuesto de tipo (I-2)).

Los procedimientos P1 y P2 representados en los esquemas anteriores D y E, comprenden un número mínimo de etapas. Se debe comprender no obstante que, según la naturaleza del sustrato enzimático de fórmula (I-1) o (I-2) que se desea obtener pueden ser necesarias reacciones suplementarias de protección/desprotección, en particular, si se desean aplicar los procedimientos P1 o bien P2 a sustratos enzimáticos de fórmula (I-1) o bien (I-2), en los que F e I son distintos. Estas reacciones son realizadas de manera clásica según los procedimientos conocidos por los técnicos en la materia.

A título de ejemplo suplementario, los compuestos de fórmula (I-1), en los que F e I son diferentes, y X= NH pueden ser preparados especialmente según el procedimiento P3, tal como se ha representado en el esquema siguiente F:



con F distinto de I
ESQUEMA F

según el cual;

- 1) en una primera etapa, se hace reaccionar en un disolvente orgánico, tal como, por ejemplo, diclorometano, un compuesto de fórmula (IX), tal como el que se ha definido en la etapa 2) del procedimiento P1, con 4-(dimetilamino)piridina (DMAP), en presencia de carbonilo diimidazol para conducir a un compuesto de fórmula (XXV) en el que "Ac" significa acetilo;
- 2) en una segunda etapa, se hace reaccionar, en un disolvente orgánico tal como, por ejemplo, diclorometano, el compuesto de fórmula (XXV) obtenido anteriormente en la etapa precedente con metil trifluorometansulfonato para conducir a un compuesto de fórmula (XXVI);
- 3) en una tercera etapa, se hace reaccionar, en un disolvente orgánico tal como, por ejemplo, diclorometano, el compuesto de fórmula (XXVI) obtenido anteriormente en la etapa precedente con 4-aminiofenol para conducir a un compuesto de fórmula (XXVII);
- 4) en una cuarta etapa, se lleva a cabo, en un disolvente orgánico tal como, por ejemplo, metanol, una reducción del compuesto de fórmula (XXVII) obtenido en lo anterior en la etapa precedente en presencia de un agente reductor para conducir a un compuesto de fórmula (XXVIII);
- 5) en una quinta etapa, se hidroliza, en un disolvente orgánico tal como metanol, los grupos acetilo del compuesto de fórmula (XXVIII) en presencia, por ejemplo, de metilato de sodio, para conducir a un compuesto de fórmula (XXIX); y
- 6) en una sexta etapa, se hace reaccionar, en un disolvente orgánico tal como, por ejemplo, dimetilformamida anhidra, el compuesto de fórmula (XXIX) obtenido anteriormente en la etapa precedente, con un compuesto fluoróforo previamente funcionalizado por un grupo maleimida y un compuesto inhibidor de la fluorescencia del grupo fluoróforo, habiendo sido previamente funcionalizado dicho compuesto inhibidor por un grupo NHS, en presencia de dietilamina, para conducir un compuesto de fórmula (XXX) en el que F es diferente de I (compuesto de tipo (I-1)).

En cada una de las etapas de los procedimientos P1, P2 y P3, los compuestos intermediarios y el compuesto o compuestos finales de fin de síntesis son preferentemente lavados, aislados y purificados según los procedimientos utilizados de manera clásica a estos efectos tales como, por ejemplo, purificación sobre columna de gel de sílice.

5 Tal como se ha descrito y explicado ampliamente en lo anterior, los sustratos enzimáticos de fórmula (I) según la invención, pueden ser utilizados para la detección de una actividad enzimática *in vitro* e *in vivo*.

La presente invención, tiene, por lo tanto, por segundo objeto la utilización de, como mínimo, un sustrato enzimático de fórmula (I) tal como se ha definido anteriormente a título de reactivo fluorescente, para la detección de una actividad enzimática *in vitro*.

Según una fórmula de realización especialmente preferente, el grupo fluoróforo F de los sustratos enzimáticos de fórmula (I) se escoge entre los grupos absorbentes y que emiten en los infrarrojos próximos, en particular, entre 640 y 900 nm, con la finalidad de permitir una utilización *in vivo*. En este caso, la presente invención tiene igualmente por objeto la utilización de, como mínimo, un sustrato enzimático de fórmula (I) en el que el grupo fluoróforo F es escogido entre los grupos absorbente y emisor en los infrarrojos próximos para la preparación de un reactivo de diagnóstico destinado a la formación de imágenes funcionales *in vivo*, y en particular para la formación de imágenes, por fluorescencia, de la expresión de los genes informadores *lacZ* y *gusA* de *E. coli*.

Finalmente, la invención tiene por objetivo un reactivo de diagnóstico caracterizado por el hecho de que comprende, como mínimo, una solución constituida por agua o una mezcla de agua, como mínimo, un disolvente orgánico, comprendiendo dicha solución, como mínimo, un sustrato enzimático de fórmula (I), tal como se ha definido anteriormente.

Según una forma de realización particular y preferente de la invención, el reactivo es un reactivo de diagnóstico *in vivo* y el sustrato enzimático de fórmula (I) comprende, como mínimo, un grupo fluoróforo F escogido entre los grupos fluoróforos absorbente y emisor en los infrarrojos próximos.

A título de disolventes orgánicos utilizables se pueden citar los disolventes clásicamente utilizados para la preparación de reactivos de diagnóstico, entre los que figuran, por ejemplo, los alcoholes inferiores, tales como el etanol y el dimetilsulfóxido (DMSO). Cuando se utilizan estos disolventes pueden representar hasta 50% (en volumen) de la solución que comprende el sustrato enzimático de fórmula (I).

Según una forma de realización particular de la invención, la solución puede comprender además un tampón fisiológicamente aceptable, tal como un tampón fosfato tal como, por ejemplo, PBS ("Phosphate Buffer Saline") a pH 7,2.

En el seno del reactivo de diagnóstico, según la invención, la concentración del sustrato o sustratos enzimáticos de fórmula (I) está comprendida preferentemente entre 1 μM y 1mM aproximadamente, más preferentemente entre 10 μM y 200 μM . Según una forma de realización particularmente preferente de la invención, esta concentración es de 100 μM , aproximadamente.

Además de las disposiciones anteriores, la invención comprende otras disposiciones que resultarán del complemento de descripción siguiente que se refiere a ejemplos de preparación de los ejemplos de síntesis de los sustratos enzimáticos de fórmula (I), así como a los dibujos adjuntos, en los que:

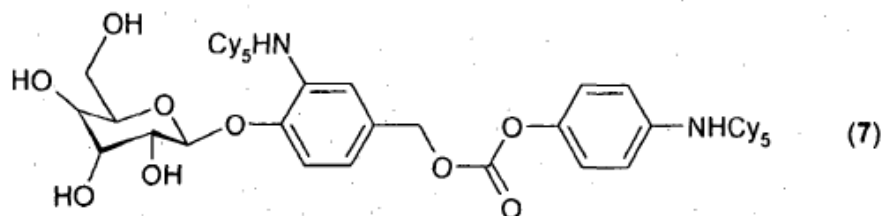
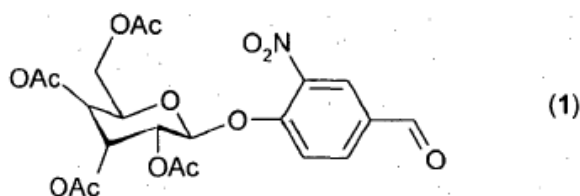
- la figura 1 muestra el principio de funcionamiento de un sustrato enzimático de tipo (I-1). En esta figura, F, I, Fonc y X son los que se han definido anteriormente; cada uno de los F e I está injertado sobre núcleos aromáticos distintos a un lado y otro de las funciones carbonato o carbamato, pudiéndose no obstante, intercambiar las dos posiciones. El fraccionamiento enzimático libera el brazo autodivisible del azúcar que se hidroliza a continuación espontáneamente en dos subunidades distintas cada una de las cuales lleva uno de los dos grupos F o I. Los dos grupos F e I se encuentran entonces alejados, pudiendo el grupo F emitir fluorescencia.
- la figura 2 muestra el principio de funcionamiento de un sustrato enzimático de (I-2). En esta figura, F, I, Fonc, R₁, R₂, Y, W, m, y n son tales como se han definido anteriormente. Cada uno de los dos grupos F e I está injertado a un lado y otro de las funciones carbonato, carbamato o urea. Las dos posiciones pueden ser, no obstante, intercambiadas. El fraccionamiento enzimático libera el brazo autodivisible del azúcar que se hidroliza espontáneamente en dos subunidades, una aromática y presentando la otra que presenta todavía los dos grupos F e I. Una última reacción intramolecular espontánea engendra la separación de los dos grupos F e I a nivel de la función carbonato, amida o incluso urea. Al estar alejados los dos grupos F e I, el grupo F puede emitir entonces fluorescencia.

Se debe comprender, no obstante, que los ejemplos siguientes no se facilitan más que a título ilustrativo de la invención, de la que no constituyen por otra parte, en modo alguno, limitación.

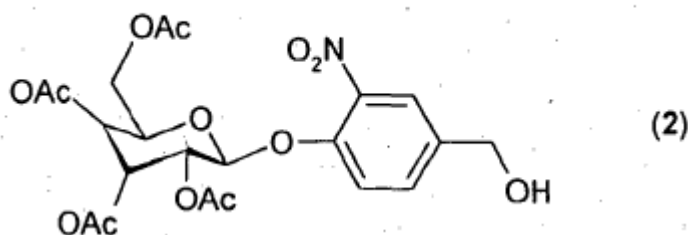
65

EJEMPLO 1: SÍNTESIS DE UN SUSTRATO ENZIMÁTICO, SEGÚN LA INVENCÓN EN EL QUE F = I = CY5, Y X = O (Compuesto de fórmula (I-1))

En este ejemplo, se ha sintetizado el siguiente compuesto (7):

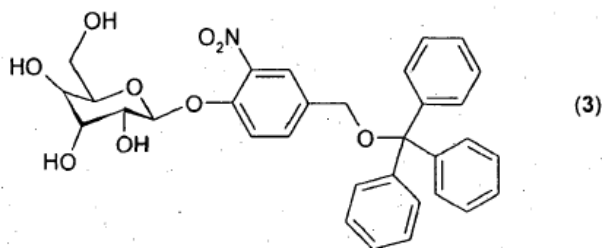
**1) Primera etapa: Síntesis del intermediario (1)**

15 A una solución de α -D-acetobromogalactosa (10 g, 24,3 mmol) en acetonitrilo anhidro (100 ml) se han añadido 6,9 g (41,3 mmol) de 4-hidroxi-3-nitrobenzaldehido y 19,7 g (85,1 mmol) de óxido de plata. La mezcla de reacción ha sido agitada a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón y con protección contra la luz durante 12 horas. A continuación, la mezcla ha sido filtrada sobre sílice, y el filtrado ha sido concentrado a presión reducida. Se han obtenido de este modo 7,44 g del intermediario (1) en forma de un sólido amarillo pálido (rendimiento: 62 %). El producto ha sido, a continuación, directamente introducido en la etapa siguiente, sin purificación suplementaria.

2) Segunda etapa: Síntesis del intermediario (2)

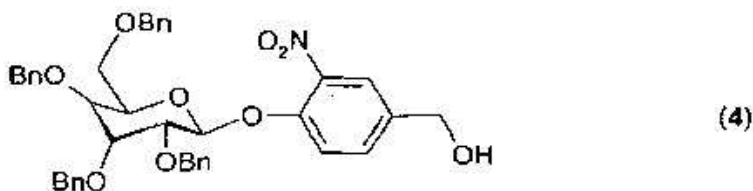
25 A una solución de 7,44 g (14,9 mmol) del intermediario (2) obtenido anteriormente en la etapa precedente, en 160 ml de una mezcla triclorometano/isopropanol ($\text{CHCl}_3/\text{iPrOH}$: 3/1, v/v), y enfriada a 0°C bajo atmósfera de argón, se han añadido 6,8 g (180 mmol) de borohidruro de sodio en pequeñas porciones. Después de 12 horas de agitación a temperatura ambiente, la mezcla de la reacción ha sido hidrolizada mediante una solución saturada de bicarbonato sódico. La fase acuosa ha sido extraída dos veces con 300 ml de diclorometano; la fase orgánica obtenida ha sido lavada dos veces con 200 ml de agua, secada sobre sulfato magnésico, filtrada sobre un sinterizado, y a continuación, concentrada a presión reducida. Se han obtenido de este modo 5,86 g de intermediario (2) esperado en forma de un sólido de color amarillo pálido (rendimiento: 78%). El producto ha sido, a continuación, directamente introducido en la etapa siguiente, sin purificación suplementaria.

30

3) Tercera Etapa: Síntesis del intermediario (3)

5 A una solución de 1,03 g (2,05 mmol) del intermediario (2) obtenida anteriormente en la etapa precedente, en 20 ml de diclorometano, se han añadido 1,72 g (6,17 mmol) de cloruro de tritilo, 860 μ l (6,17 mmol) de trietilamina y 25 mg (0,205 mmol) de 4-(dimetilamino)piridina (DMAP). La mezcla de reacción ha sido agitada durante 12 horas a temperatura ambiente antes de ser purificada directamente por cromatografía de gel de sílice utilizando como fase líquida una mezcla de acetato de etilo/heptano/trietilamina (AcOEt/Heptano/Et₃N: 20/79/1, v/v/v). De este modo, se han obtenido 1,18 g de un sólido de color marrón claro ("beige") (rendimiento: 77%).

10 A una solución de 1,18 g (1,59 mmol) de este producto en 16 ml de metanol anhidro, se han añadido 86 mg (1,59 mmol) de metilato sódico. La mezcla de reacción ha sido agitada a temperatura ambiente durante 12 horas antes de ser acidificada a pH = 5 con resina Dowex® H+. Después de filtrado y concentración a presión reducida, se han obtenido 839 mg del intermediario (3) en forma de un sólido de color amarillo (rendimiento: 92%). El producto ha sido, a continuación, directamente introducido en la etapa siguiente, sin purificación suplementaria.

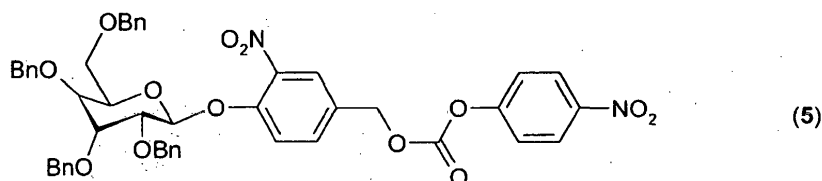
4) Cuarta etapa: Síntesis del intermediario (4)

20 en la que "Bn" significa bencilo.

25 A una solución enfriada a 0°C bajo atmósfera de argón a 839 mg (1,46 mmol) del intermediario (4) obtenido anteriormente en la etapa precedente, en 15 ml de dimetilformamida anhidra (DMF), se han añadido 351 mg (8,77 mmol) de hidruro sódico a 60%. Después de 10 minutos de agitación se han añadido a continuación 1,39 ml (11,7 mmol) de bromuro de bencilo. La mezcla de reacción ha sido agitada a temperatura ambiente durante 12 horas antes de ser hidrolizada. Después de una división H₂O/AcOEt, la fase acuosa ha sido extraída dos veces con 150 ml de acetato de etilo, la fase orgánica obtenida ha sido lavada dos veces con 100 ml de una solución acuosa saturada de cloruro sódico, secada sobre sulfato de magnesio, filtrada sobre un sinterizado y después concentrada a presión reducida. El residuo ha sido purificado por cromatografía sobre gel de sílice utilizando como fase líquida una mezcla de AcOEt/Heptano/Et₃N: 10/89/1, v/v/v. Se han obtenido 888 mg de un aceite de color amarillo (rendimiento: 65%).

35 A una solución enfriada a 0°C bajo atmósfera de argón de 888 mg (0,951 mmol) de este producto en 5 ml de diclorometano se han añadido a continuación 71 μ l (0,951 mmol) de ácido trifluoroacético. La mezcla de reacción ha sido agitada a 0°C durante 1 hora antes de ser neutralizada mediante una solución acuosa de bicarbonato sódico. La fase acuosa ha sido extraída dos veces con 150 ml de diclorometano; la fase orgánica obtenida ha sido lavada dos veces con 100 ml de agua, secada sobre sulfato magnésico, filtrada sobre un sinterizado y después concentrada a presión reducida. El residuo obtenido de este modo ha sido purificado por cromatografía sobre gel de sílice (AcOEt/Heptano: 40/60, v/v) para conducir a 605 mg del intermediario (4) esperado en forma de aceite de color amarillo pálido (rendimiento: 92%).

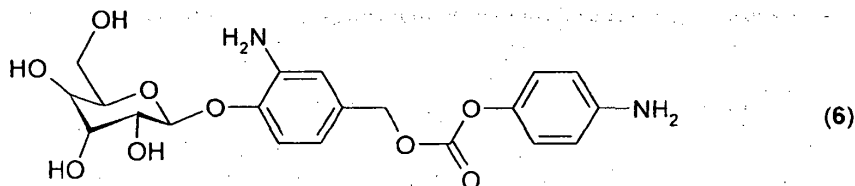
5) Quinta etapa: Síntesis del intermediario (5)



5 A una solución de 233 mg (0,337 mmol) del intermediario (4) obtenido anteriormente en la etapa precedente, en 2 ml de diclorometano, se han añadido 94 μ l (0,674 mmol) de trietilamina y 102 mg (0,505 mmol) de 4-nitrofenil-cloroformato. La mezcla de reacción ha sido agitada a temperatura ambiente durante 12 horas antes de ser hidrolizada con una solución acuosa de bicarbonato sódico. La fase acuosa ha sido extraída dos veces con 50 ml de diclorometano; la fase orgánica obtenida ha sido lavada dos veces con 25 ml de agua, secada sobre sulfato magnésico, filtrada sobre un sinterizado y después concentrada a presión reducida. El residuo ha sido purificado por cromatografía sobre gel de sílice (AcOEt/Heptano: 15/85, v/v) para conducir a 213 mg del intermediario (5) esperado en forma de un aceite de color amarillo (rendimiento: 74%).

6) Sexta etapa: Síntesis del intermediario (6)

15



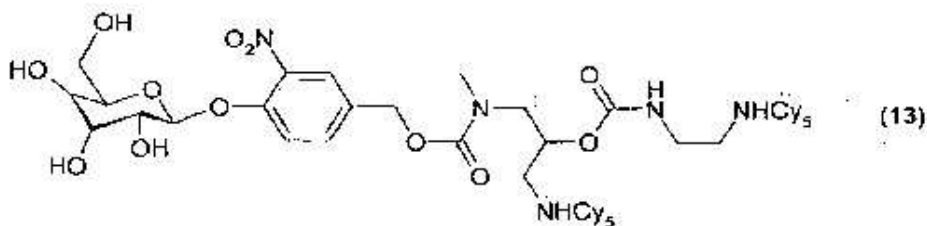
20 A una solución de 165 mg (0,192 mmol) del intermediario (5) obtenido anteriormente en la etapa precedente, en 2 ml de metanol, se han añadido 17 mg de paladio sobre carbón con 10% de agua. La mezcla de reacción ha sido purgada con dihidrógeno cinco veces antes de ser agitada a temperatura ambiente durante 12 horas. Después de filtrado sobre celite y concentración a presión reducida se han obtenido 78 mg del compuesto intermediario (6) en forma de un aceite de color amarillo (rendimiento: 93%). El producto ha sido introducido directamente a continuación en la etapa siguiente, sin purificación suplementaria.

7) Séptima etapa: Síntesis del compuesto (7) de acuerdo con la invención

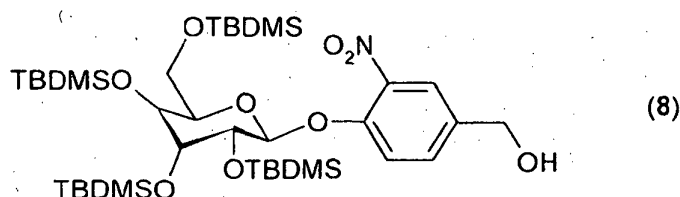
25 A una solución de 5 mg (5,7 μ mol) de Cy5-NHS (GE-Amersham) en 500 μ l de DMF anhidro en atmósfera de argón, se han añadido 250 μ l de dietilamina y 1,3 mg (2,93 μ mol) del intermediario (6) obtenido anteriormente en la etapa precedente. La mezcla de reacción ha sido agitada a temperatura ambiente durante 12 horas antes de ser concentrada a presión reducida. El sustrato enzimático (7) esperado ha sido obtenido después de purificación por HPLC con un rendimiento de 72%.

35 **EJEMPLO 2: SÍNTESIS DE UN SUSTRATO ENZIMÁTICO SEGÚN LA INVENCIÓN EN EL QUE F=I=Cy5, y X=Y=O, m=n=1** (Compuesto de fórmula (1-2))

En este ejemplo, se ha sintetizado el compuesto (13) siguiente:



1) Primera etapa: Síntesis del intermediario (8)



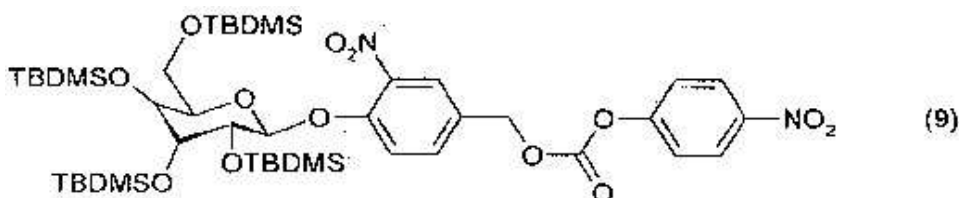
5 en la que "TBDMS" representa el grupo protector *tert*butildimetilsilano.

A una solución de 1,21 g (2,11 mmol) del intermediario (3), tal como se ha obtenido anteriormente a la salida de la tercera etapa del ejemplo 1, en 11 ml de diclorometano, se han añadido 862 mg (12,7 mmol) de imidazol y 1,9 g (12,7 mmol) de *tert*butildimetilclorosilano. La mezcla de reacción ha sido agitada a temperatura ambiente durante 12 horas antes de ser neutralizada con una solución acuosa de bicarbonato sódico. La fase acuosa ha sido extraída dos veces con 150 ml de diclorometano; la fase orgánica obtenida ha sido lavada dos veces con 100 ml de agua, secada sobre sulfato magnésico, filtrada sobre un sinterizado y después concentrada a presión reducida. El residuo ha sido purificado por cromatografía sobre gel de sílice (AcOEt/Heptano: 20/80, v/v) conduciendo a 1,57 g de un producto que se presenta en forma de un aceite de color amarillo (rendimiento: 72%).

15 A una solución enfriada a 0°C en una atmósfera de argón de 1,57 g (1,52 mmol) de este producto en 8 ml de diclorometano se han añadido 113 µl (1,52 mmol) de ácido trifluoroacético. La mezcla de reacción ha sido agitada a 0°C durante 1 hora antes de ser neutralizada por una solución acuosa de bicarbonato sódico. La fase acuosa ha sido extraída dos veces con 150 ml de diclorometano; la fase orgánica obtenida ha sido lavada dos veces con 100 ml de agua, secadas con el sulfato magnésico, filtradas sobre un sinterizado y después concentrada a presión reducida. El residuo ha sido purificado por cromatografía sobre gel de sílice (AcOEt/Heptano: 40/60, v/v). Se han obtenido 1,05 g de un aceite de color amarillo (rendimiento: 88%).

2) Segunda etapa: síntesis del intermediario (9)

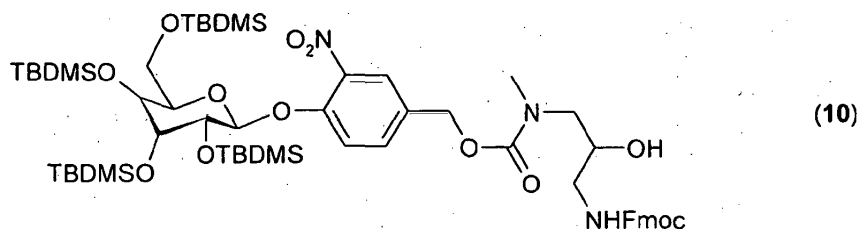
25



30 A una solución de 1,0 g (1,27 mmol) del intermediario (8) obtenido anteriormente en la etapa precedente en 6 ml de diclorometano, se han añadido 354 µl (2,54 mmol) de trietilamina y 384 g (1,90 mmol) de 4-nitrofenil-clorofornato. La mezcla de reacción ha sido agitada a temperatura ambiente durante 12 horas antes de ser hidrolizada con una solución acuosa de bicarbonato sódico. La fase acuosa ha sido extraída dos veces con 150 ml de diclorometano; la fase orgánica obtenida ha sido lavada dos veces con 100 ml de agua, secada sobre sulfato magnésico, filtrada sobre un sinterizado y después concentrada a presión reducida. El residuo ha sido purificado por cromatografía sobre gel de sílice (AcOEt/Heptano: 15/85, v/v) para conducir a 919 mg del compuesto intermediario (9) en forma de un aceite de color amarillo (rendimiento: 76%).

35

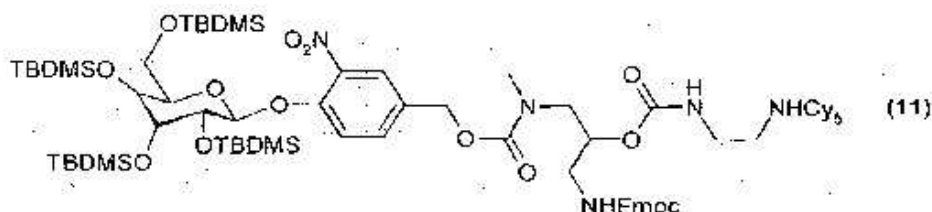
3) Tercera etapa: Síntesis del intermediario (10) (X=O, m=1)



40 en el que Fmoc es el grupo protector fluorenilmetiloxycarbonilo. A una solución de 278 mg (0,295 mmol) del intermediario (9) obtenido anteriormente en la etapa precedente, en 1,5 ml de diclorometano, se han añadido 114 mg (0,350 mmol) de (9*H*-fluoren-9-il)metil-2-hidroxi-3-(metilamino)propilcarbarnato. Después de 12 horas de

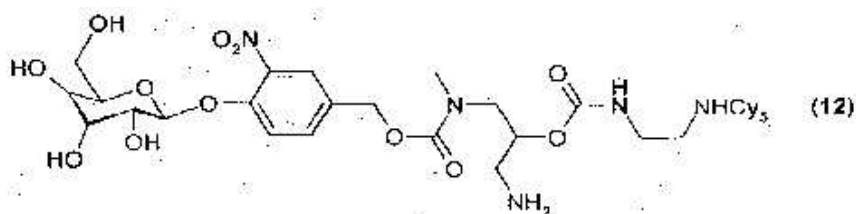
agitación a temperatura ambiente, la mezcla de reacción ha sido hidrolizada por una solución saturada de bicarbonato sódico. La fase acuosa ha sido extraída dos veces con 50 ml de diclorometano; la fase orgánica obtenida ha sido lavada dos veces con 30 ml de agua, secada sobre sulfato magnésico, filtrada sobre un sinterizado y después concentrada a presión reducida. Se han obtenido 226 mg de compuesto intermediario **(10)** en forma de un aceite de color amarillo (rendimiento: 68%). El producto ha sido introducido a continuación directamente en la etapa siguiente, sin purificación suplementaria.

4) Cuarta etapa: Síntesis del intermediario **(11)** (X=O, Y=N, B=Cy5, m=n=1)



A una solución enfriada a 0°C en atmósfera de argón de 212 mg (0,186 mmol) del compuesto intermediario **(10)** obtenido anteriormente en la etapa precedente, en 2 ml de diclorometano anhidro, se han añadido 22 mg (0,223 mmol) de fosgeno. La mezcla de reacción ha sido agitada durante 1 hora a 0°C antes de añadir 165 mg (0,372 mmol) del compuesto de fórmula siguiente: H₂N-(CH₂)₂-NHCy₅. La mezcla de reacción ha sido agitada a temperatura ambiente durante 2 horas antes de ser concentrada a presión reducida. Se han obtenido 14 mg de un residuo que ha sido purificado a continuación por HPLC facilitando 11,3 mg del compuesto intermediario esperado **(11)**.

5) Quinta etapa: Síntesis del intermediario **(12)** (X=O, Y=N, B=Cy5, m=n=1)



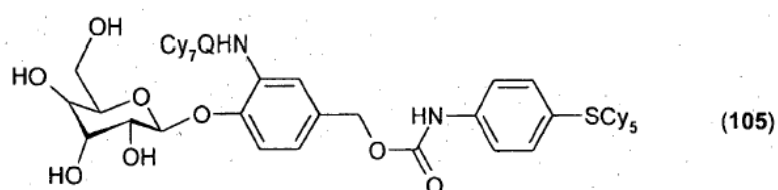
A una solución de 11,3 mg (5,9 µmol) del compuesto intermediario **(11)** obtenido anteriormente en la etapa precedente en 1 ml de diclorometano anhidro, se han añadido 1,16 µl (11,8 µmol) de piperidina. La mezcla de reacción ha sido agitada durante 2 horas y a continuación se han añadido 23,6 µl (23,6 µmol) de una solución de fluoruro de tetrabutilamonio a 1,0 M en tetrahidrofurano (THF). La mezcla de reacción ha sido agitada durante 4 horas antes de ser concentrada a presión reducida. El residuo ha sido purificado por HPLC para conducir a 8,7 mg del compuesto intermediario **(12)**.

6) Sexta etapa: Síntesis del compuesto **(13)**

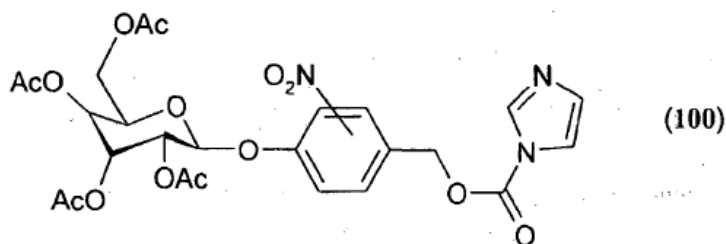
A una solución de 6,7 mg (7,6 µmol) de Cy₅-NHS en 500 µl de DMF anhidro, en atmósfera de argón, se han añadido 250 µl de dietilamina y 4,8 mg (3,8 µmol) del compuesto intermediario **(12)** obtenido anteriormente en la etapa precedente. La mezcla de reacción ha sido agitada a temperatura ambiente durante 12 horas antes de ser concentrada a presión reducida. Después de purificación por HPLC, se han obtenido 4,4 mg del compuesto de fórmula **(13)** esperado.

EJEMPLO 3: SÍNTESIS DE UN SUSTRATO ENZIMÁTICO SEGÚN LA INVENCÓN, EN EL QUE F = Cy₅, I = Cy₇Q Y X = NH (Compuesto de fórmula (I-1))

En este ejemplo, se ha sintetizado el compuesto **(105)** siguiente:



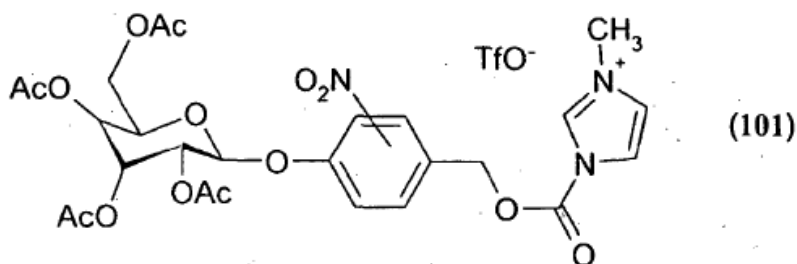
1) Primera etapa: Síntesis del intermediario (100)



5 A una solución del intermediario (2), tal como el obtenido anteriormente después de la segunda etapa del ejemplo 1 (1,0 g, 2,0 mmol) en 15 ml de diclorometano, se han añadido 49 mg (0,4 mmol) de DMAP y 650 mg (4,0 mmol) de carbonil diimidazol. La mezcla de reacción ha sido agitada a temperatura ambiente durante 12 horas antes de ser concentrada a presión reducida. El aceite obtenido ha sido purificado por cromatografía sobre gel de sílice (AcOEt/Heptano: 50/50, v/v y después 70/30, v/v y 100/0, v/v). De este modo, se han obtenido 702 mg del intermediario (100) en forma de un material esponjoso de color blanco (rendimiento: 59%).

10

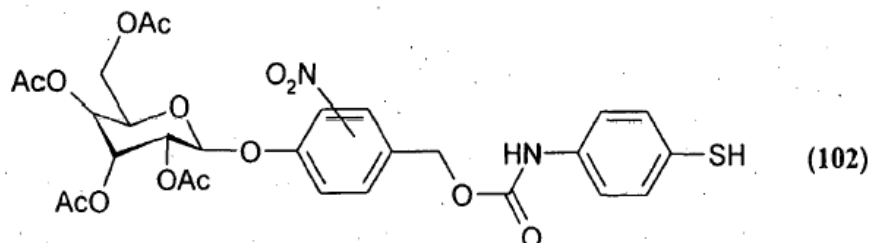
2) Segunda etapa: Síntesis del intermediario (101)



15 A una solución 700 mg (1,18 mmol) del intermediario (100) obtenido anteriormente en la etapa anterior, en 8 ml de diclorometano anhidro y bajo atmósfera de argón se han añadido 267 μ l (2,36 mmol) de metil trifluorometansulfonato. La mezcla de reacción ha sido agitada durante 10 minutos a temperatura ambiente antes de ser concentrada a presión reducida. El residuo ha sido triturado varias veces en éter dietílico antes de ser secado en vacío. De este modo, se han obtenido 822 mg del intermediario (101) esperado en forma de un sólido de color blanco (rendimiento: 92%). El producto ha sido, a continuación, directamente introducido en la etapa siguiente sin purificación suplementaria.

20

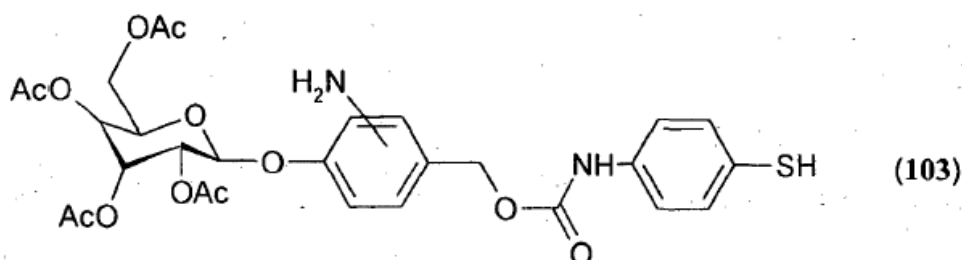
3) Tercera etapa: Síntesis del intermediario (102)



25 A una solución de 700 mg (0,924 mmol) del intermediario (101) obtenido anteriormente en la etapa precedente, en 5 ml de diclorometano anhidro y bajo atmósfera de argón, se han añadido 231 mg (1,85 mmol) de 4-aminotiofenol. La mezcla de reacción ha sido agitada durante 2 horas a temperatura ambiente antes de ser concentrada a presión reducida. El aceite obtenido ha sido purificado por cromatografía sobre gel de sílice (AcOEt/Heptano: 30/70, v/v). De esta manera, se han obtenido 457 mg del compuesto intermediario (102) esperado en forma de sólido de color amarillo pálido (rendimiento: 76%).

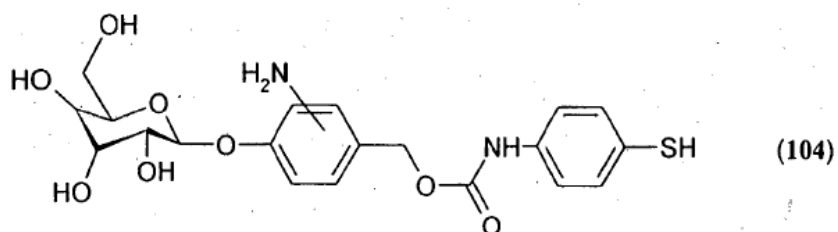
30

4) Cuarta etapa: Síntesis del intermediario (103)



5 A una solución de 330 mg (0,507 mmol) del intermediario (102) obtenido anteriormente en la etapa precedente, en 3 ml de metanol y 500 μ l de ácido clorhídrico concentrado, se han añadido 192 mg (1,01 mmol) de dicloruro de estaño. La mezcla de reacción ha sido agitada a continuación durante 12 horas a temperatura ambiente. Después de la separación diclorometano/agua, el pH de la mezcla ha sido elevado a 8-9 añadiendo una solución acuosa saturada de bicarbonato sódico. La fase acuosa ha sido extraída dos veces con diclorometano, secada sobre sulfato de magnesio, filtrada sobre un sinterizado y después concentrada a presión reducida. El residuo ha sido purificado por cromatografía sobre gel de sílice (AcOEt/Heptano: 70/30, vlv). Se han obtenido 226 mg del intermediario (103) esperado en forma de un aceite de color amarillo (rendimiento: 72%).

5) Quinta etapa: Síntesis del intermediario (104)



20 A una solución de 210 mg (0,338 mmol) del intermediario (103) obtenido anteriormente en la etapa precedente, en 3 ml de metanol anhidro, se han añadido 18 mg (0,338 mmol) de metilato sódico. La mezcla de reacción ha sido agitada a temperatura ambiente durante 12 horas antes de ser acidificada hasta pH 7 con resina Dowex H^+ . Antes de filtrado y concentración a presión reducida, se han obtenido 145 mg del intermediario (104) esperado en forma de un sólido de color amarillo (rendimiento: 95%). El producto ha sido introducido a continuación en la etapa siguiente, sin purificación suplementaria.

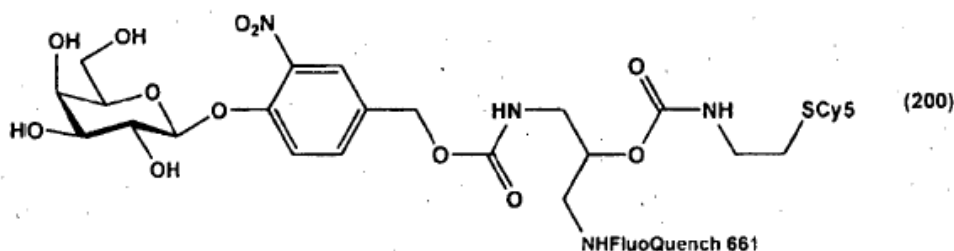
6) Sexta etapa: Síntesis del compuesto (105) según la invención.

30 A una solución de 24 mg (26,5 μ mol) de Cy7Q-NHS y de 20 mg (26,5 μ mol) de Cy5-maleimida en 1 ml de DMF anhidro y bajo atmósfera de argón, se han añadido 500 μ l de dietilamina y 10 mg (22,1 μ mol) del intermediario (104) obtenido anteriormente en la etapa precedente. La mezcla de reacción ha sido agitada a temperatura ambiente durante 12 horas antes de ser concentrada a presión reducida. Después de purificación por HPLC preparativa, se han obtenido 26 mg del compuesto (105) esperado (rendimiento: 62%).

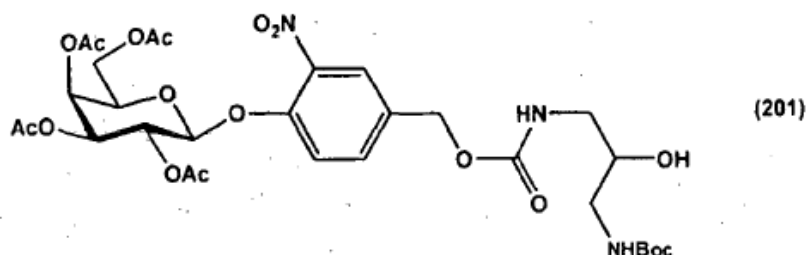
EJEMPLO 4: SÍNTESIS DE UN SUSTRATO ENZIMÁTICO SEGÚN LA INVENCÓN, EN EL QUE F = Cy5, I = FluoQuench 661, R₁ = NO₂, R₂ = H, Y = 0, W = N, y m = n = 1

(Compuesto de fórmula (I-2))

En este ejemplo, se ha sintetizado el compuesto (200) siguiente:



1) Primera etapa: Síntesis del intermediario (201):



5

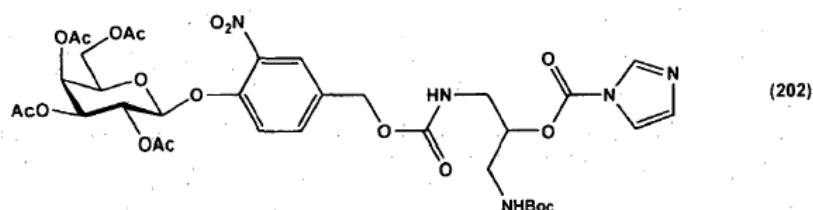
A una solución de 700 mg (0,924 mmol) del intermediario (101) tal como el obtenido como final de la segunda etapa del ejemplo 3 en 5 ml de N,N-dimetilformamida anhidra y bajo atmósfera de argón, se han añadido 351 mg (1,85 mmol) de *tert*-butil-3-amino-2-hidroxiopropil carbamato. La mezcla de reacción ha sido agitada durante 2 horas a temperatura ambiente antes de ser concentrada a presión reducida. El aceite obtenido ha sido purificado por cromatografía sobre gel de sílice (AcOEt/Heptano: 60/40, v/v). De este modo, se han obtenido 509 mg del compuesto intermediario (201) esperado en forma de un aceite de color amarillo pálido (rendimiento: 77%).

10

RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz): δ (ppm): 7,84 (d, J = 2 Hz, 1H); 7,58-7,30 (m, 1H); 7,40-7,35 (m, 1H); 5,95-5,89 (m, 1H), 5,64-5,50 (m, 3H); 5,17-5,08 (m, 4H); 4,31-4,10 (m, 4H); 3,85-3,79 (m, 1H); 3,36-3,21 (m, 3H); 2,23 (s, 3H); 2, 17 (s, 3H); 2, 12 (s, 3H); 2,09 (s, 3H); 1,48 (s, 9H); 1,30 (t, J = 7 Hz, 2H). SM (ESI+): 738,2 (M+Na)⁺, 1453,8 (2M+Na)⁺.

15

2) Segunda etapa: Síntesis del intermediario (202)



20

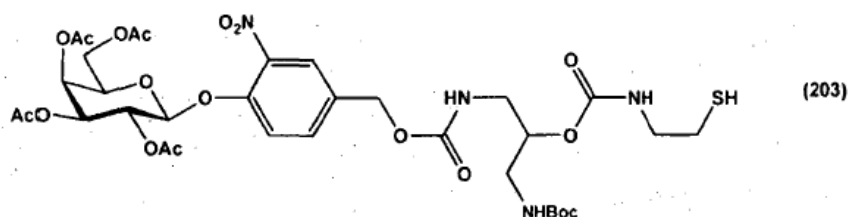
A una solución de 1,0 g (1,40 mmol) del intermediario (201) obtenido en la etapa precedente, en 15 ml de diclorometano, se han añadido 45 mg (0,28 mmol) de DMAP y 454 mg (2,80 mmol) de carbonil diimidazol. La mezcla de reacción ha sido agitada a temperatura ambiente durante 12 horas antes de ser concentrada a presión reducida. El aceite obtenido ha sido purificado por cromatografía sobre gel de sílice (AcOEt/Heptano: 80/20, v/v). De este modo, se han obtenido 882 mg del compuesto intermediario (202) esperado, en forma de un producto esponjoso de color blanco (rendimiento: 78%).

25

RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz): δ (ppm) : 8,26 (d, J = 7 Hz, 1H); 7,83 (d, J = 2 Hz, 1H); 7,57-7,35 (m, 3H); 7,12 (s, 1H); 5,94-5,89 (m, 1H); 5,63-5,45 (m, 3H); 5,18-5,03 (m, 7H); 4,29-4,08 (m, 4H); 3,56-3,51 (m, 4H); 2,23 (s, 3H); 2, 17 (s, 3H); 2, 11 (s, 3H); 2,08 (s, 3H); 1,47 (s, 9H). SM (ESI+) : 810,1 (M+H)⁺, 1618,8 (2M+H)⁺.

30

3) Tercera etapa: Síntesis del intermediario (203)

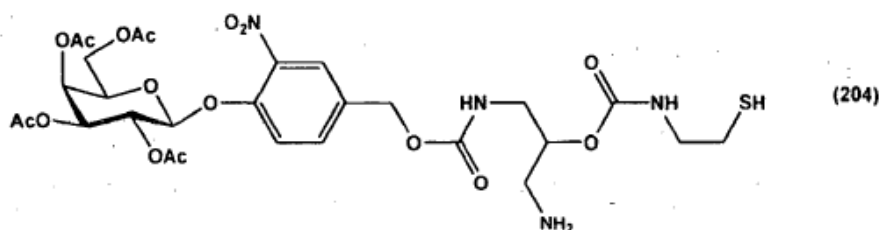


5 A una solución de 205 mg (0,253 mmol) del intermediario (202) obtenido anteriormente en la etapa precedente, en 2 ml de diclorometano anhidro y bajo atmosfera de argón, se han añadido 353 μ L (2,50 mmol) de trietilamina y 58 mg (0,506 mmol) de clorhidrato de cisteamina. La mezcla de reacción ha sido agitada durante 12 horas a temperatura ambiente antes de ser concentrada a presión reducida. El aceite obtenido ha sido purificado por cromatografía sobre gel de sílice (AcOEt/Heptano: 60/40, v/v). De esta manera, se han obtenido 130 mg del compuesto intermediario (203) esperado en forma de un aceite de color amarillo pálido (rendimiento: 63%).

10 RMN 1 H (CDCl₃, 200 MHz): δ (ppm) : 7,84 (d, J = 2 Hz, 1H); 7,56 (dd, J = 2 et 9 Hz, 1H); 7,37 (d, J = 9 Hz, 1H); 5,73-5,66 (m, 1H); 5,63-5,48 (m, 2H); 5,19-5,08 (m, 4H); 4,99-4,91 (m, 1H); 4,80-4,72 (m, 1H); 4,34-4,07 (m, 3H); 3,54-3,24 (m, 4H); 2,92 (d, J = 7 Hz, 4H); 2,23 (s, 3H); 2,17 (s, 3H); 2,12 (s, 3H); 2,06 (s, 3H); 1,48 (s, 9H). SM (ESI⁺): 841,2 (M+Na)⁺; 1659,8 (2M+Na)⁺.

15

4) Cuarta etapa: Síntesis del intermediario (204)

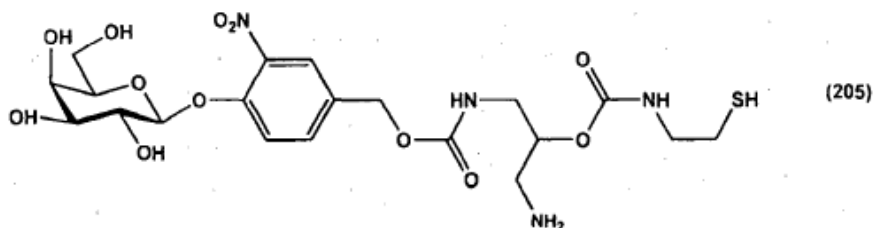


20 A una solución enfriada a 0°C en atmósfera de argón 210 mg (0,256 mmol) de intermediario (203) obtenido anteriormente en la etapa precedente, en 3 ml de diclorometano anhidro se ha añadido 1 ml (13,0 mmol) de ácido trifluoroacético. La mezcla de reacción ha sido agitada durante 2 horas a 0°C antes de ser hidrolizada en solución acuosa de bicarbonato sódico. La fase acuosa ha sido extraída dos veces 50 ml con diclorometano; la fase orgánica obtenida ha sido lavada dos veces con 50 ml de agua, secada sobre sulfato magnésico, filtrada sobre un sinterizado, y después concentrada a presión reducida. De esta manera, se han obtenido 117 mg del compuesto intermediario (204) esperado en forma de aceite de color amarillo pálido (rendimiento: 64%). El producto ha sido introducido a continuación directamente en la etapa siguiente, sin purificación suplementaria.

25 RMN 1 H (CDCl₃, 200 MHz): δ (ppm) : 7,83 (d, J = 2 Hz, 1H); 7,57 (dd, J = 2 et 9 Hz, 1H); 7,39 (d, J = 9 Hz, 1H); 5,63-5,50 (m, 2H); 5,34 (s, 3H, 5,19-5,08 (m, 4H); 4,82-4,76 (m, 1H); 4,31- 4, 11 (m, 3H); 3,54-3,35 (m, 3H); 2,97-2,91 (m, 3H); 2,22 (s, 3H); 2,16 (s, 3H); 2,11 (s, 3H); 2,05 (s, 3H); 1,38-1, 19 (m, 2H); 1,02-0,91 (m, 1H). SM (ESI⁺): 741,3 (M+Na)⁺; 1459,2 (2M+Na)⁺.

30

5) Quinta etapa: Síntesis del intermediario (205)



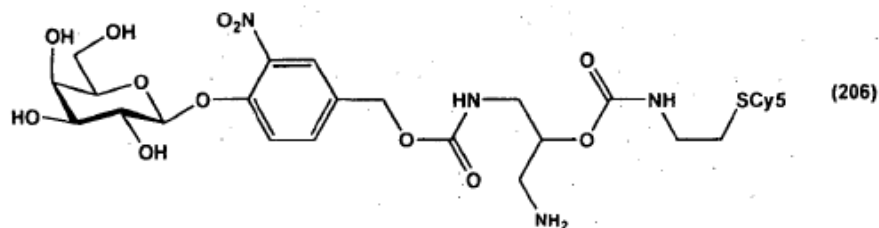
35

A una solución de 117 mg (0, 163 mmol) del intermediario (204) obtenido anteriormente en la etapa precedente, en 2 ml de metanol anhidro y bajo una atmósfera de argón, se han añadido 9 mg (0,163 mmol) de metilato de sodio. La mezcla de reacción ha sido agitada durante 12 horas a temperatura ambiente. El pH de la solución ha sido ajustado

a continuación a pH = 7 añadiendo resina de intercambio iónico H^+/Na^+ . De esta manera, se han obtenido 45 mg del compuesto intermediario **(205)** esperado, en forma de un sólido de color amarillo pálido (rendimiento: 50%). El producto ha sido introducido a continuación directamente en la etapa siguiente, sin purificación suplementaria.

5 RMN 1H (D_2O , 200 MHz): δ (ppm): 7,84-7,22 (m, 3H) ; 5,09-4,87 (m, 4H) ; 3,89 (d, J = 3 Hz, 1H) ; 3,79- 3,61 (m, 6H) ; 3,30-3,05 (m, 4H) ; 2,67-2,62 (m, 4H). SM (ESI $^+$): 519,3 (M-S) $^+$; 541,2 (M-S+Na) $^+$; 550,5 (M+H) $^+$; 573,3 (M+Na) $^+$; 1099,4 (2M-2H) $^+$.

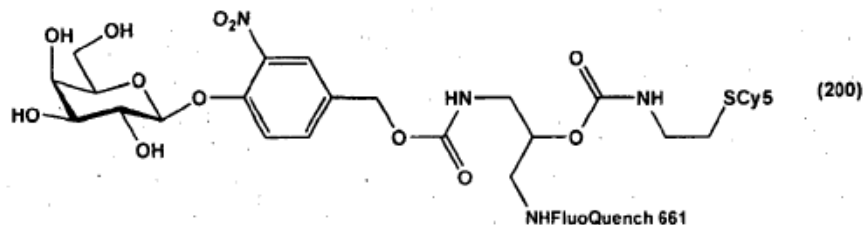
6) Sexta etapa: Síntesis del intermediario **(206)**



10 A una solución de 0,674 mg (1,22 μ mol) de intermediario **(205)** obtenido anteriormente en la etapa precedente, en 150 μ L de solución tampón PBS (pH = 7,4) a 0,01 mol.L $^{-1}$, se han añadido 48 μ L (24 μ mol) de una solución de clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina a 0,5 mol.L $^{-1}$. La mezcla de reacción ha sido agitada durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de añadir una solución de 1,0 mg (1,22 μ mol) de Cy5 monomaleimida en 50 μ L de DMSO. La mezcla de reacción ha sido agitada durante 12 horas a temperatura ambiente y con protección contra la luz antes de ser purificada directamente por HPLC, facilitando 0,77 mg del compuesto intermediario **(206)** esperado (rendimiento: 46%).

15 SM(ESI $^-$): 1327,4 (M-H) $^-$.

20 7) Séptima etapa: Síntesis del compuesto **(200)** según la invención



25 A una solución de 0,77 mg (0,561 μ mol) del intermediario **(206)** obtenido anteriormente en la etapa precedente, en 50 μ L de N,N-dimetilformamida, se han añadido 5 μ L (36 μ mol) de trietilamina y una solución de 1,0 mg (1,12 μ mol) de FluoQuench 661 mono NHS éster en 50 μ L de N,N-dimetilformamida. La mezcla de reacción ha sido agitada durante 12 horas a temperatura ambiente y con protección contra la luz antes de ser purificada directamente por HPLC, facilitando 0,52 mg del compuesto **(200)** según la invención (rendimiento 45%). SM(ESI $^-$): 2056,6 (M-H) $^-$.

30

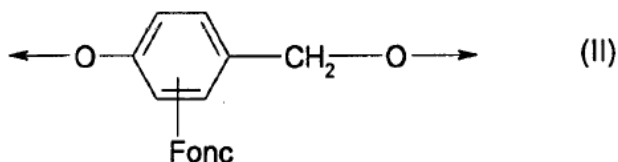
REIVINDICACIONES

1. Sustrato enzimático fluorescente caracterizado por el hecho de que corresponde a la siguiente estructura (I):



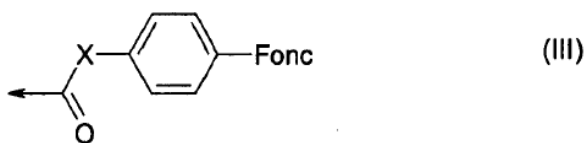
en la que:

- 10
- S es un esqueleto de naturaleza sacarídica constituido, como mínimo, por una unidad sacarídica, y escogido entre los monosacáridos, los oligosacáridos, que tienen de 2 a 9 unidades sacarídicas, y los polisacáridos que tienen, como mínimo, 10 unidades sacarídicas
 - F es un grupo fluoróforo soportado por el brazo separador B;
 - I es un grupo inhibidor de la fluorescencia de F; siendo dicho grupo I un sustituyente lateral de, como
- 15 debiéndose entender que ningún enlace covalente conecta directamente el grupo fluoróforo al grupo inhibidor;
- n es un número entero igual a 1 ó 2;
 - B representa un grupo separador autodivisible constituido por una o varias subunidades; encontrándose dicho brazo B fijado en posición anomérica de dicha unidad sacarídica S, encontrándose el enlace anomérico indiferentemente en posición α o β , correspondiéndose dicho brazo B a un lugar reconocido y
- 20 fraccionado por una enzima y que comprende una subunidad B1 escogida entre:
- i) los grupos aromáticos monocíclicos de fórmula (II) siguiente:



25 en la que:

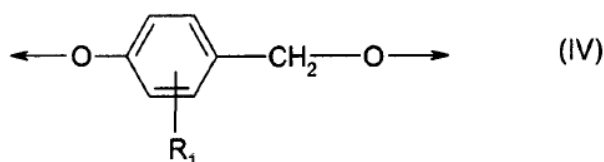
- Fonc es una función química reactiva con respecto a una función química complementaria de un grupo fluoróforo F o bien de un grupo inhibidor de la fluorescencia de un grupo fluoróforo F,
- la flecha que sale del átomo de oxígeno directamente soportada por el ciclo fenilo representa el punto de acoplamiento de dicha subunidad B1 con una unidad sacarídica del brazo separador, con intermedio de un enlace covalente con el átomo de carbono situado en posición 1 anomérica de dicha unidad sacarídica,
- la flecha que sale del átomo de oxígeno enlazada al radical -CH₂- representa el punto de acoplamiento de dicha subunidad B1 con una subunidad B2, escogida entre los grupos aromáticos de fórmula (III) siguiente:



35

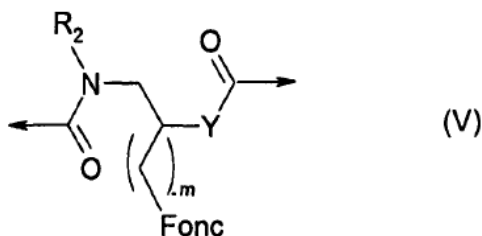
en la que:

- Fonc es una función química reactiva con respecto de una función química complementaria de un grupo inhibidor de la fluorescencia del grupo F o bien de un grupo fluoróforo F;
 - la flecha representa el punto de acoplamiento de dicha subunidad B2 con la subunidad B1 con intermedio de un enlace covalente con el átomo de oxígeno de la subunidad B1,
 - X es O, NH ó S; y
- 45 ii) los grupos aromáticos monocíclicos de fórmula (IV) siguiente:



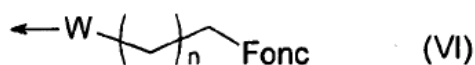
en la que:

- R₁ se escoge entre los grupos nitro, sulfato, amina y amina protegida por un grupo protector,
- la flecha que sale del átomo de oxígeno directamente soportada por el átomo de carbono del ciclo fenilo representa el punto de acoplamiento de dicha subunidad B1 con la unidad sacarídica del brazo separador con intermedio de un enlace covalente con el átomo de carbono situado en posición 1 anomérica de dicha unidad sacarídica,
- la flecha que sale del átomo de oxígeno enlazado al radical -CH₂- representa el punto de acoplamiento de dicha subunidad B1 con una subunidad B2 escogida entre los grupos de fórmula (V) siguiente:



en la que:

- R₂ es un átomo de oxígeno o un radical alquilo en C₁-C₄,
- Fonc es una función química reactiva con respecto de una función química complementaria de un grupo fluoróforo F o bien de un grupo inhibidor de la fluorescencia de un grupo fluoróforo F;
- m es un número entero de 1 a 10;
- Y es O, NH ó S;
- las flechas que representan el punto de acoplamiento de dicha subunidad B2 con, por una parte, la subunidad B1, y por otra, un átomo de nitrógeno o de oxígeno soportado por una subunidad B3 de fórmula (VI) siguiente:



en la que:

- W representa O, NH ó S;
- la flecha representa el punto de acoplamiento del átomo de nitrógeno, de azufre, o de oxígeno, designado por W con intermedio de un enlace covalente con un átomo de carbono de la subunidad B2,
- n es un número entero de 1 a 10;
- Fonc es una función química reactiva con respecto a una función química complementaria de un grupo fluoróforo F o bien de un grupo inhibidor de la fluorescencia de un grupo fluoróforo F.

2. Sustrato, según la reivindicación 1, caracterizado porque las unidades sacarídicas del esqueleto S son escogidas entre galactosa, manosa, idosa, talosa, ramnosa, glucosa, ribosa, fucosa y sus derivados aminados o ácidos.

3. Sustrato, según la reivindicación 2, caracterizado porque los derivados aminados y ácidos de las unidades sacarídicas son escogidos entre la galactosamina, glucosamina, lactosamina, ácido glucurónico, ácido idurónico y ácido siálico.

4. Sustrato, según la reivindicación 2 ó 3, caracterizado porque las unidades sacarídicas del esqueleto S de los sustratos de fórmula (I) son escogidas entre la glucosamina, galactosa y ácido glucurónico.

5. Sustrato, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el esqueleto S es un oligosacárido escogido entre los oligosacáridos que tienen de 4 a 9 unidades sacarídicas.

6. Sustrato, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque Fonc se escoge entre las funciones amina primaria y tiol.

7. Sustrato, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque las subunidades de fórmula (II) son escogidas entre aquellas en las que Fonc está situada en posición orto del átomo de carbono portador del átomo de oxígeno.

8. Sustrato, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque las subunidades de fórmula (III) son escogidas entre aquellas en las que:

- X es un átomo de oxígeno y Fonc es una función amina primaria o tiol,
- X es un átomo de nitrógeno y Fonc es una función amina primaria o tiol.

5 9. Sustrato, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque las subunidades de fórmula (IV) son escogidas entre aquellas en las que R₁ está situado en posición orto del átomo de carbono portador del átomo de oxígeno.

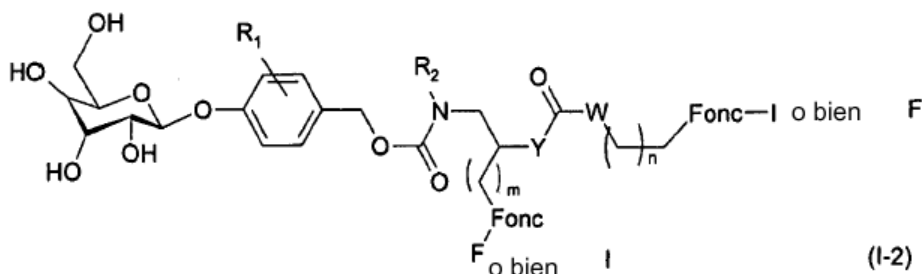
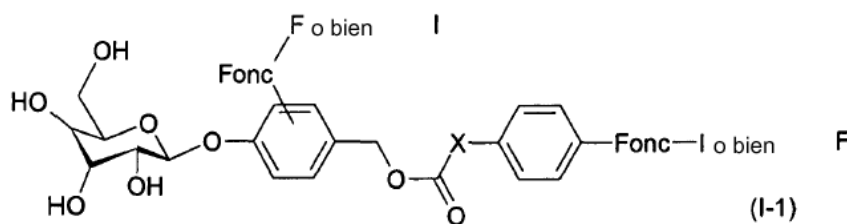
10 10. Sustrato, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque las subunidades de fórmula (V) son escogidas entre aquellas en las que:

- R₂ es un radical metilo, m=1, Fonc es una función amina primaria e Y es un átomo de oxígeno,
- R₂ es un radical metilo, m=1, Fonc es una función amina primaria e Y=NH.

15 11. Sustrato, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque las subunidades de fórmula (VI) son escogidas entre aquellas en las que:

- W es un átomo de oxígeno, n=1, Fonc es una función amina primaria e Y es un átomo de oxígeno,
- W representa NH, n=1, Fonc es una función amina primaria e Y es un átomo de oxígeno,
- W es un átomo de azufre, n=1, Fonc es una función amina primara e Y es un átomo de oxígeno.

20 12. Sustrato, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque se escoge entre los compuestos de fórmulas (I-1) y (1-2) siguientes:



25 en las que F, I, Fonc, X, Y, W, R₁, R₂, m y n tienen las mismas significaciones que las indicadas por las reivindicaciones 1 a 11.

30 13. Sustrato, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque los grupos fluoróforos F son escogidos entre la fluoresceína y sus derivados; los colorantes fluorescentes absorben y emiten en los infrarrojos próximos; las cianinas fluorescentes; la 7-hidroxi-9H-(1,3-dicloro-,9-dimetilacridina-2-ona); la rodamina y sus derivados; colorantes fluorescentes de aminas reactivas; difluoruros de boro de dipirometeno; porfirinas; cianinas; oxacinas; fluoróforos derivados del pireno; derivados diazoicos, derivados de dansilo; eosina; eritrosina y derivados de sulforrodamina; y nanopartículas fluorescentes.

35 14. Sustrato, según la reivindicación 13, caracterizado porque el grupo F es escogido entre los grupos fluoróforos F que absorben y emiten dentro de los infrarrojos próximos.

40 15. Sustrato, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el grupo I es un grupo fluorescente escogido entre los grupos cuya fluorescencia inhibe la del grupo F.

16. Sustrato, según la reivindicación 15, caracterizado porque el grupo I es idéntico al grupo F.

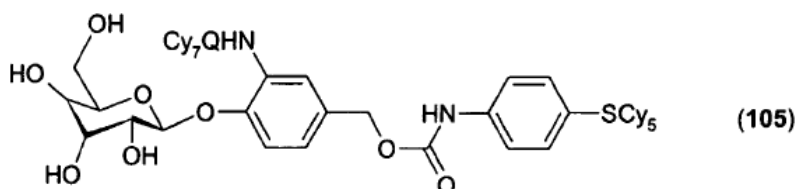
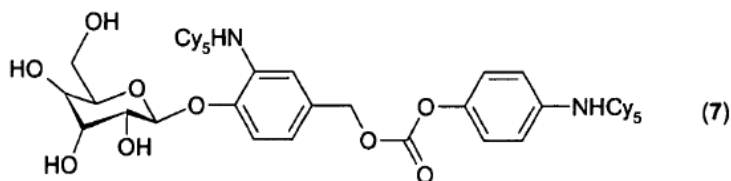
45 17. Sustrato, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, caracterizado porque el grupo I es un grupo fluorescente, diferente del grupo F y que absorbe la fluorescencia del grupo F por transferencia de energía por resonancia de fluorescencia.

18. Sustrato, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque es escogido entre los compuestos de fórmula (I) es los que:

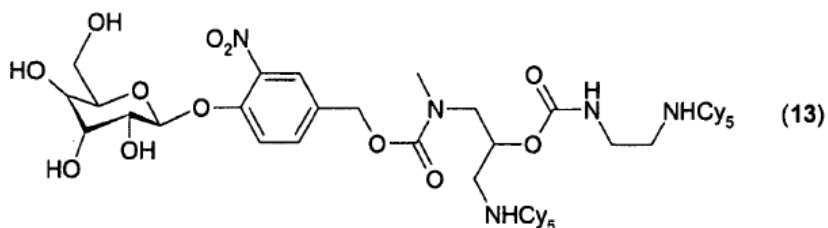
- 5 i) el esqueleto S es una galactosamina, el brazo separador está constituido por una subunidad B1 de fórmula (II) y de una subunidad B2 de fórmula (III) y F e I son idénticos;
 ii) el esqueleto S es una galactosamina, el brazo separador está constituido por una subunidad B1 de fórmula (IV), de una subunidad B2 de fórmula (V) y de una subunidad B3 de fórmula (VI) y F e I son idénticos;
 10 iii) el esqueleto S es una galactosamina, el brazo separador está constituido por una subunidad B1 de fórmula (IV) y de una subunidad B2 de fórmula (III) y F e I son diferentes;

19. Sustrato, según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 17, caracterizado porque los sustratos enzimáticos de fórmula (I-1) son escogidos entre los compuestos siguientes:

15



20. Sustrato, según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 17, caracterizado porque los sustratos enzimáticos de fórmula (I-2) responden a la fórmula siguiente:



21. Utilización de, como mínimo, un sustrato enzimático de fórmula (I), tal como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, a título de reactivo fluorescente para la detección de actividad enzimática *in vitro*.

25

22. Utilización de, como mínimo, un sustrato enzimático de fórmula (I), tal como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, y en el que el grupo fluoróforo F es escogido entre los grupos que absorben y emiten en los infrarrojos próximos, para la preparación de un reactivo de diagnóstico destinado a la formación de imágenes funcional *in vivo*.

30

23. Utilización, según la reivindicación 22, caracterizada porque dicho reactivo está destinado a formación de imágenes, por fluorescencia, de la expresión de los genes informadores LacZ y gusA de *E.coli*.

24. Reactivo de diagnóstico, caracterizado porque comprende, como mínimo, una solución constituida por agua o una mezcla de agua y, como mínimo, un disolvente orgánico, comprendiendo dicha solución, como mínimo, un sustrato enzimático de fórmula (I), tal como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20.

35

25. Reactivo, según la reivindicación 24, caracterizado porque se trata de un reactivo de diagnóstico *in vivo* y que el sustrato enzimático de fórmula (I) comprende, como mínimo, un grupo fluoróforo F escogido entre los grupos fluoróforos que absorben y emiten en los infrarrojos próximos.

40

26. Reactivo, según la reivindicación 24 ó 25, caracterizado porque la concentración del o de los sustratos enzimáticos de fórmula (I) está comprendida entre 1 μM y 1 mM.

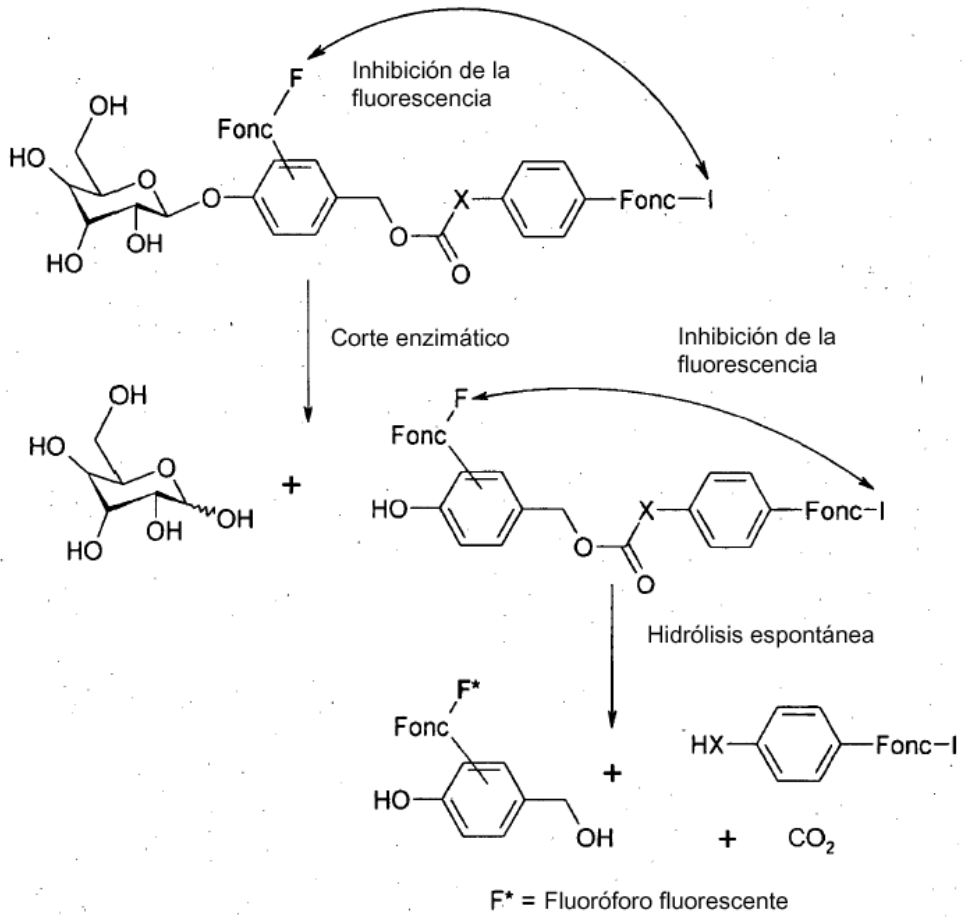


FIGURA 1

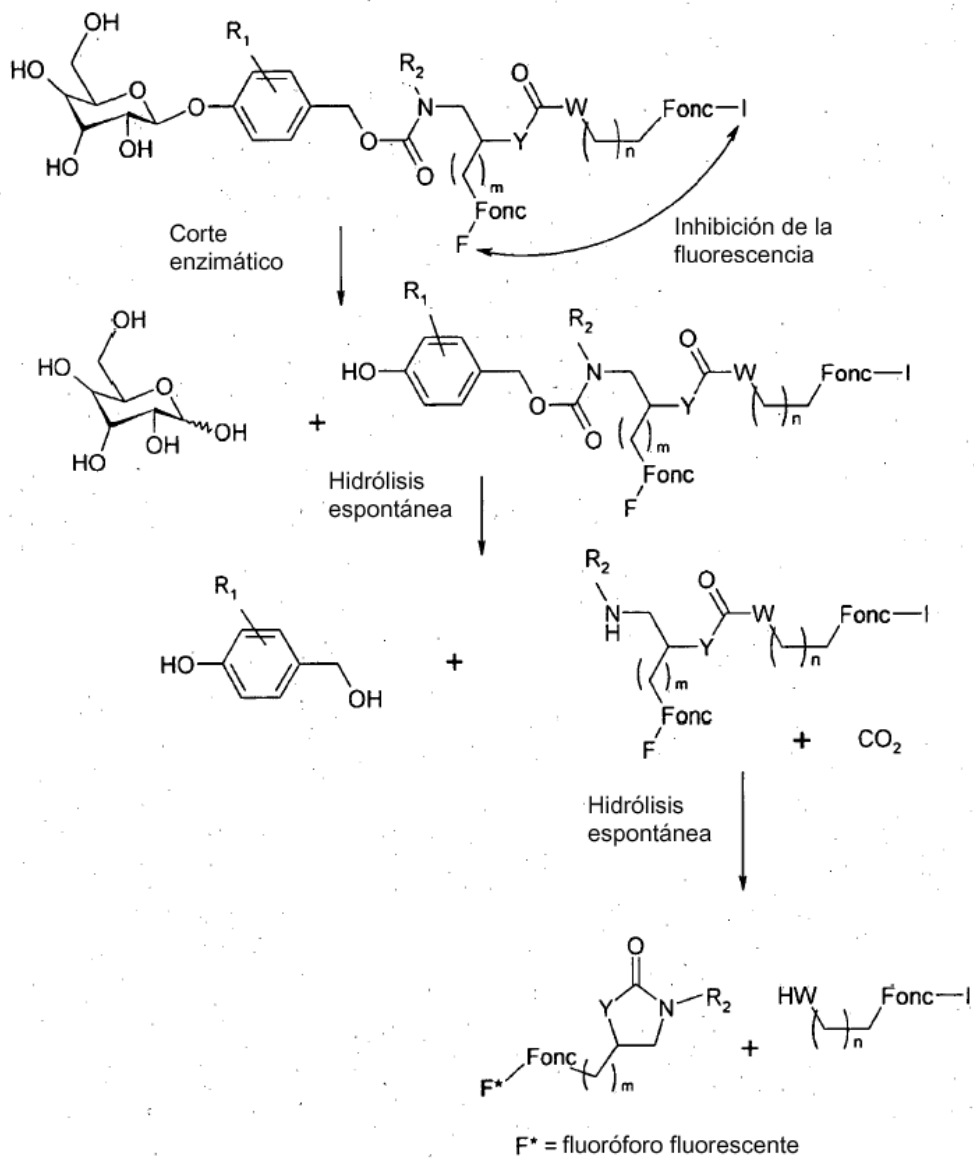


FIGURA 2