

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 527 536**

51 Int. Cl.:

C07C 33/16 (2006.01) **G01N 33/58** (2006.01)

C07C 69/96 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

A61K 49/00 (2006.01)

C07C 29/147 (2006.01)

C07C 29/58 (2006.01)

C07C 29/62 (2006.01)

C07C 67/347 (2006.01)

C07C 271/12 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.04.2011 E 11720197 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.11.2014 EP 2563753**

54 Título: **Compuestos de ciclooctina fusionada y su uso en reacciones clic sin metales**

30 Prioridad:

27.04.2010 US 328306 P
27.04.2010 EP 10161192

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.01.2015

73 Titular/es:

SYNAFFIX B.V. (100.0%)
Molenstraat 110
5342 CC Oss, NL

72 Inventor/es:

VAN DELFT, FLORIS, LOUIS;
RUTJES, FLORIS, PETRUS, JOHANNES,
THEODORUS y
DOMMERHOLT, FREDERIK, JAN

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 527 536 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Compuestos de ciclooctina fusionada y su uso en reacciones clic sin metales

5 Campo de la invención

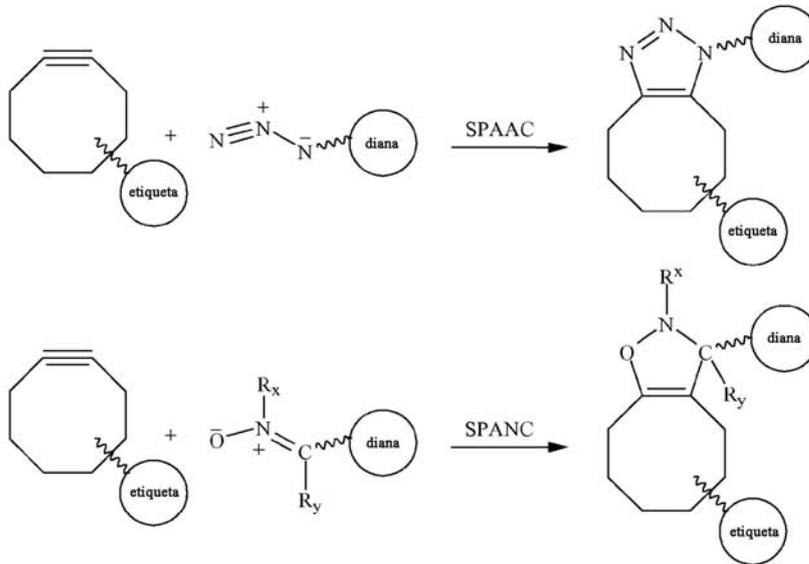
[0001] La invención se refiere a compuestos de ciclooctina fusionada y a un método para su preparación. Los compuestos de ciclooctina fusionada según la invención se pueden utilizar en las reacciones clic sin metales. Por lo tanto, la invención se refiere además a un método para la modificación de una molécula diana mediante la reacción de un conjugado de ciclooctina fusionada con una molécula diana que comprende un 1,3-dipolo o un 1,3-(hetero)dieno. La invención también se refiere al uso de conjugados de ciclooctina en el etiquetado bioortogonal, la formación de imágenes o la modificación de una molécula diana.

15 Antecedentes de la invención

[0002] Un desarrollo revolucionario en el campo en rápida expansión de la "biología química" está relacionado con la química en sistemas vivos. La química en sistemas vivos comprende las reacciones químicas que son progresivas en la naturaleza, pero tan rápidas y eficientes que se producen a pH aproximadamente fisiológico, en el agua, y en la proximidad de funcionalidades biomoleculares. Tales reacciones se pueden agrupar bajo el término "química bioortogonal". En el campo de la química bioortogonal hay dos desafíos principales: primero, el desarrollo de la química adecuada, y segundo, su aplicación en organismos vivos (*in vivo*).

[0003] En el campo de la química, una caja de herramientas enorme de reacciones químicas está disponible y se pueden aplicar a la construcción de moléculas orgánicas complejas. No obstante, la gran mayoría de tales reacciones pueden sólo llevarse a cabo bajo condiciones estrictamente anhidras, en otras palabras, en ausencia completa de agua. Aunque todavía una buena minoría de reacciones químicas se pueden realizar en agua, o en presencia de agua, la mayor parte de estas reacciones pueden sólo aplicarse aún *in vitro* debido a que la interferencia de otros compuestos presentes en el organismo vivo con los productos químicos implicados pueden no ser excluidos. Actualmente, sólo unas pocas reacciones químicas son completamente compatibles con otros grupos funcionales presentes en el organismo vivo.

[0004] Un ejemplo de tal reacción es la cicloadición de alquinas y azidas cíclicas, una de las reacciones es conocida como "reacciones clic". Esta reacción se ha convertido en una herramienta versátil para el etiquetado bioortogonal y la formación de imágenes de biomoléculas (como por ejemplo proteínas, lípidos, glicanos y similares), proteómicos y ciencia de los materiales. En esencia, dos entidades moleculares separadas, una cargada con una azida, y una cargada con un cicloalquino forzado, se unen espontáneamente y forman una única molécula mediante una reacción llamada cicloadición de alquinos y azidas promovida por tensión (SPAAC). La potencia de la SPAAC para el etiquetado bioortogonal radica en el hecho de que una alquina o azida cíclica aislada es completamente inerte a las funcionalidades biológicas, como por ejemplo aminas, tioles, ácidos o carbonilos, pero en combinación sufren una cicloadición rápida e irreversible que lleva a un conjugado de triazol estable. Por ejemplo, las proteínas azidomodificadas, obtenidas por expresión en bacterias auxotróficas, ingeniería genética o conversión química, pueden ser limpiamente etiquetadas con biotina, fluoróforos, cadenas de PEG u otras funcionalidades agitando simplemente la azido-proteína con un conjugado de ciclooctina. Además, el tamaño pequeño de la azida ha demostrado ser altamente útil para la aplicación de SPAAC en la formación de imágenes de biomoléculas específicas mediante la estrategia de indicador químico.



Esquema 1

[0005] Además de las azidas, las ciclooctinas también muestran una alta reactividad con otros dipolos, tales como las nitronas y los óxidos de nitrilo. Por ejemplo, la cicloadición de alquinos y nitronas promovida por tensión (SPANC) se aplicó para la modificación de los N-terminales de las proteínas.

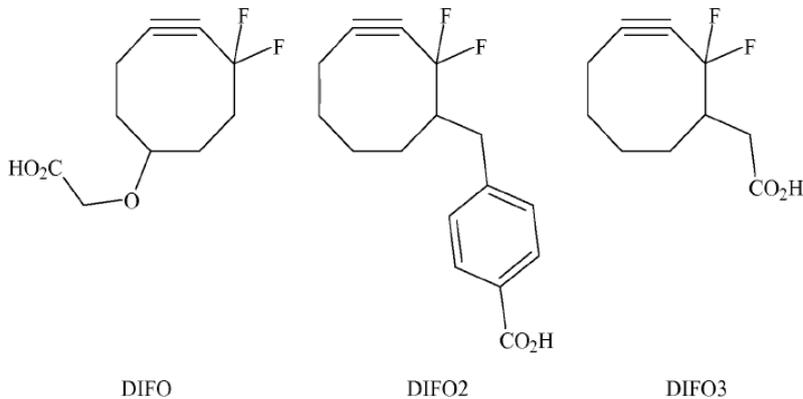
5

[0006] Las reacciones de cicloadición SPAAC y SPANC (esquema 1) ocurren espontáneamente, por lo tanto en ausencia de un catalizador (metal), y éstas y un selecto número de cicloadiciones adicionales son también llamadas "reacciones clic sin metales".

10

[0007] Varias alquinas cíclicas y su aplicación en el etiquetado bioortogonal están descritas en la técnica previa. La US 2009/0068738 se refiere a compuestos de cicloalquino modificado y su uso en biomoléculas de modificación a través de una reacción de cicloadición que se puede llevar a cabo bajo condiciones fisiológicas. La cicloadición implica reaccionar un cicloalquino modificado, como por ejemplo compuestos de ciclooctina difluorinada DIFO, DIF02 y DIF03, con una fracción de azida en una biomolécula diana, generando una biomolécula covalente modificada. Se observó que la sustitución del fluoruro tiene un efecto acelerador en la cicloadición con azida. Por ejemplo DIF03 muestra una velocidad de reacción constante significativamente mejorada de hasta $k = 76 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, frente a un máximo de $2.4 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ en sistemas no fluorinados.

15



20

[0008] WO 2009/064366 divulga composiciones y métodos de uso de los mismos para etiquetar péptidos y proteínas *in vitro* o *in vivo*. Se describen los conjugados donde una ciclooctina fluorinada se conjuga a través de un enlazador de polietilenglicol con un fluoroforo (Cy3 o Alexa Fluor 568) o con biotina.

ES 2 527 536 T3

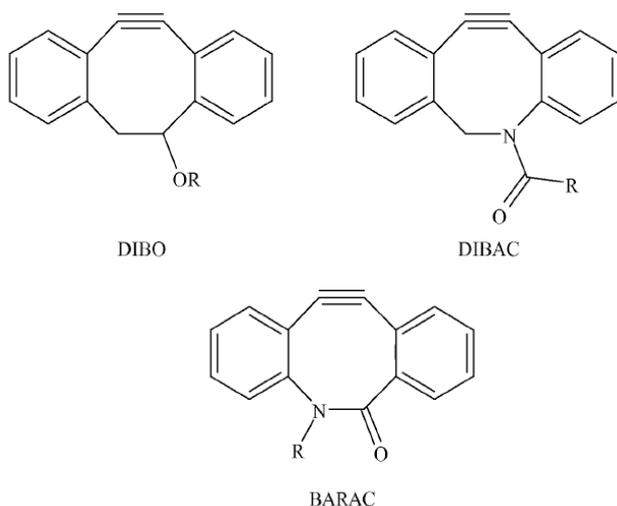
[0009] Las ciclooctinas donde la ciclooctina se fusiona con grupos arilo (sistemas benzanulados) se describen en WO 2009/067663, y la cinética reactiva de estos compuestos de dibenzociclooctina DIBO en la cicloadición con azidas están más mejorados ($k = 0.12 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).

5 [0010] La azadibenzociclooctina DIBAC fue desarrollada por van Delft et al. (Chem. Commun. 2010, 46, 97 - 99), y muestra además la cinética reactiva mejorada en la cicloadición con azidas ($k = 0.31 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).

[0011] Recientemente fue proporcionado otro sistema benzanulado, la biarilazaciclooctinona BARAC, por Bertozzi et al. (J. Am. Chem. Soc. 2010, 132, 3688 - 3690). Colocando la funcionalidad de la amida en el anillo, la cinética reactiva de la cicloadición de BARAC con azidas mejoró significativamente ($k = 0.96 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).

10

[0012] Se descubrió también que DIBO y DIBAC sufren cicloadición rápida con nitronas como describen Pezacki (Chem. Commun. 2010, 46, 931 - 933) y van Delft (Angew. Chem. Int. Ed. 2010, 49, 3065 - 3068), con constantes de velocidad de reacción hasta 300 veces superiores a con azidas.



15

[0013] No obstante, las sondas de ciclooctina para el etiquetado bioortogonal conocidas en la técnica anterior conllevan diferentes desventajas. Ante todo, la aplicación difundida se dificulta por el hecho de que sólo DIBAC está comercialmente disponible. La preparación sintética requiere experiencia química avanzada. Además, la síntesis de las sondas actualmente disponibles es larga (ocho pasos químicos para DIF02, diez pasos para DIF03, nueve pasos para DIBAC), y/o de producción baja (10% total para DIBO). En tercer lugar, la presencia de las dos fracciones de arilo benzanulado en DIBO y DIBAC infligen ambas repulsión estérica seria al igual que carácter lipofílico. El carácter lipofílico de DIBO y DIBAC puede llevar a la unión de proteínas inespecíficas por interacciones de van der Waals, lo cual es indeseable.

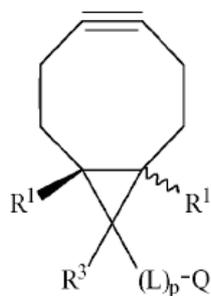
20

[0014] Por lo tanto, existe una demanda clara de sondas bioortogonales nuevas fácilmente accesibles y reactivas para su uso en reacciones clic sin metales, tal como la cicloadición 1,3-dipolar con azidas, nitronas y otros 1,3-dipolos.

25 Resumen de la invención

30

[0015] En un primer aspecto, la invención se refiere a un compuesto de la Fórmula (IIa):



(IIa)

donde:

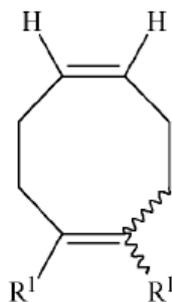
- 5 p es 0 o 1;
 R^3 se selecciona del grupo consistente en $[(L)_p-Q]$, hidrógeno, halógeno, grupos alquilo $C_1 - C_{24}$, grupos (hetero)arilo $C_6 - C_{24}$, grupos alquil(hetero)arilo $C_7 - C_{24}$ y grupos (hetero)arilalquilo $C_7 - C_{24}$, los grupos alquilo siendo interrumpidos opcionalmente por uno de varios heteroátomos seleccionados del grupo consistente en O, N y S, donde los grupos alquilo, grupos (hetero)arilo, grupos alquil(hetero)arilo y grupos (hetero)arilalquilo son opcionalmente
 10 independientemente sustituidos con uno o varios sustituyentes independientemente seleccionados del grupo consistente en grupos alquilo $C_1 - C_{12}$, grupos alquenoilo $C_2 - C_{12}$, grupos alquinoilo $C_2 - C_{12}$, grupos cicloalquilo $C_3 - C_{12}$, grupos alcoxi $C_1 - C_{12}$, grupos alquenoiloxi $C_2 - C_{12}$, grupos alquinoiloxi $C_2 - C_{12}$, grupos cicloalquiloxi $C_3 - C_{12}$, halógenos, grupos amino, grupos oxo y grupos sililo, donde los grupos alquilo, grupos alquenoilo, grupos alquinoilo, grupos cicloalquilo, grupos alcoxi, grupos alquenoiloxi, grupos alquinoiloxi y grupos cicloalquiloxi son opcionalmente sustituidos, los grupos alquilo, los grupos alcoxi, los grupos cicloalquilo y los grupos cicloalcoxi siendo opcionalmente interrumpidos por uno de varios heteroátomos seleccionados del grupo consistente en O, N y S, donde los grupos sililo se representan con la fórmula $(R^4)_3Si-$, donde R^4 se selecciona independientemente del grupo consistente en grupos alquilo $C_1 - C_{12}$, grupos alquenoilo $C_2 - C_{12}$, grupos alquinoilo $C_2 - C_{12}$, grupos cicloalquilo $C_3 - C_{12}$, grupos alcoxi $C_1 - C_{12}$, grupos alquenoiloxi $C_2 - C_{12}$, grupos alquinoiloxi $C_2 - C_{12}$ y grupos cicloalquiloxi $C_3 - C_{12}$, donde los grupos alquilo, grupos alquenoilo, grupos alquinoilo, grupos cicloalquilo, grupos alcoxi, grupos alquenoiloxi, grupos alquinoiloxi y grupos cicloalquiloxi son opcionalmente sustituidos, los grupos alquilo, los grupos alcoxi, los grupos cicloalquilo y los grupos cicloalcoxi siendo opcionalmente interrumpidos por uno de más heteroátomos seleccionados del grupo consistente en O, N y S;
 L es un grupo de unión seleccionado de entre grupos alquilenilo $C_1 - C_{24}$, grupos alquenoileno $C_2 - C_{24}$, grupos alquinoileno $C_2 - C_{24}$, grupos cicloalquilenilo $C_3 - C_{24}$, grupos cicloalquenoileno $C_5 - C_{24}$, grupos cicloalquinoileno $C_8 - C_{24}$, grupos alquil(hetero)arileno $C_7 - C_{24}$, grupos (hetero)arilalquilenilo $C_7 - C_{24}$, grupos (hetero)arilalquenoileno $C_8 - C_{24}$, grupos (hetero)arilalquinoileno $C_9 - C_{24}$ lineales o ramificados, los grupos alquilenilo, grupos alquenoileno, grupos alquinoileno, grupos cicloalquilenilo, grupos cicloalquenoileno, grupos cicloalquinoileno, grupos alquil(hetero)arileno, grupos (hetero)arilalquilenilo, grupos (hetero)arilalquenoileno y grupos (hetero)arilalquinoileno siendo opcionalmente sustituidos con uno o varios sustituyentes independientemente seleccionados del grupo consistente en grupos alquilo $C_1 - C_{12}$, grupos alquenoilo $C_2 - C_{12}$, grupos alquinoilo $C_2 - C_{12}$, grupos cicloalquilo $C_3 - C_{12}$, grupos cicloalquenoilo $C_5 - C_{12}$, grupos cicloalquinoilo $C_8 - C_{12}$, grupos alcoxi $C_1 - C_{12}$, grupos alquenoiloxi $C_2 - C_{12}$, grupos alquinoiloxi $C_2 - C_{12}$, grupos cicloalquiloxi $C_3 - C_{12}$, halógenos, grupos amino, grupos oxo y sililo, donde los grupos sililo se pueden representar con la fórmula $(R^4)_3Si-$, donde R^4 se define como anteriormente;
 Q es un grupo funcional seleccionado del grupo consistente en hidrógeno, halógeno, R^6 , $-CH=C(R^6)_2$, $-C\equiv CR^6$, $-[C(R^6)_2C(R^6)_2O]_q-R^6$, donde q está dentro del rango de 1 a 200, $-CN$, $-N_3$, $-NCX$, $-XCX$, $-XR^6$, $-N(R^6)_2$, $-N(R^6)_3$, $-C(X)N(R^6)_2$, $-C(R^6)_2XR^6$, $-C(X)R^6$, $-C(X)XR^6$, $-S(O)R^6$, $-S(O)_2R^6$, $-S(O)OR^6$, $-S(O)_2OR^6$, $-S(O)N(R^6)_2$, $-S(O)_2N(R^6)_2$, $-OS(O)R^6$, $-OS(O)_2R^6$, $-OS(O)OR^6$, $-OS(O)_2OR^6$, $-P(O)(R^6)(OR^6)$, $-P(O)(OR^6)_2$, $-OP(O)(OR^6)_2$, $-Si(R^6)_3$, $-XC(X)R^6$, $-XC(X)XR^6$, $-XC(X)N(R^6)_2$, $-N(R^6)C(X)R^6$, $-N(R^6)C(X)XR^6$ y $-N(R^6)C(X)N(R^6)_2$, donde X es oxígeno o azufre y donde R^6 se selecciona independientemente del grupo consistente en hidrógeno, halógeno, grupos alquilo $C_1 - C_{24}$, grupos (hetero)arilo $C_6 - C_{24}$, grupos alquil(hetero)arilo $C_7 - C_{24}$ y grupos (hetero)arilalquilo $C_7 - C_{24}$; y

R^1 es independientemente seleccionado del grupo consistente en hidrógeno, grupos alquilo $C_1 - C_{24}$, grupos (hetero)arilo $C_6 - C_{24}$, grupos alquil(hetero)arilo $C_7 - C_{24}$ y grupos (hetero)arilalquilo $C_7 - C_{24}$.

- 45 [0016] La presente invención se refiere además a un conjugado, tal como un conjugado de ciclooctina, donde un compuesto de la Fórmula (IIa) se conjuga a una etiqueta a través de un grupo funcional Q.

[0017] Otro aspecto de la presente invención es proporcionar un método para preparar un compuesto de la Fórmula (IIa), el método incluye las etapas de:

- 5 (a) Ciclopropanación de un ciclooctadieno de la Fórmula (VIIa):



(VIIa)

donde:

- 10 R¹ se selecciona independientemente del grupo consistente en hidrógeno, grupos alquilo C₁ - C₂₄, grupos (hetero)arilo C₆ - C₂₄, grupos alquil(hetero)arilo C₇ - C₂₄ y grupos (hetero)arilalquilo C₇ - C₂₄;

para formar un compuesto de cicloocteno bicíclico,

- 15 (b) Brominación del compuesto de cicloocteno bicíclico obtenido para formar un compuesto de ciclooctano bicíclico, y
(c) Deshidrobrominación del compuesto de ciclooctano bicíclico obtenido para formar un compuesto de la Fórmula (IIa).

[0018] La presente invención también se refiere a un método para la modificación de una molécula diana, donde un conjugado según la invención reacciona con un compuesto que comprende un 1,3-dipolo o un 1,3-(hetero)dieno.

- 20 [0019] Otro aspecto de la presente invención es el uso de un conjugado según la invención para el etiquetado bioortogonal, la formación de imágenes o la modificación, tal como por ejemplo modificación de la superficie, de una molécula diana.

- 25 [0020] Finalmente, la invención se refiere a una composición que comprende un conjugado según la invención, que comprende además un portador farmacéuticamente aceptable.

Descripción de las figuras

- 30 [0021]

La Figura 1 representa el análisis SDS-PAGE de la reacción SPAAC de proteína cápsida etiquetada con azida con una ciclooctina conjugada con Alexa Fluor 555 (izquierda) y de la reacción en blanco (derecha).

- 35 La Figura 2 representa el espectro de masa ESI-TOF de proteína cápsida funcionalizada con una ciclooctina conjugada con Alexa Fluor 555.

La Figura 3 representa el análisis FPLC de proteína de cápsida funcional con una ciclooctina conjugada con Alexa Fluor 555.

- 40 La Figura 4 representa la fluorescencia de la superficie celular en células MV3 intactas tras la incorporación metabólica de Ac₄ManNAz, etiquetando con DIBO-biotina o BCN-biotina, y la detección con estreptavidina conjugada con Alexa Fluor 488 como se determina con la citometría de flujo.

La Figura 5 representa las intensidades de fluorescencia y la viabilidad celular de células MV3 tras la incorporación metabólica de Ac₄ManNAz, etiquetando con DIBO-biotina o BCN-biotina, y la detección con estreptavidina conjugada con Alexa Fluor 488.

- 45 La Figura 6 representa imágenes confocales representativas de células etiquetadas, previamente cultivadas en ausencia o presencia de Ac₄ManNAz (50 μM), etiquetando con DIBO-biotina o BCN-biotina, y la detección con estreptavidina conjugada con Alexa Fluor 488.

Descripción detallada de la invención

ES 2 527 536 T3

Definiciones

- 5 [0022] El verbo "comprender" y sus conjugaciones como se usan en esta descripción y en las reivindicaciones, se usan no en su sentido limitante para referirse a que los artículos que siguen a la palabra están incluidos, sino a que los artículos no específicamente mencionados no están excluidos.
- 10 [0023] Además, la referencia a un elemento por el artículo indefinido "un" no excluye la posibilidad de que más de un elemento esté presente, a menos que el contexto requiera claramente que haya uno y sólo uno de los elementos. El artículo indefinido "un" normalmente significa "al menos uno".
- 15 [0024] Los compuestos descritos en esta descripción y en las reivindicaciones pueden ser descritos como compuestos de ciclooctina fusionada, es decir, compuestos de ciclooctina donde una segunda estructura anular se fusiona con la fracción de ciclooctina. El triple enlace de la fracción de ciclooctina en un compuesto de ciclooctina fusionada se puede localizar en cada una de las tres ubicaciones posibles, es decir en la posición 2, 3 o 4 de la fracción de ciclooctina (numeración según la "Nomenclatura de Química Orgánica IUPAC", Regla A31.2). La descripción de cualquier compuesto de ciclooctina fusionada en esta descripción y en las reivindicaciones pretende incluir los tres regioisómeros individuales de la fracción de ciclooctina.
- 20 [0025] Los compuestos descritos en esta descripción y en las reivindicaciones pueden comprender uno o varios centros asimétricos, y pueden existir diferentes diastereómeros y/o enantiómeros de los compuestos. La descripción de cualquier compuesto en esta descripción y en las reivindicaciones pretende incluir todos los diastereómeros y sus mezclas derivadas, a menos que se establezca lo contrario. Además, la descripción de cualquier compuesto en esta descripción y en las reivindicaciones pretende incluir tanto los enantiómeros individuales, como cualquier mezcla, racémica u otra diferente, de los enantiómeros, a menos que se establezca lo contrario. Cuando la estructura de un compuesto se representa como un enantiómero específico, debe entenderse que la invención de la presente aplicación no está limitada a ese enantiómero específico.
- 25 [0026] Los compuestos pueden ocurrir en diferentes formas tautoméricas. Los compuestos según la invención pretenden incluir todas formas tautoméricas, a menos que se establezca lo contrario.
- 30 [0027] Los compuestos descritos en esta descripción y en las reivindicaciones pueden existir además como *exo* y *endoregioisómeros*. A menos que se establezca lo contrario, la descripción de cualquier compuesto en la descripción y en las reivindicaciones pretende incluir tanto el *exoregioisómero* individual como el *endoregioisómero* individual de un compuesto, al igual que sus mezclas derivadas.
- 35 [0028] Además, los compuestos descritos en esta descripción y en las reivindicaciones pueden existir como isómeros *cis* y *trans*. A menos que se establezca lo contrario, la descripción de cualquier compuesto en la descripción y en las reivindicaciones pretende incluir el isómero *cis* individual y el isómero *trans* individual de un compuesto, al igual que sus mezclas derivadas. Como ejemplo, cuando la estructura de un compuesto se representa como un isómero *cis*, debe entenderse que el correspondiente isómero *trans* o mezclas del isómero *cis* y *trans* no se excluyen de la invención de la presente solicitud.
- 40 [0029] Los grupos alquilo no sustituidos tienen la fórmula general C_nH_{2n+1} y pueden ser lineales o ramificados. Los grupos alquilo no sustituidos también pueden contener una fracción cíclica, y por tanto tienen la fórmula general concomitante C_nH_{2n-1} . Opcionalmente, los grupos alquilo se sustituyen por uno o varios sustituyentes además especificados en este documento. Los ejemplos de grupos alquilo adecuados incluyen, pero no se limitan a, metilo, etilo, propilo, 2-propilo, t-butilo, 1-hexilo, 1-dodecilo y similares.
- 45 [0030] Los grupos alqueno no sustituidos tienen la fórmula general C_nH_{2n-1} , y pueden ser lineales o ramificados. Los ejemplos de grupos alqueno adecuados incluyen, pero se limitan a, etenilo, propenilo, isopropenilo, butenilo, pentenilo, decenilo, octadecenilo, y icosenilo y similares. Los grupos alqueno no sustituidos también pueden contener una fracción cíclica, por tanto tienen la fórmula general concomitante C_nH_{2n-3} .
- 50 [0031] Los alquenos no sustituidos tienen la fórmula general C_nH_{2n} mientras que las alquinas no sustituidas tienen la fórmula general C_nH_{2n-2} .
- 55 [0032] Los grupos arilo comprenden al menos seis átomos de carbono y pueden incluir estructuras monocíclicas, bicíclicas y policíclicas. Opcionalmente, los grupos arilo se pueden sustituir por uno o varios sustituyentes especificados además en este documento. Los ejemplos de grupos arilo incluyen grupos como por ejemplo fenilo, naftilo, antracilo y similares.
- 60

[0033] Los grupos arilalquilo y los grupos alquilarilo comprenden al menos siete átomos de carbono y pueden incluir estructuras monocíclicas y bicíclicas. Opcionalmente, los grupos arilo se pueden sustituir por uno o varios sustituyentes especificados además en este documento. Un grupo arilalquilo es por ejemplo el bencilo y similares. Un grupo alquilarilo es por ejemplo 4-t-butilfenilo y similares.

[0034] Donde un grupo arilo se denomina como un grupo (hetero)arilo, la notación pretende incluir un grupo arilo y un grupo heteroarilo. De forma similar, un grupo alquil(hetero)arilo pretende incluir un grupo alquilarilo y un grupo alquilheteroarilo, y (hetero)arilalquilo pretende incluir un grupo arilalquilo y un grupo heteroarilalquilo.

[0035] Un grupo heteroarilo comprende de uno a cuatro heteroátomos seleccionados del grupo consistente en oxígeno, nitrógeno y azufre.

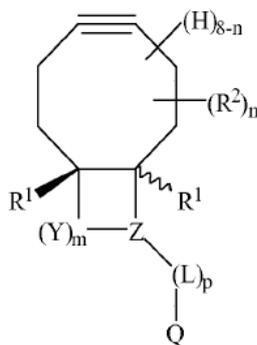
Compuestos de ciclooctina fusionada

[0036] Basado en el hecho de que la reactividad de las cicloalquinas aumenta conforme decrece el tamaño del anillo, los conjugados de cicloalquinas con menos de ocho átomos de carbono serían de gran interés para la aplicación en la química bioortogonal. Desafortunadamente, hasta la fecha el cicloheptino y los anillos menores no pueden ser aislados en la forma pura, debido a la energía de tensión en aumento como resultado de la desviación del ángulo ideal 180° $C-C\equiv C$.

[0037] Una vía alternativa para aumentar la energía de tensión es mediante la benzanulación de la ciclooctina para los grupos arilo, estrategia seguida en WO 2009/067663 para DIBO. La energía de tensión puede luego además mejorarse mediante la introducción de otro átomo tipo sp^2 en el anillo, método seguido por van Delft para DIBAC y por Bertozzi para BARAC. No obstante, como fue mencionado anteriormente, la presencia de dos fracciones de arilo en la ciclooctina no solo da lugar a una repulsión estérica seria, sino que también aumenta el carácter lipofílico de los compuestos de ciclooctina, lo cual es indeseado.

[0038] Los presentes inventores descubrieron que una vía altamente eficaz para inducir la tensión del anillo adicional implica la fusión de una ciclooctina con un anillo de 3 o 4 miembros, conduciendo a compuestos de ciclooctina fusionada, más particularmente a sistemas de biciclo[6.1.0]nonina y biciclo[6.2.0]decina, respectivamente. Estos sistemas bicíclicos están sorprendentemente bien adecuados como sondas bioortogonales, ya que combinan estabilidad relativa con alta reactividad en cicloadiciones (3+2) con 1,3-dipolos y en reacciones (hetero) Diels-Alder con 1,3-(hetero)dienos. Además, la estructura anular de 3 o 4 miembros fusionada, además de infligir tensión al anillo, es también perfectamente adecuada para la posición de un mango para la conjugación de grupos funcionales y/o etiquetas y pueden ser convenientemente funcionales para aplicaciones tal como el etiquetado bioortogonal, la formación de imágenes y/o la modificación, tal como por ejemplo modificación de la superficie, de moléculas diana.

[0039] Los compuestos de ciclooctina fusionada son los compuestos de la Fórmula general (Ia),



(Ia)

donde:

m es 0 o 1;

n es de 0 a 8;

p es 0 o 1;

Z es N o $C(R^3)$, donde R^3 se selecciona del grupo consistente en $[(L)_p-Q]$, hidrógeno, halógeno, grupos alquilo $C_1 - C_{24}$,

ES 2 527 536 T3

[0043] Preferiblemente, Q se selecciona del grupo consistente en $-\text{CN}$, $-\text{N}_3$, $-\text{NCX}$, $-\text{XCN}$, $-\text{XR}^6$, $-\text{N}(\text{R}^6)_2$, $-\text{N}^+(\text{R}^6)_3$, $-\text{C}(\text{X})\text{N}(\text{R}^6)_2$, $-\text{C}(\text{R}^6)_2\text{XR}^6$, $-\text{C}(\text{X})\text{R}^6$, $-\text{C}(\text{X})\text{XR}^6$, $-\text{XC}(\text{X})\text{R}^6$, $-\text{XC}(\text{X})\text{XR}^6$, $-\text{XC}(\text{X})\text{N}(\text{R}^6)_2$, $-\text{N}(\text{R}^6)\text{C}(\text{X})\text{R}^6$, $-\text{N}(\text{R}^6)\text{C}(\text{X})\text{XR}^6$ y $-\text{N}(\text{R}^6)\text{C}(\text{X})\text{N}(\text{R}^6)_2$, donde X y R^6 son tal como se ha definido anteriormente. De forma más preferible, X es oxígeno. De la forma más preferible, Q se selecciona del grupo consistente en $-\text{OR}^6$, $-\text{N}(\text{R}^6)_2$, $-\text{N}^+(\text{R}^6)_3$, $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^6)_2$, $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^6$, $-\text{OC}(\text{O})\text{R}^6$, $-\text{OC}(\text{O})\text{OR}^6$, $-\text{OC}(\text{O})\text{N}(\text{R}^6)_2$, $-\text{N}(\text{R}^6)\text{C}(\text{O})\text{R}^6$, $-\text{N}(\text{R}^6)\text{C}(\text{O})\text{OR}^6$ y $-\text{N}(\text{R}^6)\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^6)_2$. Además, el grupo funcional Q puede opcionalmente ser enmascarado o protegido. Los grupos R^6 se pueden seleccionar independientemente entre sí, lo que significa que los dos grupos R^6 presentes en, por ejemplo, un $-\text{N}(\text{R}^6)_2$ sustituyente puede ser diferente entre sí.

[0044] En una forma de realización, p es 0, es decir Q está unido directamente a Z. En otra forma de realización, p es 1. En otra forma de realización, p es 1 y L es CH_2 .

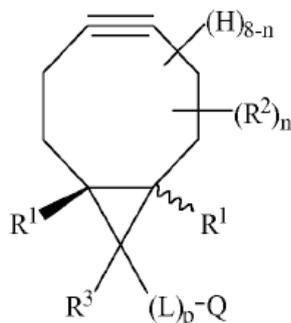
[0045] En una forma de realización preferida, R^1 es hidrógeno.

[0046] En otra forma de realización preferida, n es 0. En otra forma de realización preferida, R^2 es un grupo de retirada de electrones, es decir un grupo con un valor positivo para la constante sustituyente Hammett σ . Los grupos de retirada de electrones adecuados son conocidos por los expertos en la técnica, e incluyen por ejemplo halógeno (en particular F), $-\text{OR}^6$, $-\text{NO}_2$, $-\text{CN}$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}^6$, grupos alquilo sustituidos $\text{C}_1 - \text{C}_{12}$, grupos arilo sustituidos $\text{C}_1 - \text{C}_{12}$ o grupos alquilarilo sustituidos $\text{C}_1 - \text{C}_{12}$, donde los sustituyentes son grupos de retirada de electrones. Preferiblemente, los grupos alquilo, grupos arilo y grupos alquilarilo sustituidos son grupos alquilo fluorinados $\text{C}_1 - \text{C}_{12}$ (tal como por ejemplo $-\text{CF}_3$), grupos arilo fluorinados $\text{C}_1 - \text{C}_{12}$ (tal como por ejemplo $-\text{C}_6\text{F}_5$) o grupos alquilarilo fluorinados $\text{C}_1 - \text{C}_{12}$ (tal como por ejemplo $-\text{[3,5-(CF}_3)_2(\text{C}_6\text{H}_3)]$).

Compuestos con $m = 0$ y $\text{Z} = \text{CR}^3$

[0047] Una clase específica de compuestos es la clase de compuestos según la Fórmula (Ia), donde la fracción de ciclooctina se fusiona con una estructura anular de tres miembros. En esta clase de compuestos, m, tal como se ha definido anteriormente, es 0.

[0048] Preferiblemente, Z es $\text{C}(\text{R}^3)$, donde R^3 es tal como se ha definido anteriormente. La presente invención por lo tanto se refiere a un compuesto según la Fórmula (IIa):



(IIa)

donde n, p, R^1 , R^2 , R^3 , L y Q son tal como se ha definido anteriormente para los compuestos de la Fórmula (Ia).

[0049] Como ya se ha mencionado anteriormente, el sustituyente $-\text{[(L)}_p\text{-Q]}$ en los compuestos de la Fórmula (IIa), se puede situar *exo* o *endo* con respecto al anillo de ciclooctina, y los dos sustituyentes R^1 se pueden situar en una posición *cis* o *trans* una con respecto a la otra. En una forma de realización preferida, los sustituyentes R^1 están en una posición *cis*.

[0050] En una forma de realización, p es 0, es decir Q se une directamente al anillo de ciclopropilo. En otra forma de realización, p es 1. En otra forma de realización, p es 1 y L es CH_2 .

[0051] También en compuestos de la Fórmula (IIa), tanto cuando p es 0 como cuando p es 1, Q se selecciona preferiblemente del grupo consistente en $-\text{CN}$, $-\text{N}_3$, $-\text{NCX}$, $-\text{XCN}$, $-\text{XR}^6$, $-\text{N}(\text{R}^6)_2$, $-\text{N}^+(\text{R}^6)_3$, $-\text{C}(\text{X})\text{N}(\text{R}^6)_2$, $-\text{C}(\text{R}^6)_2\text{XR}^6$,

$-C(X)R^6$, $-C(X)XR^6$, $-XC(X)R^6$, $-XC(X)XR^6$, $-XC(X)N(R^6)_2$, $-N(R^6)C(X)R^6$, $-N(R^6)C(X)XR^6$ y $-N(R^6)C(X)N(R^6)_2$, donde X y R^6 son tal como se ha definido anteriormente. De forma más preferible, X es oxígeno. De la forma más preferible, Q se selecciona del grupo consistente en $-OR^6$, $-N(R^6)_2$, $-N(R^6)_3$, $-C(O)N(R^6)_2$, $-C(O)OR^6$, $-OC(O)R^6$, $-OC(O)OR^6$, $-OC(O)N(R^6)_2$, $-N(R^6)C(O)R^6$, $-N(R^6)C(O)OR^6$ y $-N(R^6)C(O)N(R^6)_2$. Además, el grupo funcional Q puede opcionalmente ser enmascarado o protegido. Los grupos R^6 se pueden seleccionar independientemente entre sí, lo que significa que los dos grupos R^6 presentes en, por ejemplo, un sustituyente $-N(R^6)_2$ pueden ser diferentes entre sí. En una forma de realización preferida, Q es $-OR^6$, preferiblemente $-OH$. En otra forma de realización preferida, Q es $-C(O)OR^6$.

[0052] En otra forma de realización preferida, R^3 es hidrógeno o $[(L)_p-Q]$.

[0053] En una forma de realización preferida, R^1 es hidrógeno.

[0054] En otra forma de realización preferida, n es 0. En otra forma de realización preferida, R^2 es un grupo de retirada de electrones, es decir un grupo con un valor positivo para la constante del sustituyente de Hammett σ . Los grupos de retirada de electrones adecuados son conocidos por un experto en la técnica, e incluyen por ejemplo halógeno (en particular F), $-OR^6$, $-NO_2$, $-CN$, $-S(O)_2R^6$, grupos alquilo sustituidos $C_1 - C_{12}$, grupos arilo sustituidos $C_1 - C_{12}$ o grupos alquilarilo sustituidos $C_1 - C_{12}$, donde los sustituyentes son grupos de retirada de electrones. Preferiblemente, los grupos alquilo, grupos arilo y grupos alquilarilo sustituidos son grupos alquilo fluorinados $C_1 - C_{12}$ (como por ejemplo $-CF_3$), grupos arilo fluorinados $C_1 - C_{12}$ (como por ejemplo $-C_6F_5$) o grupos alquilarilo fluorinados $C_1 - C_{12}$ (como por ejemplo $-[3,5-(CF_3)_2(C_6H_3)]$).

[0055] Los compuestos de la Fórmula (IIa) son preferidos debido a que pueden poseer un eje o un plano de simetría, reduciendo así el número de regioisómeros potenciales que se pueden formar.

[0056] Una forma de realización donde p es 1, L es CH_2 , Q es $-OH$, R^1 es hidrógeno, R^3 es hidrógeno o $[(L)_p-Q]$ y n es 0, es particularmente preferida.

Conjugados

[0057] Los compuestos de ciclooctina fusionada según la presente invención son muy adecuados para su uso en las reacciones clic sin metales, y en consecuencia estos compuestos son herramientas versátiles en aplicaciones tal como por ejemplo el etiquetado bioortogonal, la formación de imágenes y/o la modificación, incluyendo la modificación de la superficie, de un rango grande de moléculas diana. Se proporciona un conjugado donde un compuesto de la Fórmula (Ia) se conjuga a una etiqueta a través de un grupo funcional Q.

[0058] El término "etiqueta" se refiere a cualquier marca identificativa que se puede conjugar con un compuesto de la Fórmula (Ia). Se conoce una amplia variedad de etiquetas en la técnica, para una amplia variedad de aplicaciones diferentes. Dependiendo de la aplicación específica, se puede seleccionar una etiqueta adecuada para esta aplicación específica. Se conocen etiquetas adecuadas para aplicaciones específicas por los expertos en la técnica, e incluyen, pero de forma no limitante, todos los tipos de fluoróforos, biotina, cadenas de polietilenglicol (PEG), cadenas de polipropilenglicol (PPG), cadenas mixtas de polietilenglicol/polipropilenglicol, isótopos radiactivos, esteroides, compuestos farmacéuticos, lípidos, péptidos, glicanos (incluyendo oligosacáridos y polisacáridos), nucleótidos (incluyendo oligonucleótidos y polinucleótidos) y etiquetas peptídicas. Ejemplos de fluoróforos adecuados son por ejemplo todos los tipos de Alexa Fluor (por ejemplo Alexa Fluor 555), tintes de cianina (por ejemplo Cy3 o Cy5), derivados de cumarina, fluoresceína, rodamina, alofocianina, cromomicina, etcétera. Ejemplos de etiquetas peptídicas adecuadas incluyen etiquetas FLAG o HIS. Un ejemplo de un glicano adecuado es la concanavalina. Preferiblemente, la etiqueta se selecciona del grupo que comprende fluoróforos, biotina, cadenas de polietilenglicol, cadenas de polipropilenglicol, cadenas mixtas de polietilenglicol/polipropilenglicol, isótopos radiactivos, esteroides, compuestos farmacéuticos, lípidos, péptidos, glicanos, nucleótidos y etiquetas peptídicas.

[0059] El grupo funcional Q se puede conectar a la etiqueta directamente, o indirectamente a través de un enlazador o unidad de conexión. Las unidades de conexión son bien conocidas en la técnica, y tienen la estructura general Q-S-Q, donde Q es tal como se ha definido anteriormente, y S se selecciona del grupo consistente en grupos alquileo $C_1 - C_{200}$, grupos alquilenilo $C_2 - C_{200}$, grupos alquinileno $C_2 - C_{200}$, grupos cicloalquileo $C_3 - C_{200}$, grupos cicloalquilenilo $C_5 - C_{200}$, grupos cicloalquinileno $C_8 - C_{200}$, grupos alquilarileno $C_7 - C_{200}$, grupos arilalquileo $C_7 - C_{200}$, grupos arilalquilenilo $C_8 - C_{200}$, grupos arilalquinileno $C_9 - C_{200}$ lineales o ramificados. Opcionalmente los grupos alquileo, grupos alquilenilo, grupos alquinileno, grupos cicloalquileo, grupos cicloalquilenilo, grupos cicloalquinileno, grupos alquilarileno, grupos arilalquileo, grupos arilalquilenilo y grupos arilalquinileno pueden ser sustituidos, y opcionalmente dichos grupos se pueden interrumpir por uno o varios heteroátomos, preferiblemente de 1 a 100 heteroátomos, dichos heteroátomos siendo preferiblemente seleccionados del grupo consistente en O, S y NR^6 , donde R^6 se define como anteriormente. De

la forma más preferible, el heteroátomo es O.

[0060] Ejemplos de unidades de conexión adecuados incluyen, pero no de forma limitante, diaminas de (poli)etilenglicol (como por ejemplo 1,8-diamino-3,6-dioxaoctano o equivalentes que comprendan cadenas más largas de etilenglicol), cadenas de polietilenglicol o de óxido de polietileno, polipropilenglicol o cadenas de óxido de polipropileno, 1,x-diaminoalcanos donde x es el número de átomos de carbono en el alcano, y similares. Otra clase de enlaces adecuados comprende enlaces divisibles. Los enlaces divisibles son bien conocidos en la técnica.

[0061] En una forma de realización preferida, la invención se refiere a un conjugado, donde un compuesto de la Fórmula (IIa) se conjuga con una etiqueta a través de un grupo funcional Q. En otra forma de realización preferida, el compuesto conjugado de la Fórmula (IIa) es un compuesto donde p es 1 y L es CH₂. R¹ y/o R³ son preferiblemente H. En otra forma de realización, n es 0 (Q, n, p, L, R¹ y R³, tal y como se definen anteriormente). De la forma más preferible, p es 1, L es CH₂, R¹ es H, R³ es H y n es 0.

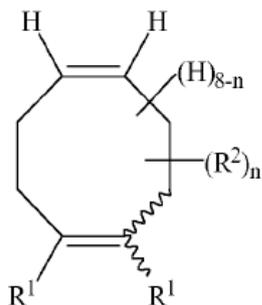
[0062] La presente invención también se refiere al uso de un conjugado según la invención para el etiquetado bioortogonal, la formación de imágenes o la modificación, tal como por ejemplo la modificación de la superficie, de una molécula diana.

Método de síntesis

[0063] Otro aspecto de la presente invención es proporcionar un método de síntesis para los compuestos de la Fórmula (IIa).

[0064] Un método para preparar un compuesto de la Fórmula (Ia) general comprende los pasos de:

(a) Introducción de un anillo fusionado de 3 o 4 miembros a un ciclooctadieno de la Fórmula (VIIa):



(VIIa)

donde:

n = de 0 a 8;

R¹ se selecciona independientemente del grupo consistente en hidrógeno, grupos alquilo C₁ - C₂₄, grupos (hetero)arilo C₆ - C₂₄, grupos alquil(hetero)arilo C₇ - C₂₄ y grupos (hetero)arilalquilo C₇ - C₂₄; y R² se selecciona independientemente del grupo consistente en halógeno, -OR⁶, -NO₂, -CN, -S(O)₂R⁶, grupos alquilo C₁ - C₁₂, grupos arilo C₁ - C₁₂, grupos alquilarilo C₁ - C₁₂ y grupos arilalquilo C₁ - C₁₂, donde los grupos alquilo, grupos arilo, grupos alquilarilo y grupos arilalquilo son opcionalmente sustituidos, y donde R⁶ se selecciona independientemente del grupo consistente en hidrógeno, halógeno, grupos alquilo C₁ - C₂₄, grupos (hetero)arilo C₆ - C₂₄, grupos alquil(hetero)arilo C₇ - C₂₄ y grupos (hetero)arilalquilo C₇ - C₂₄.

para formar un compuesto de cicloocteno bicíclico,

(b) Brominación del compuesto obtenido de cicloocteno bicíclico para formar un compuesto de ciclooctano bicíclico, y

(c) Deshidrobrominación del compuesto obtenido de ciclooctano bicíclico para formar un compuesto de la Fórmula (Ia) general.

[0065] El ciclooctadieno de la Fórmula (VIIa) en el paso (a) puede ser un *cis,cis*- o un *cis,trans*-ciclooctadieno. En una forma de realización, el ciclooctadieno es un *cis,cis*-ciclooctadieno. En una segunda forma de realización, el ciclooctadieno es un *cis,trans*-ciclooctadieno. En otras palabras, el enlace doble que comprende el sustituyente R¹ puede tener la configuración E o Z.

5

[0066] En una forma de realización preferida R¹ es H. En otra forma de realización preferida, n es 0. En otra forma de realización preferida, R¹ es H y n es 0.

[0067] El grupo funcional Q se puede introducir en cualquier punto en el método de síntesis. Por ejemplo, el grupo funcional se puede introducir durante el paso (a), la formación del compuesto de cicloocteno bicíclico. El grupo funcional también se puede introducir en un paso adicional, por ejemplo antes o después del paso de brominación (b) o después del paso de deshidrobrominación (c). Como quedará claro para un experto en la técnica, la estrategia empleada para la introducción del grupo funcional depende en su totalidad de la naturaleza del grupo funcional específico que necesita ser introducido.

10

[0068] Obviamente, el método de elección del paso (a), la introducción de un anillo fusionado de 3 o 4 miembros en un ciclooctadieno de la Fórmula (VIIa), depende del tipo de anillo de 3 o 4 miembros que se introduce.

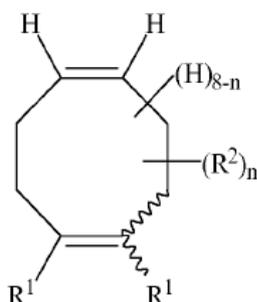
[0069] El paso (b), brominación de un compuesto de cicloocteno, y el paso (c), deshidrobrominación de un compuesto de ciclooctano, son considerados transformaciones orgánicas estándar conocidas por un experto en la técnica.

15

[0070] Los presentes inventores descubrieron que por ejemplo los compuestos de la Fórmula (IIa) pueden ser fácilmente y rápidamente preparados a buen rendimiento a partir de materias primas fácilmente disponibles. La presente invención por lo tanto también se refiere a un método para preparar un compuesto de la Fórmula (IIa), el método que comprende las etapas de:

20

(a) Ciclopropanación de un ciclooctadieno de la Fórmula (VIIa):



(VIIa)

donde n, R¹ y R² son tal como se ha definido anteriormente para formar un compuesto de cicloocteno bicíclico,

30

(b) Brominación del compuesto obtenido de cicloocteno bicíclico para formar un compuesto de ciclooctano bicíclico, y

(c) Deshidrobrominación del compuesto obtenido de ciclooctano bicíclico para formar un compuesto de la Fórmula (IIa).

[0071] El ciclooctadieno de la Fórmula (VIIa) en el paso (a) puede ser un *cis,cis*- o un *cis,trans*-ciclooctadieno. En una forma de realización, el ciclooctadieno es un *cis,cis*-ciclooctadieno. En otra forma de realización, el ciclooctadieno es un *cis,trans*-ciclooctadieno. En otras palabras, el enlace doble que comprende los sustituyentes R¹ puede tener la configuración E o Z.

[0072] En una forma de realización preferida R¹ es H. En otra forma de realización preferida, n es 0. En otra forma de realización preferida R¹ es H y n es 0.

40

[0073] También en este caso, el grupo funcional Q se puede introducir en un paso adicional, por ejemplo antes o después del paso de brominación (b), o a continuación del paso de deshidrobrominación (c). El paso (a), la ciclopropanación de un ciclooctadieno, puede por ejemplo conseguirse mediante la reacción de un carbeno, un carbenoide o un precursor de carbeno con el ciclooctadieno, opcionalmente en presencia de un catalizador. El paso (b) y

45

(c) son transformaciones orgánicas estándar conocidas por el experto en la técnica.

[0074] Como ejemplo, un compuesto de la Fórmula *endo*-(IIa), donde p es 1, L es CH₂, Q es OH, n es 0, y R¹ y R³ son H (*endo*-9-(hidroximetil)biciclo[6.1.0]non-4-ina), se puede sintetizar con buen rendimiento en sólo 4 pasos en un periodo de tiempo muy corto (sólo 1 - 2 días). Otra ventaja del método de síntesis según la presente invención es que sólo hay una necesidad limitada de la purificación cromatográfica, reduciendo así el tiempo total necesario para la síntesis total.

Modificación de moléculas diana

[0075] Los conjugados según la presente invención se aplican exitosamente en el etiquetado bioortogonal, la formación de imágenes o la modificación, incluyendo la modificación de la superficie, de moléculas diana tales como por ejemplo proteínas, lípidos y glicanos. La presente invención por lo tanto también se refiere a un método para la modificación de una molécula diana, donde un conjugado según la presente invención reacciona con un compuesto que comprende un 1,3-dipolo o un 1,3-(hetero)dieno. Como ejemplo, la cicloadición promovida por tensión de un cicloalquino con una azida (SPAAC) o con una nitrona (SPANC) fue representada en el Esquema 1. La reacción de una ciclooctina con un 1,3-(hetero)dieno se conoce como reacción (hetero) Diels-Alder. Estas reacciones se nombran también reacciones clic sin metales.

[0076] Los compuestos 1,3-dipolo son bien conocidos en la técnica (cf. por ejemplo F.A. Carey y R.J. Sundberg, *Advanced Organic Chemistry, Part A: Structure and Mechanisms*, 3ª Ed., 1990, p. 635 - 637), e incluyen óxidos de nitrilo, azidas, diazometano, nitronas, nitrilaminas, etc. Preferiblemente, el compuesto que comprende un 1,3-dipolo es un compuesto que comprende azida, un compuesto que comprende nitrona o un compuesto que comprende óxido de nitrilo.

[0077] Las reacciones (hetero) Diels-Alder y los 1,3-(hetero)dienos son también bien conocidos en el estado de la técnica. Ejemplos de 1,3-dienos incluyen, entre otros, 1,3-butadieno, 1,3-ciclopentadieno, 1,3-ciclohexadieno, furano, pirrol, y sus variedades sustituidas. Ejemplos de 1,3-heterodienos incluyen entre otros 1-oxa-1,3-butadieno, 1-aza-1,3-butadieno, 2-aza-1,3-butadieno, 3-aza-1,3-butadieno, y sus variedades sustituidas.

[0078] Una gran variedad de moléculas diana, es decir compuestos que comprenden un 1,3-dipolo o un 1,3-(hetero)dieno, se pueden modificar mediante el método según la invención. Las moléculas diana adecuadas son bien conocidas en la técnica e incluyen, pero no de forma limitante, biomoléculas tal como por ejemplo proteínas, péptidos, glicanos, lípidos, ácidos nucleicos, enzimas, hormonas, y similares. En principio, cualquier compuesto que comprende un 1,3-dipolo o un 1,3-(hetero)dieno se puede adecuar como molécula diana.

[0079] Las aplicaciones del método para la modificación de moléculas diana según la presente invención incluyen, pero de ninguna manera de forma limitante, diagnóstico y usos terapéuticos, etiquetado celular de células vivas, por ejemplo células MV3, fibroblastos, células Jurkat, células CHO o células HEK, modificación de biopolímeros (proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, glicanos), enriquecimiento de proteínas y glicanos para el análisis espectrométrico de masas, sintonización de propiedades poliméricas, modificación superficial, etc.

[0080] En una forma de realización, la reacción del conjugado se realiza *in vitro*. En una forma de realización preferida, la reacción se realiza *in vivo*, es decir, bajo condiciones fisiológicas.

[0081] Los conjugados según la presente invención que se aplican en la modificación de una molécula diana son anteriormente descritos con gran detalle. Una de las grandes ventajas de estos conjugados es que se pueden aplicar tanto *in vivo* como *in vitro*. Además, los conjugados aquí descritos son menos susceptibles de sufrir interacciones lipofílicas inespecíficas no deseadas, y muestran una buena cinética reactiva en las reacciones clic sin metales. Otra ventaja es que los conjugados aquí descritos son fácilmente sintetizados y susceptibles de que se modifiquen simplemente y directamente varias partes del conjugado. Esto hace posible "sintonizar con precisión" un conjugado para una aplicación específica, y optimizar la cinética reactiva para esta aplicación.

[0082] En una forma de realización preferida, un compuesto de la Fórmula (IIa), o un conjugado de la misma como se ha descrito anteriormente, reacciona con un compuesto que comprende un 1,3-dipolo o un 1,3-(hetero)dieno. Por ejemplo la cicloadición de (IIa) con azida de bencilo en condiciones acuosas procede rápidamente y limpiamente a los aductos de triazol correspondientes con una cinética reactiva excelente ($k = 0.09 - 0.28 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, dependiendo del disolvente). La cinética reactiva para la cicloadición de (IIa) con *C*-benzamidina-*N*-metilnitrona es incluso más alta ($k = 1.25 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Sorprendentemente, la cinética reactiva es similar tanto para *exo*-(IIa) como para *endo*-(IIa), lo que indica que la estereoquímica en la posición C-9 del compuesto (IIa) tiene poca influencia en la reactividad. Consecuentemente, se puede aplicar una mezcla de *exo* y *endocompuestos* según la invención en algunas aplicaciones, evitando la necesidad de la separación de los *exo* y *endocompuestos* e incluso además simplificando la síntesis de los compuestos según la invención.

[0083] Aplicaciones adicionales del método según la presente invención incluyen por ejemplo el ligamiento de un conjugado de fluoróforo donde (IIa) se conjuga con Alexa Fluor 555 hasta dar una proteína de plásmido vírico con una única azida, y la detección de glicanos de la superficie celular mediante la estrategia de indicador químico.

5

Composición farmacéutica

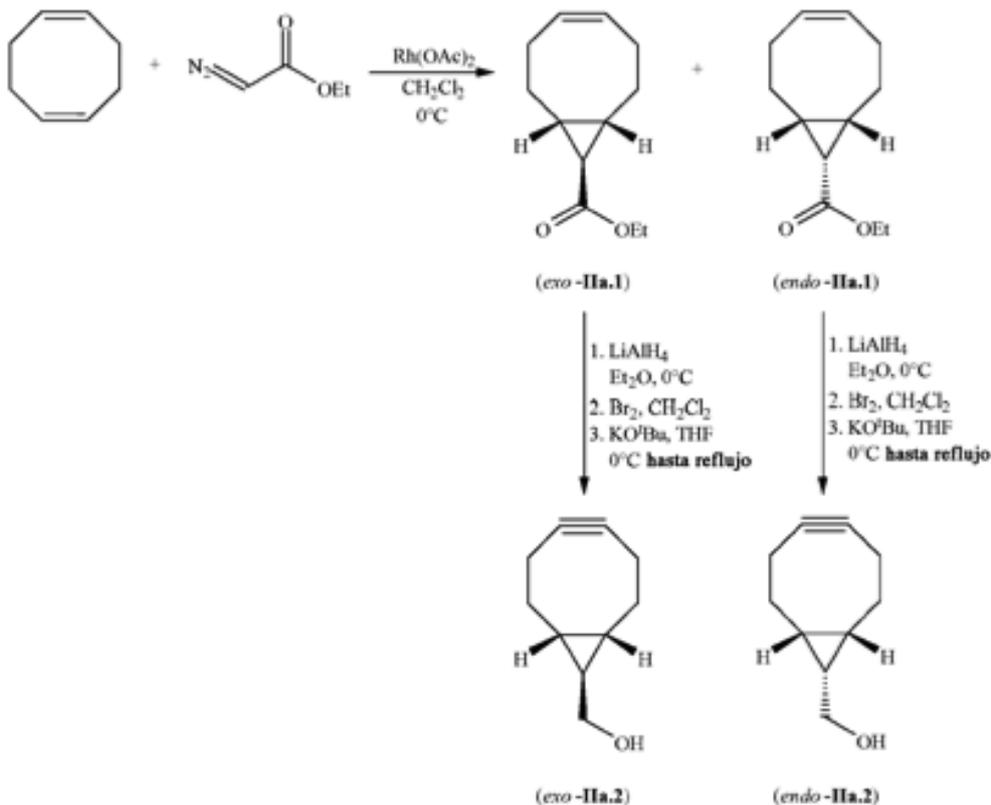
[0084] Finalmente, la invención se refiere a una composición que comprende un conjugado según la invención, que comprende además un portador farmacéuticamente aceptable. Se conocen en la técnica una amplia variedad de portadores farmacéuticamente aceptables adecuados (cf. por ejemplo R.C. Rowe, P.J. Sheskey y P.J. Weller (Eds.), Handbook of Pharmaceutical Excipients, 4ª Ed. 2003).

10

Ejemplos

15 Ejemplo 1: Síntesis de *exo*- y *endo*-IIa.2

[0085]



20

[0086] En el primer paso, el diazoacetato de etilo se añade lentamente a una solución en diclorometano de gran exceso (8 equiv.) de 1,5-ciclooctadieno en presencia de acetato de rodio, conduciendo a los compuestos diastereoméricos *exo*-IIa.1 y *endo*-IIa.1 en una proporción de 2:1 (rendimiento combinado del 82%). Directamente después de la separación mediante gel de sílice, primero el *endo*isómero de IIa.1 fue convertido en alcohol IIa.2 siguiendo un procedimiento directo de tres pasos de reducción, brominación y eliminación. Así, la reducción estérica de *endo*-IIa.1 con LiAlH₄ (30 min) produjo un alcohol intermedio crudo (30 min) suficientemente puro para la brominación sin purificación intermedia (30 min). Debe señalarse que no es necesaria la protección temporal del alcohol, como en la síntesis de DIBO. Finalmente, el dibromuro resultante fue sometido a exceso de KO^tBu en THF (0 °C → reflujo, 2 h), proveyendo el deseado 9-(hidroximetil)-bicyclo[6.1.0]non-4-ina *endo*-IIa.2 en rendimiento aislado del 61% para los tres pasos de *endo*-IIa.1. Una secuencia similar de eventos, que se puede ejecutar en un solo día con sólo una purificación cromatográfica, proveyó el

25

30

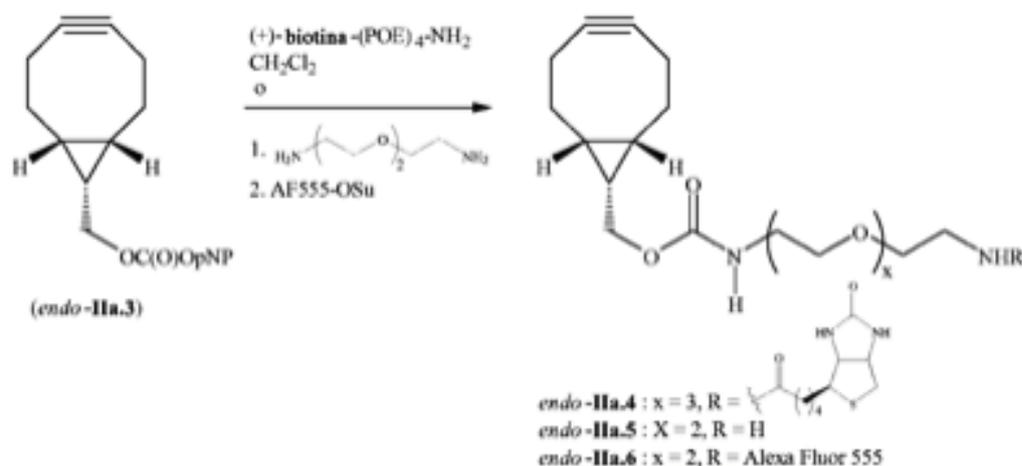
exoisómero diastereomérico de Ila.2 en un 53%.

Ejemplo 2: Cinética reactiva

- 5 [0087] Se investigó la cinética reactiva para la cicloadición con la azida prototípica azida de bencilo. Así, el compuesto *endo*-Ila.2 fue disuelto en una mezcla 3:1 de CD₃CN y D₂O y mezclado con azida de bencilo a una concentración final de 18 mM. La conversión química fue seguida con RMN de protón mediante la integración de picos de diagnóstico y fue indicado que el *endo*-Ila.2 reaccionó rápidamente y limpiamente a los aductos de triazol previstos. El cálculo de la cinética reactiva de segundo orden mostró una constante de índice de 0.12 M⁻¹ s⁻¹. Un valor similar de 0.10 M⁻¹ s⁻¹ fue
- 10 determinado para *exo*-Ila.2, indicando que la estereoquímica en la posición C-9 tiene poca influencia en la reactividad, con solo un índice ligeramente superior para los compuestos configurados con *endo*. Se observó un efecto significativo del disolvente debido a que la misma reacción de cicloadición en una mezcla 1:2 de CD₃CN y D₂O produjo constantes de índice de 0.28 y 0.25 M⁻¹ s⁻¹ para *endo*-Ila.2 y *exo*-Ila.2, respectivamente.

15 Ejemplo 3: Conjugados biciclo[6.1.0]non-4-ina (BCN)

[0088]



BCN conjugado con biotina (Ila.4)

- 20 [0089] La fracción alcohólica de *endo*-Ila.1 fue convertida en un carbonato de *p*-nitrofenilo (*p*NP) como en Ila.3. La reacción posterior con biotina-(POE)₃-NH₂ llevó a un conjugado de BCN-biotina Ila.4 (rendimiento 69%).

BCN conjugado con Alexa Fluor 555 (Ila.6)

- 25 [0090] Alternativamente, el compuesto Ila.3 fue reaccionado con 1,8-diamino-3,6-dioxaoctano para dar sonda BCN amino-terminal Ila.5, que fue convertida en el conjugado de fluoróforo Ila.6 con la reacción estérica de hidroxisuccinimida Alexa Fluor 555 comercial.

- 30 [0091] Alternativamente, el compuesto Ila.3 fue reaccionado con 1,5-diaminopentano para dar como resultado una sonda BCN amino-terminal más lipofílica.

Ejemplo 4: Reacción de Ila.6 con proteína cápsida etiquetada con azida (etiquetado SPAAC)

- 35 [0092] La proteína cápsida se preparó para contener sólo una única funcionalidad de azida por molécula, la cual -tras el ensamblaje de la cápsida- se localiza en la superficie interna de la cápsida. La proteína es disuelta en el tampón (50 mM de tampón fosfato a pH 7.5; 1M NaCl) a una concentración de 1 mg/mL. El conjugado Alexa Fluor 555-BCN Ila.6 fue disuelto en agua y se añadieron 4 equivalentes del conjugado a la solución de proteína. La mezcla reactiva fue incubada durante 3 horas a temperatura ambiente antes del análisis.

- 40 [0093] El producto de la reacción fue analizado en un gel SDS-PAGE al 12%, del cual se registró una imagen de

fluorescencia antes de la coloración con Coomassie-blue. En la Figura 1 se muestran los análisis del SDS-Page del producto de la reacción (izquierda) y de la reacción en blanco (derecha). La parte superior de la Figura 1 muestra la coloración Coomassie-blue, la parte inferior muestra la imagen de fluorescencia antes de la coloración con Coomassie-blue. Estos resultados indican claramente que el conjugado Alexa Fluor 555-BCN fue incorporado en la proteína cápsida.

[0094] Para el análisis de masa, la mezcla reactiva cruda fue dializada al 0.1% TFA en milliQ antes de analizarla con ionización por electrospray a tiempo de vuelo (ESI-TOF) en un JEOL AccuTOF. La Figura 2 muestra el espectro de masa ESI-TOF de la proteína cápsida reaccionada con Ila.6. El pico B corresponde a la masa de la proteína cápsida no reaccionada, mientras que el pico A corresponde al producto de la reacción. La diferencia de masa entre los picos es 1135.1 (previsto 1135), lo que indica que la única azida en la proteína cápsida ha reaccionado eficazmente con el conjugado BCN-Alexa Fluor555 que tiene una masa de 1135.

[0095] Para probar las propiedades de autoensamblaje de la proteína cápsida funcional, la mezcla reactiva cruda fue dializada a un tampón a pH 5.0 (50 mM NaOAc; 1 M NaCl; 10 mM CaCl₂), que debería inducir la formación de partículas esféricas de dimensión 28 nm (B.J.M. Verduin, FEBS Lett. 1974, 45, 50 - 54). Después del ensamblaje de las cápsidas por diálisis, la mezcla reactiva fue analizada con FPLC. El análisis de exclusión de tamaño en una columna Superpose 6 se muestra en la Figura 3. El pico de absorción a 280 nm a un volumen de elución de 1.2 ml señala la formación de cápsidas de 28 nm, y la absorbancia de superposición a 555 nm muestra que el tinte Alexa, y por eso Ila.6, está presente en las cápsidas.

Ejemplo 5: Reacción de Ila.2 con proteína etiquetada con nitrona FRATtide (etiquetado SPANC)

[0096] Se disolvió FRATtide (15.6 µg, 3.4 nmol, 34 µM) en 0.1 M de tampón NH₄OAc a pH 6.9 (100 µL) y se añadió NaIO₄ (1.1µg, 5.5 nmol, 48 µM). Se dejó que la reacción se produjera a temperatura ambiente durante 40 min y se añadió *p*-metoxibenzenetiol (9.2 µg, 66.0 nmol, 565 µM). Se agitó la mezcla durante 2 horas a 25 °C y se añadió *p*-anisidina (13.5 µg, 109.3 µmol, 845 µM), hidrocloreuro de *N*-metilhidroxilamina (18.2 µg, 218.6 nmol, 1.5 mM), y BCN-OH Ila.2 (41.1 µg, 273.3 nmol, 1.8 mM). Finalmente, se agitó la mezcla reactiva a 25 °C durante 24 horas para dar el conjugado deseado.

[0097] El progreso de la reacción fue monitoreado por espectrometría de masas (Accu-TOF). El pico de ión molecular a 4533.8 Da, que corresponde con la proteína FRATtide, desapareció tras el tratamiento con peryodato de sodio, mientras que apareció un pico de ión molecular a 4534.8, correspondiente con el hemiacetal metílico. Tras el tratamiento con *N*-metilhidroxilamina y BCN-OH, apareció un pico de ión molecular a 4681.4 Da, que corresponde con el derivado de nitrona de proteína FRATtide que ha reaccionado con BCN-OH Ila.2, como el pico principal (tras la deconvolución).

Ejemplo 6: Etiquetado de la superficie celular

[0098] La utilidad del conjugado de biotina Ila.4 con fines de etiquetado bioortogonal fue investigada mediante la detección de glicanos de la superficie celular mediante la estrategia de indicador químico. La *N*-azidoacetilmanosamina (ManNAz) fue metabólicamente incorporada en células MV3, y detectada por FACS y microscopía confocal.

Procedimiento de cultivo celular

[0099] Las células de melanoma humano invasivo y metastásico (MV3) se mantuvieron en el medio de cultivo RPMI 1640, que contiene 10% de suero de feto de ternera, penicilina/estreptomina (cada 50U/ml) en una atmósfera saturada de agua a 5% CO₂.

Etiquetado de azida de superficie celular

[0100] Las células MV3 fueron cultivadas durante 6 días en ausencia o presencia de Ac₄ManNAz (50µM). El cambio de medio y compuesto fue realizado 3 días después. La adhesión y morfología celulares fueron analizadas con un microscopio de campo claro antes de los estudios avanzados. Para el etiquetado de célula viva, se separaron células con EDTA (1mM), se lavaron y centrifugaron tres veces (PBS, 300 x G rpm, 5 min, 4°C), se resuspendieron en PBS y se incubaron en BCN-biotina (Ila.4) (60µM), DIBO-biotina (60µM) o tampón (1 h, 20°C), se lavaron tres veces (PBS, 300 x G, 2 min, 4°C), se resuspendieron en PBS que contenía estreptavidina conjugada con Alexa Fluor 488 a temperatura muy fría (5µg/ml, Invitrogen; volumen final 200µl). Tras la incubación (30 min, 4°C), las células fueron lavadas tres veces, resuspendidas en PBS (200µl, 4°C) para más análisis biológicos.

Citometría de flujo

[0101] La citometría de flujo fue realizada en un citómetro de flujo BD Biosciences FACS-Calibur que utiliza el láser de

argón de 488 nm y se analizaron datos con la edición de investigación FCS Express versión 3 (De Novo Software, Los Angeles, CA). Por muestra, se analizaron 2×10^4 células morfológicamente intactas en presencia de yoduro de propidio (2.5µg/ml).

5 [0102] En la Figura 4, se muestra la fluorescencia de la superficie celular en células MV3 intactas tras la incorporación metabólica de Ac₄ManNAz, el etiquetado con DIBO-biotina o BCN-biotina y la detección con estreptavidina conjugada con Alexa Fluor 488. El análisis por citometría de flujo indica un incremento de más de 100 veces en la intensidad de la fluorescencia para el etiquetado con BCN-biotina o DIBO-biotina, seguidos de la detección con estreptavidina conjugada con Alexa Fluor 488, con niveles insignificantes de antecedentes de fluorescencia cuando las células no se incuban con Ac₄ManNAz.

10 [0103] La Figura 5 muestra las intensidades de fluorescencia y viabilidad celular de las células MV3 después de la incorporación metabólica de Ac₄ManNAz, el etiquetado con DIBO-biotina o BCN-biotina, y la detección con estreptavidina conjugada con Alexa Fluor 488. En la Figura 5A se muestran las intensidades medias para la fluorescencia verde (Alexa Fluor 488) y las desviaciones estándar (SD) de cuatro experimentos independientes, en la Figura 5B la viabilidad celular intacta después del etiquetado con glicano. Se usaron etiquetas de fluorescencia verde (Alexa Fluor 488) y el yoduro de propidio (PI). Los números indican el porcentaje de células PI-negativas viables. De la Figura 5A, se puede concluir que tanto BCN como DIBO son efectivamente células de etiquetado viables que fueron previamente expuestas a Ac₄ManNAz, con una eficiencia mayor de etiquetado con BCN-biotina. La Figura 5B muestra que las células, ya sea sin tratar, tratadas con BCN o tratadas con DIBO, mostraron una viabilidad alta (>98% en todos casos).

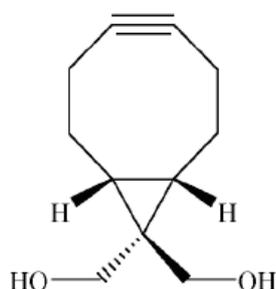
Microscopía confocal

25 [0104] Los glicanos de la superficie celular fueron etiquetados con BCN-biotina o DIBO-biotina y posteriormente con estreptavidina conjugada con Alexa Fluor 488. Después del etiquetado, las células fueron resuspendidas en el medio de cultivo normal, transferidas a una placa de 6 pocillos e incubada durante 30 min a 37°C. La formación de imágenes de células vivas de células MV3 fue realizada en un microscopio de escaneo de láser confocal Olimpo FV1000 con un láser de argón 488, excitación 488 nm, emisión 520 nm y una ampliación 40x a temperatura ambiente.

30 [0105] La Figura 6 muestra imágenes confocales representativas de células etiquetadas, previamente cultivadas en ausencia o presencia de Ac₄ManNAz (50µM). Las imágenes confocales muestran claramente que la superficie celular de las células MV3 se hace fluorescente tras la incubación de las células con Ac₄ManNAz seguida de la detección de los glicanos de la superficie celular con BCN-biotina o DIBO-biotina y posteriormente estreptavidina conjugada con Alexa Fluor 488, pero no sin incubación con Ac₄ManNAz.

Ejemplo 7: Síntesis de IIa.7

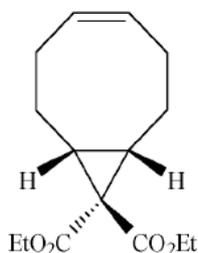
40 [0106]



(IIa.7)

(1R,8S,Z)-diethyl bicyclo[6.1.0]non-4-eno-9,9-dicarboxilato (IIa.8)

45 [0107]

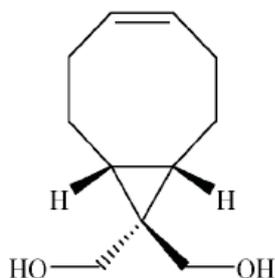


(IIa.8)

- 5 [0108] A una solución de 1,5-ciclooctadieno (5.27 mL, 43.0 mmol) y $\text{Rh}_2(\text{OAc})_4$ (100 mg, 0.23 mmol) en CH_2Cl_2 (5 mL) se añadió gota a gota en 3 horas una solución de diazomalonato de dietilo (1.0 g, 5.37 mmol) en CH_2Cl_2 (5 mL). Esta solución fue agitada durante 24 horas a temperatura ambiente. El CH_2Cl_2 fue evaporado y el exceso de ciclooctadieno fue retirado por filtración con un filtro de vidrio lleno de sílice (elución: heptano). El filtrado fue concentrado al vacío y el residuo fue purificado por cromatografía en columna en gel de sílice (EtOAc:heptano; 1:10) para obtener **IIa.8** (1.03 g, 72%).
- 10 ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz): δ 5.65-5.57 (m, 2H), 4.10 (2 \times q, $J = 7.2$ Hz, 4H), 2.41-2.29 (m, 2H), 2.15-2.06 (m, 3H), 1.83-1.70 (m, 3H), 1.31-1.23 (2 \times t, $J = 7.2$ Hz, 6H).

(1R,8S,Z)-Biciclo[6.1.0]non-4-eno-9,9-diildimetanol (IIa.9)

- 15 [0109]

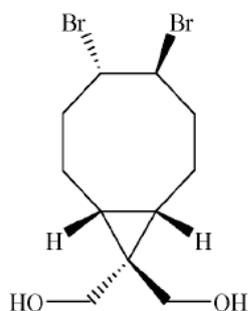


(IIa.9)

- 20 [0110] A una suspensión de LiAlH_4 (103 mg, 2.70 mmol) en Et_2O (10 mL) se añadió gota a gota a 0 °C una solución de **IIa.8** (400 mg, 1.50 mmol) en Et_2O (10 mL). Se añadió agua cuidadosamente hasta que el sólido gris se volvió blanco. Después se añadió Na_2SO_4 (2 g), se filtró el sólido y se lavó íntegramente con Et_2O (100 mL). El filtrado fue concentrado al vacío. El residuo fue purificado por cromatografía en columna en gel de sílice (EtOAc:heptano; 3:1) para obtener **IIa.9** como un sólido blanco (190 mg, 69%).
- 25 ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz): δ 5.66-5.58 (m, 2H), 3.88 (d, $J = 4.8$ Hz, 2H), 3.58 (d, $J = 4.8$ Hz, 2H), 2.43-2.35 (m, 2H), 2.20-1.99 (m, 6H), 1.71-1.57 (m, 2H), 0.95-0.88 (m, 2H).

((1R,8S)-4,5-Dibromobiciclo[6.1.0]nonano-9,9-diil)dimetanol (IIa.10)

[0111]



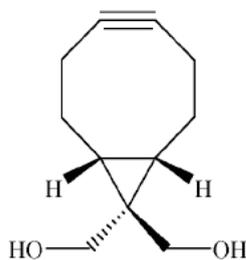
(IIa.10)

[0112] El diol **IIa.9** (145 mg, 0.796 mmol) fue disuelto en CH₂Cl₂ (5 mL). A 0 °C se añadió una solución de Br₂ (45 µL, 0.875 mmol) en CH₂Cl₂ (1 mL) gota a gota hasta que el color amarillo permaneció. La mezcla reactiva fue extinguida con una solución de Na₂S₂O₃ al 10% (5 mL), y extraída con CH₂Cl₂ (2 x 20 mL). El estrato orgánico fue secado (Na₂SO₄) y concentrado al vacío. El residuo fue purificado por cromatografía en columna en gel de sílice (EtOAc:heptano; 5:1) para obtener **IIa.10** (235 mg, 86%) como un sólido blanco.

¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ 4.87-4.78 (m, 2H), 3.96-3.88 (m, 2H), 3.60 (d, J = 5.2 Hz, 2H), 2.75-2.63 (m, 2H), 2.32-2.22 (m, 3H), 2.20-2.13 (m, 1H), 2.05-1.94 (m, 2H), 1.74-1.57 (m, 2H), 1.13-0.99 (m, 2H).

(1R,8S)-Biciclo[6.1.0]non-4-in-9,9-diildimetanol (IIa.7)

[0113]



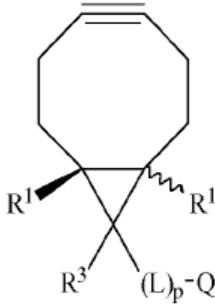
(IIa.7)

[0114] A una solución del dibromuro **IIa.10** (100 mg, 0.292 mmol) en THF (5 mL) se le añadió gota a gota a 0 °C una solución de KO^tBu (1.29 mL, 1 M en THF, 1.29 mmol). Posteriormente la solución fue refluída durante 1.5 horas. Tras el enfriamiento hasta temperatura ambiente, la mezcla fue extinguida con solución saturada de NH₄Cl (20 mL), y extraída con CH₂Cl₂ (3 x 20 mL). El estrato orgánico fue secado (Na₂SO₄) y concentrado al vacío. El residuo fue purificado por cromatografía en columna en gel de sílice (EtOAc) para obtener **IIa.** (24 mg, 46%) como un sólido blanco.

¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ 3.89 (bs, 2H), 3.63 (bs, 2H), 2.58 (bs, 2H), 2.34-2.20 (m, 6H), 1.68-1.59 (m, 2H), 0.89-0.82 (m, 2H).

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de la Fórmula (IIa):



(IIa)

5

donde:

p es 0 o 1;

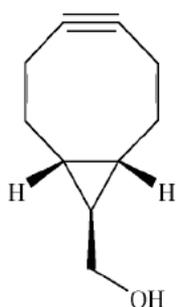
10 R^3 se selecciona del grupo consistente en $[(L)_p-Q]$, hidrógeno, halógeno, grupos alquilo $C_1 - C_{24}$, grupos (hetero)arilo $C_6 - C_{24}$, grupos alquil(hetero)arilo $C_7 - C_{24}$ y grupos (hetero)arilalquilo $C_7 - C_{24}$, los grupos alquilo siendo opcionalmente interrumpidos por uno de varios heteroátomos seleccionados del grupo consistente en O, N y S, donde los grupos alquilo, grupos (hetero)arilo, grupos alquil(hetero)arilo y grupos (hetero)arilalquilo son opcionalmente independientemente sustituidos con uno o varios sustituyentes independientemente seleccionados del grupo consistente en grupos alquilo $C_1 - C_{12}$, grupos alquenilo $C_2 - C_{12}$, grupos alquinilo $C_2 - C_{12}$, grupos cicloalquilo $C_3 - C_{12}$, grupos alcoxi $C_1 - C_{12}$, grupos alqueniloxi $C_2 - C_{12}$, grupos alquiniloxi $C_2 - C_{12}$, grupos cicloalquiloxi $C_3 - C_{12}$, halógenos, grupos amino, grupos oxo y grupos sililo, donde los grupos alquilo, grupos alquenilo, grupos alquinilo, grupos cicloalquilo, grupos alcoxi, grupos alqueniloxi, grupos alquiniloxi y grupos cicloalquiloxi son opcionalmente sustituidos, los grupos alquilo, los grupos alcoxi, los grupos cicloalquilo y los grupos cicloalcoxi siendo opcionalmente interrumpidos por uno de varios heteroátomos seleccionados del grupo consistente en O, N y S, donde los grupos sililo se representan con la fórmula $(R^4)_3Si-$, donde R^4 se selecciona independientemente del grupo consistente en grupos alquilo $C_1 - C_{12}$, grupos alquenilo $C_2 - C_{12}$, grupos alquinilo $C_2 - C_{12}$, grupos cicloalquilo $C_3 - C_{12}$, grupos alcoxi $C_1 - C_{12}$, grupos alqueniloxi $C_2 - C_{12}$, grupos alquiniloxi $C_2 - C_{12}$ y grupos cicloalquiloxi $C_3 - C_{12}$, donde los grupos alquilo, grupos alquenilo, grupos alquinilo, grupos cicloalquilo, grupos alcoxi, grupos alqueniloxi, grupos alquiniloxi y grupos cicloalquiloxi son opcionalmente sustituidos, los grupos alquilo, los grupos alcoxi, los grupos cicloalquilo y los grupos cicloalcoxi siendo opcionalmente interrumpidos por uno de varios heteroátomos seleccionados del grupo consistente en O, N y S;

25 L es un grupo de unión seleccionado de grupos alquilenos $C_1 - C_{24}$, grupos alquenilenos $C_2 - C_{24}$, grupos alquinilenos $C_2 - C_{24}$, grupos cicloalquilenos $C_3 - C_{24}$, grupos cicloalquenilenos $C_5 - C_{24}$, grupos cicloalquinilenos $C_8 - C_{24}$, grupos alquil(hetero)arilenos $C_7 - C_{24}$, grupos (hetero)arilalquilenos $C_7 - C_{24}$, grupos (hetero)arilalquenilenos $C_8 - C_{24}$, grupos (hetero)arilalquinilenos $C_9 - C_{24}$, los grupos alquilenos, grupos alquenilenos, grupos alquinilenos, grupos cicloalquilenos, grupos cicloalquenilenos, grupos cicloalquinilenos, grupos alquil(hetero)arilenos, grupos (hetero)arilalquilenos, grupos (hetero)arilalquenilenos y grupos (hetero)arilalquinilenos lineales o ramificados siendo opcionalmente sustituidos con uno o varios sustituyentes independientemente seleccionados del grupo consistente en grupos alquilo $C_1 - C_{12}$, grupos alquenilo $C_2 - C_{12}$, grupos alquinilo $C_2 - C_{12}$, grupos cicloalquilo $C_3 - C_{12}$, grupos cicloalquenilo $C_5 - C_{12}$, grupos cicloalquinilo $C_8 - C_{12}$, grupos alcoxi $C_1 - C_{12}$, grupos alqueniloxi $C_2 - C_{12}$, grupos alquiniloxi $C_2 - C_{12}$, grupos cicloalquiloxi $C_3 - C_{12}$, halógenos, grupos amino, grupos oxo y grupos sililo, donde los grupos sililo se pueden representar con la fórmula $(R^4)_3Si-$, donde R^4 se define como anteriormente;

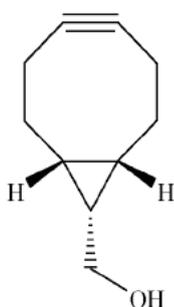
35 Q es un grupo funcional seleccionado del grupo consistente en hidrógeno, halógeno, R^6 , $-CH=C(R^6)_2$, $-C-CR^6$, $-[C(R^6)_2C(R^6)_2O]_q-R^6$, donde q está dentro del rango de 1 a 200, $-CN$, $-N_3$, $-NCX$, $-XCN$, $-XR^6$, $-N(R^6)_2$, $-N^+(R^6)_3$, $-C(X)N(R^6)_2$, $-C(R^6)_2XR^6$, $-C(X)R^6$, $-C(X)XR^6$, $-S(O)R^6$, $-S(O)_2R^6$, $-S(O)OR^6$, $-S(O)_2OR^6$, $-S(O)N(R^6)_2$, $-S(O)_2N(R^6)_2$, $-OS(O)R^6$, $-OS(O)_2R^6$, $-OS(O)OR^6$, $-OS(O)_2OR^6$, $-P(O)(R^6)(OR^6)$, $-P(O)(OR^6)_2$, $-OP(O)(OR^6)_2$, $-Si(R^6)_3$, $-XC(X)R^6$, $-XC(X)XR^6$, $-XC(X)N(R^6)_2$, $-N(R^6)C(X)R^6$, $-N(R^6)C(X)XR^6$ y $-N(R^6)C(X)N(R^6)_2$, donde X es oxígeno o azufre y donde R^6 se selecciona independientemente del grupo consistente en hidrógeno, halógeno, grupos alquilo $C_1 - C_{24}$, grupos (hetero)arilo $C_6 - C_{24}$, grupos alquil(hetero)arilo $C_7 - C_{24}$ y grupos (hetero)arilalquilo $C_7 - C_{24}$; y

45 R^1 se selecciona independientemente del grupo consistente en hidrógeno, grupos alquilo $C_1 - C_{24}$, grupos (hetero)arilo $C_6 - C_{24}$, grupos alquil(hetero)arilo $C_7 - C_{24}$ y grupos (hetero)arilalquilo $C_7 - C_{24}$.

2. Compuesto según la reivindicación 1, donde p es 1 y L es CH₂.
3. Compuesto según la reivindicación 1 o reivindicación 2, donde Q se selecciona del grupo consistente en -OR⁶, -N(R⁶)₂, -⁺N(R⁶)₃, -C(O)N(R⁶)₂, -C(O)OR⁶, -OC(O)R⁶, -OC(O)OR⁶, -OC(O)N(R⁶)₂, -N(R⁶)C(O)R⁶, -N(R⁶)C(O)OR⁶ y -N(R⁶)C(O)N(R⁶)₂, donde R⁶ es tal y como se define en la reivindicación 1.
4. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3, donde Q es -OH.
5. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 4, donde R₁ es hidrógeno.
6. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 5, donde R³ es hidrógeno o [(L)_p-Q].
7. Compuesto según la reivindicación 2, donde Q es -OH, R¹ es hidrógeno y R³ es hidrógeno o [(L)_p-Q].
8. Compuesto según la reivindicación 7, donde el compuesto es el de la Fórmula (exo-IIa.2) o (endo-IIa.2):



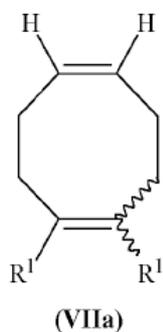
(*exo* -IIa.2)



(*endo* -IIa.2)

9. Conjugado donde un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 8 se conjuga con una etiqueta a través de un grupo funcional Q.
10. Conjugado según la reivindicación 9, donde el grupo funcional Q se conecta a la etiqueta a través de una unidad de conexión de la estructura Q-S-Q, donde Q se define como en la reivindicación 1, y donde S se selecciona del grupo consistente en grupos alquileo C₁ - C₂₀₀, grupos alquenilo C₂ - C₂₀₀, grupos alquínilo C₂ - C₂₀₀, grupos cicloalquileo C₃ - C₂₀₀, grupos cicloalquénilo C₅ - C₂₀₀, grupos cicloalquínilo C₈ - C₂₀₀, grupos alquilarileno C₇ - C₂₀₀, grupos arilalquileo C₇ - C₂₀₀, grupos arilalquénilo C₈ - C₂₀₀, grupos arilalquínilo C₉ - C₂₀₀, donde opcionalmente los grupos alquileo, grupos alquénilo, grupos alquínilo, grupos cicloalquileo, grupos cicloalquénilo, grupos cicloalquínilo, grupos alquilarileno, grupos arilalquileo, grupos arilalquénilo y grupos arilalquínilo son sustituidos, y donde opcionalmente dichos grupos se interrumpen por uno o varios heteroátomos, dichos heteroátomos siendo seleccionados del grupo que consiste en O, S y NR⁶, donde R⁶ se define como en la reivindicación 1.
11. Conjugado según la reivindicación 9 o reivindicación 10, donde, en el compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 8, p es 1, L es CH₂, R¹ es H y R³ es H.
12. Conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 9 - 11, donde la etiqueta se selecciona del grupo que comprende fluoróforos, biotina, cadenas de polietilenglicol, cadenas de polipropilenglicol, cadenas mixtas de polietilenglicol/polipropilenglicol, isótopos radiactivos, esteroides, compuestos farmacéuticos, lípidos, péptidos, glicanos, nucleótidos y etiquetas peptídicas.
13. Método para preparar un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 8, el método comprende las etapas de:

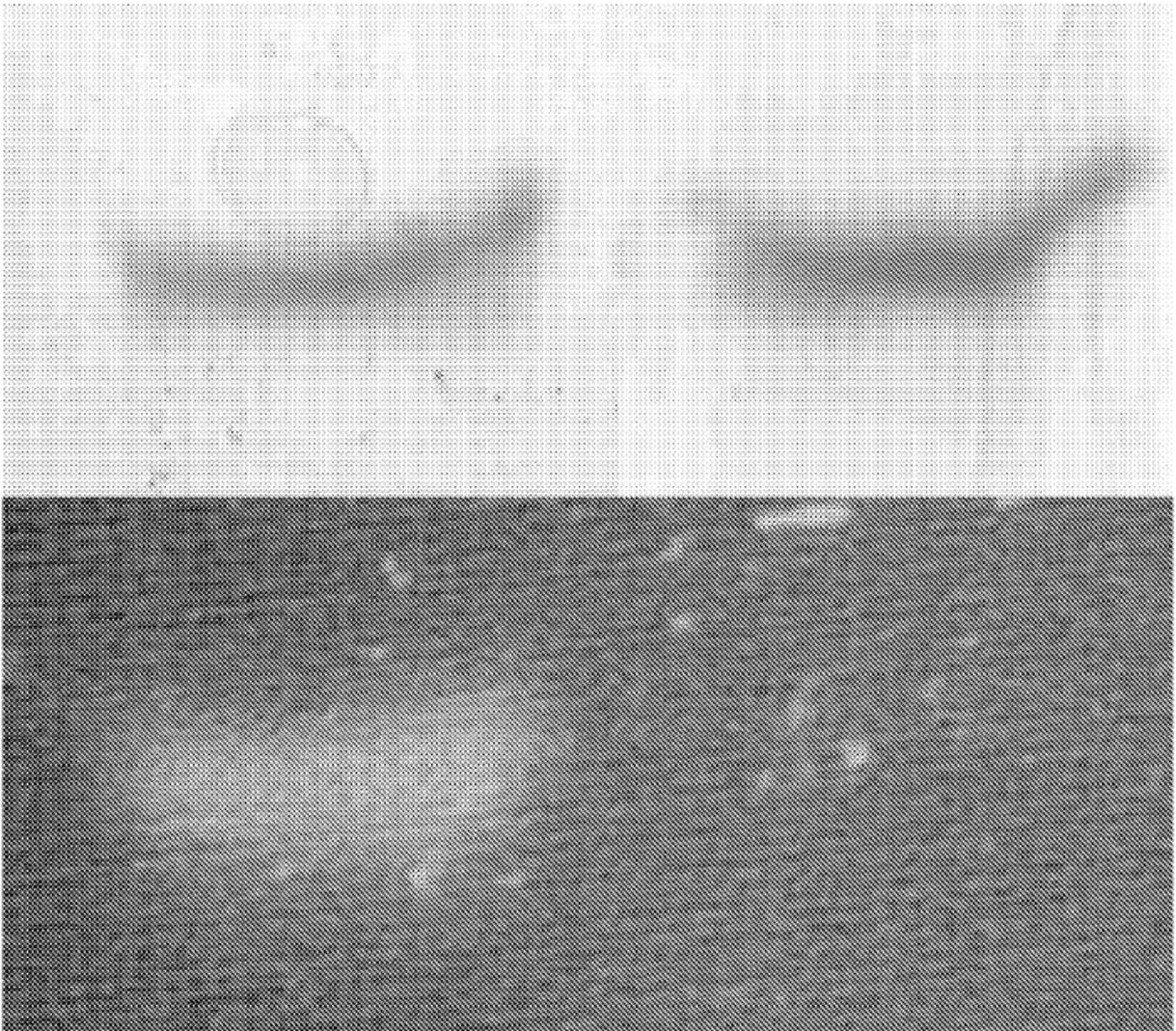
(a) Ciclopropanación de un ciclooctadieno de la Fórmula (VIIa):

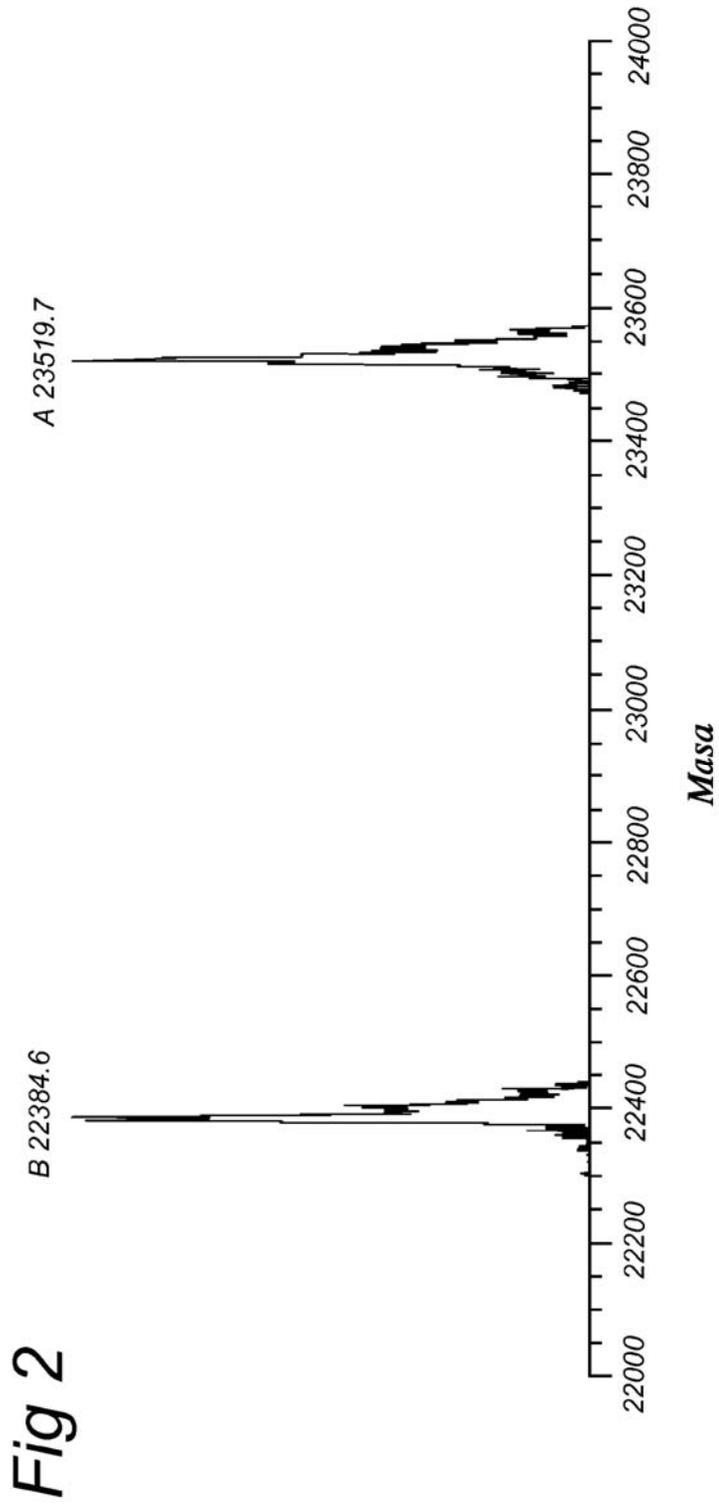


donde:

- 5 R¹ se selecciona independientemente del grupo consistente en hidrógeno, grupos alquilo C₁ - C₂₄, grupos (hetero)arilo C₆ - C₂₄, grupos alquil(hetero)arilo C₇ - C₂₄ y grupos (hetero)arilalquilo C₇ - C₂₄;
- 10 para formar un compuesto de cicloocteno bicíclico,
- (b) Brominación del compuesto obtenido de cicloocteno bicíclico para formar un compuesto de ciclooctano bicíclico, y
- (c) Deshidrobrominación del compuesto obtenido de ciclooctano bicíclico para formar un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 8.
- 15 14. Método para la modificación de una molécula diana, donde un conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 9 - 12 reacciona con un compuesto que comprende un 1,3-dipolo o un 1,3-(hetero)dieno.
- 20 15. Método según la reivindicación 14, donde el compuesto que comprende un 1,3-dipolo es un compuesto que comprende azida, un compuesto que comprende nitrona o un compuesto que comprende óxido de nitrilo.
16. Uso de un conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 9 - 12 para el etiquetado bioortogonal, la formación de imágenes o la modificación de una molécula diana.
- 25 17. Composición que comprende un conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 9 - 12, que comprende además un portador farmacéuticamente aceptable.

Fig 1





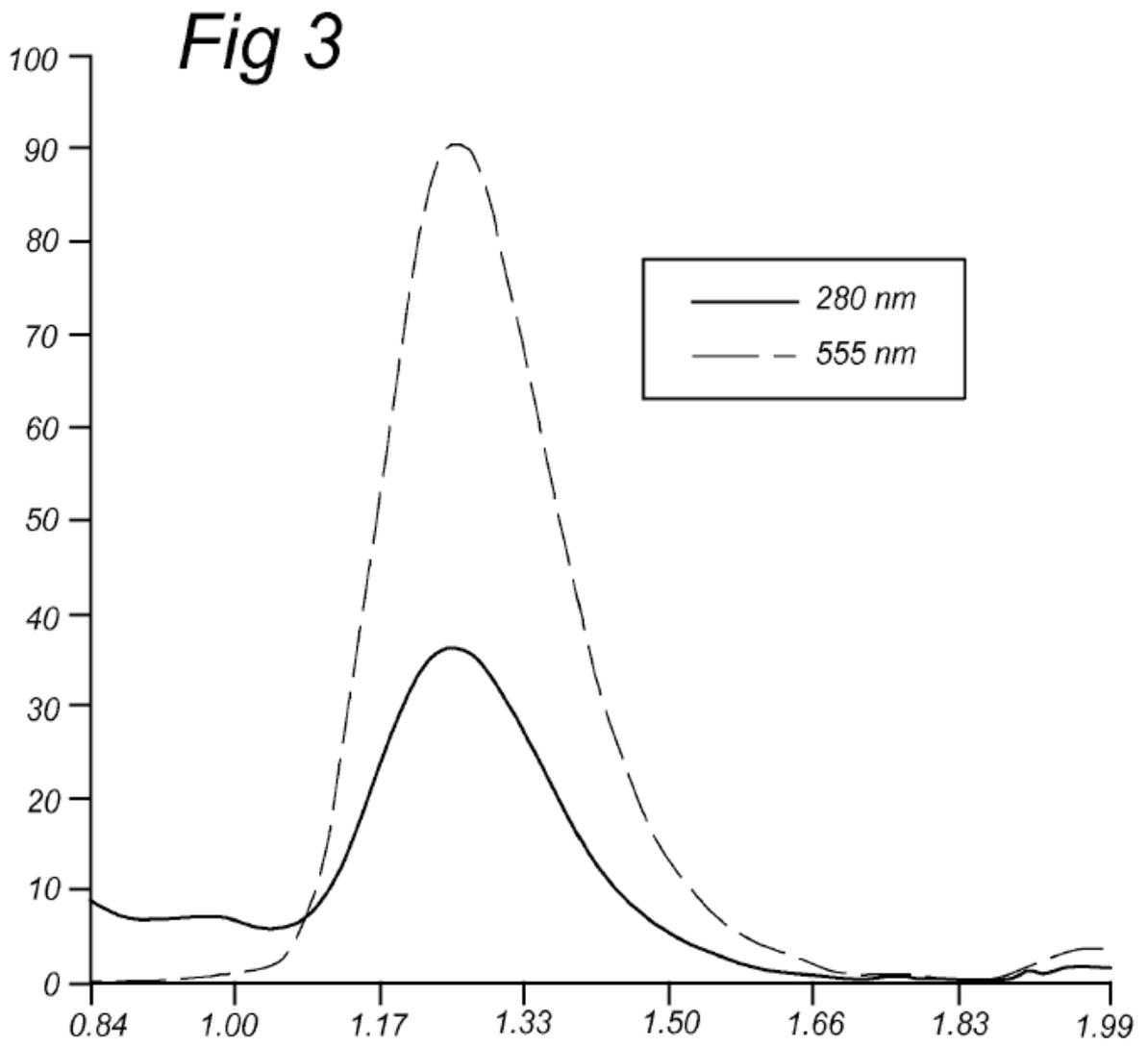


Fig 4

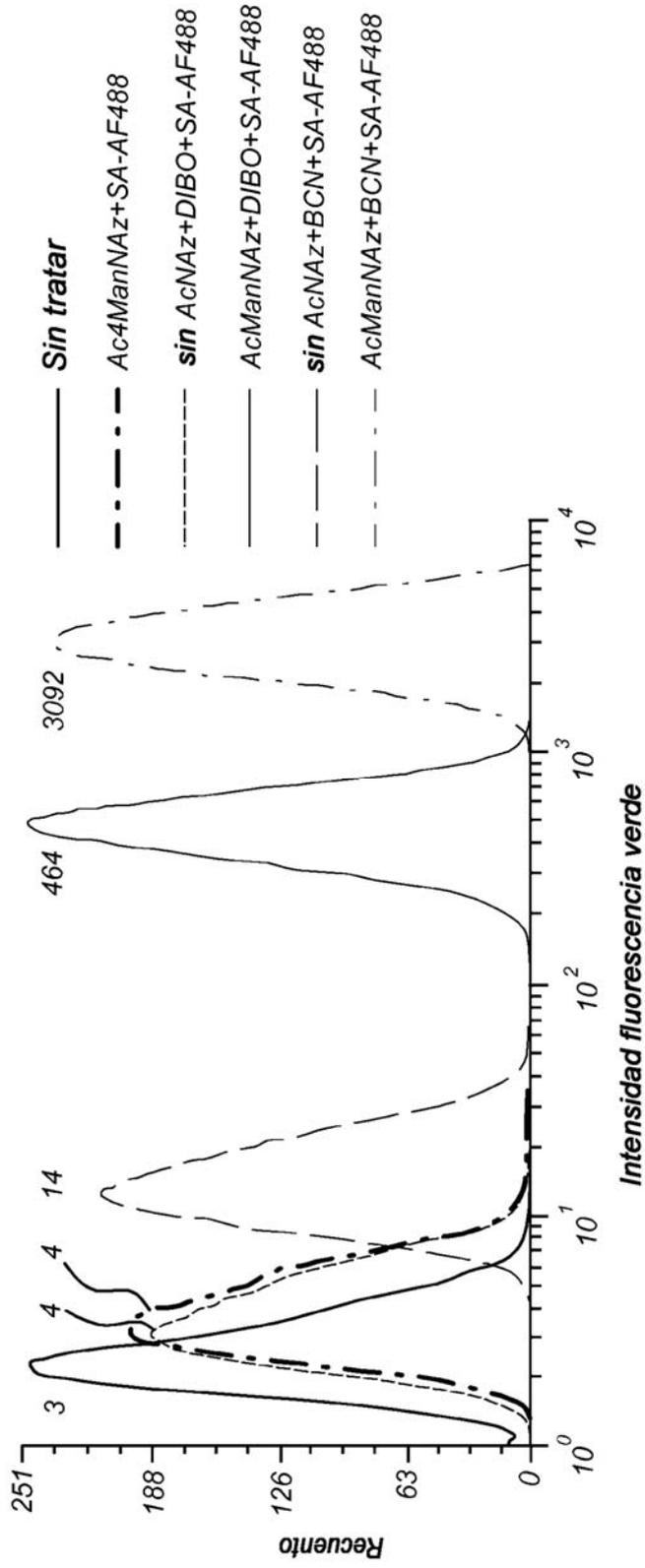


Fig 5a

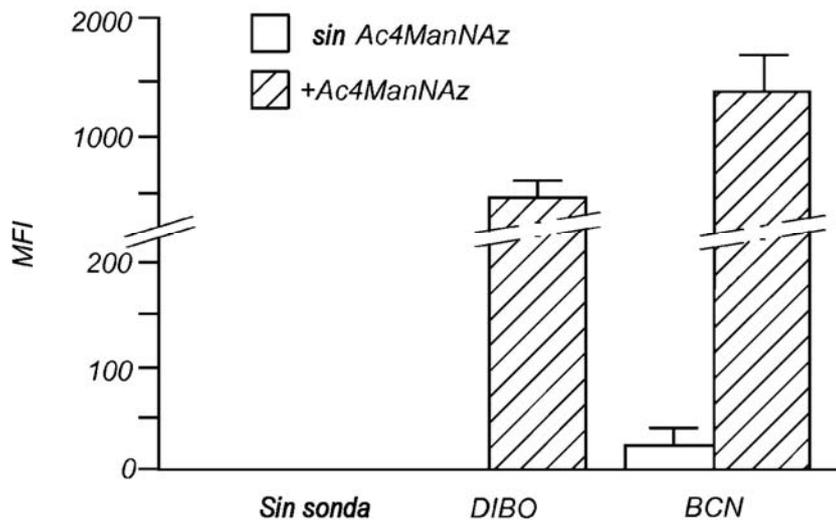


Fig 5b

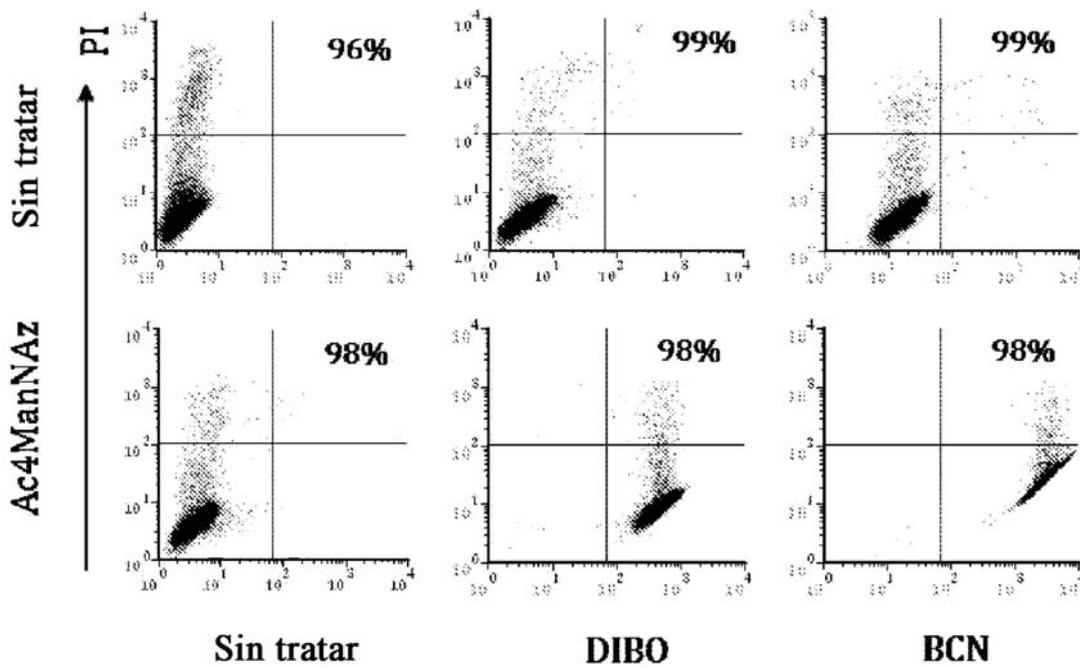


Fig 6

