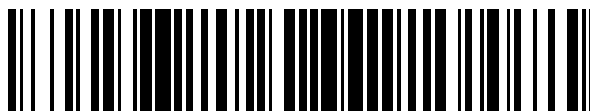


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 649 898**

51 Int. Cl.:

**C07D 487/22** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.11.2011** **PCT/EP2011/069425**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.05.2012** **WO12059584**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.11.2011** **E 11788783 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.11.2017** **EP 2635585**

54 Título: **Catalizadores de alta eficiencia, preparación y uso de los mismos**

30 Prioridad:

**05.11.2010 IT MI20102059**

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

**16.01.2018**

73 Titular/es:

**INKIDIA S.R.L. (100.0%)**

**Via Camaldolilli 59**

**80128 Napoli, IT**

72 Inventor/es:

**PAVONE, VINCENZO;**

**NASTRI, FLAVIA;**

**MAGLIO, ORNELLA y**

**LOMBARDI, ANGELINA**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

ES 2 649 898 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

Catalizadores de alta eficiencia, preparación y uso de los mismos

Campo de la invención

La presente invención se relaciona con macrociclos que contienen nitrógeno, similares a porfirina, a los que se ha dado funcionalidad con compuestos sintéticos a base de péptido, y su preparación y uso como catalizadores en química fina. Pueden ser usados, por ejemplo, como catalizadores en soluciones acuosas o en agua-alcohol para reacciones de peroxidación, oxidación, hidroxilación, nitración de fenol y epoxidación de compuestos inertes, en el control y descontaminación de aguas y en diagnóstico para laboratorio. Pueden ser usados también, por ejemplo, en pruebas de inmunohistoquímica, para hibridación *in situ*, pruebas ELISA, y pruebas de mancha del sur, del norte y del oeste. Los compuestos de acuerdo con la invención pueden ser usados "como están" o en asociación covalente con biomoléculas tales como anticuerpos, antígenos, enzimas, receptores, ácidos nucleicos, péptidos y proteínas. Los compuestos de acuerdo con la invención tienen un amplio rango de aplicaciones, porque representan análogos de bajo peso molecular (2000-5000 uma) de hemoproteínas naturales y mutadas, y por ello son propuestas como alternativas particularmente ventajosas a productos de expresión o de extracción. Los compuestos de acuerdo con la invención pueden ser usados también, sobre soportes de matrices sólidas y/o sobre nanopartículas paramagnéticas y no paramagnéticas.

Estado de la técnica

En la literatura se conocen numerosos macrociclos de nitrógeno, de diferentes composiciones y con diferentes iones metálicos insertos en el macrociclo de nitrógeno. Desde el punto de vista de la aplicación, los más prometedores son las porfirinas sustituidas con meso-tetra-arilo. ("Metallo-porphyrins in catalytic oxidations" (1994) Sheldon R.A. ed. Dekker, NY; D. Mansuy, C.R. Chimie, 2007, 10, pp 392; Meunier, B. Chem. Rev. 1992, 92, pp. 1411). A pesar de su potencial aplicación, la mayoría de los macrociclos de nitrógeno descritos no han hallado ninguna aplicación industrial por diferentes razones, incluyendo: 1) baja solubilidad en agua y fluidos biológicos; 2) baja transferencia y/o baja selectividad en procesos catalíticos; 3) necesidad de uso de reactivos fuertemente oxidantes para la activación.

Otras porfirinas sustituidas en las posiciones beta-pirrólica y meso fueron posteriormente desarrolladas para mejorar las características catalíticas (véase por ejemplo, Bruice T.C. et al. PNAS, 1986, pp 4646). Sin embargo, estos compuestos presentan también la severa limitación de la solubilidad en agua, y pueden ser usados en la práctica en la interfaz de la fase acuosa/fase orgánica.

Las porfirinas sustituidas en las posiciones meso con grupos hidrofílicos (tanto tipos aniónico y catiónico) son solubles en agua, pero todavía carecen de suficiente eficiencia catalítica para ser útiles en aplicaciones industriales de química fina (Lindsay Smith, J.R. et al. J.Chem.Soc. Chem. Comm 1985, pp410; Bernadou, J. et al. Tetrahedron letters, 1988, pp 6615).

Más recientemente se han descrito nuevos conjugados de péptido-porfirina. Ellos pueden ser agrupados sobre la base del número de péptidos unidos a la porfirina, en productos de mono- y di-adición. Por ejemplo, las microperoxidasas son porfirinas de monoadición obtenidas por la digestión proteolítica de citocromos c. Estos compuestos se caracterizan también por dos enlaces tioéter entre las cisteínas del componente de péptido y los grupos vinilo de protoporfirina IX. Dependiendo de la enzima usada en la digestión proteolítica, se obtienen diferentes microperoxidasas, cuya cadena de péptido se caracteriza por un número diferente de aminoácidos (Aron, J.; Baldwin, D.A.; Marques, H.M.; Pratt, J.M.; Adams, P.A.J. Inorg. Biochem. 1986, 27, 227). Estos compuestos son llamados comúnmente microperoxidasas MP8, MP9, MP10 y MP11 (Munro, O.Q.; Marques, H.M. Inorg. Chem. 1996, 35, 3752; Adams, P.A. en: Peroxidasas in Chemistry and Biology, 1993, Vol. II, Everse, J., Everse, K.E. & Grisham, M.B., eds, pp. 171-200. CRC Press, Boston, MA, EEUU; Marques, H.M. Dalton Trans. 2007, 4371).

Abajo se establecen las secuencias de péptido de las microperoxidasas mejor caracterizadas a la fecha:

MP8: H-Cys-Ala-Gln-Cys-His-Thr-Val-Glu-OH (J. Aron, D.A. Baldwin, H.M. Marques, J.M. Pratt, P.A. Adams, J. Inorg. Biochem. 1986, 27, 227; D.A. Baldwin, H.M. Marques, J.M. Pratt, J. Inorg. Biochem. 1986, 27, 245; M.S.A. Hamza, J.M. Pratt, J. Chem. Soc., Dalton Trans. 1994, 1367);

MP9: H-Cys-Ala-Gln-Cys-His-Thr-Val-Glu-Lys-OH (Baldwin, D. A.; Mabuya, M. B.; Marques, H. M. S. Afr. J. Chem. 1987, 40, 103); MP11: H-Val-Gln-Lys-Cys-Ala-Gln-Cys-His-Thr-Val-Glu-OH (Carraway, A. D.; McCollum, M. G.; Peterson, J. Inorg. Chem. 1996, 35, 6885); MP11: H-Lys-Thr-Arg-Cys-Glu-Leu-Cys-His-Thr-Val-Glu-OH (C. Dallacosta, E. Monzani, L. Casella, ChemBioChem. 5, 2004, 1692); Ac-MP8: Ac-Cys-Ala-Gln-Cys-His-Thr-Val-Glu-OH (Munro, O. Q.; Marques, H. M. Inorg. Chem. 1996, 35, 3752; Munro, O. Q.; Marques, H. M. Inorg. Chem. 1996, 35, 3768; Carraway, A. D.; McCollum, M. G.; Peterson, J. Inorg. Chem. 1996, 35, 6885); bis-Ac-MP11: Ac-Val-Gln-Lys(Ac)-Cys-Ala-Gln-Cys-His-Thr-Val-Glu-OH (Carraway, A. D.; McCollum, M. G.; Peterson, J. Inorg. Chem. 1996,

35, 6885); Fmoc-Pro-MP8: Fmoc-Pro-Cys-Ala-Gln-Cys-His-Thr-Val-Glu-OH (Casella, L.; De Gioia, L.; Frontoso Silvestri, G.; Monzani, E.; Redaelli, C.; Roncone, R.; Santagostini, L. J. Inorg. Biochem. 2000, 79, 31); Pro-MP8: H-Pro-Cys-Ala-Gln-Cys-His-Thr-Val-Glu-OH (Casella, L.; De Gioia, L.; Frontoso Silvestri, G.; Monzani, E.; Redaelli, C.; Roncone, R.; Santagostini, L. J. Inorg. Biochem. 2000, 79, 31); Pro2-MP8: H-Pro-Cys-Ala-Gln-Cys-His-Thr-Val-Glu-OH (Casella, L.; De Gioia, L.; Frontoso Silvestri, G.; Monzani, E.; Redaelli, C.; Roncone, R.; Santagostini, L. J. Inorg. Biochem. 2000, 79, 31); MP9-22 -(FmocAlaPro): H-Cys-Ala-Gln-Cys-His-Thr-Val-Glu-Lys (Fmoc-Ala-Pro)-OH (Casella, L.; De Gioia, L.; Frontoso Silvestri, G.; Monzani, E.; Redaelli, C.; Roncone, R.; Santagostini, L.J. Inorg. Biochem. 2000, 79, 31).

Las microperoxidasas son estructuralmente muy diferentes a los péptidos reivindicados y, aunque presentan pentacoordinación con hierro, la cual involucra el residuo individual de histidina presente en su secuencia, muestran actividad catalítica muy modesta comparada con la de peroxidasa de rábano picante (HRP). A modo de ejemplo, abajo se establecen algunos parámetros cinéticos en la oxidación de ABTS usando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para MP8, MP11 y la enzima HRP.

Enzima	pH	k <sub>cat</sub> (s <sup>-1</sup> )	Mw(E) KDa	Actividad específica (mol g <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )
MP8	7.0	0.0026	1.51	0.104* 10 <sup>-3</sup>
MP11	7.0	0.013	1.86	0.419* 10 <sup>-3</sup>
HRP	4.6	4100	44	5.569
HRP	7.0	53	44	0.071

Además, durante la catálisis de oxidación de sustratos orgánicos por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se observa una rápida degradación del catalizador. Otro factor limitante en el uso de microperoxidasas es su baja solubilidad en agua. Las microperoxidasas acetiladas en N son más solubles en agua y tienen mejor actividad catalítica en la oxidación de sustratos orgánicos usando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como oxidante, y son todavía fácilmente degradables y presentan modesta actividad catalítica. Por ello, las microperoxidasas no han hallado aún una aplicación industrial.

Otros ejemplos de conjugados péptido-porfirina de una adición, fueron reportados por Casella L. et al. (J. Chem. Soc. Dalton Trans. 1993, 2233) y visitados de nuevo recientemente en la revisión de Nicolis S. et al. (Comptes Rendus Chimie 10, 2007, 380-391). Estas moléculas, que también son estructuralmente muy diferentes de las moléculas reivindicadas, presentan muchas limitaciones de manera similar a las de las microperoxidasas, tales como baja actividad catalítica, y por ello no han encontrado aún aplicación industrial.

Nuevos conjugados de péptido-porfirina de doble adición han sido reportados por Benson (Benson, D.R.; Hart, B.R.; Zhu, X.; Doughty, M.B. J. Am. Chem. Soc. 1995, 117, 8502; Arnold, P.A.; Benson, D.R.; Brink, D.J.; Hendrich, M.P.; Jas, G.S.; Kennedy, M.L.; Petasis, D.T.; Wang, M. Inorg. Chem. 1997, 36, 5306; Wang, M.; Kennedy, M.L.; Hart, B.R.; Benson, D.R. Chem. Commun. 1997, 883; Williamson, D.A.; Benson, D.R. Chem. Commun. 1998, 961; Liu, D.; Williamson, D.A.; Kennedy, M.L.; Williams, T.D.; Morton, M.M.; Benson, D.R. J. Am. Chem. Soc. 1999, 121, 11798; Liu, D.; Lee, K.-H.; Benson, D.R. Chem. Commun. 1999, 1205; Kennedy, M.L.; Silchenko, S.; Houndonougbo, N.; Gibney, B.R.; Dutton, P.L.; Rodgers, K.R.; Benson, D.R. J. Am. Chem. Soc. 2001, 123, 4635). Estos compuestos se caracterizan por dos péptidos iguales enlazados a los grupos propionilo de mesohem, llamados PSM (mesohems en sandwich con péptido): PSM1, Ac-AKEAAHAAEAAEA-NH<sub>2</sub>; PSM2, Ac-AAEAAEAHAAEKA-NH<sub>2</sub>; PSM3, Ac-AKEAHAAEAAEA-NH<sub>2</sub>; PSM4, Ac-AAEAAEAHAAEKA-NH<sub>2</sub>; PSM5, Ac-AAHAAEAEEAKEA-NH<sub>2</sub>; PSM6, Ac-AAEAAEAHAAEKA-NH<sub>2</sub>; PSM7, Ac-AAEFAEAHAAEKA-NH<sub>2</sub>; PSM8, Ac-AAEWAEAHAAEKA-NH<sub>2</sub>.

La presencia de estas moléculas de péptidos iguales que contienen una histidina involucra la hexacoordinación de hierro; por ello estas moléculas presentan muy baja actividad catalítica en reacciones que involucran la oxidación de sustratos orgánicos por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, dado que carecen de un sitio distal para el enlace del sustrato. Ninguno de los compuestos en esta serie ha hallado aún una aplicación industrial.

Otros compuestos de doble adición son aquellos denominados mimocromos, descritos por: Natri F. et al. Chem. Eur. J. 1997, 3, pp340; D'Auria G. et al. Chem. Eur. J. 1997, 3, pp350; Natri F. et al. J. Biol. Inorg. Chem. 1998, 3, pp671; Natri F. et al. Biopolymers (Peptid Science) 1998, pp5; Lombardi A. et al. Chem. Rev. 2001, pp316; Lombardi A. et al. Inorg. Chim. Acta 1998, 275-276, pp301; Lombardi A. et al. Chem. Eur. J. 2003, 9, pp5643; Di Costanzo L. et al. J. Biol. Inorg. Chem. 2004, 9, pp1017; y visitados nuevamente en la revisión de Lombardi A. et al. Chem. Rev. 2001, 101, 3165-3189.

Los mimocromos I, II y IV (Natri F. et al. Chem. Eur. J. 1997, 3, pp340; D'Auria G. et al. Chem. Eur. J. 1997, 3, pp350; Lombardi A. et al. Inorg. Chim. Acta 1998, 275-276, pp301; Lombardi A. et al. Chem. Eur. J. 2003, 9,

- pp5643; Di Costanzo L. et al. J. Biol. Inorg. Chem. 2004, 9, pp1017) se caracterizan también por coordinación de hierro con bis-histidina, y en consecuencia presentan las mismas limitaciones que los PSMs descritos por Benson, mientras los mimocromos III, V y VI (Lombardi A. et al. Chem. Rev. 2001, 101, 3165-3189) presentan penta-coordinación. Sin embargo, debido a la particular composición de aminoácidos de las dos cadenas de péptidos, que son de la misma longitud, estos últimos análogos no presentan actividad catalítica mayor a o comparable a la de las peroxidasas naturales. A modo de ejemplo, abajo se establecen algunos parámetros cinéticos en la oxidación de ABTS usando  $\text{H}_2\text{O}_2$  para mimocromos y la enzima HRP.

Enzima	pH	$k_{\text{cat}}$	Mw(E)	Actividad específica ( $\text{mol g}^{-1} \text{min}^{-1}$ )
		( $\text{s}^{-1}$ )	KDa	
FeIII-mimocromo I	7.0	0.005	2.62	$1.14 \cdot 10^{-4}$
FeIII-mimocromo II	7.0	0.011	3.83	$1.72 \cdot 10^{-4}$
FeIII-mimocromo III	7.0	0.15	4.03	$2.23 \cdot 10^{-3}$
FeIII-mimocromo IV	7.0	0.014	2.81	$2.99 \cdot 10^{-4}$
FeIII-mimocromo V	7.0	0.16	4.00	$2.40 \cdot 10^{-3}$
FeIII-mimocromo VI	7.0	0.12	4.01	$1.80 \cdot 10^{-3}$
HRP	4.6	4100	44	5.569
HRP	7.0	53	44	0.071

Por ello, los mimocromos no han hallado aún una aplicación industrial.

- Otros sistemas más elaborados son hemoabzimas (Ricoux R., Raffy Q., Mahy J.P. C.R. Chimie 2007, 10, 684-702), que presentan como limitación el tener un muy alto peso molecular y estar inherentemente sujetas a desnaturalización y degradación. A modo de ejemplo, abajo se establecen algunos parámetros cinéticos en la oxidación de ABTS usando  $\text{H}_2\text{O}_2$  para hemoabzimas y enzimas HRP.

Enzima	pH	$k_{\text{cat}}$	Mw(E)	Actividad específica ( $\text{mol g}^{-1} \text{min}^{-1}$ )
		( $\text{s}^{-1}$ )	KDa	
$\text{Fe}^{\text{III}}$ ToCPP-13G10	4.6	9.33	151	$3.71 \cdot 10^{-3}$
$\text{Fe}^{\text{III}}$ ToCPP-14H7	5.0	1.05	151	$0.417 \cdot 10^{-3}$
$\text{Fe}^{\text{III}}$ ToCPP <sup>2</sup>	5.0	0.85	0.878	$58.1 \cdot 10^{-3}$
HRP	4.6	4100	44	5.569
HRP	7.0	53	44	0.071

- Otros sistemas complejos de péptido-porfirina son reportados por Sasaki T. y Kaiser E.T., JACS 1989, pp380; Akerfeldt K.S. et al. JACS, 1992, pp9656; Arnold, P.A. et al. JACS 1997, pp3181; Sakamoto S. et al. Chem Commun. 1997, pp1221; Kennedy, M. L. et al. JACS 2001, 123, pp 4635 y visitados de nuevo recientemente por Reedy, C.J. y Gibney, B.R. (Chem. Rev. 2004, 104, pp. 617). Todos estos compuestos presentan hexacoordinación con centro de hem, y por ello no poseen ninguna actividad catalítica útil para propósitos de aplicación. En particular, los sistemas de helicromo (Sasaki T. y Kaiser E.T., JACS 1989, pp380), sistemas de tetrafilina (Akerfeldt K.S. et al. JACS, 1992, pp9656) y conjugados de péptido-mesohem (Arnold, P.A. et al. JACS 1997, pp3181; Sakamoto S. et al. Chem Commun. 1997, pp1221) son ejemplos de conjugados sintéticos de péptido-porfirina en los que el anillo de porfirina ha sido incorporado de manera covalente dentro de secuencias de péptido, con objeto de inducir estructuras helicoidales. Estos sistemas desarrollados por Choma C.T. et al. (JACS 1994, pp856) y Robertson D.E. et al. (Nature 1994, pp425) son el primer ejemplo de proteínas hem sintéticas hexacoordinadas, que consisten en secuencias de péptido que adoptan el motivo estructural de "haz de cuatro hélices", y son capaces de unir uno o más grupos hem en su interior de una manera no covalente.

Una vez más, ninguno de los compuestos mencionados anteriormente exhibe propiedades comparables con o mayores a las de las peroxidasas naturales.

- Por ello, las soluciones estructurales propuestas a la fecha han probado ser inadecuadas para satisfacer de manera simultánea los siguientes requerimientos: 1) alta eficiencia catalítica; 2) una alta transferencia catalítica; 3)

adecuada solubilidad en soluciones acuosas o de agua-alcohol; 4) resistencia a la degradación durante ciclos catalíticos; 5) bajo peso molecular y alta actividad específica. La peroxidasa de rábano picante exhibe reducida actividad catalítica, a pH neutro, si se compara con su máxima actividad a pH=4.6.

De otro modo, las enzimas naturales o mutadas tales como peroxidasas, citocromos P450, oxidasas y monooxigenasas, aunque satisfacen los requerimientos de elevada eficiencia catalítica en reacciones que requieren activación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, son particularmente costosas, sensibles a la desnaturalización, y en consecuencia pueden tener una vida útil limitada, pero en primer lugar tienen dimensiones moleculares más bien grandes (30,000 - 200,000 Da) lo cual puede limitar su uso industrial. Por ejemplo, las nanopartículas paramagnéticas que tienen funcionalidad con HRP, son conocidas a partir de la literatura (Xiaoyan Y. et al., Anal. Biochem. 2009, 393, pp 56). Sin embargo, el grado de recubrimiento es relativamente bajo, involucrando un número limitado de sitios catalíticos anclados a las nanopartículas, y en consecuencia baja amplificación catalítica.

Muchos métodos estándar de diagnóstico de laboratorio, tales como pruebas inmunohistoquímicas, hibridación *in situ*, ELISA y pruebas de mancha, usan métodos de detección del producto deseado, que involucran la incubación de la muestra experimental que contiene el analito que va a ser detectado, con una molécula de reconocimiento capaz de interactuar específicamente con el analito. El fenómeno de reconocimiento es entonces determinado cuantitativamente por la producción de una señal, tal como una señal luminiscente, colorimétrica, fluorimétrica, electroquímica o radioactiva. En muchos casos, cuando el analito está presente en bajas concentraciones, la señal requiere ser amplificada añadiendo una o más capas de amplificación a la prueba. Por ejemplo, si el elemento de reconocimiento es un anticuerpo primario, puede añadirse un anticuerpo secundario que tiene funcionalidad con una enzima que cataliza la conversión de un cromógeno. Por ello, para cada elemento de reconocimiento, en un cierto tiempo se produce una elevada cantidad de cromógeno.

Los anticuerpos que tienen funcionalidad con no más de tres moléculas de peroxidasa de rábano picante son usados comúnmente en pruebas ELISA. Este grado de sustitución relativamente bajo es determinado principalmente por las dimensiones moleculares de la peroxidasa (aproximadamente 45000 Da) y por ello, aunque es deseable, no pueden obtenerse anticuerpos con un mayor grado de sustitución. Este aspecto es particularmente relevante en vista del hecho según el cual el desarrollo de color depende no sólo del número de anticuerpos unidos a la placa de la prueba ELISA, sino también del número de moléculas de la enzima que amplifica el reconocimiento molecular. Además, las moléculas pequeñas tales como péptidos, antígenos, oligonucleótidos, PNA, antagonistas o agonistas de receptor e inhibidores de enzimas, pierden su habilidad para reconocer las moléculas objetivo, cuando están enlazados a macromoléculas grandes, tales como enzimas naturales o mutadas.

Las enzimas naturales o mutadas propuestas hasta la fecha para pruebas inmunohistoquímicas, hibridación *in situ*, pruebas de ELISA, pruebas de mancha del sur, del norte y del oeste no han probado por ello ser completamente adecuadas para satisfacer los siguientes requerimientos de manera simultánea: 1) muy alta sensibilidad; 2) alta estabilidad; 3) versatilidad y simplicidad de uso.

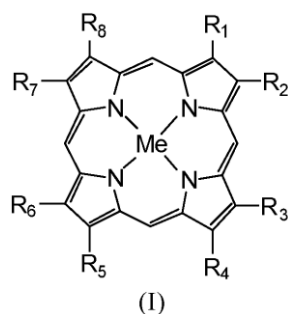
En las siguientes referencias se describen estrategias de conjugación que pueden ser usadas sin alterar las propiedades de las biomoléculas involucradas: Cross-Linking Reagents Technical Handbook from Pierce Biotechnology; Chemistry of Protein and Nucleic Acid Cross-Linking and Conjugation, primera edición, Shan S. Wong, Ed, 1991, CRC Press, ISBN 9780849358869; Bioconjugate Techniques, segunda edición, Greg T. Hermanson, 2008 Elsevier Inc., ISBN: 978-0-12-370501-3.

En "Ana M. Azevedo, et al, "Horseradish peroxidase : a valuable tool in biotechnology", Biotechnology Annual Review, Volume 9, 2003, páginas 199-247, doi:10.1016/S1387-2656(03)09003-3 se describen las aplicaciones de la enzima natural HRP.

#### Descripción de la invención

La presente invención se relaciona con una nueva clase de conjugados de péptido-porfirina de bajo peso molecular (2000-5000 Da) en la que las propiedades biomiméticas de elevada eficiencia catalítica son garantizadas por la particular composición de aminoácidos, que nunca había sido descrita previamente. Los compuestos de acuerdo con la invención pueden ser usados solos o en asociación covalente con las macromoléculas deseadas, tales como anticuerpos mono- y policlonales, fragmentos de anticuerpos, antígenos, receptores, agonistas y antagonistas de receptor, biotina, enzimas, inhibidores de enzima, ácidos nucleicos, PNA, péptidos y proteínas. Los compuestos de acuerdo con la invención pueden ser usados también sobre soporte de matrices sólidas y/o sobre nanopartículas paramagnéticas y no paramagnéticas.

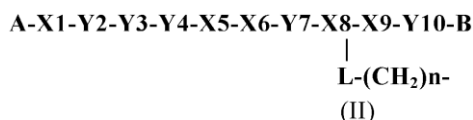
Los compuestos descritos tienen la siguiente fórmula general (I):



en la que:

los átomos de nitrógeno del macrociclo forman complejo con el ion metálico Me, seleccionado del grupo que consiste en Fe, Mn y Ru, en cualquiera de los posibles estados de oxidación;

- 5 R1 es un grupo de la fórmula general (II):



En la que:

$n = 1, \text{ o } 2, \text{ o } 3$ ;

A es Suc, o Ace, o Ace-Asp, o Ace-Asn, o Ace-Pro, o Ace-Lys-Pro, o Ace-Orn-Pro;

- 10 X1 es un aminoácido seleccionado del grupo consistente en Glu, Aada, Arg, hArg, Leu, Lys y Orn;

Y2 es un aminoácido seleccionado del grupo consistente en Gln, Glu, Lys, Orn;

Y3 es un aminoácido seleccionado del grupo consistente en Gln, Glu, Lys, Orn;

Y4 es Leu;

X5 es un aminoácido seleccionado del grupo consistente en His, hCys, Met, 4Taz y 5Taz;

- 15 X6 es un aminoácido seleccionado del grupo consistente en Ser, Thr, Asn, Gln, aThr, Glu, Lys, Orn;

Y7 es un aminoácido seleccionado del grupo consistente en Gln, Glu, Lys, Orn;

X8 es un aminoácido que posee un grupo funcional en la cadena lateral, adecuado para formar un enlace amida, seleccionado del grupo que consiste en Glu, Aada, Orn, Lys, Dap y Dab;

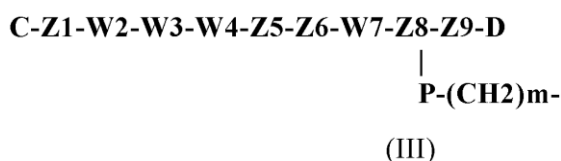
X9 es un aminoácido seleccionado del grupo consistente en Glu, Aada, Arg, hArg, Leu, Lys, Orn;

- 20 Y10 es un aminoácido seleccionado del grupo consistente en Gln, Glu, Lys, Orn;

B es NH<sub>2</sub>, o Ile-NH<sub>2</sub>, o Ile-Thr-NH<sub>2</sub>, o Ile-Thr-Leu-NH<sub>2</sub>, o Ile-Thr-Leu-Lys-NH<sub>2</sub>, o Ile-Thr-Leu-Orn-NH<sub>2</sub>;

L es CO si el grupo funcional en la cadena lateral de X8 es una amida, o NH si el grupo funcional en la cadena lateral de X8 es un carboxilo;

- 25 R2 y R7, que son iguales o diferentes, son H o CH<sub>3</sub>; uno de los sustituyentes R3, R4, R5, R6 o R8 tiene la fórmula Q-(CH<sub>2</sub>)<sub>s</sub>- en la que:  $s = 1, \text{ o } 2, \text{ o } 3$  y Q es NH<sub>2</sub>CO, o CH<sub>3</sub>CONH, o HOOC, o CH<sub>3</sub>OOC, o uno de los sustituyentes R3, R4, R5, R6 o R8 es un grupo de la fórmula general (III):



en la que:

m = 1, o 2, o 3;

C es Suc, o Ace, o Ace-Asp, o Ace-Asn, o Ace-Pro, o Ace-Lys-Pro o Ace-Orn-Pro;

Z1 es un aminoácido seleccionado del grupo consistente en Glu, Aada, Arg, hArg, Leu, Lys y Orn;

W2 es un aminoácido seleccionado del grupo consistente en Gln, Glu, Lys, Orn;

5 W3 es un aminoácido seleccionado del grupo consistente en Gln, Glu, Lys, Orn;

W4 es Leu;

Z5 es un aminoácido seleccionado del grupo consistente en Ser, Gly, Ala y Aib;

Z6 es un aminoácido seleccionado del grupo consistente en Gln, Glu, Lys, Orn, Ser, Thr, Asn, aThr;

W7 es un aminoácido seleccionado del grupo consistente en Gln, Glu, Lys, Orn;

10 Z8 es un aminoácido que posee un grupo funcional en la cadena lateral, adecuado para formar un enlace amida seleccionado del grupo que consiste en Glu, Aada, Orn, Lys, Dap y Dab;

Z9 es un aminoácido seleccionado del grupo consistente en Glu, Aada, Orn, Lys, Arg, hArg y Leu;

D es NH<sub>2</sub>, o Lys-NH<sub>2</sub>, u Orn-NH<sub>2</sub>;

15 P es CO si el grupo funcional en la cadena lateral de Z8 es una amina, o NH si el grupo funcional en la cadena lateral de Z8 es un carboxilo;

los sustituyentes R3, R4, R5, R6 y R8 restantes no ocupados por el grupo de la fórmula (III), que son iguales o diferentes, son seleccionados de H, metilo, etilo o vinilo.

20 La tabla abajo muestra algunas combinaciones de secuencia de los compuestos de acuerdo con las fórmulas generales (II) y (III) en la que cada celda de una fila representa posibles alternativas en una posición dada en la secuencia:

Fórmula general (II)

	Alternativas posibles														
A	Ace Asp	o	Ace Asn	o	Ace Pro	o	Suc	o	Ace	o	Ace Lys Pro	o	Ace Orn Pro		
X1	Glu	o	Arg	o	Aada	o	hArg	o	Leu	o	Lys	o	Orn		
Y2	Gln	o	Glu	o	Lys	o	Orn								
Y3	Gln	o	Glu	o	Lys	o	Orn								
Y4	Leu														
X5	His	o	4Taz	o	5Taz	o	hCys	o	Met						
X6	Ser	o	Thr	o	Asn	o	aThr	o	Gln	o	Glu	o	Lys	o	Orn
Y7	Gln	o	Glu	o	Lys	o	Orn								
X8	Lys	o	Orn	o	Dab	o	Dap	o	Aada	o	Glu				
X9	Arg	o	Glu	o	hArg	o	Aada	o	Leu	o	Lys	o	Orn		
Y10	Lys	o	Orn	o	Gln	o	Glu	o							
B	IleT hrLe uN H2	o	Ile Thr NH2	o	Ile NH2	o	NH2	o	Ile Thr Leu Lys NH2	o	Ile Thr Leu Orn NH 2				

## Fórmula general (III)

C	Alternativas posibles														
	Ace Asp	o	Ace Asn	o	Ace Pro	o	Suc	o	Ace	o	Ace Lys Pro	o	Ace Orn Pro		
Z1	Glu	o	Arg	o	Aada	o	hArg	o	Leu	o	Lys	o	Orn		
W 2	Gln	o	Glu	o	Lys	o	Orn								
W 3	Gln	o	Glu	o	Lys	o	Orn								
W 4	Leu														
Z5	Ser	o	Gly	o	Ala	o	Aib								
Z6	Ser	o	Gln	o	Glu	o	Thr	o	aThr	o	Asn	o	Lys	o	Orn
W 7	Gln	o	Glu	o	Lys	o	Orn								
Z8	Lys	o	Orn	o	Dab	o	Dap	o	Aada	o	Glu				
Z9	Arg	o	Glu	o	Aada	o	hArg	o	Leu	o	Lys	o	Orn		
D	NH2	o	Lys NH2	o	Orn NH2										

Los compuestos preferidos de acuerdo con la invención son aquellos de la fórmula general (I), en la que:

- 5 Los átomos de nitrógeno del macrociclo forman complejos con el ion metálico Me, seleccionado del grupo que consiste en Fe, Mn y Ru, en cualquiera de los posibles estados de oxidación;

R1 tiene la fórmula general (II), en la que:

n = 2, o 3;

A es Suc, o Ace, o Ace-Asp, o Ace-Asn, o Ace-Pro;

- 10 X1 es un aminoácido seleccionado del grupo consistente en Glu, Aada, Arg, hArg, Leu;

Y2 es Gln, o Glu;

Y3 es Gln, o Glu;

Y4 es Leu;

X5 es un aminoácido seleccionado del grupo consistente en His, hCys, Met, 4Taz y 5Taz;

- 15 X6 es un aminoácido seleccionado del grupo consistente en Ser, Thr, Asn, Gln, aThr, Glu;

Y7 es Gln, o Glu;

X8 es un aminoácido que posee un grupo funcional en la cadena lateral, adecuado para formar un enlace amida seleccionado del grupo que consiste en Glu, Aada, Orn, Lys, Dap y Dab;

X9 es un aminoácido seleccionado del grupo consistente en Glu, Aada, Arg, hArg, Leu;

- 20 Y10 es Lys, u Orn;

B es NH2, o Ile-NH2, o Ile-Thr-NH2, o Ile-Thr-Leu-NH2;

L es CO si el grupo funcional en la cadena lateral de X8 es una amina, o es NH si el grupo funcional en la cadena lateral de X8 es un carboxilo;

R2 y R7, que son iguales o diferentes, son H o CH3;

- 25 uno de los sustituyentes R3, R4, R5, R6 o R8 tiene la fórmula Q-(CH<sub>2</sub>)<sub>s</sub>- en la que: s = 2, o 3 y Q es NH<sub>2</sub>CO, o CH<sub>3</sub>CONH, o HOOC, o CH<sub>3</sub>OOC, o uno de los sustituyentes R3, R4, R5, R6 o R8 tiene la fórmula general (III), en la que:



m = 2 o 3;

C es Suc, Ace, Ace-Asp, Ace-Asn, o Ace-Pro;

Z1 es un aminoácido seleccionado del grupo consistente en Glu, Aada, Arg, hArg y Leu;

W2 es Gln, o Glu;

5 W3 es Gln, o Glu;

W4 es Leu;

Z5 es un aminoácido seleccionado del grupo consistente en Ser, Gly, Ala y Aib;

Z6 es un aminoácido seleccionado del grupo consistente en Gln, Glu, Ser, Thr, Asn, aThr;

W7 es Gln o Glu;

10 Z8 es un aminoácido que posee un grupo funcional en la cadena lateral, adecuado para formar un enlace amida seleccionado del grupo que consiste en Glu, Aada, Orn, Lys, Dap y Dab;

Z9 es un aminoácido seleccionado del grupo consistente en Glu, Aada, Orn, hArg y Leu;

D es NH<sub>2</sub>;

15 P es CO si el grupo funcional en la cadena lateral de Z8 es una amina, o es NH si el grupo funcional en la cadena lateral de Z8 es un carboxilo;

los sustituyentes R3, R4, R5, R6 y R8 remanentes no ocupados por el grupo de la fórmula (III), que son iguales o diferentes, son H, metilo, etilo o vinilo.

20 La tabla abajo muestra algunas combinaciones de secuencia de los compuestos preferidos de acuerdo con la fórmula general (II) y (III) en la que cada celda en una fila representa alternativas posibles en una posición dada en la secuencia:

Fórmula general (II)

	Alternativas posibles										
A	Ace-Asp	o	Ace-Asn	o	Ace-Pro	o	Suc	o	Ace		
X1	Glu	o	Arg	o	Aada	o	hArg	o	Leu		
Y2	Gln	o	Glu								
Y3	Gln	o	Glu								
Y4	Leu										
X5	His	o	4Taz	o	5Taz	o	hCys	o	Met		
X6	Ser	o	Thr	o	Asn	o	aThr	o	Gln	o	Glu
Y7	Gln	o	Glu								
X8	Lys	o	Orn	o	Dab	o	Dap	o	Aada	o	Glu
X9	Arg	o	Glu	o	hArg	o	Aada	o	Leu		
Y10	Lys	o	Orn								
B	Ile-Thr-Leu-NH <sub>2</sub>	o	Ile-Thr-NH <sub>2</sub>	o	Ile-NH <sub>2</sub>	o	NH <sub>2</sub>				

Fórmula general (III)

	Alternativas posibles										
C	Ace-Asp	o	Ace-Asn	o	Ace-Pro	o	Suc	o	Ace		
Z1	Glu	o	Arg	o	Aada	o	hArg	o	Leu		
W2	Gln	o	Glu								
W3	Gln	o	Glu								
W4	Leu										
Z5	Ser	o	Gly	o	Ala	o	Aib				
Z6	Ser	o	Gln	o	Glu	o	Thr	o	aThr	o	Asn
W7	Gln	o	Glu								
Z8	Lys	o	Orn	o	Dab	o	Dap	o	Aada	o	Glu
Z9	Arg	o	Glu	o	Aada	o	hArg	o	Leu		
D	NH <sub>2</sub>										

Los compuestos más preferidos de acuerdo con la invención son aquellos de la fórmula general (I), en la que:

- 5 Los átomos de nitrógeno del macrociclo forman complejos con el ion metálico Me, seleccionado del grupo que consiste en Fe, Mn y Ru, en cualquiera de los posibles estados de oxidación;

R1 tiene la fórmula general (II), en la que:

$n=2$ ;

A es Ace-Asp, o Ace-Asn, o Ace-Pro;

- 10 X1 es seleccionado del grupo que consiste en Glu, Aada, Arg, hArg, Leu;

Y2 es Gln o Glu;

Y3 es Gln o Glu;

Y4 es Leu;

X5 es un aminoácido seleccionado del grupo consistente en His, 4Taz y 5Taz;

- 15 X6 es un aminoácido seleccionado del grupo consistente en Ser, Thr, Asn, aThr;

Y7 es Gln o Glu;

X8 es un aminoácido seleccionado del grupo consistente en Orn, Lys, Dap y Dab;

X9 es un aminoácido seleccionado del grupo consistente en Glu, Aada, Arg, hArg, Leu;

Y10 es Lys, u Orn;

- 20 B es Ile-Thr-Leu-NH<sub>2</sub>;

L es CO;

R2 y R7 son CH<sub>3</sub>;

R8 tiene la fórmula Q-(CH<sub>2</sub>)<sub>s</sub>- en la que:  $s = 2$ , y Q es NH<sub>2</sub>CO, o CH<sub>3</sub>CONH, o HOOC, o CH<sub>3</sub>OOC, o R8 tiene la fórmula general (III), en la que:

- 25  $m = 2$ ;

C es Ace-Asp, o Ace-Asn, o Ace-Pro;

Z1 es un aminoácido seleccionado del grupo consistente en Glu, Aada, Arg y hArg;

W2 es Gln, o Glu;

W3 es Gln, o Glu;

W4 es Leu;

5 Z5 es un aminoácido seleccionado del grupo consistente en Ser, Gly, Ala y Aib;

Z6 es un aminoácido seleccionado del grupo consistente en Gln, Glu, Ser;

W7 es Gln, o Glu;

Z8 es un aminoácido seleccionado del grupo consistente en Orn, Lys, Dap y Dab;

Z9 es un aminoácido seleccionado del grupo consistente en Glu, Aada, Arg y hArg;

10 D es NH<sub>2</sub>;

P es CO;

R3, R4, R5, R6, que son iguales o diferentes, son H o metilo.

La tabla abajo muestra algunas combinaciones de secuencia de los compuestos más preferidos de acuerdo con la fórmula general (II) y (III) en la que cada celda en una fila representa alternativas posibles en una posición dada en la secuencia:

15

Fórmula general (II)

	Alternativas posibles								
A	Ace-Asp	o	Ace-Asn	o	Ace-Pro				
X1	Glu	o	Arg	o	Aada	o	hArg	o	Leu
Y2	Gln	o	Glu						
Y3	Gln	o	Glu						
Y4	Leu								
X5	His	o	4Taz	o	5Taz				
X6	Ser	o	Thr	o	Asn	o	aThr		
Y7	Gln	o	Glu						
X8	Lys	o	Orn	o	Dab	o	Dap		
X9	Arg	o	Glu	o	hArg	o	Aada	o	Leu
Y10	Lys	o	Orn						
B	Ile-Thr-Leu-NH <sub>2</sub>								

Fórmula general (III)

	Alternativas posibles						
C	Ace-Asp	o	Ace-Asn	o	Ace-Pro		
Z1	Glu	o	Arg	o	Aada	o	hArg
W2	Gln	o	Glu				
W3	Gln	o	Glu				
W4	Leu						
Z5	Ser	o	Gly	o	Ala	o	Aib
Z6	Ser	o	Gln	o	Glu		
W7	Gln	o	Glu				

Z8	Lys	o	Orn	o	Dab	o	Dap
Z9	Arg	o	Glu	o	Aada	o	hArg
(continuación)							
Alternativas posibles							
D	NH2						

Los compuestos incluso más preferidos de acuerdo con la invención son aquellos de la fórmula general (I), en la que:

- 5 Los átomos de nitrógeno del macrociclo forman complejos con el ion metálico Me, seleccionado del grupo que consiste en Fe, Mn y Ru, en cualquiera de los posibles estados de oxidación;

R1 tiene la fórmula general (II), en la que:

$n=2$ ;

A es Ace-Asp;

X1 es Glu, o Arg, o Leu;

- 10 Y2 es Gln, o Glu;

Y3 es Gln, o Glu;

Y4 es Leu;

X5 es His;

X6 es un aminoácido seleccionado del grupo consistente en Ser, Thr, Asn, aThr;

- 15 Y7 es Gln, o Glu;

X8 es Lys;

X9 es Glu, o Arg, o Leu;

Y10 es Lys, u Orn;

B es Ile-Thr-Leu-NH<sub>2</sub>;

- 20 L es CO;

R2 y R7 son CH<sub>3</sub>;

R8 tiene la fórmula Q-(CH<sub>2</sub>)<sub>s</sub>- en la que:  $s = 2$  y Q es NH<sub>2</sub>CO, o CH<sub>3</sub>CONH, o HOOC, o CH<sub>3</sub>OOC, o R8 tiene la fórmula general (III), en la que:

$m = 2$ ;

- 25 C es Ace-Asp;

Z1 es Glu, o Arg;

W2 es Gln, o Glu;

W3 es Gln, o Glu;

W4 es Leu;

- 30 Z5 es un aminoácido seleccionado del grupo consistente en Ser, Gly, Ala y Aib;

Z6 es un aminoácido seleccionado del grupo consistente en Gln, Glu, Ser;

W7 es Gln, o Glu, o Aib;

Z8 es Lys;

Z9 es Glu, o Arg;

D es NH<sub>2</sub>;

P es CO;

R3, R4, R5, R6, que son iguales o diferentes, son H o metilo.

- 5 La tabla abajo muestra algunas combinaciones de secuencia de los compuestos incluso más preferidos de acuerdo con la fórmula general (II) y (III) en la que cada celda en una fila representa alternativas posibles en una posición dada de la secuencia:

Fórmula general (II)

	Alternativas posibles						
A	Ace-Asp						
X1	Glu	o	Arg	o	Leu		
Y2	Gln	o	Glu				
Y3	Gln	o	Glu				
Y4	Leu						
X5	His						
X6	Ser	o	Thr	o	Asn	o	aThr
Y7	Gln	o	Glu				
X8	Lys						
X9	Arg	o	Glu	o	Leu		
Y10	Lys	o	Orn				
B	Ile-Thr-Leu-NH <sub>2</sub>						

- 10 Fórmula general (III)

	Alternativas posibles								
C	Ace-Asp								
Z1	Glu	o	Arg						
W2	Gln	o	Glu						
W3	Gln	o	Glu						
W4	Leu								
Z5	Ser	o	Gly	o	Ala	o	Aib		
Z6	Ser	o	Gln	o	Glu				
W7	Gln	o	Glu						
Z8	Lys								
Z9	Arg	o	Glu						
D	NH <sub>2</sub>								

Los compuestos de la fórmula general (I) pueden ser usados también en combinación con iones contrarios adecuados, siempre y cuando ellos sean compatibles con las aplicaciones específicas.

- 15 Las propiedades únicas, completamente nuevas descritas a continuación, para compuestos con bajo peso molecular, tales como las moléculas reivindicadas, se derivan de las soluciones estructurales elegidas. Los productos de adición doble de péptido-porfirina con las siguientes características estructurales son reportados y

reivindicados por primera vez: a) dos péptidos de diferentes longitudes; una cadena de péptido contiene 10 a 16 residuos de aminoácido, y la otra contiene 9 a 12 residuos de aminoácido; b) dos péptidos de igual longitud, es decir 10 o 11 o 12 residuos de aminoácido, nunca descritos anteriormente en asociación covalente con porfirinas. También se reportan y reivindican por primera vez productos de adición simple de péptido-porfirina con las siguientes características estructurales: a) la cadena de péptido contiene 10 a 16 residuos de aminoácido; b) la secuencia de péptido no ha sido descrita previamente nunca en asociación covalente con porfirinas.

Sorprendentemente, todas estas soluciones estructurales confieren buena solubilidad en agua (> mM) a los compuestos reivindicados, incluso cuando los diferentes constituyentes no son principalmente hidrofílicos. Esta característica es particularmente importante porque permite el uso de las moléculas reivindicadas en soluciones tanto acuosas como de agua-alcohol, eliminando de ese modo los problemas de aplicación de otras numerosas porfirinas modificadas, reportadas anteriormente.

Además, a diferencia de los procesos reportados a la fecha, cuando las moléculas reivindicadas son usadas como catalizadores para activar moléculas inertes tales como  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2$  o  $\text{NO}$ , el elevado número de transferencia y eficiencia catalítica son comparables con o mayores que las de las hemoproteínas naturales o mutadas. Esta característica es un requerimiento esencial para aplicaciones industriales de bajo costo. Los compuestos descritos aquí tienen muy alta actividad específica, como se describe de modo particular en el ejemplo 13. Son capaces de convertir varios kilogramos de sustrato por minuto, por cada gramo de catalizador usado.

A continuación se resumen los valores de actividad específica de algunos de los compuestos reivindicados, en la oxidación de ABTS usando  $\text{H}_2\text{O}_2$  como agente oxidante.

Enzima	Actividad específica ( $\text{mol g}^{-1} \text{ min}^{-1}$ )
Ejemplo 1	6.27
Ejemplo 4	17.86
Ejemplo 5	11.72
Ejemplo 6	13.43
Ejemplo 7	7.98
Ejemplo 8	6.46
Ejemplo 9	2.89

Además, la naturaleza química de los compuestos de acuerdo con la invención hace su funcionalización covalente con biomoléculas, particularmente simple, económica y versátil, y sobre todo, las pequeñas dimensiones moleculares suministran macromoléculas biológicas, tales como anticuerpos mono- y policlonales, fragmentos de anticuerpo, antígenos, receptores, agonistas y antagonistas del receptor, biotina, enzimas, inhibidores de enzima, ácidos nucleicos, PNA, péptidos y proteínas, con un grado muy alto de sustitución con las moléculas reivindicadas, pero sin modificar sus propiedades y aumentando al mismo tiempo la cantidad de catalizador presente. Por ello, una sonda química, electroquímica o espectroscópica puede ser focalizada sobre una macromolécula objetivo, con la característica de amplificar el fenómeno de reconocimiento con gran eficiencia.

Además, si las moléculas reivindicadas tienen como soporte matrices sólidas o nanopartículas, con los métodos conocidos a partir de la literatura puede obtenerse un elevado grado de recubrimiento del soporte. El recubrimiento puede ser hasta 10 veces mayor que el obtenido cuando se usan sistemas de enzimas naturales o mutadas.

Por ello, los compuestos reivindicados pueden ser usados como: 1) catalizadores en reacciones de hidroxilación de hidrocarburos alifáticos y aromáticos, usando agentes oxidantes limpios ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2$ ); 2) catalizadores en las reacciones de epoxidación de olefinas alifáticas y aromáticas usando agentes oxidantes limpios ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2$ ); 3) catalizadores en las reacciones de oxidación de hidrocarburos alifáticos y aromáticos usando agentes oxidantes limpios ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2$ ); 4) catalizadores en las reacciones de peroxidación de hidrocarburos alifáticos y aromáticos usando agentes oxidantes limpios ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2$ ); 5) catalizadores de nitración de fenol; 6) degradación de contaminantes; 7) degradación de lignina; 8) sondas para determinar los contaminantes en el agua; 9) sondas para determinar conservantes en alimentos; 10) sondas para determinar la concentración de drogas y productos tóxicos el cuerpo; 11) diagnóstico *in vitro* para determinar la ruta metabólica de medicamentos; 12) determinación de la concentración de medicamentos y productos tóxicos en fluidos biológicos; 13) inmunodiagnóstico; 14) pruebas inmunohistoquímicas; 15) hibridación *in situ*; 16) pruebas ELISA; 17) en pruebas de mancha del sur, del norte y del oeste; 18) citofluorometría; 19) dispositivos electroquímicos.

Además, los compuestos de acuerdo con la invención son de fácil síntesis y purificación y, como ellos tienen un bajo peso molecular, pueden ser obtenidos a gran escala a menores costos que las hemoproteínas obtenidas

mediante expresión o extracción. El procedimiento de síntesis propuesto se basa principalmente en métodos de síntesis de péptidos establecidos en fase sólida, donde se prefiere la síntesis con grupos protectores característicos de la química de Fmoc. Muchos de los macrociclos de nitrógeno requeridos para sintetizar los productos reivindicados, están disponibles comercialmente o pueden ser sintetizados con uno de los métodos descritos en la literatura (Wijesekera T.P. & Dolphin D. en "Metalloporphyrins in catalytic oxidations" 1994, ed. Sheldon R.A., Dekker N.Y.).

Los compuestos de la fórmula (I) con los cuales se relaciona esta invención pueden ser sintetizados con las diferentes técnicas conocidas a partir de la literatura. Estas técnicas incluyen síntesis de péptidos en fase sólida, síntesis de péptidos en solución, métodos de síntesis de química orgánica, o cualquier combinación de ellos. Obviamente, el esquema de síntesis escogido dependerá de la composición de la molécula particular. Preferiblemente se usan métodos de síntesis basados en combinaciones apropiadas de técnicas de fase sólida y métodos clásicos en solución, que involucran bajos costos de manufactura, especialmente a escala industrial. En detalle, estos métodos involucran:

i) Síntesis en solución de fragmentos de cadena de péptido, mediante el acoplamiento sucesivo de aminoácidos activados de manera adecuada, protegidos en N con un aminoácido o una cadena de péptido protegida en C, con aislamiento de los productos intermedios, subsiguiente eliminación selectiva de la protección de los extremos terminales en N y C de dichos fragmentos y su acoplamiento hasta que se ha obtenido el péptido deseado. Estas etapas son seguidas por la eliminación selectiva de la protección de los grupos involucrados en el enlace con el macrociclo de nitrógeno y por su condensación en macrociclo. La eliminación completa de la protección de las cadenas laterales puede ser ejecutada en cualquier etapa, cuando sea necesario.

ii) Síntesis en fase sólida en las cadenas de péptido desde el extremo terminal en C hasta el extremo terminal en N, sobre un soporte de polímero insoluble, eliminación selectiva de la protección de la cadena lateral del residuo X8, y separación de la resina del péptido protegido en las otras cadenas laterales, cuando sea necesario. Esto es seguido por la condensación de los péptidos con el grupo funcional sobre el macrociclo de nitrógeno en la forma compleja y la no compleja con el metal, con uno de los métodos conocidos a partir de la literatura para la formación de un enlace amida. Esto es seguido por la eliminación total de la protección, con TFA en presencia de captadores adecuados. Opcionalmente, el metal inserto en el macrociclo contiene nitrógeno, si no está presente ya.

Los siguientes ejemplos que no son limitantes ilustran adicionalmente los compuestos de acuerdo con la invención.

Ejemplo 1. síntesis de 3,7,12,17-tetrametilporfirina-2(18)-N<sub>9</sub><sup>ε</sup>-(Ace-Asp<sup>1</sup>-Glu<sup>2</sup>-Gln<sup>3</sup>-Gln<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-Ser<sup>7</sup>-Gln<sup>8</sup>-Lys<sup>9</sup>-Arg<sup>10</sup>-Lys<sup>11</sup>-Ile<sup>12</sup>-Thr<sup>13</sup>-Leu<sup>14</sup>-NH<sub>2</sub>)-18(2)-N<sub>9</sub><sup>ε</sup>-(Ace-Asp<sup>1</sup>-Glu<sup>2</sup>-Gln<sup>3</sup>-Gln<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Ser<sup>6</sup>-Ser<sup>7</sup>-Gln<sup>8</sup>-Lys<sup>9</sup>-Arg<sup>10</sup>-NH<sub>2</sub>)-di-propionamida; compuesto de la fórmula general (I) en la cual:

Los átomos de nitrógeno del macrociclo están coordinados al ion Fe<sup>3+</sup>; R<sub>2</sub> y R<sub>7</sub> son CH<sub>3</sub>; R<sub>4</sub> y R<sub>6</sub> son H; R<sub>3</sub> y R<sub>5</sub> son CH<sub>3</sub>; R<sub>1</sub> es de la fórmula general(II), en la cual: n = 2; A es Ace-Asp, X<sub>1</sub> es Glu; Y<sub>2</sub> es Gln; Y<sub>3</sub> es Gln; Y<sub>4</sub> es Leu; X<sub>5</sub> es His; X<sub>6</sub> es Ser; Y<sub>7</sub> es Gln; X<sub>8</sub> es Lys (N,epsilon-propionamida); X<sub>9</sub> es Arg; Y<sub>10</sub> es Lys; B es Ile-Thr-Leu-NH<sub>2</sub>; L es CO; A es Ace-Asp; R<sub>8</sub> es de la fórmula general(III), en la cual: m = 2; C es Ace-Asp; Z<sub>1</sub> es Glu; W<sub>2</sub> es Gln; W<sub>3</sub> es Gln; W<sub>4</sub> es Leu; Z<sub>5</sub> es Ser; Z<sub>6</sub> es Ser; W<sub>7</sub> es Gln; Z<sub>8</sub> es Lys (N,epsilon-propionamida); Z<sub>9</sub> es Arg; D es NH<sub>2</sub>; P es CO.

Los diferentes pasos para la síntesis de 3,7,12,17-tetrametilporfirina-2(18)-N<sub>9</sub><sup>ε</sup>-(Ace-Asp<sup>1</sup>-Glu<sup>2</sup>-Gln<sup>3</sup>-Gln<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-Ser<sup>7</sup>-Gln<sup>8</sup>-Lys<sup>9</sup>-Arg<sup>10</sup>-Lys<sup>11</sup>-Ile<sup>12</sup>-Thr<sup>13</sup>-Leu<sup>14</sup>-NH<sub>2</sub>)-18(2)-N<sub>9</sub><sup>ε</sup>-(Ace-Asp<sup>1</sup>-Glu<sup>2</sup>-Gln<sup>3</sup>-Gln<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Ser<sup>6</sup>-Ser<sup>7</sup>-Gln<sup>8</sup>-Lys<sup>9</sup>-Arg<sup>10</sup>-NH<sub>2</sub>)-di-propionamida son reportados a continuación.

Síntesis del decapeptido (Ace-Asp<sup>1</sup>(OtBu)-Glu<sup>2</sup>(Ot-Bu)-Gln<sup>3</sup>(Trt)-Gln<sup>4</sup>(Trt)-Leu<sup>5</sup>-Ser<sup>6</sup>(tBu)-Ser<sup>7</sup>(tBu)-Gln<sup>8</sup>(Trt)-Lys<sup>9</sup>-Arg<sup>10</sup>(Pbf)-NH<sub>2</sub>) (1)

El péptido (1) fue sintetizado usando la estrategia Fmoc en síntesis de péptido manual en fase sólida, sobre resina de amida Sieber. La resina Sieber es una resina 9-Fmoc-amino-xanten-3-iloxi-Merrifield (malla 100-200, 1% de 2,2,4,6,7-pentametilhidrobenzo-furano, nivel de sustitución 0.52 mmol g<sup>-1</sup>), y es un excelente soporte para la síntesis de péptidos protegidos con amidas.

Los aminoácidos se insertaron como Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH. El residuo de Lys en la posición 9 se insertó como Fmoc-Lys(Mmt)-OH. El grupo protector metoxitritilo (Mmt) es un grupo protector que puede ser retirado de la cadena lateral de lisina en condiciones ácidas suaves (1% TFA en DCM o AcOH/TFE/DCM 1:2:7 (v/v)); este comportamiento permite el retiro selectivo del grupo Mmt en presencia de otros grupos protectores de cadena lateral, que requieren retiro de hasta 95% TFA. El retiro selectivo de este grupo permite el acoplamiento de un péptido completamente protegido, a través del grupo amino ε libre de la cadena lateral Lys 9, con el macrociclo porfirina.

La síntesis fue llevada a cabo en un escala de 0.25 mmol. La eliminación de la protección N-α-Fmoc fue lograda

con una solución de piperidina/DMF 20% (v/v). Para cada ciclo se usaron dos tratamientos separados, de 3 y 7 minutos.

Para cada aminoácido se ejecutaron dos pasos de acoplamiento (tiempo de acoplamiento 45 min). Para el primer acoplamiento, se usaron 3 equivalentes de aminoácido-Fmoc, 3 equivalentes de PyBop/HOBt, y 6 equivalentes de DIEA en N,N-dimetilformamida (DMF); en cambio, para el segundo acoplamiento se emplearon 2 equivalentes de aminoácido-Fmoc, 2 equivalentes de HATU, y 4 equivalentes de DIEA en DMF. Después de cada acoplamiento, mediante la prueba de Kaiser se evaluó si se había completado la reacción.

Una vez se completó la síntesis, se acetiló el extremo N con anhídrido acético 4.7% y piridina 4% en DMF por 15 min.

El retiro selectivo del grupo Mmt de lisina 9 fue logrado mediante tratamiento de la resina de peptidilo con AcOH/TFE/DCM 1:2:7 (v/v), en un embudo de vidrio sinterizado. Se agitó la resina por 10 min, y se retiró el solvente en bajo vacío. Este paso fue repetido 15 veces. Finalmente, se lavó la resina con isopropanol y DCM. Después de la escisión del grupo Mmt, se escindió de la resina el péptido totalmente protegido con amida, mediante aplicación de una solución 1% TFA/DCM (porcentaje en volumen). Se agitó la resina por 2 min, y se colectó la solución filtrada dentro de un matraz enfriado con hielo que contenía piridina/metanol 5% (porcentaje en volumen). Este tratamiento fue repetido muchas veces. Finalmente, se lavó la resina con DCM. Los filtrados fueron evaluados mediante TLC sobre gel de sílice en cloroformo/metanol/ácido acético 80:18:2 (v/v/v). Se combinaron las fracciones que contenían el producto deseado y se evaporaron bajo presión reducida hasta 5% del volumen.

Se añadió agua enfriada con hielo al residuo y se enfrió la mezcla sobre hielo para ayudar a la precipitación del péptido protegido. Se filtró el producto, se lavó varias veces con agua fresca, y se secó bajo vacío para dar la decapeptido amida cruda terminal en C (1).

Se confirmó la homogeneidad del producto mediante RP-HPLC analítica, sobre una columna C18, usando un gradiente de acetonitrilo en TFA 0.1% acuoso, 50% a 95% durante 30 min, rata de flujo 1 mLmin<sup>-1</sup>). El cromatograma mostró un pico principal a un tiempo de retención de 23.8 min. La identidad del péptido fue evaluada mediante espectrometría ESI-MS, que confirmó el peso molecular esperado (2463 u.m.a.)

Se obtuvo el péptido con un rendimiento de 85%.

Síntesis del tetradecapéptido Ace-Asp<sup>1</sup>(OtBu)-Glu<sup>2</sup>(OtBu)-Gln<sup>3</sup>(Trt)-Gln<sup>4</sup>(Trt)-Leu<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>(Trt)-Ser<sup>7</sup>(tBu)-Gln<sup>8</sup>(Trt)-Lys<sup>9</sup>-Arg<sup>10</sup>(Pbf)-Lys<sup>11</sup>(Boc)-Ile<sup>12</sup>-Thr<sup>13</sup>(tBu)-Leu<sup>14</sup>-NH<sub>2</sub>(2)

La síntesis del tetradecapéptido (2) fue ejecutada de modo similar a la del decapeptido (1). Se insertaron los aminoácidos como Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-His(Trt)-OH. El residuo Lys fue insertado en la posición 9 como Fmoc-Lys(Mmt)-OH.

Se confirmó la homogeneidad del producto mediante RP-HPLC analítica, sobre una columna C18, usando un gradiente de acetonitrilo en TFA acuoso 0.1%, 50% a 95% durante 30 min, rata de flujo 1 mLmin<sup>-1</sup>). El cromatograma mostró un pico principal a un tiempo de retención de 23.4 min. La identidad del péptido fue evaluada mediante espectrometría ESI-MS, que confirmó el peso molecular esperado (3311 uma).

Se obtuvo el péptido con un rendimiento de 90%.

Síntesis del producto intermedio de péptido-porfirina (3): 3,7,12,17-tetrametilporfirina-18(2)-ácido propiónico -2(18)-N<sub>9</sub><sup>ε</sup>-(Ace-Asp<sup>1</sup>(OtBu)-Glu<sup>2</sup>(OtBu)-Gln<sup>3</sup>(Trt)-Gln<sup>4</sup>(Trt)-Leu<sup>5</sup>-Ser<sup>6</sup>(tBu)-Ser<sup>7</sup>(tBu)-Gln<sup>8</sup>(Trt)-Lys<sup>9</sup>-Arg<sup>10</sup>(Pbf)-NH<sub>2</sub>) propionamida, producto de adición de monopeptido.

Este producto intermedio fue sintetizado mediante acoplamiento del decapeptido (1) a la deuteroporfirina IX (DP-IX) en solución.

Se disolvieron el decapeptido (1) (0.100 g, 0.040 mmol) y la deuteroporfirina IX·2HCl (0.028 g, 0.048 mmol) en 30 mL de DMF, que contenía DIEA (0.032 mL, 0.184 mmol). Se añadió entonces gota a gota una solución de PyBop (0.025 g, 0.048 mmol), HOBt (0.0075 g, 0.048 mmol), y DIEA (0.017 mL, 0.096 mmol) en DMF (10 mL). Se agitó la mezcla de reacción por 3 h a temperatura ambiente. Se vigiló la reacción mediante HPLC analítica en una columna C8, usando un gradiente de acetonitrilo en TFA acuoso al 0.1%, 50% a 90% durante 20 min, y mediante TLC sobre gel de sílice (sistema de solvente cloroformo/metanol 90:10). Se evaporó la mezcla de reacción bajo presión reducida hasta 20% del volumen, y se precipitó con dietiléter frío. Se purificó el producto crudo sobre una columna de gel de sílice gel (5 x 60 cm), con elución paso a paso usando un gradiente de cloroformo/metanol de 0 a 10% de metanol. El producto eluyó a 10% de metanol, con rendimiento de 48%. La RP-HPLC analítica y espectrometría ESI/MS confirmaron la pureza e identidad del producto (2980 uma).



Síntesis del producto final: 3,7,12,17-tetrametil porfirina-2(18)-N<sub>9</sub><sup>ε</sup>-(Ace-Asp<sup>1</sup>-Glu<sup>2</sup>-Gln<sup>3</sup>-Gln<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-Ser<sup>7</sup>-Gln<sup>8</sup>-Lys<sup>9</sup>-Arg<sup>10</sup>-Lys<sup>11</sup>-Ile<sup>12</sup>-Thr<sup>13</sup>-Leu<sup>14</sup>-NH<sub>2</sub>)-18(2)-N<sub>9</sub><sup>ε</sup>-(Ace-Asp<sup>1</sup>-Glu<sup>2</sup>-Gln<sup>3</sup>-Gln<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Ser<sup>6</sup>-Ser<sup>7</sup>-Gln<sup>8</sup>-Lys<sup>9</sup>-Arg<sup>10</sup>-NH<sub>2</sub>)-di-propionamida (4)

- Se disolvieron el producto de adición de mon péptido (3) (0.050 g, 0.017 mmol), tetradecapéptido (2) (0.052 g, 0.017 mmol), y DIEA (0.009 mL, 0.051 mmol) en 16 mL de TFE 20% (v/v) en DMF. Se añadió entonces gota a gota una solución de HATU (0.0065 g, 0.017 mmol) en 1 mL de DMF, y se dejó que la reacción ocurriera a temperatura ambiente por un total de 2 h. Se evaluó el pH durante el tiempo de reacción. Se hizo seguimiento al progreso de la reacción mediante HPLC analítica (columna Vydac C8, usando un gradiente de acetonitrilo en TFA acuoso al 0.1%, 50% a 90% durante 20 min, rata de flujo 1 mLmin<sup>-1</sup>), y mediante TLC (sistema de solvente cloroformo/metanol 90:10). Se evaporó la mezcla de reacción bajo presión reducida hasta 20% del volumen y se precipitó con dietiléter frío. Se secó el producto crudo al vacío. La eliminación de la protección de la cadena lateral fue lograda mediante adición de la mezcla de escisión (0.75 g de fenol en tioanisoles/H<sub>2</sub>O/EDT/TFA 0.25/0.5/0.5/8.75, v/v/v/v) (1,2-etanoditiol: EDT) a 0°C por 2.5 h. Este tratamiento fue ejecutado dos veces. Se concentró la mezcla de reacción en un evaporador rotativo hasta un volumen de aproximadamente 1-2 mL. La extracción de los captore y precipitación del producto crudo fueron logrados mediante adición de dietiléter frío. Se secó entonces al vacío el material crudo y se purificó mediante RP-HPLC preparativa en una columna C18, usando un gradiente de acetonitrilo en TFA acuoso al 0.1%, 10% a 80% durante 35 min; se liofilizaron las fracciones combinadas que contenían el producto deseado, proporcionando 0.025 g (7.2 x 10<sup>-3</sup> mmol, rendimiento 42%) del producto final. La RP-HPLC analítica indicó que el producto purificado tenía una pureza > 99%, y se confirmó por ESI/MS el peso molecular esperado (3499 uma).
- Síntesis del complejo Fe<sup>3+</sup> del producto 3,7,12,17-tetrametil-porfirina-2(18)-N<sub>9</sub><sup>ε</sup>-(Ace-Asp<sup>1</sup>-Glu<sup>2</sup>-Gln<sup>3</sup>-Gln<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-Ser<sup>7</sup>-Gln<sup>8</sup>-Lys<sup>9</sup>-Arg<sup>10</sup>-Lys<sup>11</sup>-Ile<sup>12</sup>-Thr<sup>13</sup>-Leu<sup>14</sup>-NH<sub>2</sub>)-18(2)-N<sub>9</sub><sup>ε</sup>-(Ace-Asp<sup>1</sup>-Glu<sup>2</sup>-Gln<sup>3</sup>-Gln<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Ser<sup>6</sup>-Ser<sup>7</sup>-Gln<sup>8</sup>-Lys<sup>9</sup>-Arg<sup>10</sup>-NH<sub>2</sub>)-di-propionamida (5)

- El ion hierro fue insertado dentro del macrociclo de acuerdo con un procedimiento de la literatura (Buchler JW. en The Porphyrins, vol. 1 (Ed. D. Dolphin), Academic Press. Nueva York. 1979, pp.389). Se añadió acetato precipitado (exceso de 50 molar) a una solución del compuesto final (4) (0.006 g, 1.7 x 10<sup>-6</sup> mol, concentración final 1.0 x 10<sup>-4</sup> M) ácido acético/TFE 6/4 v/v. Se mantuvo la mezcla de reacción a 40°C por 3 h, haciendo reflujo bajo nitrógeno. Se hizo seguimiento a la reacción mediante HPLC analítica. Se retiró entonces del solvente bajo vacío, y se purificó el producto hasta la homogeneidad mediante RP-HPLC preparativa sobre una columna C18, usando un gradiente de acetonitrilo en TFA acuoso al 0.1%, 10% a 80% durante 58.4 min. Se obtuvieron 0.0032 g (0.90 x 10<sup>-3</sup> mmol, rendimiento 54%) de producto puro. El análisis por ESI/MS confirmó el peso molecular esperado (3552 uma).

Ejemplo 2. Síntesis del compuesto descrito en el ejemplo 1, enlazado de manera covalente a un anticuerpo

- Se enlazó el compuesto descrito en el Ejemplo 1 de manera covalente a anticuerpos monoclonales de murina anti-humano IgG, denominados a continuación como IgG, usando un agente de enlace heterobifuncional. Se seleccionó el sulfo-SMCC (agente de enlace) puesto que este reactivo es un agente de entrecruzamiento amina-a-sulfhidrilo. Los agentes de enlace heterobifuncionales son los reactivos a elegir para obtener alto nivel de conjugación, dado que ellos no determinan la formación de entrecruzamiento entre dos fragmentos idénticos, tales como anticuerpo-anticuerpo. El protocolo de conjugación estaba compuesto de dos pasos.

Modificación de cadena lateral de Lys11 del compuesto (5) con el reactivo sulfo-SMCC (6)

- Se disolvieron 0.002 g de compuesto (5) en 0.8 mL de fosfato 0.1 M, NaCl 0.15 M a pH=7.2. A esta solución se añadieron 0.2 mL de una solución acuosa que contenía 0.0043 g de sulfo-SMCC (relación molar ≈ 1:20). Se incubó la mezcla de reacción a temperatura ambiente por 2 horas, bajo agitación.

Se hizo seguimiento al curso de la reacción mediante LC-MS. Una vez estuvo completa la reacción, se purificó la mezcla de reacción usando una columna PD10 de desalinización, usando fosfato 100 mM, NaCl 150 mM, pH 7.2, como amortiguador de elución. Se combinaron y liofilizaron las fracciones que contenían el producto (6) deseado.

- Introducción de grupos sulfhidrilo dentro de moléculas IgG (7)

Se añadieron 0.8 mg de N-succinimidil S-acetiltioacetato (SATA), disueltos en 0.010 mL de acetonitrilo a una solución de anticuerpo (IgG, 1 mg/mL, ≈ 6.7 10<sup>-6</sup> M) en amortiguador de carbonato 0.1 M, pH 9. Se mantuvo la reacción a temperatura ambiente por 30 minutos, bajo agitación. Se purificaron los anticuerpos modificados usando una columna de desalinización, se realizó elución con amortiguador de carbonato 0.1 M, pH 9.

- Se ejecutó desacetilación del anticuerpo modificado con SATA mediante adición de 0.100 mL de solución madre de hidroxilamina (preparada disolviendo 0.050 g de clorhidrato de hidroxilamina en 1.0 mL de amortiguador de carbonato 0.1 M, pH 9) a la solución de anticuerpo modificada con SATA (el exceso molar de NH<sub>2</sub>OH es de aproximadamente 30 veces sobre el anticuerpo).

Se mantuvo la reacción a temperatura ambiente por 2 horas, bajo agitación. Con objeto de purificar el producto de reacción del exceso de hidroxilamina, se usó una columna de desalinización, llevada a equilibrio con amortiguador de fosfato 100 mM, NaCl 150 mM, EDTA 25 mM, pH 5.

Conjugación del anticuerpo (7) modificado con el compuesto (6) para suministrar el producto (8) conjugado

- 5 El producto (8) de conjugación final fue obtenido mediante reacción de 0.0025 g de (6) con 0.001 g de anticuerpos (7) modificados, en un volumen de reacción de 0.003 L.

Se mantuvo la reacción a temperatura ambiente por 2 horas, bajo agitación. Se hizo seguimiento al curso de la reacción mediante HPLC analítica usando una columna de exclusión por tamaño llevada a equilibrio con amortiguador de fosfato 0.1 M, SDS 3.5 mM, pH6. Se purificó el producto de conjugación mediante filtración en gel usando una columna de vidrio (10 x 150 mm, empacada con Sephadex G-100 superfino 10-40). La separación fue realizada en amortiguador de fosfato 0.1 M, NaCl 0.15 M, pH 7 a una rata de flujo de 3 mL/h. Se evaluó la relación de conjugación analizando la relación de absorbancia entre las bandas de 280 y 398 nm, y se estimó que era 13 (compuesto (6)/IgG).

- 15 Ejemplo 3. síntesis del compuesto 3,7,12,17-tetrametil-porfirina-2(18)-N<sup>9</sup>ε-(Ace-Asp<sup>1</sup>-Glu<sup>2</sup>-Gln<sup>3</sup>-Gln<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-Ser<sup>7</sup>-Gln<sup>8</sup>-Lys<sup>9</sup>-Arg<sup>10</sup>-Lys<sup>11</sup>-Ile<sup>12</sup>-Thr<sup>13</sup>-Leu<sup>14</sup>-NH<sub>2</sub>)-18(2)-N<sup>9</sup>ε-(Ace-Asp<sup>1</sup>-Glu<sup>2</sup>-Gln<sup>3</sup>-Gln<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Ser<sup>6</sup>-Ser<sup>7</sup>-Gln<sup>8</sup>-Lys<sup>9</sup>-Arg<sup>10</sup>-NH<sub>2</sub>)-di-propionamida, de la fórmula general (I) en la cual:

Los átomos de nitrógeno del macrociclo están coordinados al ion Ru<sup>2+</sup>; R<sub>2</sub> y R<sub>7</sub> son CH<sub>3</sub>; R<sub>4</sub> y R<sub>6</sub> son H; R<sub>3</sub> y R<sub>5</sub> son CH<sub>3</sub>; R<sub>1</sub> es de la fórmula general(II), en la cual: n = 2; A es Ace-Asp, X<sub>1</sub> es Glu; Y<sub>2</sub> es Gln; Y<sub>3</sub> es Gln; Y<sub>4</sub> es Leu; X<sub>5</sub> es His; X<sub>6</sub> es Ser; Y<sub>7</sub> es Gln; X<sub>8</sub> es Lys(N,epsilon-propionamida); X<sub>9</sub> es Arg; Y<sub>10</sub> es Lys; B es Ile-Thr-Leu-NH<sub>2</sub>; L es CO; A es Ace-Asp; R<sub>8</sub> es de la fórmula general (III), en la cual: m = 2; C es Ace-Asp; Z<sub>1</sub> es Glu; W<sub>2</sub> es Gln; W<sub>3</sub> es Gln; W<sub>4</sub> es Leu; Z<sub>5</sub> es Ser; Z<sub>6</sub> es Ser; W<sub>7</sub> es Gln; Z<sub>8</sub> es Lys (N,epsilon-propionamida); Z<sub>9</sub> es Arg; D es NH<sub>2</sub>; P es CO.

La síntesis de este compuesto comienza con la inserción del ion rutenio dentro del macrociclo (DP-IX). A continuación, se acoplaron el deca- (compuesto 1) y the tetradeca-péptido (compuesto 2), al macrociclo, como se reporta en el Ejemplo 1.

En detalle, la inserción del ion rutenio dentro en el anillo de porfirina, que conduce a la preparación del complejo Ru(II)-CO-DP-IX, fue llevada a cabo usando un método de carbonilo metálico ligeramente modificado.

Este método se basa en el uso de solventes apróticos de alto punto de ebullición (tales como tolueno, DMF, dioxano), el trirutenio dodecacarbonilo Ru<sub>3</sub>(CO)<sub>12</sub> como "vehículo de metal" y muy largo tiempo de reacción bajo condiciones de reflujo. Las condiciones experimentales optimizadas se basan en el uso de una solución de ácido acético-acetato de sodio como solvente (Hartmann M. et al. J.Biol. Inorg. Chem. 1997, 2, pp427). En detalle, se disolvieron 20.0 mg de DP-IX en 6.3 ml de solución de ácido acético que contenía 133.0 mg de acetato de sodio. Se agregaron a esta solución 83 mg de Ru<sub>3</sub>(CO)<sub>12</sub> (~4 eq). Se calentó la mezcla a 85°C, bajo reflujo.

Se hizo seguimiento a la metalización mediante espectroscopía UV-vis y RP-HPLC analítica. El análisis de la muestra después de un tiempo de reacción de 24 h confirmó la inserción de Ru<sup>2+</sup> dentro del macrociclo (rendimiento de 80%).

Se enfrió la mezcla de reacción, y entonces se añadieron 50 mL de agua fría a la mezcla. Se observó la formación de un sólido rojo-marrón que contenía el producto deseado, el DP-IX que no reaccionó y el exceso de Ru<sub>3</sub>(CO)<sub>12</sub>. Mediante centrifugación se separó el sólido de la solución, y a continuación se trató con metanol. Con la adición de metanol, se disolvieron el DP-IX que no reaccionó y el producto deseado; mediante centrifugación se separó de la solución la pella insoluble de Ru<sub>3</sub>(CO)<sub>12</sub>. Por cromatografía RP-HPLC se purificó el producto deseado, sobre una columna C18 de 2.2 x 25 cm, usando un gradiente de acetonitrilo en TFA acuoso al 0.1%, 20% a 80% durante 33 min. Se liofilizaron las fracciones combinadas que contenían el producto deseado, suministrando 9.6 mg (15 x 10<sup>-3</sup> mmol, rendimiento de 44%) de producto puro.

Se confirmó la homogeneidad del producto crudo a través de RP-HPLC. El análisis por espectrometría de masas MALDI mostró la presencia de un pico principal a m/z 610 uma, correspondiendo al pico de ion molecular Ru(II)-DP-IX. En efecto, durante la ionización de la muestra con la fuente de láser MALDI, se observa la disociación del CO del metal (Ishii K. et al. Inorg. Chem. 2004, 43, pp 7369). Se confirmó la presencia del CO por análisis del espectro IR del producto, el cual mostró la banda ν=1989 cm<sup>-1</sup> típica de un complejo Ru(II)-CO-porfirina.

Se efectuaron acoplamiento del decapeptido (1) y a continuación del tetradecapeptido (2) al Ru(II)-CO-DP-IX, como se reporta en el Ejemplo (1).

El producto final fue purificado por RP-HPLC, y se obtuvo con un rendimiento de 42%. La homogeneidad e

identidad fueron confirmadas mediante análisis LC-MS/ESI (3625 uma).

Ejemplo 4. Síntesis del compuesto 3,7,12,17-tetrametilporfirina-18(2)-ácido propiónico-2(18)-N<sub>9</sub><sup>ε</sup>-(Ace-Asp<sup>1</sup>-Glu<sup>2</sup>-Gln<sup>3</sup>-Gln<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-Ser<sup>7</sup>-Gln<sup>8</sup>-Lys<sup>9</sup>-Arg<sup>10</sup>-Lys<sup>11</sup>-Ile<sup>12</sup>-Thr<sup>13</sup>-Leu<sup>14</sup>-NH<sub>2</sub>) propionamida, de la fórmula general (I) en la cual:

- 5 Los átomos de nitrógeno del macrociclo están coordinados al ion Fe<sup>3+</sup>; R<sub>2</sub> y R<sub>7</sub> son CH<sub>3</sub>; R<sub>4</sub> y R<sub>6</sub> son H; R<sub>3</sub> y R<sub>5</sub> son CH<sub>3</sub>; R<sub>1</sub> es de la fórmula general(II), en la cual: n = 2; A es Ace-Asp, X<sub>1</sub> es Glu; Y<sub>2</sub> es Gln; Y<sub>3</sub> es Gln; Y<sub>4</sub> es Leu; X<sub>5</sub> es His; X<sub>6</sub> es Ser; Y<sub>7</sub> es Gln; X<sub>8</sub> es Lys(N,epsilon-propionamida); X<sub>9</sub> es Arg; Y<sub>10</sub> es Lys; B es Ile-Thr-Leu-NH<sub>2</sub>; L es CO; A es Ace-Asp; R<sub>8</sub> es de la fórmula Q-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>- en la cual: m = 2, y Q es HOOC.

- 10 La síntesis de este compuesto fue llevada a cabo usando el tetradecapéptido Ace-Asp<sup>1</sup>(OtBu)-Glu<sup>2</sup>(OtBu)-Gln<sup>3</sup>(Trt)-Gln<sup>4</sup>(Trt)-Leu<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>(Trt)-Ser<sup>7</sup>(tBu)-Gln<sup>8</sup>(Trt)-Lys<sup>9</sup>-Arg<sup>10</sup>(Pbf)-Lys<sup>11</sup>(Boc)-Ile<sup>12</sup>-Thr<sup>13</sup>(tBu)-Leu<sup>14</sup>-NH<sub>2</sub>(producto intermedio (2)) descrito en el Ejemplo (1) y el DP-IX. Se acopló el tetradecapéptido con DPIX como se describe en el Ejemplo 1. Después de retirar los grupos protectores de cadena lateral, y de insertar el ion hierro dentro del macrociclo, con el mismo procedimiento descrito en el Ejemplo (1), el producto final fue purificado por medio de RP-HPLC (rendimiento de 48%). La homogeneidad e identidad fueron confirmadas mediante análisis LC-MS/ESI (2311 uma).

Ejemplo 5. Síntesis del compuesto 3,7,12,17-tetrametilporfirina-2(18)-N<sub>9</sub><sup>ε</sup>-(Ace-Asp<sup>1</sup>-Glu<sup>2</sup>-Gln<sup>3</sup>-Gln<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-Ser<sup>7</sup>-Gln<sup>8</sup>-Lys<sup>9</sup>-Leu<sup>10</sup>-Lys<sup>11</sup>-Ile<sup>12</sup>-Thr<sup>13</sup>-Leu<sup>14</sup>-NH<sub>2</sub>)-18(2)-N<sub>9</sub><sup>ε</sup>-(Ace-Asp<sup>1</sup>-Glu<sup>2</sup>-Gln<sup>3</sup>-Gln<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Ser<sup>6</sup>-Ser<sup>7</sup>-Gln<sup>8</sup>-Lys<sup>9</sup>-Arg<sup>10</sup>-NH<sub>2</sub>)-di-propionamida, de la fórmula general (I) en la cual:

- 20 Los átomos de nitrógeno del macrociclo están coordinados al ion Fe<sup>3+</sup>; R<sub>2</sub> y R<sub>7</sub> son CH<sub>3</sub>; R<sub>4</sub> y R<sub>6</sub> son H; R<sub>3</sub> y R<sub>5</sub> son CH<sub>3</sub>; R<sub>1</sub> es de la fórmula general(II), en la cual: n = 2; A es Ace-Asp, X<sub>1</sub> es Glu; Y<sub>2</sub> es Gln; Y<sub>3</sub> es Gln; Y<sub>4</sub> es Leu; X<sub>5</sub> es His; X<sub>6</sub> es Ser; Y<sub>7</sub> es Gln; X<sub>8</sub> es Lys (N,epsilon-propionamida); X<sub>9</sub> es Leu; Y<sub>10</sub> es Lys; B es Ile-Thr-Leu-NH<sub>2</sub>; L es CO; A es Ace-Asp; R<sub>8</sub> es de la fórmula general(III), en la cual: m = 2; C es Ace-Asp; Z<sub>1</sub> es Glu; W<sub>2</sub> es Gln; W<sub>3</sub> es Gln; W<sub>4</sub> es Leu; Z<sub>5</sub> es Ser; Z<sub>6</sub> es Ser; W<sub>7</sub> es Gln; Z<sub>8</sub> es Lys (N,epsilon-propionamida); Z<sub>9</sub> es Arg; D es NH<sub>2</sub>; P es CO.

- 25 La síntesis de este compuesto fue ejecutada usando: a) el decapéptido (Ace-Asp<sup>1</sup>(OtBu)-Glu<sup>2</sup>(OtBu)-Gln<sup>3</sup>(Trt)-Gln<sup>4</sup>(Trt)-Leu<sup>5</sup>-Ser<sup>6</sup>(tBu)-Ser<sup>7</sup>(tBu)-Gln<sup>8</sup>(Trt)-Lys<sup>9</sup>-Arg<sup>10</sup>(Pbf)-NH<sub>2</sub>) (producto intermedio 1), sintetizado como se describe en el Ejemplo (1); b) el tetradecapéptido Ace-Asp<sup>1</sup>(OtBu)-Glu<sup>2</sup>(OtBu)-Gln<sup>3</sup>(Trt)-Gln<sup>4</sup>(Trt)-Leu<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>(Trt)-Ser<sup>7</sup>(tBu)-Gln<sup>8</sup>(Trt)-Lys<sup>9</sup>-Leu<sup>10</sup>-Lys<sup>11</sup>(Boc)-Ile<sup>12</sup>-Thr<sup>13</sup>(tBu)-Leu<sup>14</sup>-NH<sub>2</sub>)(producto intermedio (2)), que contiene en la posición X<sub>9</sub> una leucina en lugar de la Arginina (Pbf) y sintetizado como se describe en el Ejemplo (1); c) el DP-IX.
- 30 El acoplamiento entre el tetradecapéptido, el decapéptido y el DP-IX fue realizado como se describe en el Ejemplo 1.

Después de retirar los grupos protectores de cadena lateral, e inserción del ion hierro dentro del macrociclo, con el mismo procedimiento descrito en el Ejemplo (1), se purificó el producto final mediante RP-HPLC (rendimiento de 25%). Se confirmaron la homogeneidad e identidad por análisis LC-MS/ESI (3509 uma).

- 35 Ejemplo 6. Síntesis del compuesto 3,7,12,17-tetrametilporfirina-2(18)-N<sub>9</sub><sup>ε</sup>-(Ace-Asp<sup>1</sup>-Leu<sup>2</sup>-Gln<sup>3</sup>-Gln<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-Ser<sup>7</sup>-Gln<sup>8</sup>-Lys<sup>9</sup>-Arg<sup>10</sup>-Lys<sup>11</sup>-Ile<sup>12</sup>-Thr<sup>13</sup>-Leu<sup>14</sup>-NH<sub>2</sub>)-18(2)-N<sub>9</sub><sup>ε</sup>-(Ace-Asp<sup>1</sup>-Glu<sup>2</sup>-Gln<sup>3</sup>-Gln<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Ser<sup>6</sup>-Ser<sup>7</sup>-Gln<sup>8</sup>-Lys<sup>9</sup>-Arg<sup>10</sup>-NH<sub>2</sub>)-di-propionamida, de la fórmula general (I) en la cual:

- 40 Los átomos de nitrógeno del macrociclo están coordinados al ion Fe<sup>3+</sup>; R<sub>2</sub> y R<sub>7</sub> son CH<sub>3</sub>; R<sub>4</sub> y R<sub>6</sub> son H; R<sub>3</sub> y R<sub>5</sub> son CH<sub>3</sub>; R<sub>1</sub> es de la fórmula general(II), en la cual: n = 2; A es Ace-Asp, X<sub>1</sub> es Leu; Y<sub>2</sub> es Gln; Y<sub>3</sub> es Gln; Y<sub>4</sub> es Leu; X<sub>5</sub> es His; X<sub>6</sub> es Ser; Y<sub>7</sub> es Gln; X<sub>8</sub> es Lys (N,epsilon-propionamida); X<sub>9</sub> es Arg; Y<sub>10</sub> es Lys; B es Ile-Thr-Leu-NH<sub>2</sub>; L es CO; A es Ace-Asp; R<sub>8</sub> es de la fórmula general(III), en la cual: m = 2; C es Ace-Asp; Z<sub>1</sub> es Glu; W<sub>2</sub> es Gln; W<sub>3</sub> es Gln; W<sub>4</sub> es Leu; Z<sub>5</sub> es Ser; Z<sub>6</sub> es Ser; W<sub>7</sub> es Gln; Z<sub>8</sub> es Lys (N,epsilon-propionamida); Z<sub>9</sub> es Arg; D es NH<sub>2</sub>; P es CO.

- 45 La síntesis de este compuesto fue ejecutada usando: a) the decapéptido (Ace-Asp<sup>1</sup>(OtBu)-Glu<sup>2</sup>(OtBu)-Gln<sup>3</sup>(Trt)-Gln<sup>4</sup>(Trt)-Leu<sup>5</sup>-Ser<sup>6</sup>(tBu)-Ser<sup>7</sup>(tBu)-Gln<sup>8</sup>(Trt)-Lys<sup>9</sup>-Arg<sup>10</sup>(Pbf)-NH<sub>2</sub>) (producto intermedio 1), sintetizado como se describe en el Ejemplo (1); b) el tetradecapéptido Ace-Asp<sup>1</sup>(OtBu)-Leu<sup>2</sup>-Gln<sup>3</sup>(Trt)-Gln<sup>4</sup>(Trt)-Leu<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>(Trt)-Ser<sup>7</sup>(tBu)-Gln<sup>8</sup>(Trt)-Lys<sup>9</sup>-Arg<sup>10</sup>(Pbf)-Lys<sup>11</sup>(Boc)-Ile<sup>12</sup>-Thr<sup>13</sup>(tBu)-Leu<sup>14</sup>-NH<sub>2</sub>) (producto intermedio (2)), que contiene en la posición X<sub>1</sub> una leucina en lugar del Glu(OtBu), y sintetizado como se describe en el Ejemplo (1); c) el DP-IX. El acoplamiento entre el tetradecapéptido, el decapéptido y el DP-IX fue ejecutado como se describe en el Ejemplo 1.

- 50 Después de retirar los grupos protectores de cadena lateral, y de la inserción del ion hierro dentro del macrociclo, con el mismo procedimiento descrito en el Ejemplo (1), se purificó el producto final mediante RP-HPLC (rendimiento de 27%). Se confirmaron la homogeneidad e identidad por análisis LC-MS/ESI (3536 uma).

Ejemplo 7. síntesis del compuesto 3,7,12,17-tetrametilporfirina-2(18)-N<sub>9</sub><sup>ε</sup>-(Ace-Asp<sup>1</sup>-Glu<sup>2</sup>-Gln<sup>3</sup>-Gln<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-Ser<sup>7</sup>-

Gln<sup>8</sup>-Lys<sup>9</sup>-Arg<sup>10</sup>-Lys<sup>11</sup>-Ile<sup>12</sup>-Thr<sup>13</sup>-Leu<sup>14</sup>-NH<sub>2</sub>-18(2)-N<sub>9</sub><sup>ε</sup>-(Ace-Asp<sup>1</sup>-Glu<sup>2</sup>-Gln<sup>3</sup>-Gln<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Gly<sup>6</sup>-Ser<sup>7</sup>-Gln<sup>8</sup>-Lys<sup>9</sup>-Arg<sup>10</sup>-NH<sub>2</sub>)-di-propionamida, de la fórmula general (I) en la cual

Los átomos de nitrógeno del macrociclo están coordinados al ion Fe<sup>3+</sup>; R2 y R7 son CH<sub>3</sub>; R4 y R6 son H; R3 y R5 son CH<sub>3</sub>; R1 es de la fórmula general(II), en la cual: n = 2; A es Ace-Asp, X1 es Glu; Y2 es Gln; Y3 es Gln; Y4 es Leu; X5 es His; X6 es Ser; Y7 es Gln; X8 es Lys (N,epsilon-propionamida); X9 es Arg; Y10 es Lys; B es Ile-Thr-Leu-NH<sub>2</sub>; L es CO; A es Ace-Asp; R8 es de la fórmula general(III), en la cual: m = 2; C es Ace-Asp; Z1 es Glu; W2 es Gln; W3 es Gln; W4 es Leu; Z5 es Gly; Z6 es Ser; W7 es Gln; Z8 es Lys (N,epsilon-propionamida); Z9 es Arg; D es NH<sub>2</sub>; P es CO.

La síntesis de este compuesto fue ejecutada usando: a) el decapeptido (Ace-Asp<sup>1</sup>(OtBu)-Glu<sup>2</sup>(Ot-Bu)-Gln<sup>3</sup>(Trt)-Gln<sup>4</sup>(Trt)-Leu<sup>5</sup>-Gly<sup>6</sup>-Ser<sup>7</sup>(tBu)-Gln<sup>8</sup>(Trt)-Lys<sup>9</sup>-Arg<sup>10</sup>(Pbf)-NH<sub>2</sub>) (producto intermedio 1), sintetizado como se describe en el Ejemplo (1) y que contiene en la posición Z5 una glicina el lugar de la serina(tBu); b) el tetradecapeptido Ace-Asp<sup>1</sup>(OtBu)-Glu<sup>2</sup>(OtBu)-Gln<sup>3</sup>(Trt)-Gln<sup>4</sup>(Trt)-Leu<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>(Trt)-Ser<sup>7</sup>(tBu)-Gln<sup>8</sup>(Trt)-Lys<sup>9</sup>-Arg<sup>10</sup>(Pbf)-Lys<sup>11</sup>(Boc)-Ile<sup>12</sup>-Thr<sup>13</sup>(tBu)-Leu<sup>14</sup>-NH<sub>2</sub>)(producto intermedio (2)), sintetizado como se describe en el Ejemplo (1); c) el DP-IX.

El acoplamiento entre el tetradecapeptido, el decapeptido y el DP-IX fue ejecutado como se describe en el Ejemplo 1. Después de retirar los grupos protectores de cadena lateral, y de la inserción del ion hierro dentro del macrociclo, con el mismo procedimiento descrito en el Ejemplo (1), se purificó el producto final mediante RP-HPLC (rendimiento de 28%). Se confirmaron la homogeneidad e identidad por análisis LC-MS/ESI (3522 uma).

Ejemplo 8. Síntesis del compuesto 3,7,12,17-tetrametilporfirina-2(18)-N<sub>9</sub><sup>ε</sup>-(Ace-Asp<sup>1</sup>-Glu<sup>2</sup>-Gln<sup>3</sup>-Gln<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-Ser<sup>7</sup>-Gln<sup>8</sup>-Lys<sup>9</sup>-Arg<sup>10</sup>-Lys<sup>11</sup>-Ile<sup>12</sup>-Thr<sup>13</sup>-Leu<sup>14</sup>-NH<sub>2</sub>)-18(2)-N<sub>9</sub><sup>ε</sup>-(Ace-Asp<sup>1</sup>-Leu<sup>2</sup>-Gln<sup>3</sup>-Gln<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Ser<sup>6</sup>-Ser<sup>7</sup>-Gln<sup>8</sup>-Lys<sup>9</sup>-Arg<sup>10</sup>-NH<sub>2</sub>)-di-propionamida, de la fórmula general (I) en la cual:

Los átomos de nitrógeno del macrociclo están coordinados al ion Fe<sup>3+</sup>; R2 y R7 son CH<sub>3</sub>; R4 y R6 son H; R3 y R5 son CH<sub>3</sub>; R1 es de la fórmula general(II), en la cual: n = 2; A es Ace-Asp, X1 es Glu; Y2 es Gln; Y3 es Gln; Y4 es Leu; X5 es His; X6 es Ser; Y7 es Gln; X8 es Lys (N,epsilon-propionamida); X9 es Leu; Y10 es Lys; B es Ile-Thr-Leu-NH<sub>2</sub>; L es CO; A es Ace-Asp; R8 es de la fórmula general(III), en la cual: m = 2; C es Ace-Asp; Z1 es Leu; W2 es Gln; W3 es Gln; W4 es Leu; Z5 es Ser; Z6 es Ser; W7 es Gln; Z8 es Lys (N,epsilon-propionamida); Z9 es Arg; D es NH<sub>2</sub>; P es CO.

La síntesis de este compuesto fue ejecutada usando: a) el decapeptido (Ace-Asp<sup>1</sup>(Ot-Bu)-Leu<sup>2</sup>-Gln<sup>3</sup>(Trt)-Gln<sup>4</sup>(Trt)-Leu<sup>5</sup>-Gly<sup>6</sup>-Ser<sup>7</sup>(tBu)-Gln<sup>8</sup>(Trt)-Lys<sup>9</sup>-Arg<sup>10</sup>(Pbf)-NH<sub>2</sub>) (producto intermedio 1), sintetizado como se describe en el Ejemplo (1) y que contiene en posición Z1 una leucina en lugar del Glu(OtBu); b) el tetradecapeptido Ace-Asp<sup>1</sup>(OtBu)-Glu<sup>2</sup>(OtBu)-Gln<sup>3</sup>(Trt)-Gln<sup>4</sup>(Trt)-Leu<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>(Trt)-Ser<sup>7</sup>(tBu)-Gln<sup>8</sup>(Trt)-Lys<sup>9</sup>-Arg<sup>10</sup>(Pbf)-Lys<sup>11</sup>(Boc)-Ile<sup>12</sup>-Thr<sup>13</sup>(tBu)-Leu<sup>14</sup>-NH<sub>2</sub>)(producto intermedio (2)), sintetizado como se describe en el Ejemplo (1); c) el DP-IX.

El acoplamiento entre el tetradecapeptido, el decapeptido y el DP-IX fue ejecutado como se describe en el Ejemplo 1. Después de retirar los grupos protectores de cadena lateral, y de la inserción del ion hierro dentro del macrociclo, con el mismo procedimiento descrito en el Ejemplo (1), se purificó el producto final mediante RP-HPLC (rendimiento de 30%). Se confirmaron la homogeneidad e identidad por análisis LC-MS/ESI (3536 uma).

Ejemplo 9. síntesis del compuesto 3,7,12,17-tetrametilporfirina-2(18)-N<sub>9</sub><sup>ε</sup>-(Ace-Asp<sup>1</sup>-Glu<sup>2</sup>-Gln<sup>3</sup>-Gln<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-Ser<sup>7</sup>-Gln<sup>8</sup>-Lys<sup>9</sup>-Arg<sup>10</sup>-Lys<sup>11</sup>-Ile<sup>12</sup>-Thr<sup>13</sup>-Leu<sup>14</sup>-NH<sub>2</sub>)-18(2)-N<sub>9</sub><sup>ε</sup>-(Ace-Asp<sup>1</sup>-Glu<sup>2</sup>-Gln<sup>3</sup>-Gln<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Ser<sup>6</sup>-Ser<sup>7</sup>-Gln<sup>8</sup>-Lys<sup>9</sup>-Leu<sup>10</sup>-NH<sub>2</sub>)-di-propionamida, de la fórmula general (I) en la cual:

Los átomos de nitrógeno del macrociclo están coordinados al ion Fe<sup>3+</sup>; R2 y R7 son CH<sub>3</sub>; R4 y R6 son H; R3 y R5 son CH<sub>3</sub>; R1 es de la fórmula general(II), en la cual: n = 2; A es Ace-Asp, X1 es Glu; Y2 es Gln; Y3 es Gln; Y4 es Leu; X5 es His; X6 es Ser; Y7 es Gln; X8 es Lys (N,epsilon-propionamida); X9 es Leu; Y10 es Lys; B es Ile-Thr-Leu-NH<sub>2</sub>; L es CO; A es Ace-Asp; R8 es de la fórmula general(III), en la cual: m = 2; C es Ace-Asp; Z1 es Glu; W2 es Gln; W3 es Gln; W4 es Leu; Z5 es Ser; Z6 es Ser; W7 es Gln; Z8 es Lys (N,epsilon-propionamida); Z9 es Leu; D es NH<sub>2</sub>; P es CO.

La síntesis de este compuesto fue ejecutada usando: a) el decapeptido (Ace-Asp<sup>1</sup>(Ot-Bu)-Leu<sup>2</sup>-Gln<sup>3</sup>(Trt)-Gln<sup>4</sup>(Trt)-Leu<sup>5</sup>-Gly<sup>6</sup>-Ser<sup>7</sup>(tBu)-Gln<sup>8</sup>(Trt)-Lys<sup>9</sup>-Leu<sup>10</sup>-NH<sub>2</sub>) (producto intermedio 1), sintetizado como se describe en el Ejemplo (1) y que contiene en la posición Z9 una leucina en lugar del Arg(Pbf); b) the tetradecapeptido Ace-Asp<sup>1</sup>(OtBu)-Glu<sup>2</sup>(OtBu)-Gln<sup>3</sup>(Trt)-Gln<sup>4</sup>(Trt)-Leu<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>(Trt)-Ser<sup>7</sup>(tBu)-Gln<sup>8</sup>(Trt)-Lys<sup>9</sup>-Arg<sup>10</sup>(Pbf)-Lys<sup>11</sup>(Boc)-Ile<sup>12</sup>-Thr<sup>13</sup>(tBu)-Leu<sup>14</sup>-NH<sub>2</sub>) (producto intermedio (2)), sintetizado como se describe en el Ejemplo (1); c) el DP-IX.

El acoplamiento entre el tetradecapeptido, el decapeptido y el DP-IX fue ejecutado como se describe en el Ejemplo 1. Después de retirar los grupos protectores de cadena lateral, y de la inserción del ion hierro dentro del macrociclo, con el mismo procedimiento descrito en el Ejemplo (1), se purificó el producto final mediante RP-HPLC (rendimiento de 28%). Se confirmaron la homogeneidad e identidad por análisis LC-MS/ESI (3509 uma).

## Ejemplo 10. Actividad de peroxidasa del compuesto descrito en el Ejemplo 1

Aquí se describe la actividad de peroxidasa del compuesto Fe(III)-3,7,12,17-tetrametilporfirina-2(18)-N<sub>9</sub><sup>ε</sup>-(Ace-Asp<sup>1</sup>-Glu<sup>2</sup>-Gln<sup>3</sup>-Gln<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-Ser<sup>7</sup>-Gln<sup>8</sup>-Lys<sup>9</sup>-Arg<sup>10</sup>-Lys<sup>11</sup>-Ile<sup>12</sup>-Thr<sup>13</sup>-Leu<sup>14</sup>-NH<sub>2</sub>)-18(2)-N<sub>9</sub><sup>ε</sup>-(Ace-Asp<sup>1</sup>-Glu<sup>2</sup>-Gln<sup>3</sup>-Gln<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Ser<sup>6</sup>-Ser<sup>7</sup>-Gln<sup>8</sup>-Lys<sup>9</sup>-Arg<sup>10</sup>-NH<sub>2</sub>)-di-propionamida, cuya síntesis fue descrita en el Ejemplo 1, usando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y los siguientes sustratos secundarios: ABTS y guayacol.

Se evaluó la actividad de peroxidasa del compuesto en el sustrato secundario ABTS siguiendo la formación del catión radical ABTS<sup>•+</sup>, en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Se siguió la reacción usando espectrofotometría, midiendo la aparición de los productos en el medio de reacción. Se siguió la formación del catión radical ABTS<sup>•+</sup> a 660 nm ( $\lambda_{\text{max}}$  ( $\epsilon$ ) = 660 nm (1.40 x 10<sup>4</sup> M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>)). La reacción fue ejecutada en 50% TFE (v/v), amortiguador de fosfato 100 mM, pH 6.5, usando una concentración de catalizador de 2.0 x 10<sup>-7</sup> M.

Se determinaron los parámetros cinéticos del compuesto variando la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, usando concentraciones fijas de los sustratos reductores, y viceversa.

En más detalle, en los experimentos ejecutados a diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (en el intervalo de 0.01 - 200 mM), se mantuvo constante la concentración de ABTS en 0.1 mM. En los experimentos realizados a diferentes concentraciones de ABTS (en el intervalo de 0.005 - 0.1 mM) la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue 50 mM.

Los datos experimentales fueron ajustados usando un modelo cinético de dos sustratos de Michaelis-Menten, y se obtuvieron los siguientes parámetros cinéticos:  $K_m^{\text{AH}} = 8.4 \pm 0.2 \times 10^{-2}$  mM y  $k_{\text{cat}} = 370.9 \pm 14 \text{ s}^{-1}$ .

Se evaluó la actividad de peroxidasa de sustrato de guayacol, siguiendo la formación de productos de oxidación de guayacol, el tetraguayacol. Se midieron los cambios en la absorbancia a 470 nm, considerando un  $\epsilon_{470} = 2.66 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

En detalle, en los experimentos ejecutados a diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (en el intervalo 1 - 40 mM), se mantuvo constante la concentración de guayacol, en 0.1 mM. En los experimentos realizados a diferentes concentraciones de guayacol, en el intervalo de 0.0025 - 0.07 mM, la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue de 10 mM.

Se ajustaron los datos experimentales usando un modelo cinético de dos sustratos de Michaelis-Menten, y se obtuvieron los siguientes parámetros cinéticos:  $K_m^{\text{AH}} = 9.2 \pm 0.4 \times 10^{-3}$  mM y  $k_{\text{cat}} = 8.0 \pm 0.1 \text{ s}^{-1}$ .

La actividad específica a pH=6.5 para oxidación de ABTS es 104 mmol g<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>. Este valor es similar al de la peroxidasa de rábano picante (93 mmol g<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>, pH 4.6). Para la oxidación de guayacol, la actividad específica es dos veces mayor respecto a la de peroxidasa de rábano picante.

## Ejemplo 11. Nitración de fenol

Se evaluó la habilidad del compuesto Fe(III)-3,7,12,17-tetrametilporfirina-2(18)-N<sub>9</sub><sup>ε</sup>-(Ace-Asp<sup>1</sup>-Glu<sup>2</sup>-Gln<sup>3</sup>-Gln<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-Ser<sup>7</sup>-Gln<sup>8</sup>-Lys<sup>9</sup>-Arg<sup>10</sup>-Lys<sup>11</sup>-Ile<sup>12</sup>-Thr<sup>13</sup>-Leu<sup>14</sup>-NH<sub>2</sub>)-18(2)-N<sub>9</sub><sup>ε</sup>-(Ace-Asp<sup>1</sup>-Glu<sup>2</sup>-Gln<sup>3</sup>-Gln<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Ser<sup>6</sup>-Ser<sup>7</sup>-Gln<sup>8</sup>-Lys<sup>9</sup>-Arg<sup>10</sup>-NH<sub>2</sub>)-di-propionamida, cuya síntesis es descrita en el Ejemplo 1, para catalizar la nitración del fenol. Se analizaron la mezcla de reacción mediante HPLC analítica en una columna Phenomenex Gemini C18 (150 x 4.6 mm, 5  $\mu$ m), se eluyó con un gradiente lineal de H<sub>2</sub>O/0.1% de TFA (A) y CH<sub>3</sub>CN/0.1% de TFA (B) desde 10% a 90% B durante 20 min, a una rata de flujo de 1 mL/min. Se determinaron las concentraciones del material de partida y productos a partir de curvas de calibración construidas usando muestras comerciales y 4-cianofenol como estándar interno. La incubación de estándar para la nitración de fenol fue ejecutada en fenol 1 mM en presencia de catalizador 0.2  $\mu$ M, NaNO<sub>2</sub> 20 mM y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3 mM en amortiguador de fosfato, pH 6.5, 50% TFE (v/v).

Las reacciones fueron ejecutadas a temperatura ambiente con un tiempo de incubación de 40 min. El análisis de la mezcla de reacción a través de RP-HPLC mostró la formación de 4- y 2-nitrofenol. El rendimiento de 4- y 2-nitrofenol, a un tiempo de reacción de 40 min, aumentó con el incremento de concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup> y fenol. El máximo rendimiento de nitrofenoles (4- y 2-) fue obtenido a concentraciones de sustrato y oxidante de 1.0 mM, y a concentración de 40 mM de NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, respectivamente.

En estas condiciones, el rendimiento total de nitrofenoles fue aproximadamente 14.8%. El rendimiento total de nitrofenoles en presencia de lactoperoxidasa es sólo cuatro veces mayor.

## Ejemplo 12. Actividad catalítica del compuesto descrito en el Ejemplo 2.

Como en el ejemplo, a continuación se describe la actividad de peroxidasa del compuesto de la fórmula Fe(III)-3,7,12,17-tetrametilporfirina-2(18)-N<sub>9</sub><sup>ε</sup>-(Ace-Asp<sup>1</sup>-Glu<sup>2</sup>-Gln<sup>3</sup>-Gln<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-Ser<sup>7</sup>-Gln<sup>8</sup>-Lys<sup>9</sup>-Arg<sup>10</sup>-Lys<sup>11</sup>-Ile<sup>12</sup>-Thr<sup>13</sup>-Leu<sup>14</sup>-NH<sub>2</sub>)-18(2)-N<sub>9</sub><sup>ε</sup>-(Ace-Asp<sup>1</sup>-Glu<sup>2</sup>-Gln<sup>3</sup>-Gln<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Ser<sup>6</sup>-Ser<sup>7</sup>-Gln<sup>8</sup>-Lys<sup>9</sup>-Arg<sup>10</sup>-NH<sub>2</sub>)-di-propionamida, unido de

manera covalente a un anticuerpo, sintetizado como se reporta en el Ejemplo 2, usando  $\text{H}_2\text{O}_2$  como agente oxidante y ABTS como sustrato reductor.

Los experimentos fueron ejecutados en 50% TFE (v/v) amortiguador de fosfato 100 mM, pH 6.5. Como se describió en el Ejemplo 10, el proceso catalítico fue evaluado siguiendo la formación del catión radical  $\text{ABTS}^{+\bullet}$  a 660 nm ( $\epsilon=14700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Se determinaron los parámetros cinéticos del compuesto variando la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  usando concentraciones fijas del agente reductor, y viceversa.

En más detalle, en el primer experimento se mantuvieron constantes las concentraciones de ABTS y el conjugado en 0.1 mM y  $2 \times 10^{-7} \text{ M}$ , respectivamente, y se varió la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en el intervalo de 10 - 100 mM. En el segundo experimento, las concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y el conjugado estaban fijas en 50 mM y  $2 \times 10^{-7} \text{ M}$ , respectivamente, y se varió la concentración de ABTS en el intervalo de 0.005 - 0.1 mM.

Se ajustaron los datos experimentales usando un modelo cinético de dos sustratos de Michaelis-Menten, y se obtuvieron los siguientes parámetros cinéticos:  $K_m^{\text{AH}} 2.0123 \text{ mM}$  y  $k_{\text{cat}} 91 \text{ s}^{-1}$ .

Ejemplo 13. Comparación de las actividades catalíticas

Se determinaron las actividades catalíticas de los compuestos descritos en los ejemplos 4, 5, 6, 7, 8 y 9, de manera similar a lo descrito en el Ejemplo 10.

A continuación se reporta una comparación de las actividades catalíticas frente a la oxidación de ABTS, en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , de los compuestos descritos en los ejemplos 1, 4, 5, 6, 7, 8 e 9 con las de peroxidasas nativas y recombinantes, y otros análogos.

Actividad catalítica para la oxidación de ABTS con  $\text{H}_2\text{O}_2$

Enzima	pH	$K_m \text{H}_2\text{O}_2$ (Mm)	$K_m \text{AH}_2$ (Mm)	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	Mw(E) KDa	Actividad específica ( $\text{mol g}^{-1} \text{ min}^{-1}$ )
Ejemplo 1	6.5	44	0.084	371	3.55	6.269
Ejemplo 4	6.5	80	0.130	688	2.31	17.860
Ejemplo 5	6.5	54	0.038	685	3.51	11.716
Ejemplo 6	6.5	31	0.050	785	3.54	13.430
Ejemplo 7	6.5	46	0.125	468	3.52	7.976
Ejemplo 8	6.5	96	0.115	381	3.54	6.463
Ejemplo 9	6.5	20	0.029	169	3.51	2.890
HRP	4.6	-	0.800	4100	44.2	5.569
HRP	7.0	0.0115	5.100	53	44.2	0.071
Mimocromo I	7.0	-	-	0.005	2.62	$1.14 \times 10^{-4}$
Mimocromo II	7.0	-	-	0.011	3.83	$1.72 \times 10^{-4}$
Mimocromo III	7.0	-	-	0.15	4.03	$2.23 \times 10^{-3}$
Mimocromo IV	7.0	-	-	0.014	2.81	$2.99 \times 10^{-4}$
Mimocromo V	7.0	-	-	0.16	4.00	$2.40 \times 10^{-3}$
Mimocromo VI	7.0	-	-	0.12	4.01	$1.80 \times 10^{-3}$
MP8*	7.0	-	-	0.0026	1.51	$0.104 \times 10^{-3}$
MP11*	7.0	-	-	0.013	1.86	$0.419 \times 10^{-3}$
Enzima	pH	$K_m \text{H}_2\text{O}_2$ (Mm)	$K_m \text{AH}_2$ (Mm)	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	Mw(E) KDa	Actividad específica ( $\text{mol g}^{-1} \text{ min}^{-1}$ )
ToCPP-13G10	4.6	16	-	9.33	151	$3.71 \times 10^{-3}$
ToCPP-14H7	5.0	9	-	1.05	151	$0.417 \times 10^{-3}$
ToCPP2	5.0	42	-	0.85	0.878	$58.1 \times 10^{-3}$

Se listan también las actividades catalíticas expresadas en términos de actividad específica ( $\text{mol g}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ), que corresponde a las moles de sustrato convertido por minuto por gramo de catalizador. Para todos los compuestos descritos en el ejemplo, las actividades específicas son hasta 200 veces mayores que las de la peroxidasa nativa a pH neutro, y mayores o comparables en la condición de máxima actividad para HRP (pH=4.6). La actividad específica es hasta 100,000 veces mayor que la de los compuestos en la técnica previa (MP8, MP11, ToCPP-13G10, ToCPP-14H7), y también mayor que la de la familia de mimocromo.

#### Lista de abreviaturas

Para la nomenclatura y abreviaturas de los aminoácidos, véanse las recomendaciones de IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (Eur. J. Biochem. 1984, 138, pp 9); "cadena lateral" significa cualquier cadena en el carbono alfa de un aminoácido alfa; a menos que se especifique de otro modo, los aminoácidos están en la configuración L. Las otras abreviaturas usadas son:

Suc = succinilo, Ace = acetilo, Asp = ácido aspártico, Asn = asparagina, Pro = prolina, Lys = lisina, Orn = ornitina, Glu = ácido glutámico, Aada = ácido alfa-amino adipico, Arg = arginina, hArg = homoarginina, Leu = leucina, Gln = glutamina, His = histidina, hCys = homocisteína, Met = metionina, 4TAZ = beta-(4-tiazolil)-alanina, 5TAZ = beta-(5-tiazolil)-alanina, Ser = serina, Thr = treonina, aThr = alo-treonina, Dap = ácido 2,3 diamino propiónico, Dab = ácido 2,4 diamino butírico, Ile = isoleucina, Gly = glicina, Ala= alanina, Aib= ácido alfa-aminoisobutírico, Fmoc = fluorenilmetoxycarbonilo, TFA = ácido trifluoroacético, tBu = tert-butilo, Trt = tritilo, PBF = 2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofurano, DVB = divinilbenceno, Mmt = metoxitritilo, DMF = dimetilformamida, PyBop = hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris-pirrolidino-fosfonio, HOBt = hidroxibenzotriazole, IDEA = diisopropiletilamina, HATU = hexafluorofosfato de 2-(7-aza-1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio, TFE = trifluoroetanol, DCM = diclorometano, Boc = tert-butiloxycarbonilo, sulfo-SMCC = sulfosuccinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexan-1-carboxilato, EDTA = etilenediamina tetraacetato, SDS = dodecil sulfato de sodio, ABTS = ácido 2,2'-azino-bis-3-etil-benzotiazin-6-sulfónico, DP-IX = deuteroporfirina IX.

#### Listado de secuencias

<110> Pavone, Vincenzo

Nastri, Flavia

Maglio, Ornella

Lombardi, Angelina

<120> Catalizadores de alta eficiencia, preparación y su uso

<130> 9208MEUR

<160> 14

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 12

<212> PRT

<213> Desconocido

<220>

<223> Péptido sintético

<220>

<221> Rasgo misceláneo

<222> (1)..(1)

<223> nada; o acetil-Asp; acetil-Asn; acetil-Pro; acetil-Lys-Pro; acetil-ornitina-Pro

<220>

<221> Rasgo misceláneo

- <222> (2)..(2)  
 <223> [opcionalmente succinilado o acetilado] [Glu; ácido alfa-aminoadípico; Arg; homoArg; Leu; Lys; Orn]  
 <220>  
 <221> Rasgo misceláneo
- 5 <222> (3)..(3)  
 <223> Gln, Glu, Lys, Orn  
 <220>  
 <221> Rasgo misceláneo
- 10 <222> (4)..(4)  
 <223> Gln, Glu, Lys, Orn  
 <220>  
 <221> Rasgo misceláneo
- <222> (6)..(6)  
 <223> His, homoCys, Met, beta(4-tiazolil)-Ala, beta(5-tiazolil)-Ala
- 15 <220>  
 <221> Rasgo misceláneo
- <222> (7)..(7)  
 <223> Ser, Thr, Asn, Gln, alloThr, Glu, Lys, Orn  
 <220>
- 20 <221> Rasgo misceláneo
- <222> (8)..(8)  
 <223> Gln, Glu, Lys, Orn  
 <220>  
 <221> Rasgo misceláneo
- 25 <222> (9)..(9)  
 <223> -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-CO-[delta-Orn; epsilon-Lys; ácido beta-2,3-diaminopropiónico; ácido gama-2,4-diaminobutírico] o  
 -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-NH-[gamma-Glu; ácido delta alfa-amino adípico]  
 <220>  
 <221> Rasgo misceláneo
- 30 <222> (10)..(10)  
 <223> Glu; ácido alfa-aminoadípico; Arg; homoArg; Leu; Lys; Orn  
 <220>  
 <221> Rasgo misceláneo
- <222> (11)..(11)
- 35 <223> Gln; Glu; Lys; Orn



<220>  
 <221> Rasgo misceláneo  
 <222> (12)..(12)  
 <223> -NH<sub>2</sub>; -Ile-NH<sub>2</sub>; -Ile-Thr-NH<sub>2</sub>; -Ile-Thr-Leu-NH<sub>2</sub>; -Ile-Thr-Leu-Lys-NH<sub>2</sub>; -Ile-Thr-Leu-Orn-NH<sub>2</sub>  
 5 <400> 1  
                           Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
                           1                          5                          10  
 <210> 2  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 10 <213> Desconocido  
 <220>  
 <223> Péptido sintético  
 <220>  
 <221> Rasgo misceláneo  
 15 <222> (1)..(1)  
 <223> nada; o acetil-Asp; acetil-Asn; acetil-Pro; acetil-LysPro; acetil-OrnPro  
 <220>  
 <221> Rasgo misceláneo  
 <222> (2)..(2)  
 20 <223> [opcionalmente succinilado o acetilado] [Glu; ácido alfa-aminoadípico; Arg; homoArg; Leu; Lys; Orn;]  
 <220>  
 <221> Rasgo misceláneo  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Gln; Glu; Lys; Orn;  
 25 <220>  
 <221> Rasgo misceláneo  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Gln; Glu; Lys; Orn;  
 <220>  
 30 <221> Rasgo misceláneo  
 <222> (6)..(6)  
 <223> Ser; Gly; Ala; ácido alfa-amino isobutírico;  
 <220>  
 <221> Rasgo misceláneo  
 35 <222> (7)..(7)

<223> Gln; Glu; Lys; Orn; Ser; Thr; Asn; alo-Thr  
 <220>  
 <221> Rasgo misceláneo  
 <222> (8)..(8)

5 <223> Gln; Glu; Lys; Orn;  
 <220>  
 <221> Rasgo misceláneo  
 <222> (9)..(9)

10 <223> -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-CO-[epsilon-Lys; ácido beta-2,3-diaminopropiónico; ácido gama-2,4-diaminobutírico; delta-Orn] o -  
 (CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NH-[gama-Glu; ácido delta alfa-amino adípico]  
 <220>  
 <221> Rasgo misceláneo  
 <222> (10)..(10)  
 <223> Glu; ácido alfa-aminoadípico; Orn; Lys; Arg; homoArg; Leu

15 <220>  
 <221> Rasgo misceláneo  
 <222> (11)..(11)  
 <223> -NH<sub>2</sub>; Lys-NH<sub>2</sub>; Orn-NH<sub>2</sub>  
 <400> 2

	<b>Xaa</b>	<b>Xaa</b>	<b>Xaa</b>	<b>Xaa</b>	<b>Leu</b>	<b>Xaa</b>	<b>Xaa</b>	<b>Xaa</b>	<b>Xaa</b>	<b>Xaa</b>	<b>Xaa</b>
20	1				5					10	

<210> 3  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Desconocido

25 <220>  
 <223> Péptido sintético  
 <220>  
 <221> Rasgo misceláneo  
 <222> (1)..(1)

30 <223> acetyl-Asp  
 <220>  
 <221> Rasgo misceláneo  
 <222> (9)..(9)  
 <223> -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO-N-epsilon-Lys-

35 <220>

<221> Rasgo misceláneo  
 <222> (14)..(14)  
 <223> Leu-NH2  
 <400> 3

5                   Xaa Glu Gln Gln Leu His Ser Gln Xaa Arg Lys Ile Thr Xaa  
                   1                                   5                                   10

<210> 4  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Desconocido

10 <220>  
 <223> Péptido sintético  
 <220>  
 <221> Rasgo misceláneo  
 <222> (1)..(1)

15 <223> acetil-Asp;  
 <220>  
 <221> Rasgo misceláneo  
 <222> (9)..(9)  
 <223> -CH2-CH2-CO-N-epsilon-Lys

20 <220>  
 <221> Rasgo misceláneo  
 <222> (10)..(10)  
 <223> Arg-NH2  
 <400> 4

25                   Xaa Glu Gln Gln Leu Ser Ser Gln Xaa Xaa  
                   1                                   5                                   10

<210> 5  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Desconocido

30 <220>  
 <223> Péptido sintético  
 <220>  
 <221> Rasgo misceláneo  
 <222> (1)..(1)

35 <223> acetil-Asp

<220>  
 <221> Rasgo misceláneo  
 <222> (9)..(9)  
 <223> -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO-N-epsilon-Lys-  
 5 <220>  
 <221> RASGO MISCELÁNEO  
 <222> (14)..(14)  
 <223> Leu-NH<sub>2</sub>  
 <400> 5  
 10 Xaa Glu Gln Gln Leu His Ser Gln Xaa Leu Lys Ile Thr Xaa  
 1 5 10  
 <210> 6  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Desconocido  
 15 <220>  
 <223> Péptido sintético  
 <220>  
 <221> Rasgo misceláneo  
 <222> (1)..(1)  
 20 <223> acetil-Asp  
 <220>  
 <221> Rasgo misceláneo  
 <222> (9)..(9)  
 <223> -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO-N-epsilon-Lys-  
 25 <220>  
 <221> Rasgo misceláneo  
 <222> (10)..(10)  
 <223> Arg-NH<sub>2</sub>  
 <400> 6  
 30 Xaa Glu Gln Gln Leu Ser Ser Gln Xaa Xaa  
 1 5 10  
 <210> 7  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Desconocido

<220>  
 <223> Péptido sintético  
 <220>  
 <221> Rasgo misceláneo  
 5 <222> (1)..(1)  
 <223> acetil-Asp  
 <220>  
 <221> Rasgo misceláneo  
 <222> (9)..(9)  
 10 <223> -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO-N-epsilon-Lys  
 <220>  
 <221> Rasgo misceláneo  
 <222> (14)..(14)  
 <223> Leu-NH<sub>2</sub>  
 15 <400> 7

	Xaa	Leu	Gln	Gln	Leu	His	Ser	Gln	Xaa	Arg	Lys	Ile	Thr	Xaa
	1				5					10				

<210> 8  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 20 <213> Desconocido  
 <220>  
 <223> Péptido sintético  
 <220>  
 <221> Rasgo misceláneo  
 25 <222> (1)..(1)  
 <223> acetil-Asp  
 <220>  
 <221> Rasgo misceláneo  
 <222> (9)..(9)  
 30 <223> -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO-N-epsilon-Lys  
 <220>  
 <221> Rasgo misceláneo  
 <222> (14)..(14)  
 <223> Leu-NH<sub>2</sub>  
 35 <400> 8

		Xaa	Glu	Gln	Gln	Leu	His	Ser	Gln	Xaa	Arg	Lys	Ile	Thr	Xaa
		1				5					10				

<210> 9

<211> 14

<212> PRT

5 <213> Desconocido

<220>

<223> Péptido sintético

<220>

<221> Rasgo misceláneo

10 <222> (1)..(1)

<223> acetil-Asp

<220>

<221> Rasgo misceláneo

<222> (9)..(9)

15 <223> -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO-N-epsilon-Lys-

<220>

<221> Rasgo misceláneo

<222> (14)..(14)

<223> Leu-NH<sub>2</sub>

20 <400> 9

		Xaa	Glu	Gln	Gln	Leu	His	Ser	Gln	Xaa	Arg	Lys	Ile	Thr	Xaa
		1				5					10				

<210> 10

<211> 10

<212> PRT

25 <213> Desconocido

<220>

<223> Péptido sintético

<220>

<221> Rasgo misceláneo

30 <222> (1)..(1)

<223> acetil-Asp

<220>

<221> Rasgo misceláneo

<222> (9)..(9)

<223> -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO-N-epsilon-Lys-  
 <220>  
 <221> Rasgo misceláneo  
 <222> (10)..(10)  
 5 <223> Arg-NH<sub>2</sub>  
 <400> 10

	Xaa	Glu	Gln	Gln	Leu	Gly	Ser	Gln	Xaa	Xaa
	1				5					10

<210> 11  
 <211> 14  
 10 <212> PRT  
 <213> Desconocido  
 <220>  
 <223> Péptido sintético  
 <220>  
 15 <221> Rasgo misceláneo  
 <222> (1)..(1)  
 <223> acetyl-Asp  
 <220>  
 <221> Rasgo misceláneo  
 20 <222> (9)..(9)  
 <223> -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO-N-epsilon-Lys-  
 <220>  
 <221> Rasgo misceláneo  
 <222> (14)..(14)  
 25 <223> Leu-NH<sub>2</sub>  
 <400> 11

	Xaa	Glu	Gln	Gln	Leu	His	Ser	Gln	Xaa	Arg	Lys	Ile	Thr	Xaa
	1				5					10				

<210> 12  
 <211> 10  
 30 <212> PRT  
 <213> Desconocido  
 <220>  
 <223> Péptido sintético  
 <220>  
 35 <221> Rasgo misceláneo

<222> (1)..(1)  
 <223> acetil-Asp  
 <220>  
 <221> Rasgo misceláneo  
 5 <222> (9)..(9)  
 <223> -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO-N-epsilon-Lys-  
 <220>  
 <221> Rasgo misceláneo  
 <222> (10)..(10)  
 10 <223> Arg-NH<sub>2</sub>  
 <400> 12  
  

Xaa	Leu	Gln	Gln	Leu	Ser	Ser	Gln	Xaa	Xaa
1				5					10

  
 <210> 13  
 <211> 14  
 15 <212> PRT  
 <213> Desconocido  
 <220>  
 <223> Péptido sintético  
 <220>  
 20 <221> Rasgo misceláneo  
 <222> (1)..(1)  
 <223> acetil-Asp  
 <220>  
 <221> Rasgo misceláneo  
 25 <222> (9)..(9)  
 <223> -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO-N-epsilon Lys-  
 <220>  
 <221> Rasgo misceláneo  
 <222> (14)..(14)  
 30 <223> Leu-NH<sub>2</sub>  
 <400> 13  
  

Xaa	Glu	Gln	Gln	Leu	His	Ser	Gln	Xaa	Arg	Lys	Ile	Thr	Xaa
1				5					10				

  
 <210> 14  
 <211> 10



<212> PRT

<213> Desconocido

<220>

<223> Péptido sintético

5 <220>

<221> Rasgo misceláneo

<222> (1)..(1)

<223> acetil-Asp

<220>

10 <221> Rasgo misceláneo

<222> (9)..(9)

<223> -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO-N-Lys-

<220>

<221> Rasgo misceláneo

15 <222> (10)..(10)

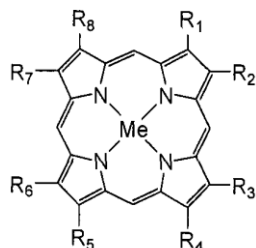
<223> Leu-NH<sub>2</sub>

<400> 14

Xaa	Glu	Gln	Gln	Leu	Ser	Ser	Gln	Xaa	Xaa
1				5				10	

# REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la fórmula general (I)

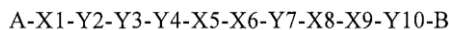


(I)

en la que:

- 5 Los átomos de nitrógeno del macrociclo que contiene nitrógeno forman complejo con un ion metálico Me, seleccionado del grupo que consiste en Fe, Mn, Ru, en cualquier estado de oxidación permitido;

R1 es un grupo de la fórmula general (II):



|



(II)

en la que n = 2;

- 10 A es seleccionado del grupo que consiste en Ace-Asp, Ace-Asn y Ace-Pro;

X1 es seleccionado del grupo que consiste en Glu, Aada, Arg, hArg, y Leu;

Y2 es Gln o Glu;

Y3 es Gln o Glu;

Y4 es Leu;

- 15 X5 es seleccionado del grupo que consiste en His, 4Taz y 5Taz;

X6 es seleccionado del grupo que consiste en Ser, Thr, Asn y aThr;

Y7 es Gln o Glu;

X8 es seleccionado del grupo que consiste en Orn, Lys, Dap y Dab;

X9 es seleccionado del grupo que consiste en Glu, Aada, Arg, hArg, y Leu;

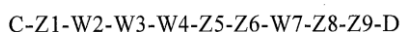
- 20 Y10 es Lys o Orn;

B es Ile-Thr-Leu-NH<sub>2</sub>;

L es CO;

R2 y R7 son CH<sub>3</sub>;

- 25 R8 tiene la fórmula Q-(CH<sub>2</sub>)<sub>s</sub>- en la que s = 2 y Q es seleccionado del grupo que consiste en NH<sub>2</sub>CO-, CH<sub>3</sub>CONH-, HOOC- y CH<sub>3</sub>OOC- o R8 tiene la fórmula general (III):



|



- en la que  $m = 2$ ;
- C es Ace-Asp, Ace-Asn o Ace-Pro;
- Z1 es seleccionado del grupo que consiste en Glu, Aada, Arg y hArg;
- W2 es Gln o Glu;
- 5 W3 es Gln o Glu;
- W4 es Leu;
- Z5 es seleccionado del grupo que consiste en Ser, Gly, Ala y Aib;
- Z6 es seleccionado del grupo que consiste en Gln, Glu y Ser;
- W7 es Gln o Glu;
- 10 Z8 es seleccionado del grupo que consiste en Orn, Lys, Dap y Dab;
- Z9 es un aminoácido seleccionado del grupo consistente en Glu, Aada, Arg y hArg;
- D es  $\text{NH}_2$ ;
- P es CO;
- R3, R4, R5, R6, son independientemente uno de otro H o metilo.
- 15 2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 en el que:
- Los átomos de nitrógeno del macrociclo forman complejo con un ion metálico Me, seleccionado del grupo que consiste en Fe, Mn y Ru, en cualquier estado de oxidación permitido;
- R1 es de la fórmula general (II), en la que:
- A es Ace-Asp;
- 20 X1 es Glu o Arg o Leu;
- Y2 es Gln o Glu;
- Y3 es Gln o Glu;
- Y4 es Leu;
- X5 es His;
- 25 X6 es seleccionado del grupo que consiste en Ser, Thr, Asn y aThr;
- Y7 es Gln o Glu;
- X8 es Lys;
- X9 es Glu o Arg, o Leu;
- Y10 es Lys o Orn;
- 30 B es Ile-Thr-Leu- $\text{NH}_2$ ;
- L es CO;
- R2 y R7 son  $\text{CH}_3$ ;
- R8 tiene la fórmula  $\text{Q}-(\text{CH}_2)_s-$  en la que  $s = 2$  y Q es seleccionado del grupo que consiste en  $\text{NH}_2\text{CO}-$ ,  $\text{CH}_3\text{CONH}-$ ,  $\text{HOOC}-$  y  $\text{CH}_3\text{OOC}-$ , o R8 tiene la fórmula general (III), en la que:
- 35 C es Ace-Asp;
- Z1 es Glu o Arg;

W2 es Gln o Glu;

W3 es Gln o Glu;

W4 es Leu;

Z5 es seleccionado del grupo que consiste en Ser, Gly, Ala y Aib;

5 Z6 es seleccionado del grupo que consiste en Gln, Glu y Ser;

W7 es Gln o Glu;

Z8 es Lys;

Z9 es Glu o Arg;

D es NH<sub>2</sub>;

10 P es CO<sub>2</sub>;

R3, R4, R5, R6, son independientemente uno de otro H o metilo.

3. Un compuesto de acuerdo con las reivindicaciones 1-2, que está unido de manera covalente a un antígeno; anticuerpo o fragmento del mismo; enzima.

15 4. Un compuesto de acuerdo con las reivindicaciones 1-3, que está sobre un soporte de matriz sólida; nanopartículas o electrodo.

5. El uso de un compuesto de acuerdo con las reivindicaciones 1-4 como un catalizador en las siguientes reacciones: epoxidación, oxidación, hidroxilación, nitración o peroxidación.

20 6. El uso de un compuesto de acuerdo con las reivindicaciones 1-4 en: kit de inmunodiagnóstico; inmunohistoquímica; kit de hibridación in-situ; ELISA; manchado del sur; manchado del norte; manchado del oeste; o en citofluorimetría.

7. El uso de un compuesto de acuerdo con las reivindicaciones 1-4

- para la degradación de contaminantes.