

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 655 082**

51 Int. Cl.:

C07D 245/04 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.08.2007** E 11189366 (5)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.10.2017** EP 2423201

54 Título: **Complejos luminiscentes de lantánidos macrocíclicos**

30 Prioridad:

15.08.2006 US 822482 P

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

16.02.2018

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (100.0%)
Office of the President, 1111 Franklin Street, 12th Floor
Oakland, CA 94607-5200, US**

72 Inventor/es:

**RAYMOND, KENNETH;
CORNEILLIE, TODD y
XU, JIDE**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 655 082 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

Complejos luminiscentes de lantánidos macrocíclicos

5 Campo de la invención

Esta invención se refiere a ligandos macrocíclicos y complejos lantánidos de estos, útiles como marcadores luminiscentes, así como también a los métodos que utilizan los ligandos y complejos de la invención.

10 Antecedentes de la invención

15 Existe una necesidad continua y en expansión de métodos rápidos, altamente específicos para la detección y cuantificación de sustancias químicas, bioquímicas y biológicas como analitos en mezclas de investigación y diagnóstico. De particular valor son los métodos para medir pequeñas cantidades de ácidos nucleicos, péptidos, productos farmacéuticos, metabolitos, microorganismos y otros materiales de valor diagnóstico. Los ejemplos de tales materiales incluyen materiales bioactivos moleculares pequeños (p. ej., narcóticos y venenos, fármacos administrados para propósitos terapéuticos, hormonas), microorganismos y virus patógenos, anticuerpos, y enzimas y ácidos nucleicos, particularmente los implicados en los estados patológicos.

20 La presencia de un analito particular puede determinarse frecuentemente mediante métodos de unión que explotan el alto grado de especificidad que caracteriza a muchos sistemas bioquímicos y biológicos. Los métodos que se usan frecuentemente se basan, por ejemplo, en sistemas antígeno-anticuerpo, técnicas de hibridación de ácidos nucleicos, y sistemas proteína-ligando. En estos métodos, la existencia de un complejo de valor diagnóstico se indica típicamente por la presencia o ausencia de una "etiqueta" observable que se une a uno o más de los materiales que interactúan. El método específico de etiquetado escogido frecuentemente dicta la utilidad y versatilidad de un sistema particular para detectar un analito de interés. Las etiquetas preferidas son económicas, seguras y capaces de unirse eficientemente a una amplia variedad de materiales químicos, bioquímicos y biológicos sin alterar significativamente las características de unión importantes de estos materiales. La etiqueta debe dar una señal altamente característica, y debe encontrarse raramente, y preferentemente nunca, en la naturaleza. La etiqueta debe ser estable y detectable en sistemas acuosos en períodos de tiempo en el intervalo de hasta meses. La detección de la etiqueta es preferentemente rápida, sensible, y reproducible sin la necesidad de instalaciones caras, especializadas o la necesidad de precauciones especiales para proteger al personal. La cuantificación de la etiqueta es preferentemente relativamente independiente de variables tales como la temperatura y la composición de la mezcla que se ensaya.

35 Se han desarrollado una amplia variedad de etiquetas, cada una con ventajas y desventajas particulares. Por ejemplo, las etiquetas radiactivas son completamente versátiles, y pueden detectarse a concentraciones muy bajas. Tales etiquetas son, sin embargo, caras, peligrosas, y su uso requiere de equipamiento sofisticado y personal entrenado. Por lo tanto, existe un amplio interés en las etiquetas no radiactivas, particularmente en las etiquetas que sean observables mediante técnicas espectrofotométricas, de resonancia de espín y de luminiscencia, y materiales reactivos, tales como enzimas que produzcan tales moléculas.

40 Las etiquetas que son detectables mediante el uso de espectroscopía de fluorescencia son de particular interés, debido al gran número de tales etiquetas que se conocen en la técnica. Además, la literatura está repleta de síntesis de etiquetas fluorescentes derivatizados para permitir su fácil unión a otras moléculas, y muchas de tales etiquetas fluorescentes están comercialmente disponibles.

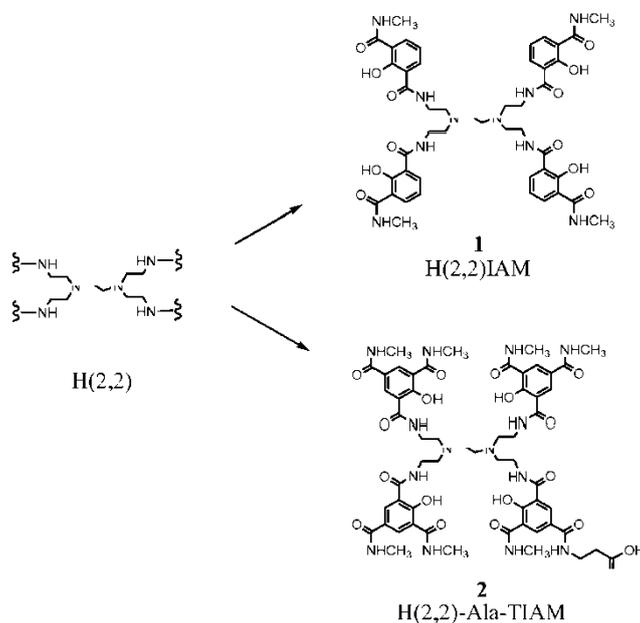
45 Además de detectarse directamente, muchas etiquetas fluorescentes operan para inhibir la fluorescencia de una segunda etiqueta fluorescente adyacente. Debido a su dependencia de la distancia y la magnitud de la interacción entre el inhibidor de fluorescencia y el fluoróforo, la inhibición de la fluorescencia de las especies fluorescentes proporciona una sonda sensible de configuración molecular y unión, u otras, interacciones. Un ejemplo excelente del uso de pares reportero fluorescente inhibidor de fluorescencia se encuentra en la detección y análisis de ácidos nucleicos.

50 Los fluoróforos orgánicos convencionales generalmente tienen tiempos de vida de fluorescencia cortos, en el orden de los nanosegundos (ns), que generalmente es demasiado corto para la discriminación óptima de la fluorescencia de fondo. Un esquema de detección alternativo, que es teóricamente más sensible que la fluorescencia convencional, es la luminiscencia resuelta en el tiempo. De acuerdo con este método, un metal lantánido quelado con un tiempo de vida radiactivo largo se une a una molécula de interés. La excitación pulsada combinada con un sistema de detección controlado permite la discriminación eficaz contra la emisión de fondo de corta duración. Por ejemplo, mediante el uso de este enfoque, se ha demostrado la detección y la cuantificación de híbridos de ADN a través de un anticuerpo etiquetado con europio (Syvanen y otros, *Nucleic Acids Research* 14:1017-1028 (1986)). Además, el ADN biotinilado se midió en pocillos de microtitulación mediante el uso de estreptavidina etiquetada con Eu (Dahlen, *Anal. Biochem.* (1982), 164:78-83). Una desventaja, sin embargo, de estos tipos de ensayos es que la etiqueta debe desprenderse de la sonda y su luminiscencia debe revelarse en una solución de mejora.

65 En vista de las ventajas prácticas predecibles se ha deseado generalmente que los quelatos de lantánidos empleados debieran mostrar un retardo de la luminiscencia con tiempos de desintegración de más de 10 μ s. La luminiscencia de

muchos de los quelatos luminiscentes conocidos tiende a ser inhibida por el agua. Como el agua generalmente está presente en un ensayo, particularmente un sistema de inmunoensayo, los complejos lantánidos que experimentan inhibición de la luminiscencia en presencia de agua se consideran como algo desfavorable o como poco prácticos para muchas aplicaciones. Por otra parte, los cortos tiempos de desintegración de la luminiscencia se consideran una desventaja de estos compuestos. Esta inhibición se debe a la afinidad de los iones lantánidos por coordinar las moléculas de agua. Cuando el ion lantánido ha coordinado las moléculas de agua, la energía de la luz absorbida (energía de excitación) se inhibe en lugar de emitirse como luminiscencia.

Por lo tanto, son altamente deseables los quelatos de lantánidos, particularmente los quelatos coordinadamente saturados que muestren excelentes propiedades luminiscentes. Alternativamente, son también ventajosos los quelatos de lantánidos coordinadamente insaturados que muestren luminiscencia aceptable en presencia de agua. Tales quelatos que se derivatizan para permitir su conjugación a uno o más componentes de un ensayo encuentran uso en una variedad de diferentes formatos de ensayo. La presente invención proporciona estos y otros de tales compuestos y ensayos mediante el uso de estos compuestos. Los complejos de hidroxiiisofalamida (IAM) de iones lantánidos tales como Tb^{3+} son potencialmente útiles en una variedad de aplicaciones biológicas. De particular importancia para aplicaciones biológicas es que estos complejos muestran estabilidad cinética en soluciones acuosas a concentraciones a niveles de nM o por debajo de estos.



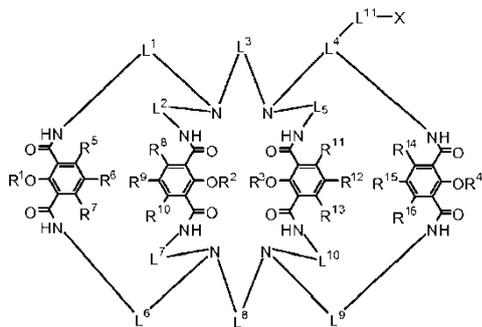
Se han descrito ligandos hidroxiiisofalamida útiles en aplicaciones que requieren luminiscencia (Petoud y otros, *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 13324-13325; la patente de los Estados Unidos núm. 7,018,850 otorgada a Raymond y otros). La cadena principal H(2,2) se ha empleado para sintetizar ligandos basados en isofalamida tales como **1** y **2** en la Figura 1. Esos ligandos octadentados manifiestan estabilidad termodinámica relativamente alta cuando se quelan a iones lantánidos trivalentes. El ligando TIAM funcionalizado **2** se ha conjugado a biomoléculas y se ha usado como un donador en estudios TR-LRET (Johansson y otros, *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126(50):16451-16455). Puede hacerse referencia adicional a: S. M. Cohen y otros "Inorganic Chemistry", 38(20), 1999, páginas 4522-4529.

Sin embargo, se mantiene una necesidad de complejos luminiscentes, que sean estables en condiciones biológicamente relevantes y a bajas concentraciones, y que muestren simultáneamente bajas interacciones no específicas con proteínas. La presente invención se dirige a estas y otras necesidades.

Resumen de la invención

Esta invención proporciona una nueva clase de ligandos macrocíclicos y complejos metálicos de estos. En particular, la invención proporciona complejos lantánidos luminiscentes. Incluso más particularmente, la invención proporciona complejos luminiscentes de terbio y europio. Estos complejos muestran alta estabilidad y solubilidad en medio acuoso así como también altos rendimientos cuánticos de luminiscencia del ion lantánido en agua sin aumento externo, tal como por micelas o fluoruro. Los complejos se forman entre un ion metálico de la serie de los lantánidos y una nueva clase de ligandos macrocíclicos. Los ligandos preferidos incorporan porciones de hidroxiiisofalamida dentro de su estructura y se caracterizan por la unión no específica sorprendentemente baja a una variedad de polipéptidos diferentes tales como anticuerpos y proteínas. Debido a sus propiedades químicas y fisicoquímicas únicas los complejos de la presente invención podrían encontrar uso en cualquier aplicación que requiera luminiscencia en medios acuosos, incluyendo sistemas de diagnósticos médicos y de ensayos bioanalíticos.

Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un compuesto que tiene una estructura de acuerdo con la Fórmula (III):



(III)

5

en donde

L¹, L², L³, L⁴, L⁵, L⁶, L⁷, L⁸, L⁹ y L¹⁰ son miembros seleccionados independientemente de etileno sustituido o no sustituido;

10 R¹, R², R³ y R⁴ son miembros seleccionados independientemente de H, un grupo enzimáticamente lábil, un grupo hidrolíticamente lábil, un grupo metabólicamente lábil y una carga negativa única;

R⁵, R⁶, R⁷, R⁸, R⁹, R¹⁰, R¹¹, R¹², R¹³, R¹⁴, R¹⁵ y R¹⁶ son H;

L¹¹ es heteroalquileo sustituido o no sustituido o alquileo sustituido o no sustituido; y

15 X es un miembro seleccionado de una amina, un ácido carboxílico, un maleimidilo, un tiazolidilo, un éster de NHS sustituido o no sustituido, un éster de NHS sulfonado y una porción succinimidilo.

15

En un segundo aspecto, la invención proporciona un complejo luminiscente formado entre al menos un ion metálico y un compuesto de la invención.

20

En un tercer aspecto, la invención proporciona un método para detectar la presencia o ausencia de un analito en una muestra. El método comprende (a) poner en contacto la muestra y una composición que incluye un complejo de la invención; (b) excitar el complejo; y (c) detectar la luminiscencia del complejo. En un ejemplo, la presencia o ausencia del analito se indica por la ausencia o presencia de luminiscencia del complejo.

25

En un cuarto aspecto, la invención proporciona un método para detectar la presencia o ausencia de un analito en una muestra. El método incluye (a) poner en contacto la muestra y una composición que incluye un complejo de la invención, y un grupo modificador de luminiscencia, en donde la energía puede transferirse entre el complejo y el grupo modificador de luminiscencia cuando el complejo se excita, y en donde el complejo y el grupo modificador de luminiscencia puede ser parte de la misma molécula o ser parte de diferentes moléculas; y (b) excitar dicho complejo; y (c) determinar la propiedad luminiscente de la muestra, en donde la presencia o ausencia del analito se indica por la propiedad luminiscente de la muestra. En un ejemplo, la presencia o ausencia del analito en la muestra se indica por un cambio en la propiedad luminiscente de la muestra.

30

Breve descripción de las figuras

35

La Figura 1 es un gráfico que indica la estabilidad cinética del compuesto **1** bajo diversas condiciones a temperatura ambiente.

La Figura 2 es un gráfico que indica la estabilidad cinética del compuesto **3** bajo diversas condiciones a temperatura ambiente.

40

La Figura 3 es un gráfico que indica la estabilidad cinética del compuesto **5A** bajo diversas condiciones a temperatura ambiente.

La Figura 4 es un gráfico que indica que el espectro de emisión de **5a-Tb** no conjugado es comparable a los espectros de emisión obtenidos para diferentes conjugados de proteínas de **5a-Tb**.

45

La Figura 5 es un gráfico que compara los tiempos de vida de desintegración de la luminiscencia de **5a-Tb** no conjugado o conjugado a estreptavidina.

50

La Figura 6 es un gráfico que indica los espectros de absorción y emisión del estado estacionario que se registraron para el compuesto **4-Tb**.

Descripción detallada de la invención

55

Definiciones

5 "Analito", como se usa en la presente descripción, significa cualquier compuesto o molécula de interés para la que se realiza una prueba diagnóstica, tal como un biopolímero o un material bioactivo molecular pequeño. Un analito puede ser, por ejemplo, una proteína, un péptido, un carbohidrato, un polisacárido, una glicoproteína, una hormona, un receptor, un antígeno, un anticuerpo, un virus, un sustrato, un metabolito, un análogo al estado de transición, un cofactor, un inhibidor, un fármaco, un colorante, un nutriente, un factor de crecimiento, un lípido etcétera, sin limitación.

10 Como se usa en la presente descripción, "transferencia de energía" se refiere al proceso mediante el que la emisión de la luz de un grupo luminiscente se altera por un grupo modificador de luminiscencia. Cuando el grupo modificador de luminiscencia es un grupo inhibidor entonces la emisión de la luz del grupo luminiscente se atenúa (se inhibe). Los mecanismos de transferencia de energía incluyen transferencia de energía por resonancia de luminiscencia mediante interacción dipolo-dipolo (p. ej., en transferencia de energía de mayor alcance) o transferencia de electrones (p. ej., a través de distancias más cortas). Mientras que la transferencia de energía frecuentemente se basa en el solapamiento espectral del espectro de emisión del grupo luminiscente y el espectro de absorción del grupo modificador de luminiscencia, (además de la distancia entre los grupos) se ha demostrado que no se requiere necesariamente el solapamiento espectral para que se produzca la transferencia de energía (ver p. ej., Latva y otros, la patente de los Estados Unidos núm.:5,998146). Debe entenderse que cualquier referencia a "transferencia de energía" en la presente descripción abarca todos los fenómenos mecánicamente diferentes.

20 "Par de transferencia de energía" se usa para referirse a un grupo de moléculas que participan en la transferencia de energía. Tales complejos pueden comprender, por ejemplo, dos grupos luminiscentes, que pueden ser diferentes uno del otro y un grupo inhibidor, dos grupos inhibidores y un grupo luminiscente, o múltiples grupos luminiscentes y múltiples grupos inhibidores. En los casos donde existen múltiples grupos fluorescentes y/o múltiples grupos inhibidores, los grupos individuales pueden ser diferentes unos de otros. Típicamente, una de las moléculas actúa como un grupo luminiscente, y la otra actúa como un grupo modificador de luminiscencia. El par de transferencia de energía preferido de la invención comprende un grupo luminiscente y un grupo inhibidor de la invención. No hay limitación en la identidad de los miembros individuales del par de transferencia de energía descrito en la presente descripción. Todo lo que se requiere es que las propiedades espectroscópicas del par de transferencia de energía como un todo cambien en alguna forma medible si la distancia entre los miembros individuales se altera en alguna cantidad crítica.

30 Como se usa en la presente descripción, "grupo modificador de luminiscencia" se refiere a una molécula de la invención que puede alterar en cualquier forma la emisión de luminiscencia de un grupo luminiscente. Un grupo modificador de luminiscencia generalmente logra esto mediante un mecanismo de transferencia de energía. En dependencia de la identidad del grupo modificador de luminiscencia, la emisión de luminiscencia puede experimentar un número de alteraciones, que incluyen, pero sin limitar a, atenuación, inhibición completa, mejora, un desplazamiento en la longitud de onda, un desplazamiento en la polaridad, y un cambio en el tiempo de vida de la luminiscencia. Un ejemplo de un grupo modificador de luminiscencia es un grupo modificador de fluorescencia. Otro grupo modificador de luminiscencia ilustrativo es un grupo inhibidor.

40 Como se usa en la presente descripción, "grupo inhibidor" se refiere a cualquier grupo modificador de luminiscencia de la invención que puede atenuar al menos parcialmente la luz emitida por un grupo luminiscente. A esta atenuación se hace referencia en la presente descripción como "inhibición de la fluorescencia". Por lo tanto, la excitación del grupo luminiscente en presencia del grupo inhibidor conduce a una señal de emisión que es menos intensa que la esperada, o incluso completamente ausente. La inhibición se produce típicamente mediante la transferencia de energía entre el grupo luminiscente y el grupo inhibidor.

50 La "transferencia de energía de resonancia de fluorescencia" o "FRET" se usa indistintamente con "FET", y "transferencia de energía de resonancia de luminiscencia (LRET)" se refiere a un fenómeno de transferencia de energía en el que la luz emitida por un grupo luminiscente excitado es absorbida al menos parcialmente por un grupo modificador de luminiscencia de la invención. El grupo modificador de luminiscencia puede ser, por ejemplo, un grupo inhibidor. LRET depende de la transferencia de energía entre el grupo luminiscente y el grupo modificador de luminiscencia. LRET también depende de la distancia entre el grupo modificador de luminiscencia y el grupo luminiscente.

55 Las condiciones de "alta dilución" o "H.D." como se describe en la presente descripción se refiere a condiciones que son más adecuadas para obtener el producto deseado en lugar de los productos no deseados. En la realización de reacciones químicas especialmente las reacciones de ciclización, las condiciones de alta dilución se logran manteniendo la concentración de uno o más reactivos lo suficientemente baja para reducir la formación de subproductos poliméricos no deseados. Diferentes reacciones tienen diferentes requisitos de concentración de reactivos que pueden resolverse para obtener el rendimiento deseado del producto deseado. Un experto en la técnica podría ser capaz de ajustar las concentraciones de reactivos para lograr el rendimiento deseado del producto deseado. En una modalidad ilustrativa, los compuestos de la invención que se preparan bajo condiciones de alta dilución se preparan de manera que la concentración de al menos un reactivo sea muy baja (aproximadamente 1×10^{-5} M o menos). Los productos deseados pueden obtenerse de reacciones a concentraciones más altas, pero el rendimiento de los productos deseados será más bajo y los rendimientos de los productos no deseados serán más altos.

"Porción" se refiere al radical de una molécula que se une a otra porción.

5 El término "porción objetivo" significa cualquier porción unida a los complejos de la invención. La porción objetivo puede ser una molécula pequeña, que incluye tanto a los no péptidos como a los péptidos. El grupo objetivo también puede ser una macromolécula, que incluye sacáridos, lectinas, receptores, ligandos para receptores, proteínas tales como BSA, anticuerpos, ácidos nucleicos, soportes sólidos y etcétera. El grupo objetivo también puede ser un lípido así como también un polímero, tal como una superficie plástica, un derivado de polietilenglicol y similares.

10 Como se usa en la presente descripción, "ácido nucleico" significa ADN, ARN, monocatenario, bicatenario, o motivos de hibridación más altamente agregados, y cualquier modificación química de estos. Las modificaciones incluyen, pero sin limitar a, las que proporcionan grupos químicos que incorporan carga adicional, polarizabilidad, enlaces de hidrógeno, interacciones electrostáticas, y fluxionalidad a las bases del ligando ácido nucleico o al ligando ácido nucleico como un todo. Tales modificaciones incluyen, pero sin limitar a, ácidos nucleicos peptídicos, modificaciones del grupo fosfodiéster (p. ej., fosforotioatos, metilfosfonatos), modificaciones del azúcar en la posición 2', modificaciones de la pirimidina en la posición 5, modificaciones de la purina en la posición 8, modificaciones en las aminas exocíclicas, sustitución de 4-tiouridina, sustitución de 5-bromo o 5-yodo-uracilo; modificaciones en la cadena principal, metilaciones, combinaciones inusuales de apareamiento de bases tales como las isobases, isocitidina e isoguanidina y similares. Las modificaciones también pueden incluir las modificaciones 3' y 5' tales como la formación de caperuza con un SL, un fluoróforo u otra porción.

25 "Péptido" se refiere a un polímero en el que los monómeros son aminoácidos y se unen mediante enlaces amida, alternativamente denominados polipéptidos. Cuando los aminoácidos son alfa aminoácidos, pueden usarse ya sea el isómero óptico L o el isómero óptico D. Además, se incluyen también los aminoácidos no naturales, por ejemplo, beta alanina, fenilglicina y homoarginina. Los aminoácidos que comúnmente se encuentran y que no son codificados por genes también se pueden usar en la presente invención. Todos los aminoácidos usados en la presente invención pueden ser ya sea el isómero D o L. Generalmente se prefieren los isómeros L. El término "péptido" o "polipéptido", como se usa en la presente descripción, se refiere a péptidos de origen natural así como también sintéticos. Además, los peptidomiméticos también son útiles en la presente invención. Para una revisión general, ver, Spatola, A. F., en CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY OF AMINO ACIDS, PEPTIDES AND PROTEINS, B. Weinstein, eds., Marcel Dekker, Nueva York, página 267 (1983).

35 Cuando los grupos sustituyentes se especifican por su fórmula química convencional, escrita de izquierda a derecha, ellos abarcan igualmente los sustituyentes químicamente idénticos, que podrían resultar de escribir la estructura de derecha a izquierda, p. ej., $-\text{CH}_2\text{O}-$ se enumera además como $-\text{OCH}_2-$.

40 El término "alquilo", por sí mismo o como parte de otro sustituyente, significa, a menos que se indique lo contrario, una cadena lineal o ramificada, o radical hidrocarburo cíclico, o combinación de estos, que pueden ser completamente saturados, mono o poliinsaturados y pueden incluir radicales di y polivalentes, que tienen el número de átomos de carbono indicados (es decir $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ significa uno a diez carbonos). Los ejemplos de radicales hidrocarburo saturados incluyen, pero sin limitarse a, grupos tales como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, t-butilo, isobutilo, sec-butilo, ciclohexilo, (ciclohexilo) metilo, ciclopropilmetilo, homólogos e isómeros de, por ejemplo, n-pentilo, n-hexilo, n-heptilo, n-octilo, y similares. Un grupo alquilo insaturado es uno que tiene uno o más enlaces dobles o triples. Los ejemplos de grupos alquilo insaturados incluyen, pero sin limitar a, vinilo, 2-propenilo, crotilo, 2-isopentilo, 2-(butadienilo), 2,4-pentadienilo, 3-(1,4-pentadienilo), etinilo, 1- y 3-propinilo, 3-butinilo, y los homólogos e isómeros superiores. El término "alquilo", a menos que se indique lo contrario, incluye también los derivados de alquilo definidos con más detalle más abajo, tal como "heteroalquilo". Los grupos alquilo que se limitan a grupos de hidrocarburo se denominan "homoalquilo".

50 El término "alquileo" por sí mismo o como parte de otro sustituyente significa un radical divalente derivado de un alcano, como se ejemplifica, pero sin limitar a, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, e incluye además los grupos descritos más abajo como "heteroalquileo". Típicamente, un grupo alquilo (o alquileo) tendrá de 1 a 24 átomos de carbono, con aquellos grupos que tienen 10 o menos átomos de carbono, siendo los preferidos en la presente invención. Un "alquilo inferior" o "alquileo inferior" es un grupo alquilo o alquileo de cadena más corta, que tiene generalmente ocho o menos átomos de carbono.

60 Los términos "alcoxi", "alquilamino" y "alquiltio" (o tioalcoxi) se usan en su sentido convencional, y se refieren a los grupos alquilo unidos al resto de la molécula a través de un átomo de oxígeno, un grupo amino, o un átomo de azufre, respectivamente.

65 El término "heteroalquilo", por sí mismo o en combinación con otro término, significa, a menos que se indique lo contrario, una cadena lineal o ramificada estable, o radical hidrocarburo cíclico, o combinaciones de estos, que consiste en el número indicado de átomos de carbono y al menos un heteroátomo seleccionado del grupo que consiste en O, N, Si y S, y en donde los átomos de nitrógeno y azufre opcionalmente pueden estar oxidados y el heteroátomo de nitrógeno opcionalmente puede estar en estado cuaternario. El(los) heteroátomo(s) O, N, S, B y Si puede(n) colocarse en cualquier posición interior del grupo heteroalquilo o en la posición en la que el grupo alquilo se une al resto de la

molécula. Los ejemplos incluyen, pero sin limitar a, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N(CH}_3\text{)-CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{-S-CH}_2\text{-CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-S(O)-CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-S(O)}_2\text{-CH}_3$, $-\text{CH}=\text{CH-O-CH}_3$, $-\text{Si(CH}_3\text{)}_3$, $-\text{CH}_2\text{-CH=N-OCH}_3$, y $-\text{CH}=\text{CH-N(CH}_3\text{)-CH}_3$. Hasta dos heteroátomos pueden ser consecutivos, tales como, por ejemplo, $-\text{CH}_2\text{-NH-OCH}_3$ y $-\text{CH}_2\text{-O-Si(CH}_3\text{)}_3$. De forma similar, el término "heteroalquileo" por sí mismo o como parte de otro sustituyente significa un radical divalente derivado de heteroalquilo, como se ejemplifica, pero sin limitar a, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-S-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$ y $-\text{CH}_2\text{-S-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-CH}_2\text{-}$. Para los grupos heteroalquileo, los heteroátomos también pueden ocupar cualquiera de los terminales de la cadena o ambos (*p. ej.*, alquilenoxi, alquilendioxi, alquilenamino, alquilendiamino, y similares). Más aun, para los grupos de enlace alquileo y heteroalquileo, ninguna orientación del grupo de enlace está implícita en la dirección en la que se escribe la fórmula del grupo de enlace. Por ejemplo, la fórmula $-\text{C(O)}_2\text{R}'$ representa tanto a $-\text{C(O)}_2\text{R}'$ como a $-\text{R}'\text{C(O)}_2$.

Los términos "cicloalquilo" y "heterocicloalquilo", por sí mismos o en combinación con otros términos, representan, a menos que se indique lo contrario, versiones cíclicas de "alquilo" y "heteroalquilo", respectivamente. Además, para el heterocicloalquilo, un heteroátomo puede ocupar la posición en la cual el heterociclo se une al resto de la molécula. Los ejemplos de cicloalquilo incluyen, pero sin limitar a, ciclopentilo, ciclohexilo, 1-ciclohexenilo, 3-ciclohexenilo, cicloheptilo, y similares. Los ejemplos de heterocicloalquilo incluyen, pero sin limitar a, 1-(1,2,5,6-tetrahidropiridilo), 1-piperidinilo, 2-piperidinilo, 3-piperidinilo, 4-morfolinilo, 3-morfolinilo, tetrahidrofurano-2-ilo, tetrahidrofurano-3-ilo, tetrahidrotien-2-ilo, tetrahidrotien-3-ilo, 1-piperazinilo, 2-piperazinilo, y similares.

Los términos "halo" o "halógeno", por sí mismos o como parte de otro sustituyente, significa a menos que se indique lo contrario, un átomo de flúor, cloro, bromo, o yodo. Además, los términos tales como "haloalquilo", incluyen monohaloalquilo y polihaloalquilo. Por ejemplo, el término "halo(C₁-C₄)alquilo" incluye, pero sin limitar a, trifluorometilo, 2,2,2-trifluoroetilo, 4-clorobutilo, 3-bromopropilo, y similares.

El término "arilo" significa, a menos que se indique lo contrario, un sustituyente poliinsaturado, aromático que puede ser un único anillo o múltiples anillos (preferentemente de 1 a 3 anillos), que se fusionan juntos o se enlazan covalentemente. El término "heteroarilo" se refiere a grupos arilo (o anillos) que contienen de uno a cuatro heteroátomos que se seleccionan de N, O, y S, en donde los átomos de nitrógeno y azufre están oxidados de manera opcional y el átomo(s) de nitrógeno está en estado cuaternario de manera opcional. Un grupo heteroarilo puede unirse al resto de la molécula a través de un heteroátomo. Los ejemplos no limitantes de los grupos arilo y heteroarilo incluyen fenilo, 1-naftilo, 2-naftilo, 4-bifenilo, 1-pirrolilo, 2-pirrolilo, 3-pirrolilo, 3-pirazolilo, 2-imidazolilo, 4-imidazolilo, pirazinilo, 2-oxazolilo, 4-oxazolilo, 2-fenilo-4-oxazolilo, 5-oxazolilo, 3-isoxazolilo, 4-isoxazolilo, 5-isoxazolilo, 2-tiazolilo, 4-tiazolilo, 5-tiazolilo, 2-furilo, 3-furilo, 2-tienilo, 3-tienilo, 2-piridil, 3-piridil, 4-piridil, 2-pirimidilo, 4-pirimidilo, 5-benzotiazolilo, purinilo, 2-bencimidazolilo, 5-indolilo, 1-isoquinolilo, 5-isoquinolilo, 2-quinoxalinilo, 5-quinoxalinilo, 3-quinolilo, y 6-quinolilo. Los sustituyentes para cada uno de los sistemas anulares arilo y heteroarilo anteriormente denotados son seleccionados del grupo de sustituyentes aceptables descritos más abajo.

Para abreviar, el término "arilo" cuando se usa en combinación con otros términos (*p. ej.*, ariloxi, ariltioxi, arilalquilo) incluye tanto los anillos arilo como heteroarilo como se definió anteriormente. Por lo tanto, el término "arilalquilo" incluye los radicales en los que un grupo arilo se une a un grupo alquilo (*p. ej.*, bencilo, fenetilo, piridilmetilo y similares) incluyendo los grupos alquilo en los que un átomo de carbono (*p. ej.*, un grupo metileno) se ha sustituido, por ejemplo, por un átomo de oxígeno (*p. ej.*, fenoximetilo, 2-piridiloximetilo, 3-(1-naftiloxi)propilo, y similares).

Cada uno de los términos anteriores (*p. ej.*, "alquilo", "heteroalquilo", "arilo" y "heteroarilo") incluyen tanto las formas sustituidas como las no sustituidas del radical indicado. Los sustituyentes preferidos para cada tipo de radical se proporcionan más abajo.

Los sustituyentes para los radicales alquilo y heteroalquilo (incluyendo aquellos grupos frecuentemente referidos como alquileo, alqueno, heteroalquileo, heteroalqueno, alquino, cicloalquilo, heterocicloalquilo, cicloalqueno, y heterocicloalqueno) genéricamente se refieren como "sustituyentes del grupo alquilo", y pueden ser uno o más de una variedad de grupos seleccionados de, pero sin limitar a: arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, $-\text{OR}'$, $=\text{O}$, $=\text{NR}'$, $=\text{N-OR}'$, $-\text{NR}'\text{R}''$, $-\text{SR}'$, $-\text{halógeno}$, $-\text{SiR}'\text{R}''\text{R}'''$, $-\text{OC(O)R}'$, $-\text{C(O)R}'$, $-\text{CO}_2\text{R}'$, $-\text{CONR}'\text{R}''$, $-\text{OC(O)NR}'\text{R}''$, $-\text{NR}'\text{C(O)R}'$, $-\text{NR}'\text{-C(O)NR}'\text{R}'''$, $-\text{NR}'\text{C(O)}_2\text{R}'$, $-\text{NR}'\text{-C(NR}'\text{R}''\text{R}''')=\text{NR}''''$, $-\text{NR}'\text{-C(NR}'\text{R}''\text{R}''')=\text{NR}''''$, $-\text{S(O)R}'$, $-\text{S(O)}_2\text{R}'$, $-\text{S(O)}_2\text{NR}'\text{R}''$, $-\text{NRSO}_2\text{R}'$, $-\text{CN}$ y $-\text{NO}_2$ en un número en el intervalo de cero a $(2m'+1)$, donde m' es el número total de átomos de carbono en dicho radical. R' , R'' , R''' y R'''' cada uno preferentemente y de manera independiente se refiere a hidrógeno, heteroalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, *p. ej.*, arilo sustituido con 1-3 halógenos, alquilo sustituido o no sustituido, grupos alcoxi o tioalcoxi, o grupos arilalquilo. Cuando un compuesto de la invención incluye más de un grupo R, por ejemplo, cada uno de los grupos R se selecciona independientemente como cada uno de los grupos R' , R'' , R''' y R'''' cuando más de uno de estos grupos está presente. Cuando R' y R'' se unen al mismo átomo de nitrógeno, estos pueden combinarse con el átomo de nitrógeno para formar un anillo de 5-, 6-, o 7-miembros. Por ejemplo, $-\text{NR}'\text{R}''$ incluye, pero sin limitar a, 1-pirrolidinilo y 4-morfolinilo. A partir de la descripción anterior de los sustituyentes, un experto en la técnica comprenderá que el término "alquilo" incluye grupos que incluyen átomos de carbono unidos a grupos diferentes a los grupos hidrógeno, tales como haloalquilo (*p. ej.*, $-\text{CF}_3$ y $-\text{CH}_2\text{CF}_3$) y acilo (*p. ej.*, $-\text{C(O)CH}_3$, $-\text{C(O)CF}_3$, $-\text{C(O)CH}_2\text{OCH}_3$, y similares).

Similar a los sustituyentes descritos para el radical alquilo, los sustituyentes para los grupos arilo y heteroarilo se refieren genéricamente como "sustituyentes del grupo arilo". Los sustituyentes se seleccionan de, por ejemplo: alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, halógeno, -OR', =O, =NR', =N-OR', -NR'R', -SR', -halógeno, -SiR'R'R'', -OC(O)R', -C(O)R', -CO₂R', -CONR'R', -OC(O)NR'R', -NR'C(O)R', -NR'C(O)NR'R'', -NR'C(O)₂R', -NR-C(NR'R'R'')=NR''', -NR-C(NR'R'')=NR''', -S(O)R', -S(O)₂R', -S(O)₂NR'R', -NRSO₂R', -CN y -NO₂, -R', -N₃, -CH(Ph)₂, fluoro(C₁-C₄)alcoxi, y fluoro(C₁-C₄)alquilo, en un número en el intervalo desde cero hasta el número total de valencias abiertas en el sistema de anillo aromático; y donde R', R'', R''' y R'''' se seleccionan preferentemente de manera independiente del hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido y heteroarilo sustituido o no sustituido. Cuando un compuesto de la invención incluye más de un grupo R, por ejemplo, cada uno de los grupos R se selecciona independientemente como cada uno de los grupos R', R'', R''' y R'''' cuando más de uno de estos grupos está presente.

Dos de los sustituyentes en los átomos adyacentes del anillo de arilo o heteroarilo opcionalmente pueden reemplazarse con un sustituyente de la fórmula -T-C(O)-(CRR')_q-U-, en donde T y U son independientemente -NR-, -O-, -CRR'- o un enlace simple, y q es un entero de 0 a 3. Alternativamente, dos de los sustituyentes en los átomos adyacentes del anillo de arilo o heteroarilo pueden reemplazarse opcionalmente con un sustituyente de la fórmula -A-(CH₂)_r-B-, en donde A y B son independientemente -CRR'-, -O-, -NR-, -S-, -S(O)-, -S(O)₂-, -S(O)₂NR'- o un enlace simple, y r es un entero de 1 a 4. Uno de los enlaces simples del nuevo anillo así formado puede estar opcionalmente sustituido con un doble enlace. Alternativamente, dos de los sustituyentes en los átomos adyacentes del anillo de arilo o heteroarilo opcionalmente pueden reemplazarse con un sustituyente de la fórmula -(CRR')_s-X-(CR''R''')_d-, donde s y d son independientemente enteros de 0 a 3, y X es -O-, -NR'-, -S-, -S(O)-, -S(O)₂-, o -S(O)₂NR'-. Los sustituyentes R, R', R'' y R''' se seleccionan preferiblemente y de manera independiente entre hidrógeno o alquilo sustituido o no sustituido (C₁-C₆).

Como se usa en la presente descripción, el término "heteroátomo" incluye oxígeno (O), nitrógeno (N), azufre (S), silicio (Si) y boro (B).

El símbolo "R" es una abreviatura general que representa un grupo sustituyente que se selecciona de alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, y grupos heterociclilo sustituido o no sustituido.

La presente invención incluye todas las formas de sales de esas moléculas que contienen grupos funcionales ionizables, tales como grupos básicos y ácidos. El término "sales farmacéuticamente aceptables" incluyen las sales de los compuestos activos que se preparan con ácidos o bases relativamente no tóxicas, dependiendo de los sustituyentes particulares encontrados en los compuestos descritos en la presente descripción. Cuando los compuestos de la presente invención contienen funcionalidades relativamente ácidas, las sales de adición básicas pueden obtenerse poniendo en contacto la forma neutra de tales compuestos con una cantidad suficiente de la base deseada, ya sea puro o en un disolvente inerte adecuado. Ejemplos de sales de adición básicas farmacéuticamente aceptables incluyen la sal de sodio, potasio, calcio, amonio, amino orgánico, o magnesio, o una sal similar. Cuando los compuestos de la presente invención contienen funcionalidades relativamente básicas, las sales de adición de ácido pueden obtenerse poniendo en contacto la forma neutra de tales compuestos con una cantidad suficiente del ácido deseado, ya sea puro o en un disolvente inerte adecuado. Los ejemplos de sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos como ácido clorhídrico, bromhídrico, nítrico, carbónico, monohidrogenocarbónico, fosfórico, monohidrogenofosfórico, dihidrogenofosfórico, sulfúrico, monohidrogenosulfúrico, yodídrico o fosforoso y similares, así como las sales derivadas de ácidos orgánicos relativamente no tóxicos como acético, propiónico, isobutírico, maleico, malónico, benzoico, succínico, subérico, fumárico, láctico, mandélico, ftálico, bencenosulfónico, p-tolilsulfónico, cítrico, tartárico, metanosulfónico, y similares. Además se incluyen las sales de aminoácidos tales como arginato y similares, y sales de ácidos orgánicos como los ácidos glucurónico o galactunónico y similares (ver, por ejemplo, Berge y otros, *Journal of Pharmaceutical Science*, 66:1-19 (1977)). Ciertos compuestos específicos de la presente invención contienen funcionalidades tanto básicas como ácidas que permiten que los compuestos se conviertan ya sea en sales de adición básicas o ácidas.

Las formas neutras de los compuestos se regeneran preferentemente poniendo en contacto la sal con una base o ácido y aislando el compuesto original de la manera convencional. La forma original del compuesto difiere de las diversas formas de sal en ciertas propiedades físicas, tales como la solubilidad en disolventes polares, pero de otro modo las sales son equivalentes a la forma original del compuesto para los propósitos de la presente invención.

Cuando un residuo (tal como R¹, R², R³ y R⁴) se define en la presente descripción como una carga negativa única, entonces el residuo opcionalmente puede incluir un contraión catiónico. La forma de sal resultante del compuesto está abarcada en la estructura tal como se presenta.

Ciertos compuestos de la presente invención pueden existir en formas no solvatadas así como en formas solvatadas, que incluyen las formas hidratadas. En general, las formas solvatadas son equivalentes a las formas no solvatadas y se incluyen dentro del alcance de la presente invención. Ciertos compuestos de la presente invención pueden existir en

múltiples formas cristalinas o amorfas. Generalmente, todas las formas físicas son equivalentes para los usos contemplados en la presente invención y se pretenden que estén dentro del alcance de la presente invención.

5 Ciertos compuestos de la presente invención poseen átomos de carbono asimétricos (centros ópticos) o dobles enlaces; los racematos, diastereómeros, isómeros geométricos e isómeros individuales se incluyen dentro del alcance de la presente invención.

10 Las representaciones gráficas de los compuestos racémicos, ambiscalesmicos y escalares o enantioméricamente puros utilizados en la presente memoria se toman Maehr, *J. Chem. Ed.*, 62:114-120 (1985); las cuñas sólidas y discontinuas se usan para indicar la configuración absoluta de un elemento quiral; las líneas onduladas indican el rechazo de cualquier implicación estereoquímica que el enlace que representa pueda generar; las líneas en negrita sólidas y discontinuas son descriptores geométricos que indican la configuración relativa mostrada pero que no implican ninguna estereoquímica absoluta; y los contornos de la cuña y las líneas punteadas o discontinuas denotan compuestos enantioméricamente puros de configuración absoluta indeterminada.

15 Los términos "exceso enantiomérico" y "exceso diastereomérico" se usan indistintamente en la presente descripción. Los compuestos con un estereocentro único se refieren como presentes en "exceso enantiomérico", aquellos con al menos dos estereocentros se refieren como presentes en "exceso diastereomérico."

20 Los compuestos de la presente invención pueden contener también proporciones no naturales de isótopos atómicos en uno o más de los átomos que constituyen tales compuestos. Por ejemplo, los compuestos pueden etiquetarse radiactivamente con isótopos radiactivos, tales como por ejemplo tritio (^3H), yodo-125 (^{125}I) o carbono-14 (^{14}C). Todas las variaciones isotópicas de los compuestos de la presente invención, sean radioactivos o no, se pretende que estén incluidos en el alcance de la presente invención.

25 Introducción

30 La presente invención proporciona una clase de sondas luminiscentes que se basan en quelatos metálicos, que se forman entre el ión metálico y una nueva clase de ligandos macrocíclicos. En particular, la invención proporciona complejos lantánidos luminiscentes. Incluso más particularmente, la invención proporciona complejos luminiscentes de terbio y europio. Estos complejos muestran alta estabilidad así como también altos rendimientos cuánticos de la luminiscencia del ión lantánido en medio acuoso sin la necesidad de agentes activadores secundarios, tales como por micelas o fluoruro. Los ligandos preferidos incorporan porciones hidroxifalámida dentro de su estructura macrocíclica y se caracterizan por una estabilidad cinética sorprendentemente alta y unión inesperadamente baja, no específica a una variedad de diferentes polipéptidos tales como anticuerpos y proteínas. Estas características los distinguen de ligandos conocidos, de estructura abierta.

40 El valor de estos complejos de lantánidos se obtiene a partir de sus altas eficiencias cuánticas y sus coeficientes de absorción relativamente altos. Estas propiedades hacen a los ligandos tales como el compuesto 5 útiles para aplicaciones de transferencia de energía de resonancia de luminiscencia resuelta en el tiempo homogénea (TR-LRET) donde las moléculas donadoras yceptoras se usan a bajas concentraciones. Los complejos de la presente invención pudieran encontrar uso en cualquier aplicación que requiera fuerte luminiscencia bajo condiciones acuosas incluyendo diagnósticos médicos y sistemas de ensayos bioanalíticos, tales como inmunoensayos, ensayos de escisión de péptidos, ensayos de ADN reporteros y similares. Además, estos complejos y sus derivados pueden encontrar amplia aplicabilidad en la nanotecnología (incorporación en partículas) y en la ciencia de materiales donde los complejos pudieran embeberse en materiales sólidos que permiten la transmisión de la luz.

50 Los fluoróforos de la invención pueden usarse con otros fluoróforos o inhibidores como componentes de las sondas de transferencia de energía. Muchas etiquetas luminiscentes o no luminiscentes son útiles en combinación con los complejos de la invención y muchas de tales etiquetas están disponibles de fuentes comerciales, tales como SIGMA (San Luis) o Invitrogen, que son conocidas por el experto en la técnica. Además, los expertos en la técnica reconocerán cómo seleccionar un fluoróforo apropiado para una aplicación particular y, si no está fácilmente disponible, serán capaces de sintetizar el fluoróforo o inhibidor *de novo* necesario o modificar sintéticamente los compuestos luminiscentes comercialmente disponibles para llegar a la etiqueta fluorescente deseada.

55 Además de los fluoróforos de moléculas pequeñas, las proteínas fluorescentes de origen natural y los análogos modificados mediante ingeniería genética de tales proteínas son útiles con los compuestos de la presente invención. Tales proteínas incluyen, por ejemplo, las proteínas verdes fluorescentes de los cnidarios (Ward y otros, *Photochem. Photobiol.* 1982, 35:803-808; Levine y otros, *Comp. Biochem. Physiol.* 1982, 72B:77-85), proteína amarilla fluorescente de la cepa *Vibrio fischeri* (Baldwin y otros, *Biochemistry* 1990, 29:5509-15), Peridina-clorofila del *Symbiodinium* dinoflagelado sp. (Morris y otros, *Plant Molecular Biology* 1994, 24:673:77), ficobiliproteínas de cianobacterias marinas, tales como *Synechococcus*, p. ej., ficoeritrina y ficocianina (Wilbanks y otros, *J. Biol.Chem.*1993, 268:1226-35), y similares.

65 Los compuestos de la invención pueden usarse como sondas, como herramientas para separar iones particulares de otros solutos, como sondas en microscopía, enzimología, química clínica, biología molecular y medicina. Los

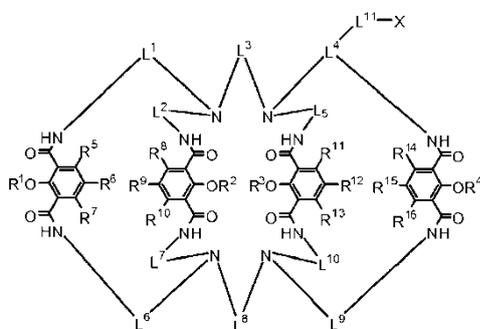
compuestos de la invención también son útiles como agentes terapéuticos y como agentes de diagnóstico en métodos de imagenología. Por otra parte, los compuestos de la invención son útiles como componentes de amplificadores ópticos de la luz, guías de ondas y similares. Además, los compuestos de la invención pueden incorporarse en tintas y colorantes, tales como los usados en la impresión de billetes y otros instrumentos.

En una modalidad, los compuestos de la invención muestran luminiscencia después de excitarlos de cualquier forma conocida en la técnica, incluyendo, por ejemplo, con luz o energía electroquímica (ver, por ejemplo, Kulmala y otros, *Analytica Chimica Acta* 1999, 386:1). La luminiscencia, en el caso de los compuestos quirales de la invención, puede estar polarizada circularmente (ver, por ejemplo, Riehl y otros, *Chem. Rev.* 1986, 86:1).

Los compuestos, sondas y métodos descritos en las siguientes secciones generalmente son representativos de las composiciones de la invención y los métodos en los que tales composiciones pueden usarse. La siguiente descripción pretende ser ilustrativa de aspectos y modalidades seleccionadas de la presente invención y no debería interpretarse como limitante del alcance de la presente invención.

Composiciones

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un compuesto que tiene una estructura de acuerdo con la Fórmula III:



(III)

en donde

L¹, L², L³, L⁴, L⁵, L⁶, L⁷, L⁸, L⁹ y L¹⁰ son miembros seleccionados independientemente de etileno sustituido o no sustituido;

R¹, R², R³ y R⁴ son miembros seleccionados independientemente de H, un grupo enzimáticamente lábil, un grupo hidrolíticamente lábil, un grupo metabólicamente lábil y una carga negativa única;

R⁵, R⁶, R⁷, R⁸, R⁹, R¹⁰, R¹¹, R¹², R¹³, R¹⁴, R¹⁵ y R¹⁶ son H;

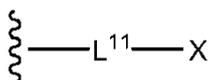
L¹¹ es heteroalquileo sustituido o no sustituido o alquileo sustituido o no sustituido; y

X es un miembro seleccionado de una amina, un ácido carboxílico, un maleimidilo, un tiazolidilo, un éster de NHS sustituido o no sustituido, un éster de NHS sulfonado y una porción succinimidilo.

Porción Funcional

Los compuestos de la invención se derivatizan con una porción funcional.

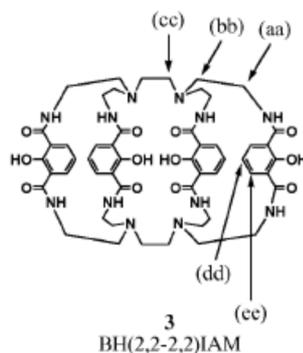
La porción funcional tiene la estructura:



en donde L¹¹ es heteroalquileo sustituido o no sustituido o alquileo sustituido o no sustituido; y X es un miembro seleccionado de una amina, un ácido carboxílico, un maleimidilo, un tiazolidilo, un éster de NHS sustituido o no sustituido, un éster de NHS sulfonado y una porción succinimidilo.

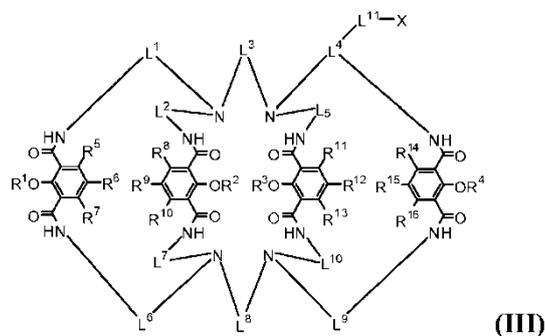
La porción funcional preferentemente se une, de manera que el ligando funcionalizado resultante será capaz de experimentar formación de complejos estables de iones metálicos. En una modalidad ilustrativa, el compuesto de la presente invención es el ligando macrocíclico **3** derivatizado con la porción funcional en la posición (aa). La Figura 2 muestra otros sitios adicionales posibles de derivatización para **3**

Figura 2



El compuesto tiene la siguiente estructura:

5



10

En una modalidad ilustrativa, en un compuesto descrito en la presente descripción, la composición también comprende un metal, formando así un complejo. En una modalidad ilustrativa, en un compuesto descrito en este párrafo, el metal es un lantánido. En una modalidad ilustrativa, en un compuesto descrito en este párrafo, el lantánido es un miembro seleccionado de Nd, Sm, Eu, Tb, Dy y Yb. En una modalidad ilustrativa, en un compuesto descrito en este párrafo, el lantánido es Tb. En una modalidad ilustrativa, en un compuesto descrito en este párrafo, el lantánido es Eu.

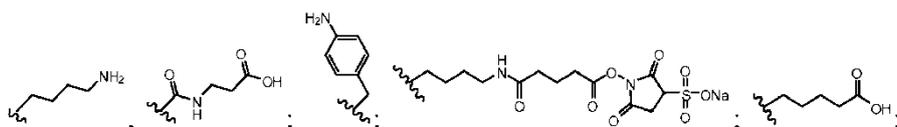
15

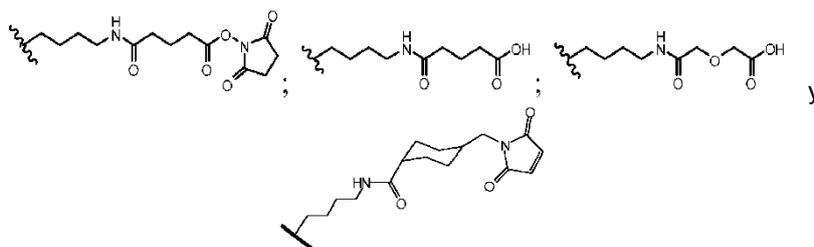
En una modalidad ilustrativa, el compuesto comprende dos porciones funcionales. Uno de estos grupos funcionales se une a L⁴ y el otro grupo funcional puede unirse a un miembro seleccionado de L¹, L² y L⁵. En otra modalidad ilustrativa, uno de estos grupos funcionales se une a L⁴ y el otro grupo funcional se une a un miembro seleccionado de L⁶, L⁷, L⁹ y L¹⁰. En otra modalidad ilustrativa, uno de estos grupos funcionales se une a L⁴ y el otro grupo funcional se une a un miembro seleccionado de L³ y L⁸. En una modalidad ilustrativa, en un compuesto descrito en este párrafo, la composición comprende también un metal, formando así un complejo. En una modalidad ilustrativa, en un compuesto descrito en este párrafo, el metal es un lantánido. En una modalidad ilustrativa, en un compuesto descrito en este párrafo, el lantánido es un miembro seleccionado de Nd, Sm, Eu, Tb, Dy y Yb. En una modalidad ilustrativa, en un compuesto descrito en este párrafo, el lantánido es Tb. En una modalidad ilustrativa, en un compuesto descrito en este párrafo, el lantánido es Eu.

25

L¹¹ es heteroalquileo sustituido o no sustituido o alquileo sustituido o no sustituido y X es un miembro seleccionado de una amina, un ácido carboxílico, un maleimidilo, un tiazolidilo, un éster de NHS sustituido o no sustituido, un éster de NHS sulfonado y una porción succinimidilo. En una modalidad ilustrativa, el compuesto de la Fórmula (III) L¹¹-X es un miembro seleccionado de

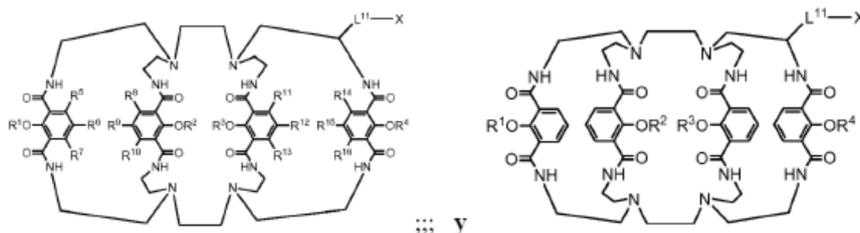
30





Los compuestos preferidos de la invención tienen la estructura:

5

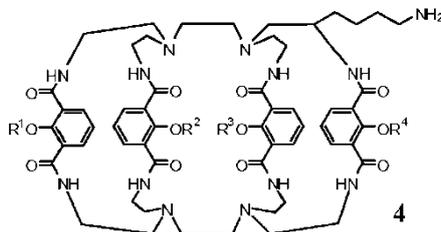


10

en donde L^{11} , X , R^5 , R^6 , R^7 , R^8 , R^9 , R^{10} , R^{11} , R^{12} , R^{13} , R^{14} , R^{15} y R^{16} son como se definen anteriormente. En otra modalidad ilustrativa, en un compuesto descrito en este párrafo, la composición comprende también un metal, formando así un complejo. En una modalidad ilustrativa, en un compuesto descrito en este párrafo, el metal es un lantánido. En una modalidad ilustrativa, en un compuesto descrito en este párrafo, el lantánido es Tb. En una modalidad ilustrativa, en un compuesto descrito en este párrafo, el lantánido es Eu.

15

Por ejemplo, la funcionalización del compuesto **3** en la posición (aa) (Figura 2) con un grupo $(CH_2)_4NH_2$ conduce al derivado macrocíclico **4**:



20

Grupos funcionales reactivos

25

La porción funcional incluye un grupo funcional reactivo, X , que puede usarse para unir covalentemente el agente formador de complejos a otra molécula. En otra modalidad ilustrativa, la otra molécula es una biomolécula. En otra modalidad ilustrativa, la otra molécula es un ligando de molécula pequeña, un péptido, una proteína, una enzima, un anticuerpo, un antígeno, un ácido nucleico, un carbohidrato, un lípido y una molécula farmacológicamente activa. Alternativamente, el grupo funcional reactivo puede usarse para enlazar el ligando a una nano partícula de cualquier tipo.

30

Los grupos funcionales reactivos y las clases de reacciones útiles para unir los compuestos descritos en la presente descripción son generalmente los que se conocen bien en la técnica de la química de bioconjugados. Las clases de reacciones actualmente favorecidas disponibles con grupos funcionales reactivos de la invención son las que proceden bajo condiciones relativamente suaves. Estas incluyen, pero sin limitar a, sustituciones nucleofílicas (p. ej., reacciones de aminas y alcoholes con acil haluros y ésteres activos), sustituciones electrofílicas (p. ej., reacciones de enamina) y adiciones a múltiples enlaces carbono-carbono y carbono-heteroátomo (p. ej., reacciones de Michael y reacciones de Diels-Alder). Estas y otras reacciones útiles se discuten, por ejemplo, en: March, *ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY*, 3ra Ed., John Wiley & Sons, Nueva York, 1985; Hermanson, *BIOCONJUGATE TECHNIQUES*, Academic Press, San Diego, 1996; y Feeney y otros, *MODIFICATION OF PROTEINS*; *Advances in Chemistry Series*, Vol. 198, American Chemical Society, Washington, D.C., 1982.

40

a) Aminas y grupos amino reactivos

En una modalidad, el grupo funcional reactivo, X , es un miembro seleccionado de aminas, tales como una amina primaria o secundaria, hidrazinas, hidrazidas, y sulfonilhidrazidas. Las aminas pueden estar, por ejemplo, aciladas, alquiladas u oxidadas. Los ejemplos no limitantes útiles de grupos amino reactivos incluyen ésteres de N-

hidroxisuccinimida (NHS), ésteres de sulfo-NHS, imidoésteres, isocianatos, isotiocianatos, acilhaluros, arilazidas, ésteres de p-nitrofenilo, aldehídos, cloruros de sulfonilo y grupos carboxilos.

5 Los ésteres de NHS y los ésteres de sulfo-NHS reaccionan preferencialmente con los grupos amino primarios (incluyendo los aromáticos) de la pareja de la reacción. Se conoce que los grupos imidazol de histidinas compiten con las aminas primarias de la reacción, pero los productos de reacción son inestables y se hidrolizan fácilmente. La reacción implica el ataque nucleofílico de una amina sobre el carboxilo ácido de un éster de NHS para formar una amida, liberando la N-hidroxisuccinimida.

10 Los imidoésteres son los reactivos acilantes más específicos para la reacción con los grupos amina de p. ej., una proteína. A un pH entre 7 y 10, los imidoésteres reaccionan sólo con aminas primarias. Las aminas primarias atacan nucleofílicamente los imidatos para producir un intermediario que se descompone a amidina a pH alto o a un nuevo imidato a pH bajo. El nuevo imidato puede reaccionar con otra amina primaria, entrecruzando por lo tanto dos grupos amino, un caso de un imidato putativamente monofuncional que reacciona bifuncionalmente. El producto principal de la
15 reacción con aminas primarias es una amidina que es una base más fuerte que la amina original. Por lo tanto se mantiene la carga positiva del grupo amino original. Como un resultado, los imidoésteres no afectan la carga total del conjugado.

20 Los isocianatos (e isotiocianatos) reaccionan con las aminas primarias de los componentes del conjugado para formar uniones estables. Sus reacciones con los grupos sulfhidrilo, imidazol, y tirosilo dan productos relativamente inestables.

Las acilazidas se usan, además, como reactivos específicos de amina en los que las aminas nucleofílicas de la pareja de la reacción atacan los grupos carboxilo ácidos bajo condiciones ligeramente alcalinas, p. ej. pH 8.5.

25 Los arilhaluros tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno reaccionan preferencialmente con los grupos amino y los grupos fenólicos de tirosina de los componentes del conjugado, pero también con sus grupos sulfhidrilo e imidazol.

Los ésteres de p-nitrofenilo de ácidos carboxílicos también son grupos amino reactivos útiles. Aunque la especificidad del reactivo no es muy alta, los grupos α - y ϵ -amino parecen reaccionar más rápidamente.

30 Los aldehídos reaccionan con las aminas primarias de los componentes del conjugado (p. ej., grupo ϵ -amino de residuos de lisina). Aunque inestables, las bases de Schiff se forman tras la reacción de los grupos amino de proteínas con el aldehído. Las bases de Schiff, sin embargo, son estables, cuando se conjugan con otro doble enlace. La interacción resonante de ambos doble enlaces evita la hidrólisis del enlace de Schiff. Además, las aminas a altas concentraciones locales pueden atacar el doble enlace etilénico para formar un producto estable de adición de Michael. Alternativamente, un enlace estable puede formarse por aminación reductiva.

40 Los cloruros sulfonilos aromáticos reaccionan con una variedad de sitios de los componentes del conjugado, pero la reacción con los grupos amino es la más importante, lo que da como resultado un enlace sulfonamida estable.

Los grupos carboxilo libres reaccionan con carbodiimidas, solubles tanto en agua como en solventes orgánicos, formando pseudoureas que pueden acoplarse después a aminas disponibles rindiendo un enlace amina. Yamada y otros, *Biochemistry* 1981, 20:4836-4842, p. ej., enseña cómo modificar una proteína con carbodiimidas.

45 b) Maleimidas

Las maleimidas reaccionan preferencialmente con el grupo sulfhidrilo de los componentes del conjugado para formar enlaces tioéter estables. También reaccionan a una tasa mucho más lenta con grupos amino primarios y los grupos imidazol de histidinas. Sin embargo, a pH 7 el grupo maleimida puede considerarse un grupo específico de sulfhidrilo, ya que a este pH la tasa de reacción de tioles simples es 1000 veces mayor que la de la amina correspondiente.

50 c) Otros grupos funcionales reactivos

Otros grupos funcionales reactivos ilustrativos incluyen:

55 (a) grupos de ácido carboxílico.

d) Grupos funcionales reactivos con reactividades no específicas

60 Además del uso de las porciones reactivas específicas de sitio, la presente invención contempla el uso de grupos funcionales reactivos no específicos para enlazar un compuesto descrito en la presente descripción a una porción objetivo. Los grupos no específicos incluyen grupos fotoactivables, por ejemplo. Los grupos fotoactivables idealmente son inertes en la oscuridad y se convierten en especies reactivas en presencia de luz.

65 Está dentro de las capacidades de un experto en la técnica seleccionar un grupo funcional reactivo, de acuerdo con la pareja de la reacción. Como un ejemplo, un éster activo, tal como un éster de NHS será útil para etiquetar una

proteína a través de los residuos de lisina. Los grupos reactivos sulfhidrilos, tales como maleimidas pueden usarse para etiquetar proteínas a través de residuos de aminoácidos que portan un grupo SH (p. ej., cisteína). Los anticuerpos pueden etiquetarse primero mediante la oxidación de sus porciones carbohidrato (p. ej., con peryodato) y mediante la reacción de los grupos aldehídos resultantes con un ligando que contiene hidrazina.

5

Las combinaciones ilustrativas adicionales de los grupos funcionales reactivos y en una porción objetivo (o polímero o enlazador) se exponen en la Tabla 2, incluyendo los grupos funcionales reactivos de la presente invención y los grupos funcionales reactivos comparativos.

10 Tabla 2

| Funcionalidad química 1 | Funcionalidad química 2 | Enlace |
|-------------------------|--------------------------|------------------------------|
| Hidroxi | Carboxi | Ester |
| | Hidroxi | Carbonato |
| | Amina | Carbamato |
| | SO ₃ | Sulfato |
| | PO ₃ | Fosfato |
| | Carboxi | Aciloxialquilo |
| | Cetona | Cetal |
| | Aldehído | Acetal |
| | Hidroxi | Anhídrido |
| | Mercapto | Mercapto |
| Carboxi | | Aciloxialquilo |
| | | Tioéter |
| Carboxi | | Tioéster |
| Carboxi | | Amino amida |
| Mercapto | | Tioéster |
| Carboxi | | Éster de aciloxialquilo |
| Carboxi | | Amida de aciloxialquilo |
| Amino | | Aciloxialcoxi carbonilo |
| Carboxi | | Anhídrido |
| Carboxi | | N-acilamida |
| Hidroxi | | Ester |
| Hidroxi | | Éster de hidroximetil cetona |
| Hidroxi | | Alcoxicarbonil oxialquilo |
| Amino | | Carboxi |
| | Carboxi | Aciloxialquilamida |
| | Amino | Urea |
| | Carboxi | Amida |
| | Carboxi | Aciloxialcoxicarbonilo |
| | Amida | Base de N-Mannich |
| | Carboxi | Carbamato de aciloxialquilo |
| | Éster de oxígeno fosfato | Hidroxi |
| Amina | | Fosforoamidato |
| Mercapto | | Éster de tiofosfato |
| Cetona | Carboxi | Éster enólico |

| Funcionalidad química 1 | Funcionalidad química 2 | Enlace |
|-------------------------|-------------------------|-------------------------------|
| Sulfonamida | Carboxi | Sulfonamida de aciloxialquilo |
| | Ester | N-sulfonil- imidato |

Un experto en la técnica apreciará fácilmente que muchos de estos enlaces pueden producirse en una variedad de formas y mediante el uso de una variedad de condiciones. Para la preparación de ésteres, ver, *p. ej.*, March *supra* en 1157; para tioésteres, ver, March, *supra* en 362-363, 491, 720-722, 829, 941, y 1172; para carbonatos, ver, March, *supra* en 346-347; para carbamatos, ver, March, *supra* en 1156-57; para amidas, ver, March *supra* en 1152; para ureas y tioureas, ver, March *supra* en 1174; para acetales y cetales, ver, Greene y otros, *supra* 178-210 y March *supra* en 1146; para derivados de aciloxialquilo, ver, PRODRUGS:TOPICAL AND OCULAR DRUG DELIVERY, K. B. Sloan, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1992; para ésteres enólicos, ver, March *supra* en 1160; para N-sulfonilimidatos, ver, Bundgaard y otros, J. Med. Chem., 31:2066 (1988); para anhídridos, ver, March *supra* en 355-56, 636-37, 990-91, y 1154; para N-acilamidas, ver, March *supra* en 379; para bases de N-Mannich, ver, March *supra* en 800-02, y 828; para éteres de hidroximetilcetona, ver, Petracek y otros, Annals NY Acad. Sci., 507:353-54 (1987); para disulfuros, ver, March *supra* en 1160; y para ésteres de fosfonato y fosfonamidatos.

Los grupos funcionales reactivos pueden escogerse de manera que los mismos no participen en, o interfieran con, las reacciones necesarias para ensamblar el análogo de ligando reactivo. Alternativamente, un grupo funcional reactivo se puede proteger de participar en la reacción por la presencia de un grupo protector. Los expertos en la técnica comprenderán cómo proteger un grupo funcional particular de la interferencia con un conjunto escogido de condiciones de reacción. Para ejemplos de grupos protectores útiles, ver Greene y otros, PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS, John Wiley & Sons, Nueva York, 1991.

Generalmente, antes de formar el enlace entre el compuesto de la invención y el agente objetivo (u otro), y opcionalmente, el grupo enlazador, se activará al menos una de las funcionalidades químicas. Un experto en la técnica apreciará que una variedad de funcionalidades químicas, incluyendo los grupos hidroxilo, amino, y carboxi, pueden activarse mediante el uso de una variedad de métodos y condiciones estándar. Por ejemplo, un grupo hidroxilo del ligando (o agente objetivo) puede activarse mediante el tratamiento con fosgeno para formar el cloroformato correspondiente, o p-nitrofenilcloroformato para formar el carbonato correspondiente.

En una modalidad ilustrativa, la invención hace uso de un agente objetivo que incluye una funcionalidad carboxilo. Los grupos carboxilo pueden activarse, por ejemplo, mediante la conversión al haluro de acilo o éster activo correspondiente. Esta reacción puede realizarse bajo una variedad de condiciones como las ilustradas en March, *supra* páginas 388-89. En una modalidad ilustrativa, el haluro de acilo se prepara mediante la reacción del grupo que contiene carboxilo con cloruro de oxalilo. El agente activo se combina con un ligando o una combinación de ligando-brazo enlazador para formar un conjugado de la invención. Los expertos en la técnica apreciarán que el uso de agentes objetivo que contienen carboxilo es simplemente ilustrativo, y que los agentes que tienen muchos otros grupos funcionales pueden conjugarse a los ligandos de la invención.

Porciones objetivo

En una modalidad ilustrativa, la porción objetivo es una biomolécula. Las porciones objetivo ilustrativas incluyen ligandos de moléculas pequeñas, lípidos, péptidos lineales y cíclicos, polipéptidos (*p. ej.*, EPO, insulina etcétera) y proteínas, tales como enzimas y receptores. Otras porciones objetivo incluyen anticuerpos y fragmentos de anticuerpos (*p. ej.*, los generados para reconocer ligandos de moléculas pequeñas y de receptores), antígenos, ácidos nucleicos (*p. ej.*, ARN y ADNc), porciones de carbohidratos (*p. ej.*, polisacáridos), y moléculas farmacológicamente activas, tales como toxinas, fármacos para uso farmacéutico y fármacos de abuso (*p. ej.* esteroides). Porciones objetivo adicionales se seleccionan de soportes sólidos y superficies poliméricas (*p. ej.*, perlas poliméricas y depósitos plásticos de muestras, tales como placas plásticas con pocillos), láminas, fibras y membranas. Las porciones objetivo también incluyen partículas (*p. ej.*, nanopartículas) y vehículos de suministro de fármacos.

En una modalidad, la porción objetivo incluye al menos una unidad de un compuesto macrocíclico. En una modalidad ilustrativa, el compuesto macrocíclico de la porción objetivo tiene una estructura que es un compuesto descrito en la presente descripción. En otra modalidad ilustrativa, el compuesto macrocíclico de la porción objetivo tiene una estructura de acuerdo con la Fórmula (III). En otra modalidad ilustrativa, el compuesto de la invención tiene una estructura dendrímica y abarca varios ligandos que tienen una estructura de acuerdo con un compuesto descrito en la presente descripción. En otra modalidad ilustrativa, el compuesto de la invención tiene una estructura dendrímica y abarca varios ligandos que tienen una estructura de acuerdo con la Fórmula (III). En una modalidad ilustrativa adicional, de acuerdo con este aspecto, un complejo basado en tal dendrímico incluye al menos dos iones metálicos.

En una modalidad ilustrativa, la porción objetivo se sustituye con un grupo modificador de luminiscencia que permite la transferencia de energía de luminiscencia entre un complejo de la invención y el grupo modificador de luminiscencia cuando el complejo se excita.

En modalidades adicionales, los compuestos de la invención pueden usarse en cualquier formato de ensayo propuesto para la detección de un lípido en una muestra (p. ej., en la sangre de un paciente). Un complejo ilustrativo de acuerdo con esta modalidad, incluye una porción objetivo, que es una proteína que contiene un motivo de reconocimiento de lípidos. Las proteínas ilustrativas de unión a lípidos incluyen las que se unen a fosfatidilinositol, fosfatidilinositol fosfato u otros lípidos biológicos.

En otro ejemplo, la porción objetivo es un anticuerpo que reconoce y se une a un analito. En un sistema de ensayo ilustrativo un analito puede detectarse en una muestra primero mediante la incubación de la muestra con un complejo de la invención, en donde el complejo se une covalentemente a un anticuerpo que incluye un sitio de unión para el analito. A la mezcla puede añadirse un exceso de moléculas sonda que se unen al mismo sitio de unión del analito e incluye un grupo modificador de luminiscencia (p. ej. un aceptor). La presencia y concentración de analito en la muestra se indica mediante la luminiscencia de la mezcla de ensayo. Por ejemplo, si la concentración de analito en la muestra es alta, muchos de los sitios de unión de anticuerpos se ocuparán con el analito y estarán disponibles menos sitios de unión para la molécula sonda. En una modalidad ilustrativa, el analito es una molécula lipídica.

En otra modalidad preferida, la porción objetivo es una porción de fármaco. Las porciones de fármaco pueden ser agentes ya aceptados para uso clínico o pueden ser fármacos cuyo uso es experimental, o cuya actividad o mecanismo de acción está bajo investigación. En otra modalidad preferida, la porción objetivo es un fármaco de abuso. Las porciones de fármaco pueden tener una acción probada en un estado dado de la enfermedad o sólo puede hipotetizarse que muestran una acción deseable en un estado dado de la enfermedad. En una modalidad preferida, las porciones de fármaco son compuestos que se tamizan para su capacidad de interactuar con un analito de elección. Como tal, las porciones de fármacos que son útiles como porciones objetivo en la invención presente incluyen fármacos de una amplia variedad de clases de fármacos que tienen una variedad de actividades farmacológicas.

Las clases de agentes útiles incluyen, por ejemplo, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE). Los AINE pueden seleccionarse, por ejemplo, de las siguientes categorías:(p. ej., derivados de ácido propiónico, derivados de ácido acético, derivados de ácido fenámico, derivados de ácido bifenilcarboxílico y los oxicam); fármacos antiinflamatorios esteroideos que incluyen hidrocortisona y similares; fármacos antihistamínicos (p. ej., clorfeniramina, triprolidina); fármacos antitusígenos (p. ej., dextrometorfan, codeína, carmifen y carbetapentano); fármacos antiprurícticos (p. ej., metidilizina y trimeprizina); fármacos anticolinérgicos (p. ej., escopolamina, atropina, homatropina, levodopa); fármacos antieméticos y antináuseas (p. ej., ciclizina, meclizina, clorpromazina, buclizina); fármacos para anorexia (p. ej., benzfetamina, fentermina, clorfentermina, fenfluramina); fármacos estimulantes del sistema nervioso central (p. ej., anfetamina, metanfetamina, dextroanfetamina y metilfenidato); fármacos antiarrítmicos (p. ej., propranolol, procainamida, disopiramida, quinidina, encainida); fármacos bloqueadores beta adrenérgicos (p. ej., metoprolol, acebutolol, betaxolol, labetalol y timolol); fármacos cardiotónicos (p. ej., milrinona, amrinona y dobutamina); fármacos antihipertensores (p. ej., enalapril, clonidina, hidralazina, minoxidil, guanadrel, guanetidina); fármacos diuréticos (p. ej., amilorida e hidroclorotiazida); fármacos vasodilatadores (p. ej., diltazem, amiodarona, isosuprina, nilidrina, tolazolina y verapamilo); fármacos vasoconstrictores (p. ej., dihidroergotamina, ergotamina y metilsergida); fármacos antiúlceras (p. ej., ranitidina y cimetidina); fármacos anestésicos (p. ej., lidocaína, bupivacaína, clorprocaína, dibucaína); fármacos antidepresores (p. ej., imipramina, desipramina, amitriptilina, nortriptilina); fármacos tranquilizantes y sedantes (p. e., clordiazepóxido, benacitizina, benzquinamida, flurazepam, hidroxizina, loxapina y promazina); fármacos antipsicóticos (p. ej., clorprotixeno, flufenazina, haloperidol, molindona, tioridazina y trifluoperazina); fármacos antimicrobianos (antibacterianos, antifúngicos, antiprotozoarios y antivirales).

Los fármacos antimicrobianos que se prefieren para la incorporación en la presente composición incluyen, por ejemplo, sales farmacéuticamente aceptables de fármacos de beta lactámicos, fármacos de quinolona, ciprofloxacina, norfloxacina, tetraciclina, eritromicina, amikacina, triclosán, doxiciclina, capreomicina, clorhexidina, clortetraciclina, oxitetraciclina, clindamicina, etambutol, isotionato de hexamidina, metronidazol, pentamidina, gentamicina, kanamicina, lineomicina, metaciclina, metenammina, minociclina, neomicina, netilmicina, paromomicina, estreptomina, tobramicina, miconazol y amfanadina.

Otras porciones de fármacos de uso en la práctica de la presente invención incluyen fármacos antineoplásicos (p. ej., antiandrógenos (p. ej., leuprolida o flutamida), agentes citocidas (p. ej., adriamicina, doxorubicina, taxol, ciclofosfamida, busulfan, cisplatino, interferón-2-alfa) antiestrógenos (p. ej., tamoxifeno), antimetabolitos (p. ej., fluorouracilo, metotrexato, mercaptopurina, tioguanina).

La porción objetivo también puede comprender hormonas (p. ej., medroxiprogesterona, estradiol, leuprolida, megestrol, octreótido o somatostatina); fármacos relajantes musculares (p. ej., cinnamedrina, ciclobenzaprina, flavoxato, orfenadrina, papaverina, mebeverina, idaverina, ritodrina, defenoxilato, dantroleno y azumolen); fármacos antiespasmódicos; fármacos activos para huesos (p. ej., compuestos fármacos de difosfonato y fosfonoalquilfosfinato); fármacos moduladores endocrinos (p. ej., contraceptivos (p. ej., etinodiol, etinilestradiol, noretindrona, mestranol, desogestrel, medroxiprogesterona), moduladores de diabetes (p. ej., gliburida o clorpropamida), anabólicos, tales como testolactona o estanozolol, andrógenos (p. ej., metiltestosterona, testosterona o fluoximesterona), antidiuréticos (p. ej., desmopresina) y calcitoninas).

En la presente invención también se usan estrógenos (p. ej., dietilestilbesterol), glucocorticoides (p. ej., triamcinolona, betametasona, etcétera) y progestágenos, tales como noretindrona, etinodiol, noretindrona, levonorgestrel; agentes tiroideos (p. ej., liotironina o levotiroxina) o agentes antitiroideos (p. ej., metimazol); fármacos antihiperprolactinémicos (p. ej., cabergolina); supresores hormonales (p. ej., danazol o goserelina), oxitócicos (p. ej., metilergonovina u oxitocina) y prostaglandinas, tales como mioprostol, alprostadil o dinoprostona, también pueden emplearse.

Otras porciones objetivo útiles incluyen fármacos inmunomoduladores (p. ej., antihistaminas, estabilizadores de mastocitos, tales como lodoxamida y/o cromolina, esteroides (p. ej., triamcinolona, beclometazona, cortisona, dexametasona, prednisolona, metilprednisolona, beclometazona, o clobetasol), antagonistas H₂ de histamina (p. ej., famotidina, cimetidina, ranitidina), inmunosupresores (p. ej., azatioprina, ciclosporina), etcétera. También pueden usarse grupos con actividad antiinflamatoria, tales como sulindac, etodolac, ketoprofeno y ketorolaco. Otros fármacos para el uso junto con la presente invención serán evidentes para los expertos en la técnica.

Las moléculas enumeradas anteriormente y otras moléculas, pueden unirse a los compuestos de la invención, a sustratos sólidos y similares mediante métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. Puede encontrarse una amplia orientación en la literatura dedicada a, por ejemplo, los campos de la química de bioconjugados y el suministro de fármacos. Por ejemplo, un experto, enfrentado a un fármaco que comprende una amina disponible será capaz de escoger de entre una variedad de reacciones de derivatización de aminas, localizar una pareja adecuadamente funcionalizada (p. ej., un tiol terminado en ácido carboxílico) para la capa orgánica y hacer reaccionar las parejas bajo condiciones escogidas para efectuar el acoplamiento deseado (p. ej., agentes de deshidratación, p. ej., dicitohexilcarbodiimida). Ver, por ejemplo, MODIFICATION OF PROTEINS: FOOD, NUTRITIONAL, AND PHARMACOLOGICAL ASPECTS, Feeney y otros, Eds., American Chemical Society, Washington, D.C., 1982, páginas 370-387; POLYMERIC DRUGS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, Dunn y otros, Eds., American Chemical Society, Washington, D.C., 1991.

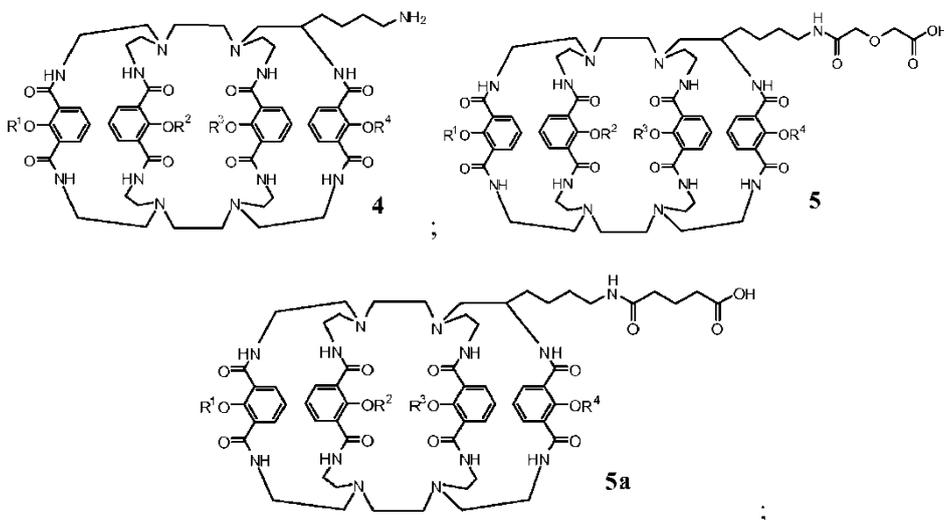
Enlazador L¹¹

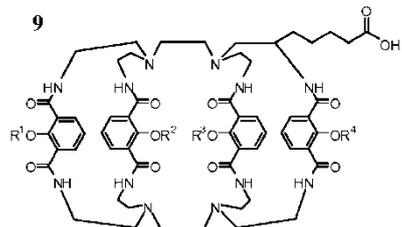
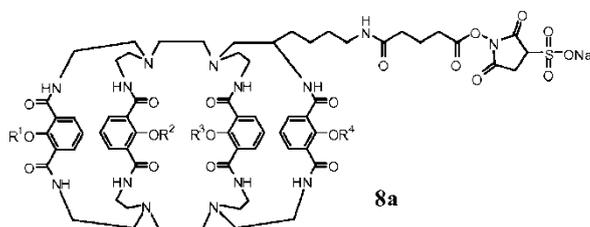
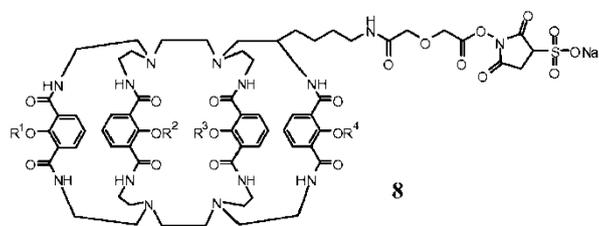
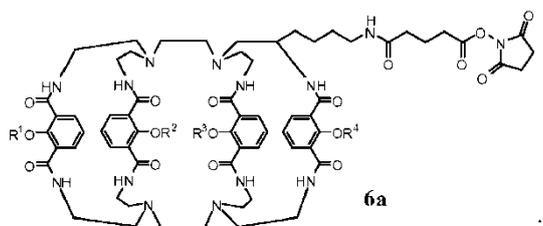
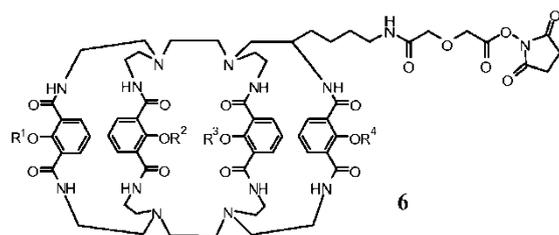
En una modalidad preferida, el enlazador L¹¹ de la porción funcional es lo suficientemente largo para evitar las reacciones secundarias durante la síntesis (p. ej. reacciones intramoleculares, tales como formación de enlaces peptídicos intramoleculares), para permitir el acoplamiento del compuesto o complejo de la invención a una porción objetivo y para permitir la porción objetivo para cumplir su función deseada. Los enlazadores útiles incluyen aquellos con aproximadamente 2 a aproximadamente 50 átomos lineales, preferentemente aproximadamente 4 a aproximadamente 20 átomos lineales.

En otra modalidad ilustrativa, la porción del enlazador L¹¹ o la porción objetivo incluyen un poliéter, tal como polietilenglicol (PEG) y derivados de este. En un ejemplo, el poliéter tiene un peso molecular entre aproximadamente 50 a aproximadamente 10 000 dalton.

Compuestos Ilustrativos

Los compuestos ilustrativos de la invención incluyen:





.....

5
10
15
20
25

en donde R^1 , R^2 , R^3 y R^4 son como se definieron anteriormente. En una modalidad ilustrativa, uno de estos compuestos ilustrativos se quela a un metal, formando así un complejo. En una modalidad ilustrativa, en un compuesto descrito en este párrafo, el metal es un lantánido. En una modalidad ilustrativa, el lantánido es un miembro seleccionado de Nd, Sm, Eu, Tb, Dy y Yb. En una modalidad ilustrativa, el lantánido es Tb. En una modalidad ilustrativa, en un compuesto descrito en este párrafo, el lantánido es Eu. En una modalidad ilustrativa, el compuesto es 4 y el lantánido es un miembro seleccionado de Nd, Sm, Eu, Tb, Dy y Yb. En una modalidad ilustrativa, el compuesto es 4 y el lantánido es Tb. En una modalidad ilustrativa, el compuesto es 4 y el lantánido es Eu. En una modalidad ilustrativa, el compuesto es 5a y el lantánido es un miembro seleccionado de Nd, Sm, Eu, Tb, Dy y Yb. En una modalidad ilustrativa, el compuesto es 5a y el lantánido es Tb. En una modalidad ilustrativa, el compuesto es 5a y el lantánido es Eu.

Síntesis

30

Los compuestos y complejos de la invención se sintetizan mediante una combinación adecuada de métodos sintéticos generalmente bien conocidos. Las técnicas útiles para sintetizar los compuestos de la invención son evidentes y accesibles para los expertos en la técnica relevante. La descripción más abajo se ofrece para ilustrar algunos de los diversos métodos disponibles para el uso en el ensamblaje de los compuestos de la invención, no pretende limitar el alcance de las reacciones o secuencias de reacción que son útiles para preparar los compuestos de la presente invención.

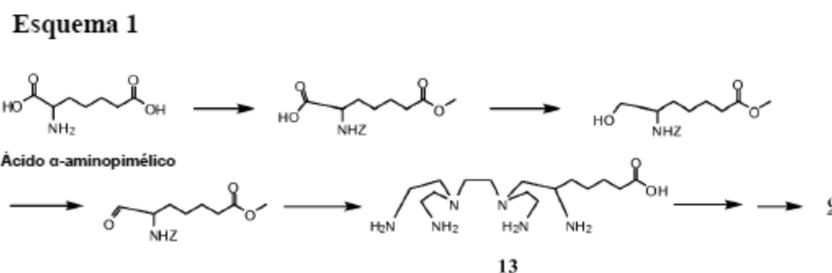
Los compuestos de la invención pueden prepararse como un único estereoisómero o como una mezcla de estereoisómeros. En una modalidad preferida, los compuestos se preparan sustancialmente como un único isómero. Los compuestos isoméricamente puros se preparan mediante el uso de intermediarios sintéticos que son isoméricamente puros en combinación con reacciones ya sea que dejan la estereoquímica en un centro quiral sin cambiar o que resultan en su inversión completa. Alternativamente, el producto final o los intermediarios a lo largo de la

5 ruta sintética pueden resolverse en un único estereoisómero. Las técnicas para invertir o dejar sin cambiar un estereocentro particular, y aquellas para resolver mezclas de estereoisómeros se conocen bien en la técnica y está dentro de la capacidad de un experto en la técnica escoger un método adecuado para una situación particular. Ver, generalmente, Furniss y otros(eds.), VOGEL'S ENCYCLOPEDIA OF PRACTICAL ORGANIC CHEMISTRY 5TH ED., Longman Scientific and Technical Ltd., Essex, 1991, páginas 809-816; y Heller, Acc.Chem. Res. 23:128 (1990).

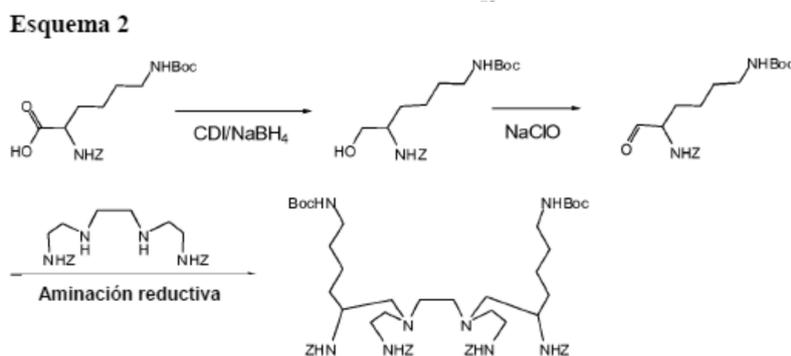
10 En una modalidad, los compuestos de la invención se sintetizan mediante la reacción de una molécula de caperuza con bloques de construcción apropiados, tal como ácido hidroxí isoftálico. El intermediario resultante se hace reaccionar después con una segunda molécula de caperuza, preferencialmente que contiene una porción funcional. Una ruta sintética ilustrativa se explica en la sección de los Ejemplos.

Unión a (aa) en la Figura 2

15 La síntesis de moléculas de caperuza ilustrativas, que contienen un grupo funcional, se describe más abajo. El compuesto **13** puede prepararse siguiendo la ruta sintética presentada en el Esquema 1. El compuesto **13** puede transformarse después en el compuesto **9**, mediante el uso del enfoque sintético descrito en los Ejemplos 4, 5, 6 y 7.



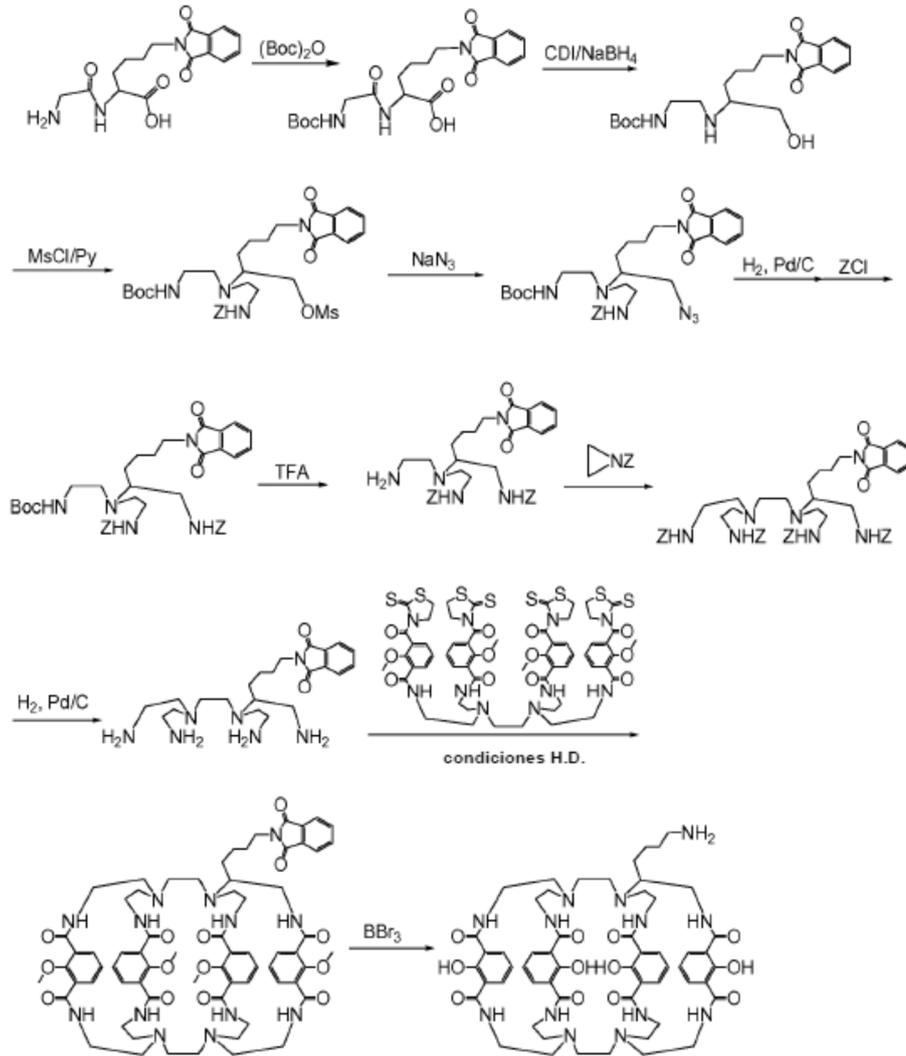
20 Múltiples grupos funcionales pueden unirse de acuerdo con la descripción ilustrativa proporcionada en el esquema siguiente. Otros métodos para unir diferentes grupos funcionales pueden producirse de acuerdo con los métodos conocidos por un experto en la técnica.



25 Unión a (bb) en la Figura 2

El esquema 3 describe un método para sintetizar un compuesto comparativo.

Esquema Comparativo 3

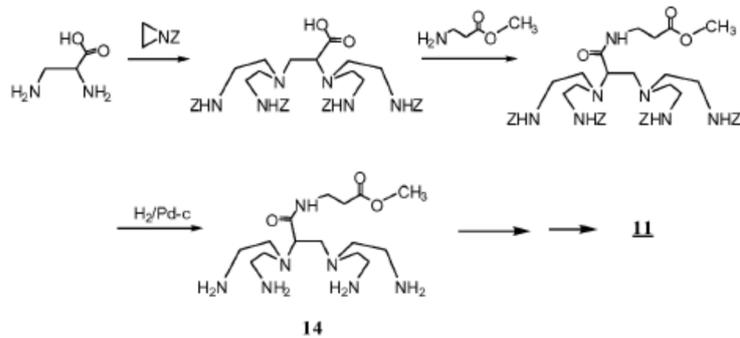


Unión a (cc) en la Figura 2

5

El esquema 4 describe un método para sintetizar el compuesto comparativo 11.

Esquema Comparativo 4

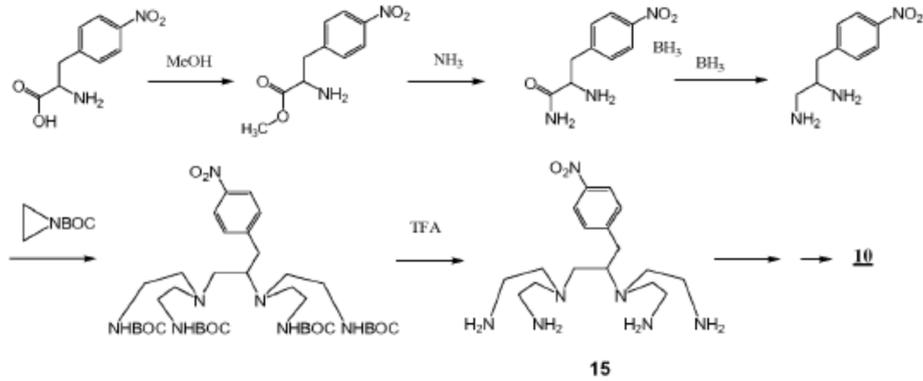


14

10

El esquema 5 describe un método para sintetizar el compuesto comparativo 10.

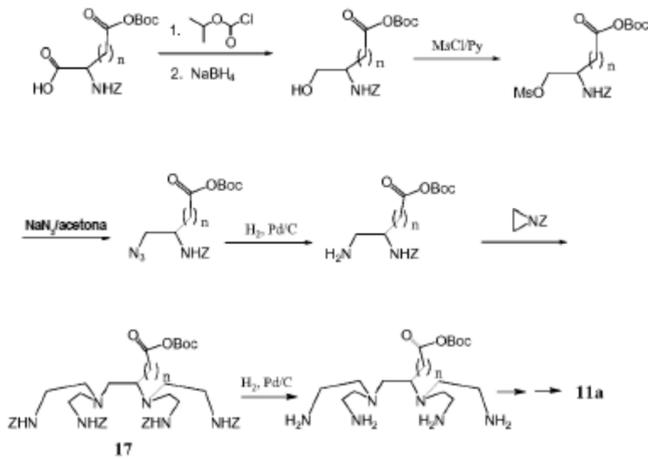
Esquema Comparativo 5



5 El compuesto comparativo **15** puede prepararse mediante el uso del procedimiento descrito en el Esquema 5. Posteriormente, el compuesto **15** puede transformarse en el compuesto comparativo **10**, mediante el uso de las etapas sintéticas descritas en los Ejemplos 4, 5, 6 y 7 además de una etapa sintética útil para la reducción del grupo nitro.

El esquema comparativo 6 describe un método para sintetizar el compuesto comparativo **11a**.

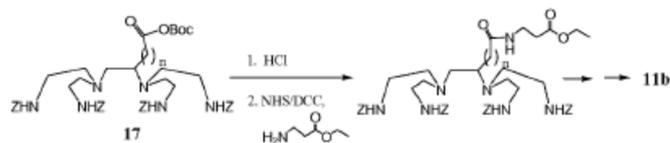
Esquema Comparativo 6



10

El esquema 7 describe un método para sintetizar el compuesto comparativo **11b**.

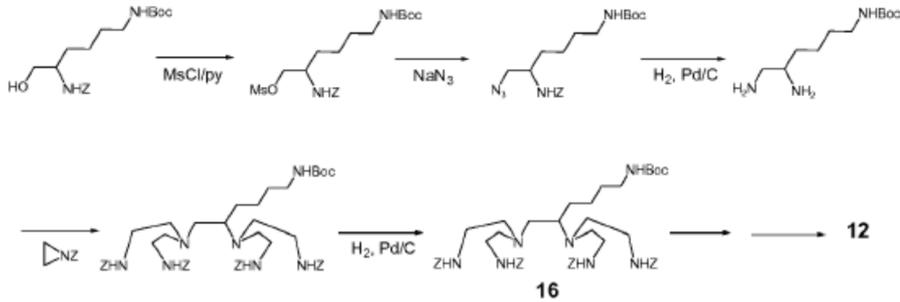
Esquema Comparativo 7



15

El esquema 8 describe un método para sintetizar el compuesto comparativo **12**.

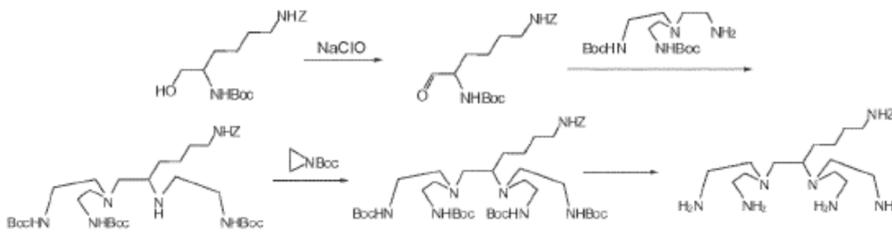
Esquema Comparativo 8



5 El compuesto **16** puede sintetizarse mediante el uso del procedimiento descrito en el Esquema 6 y puede usarse como el material de partida para sintetizar el compuesto **12** siguiendo las etapas sintéticas explicadas en los Ejemplos 4, 5, 6 y 7.

El esquema 9 describe otro método para sintetizar un compuesto comparativo que es similar al compuesto **16**, pero usa un esquema de protección de amina diferente.

Esquema 9

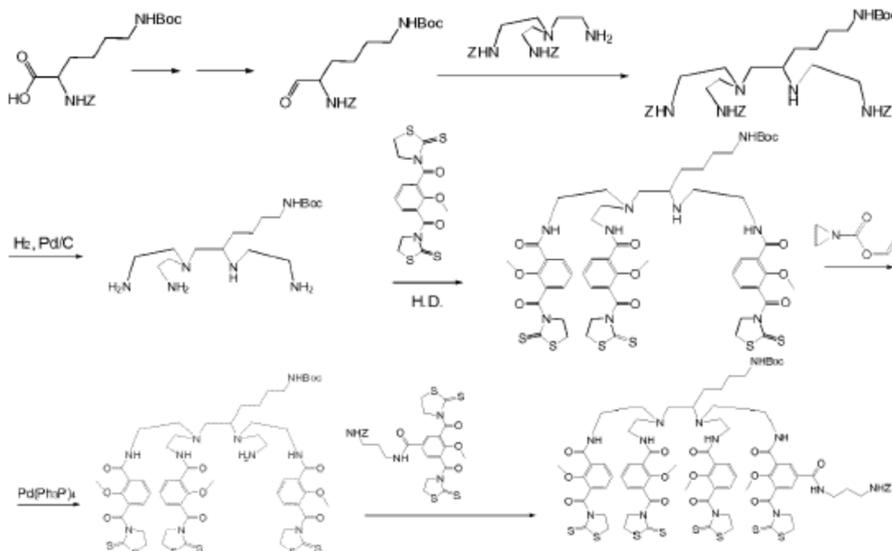


10

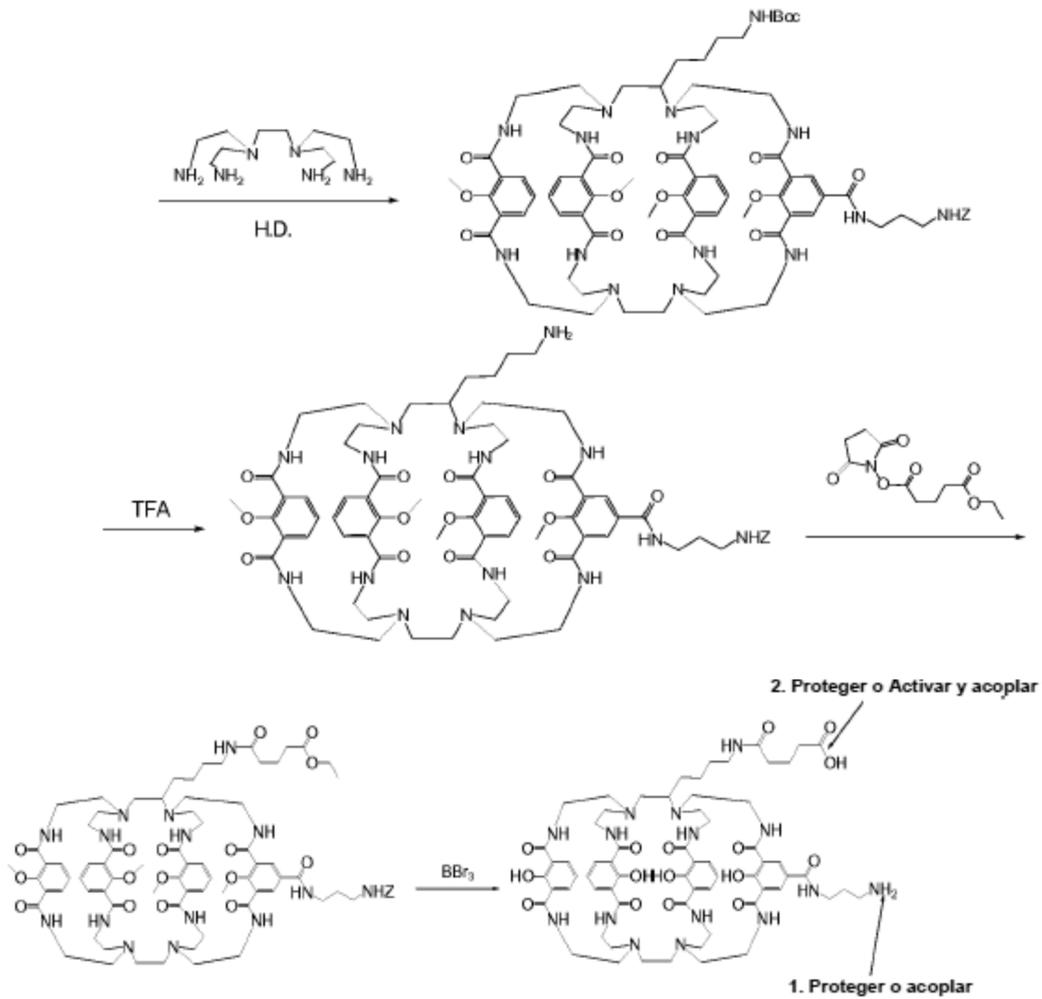
Unión a (dd) en la Figura 2

15 El esquema 10 describe un método para sintetizar un compuesto comparativo con una porción funcional unida a la posición (dd). Mientras que este esquema muestra la síntesis de un agente formador de complejos con una porción funcional tanto en la posición (cc) como la (dd), un agente formador de complejos con una porción funcional única en la posición (dd) (o una porción funcional adicional en otra posición) puede sintetizarse mediante el uso de una o más de las síntesis descritas en la presente descripción.

Esquema Comparativo 10



20



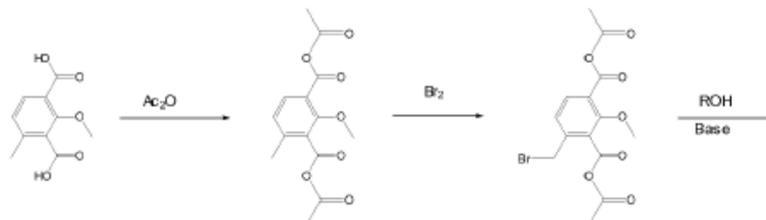
Unión a (ee) en la Figura 2

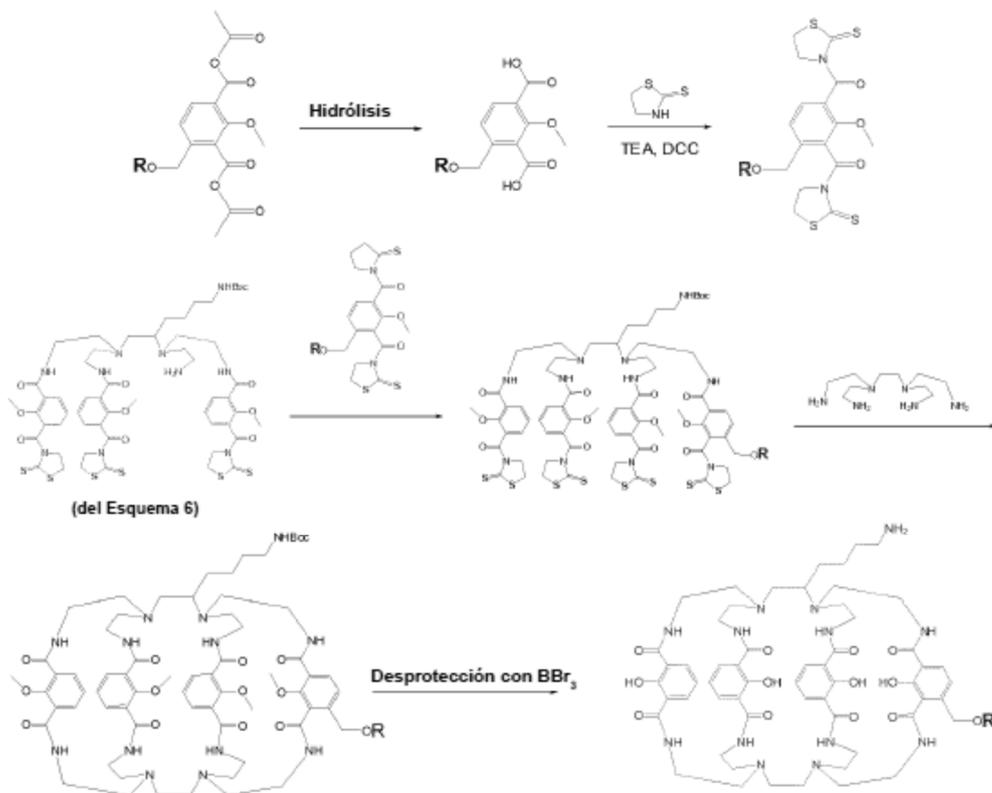
5

El esquema 11 describe un método para sintetizar un compuesto comparativo con una porción funcional unida a la posición (ee). Mientras que este esquema muestra la síntesis de un agente formador de complejos con una porción funcional tanto en la posición (cc) como en la (ee), un agente formador de complejos con una porción funcional única en la posición (ee) (o una porción funcional adicional en otra posición) puede sintetizarse mediante el uso de una o más de las síntesis descritas en la presente descripción.

10

Esquema Comparativo 11





Los ejemplos adicionales para la síntesis de estas moléculas pueden encontrarse en la sección de Ejemplos.

5

Una vez que el agente formador de complejos se forma y se purifica, el complejo metálico se sintetiza mediante cualquiera de una amplia variedad de métodos reconocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, mediante la incubación de una sal del ligando con una sal metálica, tal como una sal de lantánido (p. ej., trihaluro de lantánido, triacetato de lantánido). La reacción del agente formador de complejos con el ión metálico se lleva a cabo ya sea antes o después de acoplar el agente formador de complejos a una porción objetivo para generar un complejo de la invención.

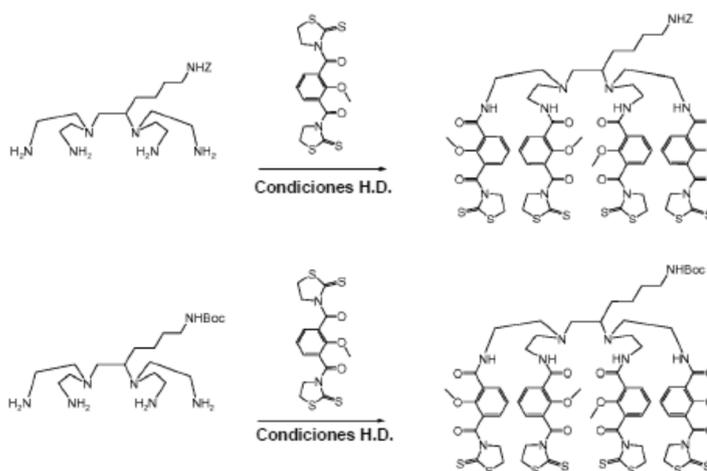
10

Unión de una primera porción de caperuza

El esquema comparativo 12 describe un método ilustrativo para sintetizar una molécula de caperuza unida a una porción ftalamidilo.

15

Esquema Comparativo 12

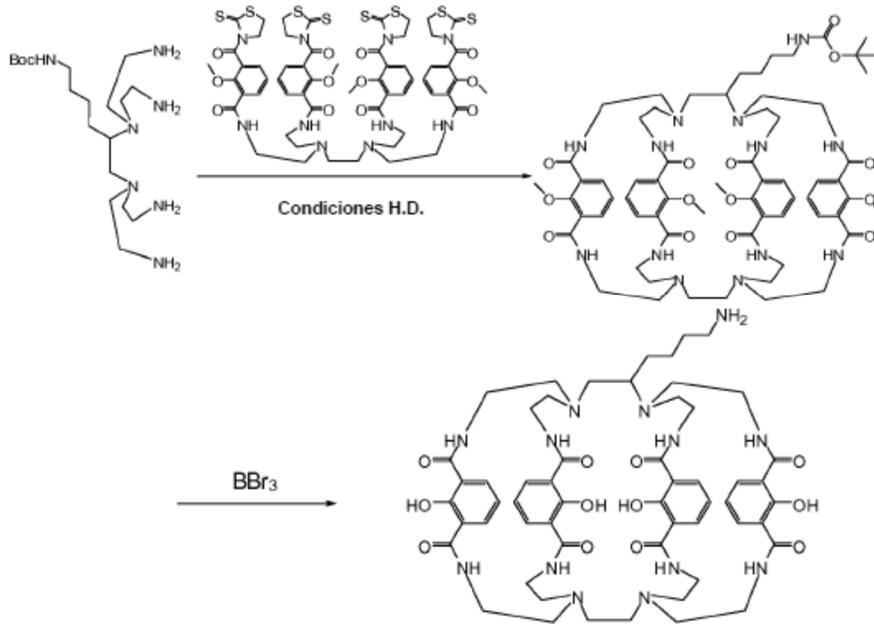


Unión de una segunda porción de caperuza

Una segunda porción de caperuza puede añadirse a una molécula descrita en la presente descripción de acuerdo con el Esquema comparativo 13.

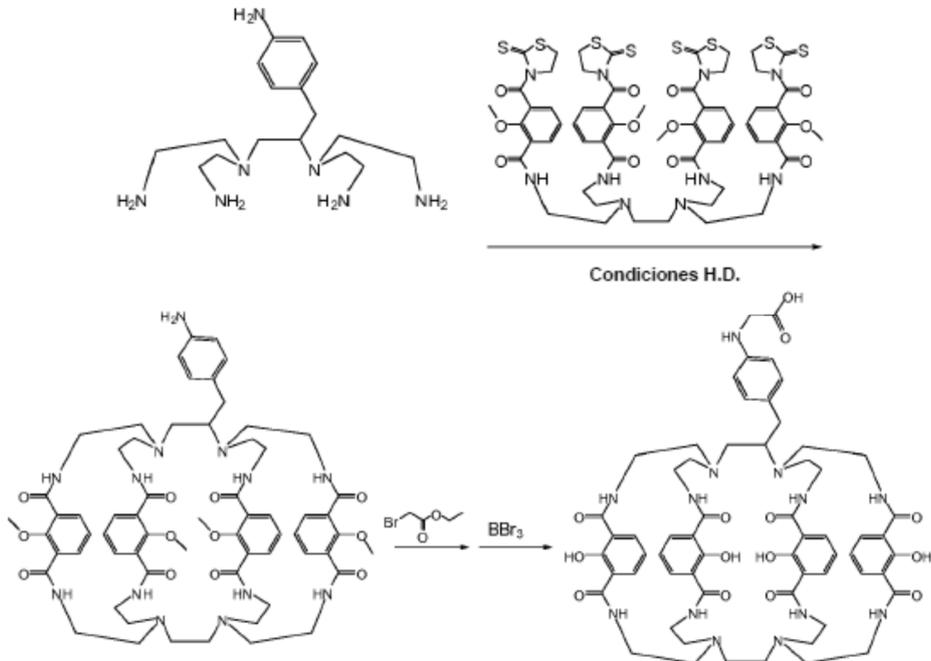
5

Esquema Comparativo 13



Otro método ilustrativo para unir una segunda porción de caperuza se describe en el Esquema comparativo 14.

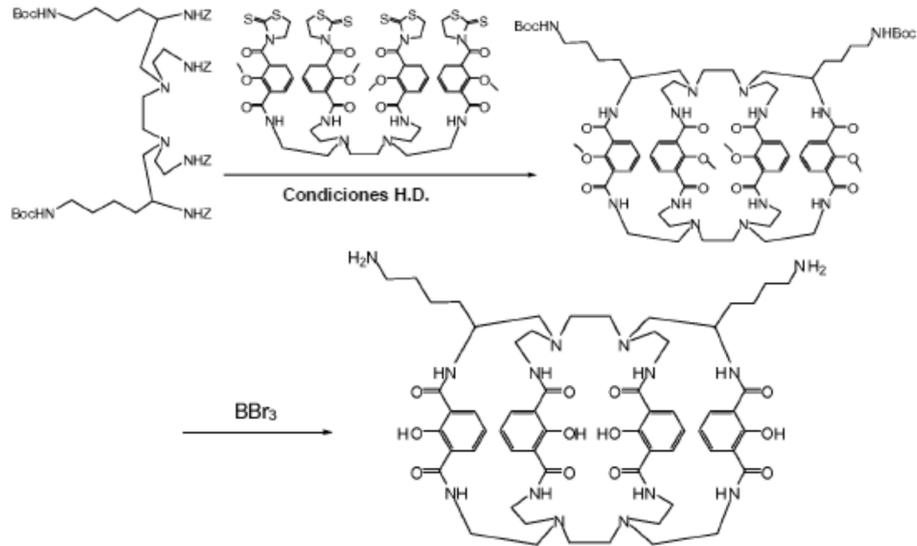
Esquema Comparativo 14



10

Otro método ilustrativo para unir una segunda porción de caperuza se describe en el Esquema 15.

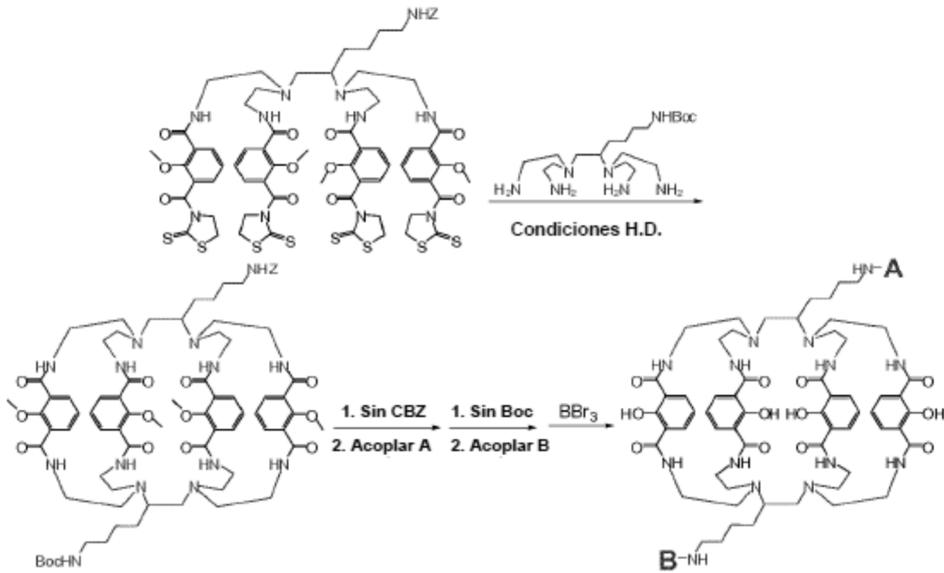
Esquema 15



5

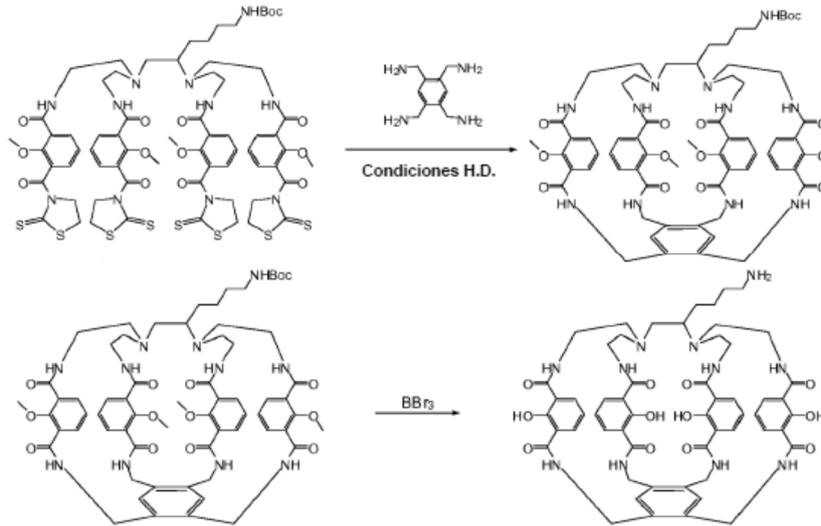
Otro método ilustrativo para unir una segunda porción de caperuza se describe en el Esquema comparativo 16.

Esquema Comparativo 16



Otro método ilustrativo para unir una segunda porción de caperuza se describe en el Esquema comparativo 17.

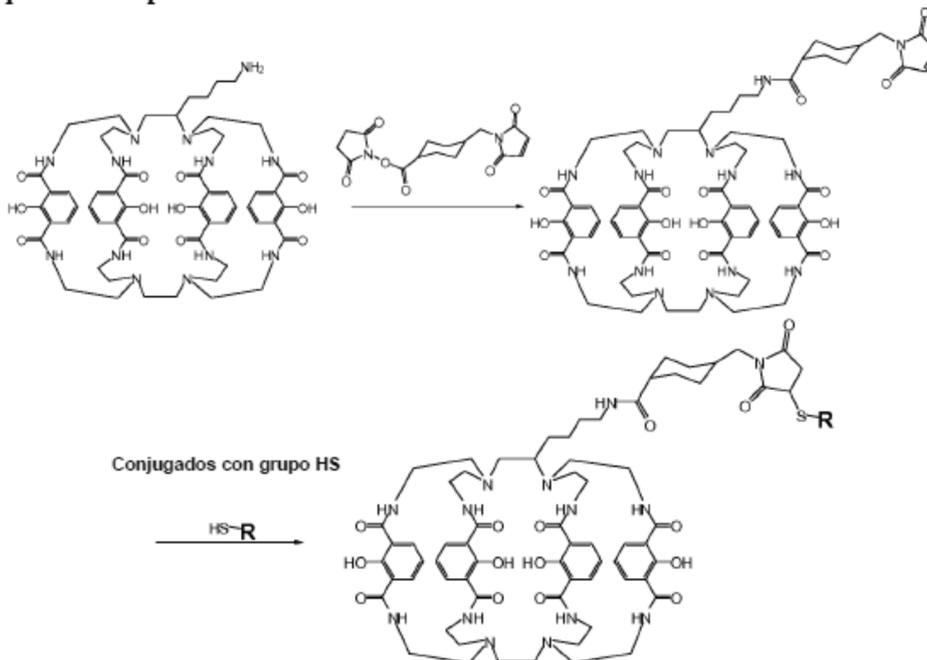
Esquema Comparativo 17



Funcionalización de L¹¹-X

- 5 Una variedad de porciones enlazadoras puede unirse a los compuestos de la invención. La elección de la porción enlazadora se informa mediante la porción a la que se unirá la molécula. Por ejemplo, el siguiente esquema tiene una porción maleimida, que es útil para la unión a porciones tiol tales como cisteína. Las condiciones para la unión de una porción maleimida a un compuesto de la invención se muestran en el Esquema comparativo 18.

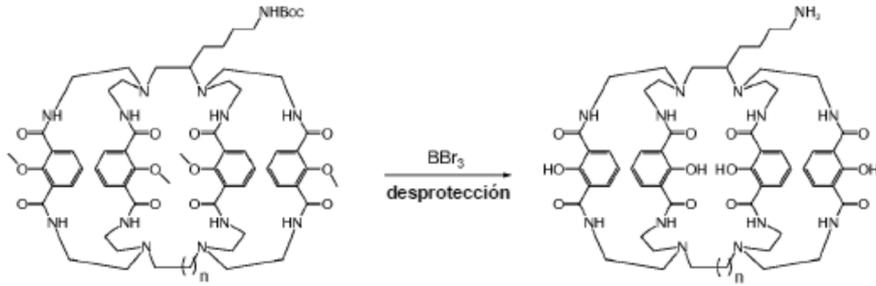
Esquema Comparativo 18



10

Otro método ilustrativo para la funcionalización de L¹¹-X se describe en el Esquema comparativo 19.

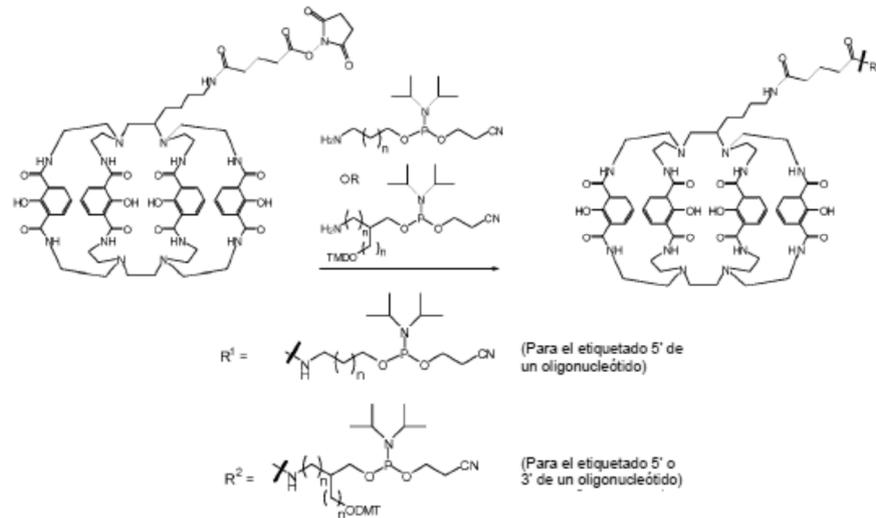
Esquema Comparativo 19



Otro método ilustrativo para la funcionalización de L¹¹-X se describe en el Esquema comparativo 20. En este esquema, se describe un derivado de fosoramidita para la incorporación en una cadena de oligonucleótidos.

5

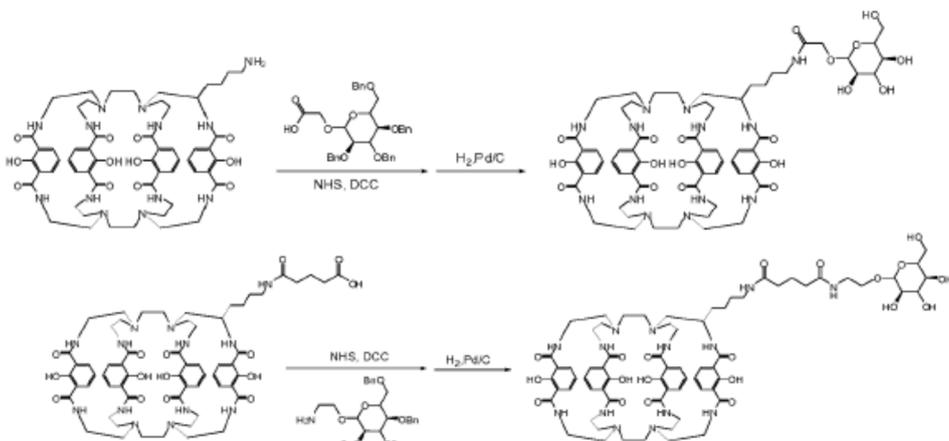
Esquema Comparativo 20



Otro método ilustrativo para la funcionalización de L¹¹-X se describe en el Esquema 21. En este esquema, se describe un compuesto conjugado a carbohidratos de la invención.

10

Esquema 21



Los grupos hidroxilo en los sacáridos o disacáridos pueden protegerse fácilmente con grupos acetoxi o bencilo. Los carbohidratos protegidos pueden derivatizarse con grupos carboxilo o amino. Los ejemplos típicos son:

Esquema 22



Los esquemas sintéticos mencionados anteriormente pretenden ser ilustrativos de ciertas modalidades de la invención, los expertos en la técnica reconocerán que están disponibles muchas otras estrategias sintéticas para producir los ligandos de la invención sin recurrir a demasiada experimentación.

Los sustituyentes en el grupo isoftalamidilo y sobre las moléculas formadoras de caperuja que unen los grupos isoftalamidilo pueden comprender por sí mismos agentes quelantes distintos de un grupo hidroxisofotalamidilo. Preferentemente, estos agentes quelantes comprenden una pluralidad de grupos aniónicos tales como grupos carboxilato o fosfonato. En una modalidad preferida, estos agentes quelantes no PL se seleccionan de compuestos que por sí mismos son capaces de funcionar como agentes quelantes de lantánidos. En otra modalidad preferida, los agentes quelantes son aminocarboxilatos (*es decir* EDTA, DTPA, DOTA, NTA, HDTA, *etcétera* y sus análogos de fosfonato tales como DTPP, EDTP, HDTP, NTP, *etcétera*).

Muchos grupos quelantes, éteres corona, criptandos y similares útiles se conocen en la técnica y pueden incorporarse en los compuestos de la invención. Ver, por ejemplo, Pitt y otros, "The Design of Chelating Agents for the Treatment of Iron Overload", En, INORGANIC CHEMISTRY IN BIOLOGY AND MEDICINE; Martell, Ed.; American Chemical Society, Washington, D.C., 1980, páginas 279-312; Lindoy, THE CHEMISTRY OF MACROCYCLIC LIGAND COMPLEXES; Cambridge University Press, Cambridge, 1989; Dugas, BIOORGANIC CHEMISTRY; Springer-Verlag, Nueva York, 1989, y las referencias contenidas en ellas.

Además, una variedad de rutas que permiten la unión de agentes quelantes, éteres corona y ciclodextrinas a otras moléculas está disponible para los expertos en la técnica. Ver, por ejemplo, Meares y otros, "Properties of In Vivo Chelate-Tagged Proteins and Polypeptides." En, MODIFICATION OF PROTEINS:FOOD, NUTRITIONAL, AND PHARMACOLOGICAL ASPECTS;" Feeney, y otros, Eds., American Chemical Society, Washington, D.C., 1982, páginas 370-387; Kasina y otros, Bioconjugate Chem., 9:108-117 (1998); Song y otros, Bioconjugate Chem., 8:249-255 (1997).

En otras modalidades los sustituyentes en el grupo isoftalamidilo o en la cadena principal son sensibilizadores de luminiscencia. Los sensibilizadores ilustrativos incluyen rodamina 560, fluoresceínas 575 y 590, 2- o 4-quinolonas, 2 o 4-cumarinas, o derivados de estas *p. ej.* cumarina 445, 450, 490, 500 y 503, 4-trifluorometilcumarina (TFC), 7-dietil-amino-cumarin-3-carbohidrida, *etcétera*, y especialmente carboestiril 124 (7-amino-4-metil-2-quinolona), cumarina 120 (7-amino-4-metil-2-cumarina), cumarina 124 (7-amino-4-(trifluorometil)-2-cumarina), aminometiltrimetilpsoraleno, naftaleno y similares.

35 Complejos

En un segundo aspecto, la invención proporciona complejos formados entre al menos un ión metálico y un compuesto de la invención. En una modalidad ilustrativa, el metal es un miembro seleccionado del grupo lantánido. Los lantánidos ilustrativos incluyen neodimio (Nd), samario (Sm), europio (Eu), terbio (Tb), disprosio (Dy) e iterbio (Yb), de los que se prefieren el europio y el terbio. Otros iones lantánidos, tales como erbio (Er), lantano (La), gadolinio (Gd) y lutecio (Lu) son útiles, pero generalmente menos preferidos. En otra modalidad preferida, los complejos de la invención son luminiscentes.

Después que se forma y se purifica el agente formador de complejos, el complejo metálico puede sintetizarse mediante cualquiera de una amplia variedad de métodos reconocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, mediante la incubación de una sal del quelato con una sal de lantánido tal como el trihaluro, triacetato de lantánido, y similares.

Grupos modificadores de luminiscencia (porciones donadoras yceptoras)

Los compuestos luminiscentes de la invención pueden usarse con una amplia variedad de moléculas donadoras yceptoras de energía para construir pares de transferencia de energía de luminiscencia, *p. ej.*, sondas de transferencia de energía de fluorescencia (FET). Los fluoróforos útiles junto con los complejos de la invención son conocidos por los expertos en la técnica. Ver, por ejemplo, Cardullo y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 85:8790-8794 (1988); Dexter, D.L., J. of Chemical Physics 21:836- 850 (1953); Hochstrasser y otros, Biophysical Chemistry 45:133-141 (1992); Selvin, P., Methods in Enzymology 246:300-334 (1995); Steinberg, I. Ann. Rev. Biochem., 40:83-114 (1971); Stryer, L. Ann. Rev. Biochem., 47:819-846 (1978); Wang y otros, Tetrahedron Letters 31:6493-6496 (1990); Wang y otros, Anal. Chem. 67:1197-1203 (1995).

Una lista no limitante de porciones donadoras oceptoras ilustrativas que pueden usarse junto con los complejos luminiscentes de la invención, se proporciona en la Tabla 1.

5 Tabla 1

| Porciones adecuadas útiles como donadores o aceptores en pares de FET |
|--|
| ácido 4-acetamido-4'-isotiocianatoestilbeno-2,2'-disulfónico |
| acridina y derivados: |
| acridina |
| isotiocianato de acridina |
| ácido 5-(2'-aminoetilo)aminonaftaleno-1-sulfónico (EDANS) |
| 4-amino-N-[3-vinilsulfonyl]fenil]naftalimida-3,5 disulfonato |
| N-(4-anilino-1-naftilo)maleimida |
| antranilamida |
| BODIPY |
| Amarillo Brillante |
| cumarina y derivados: |
| cumarina |
| 7-amino-4-metilcumarina (AMC, Cumarina 120) |
| 7-amino-4-trifluorometilcumarina (Cumarán 151) |
| colorantes de cianina |
| cianosina |
| 4',6-diaminidino-2-fenilindol (DAPI) |
| 5',5"-dibromopirogalol-sulfonaftalina (Bromopirogalol Rojo) |
| 7-dietilamino-3-(4'-isotiocianatofenil)-4-metilcumarina |
| pentaacetato de dietilentriamina |
| ácido 4,4'-diisotiocianatodihidro-estilbeno-2,2'-disulfónico |
| ácido 4,4'-diisotiocianatoestilbeno-2,2'-disulfónico |
| cloruro de 5-[dimetilamino]naftaleno-1-sulfonyl (DNS, dansilcloruro) |
| ácido 4-(4'-dimetilaminofenilazo)benzoico (DABCYL) |
| 4-dimetilaminofenilazofenil-4'-isotiocianato (DABITC) |
| eosina y derivados: |
| eosina |
| isotiocianato de eosina |
| eritrosina y derivados: |
| eritrosina B |
| isotiocianato de eritrosina |
| etidio |
| fluoresceína y derivados: |
| 5-carboxifluoresceína (FAM) |
| 5-(4,6-diclorotriazin-2-il)aminofluoresceína (DTAF) |
| 2',7'-dimetoxi-4'5'-dicloro-6-carboxifluoresceína (JOE) |
| fluoresceína |

| Porciones adecuadas útiles como donadores o aceptores en pares de FET |
|--|
| isotiocianato de fluoresceína |
| QFITC (XRITC) |
| fluorescamina |
| IR144 |
| IR1446 |
| Verde malaquita isotiocianato |
| 4-metilumbeliferona |
| orto cresoltaleína |
| nitrotirosina |
| pararrosanilina |
| Rojo de fenol |
| B-ficoeritrina |
| o-ftaldialdehído |
| pireno y derivados: |
| pireno |
| butirato de pireno |
| butirato de succinimidil 1-pireno |
| puntos cuántum |
| Rojo reactivo 4 (Cibacron™ Rojo brillante 3B-A) |
| rodamina y derivados: |
| 6-carboxi-X-rodamina (ROX) |
| 6-carboxirodamina (R6G) |
| cloruro de lisamina rodamina B sulfonilo rodamina (Rhod) |
| rodamina B |
| rodamina 123 |
| isotiocianato de rodamina X |
| sulforodamina B |
| sulforodamina 101 |
| derivado sulfonil cloruro de sulforodamina 101 (Texas Rojo) |
| N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxirodamina (TAMRA) |
| tetrametil rodamina |
| isotiocianato de tetrametil rodamina (TRITC) |
| riboflavina |
| ácido rosólico |
| derivados de quelatos de lantánidos |

5 En la literatura existe una variedad de orientaciones prácticas disponibles para seleccionar pares donadores-aceptores apropiados para sondas particulares, como se ejemplifica por las siguientes referencias: Pesce y otros, Eds., FLUORESCENCE SPECTROSCOPY (Marcel Dekker, Nueva York, 1971); White y otros, FLUORESCENCE ANALYSIS: A PRACTICAL APPROACH (Marcel Dekker, Nueva York, 1970). La literatura también incluye referencias que proporcionan listas exhaustivas de moléculas luminiscentes y cromogénicas y sus propiedades ópticas relevantes, para escoger pares de reportero-inhibidor (ver, por ejemplo, Beriman, HANDBOOK OF FLUORESCENCE SPECTRA OF AROMATIC MOLECULES, 2da Edición (Academic Press, Nueva York, 1971); Griffiths, COLOUR y CONSTITUTION OF ORGANIC MOLECULES (Academic Press, Nueva York, 1976); Bishop, Ed., INDICATORS (Pergamon Press,

Oxford, 1972); Haugland, HANDBOOK OF FLUORESCENT PROBES AND RESEARCH CHEMICALS (Molecular Probes, Eugene, 1992) Pringsheim, FLUORESCENCE AND PHOSPHORESCENCE (Interscience Publishers, Nueva York, 1949); y similares. Además, hay una amplia orientación en la literatura para derivatizar moléculas reporteras e inhibidoras para la unión covalente a través de grupos reactivos fácilmente disponibles que pueden añadirse a una molécula.

La diversidad y utilidad de métodos químicos disponibles para conjugar fluoróforos a otras moléculas y superficies se ejemplifica por el amplio cuerpo de literatura en la preparación de ácidos nucleicos derivatizados con fluoróforos. Ver, por ejemplo, Haugland (*supra*); Ullman y otros, la patente de los Estados Unidos núm. 3,996,345; Khanna y otros, la patente de los Estados Unidos núm. 4,351,760. Por lo tanto, está bien dentro de las capacidades de los expertos en la técnica elegir un par de intercambio de energía para una aplicación particular y para conjugar los miembros de este par a una molécula sonda, tal como, por ejemplo, un material bioactivo molecular pequeño, un ácido nucleico, un péptido u otro polímero.

En una pareja de FET, generalmente se prefiere que una banda de absorbancia del aceptor solape una banda de emisión de luminiscencia del donador. Cuando el donador (fluoróforo) es un componente de una sonda que usa transferencia de energía de resonancia de luminiscencia (LRET), la porción luminiscente donadora y el inhibidor (aceptor) de la invención se seleccionan preferentemente de manera que las porciones donadora y aceptora muestren transferencia de energía de resonancia de luminiscencia cuando la porción donadora se excita. Un factor a considerar en la elección del par fluoróforo-inhibidor es la eficiencia de la transferencia de energía de resonancia de luminiscencia entre ellos. Preferentemente, la eficiencia de LRET entre las porciones donadora y aceptora es al menos 10 %, con mayor preferencia al menos 50 % y aún con mayor preferencia al menos 80 %. La eficiencia de LRET fácilmente puede probarse empíricamente mediante el uso de ambos métodos descritos en la presente descripción y conocidos en la técnica.

La eficiencia de LRET entre la pareja donador-aceptor también puede ajustarse mediante el cambio de la capacidad del donador y del aceptor para dimerizar o asociarse estrechamente. Si las porciones de donador y aceptor se conocen o se determina que se asocian estrechamente, puede promoverse un aumento o disminución de la asociación mediante el ajuste de la longitud de una porción enlazadora, o de la misma sonda, entre las dos entidades luminiscentes. La capacidad de un donador y un aceptor en un par de asociarse puede aumentarse o disminuirse mediante el ajuste de las interacciones hidrofóbicas o iónicas, o las repulsiones estéricas en el constructo de la sonda. Así, las interacciones intramoleculares responsables por la asociación del par donador-aceptor se pueden aumentar o atenuar. Así, por ejemplo, la asociación entre el par donador-aceptor se puede aumentar por, por ejemplo, usar un donador que contiene una carga total negativa y un aceptor con una carga total positiva.

Además de los fluoróforos que se unen directamente a una sonda, los fluoróforos también pueden unirse mediante medios indirectos. En estas modalidades, una molécula ligando (p. ej., biotina) preferentemente se une covalentemente a las especies sonda. El ligando se une después a otra molécula (p. ej., estreptavidina), que es inherentemente detectable o se une covalentemente a un sistema de señal, tal como un compuesto luminiscente de la invención, o una enzima que produce un compuesto luminiscente mediante la conversión de un compuesto no luminiscente. Las enzimas útiles de interés como etiquetas incluyen, por ejemplo, hidrolasas, particularmente fosfatasa, esterasas y glicosidasas, u oxidorreductasas, particularmente peroxidasa. Los compuestos fluorescentes incluyen fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansil, umbeliferona, *etcétera*, como se discutió anteriormente. Para una revisión de varios sistemas de etiquetado o producción de señal que pueden usarse, ver, la patente de los Estados Unidos núm. 4,391,904.

Los medios para detectar etiquetas luminiscentes son bien conocidos por los expertos en la técnica. Así, por ejemplo, las etiquetas luminiscentes pueden detectarse mediante la excitación del fluoróforo con la longitud de onda adecuada de luz y la detección de la luminiscencia resultante. La luminiscencia puede detectarse visualmente, por medio de una película fotográfica, mediante el uso de detectores electrónicos tales como dispositivos acoplados a carga (CCD) o fotomultiplicadores y similares. Similarmente, las etiquetas enzimáticas se pueden detectar al proporcionar el sustrato adecuado para la enzima y detectar el producto de reacción resultante.

Métodos

Los compuestos y complejos de la invención son útiles como sondas en una variedad de sistemas de ensayos biológicos y aplicaciones diagnósticas. Una revisión de los sistemas de ensayos, tales como los formatos de ensayos competitivos, ensayos inmunológicos, microarreglos, ensayos de unión a membrana y ensayos de actividad de enzimas, se da p. ej., en la patente de los Estados Unidos núm. 6,864,103 otorgada a Raymond y otros. Está dentro de la capacidad de un experto en la técnica seleccionar y preparar una sonda que incluya un complejo de la invención, y que es adecuada para cada sistema de ensayo. En una modalidad ilustrativa, la molécula sonda luminiscente se usa para detectar la presencia o ausencia de un analito en una muestra.

Por lo tanto, en un aspecto, la invención proporciona una mezcla de un complejo de la invención y un analito.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para detectar la presencia o ausencia de un analito en una

muestra. El método comprende (a) poner en contacto la muestra y una composición que incluye un complejo de la invención; (b) excitar el complejo; y (c) detectar la luminiscencia del complejo. La presencia o ausencia del analito puede indicarse por la ausencia o presencia de la luminiscencia del complejo.

5 En un aspecto adicional, la invención proporciona un método para detectar la presencia o ausencia de un analito en una muestra. El método comprende (a) poner en contacto la muestra y una composición que comprende un complejo de la invención, y un grupo modificador de luminiscencia, en donde la energía puede transferirse entre el complejo y el grupo modificador de luminiscencia cuando el complejo se excita, y en donde el complejo y el grupo modificador de luminiscencia puede ser parte de la misma molécula o ser parte de diferentes moléculas; y (b) excitar dicho complejo; y
10 (c) determinar la propiedad luminiscente de la muestra, en donde la presencia o ausencia del analito se indica por la propiedad luminiscente de la muestra.

En una modalidad ilustrativa, el analito, si está presente en dicha muestra, compete con una molécula sonda que incluye un complejo de la invención, para unirse a un sitio de unión localizado en una molécula de reconocimiento. En otra
15 modalidad ilustrativa, el analito desplaza a la molécula sonda del sitio de unión localizado en una molécula de reconocimiento, mediante la unión al sitio de unión. En una modalidad ilustrativa adicional, la molécula sonda es un complejo de la invención.

Por consiguiente, en un aspecto, la invención proporciona un kit que incluye una molécula de reconocimiento y un compuesto o un complejo de la invención. Las moléculas de reconocimiento ilustrativas incluyen biomoléculas, tales como células completas, preparaciones de membranas celulares, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, proteínas (p.
20 ej., receptores de superficie celular, tales como receptores acoplados a proteína G), dominios proteicos, péptidos, ácidos nucleicos, y similares.

25 Analitos

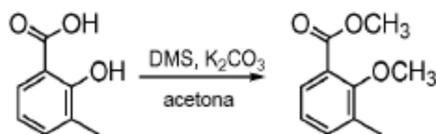
Los compuestos, complejos y métodos de la invención pueden usarse para detectar cualquier analito o clase de analitos en cualquier muestra. Una muestra puede contener p. ej., un fluido biológico (p. ej., sangre de un paciente) o tejido. Otras muestras pueden incluir, p. ej., soluciones de moléculas sintéticas o extractos de una planta o microorganismo (p.
30 ej., para esfuerzos de tamizaje de fármacos). Los analitos ilustrativos son fármacos de uso farmacéutico, fármacos de abuso, moléculas pequeñas sintéticas, compuestos marcadores biológicos, hormonas, agentes infecciosos, toxinas, anticuerpos, proteínas, lípidos, iones orgánicos e inorgánicos, carbohidratos y similares. (ver p. ej., la patente de los Estados Unidos núm.:6,864,103 otorgada a Raymond y otros para muestras adicionales de analitos).

35 Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar modalidades seleccionadas de la invención y no se construyen como limitantes de su alcance.

Ejemplos

40 Ejemplo 1

Metil 2-metoxi-3-metilbenzoato (E-1)

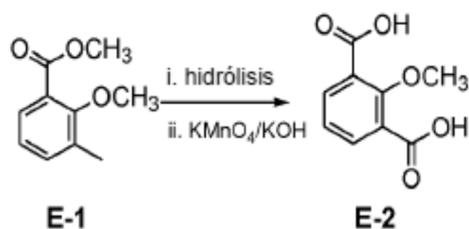


E-1

45

A una mezcla de ácido 3-metil-salicílico (200 g, 1.32 mol), carbonato de potasio anhidro (500 gramos, 3.6 mol) y acetona seca (3.5 L) en un matraz de fondo redondo de 5 litros, se añadió dimetilsulfato (DMS, 210 mL, 2.2 mol) en varias porciones. Después de agitar a temperatura ambiente durante la noche, la mezcla se calentó a reflujo, y la reacción se controló mediante TLC. Para completar la esterificación, pueden ser necesarias nuevas adiciones de DMS y K₂CO₃. Cuando la TLC indica la finalización de la reacción, la mezcla se sometió a reflujo 4 horas más para destruir cualquier DMS remanente. La mezcla se filtró, y el filtrado se evaporó para eliminar los solventes. Se obtuvo un aceite espeso amarillo pálido como el producto bruto, 215 g de rendimiento (91 %). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 25 °C) δ:2.26 (s, 3H, CH₃), 3.78 (s, 3H, OCH₃), 3.85 (s, 3H, OCH₃), 6.98 (t, J = 7.5, 1H, ArH), 7.27 (d, J = 7.5, 1H, ArH), 7.58 (d, J = 7.5, 1H, ArH); ¹³C NMR (500 MHz, CDCl₃, 25 °C) δ:15.7, 51.8, 61.1, 123.2, 124.3, 128.8, 132.4, 134.8, 158.1, 166.6.

55



Ácido 2-Metoxi-isoftálico (E-2)

5

A una solución del compuesto **E-2** (215 g, 1.19 mol) en una mezcla de metanol (2 L) y agua (0.5 L), se añadieron perlas de hidróxido de potasio (100 gramos, 1.5 mol) con enfriamiento. La mezcla se sometió a reflujo durante la noche, y después se evaporó hasta secarse; el residuo se disolvió después en agua (0.5 L) y se acidificó con HCl 6N. El ácido 2-metoxi-3-metilbenzoico precipitó como cristales blancos; 189 gramos de rendimiento, 95 %. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 25 °C) δ: 2.23 (s, 3H, CH₃), 3.71 (s, 3H, OCH₃), 7.06 (t, J = 7.5, 1H, ArH), 7.36 (d, J = 7.5, 1H, ArH), 7.49 (d, J = 7.5, 1H, ArH).

10

A una mezcla de ácido 2-metoxi-3-metilbenzoico (75 gramos, 0.45 mol) y agua (4 L) en un matraz de 5 litros equipado con un agitador mecánico y un manto de calentamiento, se añadió hidróxido de sodio (20 g, 0.5 mol), y la mezcla se convirtió en una solución clara. La solución se calentó a 75 °C, y se añadió permanganato de potasio (158 g, 1 mol) en varios lotes durante 6 horas. La suspensión marrón resultante se agitó durante la noche; mientras tanto, la temperatura de la mezcla de reacción se mantuvo en el intervalo de 80 - 85 °C.

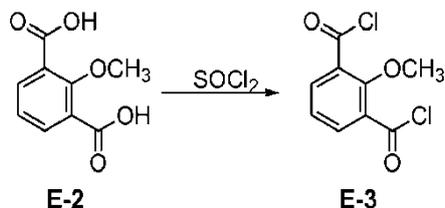
15

El proceso de oxidación se controló mediante NMR de protones (en D₂O-NaOD). Si el pico característico de 3-metilo a 2.06 ppm en NMR aún fuera reconocible, pueden añadirse varios gramos más de permanganato de potasio para asegurar la finalización de la reacción de oxidación. La suspensión se filtró después para eliminar la gran cantidad de MnO₂ y el filtrado se acidificó con HCl conc. Se observa que la precipitación del producto cristalino es lenta. El producto puro se obtuvo como cristales de nieve y se recolectó mediante filtración, 75 gramos de rendimiento, 85 %. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆, 25 °C) δ: 3.79 (s, 3H, CH₃), 7.24 (t, J = 7.5, 1H, ArH), 7.79 (d, J = 7.5, 2H, ArH).

20

25

Cloruro de ácido de 2-metoxi- isoftálico (E-3)

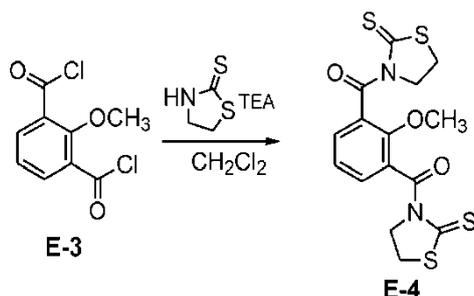


30

A una solución de ácido de 2-metoxiisofáltico **E-2** (75 g, 0.41 mol) en dioxano seco, se añadieron cloruro de tionilo (119 g, 1 mol) y una gota de DMF con agitación. La mezcla se sometió a reflujo durante la noche bajo N₂, después todas los compuestos volátiles se eliminaron mediante destilación a presión reducida, el residuo se secó a vacío (0.1 mm de Hg) durante al menos 8 h. Este compuesto sensible a la humedad es lo suficientemente puro para la próxima etapa de reacción.

35

2-Metoxi- bis(2-mercaptotiazolida)isofalamida (E-4)



40

A la solución enfriada con hielo de 2-mercaptotiozalina (107 g, 0.9 mol) y 150 mL de trietilamina en 350 mL de THF seco

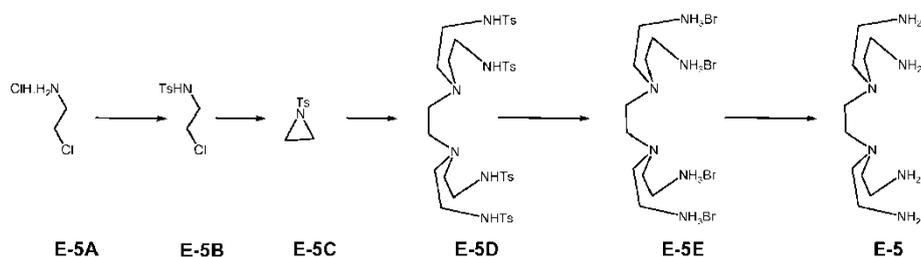
se añadió a una solución del compuesto E-3 (hecho a partir de 75 g de ácido 2-metoxi-isoftálico) en 300 mL de THF seco gota a gota con agitación. Se produjo una suspensión amarilla espesa que se agitó durante la noche y después se filtró. La torta amarilla del filtro se lavó rigurosamente con agua, se secó al aire y se recrystalizó a partir de 2-propanol para dar 106.7 g de producto puro. El filtrado se evaporó hasta secarse, se disolvió en CH₂Cl₂, se extrajo con HCl 1N y KOH 1N sucesivamente, después se purificó mediante cromatografía rápida para dar 31 g adicionales de producto, 137.7 g de rendimiento total, 84 %. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 25 °C) (Figura 7) δ:3.419 (t, J = 7.5, 2H, CH₂), 3.897 (s, 3H, OCH₃), 4.589 (t, J = 7.5, 2H, CH₂), 7.137 (t, J = 7.5, 1H, ArH), 7.433 (d, J = 7.5, 1H, ArH). ¹³C NMR (500 MHz, CDCl₃, 25 °C) δ:29.2, 55.6, 62.9, 123.1, 128.1, 131.9, 154.7, 167.1, 200.8. Anal. Calcd (encontrado) para C₁₅H₁₄N₂O₃S₄·H₂O(352.427):C, 43.25 (43.02); H, 3.87 (3.78); N, 6.72 (6.81).

Los métodos adicionales para funcionalizar la porción isoftalamidilo se describen en la presente descripción concerniente a la funcionalización en las posiciones (dd) y (ee) de la Figura 2.

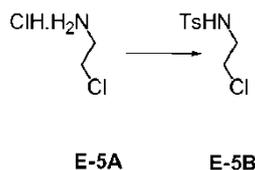
Ejemplo 2

H(2,2)-amina o PENTEN (E-5)

El compuesto **E-5** se sintetizó mediante una leve modificación del procedimiento informado (Bianke K. Wagnont y Susan C. Jackels, Inorg. Chem. 1989, 28, 1923-1927):

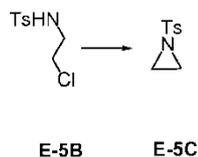


ClEtNHTs (E-5B)



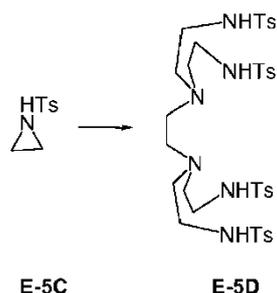
Una solución acuosa de hidrocloreto de 2-cloroetilamina (**E-5A**) al 70 % (1 mol) y K₂CO₃ (1.2 mol) se disolvieron en agua destilada (4 Litros). TsCl (1 mol) se añadió lentamente con agitación. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante aproximadamente 24 h. El pH de la mezcla de reacción se ajustó a 9 mediante la adición lenta de solución de KOH 4 M y la mezcla se mantuvo en agitación hasta que la TLC indicó que se inhibió todo el TsCl. El precipitado resultante se recolectó mediante el uso de la filtración por succión, se lavó con agua destilada, y se secó al vacío (220 g, rendimiento del 95 %). mp:77-78 °C. ¹H NMR (CDCl₃): δ 2.4 (3 H, s), 3.28 (2 H, q), 3.52 (2 H, t), 5.2 (1 H, s), 7.4 (2 H, dd), 7.9 (2 H, dd).

Tosilaziridina (E-5C)



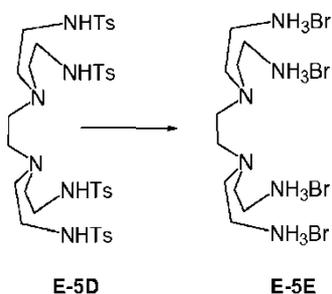
ClEtNHTs (100 g, 0.4 mol) se añadió a una solución agitada de NaOH (1200 mL, 1.4 M) en un baño de sal/hielo, y la agitación continuó durante aproximadamente 1.5 h. El precipitado después se dejó sedimentar durante la noche a 10 °C. El producto se recolectó, se lavó con agua destilada fría, y se secó al vacío (180 g, rendimiento del 92 %). mp:51-52 °C. ¹H NMR (CDCl₃): δ 2.3 (4 H, s), 2.4 (3 H, s), 7.3 (2 H, dd), 7.8 (2 H, dd).

Penten-4-Ts (N,N,N',N'-tetrakis(tetrakis(2-((p-tolilsulfonil)amino)-etil)etilenodiamina) (E-5D)



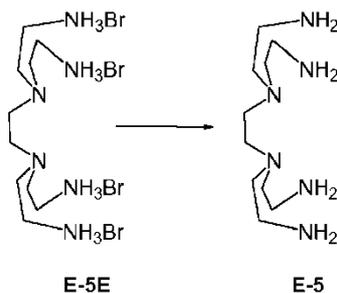
5 La tosilaziridina (80.8 g, 0.41 mol) se disolvió en tolueno seco (160 mL) y acetonitrilo (80 mL). Una solución de etilendiamina (6 g, 0.1 mol) en acetonitrilo (80 mL) se añadió gota a gota por un periodo de 1 h. La mezcla se calentó después a 60-65 °C durante la noche con agitación. Después del enfriamiento, el penten-4-Ts se recolectó como cristales blancos finos, se lavó con acetonitrilo y se secó al vacío a temperatura ambiente, 90 % de rendimiento. ¹H NMR (CDCl₃): δ 2.41 (s, 12H, CH₃), 2.50(s, 8H, CH₂), 2.95(s, 12H, CH₂), 5.95 (br, 4H, NHTs), 7.2-7.9 (m, 16H, aromH).

10 Penten-6HBr (E-5E)



15 El compuesto E-5D (42.5 g, 0.5 mol) se disolvió en una mezcla de HBr (300 mL) y de ácido acético (200 mL) en un matraz de fondo redondo de 1 L. El matraz se ajustó con un condensador y se calentó a reflujo durante 48 h y después se colocó en un baño de hielo. El precipitado resultante se recolectó, se lavó con metanol y se secó al vacío (36 g, rendimiento del 95 %). ¹H NMR (D₂O): δ 2.53 (8 H, d), 2.60 (2 H, d), 2.63 (2 H, d), 2.66 (8 H, m), 4.1 (8 H, s).

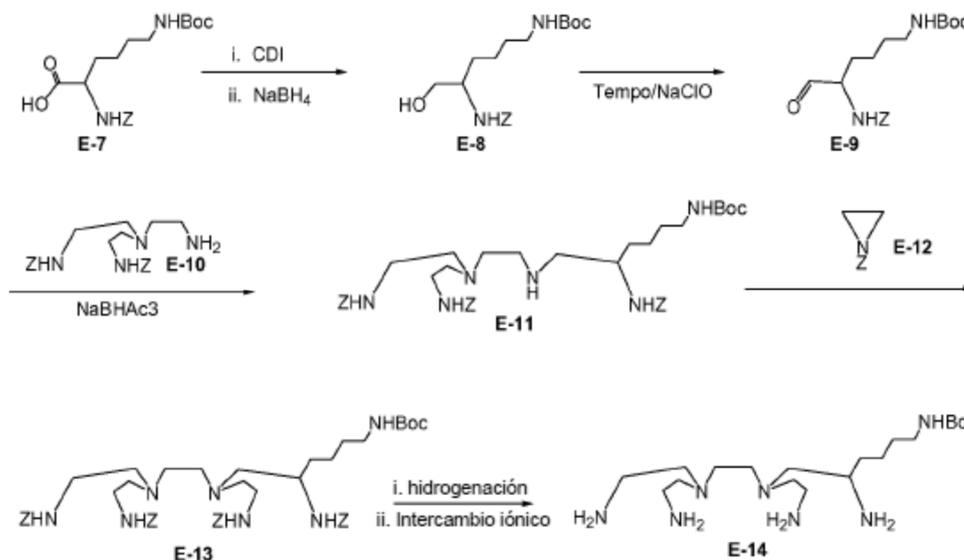
20 Penten (E-5)



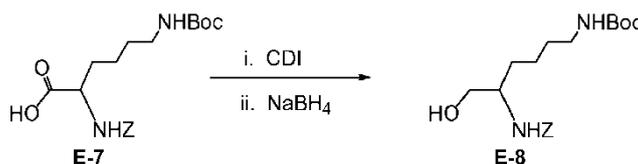
25 El Penten (E-5) se preparó a partir de la sal hidrobromuro mediante cromatografía de intercambio iónico. La resina Dowex 1X8 en la forma básica (OH⁻) se regeneró mediante el uso de un lavado de NaOH al 1 %, seguido por lavados de agua libre de CO₂. El penten.6HBr (4.0 g, 0.4 mol) en agua libre de CO₂ (40 mL) se cargó en la columna de resina Dowex regenerada (volumen de lecho de 100 mL). La columna se eluyó con agua, y se recolectaron las fracciones de prueba básica. Las fracciones recolectadas se evaporaron para producir un aceite (1.2 g, rendimiento del 95 %). ¹H NMR (D₂O): d 2.05(s, 4H), 2.16(t, 8H), 2.45(t, 8H), 4.15(s, 8H).

30 Ejemplo 3

Síntesis de la caperuza de H(2,2)amina funcionalizada (E-4)



- 5 Éster terc-butilo del ácido (5-benziloxicarbonilamino-6-hidroxi-hexil)-carbámico (Cbz-Lys(Boc)-alcohol) (E-8)

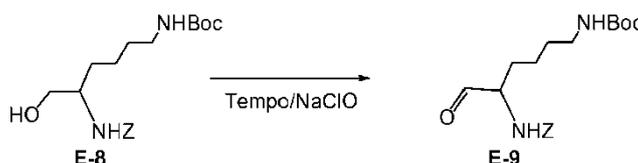


- 10 Este compuesto se sintetizó en el 2001 con un rendimiento del 69 %. Ripka, y otros, Org. Lett., 2001, 3(15), 2309. Se encontró que el método de anhídrido mixto usado rutinariamente (G. Kototos, Synthesis, 1990, 299) no proporciona producto puro, pero el procedimiento de CDI general (Kim y otros, Synlett, 1999, 1239) puede proporcionar producto puro con rendimiento satisfactorio. Este procedimiento se modificó ligeramente como sigue:

- 15 A una solución agitada de ácido 2-benziloxicarbonilamino-6-terc-butoxicarbonilamino-hexanoico (Cbz-Lys(Boc)-OH) (Chem-Impex International, 3.8 g, 10 mmol) en THF (25 mL) en un matraz redondo de 100 mL se le añadió 1,1'-carbonildiimidazol (CDI) (1.7 g, 10.5 mmol) a temperatura ambiente. Después de 20 minutos, la solución de THF se transfirió a través de una cánula Teflon ($\phi = 2$ mm) a una solución agitada de borohidruro de sodio (0.75 g, 20 mmol) en agua (10 mL) en un matraz redondo de 1 L inmerso en baño de agua a 5-10 °C. La adición provocó una fuerte evolución de gas de hidrógeno y la mezcla se agitó durante un par de horas. Las sustancias volátiles se eliminaron en un rotovapor, y el residuo se disolvió en acetato de etilo (150 mL). La solución de acetato de etilo se extrajo sucesivamente con HCl 1 N frío (2 x 50 mL), solución de bicarbonato de sodio saturada (2 x 50 mL), salmuera (100 mL), y se secó con sulfato de sodio anhidro. La solución seca de acetato de etilo se pasó después a través de una almohadilla rápida de una pulgada de gel de sílice, y se concentró para proporcionar un sólido incoloro (3.3 g, 91 %), R_f de la TLC= 0.24 (95:5:2 EtOAc :MeOH :H₂O).

- 25 ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ 1.34-1.59 (m, 6H, Lys CH₂), 1.42 (s, 9H, Boc CH₃), 2.29 (s, br, 1H, CH₂OH), 3.11 (m, 2H, CH₂), 3.63 (m, 3H, CH + CH₂), 4.60 (s, 1H, BocNH), 5.08(s, 2H, CH₃), 5.10 (s, 1H, CbzNH), 7.32 (m, 5H, ArH). ¹³C NMR (500 MHz, CDCl₃): δ , 22.66, 28.41, 29.89, 39.73, 52.98, 64.82, 66.77, 79.28, 128.09, 128.12, 128.52, 136.47, 156.42, 156.79. MS (FAB, NBA) C₁₉H₃₀N₂O₅: [M+H]⁺ 367.2.

- 30 Éster de terc-butilo del ácido (5-benziloxicarbonilamino-6-oxo-hexil)-carbámico (Cbz-Lys(Boc)-aldehído) (E-9)



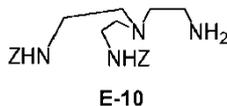
- 35 Este aldehído se sintetizó en 1990 (McConnell, y otros, J. Med. Chem. 1990, 33, 86-93) mediante el tratamiento del éster de Cbz-Lys(Boc)-metilo con hidruro de diisobutilaluminio. (Rich y otros, J. Org. Chem., 1978, 43, 3624). En el

laboratorio, el alcohol correspondiente se convirtió al aminoaldehído correspondiente a través de la oxidación con oxamónio (Leanna, y otros, Tet. Lett. 1992, 32(35), 5029).

5 Un matraz Morton de 3 cuellos de 500 mL que contiene Cbz-Lys(Boc)-alcohol (3.66 g.0.01 mol), radical libre TEMPO (0.014 g.0.0001 mol), y NaBr (1.1 g.0.011 mol) en una mezcla bifásica de tolueno (30 mL) / acetato de etilo (30 mL) y agua (5 mL) se sumergió en un baño de agua helada a 0 °C. Con agitación mecánica rápida (1200 rpm), una solución acuosa hecha de mezclar blanqueador comercial al 6 % (Cholorox^{ultra}) (14 mL), agua (20 mL) y KHCO₃ (2.5 g, 0.025 mol) se añadió a través de un tubo Teflon con una punta capilar de vidrio durante un periodo de 1 h y se agitó durante 10 min adicionales. La capa acuosa se separó y se lavó con tolueno (10 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con una solución de KI (0.1 g) disuelta en KHSO₄ acuoso al 10 % (15 mL). La capa orgánica coloreada con yodo se lavó después sucesivamente con tiosulfato de sodio acuoso al 10 % (10 mL), amortiguador de fosfato pH 7 (0.2 M, 20 mL) y salmuera saturada. El secado con Na₂SO₄ anhidro, la filtración y la concentración dio 3.1 g (85 %) de aldehído bruto (E-9) como aceite espeso incoloro, que se purificó mediante cromatografía rápida (EtOAc al 5-20 % en CH₂Cl₂). Las fracciones adecuadas se combinaron y los solventes se eliminaron a vacío, para dar un sólido blanco como producto. El compuesto puro mantiene la reactividad si se almacena en un congelador durante meses.

1H NMR (500 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ 1.32-1.86 (m, 6H, Lys CH₂), 1.41 (s, 9H, Boc CH₃), 3.10 (s, br, 2H, CH₂), 4.27 (m, 1H, CH), 4.58 (s, br, 1H, BocNH), 5.10(s, 2H, CH₃), 5.53 (d, 1H, J = 6 Hz, CbzNH), 7.31 (m, 5H, ArH), 9.57(s, 1H, aldehídoH).MS (FAB, NBA) C₁₉H₂₈N₂O₅: [M+H]⁺365.2.

20 Éster de bencilo del ácido {2-[(2-amino-etil)-(2-benziloxicarbonilamino-etil)-amino]-etil}-carbámico (BisCbzTREN) (E-10)



25 Este también es un compuesto conocido (Pat. Jap. núm. 11302243, Takayanagi, Hisao, Mitsubishi Chemical Industries). La patente informa una síntesis en múltiples etapas mediante el uso de etilendiamina como un material de partida. Se encontró que el compuesto E-10 puede prepararse en una reacción de una etapa bajo condiciones suaves:

30 Se añadió bencilfenilcarbonato* (Pittelkow, y otros, Synthesis, 2002, 2195) (4.56 g, 20 mmol) a una solución en agitación de TREN (1.46 g, 10 mmol) en EtOH absoluto (50 mL) mientras que se enfría con un baño de hielo. La mezcla de reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente. Los compuestos volátiles se eliminaron al vacío, se disolvieron en una cantidad mínima de CH₂Cl₂ y se cargaron en una columna de sílice rápida; el compuesto E-10 se preparó mediante cromatografía en gradiente con CH₃OH al 3-10 % + TEA al 1 % en CH₂Cl₂. Las fracciones adecuadas aisladas se combinaron y se pasaron a través de un tapón de alúmina básica fuerte, y se concentraron para proporcionar BisZ-TREN puro como un aceite incoloro espeso con un rendimiento del 75 %.

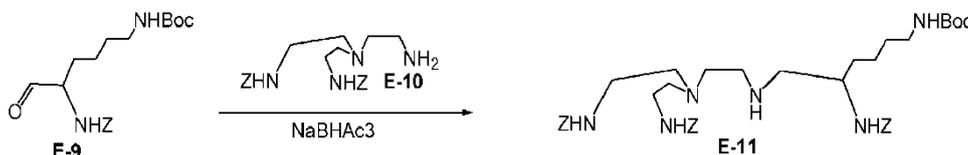
35 1H NMR (500 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ 2.48 (t, 2H, J = 5.5Hz, CH₂), 2.56 (s, br, 4H, CH₂), 2.67 (t, 2H, J = 5.5Hz, CH₂), 3.23 (s, br, 4H, CH₂), 5.06 (s, 2H, CH₂), 5.72 (s, 2H, CbzNH), 7.04 (m, 10H, ArH). ¹³C NMR (500 MHz, CDCl₃): δ, 38.91, 39.35, 53.82, 52.69, 66.28, 127.78, 127.82, 136.58, 156.70. MS (FAB, NBA) C₂₂H₃₀N₄O₄: [M+H]⁺ 415.

40 *Éster fenílico de éster bencílico del ácido carbónico (Bencilfenilcarbonato) (Pittelkow, y otros, Synthesis, 2002, 2195)

45 Este compuesto es un compuesto conocido, pero no está comercialmente disponible. Se preparó siguiendo un procedimiento publicado (Rich y otros, J. Org. Chem., 1978, 43, 3624). A una mezcla de alcohol bencílico (recientemente destilado, 69.2 g, 0.64 mol), piridina (64 mL) y CH₂Cl₂ (115 mL) en un matraz de 3 cuellos de 500 mL equipado con un condensador, agitación mecánica y un embudo de adición se añadió cloroformato de fenilo (100 g, 0.64 mol) durante un periodo de 1 h. La mezcla de reacción se agitó durante 3 h adicionales, y se añadió H₂O (160 mL). La fase orgánica se lavó con H₂SO₄ acuoso (2 M; 150 mL), se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró al vacío. El producto crudo se destiló al vacío 127-131 °C/0.1 mm de Hg para dar el compuesto deseado como aceite incoloro, Rendimiento:108 g (94%) (rendimiento de la literatura:79 %).

50 1H NMR (500 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ 5.37 (s, 2H, CH₂), 7.18-7.48 (m, 10 H, ArH).MS (FAB): m/z = 372.1 (MH⁺).

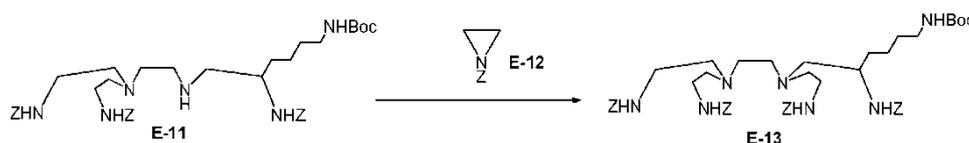
55 Éster terc-butílico del ácido (5-benziloxicarbonilamino-6-{2-[bis-(2-benziloxicarbonilamino-etil)-amino]-etilamino}-hexil)-carbámico (TrisCbzLysBocTREN) (E-11)



BisCbz-TREN (E-10) (4.14 g, 10 mmol) y Cbz-Lys(Boc)-aldehído (E-9) (3.64 g, 10 mmol) se mezclaron en THF (50 mL) a temperatura ambiente bajo N₂. La mezcla se agitó durante 3 horas con 0.2 g de tamices moleculares activados de 4 Å, después se añadió triacetoxiborohidruro de sodio (3.18 g, 15 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente bajo una atmósfera de N₂ durante 24 h. Se añadió NaOH 1 N acuoso para inhibir la mezcla de reacción, y la mezcla se extrajo con diclorometano (3 x 50 mL). El extracto de diclorometano se cargó en una columna rápida de gel de sílice. Las fracciones adecuadas de un gradiente de elución (metanol al 3-10 % en diclorometano) se recolectaron y se evaporaron hasta secarse para dar un aceite espeso beige pálido, que solidifica tras reposar, rendimiento: 6.27 g, 82 %.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ 1.17 (s, br, 2H, Lys CH₂), 1.24-1.89 (m, 4H, Lys CH₂), 1.41 (s, 9H, Boc CH₃), 2.53 (s, br, 8H, Tren CH₂), 3.03 (s, 2H, BocNHCH₂), 3.14 (s, 2H, CbzNHCH₂), 3.20 (s, 2H, CbzNHCH₂), 3.64 (s, br, 1H, Lisina quiral CH), 4.54 (s, 1H, BocNH), 5.05 (m, 6H, CbzCH₂), 7.27 (m, 15H, ArH). ¹³C NMR (500 MHz, CDCl₃): δ, 22.80, 28.33, 29.54, 32.52, 39.40, 39.97, 47.41, 50.85, 53.77, 54.34, 66.45, 78.93, 79.27, 127.92, 128.06, 128.35, 136.59, 156.01, 156.68, 156.86. MS (FAB, NBA) C₄₁H₅₈N₆O₈: [M+H]⁺ 763.5.

Éster terc-butílico del ácido [5-benziloxycarbonilamino-6-((2-benziloxycarbonilamino-etil)-{2-[bis-(2-benziloxycarbonilamino-etil)-amino]-etil}amino)-hexil]-carbámico (E-13)



TrisCbzLysBocTREN (E-11) (3.81 g, 5 mmol) y Cbz-aziridina* (E-12) (1.24 g, 7 mmol) se mezclaron en *tert*-butanol (50 mL) a temperatura ambiente bajo N₂. La mezcla se agitó bajo una atmósfera de N₂ a 80 °C durante 16 horas hasta que la TLC indicó que la reacción había finalizado. Los compuestos volátiles se eliminaron bajo vacío y el residuo se disolvió en diclorometano. Las fracciones adecuadas de una columna de gel de sílice rápida en gradiente (metanol al 1-7 % en diclorometano) se recolectaron y se evaporaron hasta secarse para dar un aceite espeso beige pálido; rendimiento: 3.98 g, 84.7 %.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ 1.24-1.87 (m, 6H, Lys CH₂), 1.42 (s, 9H, Boc CH₃), 2.26 (s, br, 2H, CH₂), 2.47 (m, br, 6H, CH₂), 2.58 (s, br, 2H, CH₂), 2.93-3.35 (m, br, 8H, CH₂), 5.05 (m, 8H, CbzCH₂), 7.27 (m, 20H, ArH).

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆, 25 °C): δ 1.12-1.55 (m, 6H, Lys CH₂), 1.34 (s, 9H, Boc CH₃), 2.60 (m, 2H, CH₂), 2.43 (s, 8H, CH₂), 2.85 (m, 2H, CH₂), 3.01 (s, 6H, CH₂), 3.43 (s, 1H, CH), 4.98 (s, 8H, CbzCH₂), 6.71 (t, 1H, J = 8 Hz, Amida H), 6.92 (d, 1H, J = 8 Hz, Amida H), 7.01 (t, 1H, J = 8 Hz, Amida H), 7.07 (t, 2H, J = 8 Hz, Amida H), 7.31 (s, br, 20H, ArH). ¹³C NMR (500 MHz, CDCl₃): δ, 22.78, 28.37, 29.65, 31.15, 32.96, 38.54, 38.67, 40.09, 49.36, 52.09, 52.31, 59.35, 66.47, 69.10, 78.94, 127.94, 127.97, 128.02, 128.11, 128.36, 128.38, 136.57, 136.64, 156.01, 156.68. MS (FAB, NBA) C₅₁H₆₉N₇O₁₀: [M+H]⁺ 940.5.

*Aziridina y sus derivados CBZ o Boc

La aziridina o etilenimina es un compuesto bien conocido. Puede prepararse a partir de hidroháluros de 2-haloetilamina con base fuerte tal como óxido de plata; hidróxido de sodio o de potasio en solución acuosa. La síntesis de aziridina mediante el tratamiento de hidrógeno sulfato de 2-aminoetilo con hidróxido de sodio fue recomendada por *Organic Synthesis* (Allen, y otros, "Organic Synthesis", V. 30, John Wiley y Son, Inc., Nueva York, N.Y., 1950, páginas 38-40) y es el método de preparación más común. Debido a su alta tendencia a polimerizar, el rendimiento de la preparación es bajo. Un rendimiento del 37 % de aziridina fue informado por *Organic Synthesis* y se considera un buen rendimiento.

Ya que la aziridina ahora no está comercialmente disponible, se adoptó el método de la literatura (Reeves y otros, J. Amer. Chem. Soc., 1951, 73, 3522) con ligeras modificaciones para sintetizar este compuesto. La cuestión clave de la síntesis es generar y vaporizar la aziridina instantáneamente y destilar rápidamente para reducir la polimerización no deseable.

Un matraz de 5 Litros, de 3 cuellos equipado con una barra de agitación magnética gigante, un embudo de goteo de 250 mL y un condensador prolongado (compuesto por tres condensadores) dispuestos para la destilación con un manto de calentamiento se instalaron en una campana bien ventilada (Figura 5). Se colocaron 100 mL de solución de hidróxido de sodio al 14 % en el matraz de 5 Litros, y se calentó en un calentador metálico controlado por un regulador. La solución se calentó a capacidad completa mientras que la destilación avanzaba a una tasa rápida. Se añadió una solución fría hecha a partir de 63 g de hidrógeno sulfato de 2-aminoetilo, 78 g de hidróxido de sodio y 270 mL de agua al matraz de destilación mediante el embudo de goteo a una tasa de manera que la cantidad de líquido en el matraz se mantuvo aproximadamente constante. El destilado sobrecalentado que llegó a 100 a 115 °C se recolectó en un matraz receptor y se sumergió en un baño de hielo. El matraz tiene un brazo lateral conectado a una trampa de gas amina llena con ácido sulfúrico diluido.

En la literatura, el destilado se trató con una enorme cantidad de hidróxido de sodio para eliminar la aziridina cruda, y se redestiló para asegurar la pureza del producto. Una gran cantidad de desecho tóxico, fuertemente básico podría generarse y no es conveniente la redestilación de la aziridina altamente tóxica y volátil. Debido a que el punto de ebullición de la aziridina y su dímero, el mayor contaminante, son 56-58° y 126-127.5 °C respectivamente, es posible controlar la pureza de la aziridina sólo mediante la recolecta del destilado que hierve a 50-115 °C. La solución de aziridina diluida destilada se usó directamente para preparar Boc-aziridina y Cbz-aziridina sin tratamiento adicional. El rendimiento de aziridina se estimó alrededor del 60 %. Para la caracterización, una fracción del destilado se saturó con exceso de hidróxido de sodio, y la aziridina se preparó como un aceite espeso. Su pureza se confirmó mediante espectroscopía de NMR.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ, 0.56 (s, br, 1H, NH), 1.56 (s, 4H, CH₂). ¹³C NMR (500 MHz, CDCl₃): δ, 18.03.

Éster bencílico del ácido aziridina-1-carboxílico (Cbz-aziridina E-12)

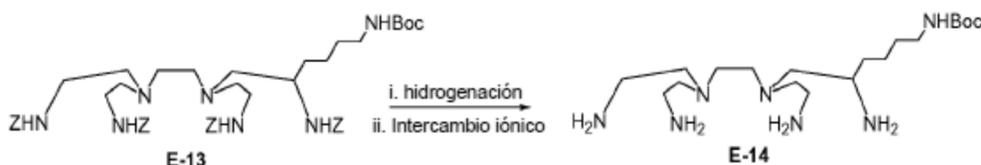


Las concentraciones de aziridina en el destilado calibrado mediante la titulación ácido-base estuvieron en el intervalo de 0.1 a 0.2 M. Las soluciones se usaron directamente para la preparación de Cbz-aziridina y Boc-aziridina.

A una solución de aziridina agitada, destilada (500 mL, 0.1 mol) en un matraz de fondo redondo enfriado con un baño de hielo, se añadieron tres equivalentes de carbonato de potasio. Después de que se disolvió todo el sólido, se añadió clorofornato de bencilo (1.5 equivalentes) en éter etílico (150 mL) durante 2 h. La solución se agitó durante la noche y se calentó a temperatura ambiente, y la fase acuosa se extrajo con cloruro de metileno (5 x 30 mL). Las fases orgánicas se combinaron y se pasaron por una almohadilla de gel de sílice rápida y se concentraron para proporcionar la Cbz-aziridina como aceite espeso incoloro, rendimiento: 7.2 g, 81 %.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ 2.22 (s, 4H, CH₂), 5.14 (s, 2H, CH₂), 7.34 (m, 5H, ArH). ¹³C NMR (500 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ, 20.51, 65.93, 127.3, 127.4, 128.7, 140.9, 159.4.

Éster terc-butílico del ácido [5-amino-6-((2-amino-etil)-{2-[bis-(2-amino-etil)-amino]-etil)-amino)-hexil]-carbámico (BocLys-H(2,2)amina) (E-14)



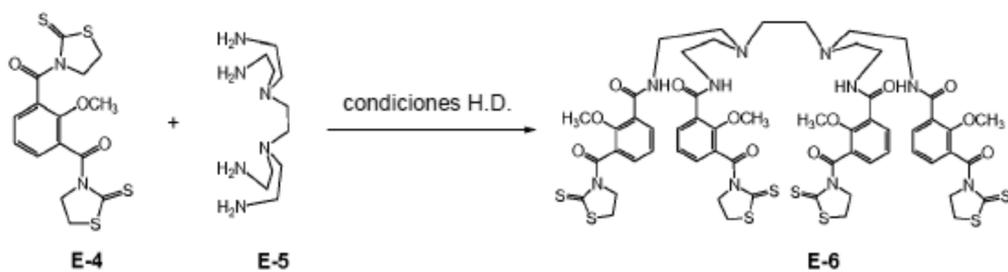
A un contenedor de hidrogenación de vidrio con 200 mg de catalizador de Pd/C húmedo al 5 %, se añadieron cuidadosamente 5 mL de metanol en toda la pared de vidrio para cubrir el catalizador (Precaución: el catalizador es inflamable en el aire). Una solución de tetraCbzBocLys-H(2,2)amina (E-13) (0.94 g, 1 mmol) en metanol (30 mL) se añadió al contenedor. El contenedor se puso en una bomba Parr y se hidrogenó a presión de 500 psi durante la noche. La TLC no mostró material de partida remanente, y el disolvente se eliminó *al vacío*. La BocLys-H(2,2)amina se obtuvo en su forma de carbonato como un aceite espeso incoloro claro. El rendimiento bruto fue del 90 %.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ 1.24-1.87 (m, 6H, Lys CH₂), 1.42 (s, 9H, Boc CH₃), 2.41-2.82 (m, br, 10H, CH₂), 2.82-3.23 (m, br, 9H, CH₂), 3.29 (s, br, 1H, CH), 5.48 (s, 1H, BocNH), 8.52 (s, 3H, CarbonatoNH). ¹³C NMR (500 MHz, CDCl₃): δ, 22.63, 28.39, 29.47, 31.11, 37.00, 39.93, 49.79, 51.99, 68.79, 78.62, 156.19, 168.99. MS (FAB, NBA) C₅₁H₆₉N₇O₁₀: [M+H]⁺ 404.3722.

Se probó que esta amina bruta no puede usarse directamente para la reacción de ciclización exitosa que conduce a un ligando IAM macrocíclico. Este producto bruto se pasó a través de una resina de intercambio aniónico básica fuerte Dowex 1X8 para eliminar el carbonato. La amina libre resultante se usó para la próxima etapa, la reacción de ciclización.

Ejemplo 4

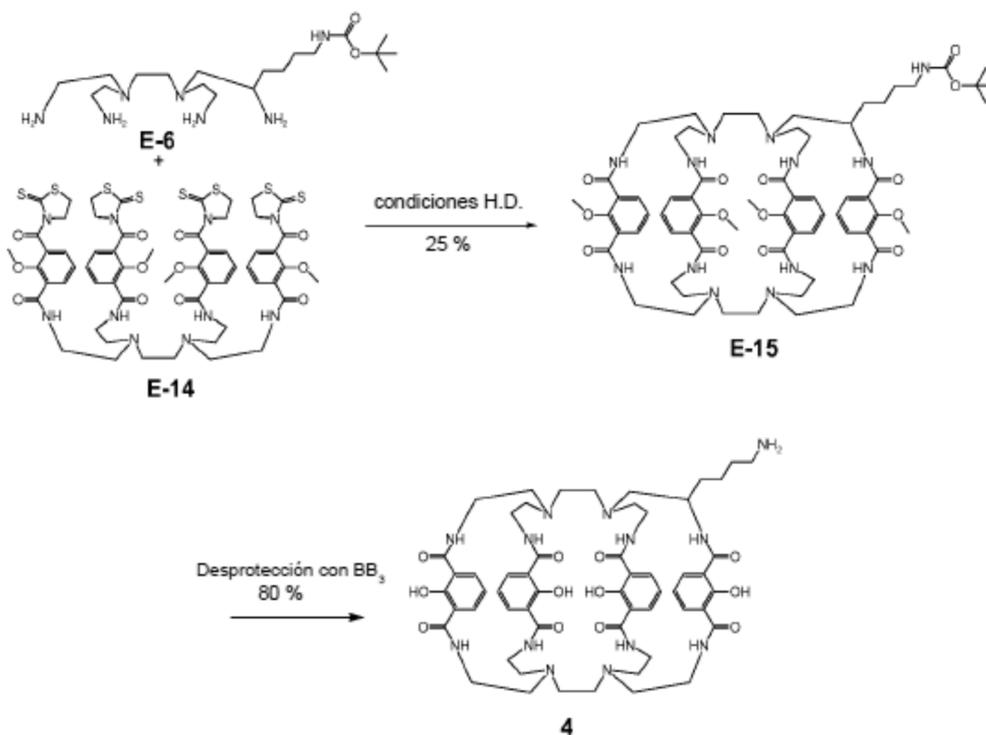
Me₄H(2,2)IAM-tetraziazolida (E-6)



A una solución de E-4 (100 g, 0.25 mol) en CH_2Cl_2 (3 L), se añadió gota a gota una solución del compuesto E-5 (1 g, 4 mmol) en 300 mL de CHCl_3 durante un periodo de 24 h. La mezcla de reacción se aplicó en una columna de gel de sílice rápida empaquetada con CH_2Cl_2 y se eluyó con 2-propanol al 3-5 % en CH_2Cl_2 para separar el compuesto **1 sin reaccionar**. Las fracciones adecuadas de la elución en gradiente sucesiva (isopropanol al 5-20 % en CH_2Cl_2) se combinaron y se evaporaron hasta secarse para dar el compuesto **6** puro como una espuma amarilla. 4.5 g de rendimiento (83 %).

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ 2.70 (s, 4H, CH_2), 2.76 (t, $J = 6.2$ Hz, 8H, CH_2), 3.43 (t, $J = 7.2$ Hz, 8H, CH_2), 3.53 (q, 8H, $J = 6.0$ Hz, CH_2), 3.85 (s, 12H, OCH_3), 4.64 (t, $J = 7.5$, 8H, CH_2), 7.17 (t, $J = 8.2$ Hz, 4H, ArH), 7.79 (t, $J = 5.4$ Hz, 4H, ArH), 8.63 (d, $J = 7.5$, 1H, ArH). ^{13}C NMR (500 MHz, CDCl_3 , 25 °C) δ : 29.2, 37.9, 50.6, 53.5, 55.7, 63.1, 124.3, 127.2, 129.1, 132.0, 133.9, 155.6, 164.9, 167.3, 201.4. Anal. Calcd (Encontrado) para $\text{C}_{58}\text{H}_{64}\text{N}_{10}\text{O}_{12}\text{S}_8 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1367.73): C, 50.93 (51.02); H, 4.86 (4.98); N, 10.24 (10.01).

Ejemplo 5

20 *Me₄BocLysBH(2,2)IAM (E-15)*

Este trimacrociclo E-15 colgante se sintetizó bajo condiciones de alta dilución. La amina libre (E-6) (1.2 g, 3 mmol), 5 mL de trietilamina y 10 mL de isopropanol se mezclaron para formar una solución homogénea y se disolvieron en 950 mL de cloroformo en un matraz de fondo redondo de 1 L. Por otro lado, H(2,2)IAMtetrazolidina (E-14) (4.05 g, 3 mmol) se disolvió en 950 mL de cloroformo en un matraz de fondo redondo de 1 L separado. Las soluciones de los compuestos E-6 y E-14 (aprox. 3-4 mM) se añadieron simultáneamente a través de un "sistema de adición lenta por capilaridad de tubo de vidrio Teflon" casero a un matraz redondo de tres cuellos de 12 L que contiene 8 litros de diclorometano y 2 mL de trietilamina. Las tasas de adición se ajustaron a aproximadamente 100-120 mL por 24 h para cada reactante durante 8-10 días, rindiendo un color amarillo pálido en el matraz de reacción principal. Es necesario mantener la condición de alta dilución para minimizar los subproductos poliméricos. Después de que los reactantes se consumieron, la mezcla de

reacción se agitó unas 8 horas adicionales. La TLC revela que la mezcla de reacción es una mezcla complicada. Ya que hay muchos posibles isómeros que coexisten para esta molécula asimétrica, estos isómeros aparecen como puntos diferentes en la placa de TLC. La mezcla de reacción se pasó después a través de un tapón de sílice rápido (200 g) para reciclar los disolventes; el producto y el subproducto que permanece en el tapón se lavaron con una mezcla de isopropanol al 20 % en CH₂Cl₂ que contiene trietilamina al 1 %. Para simplificar el proceso de purificación y separación, la solución de lavado que contiene el macrociclo E-15 y otros subproductos se trató con una columna de alúmina básica y después una columna de gel de sílice rápida, las fracciones adecuadas de la elución en gradiente (MeOH al 3-7 % en CH₂Cl₂) de la columna en sílice rápida se combinaron, se evaporaron para proporcionar el compuesto E-15 con un rendimiento del 25-30 %. HPLC revela que la pureza del producto bruto es de aproximadamente el 90 %. Se necesitan purificaciones en columna adicionales para proporcionar el producto puro.

Se aislaron dos fracciones principales con valores muy diferentes de R_f (0.58 y 0.76, desarrolladas con una mezcla de AcOH/MeOH/CH₃CN/CH₂Cl₂ en una relación de 0.5/8/10/90) en una cantidad aproximadamente igual; el espectro de masa revela que ambas fracciones son el macrociclo deseado (E-15).

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆, 25 °C): δ 1.24-1.55 (m, 15H, Boc CH₃ + Lys CH₂), 2.52-2.95 (m, br, 24H, NCH₂), 3.21-3.62 (m, br, 16H, NHCH₂), 3.65-3.7 (m, 12H, CH₃), 6.78(s, 1H, BocNH), 7.01-7.15 (m, 8H, ArH), 7.50-7.62 (m, 16H, ArH), 8.15-8.30 (m, br, 8H, amidaH). ¹³C NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 23.12, 28.25, 28.27, 29.76, 31.06, 37.09, 38.36, 46.01, 50.12, 52.68, 53.48, 62.53, 62.73, 62.85, 78.73, 124.84, 126.61, 133.42, 133.82, 154.89, 155.91, 156.01, 164.69, 165.01, 165.28. MS [(+)-FAB, NBA] C₆₅H₈₉N₁₃O₁₄: m/Z [M+H]⁺ 1276.7.

LysBH(2,2)IAM (4)

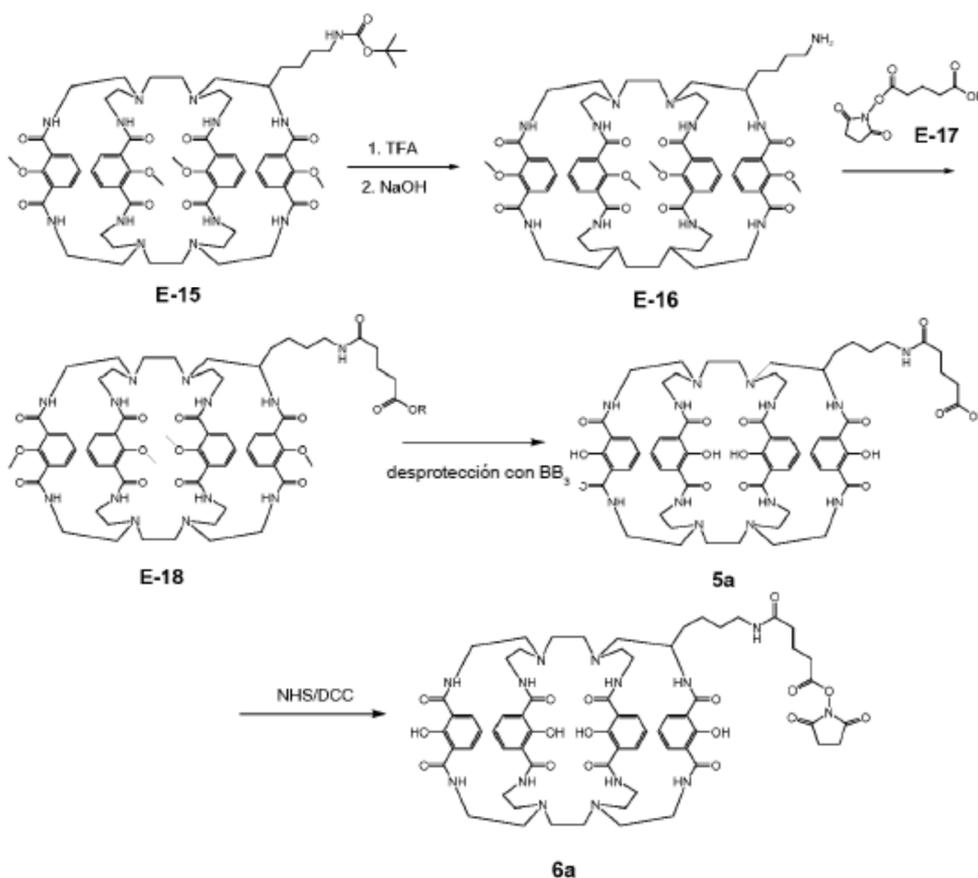
Me₄BocLysBH(2,2)IAM (E-15) (0.22 g, 0.17 mmol) se disolvió en 20 mL de CH₂Cl₂ en un matraz Schlenk con una llave de paso Teflon. Bajo un flujo de N₂, la solución se enfrió a -10 °C antes que se inyectara 1 mL de BBr₃. La suspensión se agitó durante 5 días antes de bombear el exceso de BBr₃ y CH₂Cl₂. El sólido amarillo claro remanente se disolvió en metanol (100 mL) con enfriamiento. La solución de metanol se sometió a reflujo suavemente y se dejó sin cubrir para permitir la liberación de los compuestos volátiles de boro durante 6 horas. La solución se evaporó después hasta secarse. El residuo se disolvió en metanol (10 mL) y se diluyó en agua (50 mL). La solución mixta se hirvió hasta que el volumen se redujo a aprox.10 mL y después se enfrió, proporcionando un sólido blanco como producto. Este se recolectó mediante centrifugación y se secó a vacío a 40 °C. Rendimiento:150 mg (53 %).

En comparación con la molécula simétrica altamente funcionalizada BCH(2,2)IAM, la NMR del compuesto 4 es complicada, probablemente debido al hecho de que esta molécula es asimétrica y hay varios confórmers coexistiendo.

¹H NMR (500 MHz, D₂O-NaOD, 25 °C): δ 0.78-1.25 (m, 6H, LysCH₂), 2.15-2.30 (m, 2H, CH₂), 2.40-2.92 (m, 26H, NCH₂), 3.00-3.45 (m, 14H, NHCH₂), 3.66 (s, br, 1H, CH), 6.08-6.52 (m, 4H, ArH), 7.35-7.90 (m, 8H, ArH). MS [(+)-FAB, TG/G] C₅₆H₇₃N₁₃O₁₂: m/Z 1120.5 [MH⁺]. Anal. Calcul. (Encontrado) para C₅₆H₇₃N₁₃O₁₂·5HBr·8 H₂O (1668.95):C, 40.30 (40.29); H, 5.68 (5.68); N, 10.91 (10.65).

Ejemplo E-6

Síntesis de productos macrotríclicos (compuestos 19, 20, 21)



Me₄EtGlutarBocLysBH(2,2)IAM (E-18)

5

El compuesto E-15 (0.25 g, 0.2 mmol), se recogió en una mezcla 1:1 diclorometano y ácido trifluoroacético (10 mL); la solución se dejó agitar durante 3 horas. Después de la evaporación, el residuo se disolvió en metanol, y el pH de la solución se ajustó a 11 con KOH 0.1 N en solución de metanol. Esta solución básica se cargó en un tapón de alúmina básica y se eluyó con metanol al 10 % en diclorometano para eliminar la sal de TFA y la base en exceso. Después de eliminar el disolvente, se usó directamente el macrociclo E-16 sin Boc para la siguiente etapa de reacción.

10

El compuesto bruto E-18 se disolvió en DMAA seco (2 mL) y se mezcló con exceso (2 equiv.) de éster de NHS del glutarato de etilo en solución de diclorometano seco (10 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 h; el macrociclo E-18 resultante se purificó mediante cromatografía de sílice rápida en gradiente (MeOH al 2-7 % en CH₂Cl₂).

15

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆, 25 °C): δ 1.14(t, 3H, CH₃), 1.20-1.60 (m, 6H, CH₂), 2.05 (m, 2H, CH₂), 2.26 (m, 2H, CH₂), 2.52-2.80 (m, br, 23H, NCH + NCH₂), 3.21-3.62 (m, br, 16H, NHCH₂), 3.65-3.7 (m, 12H, CH₃), 4.03(m, 2H, CH₂), 5.73(s, 1H, amidaH), 7.01-7.15 (m, 4H, ArH), 7.32(d, 1H, amidaH), 7.50-7.65 (m, 8H, ArH), 7.75(m, 1H, amidaH), 7.95(m, 1H, amidaH), 8.10-8.20 (m, 4H, amidaH), 8.26(m, 1H, amidaH). ¹³C NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 13.7, 20.5, 22.6, 24.8, 28.5, 32.6, 32.9, 34.7, 37.3, 38.4, 45.5, 50.8, 52.8, 53.1, 59.8, 62.0, 62.3, 62.6, 124.0, 127.5, 133.5, 155.0, 155.1, 164.9, 165.4, 172.0, 172.7. MS [(+)-FAB, NBA]: C₆₇H₉₁N₁₃O₁₅: m/z 1318.8 [MH⁺].

20

GlutarLysBH(2,2)IAM (5a)

25

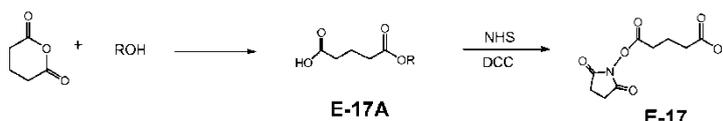
El compuesto 18 (0.4 g, 0.3 mmol) se desprotegió con BBr₃ como se describió para el compuesto 4, el compuesto 5a desprotegido se recolectó mediante centrifugación y se secó al vacío a 40 °C para rendir un sólido beige como un producto. Rendimiento: 150 mg (53 %).

30

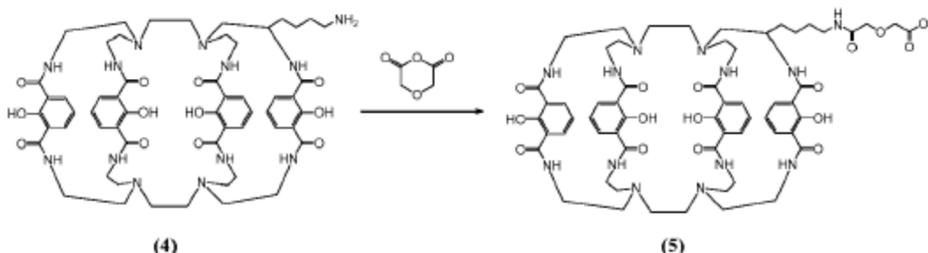
¹H NMR (500 MHz, D₂O-NaOD, 25 °C): δ 0.78-2.25 (m, 10H, CH₂), 2.40-2.92 (m, 26H, NCH₂), 3.00-3.85 (m, 17H, NHCH₂), 6.08-6.52 (m, 4H, ArH), 7.35-7.90 (m, 8H, ArH). Anal. Calcul. (Encontrado) para C₆₁H₇₉N₁₃O₁₅·3HBr·5.5H₂O (1576, 184): C, 46.48 (46.44); H, 5.96 (5.98); N, 11.55 (11.39). MS [(+)-FAB, TG/G] C₆₁H₇₉N₁₃O₁₅: m/z 1234.5 [MH⁺].

Éster GlutarLysBH(2,2)IAM-NHS (6a)

A una solución de GlutarLysBH(2,2)IAM (16 mg, 0.01 mmol) en DMF seco (2 mL), se añadió exceso de NHS (3 equiv.) y una cantidad catalítica de DMAP (2 mg). La solución se agitó durante 30 min, y se añadió DCC (2 equiv.). Después la mezcla de reacción se agitó durante 4 h, se añadió otra cantidad equivalente de DCC, la solución se agitó durante la noche bajo nitrógeno. La mezcla se dividió en una mezcla 1:1 de ciclohexano y 2-propanol (5 mL) y se agitó durante 30 min. Después se centrifugó para separar el precipitado del licor madre. El precipitado se suspendió en 5 mL de 2-propanol con agitación vigorosa para eliminar cualquiera de las impurezas de bajo peso molecular y después se centrifugó. Tal proceso de centrifugación y lavado se repitió 3 veces y el precipitado se secó a vacío. El espectro de masa de FAB(+) mostró el ión MH⁺ (1331) sin mostrar el pico del ión molecular no activado (1234). No se han hecho esfuerzos para caracterizar aún más este compuesto. Se están desarrollando nuevos métodos de evaluación para estos compuestos activados.

Método para hacer el enlazador**Ejemplo 7****Funcionalización del ligando macrocíclico (5)**

El compuesto 5 se sintetizó acoplado el compuesto 4 con anhídrido diglicólico de acuerdo con el Esquema 23 más abajo.

Esquema 23**Ejemplo 8****Interacción no específica con proteína (Estreptavidina)**

Se observó anteriormente que ciertos ligandos tales como 2 muestran interacciones no específicas con proteínas, y la adición de una cantidad pequeña de detergente no iónico tal como Tween-20 parece estabilizar la luminiscencia de Tb-2 durante periodos cortos en relación con soluciones que no contienen Tween-20. Sin embargo, la presencia de detergentes no es deseable en muchas aplicaciones.

Fue por lo tanto importante determinar la tendencia de los nuevos ligandos para interactuar inespecíficamente con las proteínas. Los derivados de éster de sulfo-NHS y de éster de NHS del compuesto 5 se sintetizaron y se conjugaron a estreptavidina. Para comparación, el éster de NHS del ligando 2 también se conjugó a estreptavidina. La estreptavidina se equilibró en amortiguador carbonato, pH 9, a una concentración de aproximadamente 130 μ M. Una solución de DMF de los ésteres activados de cada ligando se añadió a la proteína a una concentración final de aproximadamente 1 mM. Las mezclas se dejaron incubar a 4 °C durante 1 h. El metal se añade ya sea antes o después de la conjugación del ligando a la proteína. El ligando no conjugado se separó de la proteína conjugada mediante el uso de una técnica en columna rotatoria o de centrifuga de filtración en gel G50 (Penefsky, H.S, Methods Enzymol 1979, 56:527-30). Esta técnica diluye las soluciones proteicas en menor medida que las técnicas convenciones de filtración en gel. Las columnas rotatorias consecutivas se corrieron en una solución de muestra proteica única para evaluar la medida de la absorción no específica de ligando. Después de una única separación por filtración en gel, la mayoría del ligando en exceso se elimina y se deja en la superficie del lecho de gel. Un segundo tratamiento en columna rotatoria no debería dejar ligando adicional en la superficie de la segunda columna a menos que se produzca la asociación no covalente del ligando con la proteína.

Resultados

Una cantidad significativa de ligando 2 se dejó en la superficie del lecho de gel de las segundas e incluso terceras columnas rotatorias de filtración en gel consecutivas como se visualiza por un alto grado de luminiscencia residual. Por otro lado, la luminiscencia residual del compuesto 4 activado (tanto sulfo-NHS como NHS) estuvo cerca del fondo. Por lo tanto, la separación del compuesto 4 no conjugado de la estreptavidina conjugada fue eficiente y se encontró mínima la unión no específica de estos ligandos a estreptavidina.

Estos experimentos demuestran que la asociación no específica característica con proteínas observada para el ligando acíclico 2 se reduce en gran medida y casi se elimina con el ligando macrocíclico 4. Estos resultados pueden ser explicados por la mayor susceptibilidad de los ligandos acíclicos a abrirse, cuando se comparan con el macrociclo, que tiene menos grados de libertad. La naturaleza más restringida del macrociclo puede hacer que las porciones hidrófobas sean menos accesibles y limiten las interacciones no específicas de estos grupos con proteínas.

El ligando macrocíclico 4 se conjugó a una variedad de proteínas diferentes a estreptavidina que incluyen proteína A y varios anticuerpos; se encontró que la cantidad de asociación no covalente del ligando con estas proteínas es significativa en comparación con los niveles observados para el ligando 2.

Ejemplo 9

Estabilidad de complejos de Terbio (Tb)

Estabilidad de complejos de Tb en presencia de ácido o EDTA

Para evaluar la estabilidad de los complejos macrocíclicos, los complejos se expusieron a condiciones bastante duras tales como soluciones de ácido acético al 1 % y EDTA 5 mM. El ácido acético al 10 % se usa frecuentemente en la fijación y tinción de geles, mientras que el EDTA es un conservante usado comúnmente que se usa frecuentemente a una concentración de 1 mM.

Resultados

Los estudios revelan que los complejos de Tb-3 (a concentraciones en μM) muestran fuerte emisión de Tb en AcOH al 1 % que dura más de 1 h, mientras que los complejos de Tb-1 pierden su luminiscencia característica inmediatamente tras la dilución con AcOH al 1 %. De manera similar, la luminiscencia de Tb-3 a concentraciones en μM es estable durante más de 1 h en EDTA 5 mM, mientras que la luminiscencia de Tb-1 se disipa en menos de 5 min. La renuencia del ligando 3 para liberar el ión Tb^{3+} en presencia de un gran exceso de EDTA indica una estabilidad cinética mucho mayor a pH neutro (además de condiciones bastante ácidas) en comparación con el ligando 1. La alta estabilidad del complejo es crucial cuando se desarrollan aplicaciones que requieren el uso de complejos de isoftalamida a concentraciones relativamente diluidas en soluciones acuosas del complejo ($< 1 \times 10^{-8} \text{ M}$) donde el complejo se expone a una variedad de moléculas y materiales. Sin alta estabilidad a alta dilución, la reproducibilidad es pobre y la confianza en los resultados cuantitativos disminuye.

Comparación de la estabilidad cinética de diferentes complejos de Tb en varios medios

Para investigar la estabilidad de ligandos macrocíclicos, se determinaron las estabildades de diferentes complejos de Tb mediante el uso de una variedad de diferentes medios, incluyendo ácido acético al 1 % y EDTA 1 mM. Las soluciones madre de los complejos de Tb de los compuestos 1, 3 y 5a (1 μM) se prepararon en TBST, Tris 50 mM, NaCl 150 mM, Tween-80 al 0.05 %, pH 7.6. Cada solución madre se diluyó después 200x en diferentes soluciones de prueba en tubos de polipropileno de microcentrífuga a una concentración final de 5 nM de complejo Tb. Cada solución de prueba contenía además Tween-80 al 0.05 %. Las soluciones de prueba se dejaron incubar a temperatura ambiente. Las muestras se tomaron en los puntos de tiempo indicados, se evaluaron por triplicado y la luminiscencia se registró mediante el uso de configuraciones estándar de luminiscencia resuelta en el tiempo y filtros de excitación y emisión de 340 nm y 490, respectivamente. Los resultados se resumen en la Figura 1 (compuesto 1), Figura 2 (compuesto 3) y Figura 3 (compuesto 5a). Los resultados demuestran un aumento significativo en la estabilidad de los complejos de terbio derivados de ligandos macrocíclicos (3 y 5a) cuando se compara a un ligando comparable, "no restringido" (1). Los resultados también demuestran que la sustitución del ligando macrocíclico (3) puede aumentar aún más la estabilidad en ciertos medios.

Estabilidad de Complejos de Tb Durante SDS-PAGE

Los ligandos conjugados a proteína descritos en el Ejemplo 3 se evaluaron mediante SDS-PAGE. Todas las muestras se hirvieron a 95 °C durante 5 min después de que se mezclaran 1:1 con SAB reductor o no reductor 2X. Los geles Bufferless Phastsystem (GE Healthcare) se cargaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Resultados experimentales

La luminiscencia visible de Tb³⁺ se observó para todas las muestras de proteínas etiquetadas después del calentamiento de la muestra a 95 °C y la exposición a SDS. Estos resultados demuestran que los complejos de lantánidos de la presente invención son inesperadamente estables bajo las condiciones probadas. Los sistemas de imagenología basados en CCD resueltos en el tiempo podrían ser útiles para evaluar adicionalmente las diferencias de señal a ruido en las imágenes obtenidas. El uso de un filtro de corte que elimine la luz de excitación podría mejorar aún más la calidad de la imagen.

Ejemplo 10

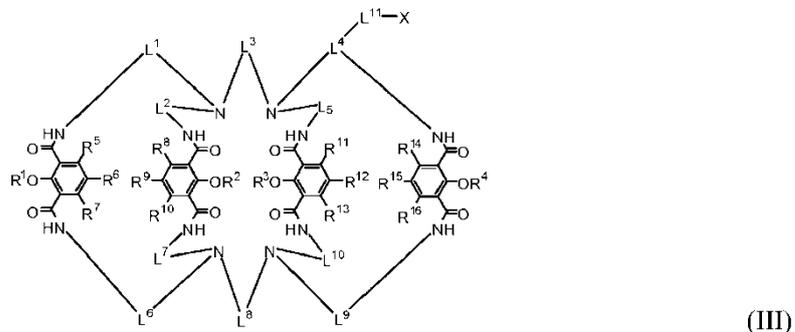
Los espectros de emisión del estado estacionario se registraron para comparar la emisión del compuesto 5a-Tb cuando no se conjuga y se conjuga a varias proteínas. El espectro de emisión de 5a-Tb no conjugado es comparable a los espectros de emisión obtenidos para diferentes conjugados proteicos de 5a-Tb (Figura 4). Los conjugados proteicos de 5a-Tb se prepararon con estreptavidina (sAv), albúmina de suero bovino (BSA), globulina gamma bovina (BgG), e inmunoglobulina G (IgG). Brevemente, el éster de sulfo-NHS de 5a se preparó in situ mediante la mezcla de 5a, EDC y sulfo-NHS en DMF seco y durante una hora. El éster de sulfo-NHS de 5a se añadió después gota a gota a una solución de proteínas en agitación equilibrada en carbonato 100 mM, pH=9.0 y se enfrió a 4°. Las reacciones se dejaron continuar hasta que un promedio de tres a cinco moléculas de 5a-Tb se unieron covalentemente por molécula de proteína. Las mediciones de luminiscencia se registraron en solución salina amortiguada con Tris, pH 7.6. La excitación se llevó a cabo a 340 nm. Los gráficos se muestran con un desplazamiento en capas para mayor claridad.

La comparación de los tiempos de vida de desintegración de la luminiscencia de 5a-Tb no conjugada y conjugada a estreptavidina muestra que los tiempos de vida de emisión de luminiscencia son esencialmente los mismos (Figura 5). Las mediciones se realizaron en un Fluorolog-3 de Jovin Yvon incorporando una lámpara rápida de xenón y un equipo de detección del tiempo de vida de desintegración.

Los espectros de absorción y emisión del estado estacionario se registraron para el compuesto 4-Tb (Figura 6). Un amplio pico de absorción centrado a 340 nm es característico de las unidades quelantes de 2-hidroxiisofetalamida sensibilizantes. El espectro de emisión se registró mediante la excitación a 340 nm y es característico de los complejos de terbio luminiscentes con picos de emisión centrados a 488 nm, 545 nm, 585 nm y 618 nm.

Reivindicaciones

1. Un compuesto que tiene una estructura de acuerdo con la Fórmula III:



en donde

L¹, L², L³, L⁴, L⁵, L⁶, L⁷, L⁸, L⁹ y L¹⁰ son miembros seleccionados independientemente de etileno sustituido o no sustituido;

R¹, R², R³ y R⁴ son miembros seleccionados independientemente de H, un grupo enzimáticamente lábil, un grupo hidrolíticamente lábil, un grupo metabólicamente lábil y una carga negativa única;

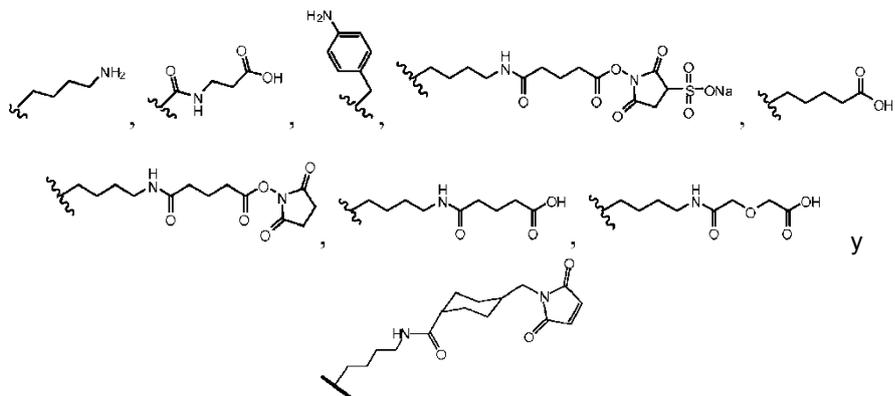
R⁵, R⁶, R⁷, R⁸, R⁹, R¹⁰, R¹¹, R¹², R¹³, R¹⁴, R¹⁵ y R¹⁶ son H;

L¹¹ es heteroalquileo sustituido o no sustituido o alquileo sustituido o no sustituido; y

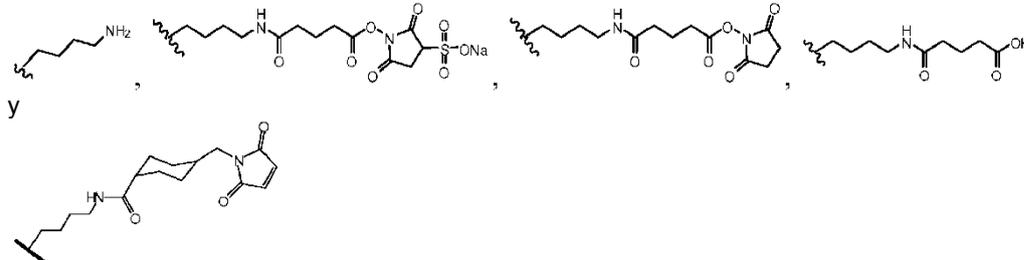
X es un miembro seleccionado de una amina, un ácido carboxílico, un maleimidilo, un tiazolidilo, un éster de NHS sustituido o no sustituido, un éster de NHS sulfonado y una porción succinimidilo.

2. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde

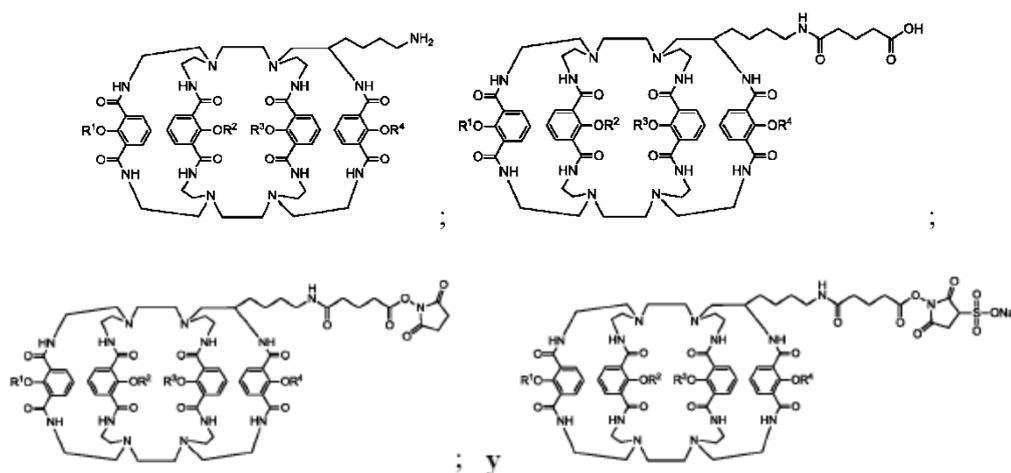
L¹¹-X es un miembro seleccionado de



3. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 2, en donde L¹¹-X es un miembro seleccionado de

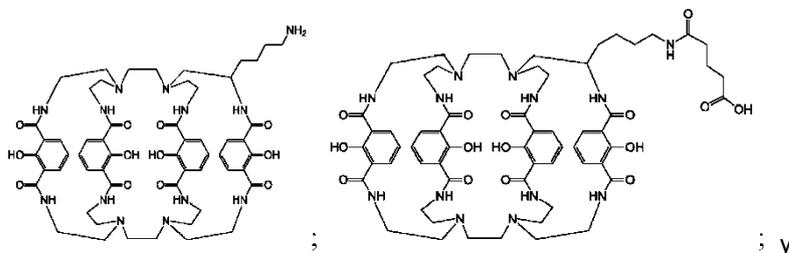


4. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 2 o la reivindicación 3, que tiene una estructura que es un miembro seleccionado de:

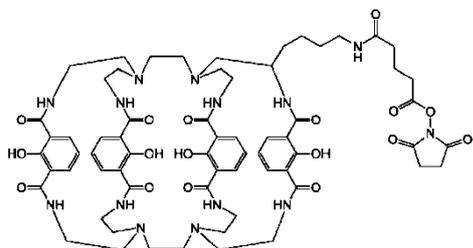


5

5. El compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, que tiene una estructura que es un miembro seleccionado de:



10



15

6. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde L¹¹ comprende un poliéter.
7. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 6, en donde dicho poliéter es polietilenglicol (PEG).
8. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 7, en donde dicho poliéter tiene un peso molecular de aproximadamente 50 a aproximadamente 10 000 dalton.
9. Un complejo luminiscente formado entre al menos un ión metálico y un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
10. El complejo de acuerdo con la reivindicación 9, en donde dicho ión metálico es un ión lantánido.
11. El complejo de acuerdo con la reivindicación 10, en donde dicho lantánido es un miembro seleccionado de neodimio (Nd), samario (Sm), europio (Eu), terbio (Tb), disprosio (Dy) e iterbio (Yb).
12. Un kit que comprende una molécula de reconocimiento y un complejo de acuerdo con la reivindicación 9, en donde la molécula de reconocimiento es un miembro seleccionado de un anticuerpo, una proteína, un péptido y un ácido nucleico.
13. Un método para detectar la presencia de un analito en una muestra, dicho método comprende:

30

- 5
14. (a) poner en contacto dicha muestra y una composición que comprende un complejo luminiscente de acuerdo con la reivindicación 9,
(b) excitar dicho complejo; y
(c) detectar la luminiscencia de dicho complejo.
- 10
14. Un método para detectar la presencia de un analito en una muestra, dicho método comprende:
(a) poner en contacto dicha muestra y una composición que comprende un complejo luminiscente de acuerdo con la reivindicación 9 y un grupo modificador de luminiscencia, en donde la energía puede transferirse entre dicho complejo luminiscente y dicho grupo modificador de luminiscencia cuando dicho complejo se excita, y en donde dicho complejo y dicho grupo modificador de luminiscencia pueden ser parte de la misma molécula o ser parte de diferentes moléculas, opcionalmente en donde el grupo modificador de luminiscencia es una molécula donadora de energía o aceptora de energía;
(b) excitar dicho complejo; y
(c) determinar la propiedad luminiscente de dicha muestra, en donde la presencia de dicho analito resulta en un cambio en dicha propiedad luminiscente.
- 15

Figura 1

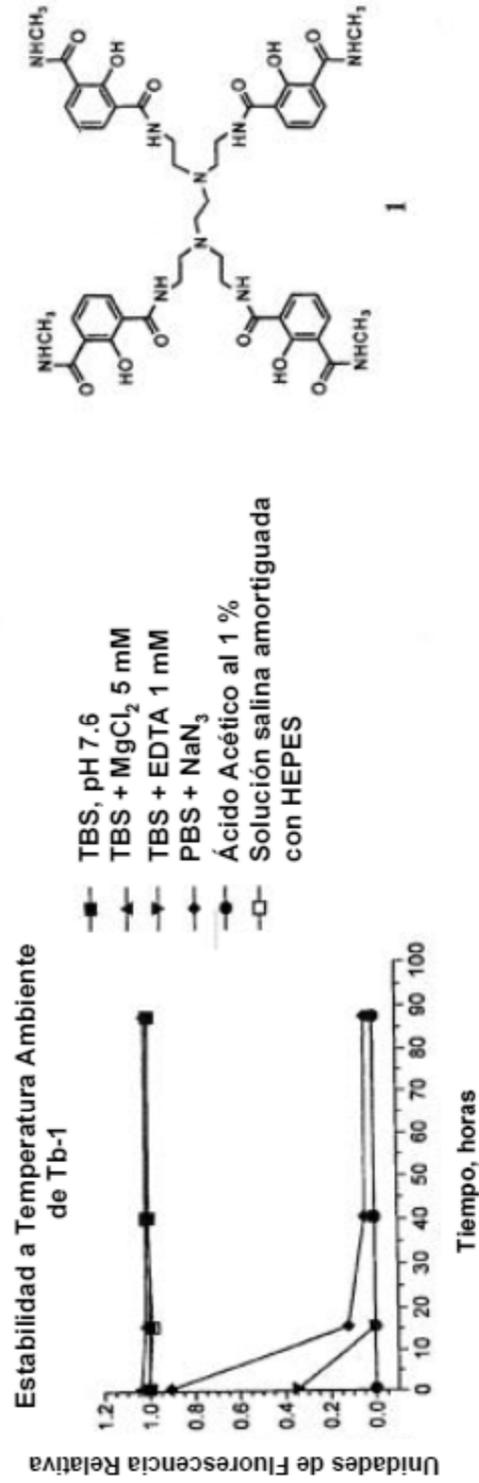


Figura 2

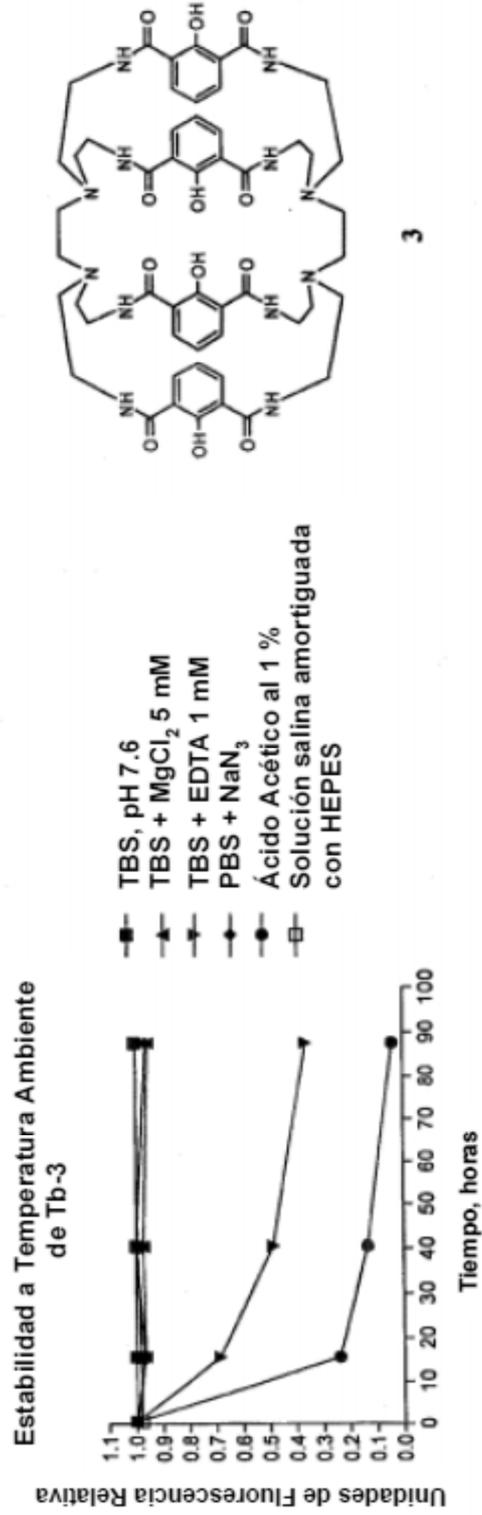
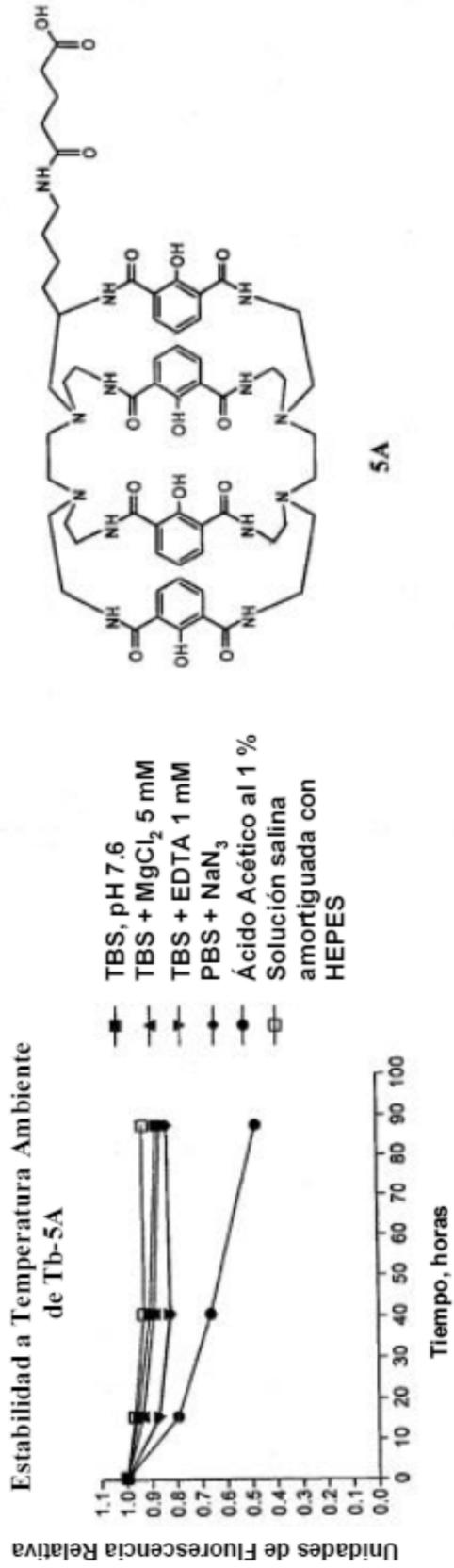


Figura 3



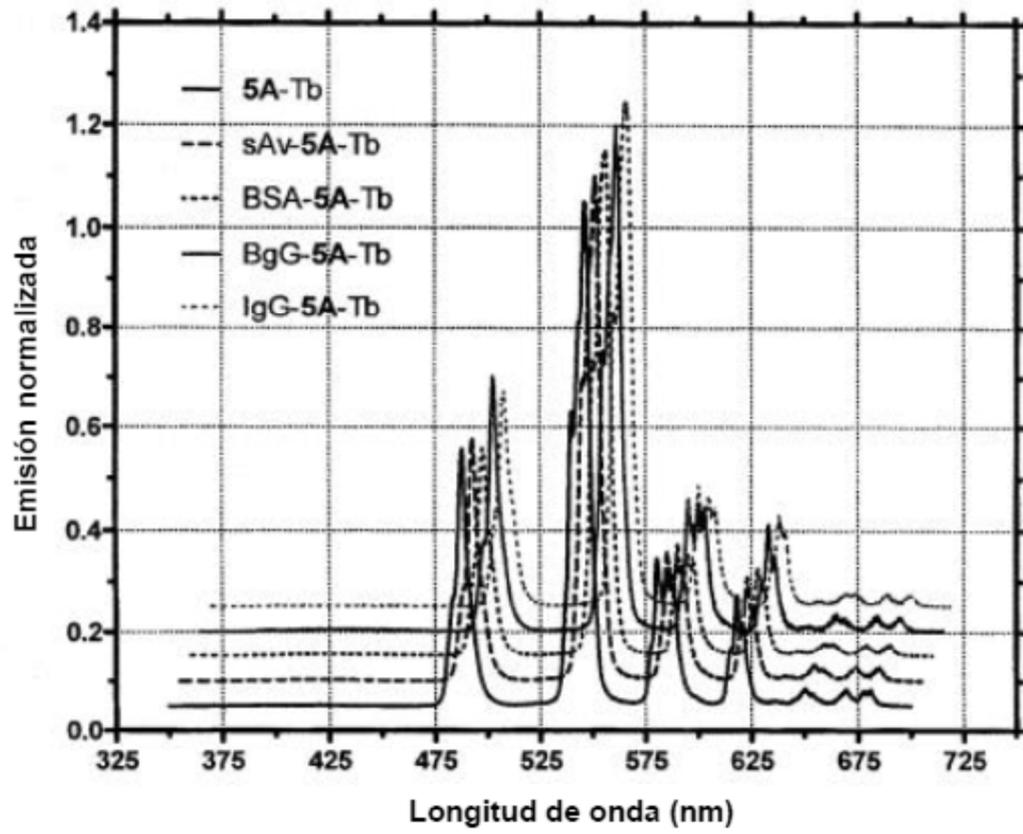


Figura 4

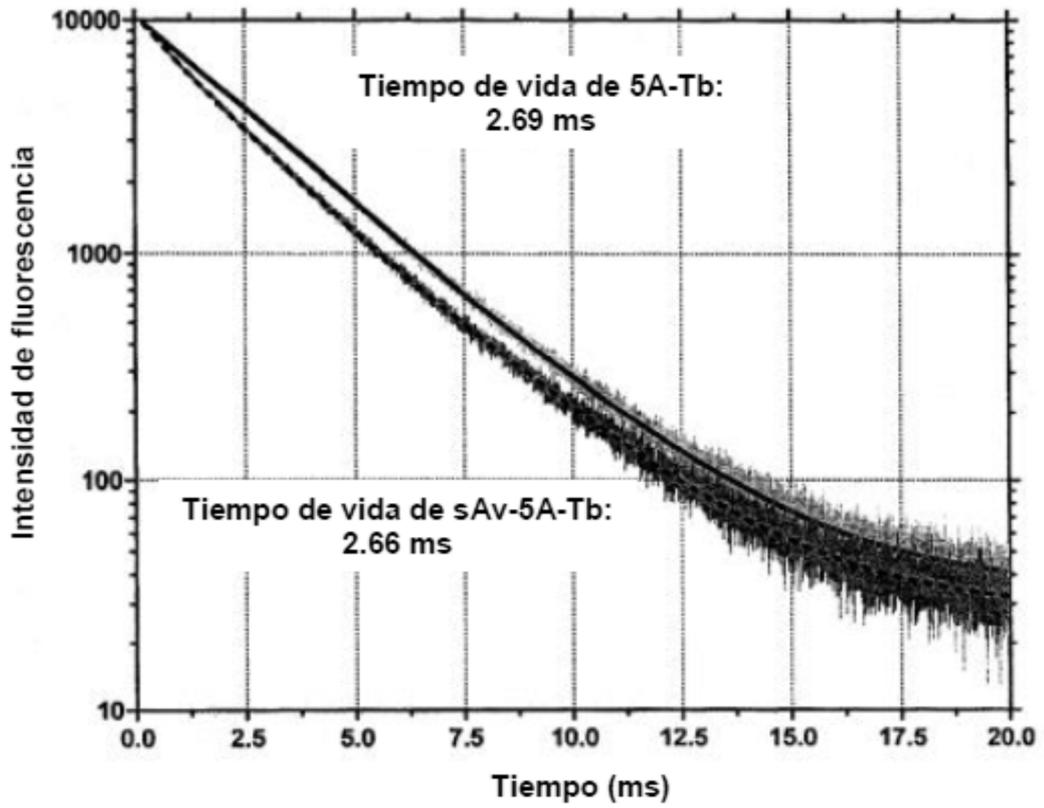


Figura 5

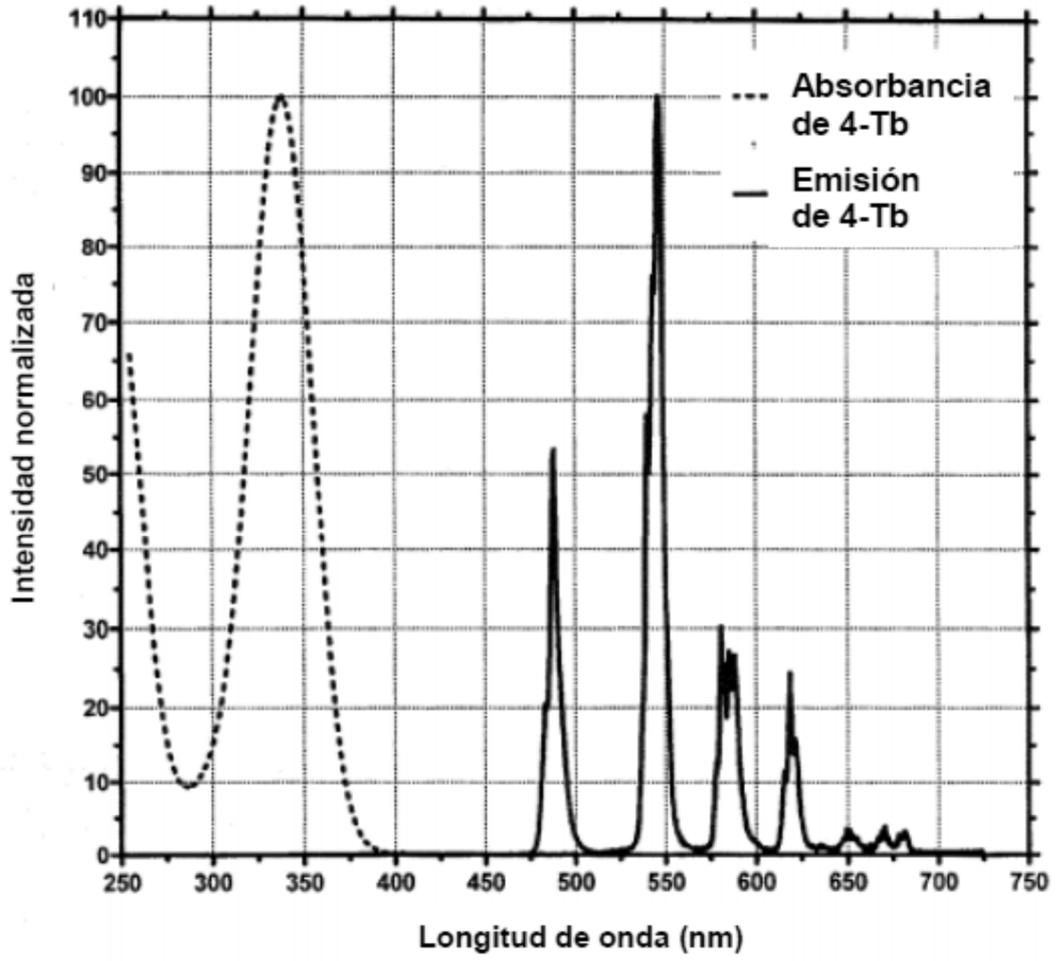


Figura 6