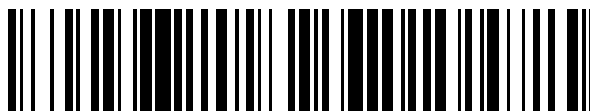


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 666 549**

51 Int. Cl.:

C07C 221/00 (2006.01)

C07D 311/88 (2006.01)

C07F 7/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.10.2010** **E 10186984 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.01.2018** **EP 2314566**

54 Título: **Procedimiento de funcionalización de moléculas biológicas**

30 Prioridad:

15.10.2009 FR 0957232

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

07.05.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BERNARDIN, AUDE;
BONNAFFE, DAVID y
TEXIER-NOGUES, ISABELLE**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 666 549 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

Procedimiento de funcionalización de moléculas biológicas

5 La presente invención tiene como objetivo proponer un nuevo método de acoplamiento, particularmente útil para la funcionalización de moléculas biológicas como por ejemplo las proteínas, enzimas, ácidos nucleicos, en la medida en la que se puede realizar en medio acuoso y a temperatura ambiente.

10 Las reacciones de acoplamiento son una vía de funcionalización ampliamente utilizada, en particular en el campo de la química por sus grandes especificidades.

En efecto, basándose en la interactividad de dos grupos específicos, llevados respectivamente por las dos entidades que se buscan acoplar, estas reacciones permiten reducir significativamente el riesgo de reacción o reacciones secundarias y garantizan generalmente un rendimiento satisfactorio en producto de acoplamiento esperado.

15 La realización de esta reacción de acoplamiento está, no obstante, generalmente subordinada, además a la puesta en contacto de los compuestos portadores de los dos grupos reactivos, al ajuste de parámetro(s) anexo(s). Estos parámetros pueden ser unos parámetros físicos tales como la temperatura, la presión atmosférica, el pH, incluso la exposición a una radiación UV por ejemplo o ser de naturaleza química tal como la presencia de un catalizador.

20 En particular, a la vista de la necesidad de considerar algunos de los parámetros mencionados anteriormente, existen relativamente pocas reacciones de acoplamiento utilizables en condiciones biológicas (*in vitro* o *in vivo*).

25 Por razones evidentes, algunos parámetros no son compatibles con una realización en medio biológico a imagen, por ejemplo, de un pH muy ácido.

Además, una reacción de acoplamiento realizada en medio biológico o con respecto a una molécula biológica impone restricciones anexas: ninguno de los reactivos o de los productos de la reacción deben ser tóxicos; los productos y reactivos deben ser inertes biológicamente frente a grupos funcionales de la vida: ácidos carboxílicos, aminas, tioles, etc. para obtener una mejor especificidad de acoplamiento; la reacción debe tener lugar rápidamente en medio acuoso, a pH y temperatura fisiológicas y, si es posible, no debe depender de la concentración en sales presentes en el medio (Na, Cl, Mg, K, etc.) y la reacción debe ser eficaz a baja concentración.

30 Como reacciones de acoplamiento realizables con unas moléculas de naturaleza biológica, se pueden citar no obstante las que se basan en la interactividad de grupos aldehídos/cetonas con unos grupos hidrazidas/aminooxi.

Los grupos cetonas y aldehídos se han utilizado en efecto ampliamente para realizar unas modificaciones de biomoléculas incorporándolas durante síntesis (o biosíntesis) en forma de monómero (azúcares, aminoácidos, etc.) modificado. Estos grupos permiten entonces una modificación ulterior haciéndolos reaccionar con unas hidrazinas o unos aminooxi, ensamblaje de dos partes de inhibidores, marcado con agentes contrastantes (véase por ejemplo Mahal, L.K. *et al.* Science, 1997. 276(5315): p. 1125-1128).

40 Desafortunadamente, la utilización de los grupos cetonas y aldehídos está limitada por el medio biológico en sí. En efecto, los grupos carbonilo reaccionan también con las aminas y no son específicos con respecto a las moléculas biológicas que los comprenden. Además, el pH óptimo para esta reacción de condensación es de 5-6; la reacción es por lo tanto o bien muy lenta, o bien la acidificación del medio conlleva una cierta muerte celular o la descomposición de biomoléculas sensibles.

45 Otro tipo de reacción de acoplamiento que se ha considerado para la química *in vivo* es una reacción que se basa en la interacción de una azida o bien con una fosfina (reacción de Staudinger) o bien un alquino (cicloaddición 1,3 dipolar de Huisgen), (véase por ejemplo Agard, N.J., *et al.*, Acs Chemical Biology, 2006. 1(10): p. 644-648).

El grupo azida es ventajosamente inerte frente a grupos funcionales encontrados en el mundo viviente, muy energético y poco reactivo frente a un gran número de grupos.

50 Desafortunadamente, el freno principal a la utilización del primer tipo de interacción es la utilización de una fosfina fácilmente oxidable al aire.

En cuanto a las cicloaddiciones de Huisgen con unos grupos azidas, éstas son posibles sólo *ex vivo*, debido a que requieren el uso de sales de cobre, excluido *in vivo* debido a su toxicidad.

60 Ciertamente es posible librarse de la presencia de cobre activando los alquinos por unos grupos atractores de electrones; Sin embargo, estos compuestos son entonces susceptibles de sufrir reacciones de Michael en un medio biológico rico en nucleófilos. Otra alternativa para acelerar la cicloaddición 1,3 dipolar de las azidas sobre los alquinos, consiste en realizar la reacción sobre enlaces múltiples forzados, siendo la tensión del ciclo la fuerza motriz de la reacción (y que sustituye la catálisis). El grupo de Bertozzi ha aprovechado así la aceleración de la reacción

debido a la tensión de ciclo para realizar una cicloadición (3+2) entre azidas y ciclooctinas que tiene lugar en condiciones fisiológicas y sin toxicidad aparente, para poder proceder a modificaciones químicas sobre las células en un organismo vivo (véase por ejemplo Agard, *et al.*, Journal of the American Chemical Society, 2004. 126(46): p. 15046-15047 y Bertozzi, C.R., *et al.*, Compositions and methods for modification of biomolecules. 2006. p. 1-58).

Desafortunadamente, las azidas, que se revelan sensibles a la fotodegradación y son algunas de ellas potencialmente explosivas, resultan poco compatibles para un uso en medio biológico.

Ahora bien, frente a su selectividad, las cicloadiciones 1,3-dipolares, constituyen manifiestamente una vía de funcionalización de la cual sería particularmente ventajoso poder beneficiarse en un medio biológico.

Como alternativa a las cicloadiciones 1,3-dipolares azida/alqueno, existen las cicloadiciones 1,3-dipolares nitronas/alquenos. Estas últimas permiten el acceso a derivados isoxazolidinas, que pueden convertirse después en numerosos productos interesantes, en particular β -lactamas, lactonas, aminoalcoholes y cetoalcoholes. Esta reacción es muy popular y proporciona dos pares de diaestereoisómeros que resultan de los enfoques *endo* o *exo*. El mismo tipo de reacción entre nitrona y alquino permite la obtención de isoxazolininas, que pueden después sufrir diversas reorganizaciones, proporcionando nuevos sistemas heterocíclicos.

Sin embargo, estas cicloadiciones 1,3-dipolares de nitronas sobre insaturaciones se llevan a cabo generalmente en medio orgánico y por otro lado a temperaturas elevadas. En lo que se refiere a la primera restricción, se impone generalmente por el hecho de que la condensación de un aldehído y de una hidroxilamina necesita unas condiciones anhidras para formar la nitrona correspondiente. Sin embargo, se ha demostrado que el empleo de un tensioactivo permite formar una nitrona y proceder a la cicloadición "one pot" de esta última con el acrilato de etilo (véase por ejemplo Chatterjee, A., *et al.*, Organic Letters, 2003. 5(21): p. 3967-3969).

La presente invención se basa más particularmente en la observación por los inventores de que la interacción de una nitrona con un grupo específico resulta realizable en condiciones suaves y por lo tanto compatibles con una realización *in vivo*, es decir en medio acuoso y a temperatura que puede variar de la temperatura ambiente a la temperatura corporal.

Más precisamente, la presente invención se refiere a un procedimiento útil para injertar al menos una molécula de interés a una entidad anexa que comprende al menos las etapas que consisten en:

- disponer de dicha molécula provista, en superficie, de al menos un grupo G1 reactivo según una reacción de cicloadición 1,3-dipolar, y

- poner en presencia dicha molécula con dicha entidad provista en superficie de al menos un grupo G2 complementario del grupo G1 enfrente de dicha cicloadición 1,3-dipolar, en condiciones propicias a dicha cicloadición de dichos grupos G1 y G2.

caracterizado por que dichos grupos G1 y G2 son respectivamente una nitrona y un radical cicloalquinilo forzado o viceversa.

En el sentido de la presente invención, la expresión "dichos grupos G1 y G2 son respectivamente una nitrona y un radical cicloalquinilo forzado o viceversa" significa que el grupo G1 es una nitrona y el grupo G2 un radical cicloalquinilo forzado o que el grupo G1 es un radical cicloalquinilo forzado y el grupo G2 una nitrona.

El procedimiento según la invención es ventajosamente compatible con una realización *in vivo*, *ex vivo* y/o *in vivo*.

Así, dicha cicloadición es realizable y preferentemente realizada en un medio asimilable a un medio biológico y más particularmente en medio acuoso.

Según otra variante preferida, dicha cicloadición es realizable y preferentemente realizada a temperatura ambiente o a una temperatura corporal.

Según también otra variante preferida, dicha cicloadición se realiza *in vivo* en superficie de un tejido o dentro de un organismo vivo.

Como destaca de los ejemplos que se presentan a continuación, los inventores han constatado que la reacción de cicloadición 1,3-dipolar entre una nitrona y un cicloalquino forzado es apta para realizarse en condiciones suaves y compatibles con la biología, a saber a temperatura ambiente, en medio acuoso, y no requiere la utilización de aditivo anexo para su activación.

Así, el procedimiento según la invención permite en particular librarse del uso de aditivos, de tipo catalizador, base o ligando (necesario en la química de click clásica) y librarse de los problemas de toxicidad del cobre (I) o de los ligandos encrptantes, de las variaciones de pH fisiológicos dañables para la viabilidad celular, y simplificar los

problemas de biodisponibilidad en el caso de una reacción llevada *in vivo*.

Además, los inventores han constatado que la interactividad de un grupo nitrona para una unidad cicloalquino restringida es particularmente ventajosa frente a la manifestada por un grupo azida frente a una misma unidad cicloalquino.

En primer lugar, la reacción de cicloadición entre nitrona y cicloalquino forzado forma un cicloaducto que se reorganiza para liberar una amina que puede, a su vez, servir para el acoplamiento de otra molécula sobre el ensamblaje anteriormente construido por la reacción de cicloadición.

Además, los compuestos que comprenden un grupo azida son potencialmente explosivos y por lo tanto difícilmente manipulables, al contrario de los que comprenden un grupo nitrona.

Así, el procedimiento según la invención permite, en condiciones compatibles con lo vivo, proceder al injerto de una biomolécula de interés de otra entidad preservando las conformaciones de los bio-polímeros de manera general, tales como las estructuras terciarias y cuaternarias de proteínas, la hibridación de las hebras de ADN, unos complejos ARN-ADN, unas estructuras complejas ADN triple hélice o cuádruple hélice, etc. que se estabilizan por unos enlaces débiles, como los enlaces hidrógeno.

En el sentido de la presente invención, la entidad anexa puede ser otra molécula de interés o un sustrato.

El procedimiento según la invención permite, por un lado, o bien acoplar unas biomoléculas tales como, por ejemplo, los ácidos nucleicos, proteínas, enzimas, anticuerpos, oligosacáridos, lípidos, etc. a otras moléculas tales como, por ejemplo, agentes de contraste, moléculas radiomarcadas, vectores de transporte, ligandos, incluso otra biomolécula de los tipos anteriormente citados, o bien funcionalizar unos sustratos tales como, por ejemplo, unas nanopartículas orgánicas o inorgánicas, unos biomateriales, unos tejidos vivos, unos nanocristales, incluso también modificar químicamente una molécula a fin de paliar, por ejemplo, su sensibilidad nativa a la temperatura, a los disolventes orgánicos, a las condiciones básicas y/o a la presencia de metales de transición o de codificantes.

Por supuesto, el procedimiento según la invención no se limita de ninguna manera a un uso para un entorno biológico. Resulta también particularmente útil para acoplar dos moléculas de interés químico, injertar una molécula química sobre una superficie funcionalizada, injertar una biomolécula a la superficie de una nanopartícula, incluso modificar químicamente unos tejidos vivos.

En consecuencia, según otro de sus aspectos, la presente invención se refiere a un procedimiento útil para funcionalizar la superficie de un sustrato con al menos una molécula de interés que comprende al menos las etapas que consisten en:

- depositar dicha molécula provista, en superficie, de al menos un grupo G1 reactivo según una reacción de cicloadición 1,3-dipolar, y

- poner en presencia dicha molécula con dicho sustrato provista en superficie de al menos un grupo G2 complementario del grupo G1 con respecto a dicha cicloadición 1,3-dipolar, en condiciones propicias a la cicloadición de dichos grupos G1 y G2,

caracterizado por que dichos grupos G1 y G2 son respectivamente una nitrona y un radical cicloalquinilo forzado o viceversa.

Según una variante de realización, dicho sustrato es un material dedicado a un uso biológico.

Puede tratarse en particular de un chip de ADN, de una célula para los ensayos de "cibrado" de alto rendimiento (actividades enzimáticas, ensayos de citotoxicidad de agentes anti-cancerosos, antibacterianos, etc.).

Tal procedimiento es también particularmente útil para la funcionalización de polímeros específicos y/o de biopolímeros, y para la síntesis de estructuras de tipo dendríticas, de hidrogeles, de fosfolípidos, de lípidos, de nanopartículas lipídicas tales como los liposomas, las nanocápsulas, las SLN ("Solid Lipide Nanoparticles") o las nanoemulsiones lipídicas.

Según también otro de sus aspectos, la presente invención se refiere a un procedimiento útil para acoplar dos moléculas de interés que comprenden al menos las etapas que consisten en:

- disponer de una primera molécula de interés provista, en superficie, de al menos un grupo G1 reactivo según una reacción de cicloadición 1,3-dipolar, y

- poner en presencia dicha molécula con dicha segunda molécula de interés provista en superficie de al menos un grupo G2 complementario del grupo G1 con respecto a dicha cicloadición 1,3-dipolar, en condiciones propicias para

la cicloadición de dichos grupos G1 y G2,

caracterizado por que dichos grupos G1 y G2 son respectivamente una nitrona y un radical cicloalquinilo forzado o viceversa.

5 Tal procedimiento es particularmente útil para la síntesis de moléculas polifuncionalizadas con objetivo terapéutico, para el marcado de células o de tejidos vivos por unos agentes contrastantes.

10 Así, según también otro de sus aspectos, la presente invención se refiere a un procedimiento útil para el marcado de una molécula de interés o de un sustrato por un agente contrastante que comprende al menos las etapas que consisten en:

- disponer dicha molécula de interés o dicho sustrato provisto, en superficie, de al menos un grupo G1 reactivo según una reacción de cicloadición 1,3-dipolar, y

15 - poner en presencia dicha molécula de interés o dicho sustrato con dicho agente contrastante provisto en superficie de al menos un grupo G2 complementario del grupo G1 frente a dicha cicloadición 1,3-dipolar, en condiciones propicias a la cicloadición de dichos grupos G1 y G2,

20 caracterizado por que dichos grupos G1 y G2 son respectivamente una nitrona y un radical cicloalquinilo forzado o viceversa.

Tal procedimiento es particularmente útil para el marcado de células o tejidos vivos.

25 En el sentido de la presente invención, el "injerto" cubre las dos reacciones que siguen, a saber:

- el anclaje que se refiere a la inmovilización de un compuesto, en este caso una molécula de interés en superficie de un sustrato, y

30 - el término "acoplamiento" que describe la reacción entre al menos un grupo funcional terminal de un primer compuesto, en particular una primera molécula de interés, y al menos un grupo funcional complementario, llevado por una segunda molécula de interés.

35 Según una variante de realización, el procedimiento según la invención se utiliza con fines de anclaje de molécula(s) de interés en superficie de un material de tipo sustrato.

Este sustrato puede ser, por ejemplo, un soporte sólido o semi-sólido.

40 Se puede seleccionar entre unas superficies de tipo metálicas, semiconductores, óxidos, tales como alúminas, SiO₂, TiO₂, orgánicas y biológicas.

45 Puede tratarse en particular de un soporte que conviene para una utilización como chip de ácidos nucleicos (ADN, ARN, oligonucleótidos), proteína, azúcares, células o como fotosensibilizador para las células fotovoltaicas, o marcador óptico de bolas de sílice (para los chips en suspensión) o también de un soporte biológico de tipo célula o tejido biológico.

Estos soportes o sus superficies a funcionalizar pueden eventualmente ser nanoestructurados.

50 Así, el soporte puede estar constituido de partículas, preferiblemente de diámetro comprendido entre 5 nm y 10 µm, y aún más preferiblemente entre 5 nm y 300 nm. Estas partículas pueden ser inorgánicas u orgánicas. Entre los materiales inorgánicos, se pueden citar unas nanopartículas de tipo metálico (por ejemplo: oro, plata), semiconductor (por ejemplo: silicio, CdSe, CdTe, CdSeTe, InP, InAs, PbS, CuInS₂), óxidos (por ejemplo: óxidos de hierro, alúminas, TiO₂, SiO₂). Entre las nanopartículas de tipo orgánico, se pueden citar las nanopartículas naturales y sintéticas de polímeros, de biopolímeros, las estructuras de tipo dendrítico, los hidrogeles, las nanopartículas lipídicas tales como los liposomas, las nanocápsulas, las SLN (Solid Lipid Nanoparticles), o las nanoemulsiones.

60 Como ejemplo de moléculas de interés, se pueden citar en particular los marcadores, los colorantes, los fluoróforos (tales como, por ejemplo, cumarinas, fluoresceína, fluorescinas modificadas, rodaninas, iguaninas, boron-dipinometeno, oxanizas y otros), las moléculas radiomarcadas, los agentes de contraste (rayos X, IRM), las toxinas (incluyendo las citotoxinas), los linkers, los activos terapéuticos, cosméticos, fitosanitarios, los miembros de un par ligando específico, los péptidos, los aminoácidos y los restos de aminoácidos, los polipéptidos (incluyendo los péptidos y las proteínas), los azúcares y los restos de azúcar, los fotosensibilizadores tales como, por ejemplo, la eosina, la rosa de bengala, las ftalocianinas, las clorinas, las bacterioclorinas, las porfirinas tales como, por ejemplo, la tetrakis [meso(4-etinilfenil)porfirina, la 1,1 0-(4-etinilfenil)5,15-(4-mesitil)porfirina y la 1-(4-etinilfenil)5,10,15-(4-mesitil)porfirina) cuya presencia en una superficies es particularmente útil en el campo de la electrónica molecular y la fototerapia; unos compuestos que presentan una isomería cis-trans tales como los derivados de los diariletlenos,

espiropiranos, espiroxazinas, fulgidos o azobenceno (cuya presencia en una superficie es particularmente útil para la fabricación de interruptores moleculares fotocontrolados).

Según una variante preferida, la molécula de interés es una molécula biológica.

El procedimiento de la invención puede comprender una puesta en presencia de un grupo cicloalquinilo forzado presente a nivel del sustrato, con un grupo nitrona, presente a nivel de la molécula de interés.

Sin embargo, el procedimiento según la invención comprende generalmente una puesta en presencia de un grupo nitrona presente a nivel del sustrato con un grupo cicloalquinilo forzado, presente a nivel de la molécula de interés.

Las biomoléculas de interés pueden ser de origen natural, o producidas de manera sintética o recombinante, y se pueden aislar y purificar.

Cuando la molécula de interés es un polipéptido, el polipéptido puede estar compuesto de aminoácidos D, L, o de los dos, y además se puede modificar, ya sea de manera natural, sintética o recombinante, a fin de incluir otros grupos. Por ejemplo, el polipéptido diana puede ser una lipoproteína, una glicoproteína o cualquier otra proteína modificada.

Según otra variante de realización, el procedimiento según la invención se realiza para acoplar al menos dos moléculas de interés, en particular tales como se definen anteriormente.

Según otra variante de realización, la o una de las moléculas de interés es un agente contrastante.

Cicloalquinilo forzado

En el sentido de la presente invención, la expresión "cicloalquinilo forzado" se extiende a los heterocicloalquinilos, que pueden comprender, llegado el caso, un átomo de nitrógeno, de oxígeno, de azufre, de fósforo o de silicio. Más particularmente, se trata de un anillo de 8 o 9 miembros.

Según un modo preferido de la invención, el grupo cicloalquinilo es un grupo ciclooctinilo.

La fuerza aplicada sobre el grupo cicloalquinilo se puede incrementar de diversas maneras, por ejemplo por la utilización de heteroátomos, el grado de insaturación, o la deformación debido a la torsión, la utilización de grupos atrayentes de electrones, etc. Los derivados correspondientes se engloban también bajo la expresión "cicloalquinilo forzado".

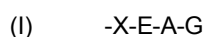
Así, el cicloalquinilo forzado conforme a la invención puede ser un compuesto en el que uno o varios átomos de carbono de anillo cicloalquinilo, con la exclusión de los dos átomos de carbono juntos por un triple enlace, está sustituido con uno o varios grupos electroatrayentes, por ejemplo un grupo halo (bromo, cloro, fluro, yodo), nitro, un grupo ciano o un grupo sulfona. El grupo electroatrayente está dispuesto de manera preferida en alfa del triple enlace.

Como otro grupo susceptible de estar presente en el cicloalquinilo, se pueden citar, de manera no exhaustiva, los grupos carboxilo, amina (por ejemplo alquilamina (por ejemplo alquilamina inferior), arilamina), éster (por ejemplo alquiléster (por ejemplo alquiléster inferior, benciléster), arilo, éster, ariléster sustituido), tioéster, sulfonilhalido, alcohol, tiol, éster succinimidilo, isotiocianato, yodoacetamida, maleimida, hidracina, etc.

La funcionalización de una molécula de interés o de un sustrato con tal grupo cicloalquinilo está claramente dentro de las competencias del experto en la técnica.

De manera general, este grupo cicloalquinilo está enlazado de manera covalente a la molécula de interés o al sustrato considerado por medio de un brazo espaciador.

Según un modo de realización particular, este brazo espaciador puede ser de fórmula siguiente



en la que:

- X, enlazado a la molécula de interés o a la entidad anexa considerada, es el producto de reacción de dos funciones reactivas, tales como, por ejemplo, tiol/maleimida, amino/ácido carboxílico activado o carbonilo/oxiamina,

- E es un grupo espaciador orgánico,

- A representa un enlace simple o un grupo seleccionado entre -CONH-, -NHCO-, OCH₂CONH-, -NHCOCH₂O-, -O-, -S-, y

- G es el grupo cicloalquilino forzado.

5 El grupo E puede ser un grupo hidrocarbonado que comprende una o varias insaturaciones, por ejemplo de tipo acuéenico. Un ejemplo de tal grupo puede ser un grupo alquileo tal como se ha definido anteriormente, interrumpido por una o varias insaturaciones alquénicas. Cuando el grupo E comprende al menos dos insaturaciones, éste puede conferir a los compuestos una capacidad para reticularse.

10 El grupo E puede ser también una cadena poli(etilen)glicol (PEG). Tal grupo permite mejorar la solubilidad de la molécula de interés o del sustrato considerado, incluso la del producto de acoplamiento esperado.

15 Esta variante de realización de E es particularmente ventajosa para la funcionalización de materiales de tipo polímeros, dendrímeros, oligómeros, partículas lipídicas, hidrogeles, apto para, por ejemplo, para encapsular unos nanocristales semiconductores fluorescente, unos fluoróforos o cualquier otro agente de interés diagnóstico o terapéutico en materiales, geles, o formulación (materiales plásticos para la óptica y la electrónica, suministro de agentes de fototerapia, por ejemplo), o también servir de matriz-soporte para la reconstrucción tisular.

20 El grupo E puede ser también un grupo hidrocarbonado que comprende uno o varios grupos aromáticos. Se puede citar, por ejemplo, un grupo que comprende unos grupos aromáticos conjugados con unos grupos lineales insaturados, tal como un grupo que resulta del enlace de una unidad fenileno-vinileno. Estos grupos contribuyen a conferir propiedades ópticas no lineales.

25 El grupo E puede también ser una pequeña molécula orgánica que permite aportar la función reactiva complementaria, por ejemplo la etilendiamina, el ácido glicólico, la cisteamina, o cualquier otra molécula orgánica que permite aportar unos ácidos/aminas/tioles.

30 Se puede citar también un grupo que comprende unas unidades pirol y/o tiofeno. Estos grupos contribuyen a conferir al material unas propiedades de conducciones electrónicas. Se puede citar, por ejemplo, un grupo que comprende uno o varios aromáticos sustituidos con uno o varios grupos aromáticos, tal como un grupo que comprende una cadena de unidades quinonas o de unidades diazoicas. Estos grupos contribuyen a conferir al compuesto, que los posee, unas propiedades de foto/electroluminescencia.

35 Nitrona

La síntesis de grupos nitrona está dentro de las competencias del experto en la técnica.

40 Por ejemplo, una de las reacciones clásicamente consideradas para formar tal grupo es la condensación de una hidroxilamina N-monosustituida con, o bien una cetona, o bien un aldehído.

45 En la hipótesis en la que tal grupo no puede generarse directamente sobre una de las moléculas de interés consideradas en el procedimiento de la invención, este puede crearse en superficie de dicha molécula mediante la interacción de una función reactiva de dicha molécula de interés con una función reactiva complementaria que figura en la entidad anexa que lleva dicho grupo nitrona.

50 Así, según una variante particular de la invención, el grupo nitrona puede unirse a dicha molécula de interés mediante un brazo espaciador orgánico E tal como se ha definido anteriormente, y preferentemente de naturaleza hidrocarbonada de C₃ a C₁₀ o una cadena polietilenglicol.

Como se ha precisado anteriormente, la reacción de cicloadición se obtiene ventajosamente sin catalizador u otros aditivos.

55 La energía de activación necesaria para la reacción se proporciona por el grupo nitrona y el grupo cicloalquilino forzado.

La cicloadición se puede realizar ventajosamente en medio acuoso y a temperatura ambiente o corporal, es decir una temperatura que varía de 16 a 45°C.

60 En el sentido de la invención, un medio acuoso designa agua pura o una mezcla mayoritariamente formada de agua y que contiene además uno o varios disolventes anexos. Tales mezclas son asimilables al agua pura.

En el sentido de la invención, la temperatura ambiente puede variar de 16 a 28°C, y preferentemente de 18 a 25°C.

65 En el sentido de la invención, se entiende por temperatura corporal, unas temperaturas comprendidas entre 32 y 45°C, más particularmente entre 36 y 42°C, y esencialmente próxima de 37 a 38°C.

Así, el procedimiento según la invención se puede realizar ventajosamente *in vivo* en un tejido o un organismo vivo.

Los procedimientos según la invención tienen múltiples aplicaciones, ya sea en síntesis, búsqueda o en diagnóstico.

Las aplicaciones de búsqueda comprenden también el descubrimiento de un medicamento o de aplicaciones de detección/cribado: como cualquier agente de contraste, la invención permite la visualización de moléculas de interés (receptor, glucosa, antígeno, etc.) o de mecanismos biológicos (endocitosis, neoangiogénesis, apoptosis, actividades enzimáticas, etc.) y permite por lo tanto la identificación de dianas terapéuticas.

Permite también realizar un seguimiento del efecto de un tratamiento medicamentoso (por ejemplo citotóxico, inhibidor de una enzima, etc.) o la detección de tumores (por medio de marcadores específicos).

Como otras aplicaciones de interés, se puede citar el estudio de características funcionales y físicas de un receptor, la proteómica, la metabolómica, etc.

La invención se puede utilizar también para el desarrollo de matrices para la reconstrucción tisular (hidrogeles, biomateriales sintéticos o modificación de superficie de materiales que se pueden implantar), y de manera general para el desarrollo de dispositivos médicos.

La invención se puede utilizar también para la fabricación de nanopartículas funcionalizadas (nanopartículas orgánicas o inorgánicas). Estas nanopartículas se pueden utilizar por ejemplo para el suministro de principios activos terapéuticos, como herramientas de diagnóstico médico o para el guiado de gestos quirúrgicos. Como herramienta de diagnóstico, se puede citar en particular su utilización en imaginería molecular.

Para algunas aplicaciones en el campo médico o preclínico, como por ejemplo la imaginería molecular, la reacción de acoplamiento entre la entidad portadora del grupo nitrona y la portadora del grupo cicloalquino forzado se puede realizar *ex vivo* o *in vivo* después de la inyección simultánea o diferida en el tiempo de las dos entidades.

Los ejemplos y figuras siguientes se presentan a título ilustrativo y no limitativo al campo de la invención.

Figura 1: Espectro XPS global de los sustratos funcionalizados por unas nitronas.

Figura 2: Espectro MIR-FTIR de láminas funcionalizadas por unas nitronas.

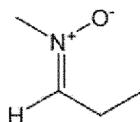
Figura 3: Análisis de "detección" de las sondas fluorescentes sobre las láminas funcionalizadas por nitronas, media sobre 5 láminas.

Figura 4: Espectro XPS global después de la funcionalización de las láminas nitronas por cicloadición con un cicloalquino forzado.

Ejemplo 1:

Cicloadición entre una nitrona y un derivado cicloalquino forzado que se opone en medio biológico.

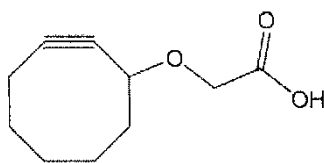
1. Síntesis de la N-propiliden-metilnitrona (4)



A una mezcla de *N*-metilhidroxilamina (835 mg; 10 mmoles) en etanol (15 ml) y de NaOMe (540 mg; 10 mmoles) se añaden 725 µl de propionaldehído **2** (10 mmoles). El conjunto se agita durante 1h a T_a . La solución se evapora hasta sequedad, se resuspende en CH_2Cl_2 , se filtra y el filtrado se purifica por cromatografía sobre gel de sílice ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 0-10%) para obtener la nitrona **4** en forma de sólido amarillo de masa 500 mg. El rendimiento es del 57%.

RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz): δ (ppm) 1,02 (t, $J = 7,5$ Hz, 3H, H_3); 2,40 (dq, $J = 1,0-7,5-6,0$, 2H, H_2); 3,59 (d, $J = 1,0$, 3H, H_4); 6,62 (t, $J = 6,0$, 1H, H_1);

2. Síntesis del ácido ciclooct-1-in-3-glicólico (18)



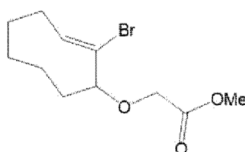
a) Síntesis del 8,8-dibromobiciclo[5,1,0]ciclooctano (16)



En un matraz seco y bajo argón se introducen 3,65 g de ciclohepteno **15** (38 mmoles) después 8,52 g de *t*-BuOK (76 mol) y 9 ml de pentano anhidro. La solución, colocada en un baño de hielo/sal ($T < -5^{\circ}\text{C}$), se agita vigorosamente después se añaden 4,9 ml de bromoformo (57 mmoles) en gota a gota. Una vez la adición terminada, la mezcla se deja volver hasta T_a durante la noche, bajo argón y agitación vigorosa. Aproximadamente 50 ml de agua son después añadidos y el pH se neutraliza con HCl 1M. Las fases orgánica y acuosa se separan; la fase acuosa se trata con 3x20 ml de pentano y la fase pentano se lava con 3x20 ml de agua. Después del secado sobre MgSO_4 , el disolvente se evapora a vacío para dar un aceite amarillo-anaranjado. El producto **16** se purifica después por filtración sobre sílice con, como eluyente, una mezcla ciclohexano/AcOEt 5%. Se obtiene entonces un aceite incoloro de masa total 9,10 g, equivalente a un rendimiento del 90% (lit. 52-65% para el 9,9-dibromobiciclo[6,1,0]nonano). R_f (ciclohexano 95/ AcOEt 5) = 0,85;

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): δ (ppm) 1,05-1,22 (m, 3H, H_{4-6}); 1,34 (qq, $J = 1,0-7,5$ Hz, 2H, H_{3-5}); 1,68 (ddd, $J = 1,5-4,0-10,5$ Hz, 2H, H_{1-7}); 1,76-1,92 (m, 3H, $\text{H}_{4'-3'-5'}$); 2,23 (dtq, $J = 14,0-6,0-1,0$ Hz, 2H, $\text{H}_{2'-6'}$);

b) Síntesis del 2-bromociclooct-1-en-3-glicolato de metilo (17)



A una solución de 8,8-dibromobiciclo[5,1,0]octano **16** (2,5 g; 9,3 mmoles) y de glicolato de metilo (6,35 ml; 83,9 mmoles) disuelto en 5 ml de tolueno anhidro en un matraz seco, bajo Ar y protegido de la luz por una película de aluminio, se añaden 3,85 g de perclorato de plata (18,6 mmoles). La reacción se agita durante 1 h 30 a temperatura ambiente, después las sales de plata se filtran sobre sinterizado y se lavan con AcOEt. La solución se concentra al vacío para dar un aceite viscoso marrón que se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (ciclohexano/AcOEt 2-15%), para obtener **17** en forma de aceite amarillo ($m = 1,7$ g, es decir 66% de rendimiento).

RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz): δ (ppm) 0,7-2,2 (m, 8H, $\text{H}_{4-4'-5-5'-6-6'-7-7'}$); 2,28 (m, 1H, H_8); 2,70 (ddd, $J = 5,0-11,5-23,5$ Hz, 1H, H_9); 3,72 (s, 3H, OMe); 3,94 (d, $J = 16,5$ Hz, 1H, H_9); 4,10 (dd, $J = 5,0-10,0$ Hz, 1H, H_3); 4,23 (d, $J = 16,5$ Hz, 1H, H_9); 6,20 (dd, $J = 4,0-11,5$ Hz, 1H, H_1);

b) Síntesis del ácido ciclooct-1-in-3-glicólico (18)

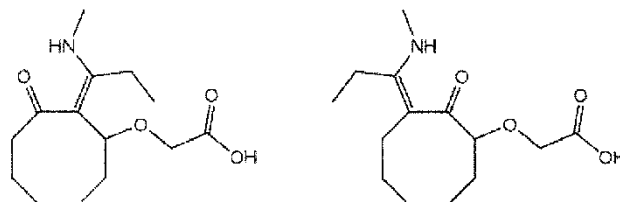
A una solución de 2-bromo-ciclooct-1-en-3-glicolato de metilo **17** (0,5 mmoles) en el DMSO anhidro a 60°C , se añaden 150 μl de 1,8-diazabicyclo[5,4,0]undec-7-eno (DBU, 1 mmol). Después de 15 min de agitación, se añaden 600 μl suplementarios de DBU (4 mmol), después se agita el conjunto a 60°C durante una noche. La mezcla se acidifica con HCl 1M y se extrae con AcOEt. La fase orgánica se filtra sobre filtro separador y se concentra a vacío. El ácido ciclooct-1-in-3-glicólico **18** se purifica sobre placa preparativa ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9/1) y se obtiene con un rendimiento del 55% ($m = 50$ mg).

RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz): δ (ppm) 1,3-2,3 (m, 10H, ciclo); 4,45 (d, $J = 17,0$ Hz, 1H, H_9); 4,50 (m, 1H, H_3); 4,58 (d, $J = 17,0$ Hz, 1H, H_9); 8,12 (s, 1H, H_{11});

3. Cicloadición

A una solución de **18** (70 mg; 0,38 mmol) en una mezcla de agua/THF (1 ml/200 μ l) se añade la nitrona **4** (33 mg; 0,38 mmol). El conjunto se agita a T_a durante 2 días. Después, el producto se extrae con CH_2Cl_2 y se concentra al vacío. Siendo el producto esperado demasiado polar para purificarse sobre gel de sílice y se realizan los análisis sobre el bruto de la reacción que revela un producto muy mayoritario.

El rendimiento de la reacción apreciado por medición del porcentaje de conversión en RMN es de aproximadamente el 85% (calculado a partir del pico residual de CH_{Nit}).



22a

22b

RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) 22a o b: δ (ppm) 0,8-2,3 (m, 13H, ciclo + H_{13}); 2,3-2,6 (m, 2H, H_{12-8}); 2,8-2,8 (m, 1H, H_{12}); 3,6-3,8 (m, 1H, H_3); 3,8-4,3 (m, 2H, $\text{H}_{9/9'}$); 8,30 (s, 1H, NH);

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 200 MHz) 22a o b: δ (ppm) 9,60 (C_{13}); 19,81 (C_{12}); 20,51; 22,57; 27,95; 31,70 (C_{5-8}); 44,27 (C_4); 44,36 (C_{14}); 66,42 (C_3); 79,48 (C_9); 133,72 (C_2); 135,83 (C_{11}); 173,26 (C_{10}); 213,69 (C_1);

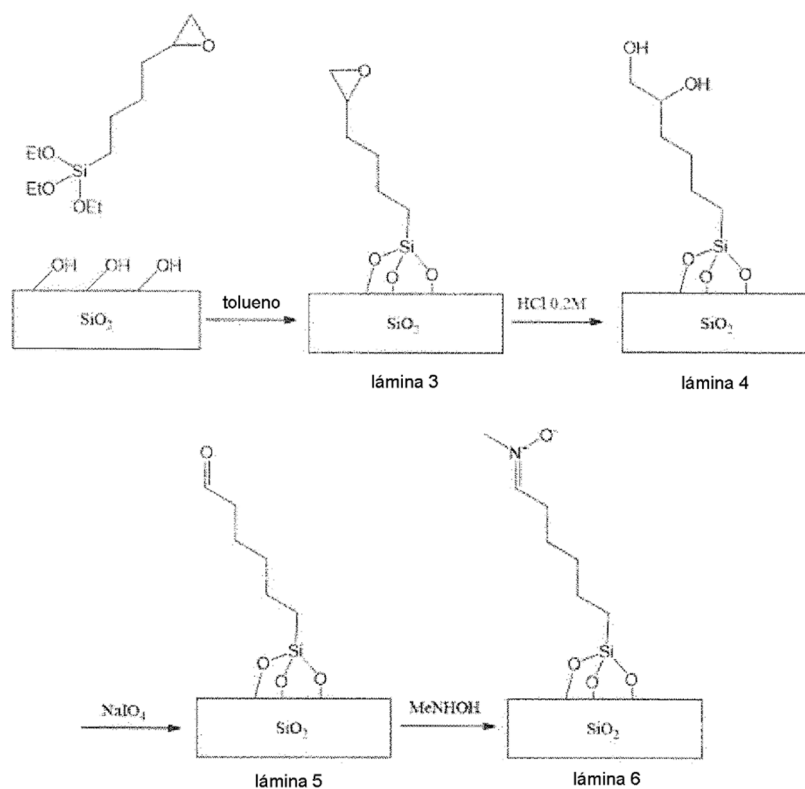
Masa ESI^+ m/z $[\text{M}-\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}+\text{H}]^+ = 212,4$ para 212,2;

Ejemplo 2:

Preparación de superficies funcionalizadas por unos grupos nitronas e injerto de una sonda fluorescente por reacción de cicloadición con un cicloalquino forzado

1. Preparación de las láminas de vidrio funcionalizadas por unas nitronas

Las superficies funcionalizadas por unas nitronas se obtiene mediante las 4 etapas siguientes:



Las láminas de vidrio se activan en primer lugar por una solución de Brown para hidroxilar la superficie. Después, se realiza la silanización en el tolueno en presencia de 5,6-epoxihexiltriatoxisilano a temperatura ambiente y en presencia de dietilamina para dar las láminas **3**. La apertura del epóxido en diol 1,2 se realiza en medio ácido, después se obtiene el aldehído por oxidación por el periodato de sodio en la superficie de las láminas **4**.

La última etapa consiste en la condensación de la *N*-metilhidroxilamina sobre el aldehído de las láminas **5** en el etanol, en presencia de metilato de sodio y a temperatura ambiente.

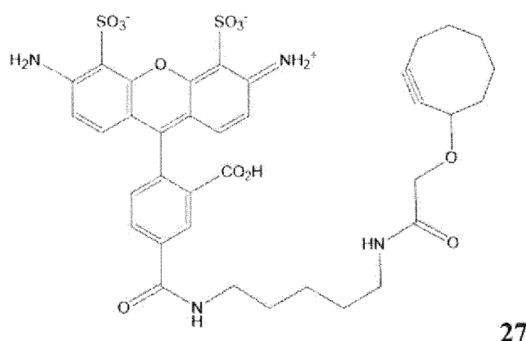
Las láminas **6** así obtenidas se caracteriza por sus espectros XPS (figura 1) y MIR-FTIR (figura 2).

Las señales correspondientes a Si (103 y 154 eV), a C (286 eV), a O (533 eV) y a N (399 eV) están presentes en el espectro XPS de las láminas **6**. La presencia del conjunto de estas señales certifica la funcionalización conseguida de la superficie de las láminas **6**.

Por espectro MIR-FTIR, la funcionalización de la lámina es también visible a la presencia de las bandas de vibración de elongación de CH₂ a 2931 y 2860 cm⁻¹.

2. Síntesis de Alexa-ciclooctina

A una solución de ácido ciclooct-1-in-3-glicólico **18** (10 mg; 55 µmol) en 250 µl de una mezcla DMF/agua (8/2) se añaden 1 µl de NEt₃ (7,4 µmoles), 16 mg de EDC(1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) (83 µmoles), 10 mg de HOBT (N-hidroxibenzotriazol) (74 µmoles) y 1 mg de Alexa 488 cadaverine **26** (1,5 µmol) (comercializada por INVITROGEN). La reacción se agita durante una noche a T_a y después se purifica por HPLC (Anexo E). La sonda Alexa-ciclooctina **27** se obtiene con un rendimiento evaluado al 25% por cuantificación UV a partir de la ley de Beer-Lambert.



Masa ESI⁻ m/z: [M-Na]⁻ = 781,3 para 781,2;

3. Injerto por cicloadición entre nitrona de superficie y sonda fluorescente que lleva un cicloalquinoforzado

Se han ensayado 6 concentraciones diferentes en sondas fluorescentes, (en presencia del 10% de glicerol, a fin de facilitar la lectura de los resultados)

Las concentraciones seleccionadas son 50-100-250-500-750-1000 nM. El plan de depósito se representa esquemáticamente por la tabla 1 siguiente.

TABLA 1

Sonda 26 (control en sextuplicado)	Sonda 27 (control en sextuplicado)
50 nM	50 nM
100 nM	100 nM
250 nM	250 nM
500 nM	500 nM
750 nM	750 nM
1 µM	1 µM

El depósito de gotas de sondas fluorescentes se ha llevado a cabo sobre las láminas **6** (funcionalizadas en superficie por unos grupos nitrona). Los resultados se presentan en la figura 3.

La intensidad media de fluorescencia depende de la concentración en sonda fluorescente.

Para verificar que la señal observada con la sonda Alexa-ciclooctina **27** sobre las láminas se debe a la funcionalización de la superficie por química entre cicloalquino forzado y nitrona, se ha procedido a la caracterización de sustratos Si/SiO₂ funcionalizados con el grupo nitrona e incubados una noche en una solución de la sonda Alexa-ciclooctina 27 a una concentración de 250 nM mediante medición del ángulo de contacto y espectro XPS.

Los ángulos de contacto medidos sobre unos sustratos Si/SiO₂ funcionalizados de manera idéntica (llevando unos nitronas) antes y después de la funcionalización por química(s) sobre alquino forzado se resumen en la tabla 2.

TABLA 2

Sustratos	$\theta_{inicial}$	θ_{final}
Sustrato nitrona (tipo lámina 6)	47,3°	53,5°

Para las superficies de tipo lámina 6, relativamente hidrófilas, el injerto de un fluoróforo que posee múltiples núcleos aromáticos hidrófobos hace la superficie de las láminas más hidrófobas.

De la misma manera, la modificación de las láminas 6 por incubación con la sonda Alexa-ciclooctina **27** es visible por análisis XPS.

La figura 4 da cuenta de este análisis.

La señal del nitrógeno se queda globalmente de misma forma que anteriormente, pero con un aumento de la señal a 399.6 eV, que da cuenta del injerto de la sonda Alexa-ciclooctina **27** (que comprende varios nitrógenos).

Además, como se muestra en la tabla 3 siguiente, las relaciones atómicas N/Si_{2p} y C/Si_{2p} aumentan después de la incubación con la sonda Alexa-ciclooctina **27** lo que indica el éxito del injerto.

TABLA 3

Relaciones atómicas	Antes de la incubación	Después de la incubación
N/Si _{2p}	0,043	0,078
C/Si _{2p}	0,396	0,804

El conjunto de estos análisis de la superficie de las láminas después de la incubación con la sonda Alexa-ciclooctina 27 permite finalizar una funcionalización de la superficie de las láminas 6 por reacción de cicloadición [3+2] entre nitronas y cicloalquinos forzados.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento útil para injertar al menos una molécula de interés a una entidad anexa que comprende al menos las etapas que consisten en

- disponer de dicha molécula provista, en superficie, de al menos un grupo G1 reactivo según una reacción de cicloadición 1,3-dipolar, y

- poner en presencia dicha molécula con dicha entidad provista en superficie de al menos un grupo G2 complementario del grupo G1 enfrente de dicha cicloadición 1,3-dipolar, en condiciones propicias para la cicloadición de dichos grupos G1 y G2.

caracterizado por que dichos grupos G1 y G2 son respectivamente una nitrona y un radical cicloalquinilo forzado o viceversa.

2. Procedimiento según la reivindicación anterior, en el que la cicloadición se realiza en medio acuoso.

3. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la cicloadición se realiza a una temperatura ambiente o corporal.

4. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha molécula de interés se selecciona entre los marcadores, los colorantes, los fluoróforos, las moléculas radiomarcadas, los agentes de contraste (rayos X, IRM), los líncers, las toxinas, los activos terapéuticos, cosméticos, fitosanitarios, los miembros de un par ligando específico, los péptidos, los aminoácidos y los restos de aminoácido, los polipéptidos, los azúcares y los restos de azúcar, los fotosensibilizadores, las porfirinas de los compuestos que presentan una isomería cis-trans tales como los derivados de diariletilenos, espiropiranos, espiroxazinas, fulgidos y azobenceno.

5. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha molécula es biológica.

6. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la entidad anexa es también una molécula de interés.

7. Procedimiento según la reivindicación anterior, en el que una de las moléculas de interés es un agente de contraste.

8. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la entidad anexa es un sustrato.

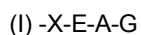
9. Procedimiento según la reivindicación anterior, en el que el sustrato se selecciona entre unas superficies de tipo metálico, semiconductor, óxido, tales como alúminas, SiO₂, TiO₂, orgánicos y biológicos.

10. Procedimiento según la reivindicación anterior, en el que la superficie está nanoestructurada.

11. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el radical cicloalquinilo es un radical ciclooctinilo.

12. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el grupo cicloalquinilo forzado está enlazado de manera covalente a la molécula de interés o a la entidad anexa por medio de un brazo espaciador.

13. Procedimiento según la reivindicación anterior, en el que el brazo espaciador es de fórmula



en la que

- X, enlazado a la molécula de interés o a la entidad anexa considerada, es el producto de reacción de dos funciones reactivas,

- E es un grupo espaciador orgánico,

- A representa un enlace simple o un grupo seleccionado entre -CONH-, -NHCO-, OCH₂CONH-, -NHCOCH₂O-, -O-, -S-, y

- G es el grupo cicloalquinilo forzado.

14. Procedimiento según la reivindicación anterior, en el que E es una cadena poli(etilen)glicol.

15. Procedimiento según la reivindicación 1, útil para el marcado de una molécula de interés o de un sustrato por un agente de contraste que comprende al menos las etapas que consisten en:

5 - disponer dicha molécula de interés o dicho sustrato provisto, en superficie, de al menos un grupo G1 reactivo según una reacción de cicloadición 1,3-dipolar, y

10 - poner en presencia dicha molécula de interés o dicho sustrato con dicho agente contrastante provisto en superficie de al menos un grupo G2 complementario del grupo G1 frente a dicha cicloadición 1,3-dipolar, en condiciones propicias a la cicloadición de dichos grupos G1 y G2,

siendo dichos grupos G1 y G2 respectivamente una nitrona y un radical cicloalquinilo forzado o viceversa.

Figura 1

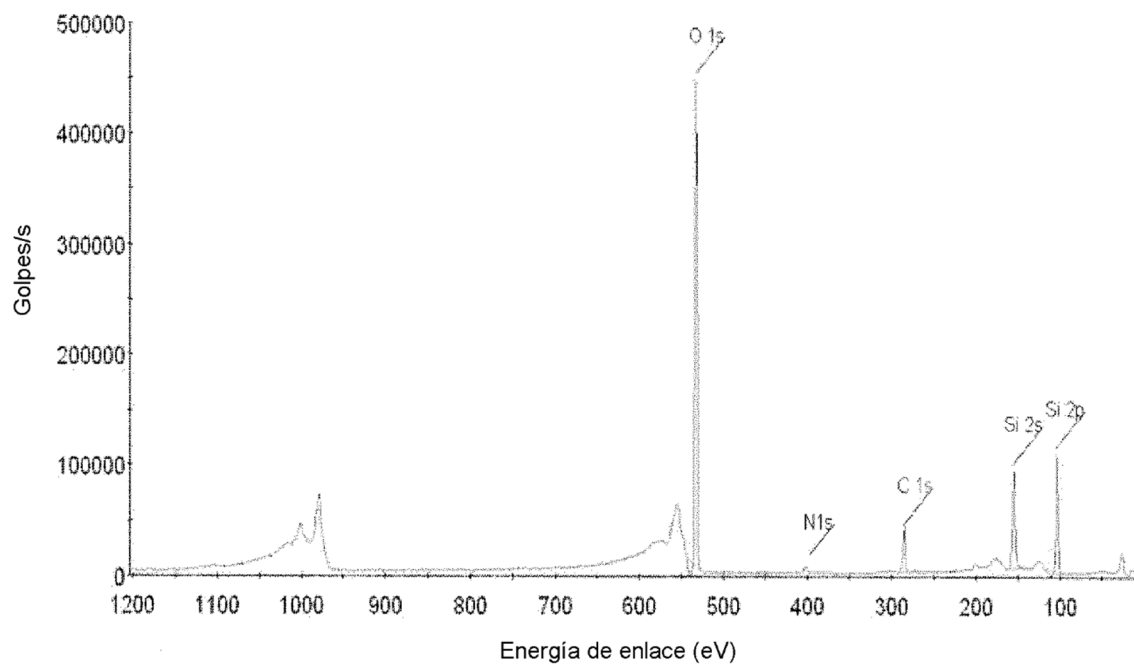


Figura 2

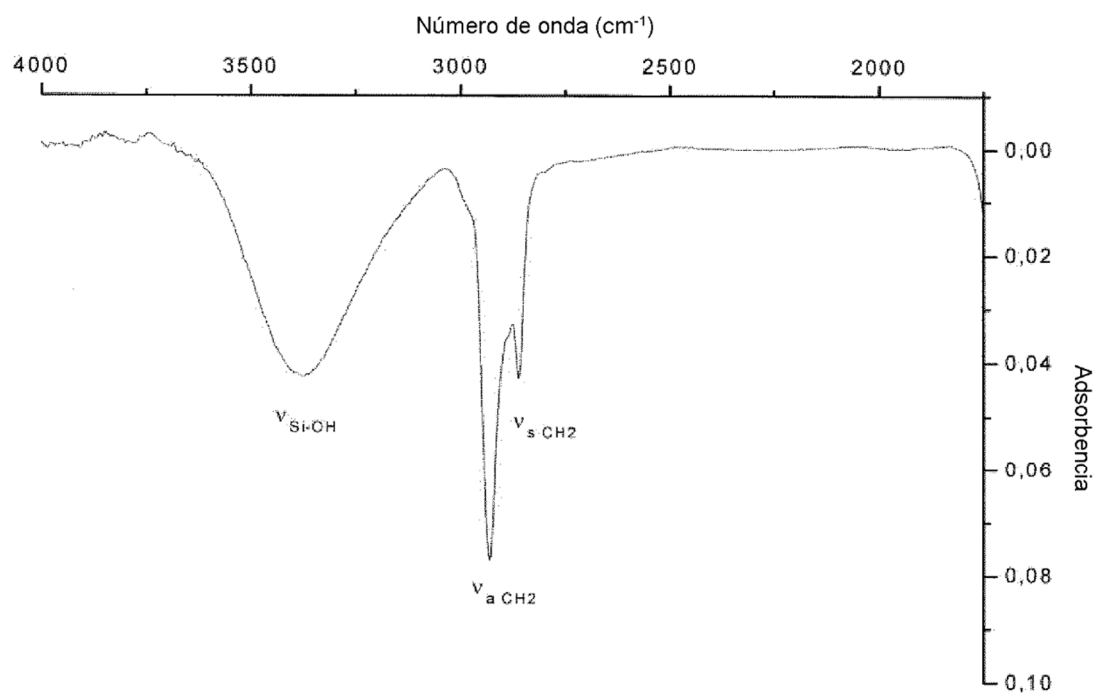


Figura 3

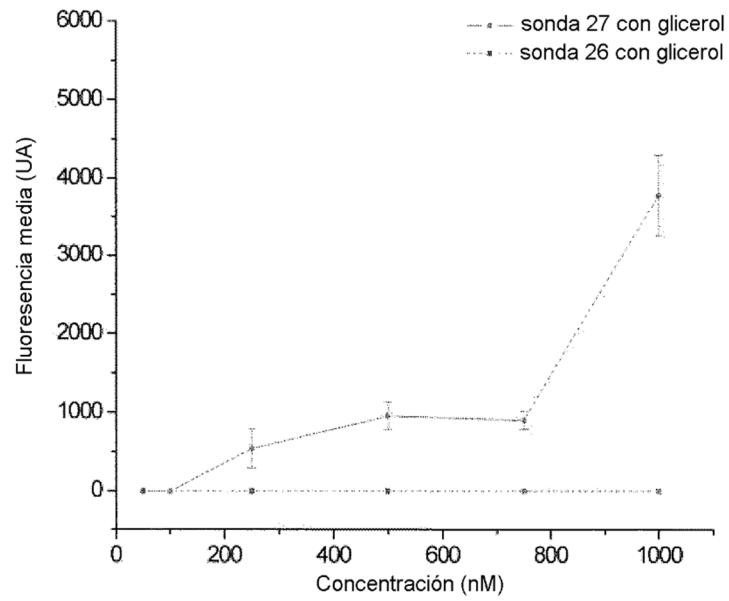


Figura 4

