

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 699 312**

51 Int. Cl.:

G01N 33/533 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.08.2010 E 15150363 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.10.2018 EP 2889624**

54 Título: **Enlace covalente reversible de moléculas funcionales**

30 Prioridad:

10.08.2009 GB 0913965

10.08.2009 GB 0913967

14.08.2009 GB 0914321

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

08.02.2019

73 Titular/es:

**UCL BUSINESS PLC (100.0%)
The Network Building 97 Tottenham Court Road
London, W1T 4TP, GB**

72 Inventor/es:

**SMITH, MARK;
CADDICK, STEPHEN;
BAKER, JAMES y
CHUDASAMA, VIJAY**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 699 312 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

Enlace covalente reversible de moléculas funcionales

5 **Introducción**

Es bien sabido que puede ser deseable unir dos o más moléculas entre sí que posean cada una propiedades funcionales específicas. De esta manera, es posible generar nuevas moléculas, conocidas como conjugados, que tienen las características combinadas de sus componentes. Esta técnica proporciona un medio atractivo para modificar las propiedades existentes de moléculas funcionalmente útiles, o para añadir aspectos funcionales completamente nuevos a tales moléculas, de una manera controlada y de aplicación amplia.

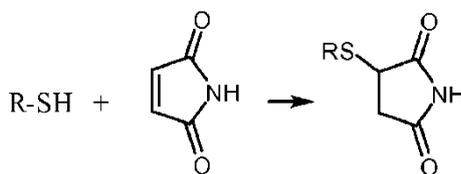
La posibilidad de conjugar entre sí dos o más compuestos funcionales ha suscitado un interés particularmente alto en el campo de la biotecnología. La conjugación de biomoléculas tales como proteínas o moléculas biológicamente activas, tales como fármacos, a un compuesto funcional secundario ha sido utilizada en una extensa variedad de aplicaciones, incluyendo técnicas de detección, estudios de proteómica, métodos de purificación y en el diagnóstico y tratamiento de una enfermedad. Es tal la ubiquidad de estas metodologías que actualmente existen libros de texto convencionales dedicados por completo a este tema. Un libro de texto de este tipo es "Bioconjugate Techniques" (Greg T. Hermanson, Academic Press Inc., 1996), cuyo contenido se incorpora a la presente memoria a modo de referencia en su totalidad.

Los métodos para unir entre sí diversos compuestos funcionales se centran generalmente en el uso de moléculas reticulantes pequeñas. Un reactivo de unión de este tipo contiene al menos dos grupos funcionales. Cada uno de estos grupos funcionales es capaz de reaccionar con una molécula funcional para generar una molécula conjugada reticulada final.

Una amplia variedad de grupos funcionales para reactivos reticulantes han sido desarrollados para reaccionar con grupos funcionales diana específicos presentes en las moléculas funcionales que van a ser unidas entre sí. Por ejemplo, reticulantes que contienen grupos éster activados tales como los ésteres de N-hidroxisuccinimida han sido utilizados durante mucho tiempo para reaccionar con fracciones funcionales que contienen grupos amina reactivos, tales como proteínas. Los reticulantes que contienen hidrazida (por ejemplo, dihidrazida de ácido adípico), han sido utilizados para funcionalizar moléculas funcionales que contienen carboxilo tales como glicoproteínas.

La reticulación de una molécula funcional con otra puede además conseguirse estableciendo como diana un grupo tiol reactivo en una molécula funcional. Este enfoque puede ser particularmente atractivo cuando la molécula funcional en cuestión es un péptido o una proteína. Una de las razones se basa en que los restos de cisteína que contienen tiol habitualmente tienen una baja presencia natural en las proteínas, abriendo, por tanto, la posibilidad a procedimientos de modificación altamente selectivos. Las técnicas estándar de mutagénesis dirigida también permiten la fácil inserción de un resto de cisteína en una localización específica en una proteína, generando así un grupo tiol reactivo, que puede entonces ser modificado por una fracción funcional mediante un reticulante adecuado.

Diversos compuestos han sido utilizados como reactivos de unión capaces de reaccionar con un grupo tiol. Estos reactivos incluyen derivados de eteno 1,2-dicarbonílico, compuestos α -halo carbonilo y tiosulfonatos. De estos, los derivados de eteno 1,2-dicarbonílico, tales como las maleimidas, son conocidos por ser los reactivos más selectivos para la reacción con un tiol, en particular con una fracción de cisteína. El grupo tiol en una molécula funcional que contiene tiol ("R-SH") reacciona con la maleimida para producir un enlace tioéter tal como se indica a continuación:



La fracción de amida reactiva en la maleimida está disponible para reaccionar con un compuesto funcional adicional, para producir un conjugado en el que la molécula funcional que contiene tiol se une a una fracción funcional adicional. Los reactivos de maleimida son por lo tanto útiles para conjugar proteínas que contienen cisteína con varias moléculas secundarias (por ejemplo, un fluoróforo, biotina, un polietilenglicol o un carbohidrato). Estas moléculas secundarias están a menudo unidas al anillo de maleimida mediante una especie químicamente inerte de enlazador.

Desgraciadamente, sin embargo, este enfoque a la generación de conjugados presenta varias desventajas. Por ejemplo, habitualmente la manipulación química del producto de reacción únicamente es posible en la fracción de amida. Esto significa que puede ser difícil añadir más de un grupo funcional adicional al compuesto que contiene tiol con un único enlazador de maleimida. Además, el enlace tioéter formado entre la molécula funcional que contiene tiol y el reticulante de maleimida es irreversible. Por consiguiente, la derivatización efectuada mediante el reticulante

es permanente y no es posible regenerar el reactivo nativo que contiene tiol.

La irreversibilidad de la reacción de derivatización conocida entre un reactivo que contiene tiol y un reticulante puede presentar serias limitaciones en lo referente a su utilidad práctica en áreas tales como purificación de proteínas, análisis proteómico cuantitativo, en la hibridación de sitios de unión, en posibilitar estudios estructurales y en la administración de fármacos. Por ejemplo, en un método de purificación que implique la generación de un conjugado entre una proteína que contenga tiol y una etiqueta de afinidad (tal como la biotina), no sería posible regenerar la proteína nativa después de la purificación eliminando la maleimida. La incapacidad para regenerar los reactivos que contienen tiol puede ser también un problema grave cuando se llevan a cabo procedimientos que implican proteínas que son difíciles de expresar, tales como muchos GPCR (receptores acoplados a proteínas G). La irreversibilidad del proceso de reticulación también impide la explotación de la metodología de bioconjugados en áreas donde la labilidad del enlace entre el reticulante y la proteína es importante (por ejemplo, donde la entidad de reticulación se diseña para bloquear la actividad de una enzima durante únicamente un periodo limitado y preferiblemente controlable).

La presente invención se basa en el sorprendente hallazgo de que es ventajoso incorporar un grupo saliente electrófilo al enlace doble C=C de un conocido reactivo reticulante eteno 1,2-dicarbonílico. Esa modificación química permite que una fracción funcional que contenga tiol, tal como un péptido o una proteína, se una al reactivo reticulante a la vez que conserva el enlace doble C=C. Esto presenta las siguientes ventajas:

- La reacción entre el reticulante y el compuesto tiol puede ser realizada a menudo rápidamente y con un elevado rendimiento, utilizando únicamente una cantidad sustancialmente estequiométrica del reticulante.
- El enlace tioéter entre el reticulante y la molécula que contiene tiol es fácilmente reversible, y en particular puede escindirse de forma controlada en un momento elegido por el experto en la materia.
- El mantenimiento del enlace doble en el compuesto obtenido después de enlazar la fracción que contiene tiol al reticulante, constituye un sitio de reacción para enlazar compuestos funcionales adicionales. Puede por lo tanto resultar más sencillo añadir fracciones funcionales al conjugado.

La nueva metodología de reticulación se puede aplicar fácilmente a través de todo el espectro completo de métodos conocidos que implican la conjugación de fracciones funcionales, lo que actualmente se está realizando de forma rutinaria en la técnica.

La patente US-4.680.272 describe el uso de maleimidias halogenadas y derivados de las mismas como una "tinción" fluorescente para detectar proteínas que tienen grupos amina o tiol. La patente US-4.680.272 no divulga, sin embargo, el uso de reactivos de reticulación de eteno 1,2-dicarbonílico que tengan un grupo saliente electrófilo en el enlace doble C=C para construir moléculas conjugadas, ni que el enlace formado entre un compuesto tiol y un reticulante de ese tipo sea fácilmente reversible y puede a menudo realizarse a un elevado rendimiento utilizando una cantidad sustancialmente estequiométrica del reticulante.

Smith et al. (J. Am. Chem. Soc., 2010, 132, pp 1960-1965) describe la modificación de proteínas, la bioconjugación y el puente disulfuro utilizando bromomaleimidias.

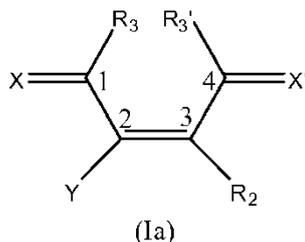
En Hong et al. (J. Am. Chem. Soc., 2009, 131 (29), págs. 9986-9994) se describe una nueva clase de sondas fluorogénicas para tioles basada en una estructura 7-oxanorbomadieno. En un experimento específico descrito en este artículo, un reactivo 7-oxanorbomadieno que lleva una fracción fluorogénica de dansilo se hizo reaccionar con albúmina de suero bovino. El producto resultante se sometió a una reacción retro-Diels-Alder para generar un producto que comprende una fracción de reticulación de maleimida que lleva la albúmina de suero bovino en un átomo de carbono del enlace doble C=C y un átomo de hidrógeno del enlace doble C=C. En Hong et al. no se describe, sin embargo, el uso de etenos 1,2-dicarbonílicos que llevan un grupo saliente electrófilo como reactivos para construir una molécula conjugada.

En la patente US-7.504.430 B2 y en Kar et al. (Mol. Cáncer Ther 2006;5(6) Junio de 2006 págs. 1511- 1519) se describe un proceso para producir compuestos farmacéuticos que contienen maleimida en los que un derivado de 3,4-dibromomaleimida se hace reaccionar con compuestos mercapto-alquílicos pequeños, opcionalmente sustituidos. Estos documentos no describen, sin embargo, procesos para construir moléculas conjugadas que comprenden al menos dos fracciones funcionales según se definen en la presente memoria, ni que el enlace formado entre un compuesto tiol y un reticulante de acuerdo a la presente invención, sea fácilmente reversible y pueda a menudo ser realizado con un elevado rendimiento utilizando una cantidad esencialmente estequiométrica del reticulante.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona (1) el uso de un compuesto de fórmula (Ia) como un reactivo para unir un compuesto de fórmula R₁-H que comprende una primera fracción funcional de fórmula F₁ a una segunda fracción

funcional de fórmula F₂



5 en la que:

- X y X' representan cada uno oxígeno;
- Y es un grupo saliente electrófilo;
- R₃ y R₃' juntos forman un grupo de fórmula -N(R_{33'})-N(R_{33'})-, en la que cada R_{33'} es igual o diferente y representa un átomo de hidrógeno o un grupo de fórmula Y, Nu, -(Z)_n o IG;
- R₁ es un grupo de fórmula -F₁ o -S-L-F₁ y R₁-H comprende al menos un primer grupo SH;
- R₂ representa un átomo de hidrógeno o un grupo de fórmula Y, Nu, -(Z)_n o IG;
- cada grupo de fórmula Y es igual o diferente y representa un grupo saliente electrófilo;
- cada grupo de fórmula Nu es igual o diferente y representa un nucleófilo seleccionado de -OH, -SH, -NH₂ y -NH(alquilo C₁₋₆);
- cada grupo de fórmula L es igual o diferente y representa un grupo enlazador;
- cada grupo de fórmula Z es igual o diferente y representa un grupo reactivo unido a un grupo de fórmula L que es capaz de reaccionar con un compuesto que contiene una segunda fracción funcional de fórmula F₂ de manera que dicha segunda fracción funcional se une a dicho grupo de fórmula L;
- n es 1, 2 o 3; y
- cada grupo de fórmula IG es igual o diferente y representa una fracción que es un grupo alquilo C₁₋₂₀, un grupo alqueno C₂₋₂₀ o un grupo alquino C₂₋₂₀, que está sin sustituir o está sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados de átomos de halógeno y grupos de ácido sulfónico, y en el cual (a) 0, 1 o 2 átomos de carbono se reemplazan por grupos seleccionados de arileno C₆₋₁₀, heteroarileno de 5 a 10 miembros, carbociclileno C₃₋₇ y grupos heterociclileno de 5 a 10 miembros, y (b) 0, 1 o 2 grupos -CH₂- se reemplazan por grupos seleccionados entre grupos -O-, -S-, -S-S-, -C(O)- y -N(alquilo C₁₋₆)-, en la que:

- (i) dichos grupos arileno, heteroarileno, carbociclileno y heterociclileno están sin sustituir o están sustituidos con uno o más sustituyentes seleccionados de átomos de halógeno y alquilo C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆, alquiltiol C₁₋₆, -N(alquilo C₁₋₆)(alquilo C₁₋₆), grupos nitro y ácido sulfónico; y
- (ii) 0, 1 o 2 átomos de carbono en dichos grupos carbociclileno y heterociclileno están reemplazados por grupos -C(O)-; y

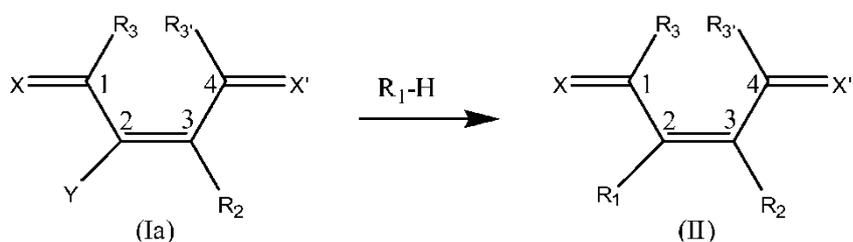
– o:

- una de la primera fracción funcional y la segunda fracción funcional es una proteína que es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que es capaz de unirse a un antígeno específico a través de un epítipo en el antígeno, y la otra de la primera fracción funcional y la segunda fracción funcional es un fármaco o
- una de la primera fracción funcional y la segunda fracción funcional es una fracción polimérica seleccionada de péptidos, proteínas, polisacáridos, poliéteres, poliaminoácidos, poli(alcoholes vinílicos), polivinilpirrolidonas, poli(ácido(met)acrílico, poliuretanos y polifosfazenos, y la otra de la primera fracción funcional y la segunda fracción funcional es un fármaco; o
- una de la primera fracción funcional y la segunda fracción funcional es una proteína que es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que es capaz de unirse a un antígeno específico a través de un epítipo en el antígeno, y la otra de la primera fracción funcional y la segunda fracción funcional es una fracción detectable seleccionada del grupo que consiste en fracciones cromogénicas, fracciones fluorescentes, fracciones radiactivas y fracciones electroquímicamente activas;

en la que el grupo R₁ se une al compuesto de fórmula (Ia) mediante el ataque nucleófilo del primer grupo SH en el compuesto de fórmula R₁-H en la posición 2 del compuesto de fórmula (Ia), de manera que el grupo Y en la posición 2 se reemplaza por el grupo R₁.

La presente invención también proporciona (2) un proceso para producir un conjugado, proceso que comprende

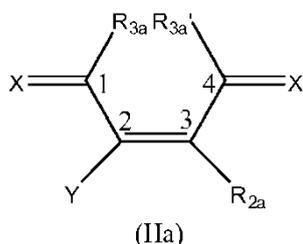
- (i) hacer reaccionar un compuesto que contiene una fracción de fórmula (Ia) con un compuesto de fórmula R₁-H, produciendo así un compuesto que contiene una fracción de fórmula (II)



(ii) unir posteriormente una fracción de fórmula F_2 a dicha fracción de fórmula (II);

5 en la que la etapa (i) implica unir el grupo R_1 mediante el ataque nucleófilo del primer grupo SH en el compuesto de fórmula R_1-H en la posición 2 de la fracción de fórmula (Ia), de manera que el grupo Y en la posición 2 se reemplaza por el grupo R_1 ,
y en la que X, X', Y, R_1 , R_2 , R_3 , R_3' y F_2 son todos como se ha definido en el punto (1) anterior.

10 La presente invención proporciona además (3) un proceso para producir un conjugado, proceso que comprende hacer reaccionar un compuesto de fórmula R_1-H con un compuesto de fórmula (IIa)

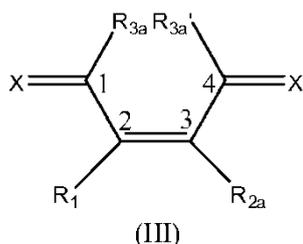


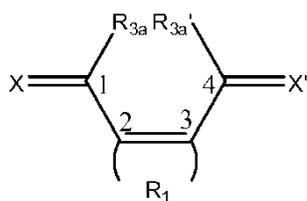
15 en la que:

- R_{3a} y R_{3a}' juntos forman un grupo de fórmula $-N(R_{33a})-N(R_{33a}')$, en la que cada R_{33a}' es igual o diferente y representa un grupo de fórmula R_{33} o un grupo de fórmula F_2 o $-L(F_2)_m(Z)_{n-m}$;
- R_{2a} representa un grupo de fórmula R_2 o un grupo de fórmula F_2 o $-L(F_2)_m(Z)_{n-m}$;
- 20 - m es un número entero que tiene un valor de cero a n;
- el compuesto de fórmula (IIa) comprende al menos un grupo de fórmula F_2 ;
- F_2 es como se define en el punto (1) anterior;
- X, X', R_3 , R_3' , R_{33} , R_2 , L, Z y n son todos como se ha definido en el punto (1) anterior;
- R_1 es como se define en el punto (1) anterior; y
- 25 - el proceso implica unir el grupo R_1 mediante el ataque nucleófilo del primer grupo SH en el compuesto de fórmula R_1-H en la posición 2 del compuesto de fórmula (IIa), de modo que el grupo Y en la posición 2 se reemplaza por el grupo R_1 .

Aún más, la presente invención proporciona (4) un proceso que comprende

- 30 (i) proporcionar un compuesto de fórmula (III) o (IIIa); y
(ii) escindir el enlace entre el grupo R_1 y el átomo de carbono en la posición 2 del compuesto de fórmula (III) o (IIIa)





en la que:

- 5
- R_{3a} y $R_{3a'}$ juntos forman un grupo de fórmula $-N(R_{33a})-N(R_{33a'})-$, en la que cada $R_{33a'}$ es igual o diferente y representa un grupo de fórmula R_{33} o un grupo de fórmula F_2 o $-L(F_2)_m(Z)_{n-m}$;
 - R_{2a} representa un grupo de fórmula R_2 o un grupo de fórmula F_2 o $-L(F_2)_m(Z)_{n-m}$;
 - m es un número entero que tiene un valor de cero a n ;
 - R_1 es como se define en el punto (1) anterior;
- 10
- F_2 es como se define en el punto (1) anterior;
 - X , X' , R_3 , R_3' , R_{33} , R_2 , L , Z y n son todos como se ha definido en el punto (1) anterior.

y en la que cuando el proceso implica el compuesto de fórmula (IIIa):

- 15
- R_1 del compuesto de fórmula (IIIa) comprende al menos un primer grupo tiol y un segundo grupo tiol, estando dicho primer grupo tiol unido a la posición 2 en el compuesto de fórmula (IIIa) y estando un segundo grupo tiol unido a la posición 3 en el compuesto de fórmula (IIIa); y
 - la etapa (ii) implica además escindir el enlace entre el grupo R_1 y el átomo de carbono en la posición 3 de la fracción de fórmula (IIIa).
- 20

La presente invención proporciona además (5) un compuesto, compuesto que es:

- (A) un compuesto de fórmula (IIa) como se define en el punto (3) anterior; o
- 25
- (B) un compuesto de fórmula (III) como se define en el punto (4) anterior, que comprende al menos un grupo de fórmula F_2 y en la que R_{2a} no es un átomo de hidrógeno.

La presente invención también proporciona (6) un compuesto de fórmula (IIIa) como se define en el punto (4) anterior.

30 Aún más, la presente invención proporciona (7) un proceso que es:

(A) un proceso para detectar si una sustancia está presente en una muestra, proceso que comprende:

- 35
- proporcionar un compuesto como se define en (B) del punto (5) anterior, del punto (6) anterior que comprende al menos un grupo de fórmula F_2 , en la que una de dicha primera fracción funcional y dicha segunda fracción funcional es una fracción funcional que es capaz de generar una señal detectable y la otra de dicha primera fracción funcional y dicha segunda fracción funcional es una fracción funcional que es capaz de interactuar con dicha sustancia;
 - incubar dicha muestra con dicho compuesto; y
 - 40 - rastrear una señal en condiciones que permitan la generación de una señal detectable de dicha fracción funcional que sea capaz de generar una señal detectable; o

(B) un proceso para identificar si una sustancia interactúa con una fracción funcional de fórmula R_1 , proceso que comprende:

- 45
- producir un conjugado que comprende (a) dicha fracción funcional de fórmula R_1 y (b) una fracción detectable que es capaz de producir una señal que puede ser modificada por dicha sustancia, llevando a cabo un proceso de acuerdo con uno de los puntos (2) y (3) anteriores;
 - incubar dicho conjugado con dicha sustancia;
 - 50 - obtener una señal de dicha fracción detectable; y
 - comparar dicha señal con una señal de control obtenible cuando dicho conjugado no ha sido puesto en contacto con la sustancia, determinando así si la sustancia interactúa con el conjugado.

Descripción detallada de la invención

55 Tal como se utiliza en la presente memoria la expresión "fracción funcional" significa una fracción que forma parte de

un conjugado y que es una de entre una fracción detectable, una fracción enzimáticamente activa, una etiqueta de afinidad, un hapteno, un vehículo inmunogénico, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, un antígeno, un ligando, una fracción biológicamente activa, un liposoma, una fracción polimérica, un aminoácido, un péptido, una proteína, una célula, un carbohidrato, un ADN y un ARN.

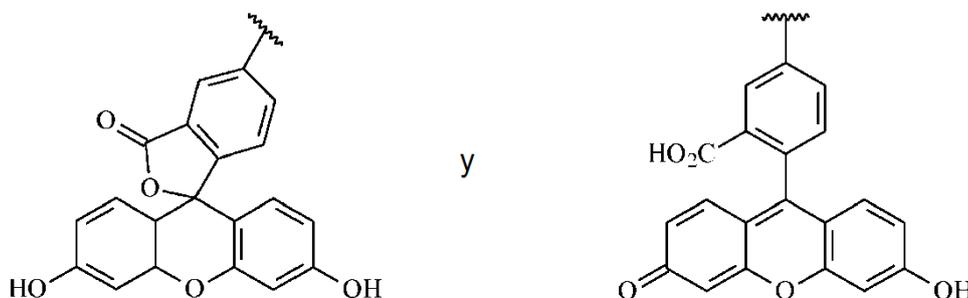
Como entenderán fácilmente los expertos en la materia, una fracción funcional comprendida en un compuesto (por ejemplo, en una molécula conjugada) se puede obtener uniendo un correspondiente "compuesto funcional" a la misma. Cuando un compuesto funcional se une a un compuesto secundario, es necesario que un enlace en algún lugar de ese compuesto funcional se rompa, de manera que pueda formarse un nuevo enlace con el compuesto secundario. Ejemplos de tales procesos incluyen la pérdida de un grupo saliente del compuesto funcional cuando se convierte en una fracción funcional unida a la molécula secundaria, la pérdida de un protón cuando el compuesto funcional reacciona a través de un grupo nucleófilo que contiene un átomo de hidrógeno, tal como un grupo OH o SH, o la conversión de un enlace doble en el compuesto funcional en un enlace sencillo cuando el compuesto funcional reacciona con el compuesto secundario a través de una reacción adicional electrófila o nucleófila. Los expertos en la materia entenderían, por tanto, que una fracción funcional que es, por ejemplo, una "proteína" significa una fracción que se forma por la incorporación de un compuesto proteico a una molécula secundaria, con pérdida concomitante de un enlace interno en comparación con el correspondiente compuesto proteico (por ejemplo, pérdida de un protón de una fracción -OH, -SH o -NH₂ cuando tal fracción forma el enlace con la molécula secundaria).

Una fracción funcional es habitualmente una fracción que tiene una significación biológica discreta en su forma nativa (es decir, cuando no es parte de un bioconjugado). Preferiblemente, cualquier fracción funcional utilizada en la presente invención tiene un peso molecular relativo de al menos 200, más preferiblemente al menos 500, lo más preferiblemente al menos 1.000. Preferiblemente, una fracción funcional según se describe en la presente memoria es una biomolécula.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "fracción detectable" significa una fracción que es capaz de generar señales detectables en una muestra de ensayo. Claramente, puede entenderse que la fracción detectable es una fracción que se obtiene de un correspondiente "compuesto detectable" y que conserva su capacidad para generar una señal detectable cuando está unida a otra fracción funcional a través de un reticulante en un conjugado de la presente invención. Las fracciones detectables son también comúnmente conocidas en la técnica como "etiquetas", "sondas" y "marcadores". Ejemplos de fracciones detectables incluyen fracciones cromogénicas, fracciones fluorescentes, fracciones radiactivas y fracciones electroquímicamente activas. En la presente invención, las fracciones detectables preferidas son fracciones cromogénicas y fracciones fluorescentes. Las fracciones fluorescentes son las más preferidas.

Una fracción cromogénica es una fracción que está coloreada, que se colorea cuando se incorpora a un conjugado, o que se colorea cuando se incorpora a un conjugado y el conjugado posteriormente interactúa con una especie diana secundaria (por ejemplo, cuando el conjugado comprende una proteína que interactúa después con otra molécula diana).

Generalmente, la expresión "fracción cromogénica" hace referencia a un grupo de átomos asociados que pueden existir en al menos dos estados de energía, un estado fundamental de energía relativamente baja y un estado excitado al que puede elevarse mediante la absorción de energía luminosa de una región específica del espectro de radiación. Con frecuencia, el grupo de átomos asociados contiene electrones deslocalizados. Las fracciones cromogénicas adecuadas para su uso en la presente invención incluyen fracciones de conjugados que contienen sistemas π y complejos metálicos. Ejemplos incluyen porfirinas, polienos, políinos y poliarilos. Las fracciones cromogénicas preferidas son



Una fracción fluorescente es una fracción que comprende un fluoróforo, que es una fracción química fluorescente. Ejemplos de compuestos fluorescentes que se incorporan comúnmente como fracciones fluorescentes a moléculas secundarias tales como conjugados incluyen:

- la familia de colorantes Alexa Fluor®, disponible en Invitrogen;

- cianina y merocianina;
- la familia de colorantes BODIPY (boro-dipirrometeno), disponible en Invitrogen;
- la familia de colorantes ATTO fabricada por ATTO-TEC GmbH;
- fluoresceína y sus derivados;
- 5 – rodamina y sus derivados;
- derivados del naftaleno tales como sus derivados dansilo y prodan;
- piridiloxazol, nitrobenzoxadiazol y derivados del benzoxadiazol;
- cumarina y sus derivados;
- derivados de pireno; y
- 10 – Verde Oregón, eosina, rojo Texas, azul cascada y rojo Nilo, disponible en Invitrogen.

Las fracciones fluorescentes preferidas para uso en la presente invención incluyen fluoresceína, rodamina, cumarina, cloruro ácido de sulforodamina 101 (rojo Texas) y dansilo. La fluoresceína y el dansilo son especialmente preferidos.

15 Una fracción radiactiva es una fracción que comprende un radionucleido. Ejemplos de radionucleidos incluyen yodo-131, yodo-125, bismuto-212, itrio-90, itrio-88, tecnecio-99m, cobre-67, renio-188, renio-186, galio-66, galio-67, indio-111, indio-114m, indio-114, boro-10, tritio (hidrógeno-3), carbono-14, azufre-35, flúor-18 y carbono-11. El flúor-18 y el carbono-11, por ejemplo, se utilizan con frecuencia en la tomografía por emisión de positrones.

20 En una realización, la fracción radiactiva puede consistir tan solo en el radionucleido. En otra realización, el radionucleido puede incorporarse en una fracción radiactiva mayor, por ejemplo, mediante un enlace covalente directo con un grupo enlazador (tal como un enlazador que contiene un grupo tiol), o formando un complejo de coordinación con un agente quelante. Agentes quelantes adecuados conocidos la técnica incluyen DTPA (anhídrido dietilentriamina pentaacético), NOTA (ácido 1,4,7-triazaciclono-nano-N,N',N"-triacético), DOTA (ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N",N"-tetraacético), TETA (ácido 1,4,8,11-tetraazaciclodecano-N,N',N",N"-tetraacético), DTTA (ácido N¹-(p-isotiocianatobencil)-dietilentriamina-N¹,N²,N³-tetraacético) y DFA (N'-[5-[[5-[[5-acetilhidroxiamino]pentil]amino]-1,4-dioxobutil]hidroxiamino]pentil]-N-(5-aminopentil)-N-hidroxibutanodiamida).

30 Una fracción electroquímicamente activa es una fracción que comprende una fracción que es capaz de generar una señal electroquímica en un método electroquímico tal como un método amperométrico o voltamétrico. Generalmente, una fracción electroquímicamente activa es capaz de existir en al menos dos estados redox distintos.

35 Un experto en la materia, por supuesto, sería fácilmente capaz de seleccionar un compuesto detectable que sería adecuado para su uso de acuerdo con la presente invención de la amplia gama de compuestos detectables que están disponibles de forma rutinaria. La metodología de la presente invención puede, por lo tanto, usarse para producir un conjugado que comprende una fracción detectable, conjugado que puede usarse posteriormente en cualquier técnica bioquímica de rutina que implique la detección de tales especies.

40 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "fracción enzimáticamente activa" significa una enzima, un sustrato para una enzima o un cofactor para una enzima. Preferiblemente, la fracción enzimáticamente activa es una enzima.

45 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "etiqueta de afinidad" significa una fracción química que es capaz de interactuar con un "compañero de afinidad", que es una segunda fracción química, cuando tanto la etiqueta de afinidad como el compañero de afinidad están presentes en una única muestra. Generalmente, la etiqueta de afinidad es capaz de formar una interacción de unión específica con el compañero de afinidad. Una interacción de unión específica es una interacción de unión que es más fuerte que cualquier interacción de unión que puede ocurrir entre el compañero de afinidad y cualquiera otra sustancia química presente en una muestra. Una interacción de unión específica puede ocurrir, por ejemplo, entre una enzima y su sustrato.

50 Las etiquetas de afinidad pueden ser útiles en aplicaciones tales como la detección o purificación de biomoléculas tales como proteínas. En tales aplicaciones, un conjugado que comprende la biomolécula y la etiqueta de afinidad puede ser detectado o purificado explotando la interacción de unión específica entre la etiqueta de afinidad y su compañero de afinidad.

55 Un par etiqueta de afinidad/compañero de afinidad que se utiliza de manera particularmente amplia en bioquímica, es el par biotina/(estrept)avidina. La avidina y la estreptavidina son proteínas que pueden utilizarse como compañeros de afinidad para unirse con alta afinidad y especificidad a una etiqueta de afinidad obtenida a partir de biotina (ácido 5-[(3a*S*,4*S*,6a*R*)-2-oxohexahidro-1*H*-tieno[3,4-*d*]imidazol-4-il]pentanoico). Otros pares etiqueta de afinidad/compañero de afinidad utilizados comúnmente en la técnica incluyen la proteína de unión a amilasa/maltosa, glutatión/glutatión-S-transferasa y metal (por ejemplo, níquel o cobalto)/poli(His). Como apreciaría un experto en la materia, cualquier miembro del par podría funcionar como la "etiqueta de afinidad", con el otro miembro del par que funciona como el "compañero de afinidad". Las expresiones "etiqueta de afinidad" y "compañero de afinidad" son por tanto intercambiables.

Un experto en la materia sería consciente del uso rutinario de las interacciones de la etiqueta de afinidad/compañero de afinidad en bioquímica, y en particular en el contexto de la tecnología de bioconjugados.

5 Etiquetas de afinidad preferidas son biotina, amilasa, glutatión y poli(His). Una etiqueta de afinidad particularmente preferida es la biotina.

10 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "hapteno" significa una fracción que comprende un epítipo, que no es capaz de estimular una respuesta inmunitaria *in vivo* en su forma nativa, sino que es capaz de estimular una respuesta inmunitaria *in vivo* cuando está unido a una molécula vehículo inmunogénica. Generalmente, un hapteno es una fracción no proteica de peso molecular relativamente bajo (por ejemplo, un peso molecular de menos de 1000). Un epítipo es la parte de una molécula o fracción que es reconocida por el sistema inmunitario y estimula una respuesta inmunitaria.

15 Tal como se utilizan en la presente memoria, la expresión "soporte inmunogénico" significa un antígeno que es capaz de facilitar una respuesta inmunitaria cuando se administra *in vivo* y que es capaz de acoplarse a una hapteno. Ejemplos de vehículos inmunogénicos incluyen proteínas, liposomas, fracciones poliméricas naturales o sintéticas (tales como fracciones de dextrano, agarosa, polilisina y ácido poliglútamico) y fracciones orgánicas diseñadas por síntesis. Vehículos inmunogénicos proteicos utilizados comúnmente incluyen hemocianina de la lapa californiana, albúmina sérica bovina, albúmina sérica bovina aminoetilada o cationizada, tiroglobulina, ovoalbúmina y diversas proteínas toxoides como el toxoide tetánico y el toxoide diftérico. Vehículos de moléculas orgánicas diseñadas mediante síntesis bien conocidos incluyen el péptido antigénico múltiple (MAP).

20 Como un experto en la materia de la bioquímica sabrá, los conjugados de vehículos inmunogénicos-hapteno se utilizan ampliamente en, por ejemplo, inmunología y proteómica.

25 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "anticuerpo o fragmento de anticuerpo" significa una proteína que es capaz de unirse a un antígeno específico a través de un epítipo en el antígeno, o un fragmento de una proteína de ese tipo. Entre los anticuerpos se incluyen anticuerpos monoclonales y anticuerpos policlonales. Se prefieren anticuerpos monoclonales.

30 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "antígeno" significa una sustancia que es capaz de promover una respuesta inmunitaria cuando se administra *in vivo* y que es capaz de unirse a un anticuerpo producido durante dicha respuesta inmunitaria.

35 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "ligando" significa una fracción que es capaz de interactuar con una biomolécula (por ejemplo, una proteína) de tal manera que modifica las propiedades funcionales de la biomolécula. Generalmente, el ligando es una fracción que se une a un sitio en una proteína diana. La interacción entre el ligando y la biomolécula es habitualmente no covalente. Por ejemplo, la interacción puede ser a través de enlace iónico, enlace de hidrógeno o interacciones de van der Waals. Sin embargo, es también posible que algunos ligandos formen enlaces covalentes con biomoléculas. Generalmente, un ligando es capaz de modificar la conformación química de la biomolécula cuando interactúa con ella.

40 Ejemplos de ligandos capaces de interactuar con una proteína incluyen sustratos (sobre los que actúa la enzima al unirse, por ejemplo participando en una reacción química catalizada por la enzima), inhibidores (que inhiben la actividad proteica sobre la unión), activadores (que aumentan la actividad proteica sobre la unión) y neurotransmisores.

45 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "fracción biológicamente activa" significa una fracción que es capaz de inducir una respuesta bioquímica cuando se administra *in vivo*.

50 La fracción biológicamente activa puede ser un fármaco. Entre los fármacos se incluyen agentes citotóxicos tales como doxorubicina, metotrexato y derivados del mismo, precursores de la citotoxina que son capaces de metabolización *in vivo* para producir un agente citotóxico, agentes antineoplásicos, antihipertensivos, agentes cardioprotectores, antiarrítmicos, inhibidores de la ECA, antiinflamatorios, diuréticos, relajantes musculares, anestésicos locales, hormonas, fármacos reductores del colesterol, anticoagulantes, antidepresivos, tranquilizantes, 55 neurolépticos, analgésicos tales como analgésicos narcóticos o anti-piréticos, antivirales, antibacterianos, antifúngicos, bacteriostáticos, agentes activos del SNC, anticonvulsivos, ansiolíticos, antiácidos, narcóticos, antibióticos, agentes respiratorios, antihistamínicos, inmunosupresores, agentes inmunoactivadores, aditivos nutricionales, antitúxicos, agentes de diagnóstico, eméticos y antieméticos, carbohidratos, glucosaminoglucanos, glicoproteínas y polisacáridos, lípidos, por ejemplo fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina y derivados de los mismos, 60 esfingosina, esteroides, vitaminas, antibióticos, incluyendo antibióticos, agentes bacteriostáticos y bactericidas, antifúngicos, antihelmínticos y otros agentes efectivos contra agentes infecciosos que incluyen patógenos unicelulares, moléculas efectoras pequeñas tales como noradrenalina, ligandos de receptores alfa-adrenérgicos, ligandos de los receptores de dopamina, ligandos de los receptores de histamina, ligandos de los receptores GABA/benzodiacepina, ligandos de los receptores de serotonina, leucotrienos y triyodotironina, y derivados de los 65 mismos.

La fracción biológicamente activa puede ser también una fracción obtenida a partir de un compuesto que es capaz de atravesar fácilmente membranas biológicas y que, cuando forman una molécula conjugada con una fracción funcional secundaria, es capaz de aumentar la capacidad de la fracción funcional secundaria para atravesar la membrana biológica. Por ejemplo, una fracción biológicamente activa puede ser un “dominio de transducción de proteínas” (PTD) o un vehículo de molécula pequeña (“SMC” o “etiqueta molecular”) tal como las descritas en el documento WO 2009/027679.

En una realización preferida de la presente invención, la fracción biológicamente activa es un fármaco.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “liposoma” significa una estructura compuesta de bicapas de fosfolípidos que tienen propiedades anfífilas. Los liposomas incluyen vesículas unilamelares y vesículas multilamelares.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión “fracción polimérica” significa una cadena polimérica única (ramificada o no ramificada), que se obtiene a partir de una molécula polimérica única correspondiente. Las fracciones poliméricas pueden ser polímeros naturales o polímeros sintéticos. Generalmente, sin embargo, las moléculas poliméricas no son polinucleótidos.

Tal como se conoce bien en el campo de la bioquímica, la creación de conjugados que comprenden una fracción polimérica es útil en muchas aplicaciones *in vivo* e *in vitro*. Por ejemplo, diversas propiedades de una macromolécula tal como una proteína pueden ser modificadas uniendo una fracción polimérica a la misma, incluyendo propiedades de solubilidad, características de la superficie y estabilidad en la solución o durante la congelación. Otra aplicación común implica conjugar una fracción polimérica con un compuesto biológicamente activo tal como un fármaco, con el objetivo de aumentar la biocompatibilidad, reducir o eliminar la respuesta inmunitaria tras la administración y/o aumentar la estabilidad *in vivo*.

Un experto en la materia reconocería, por lo tanto, que la metodología de la presente invención puede ser utilizada para preparar un conjugado que comprenda una fracción polimérica. Un experto en la materia podría seleccionar fácilmente fracciones poliméricas adecuadas para su uso de acuerdo con la presente invención, basándose en que esas fracciones poliméricas se utilizan de forma rutinaria en la técnica.

La naturaleza de la fracción polimérica dependerá, por lo tanto, del uso que se desea de la molécula conjugada. Ejemplos de fracciones poliméricas para su uso de acuerdo con la presente invención incluyen polisacáridos, poliéteres, poliaminoácidos (tales como la polilisina), poli(alcoholes vinílicos), polivinilpirrolidonas, ácido poli(met)acrílico y derivados del mismo, poliuretanos y polifosfacenos. Generalmente, tales polímeros contienen al menos diez unidades monoméricas. Por tanto, por ejemplo, un polisacárido comprende generalmente al menos diez unidades de monosacáridos.

Dos moléculas poliméricas particularmente preferidas son el dextrano y el polietilenglicol (“PEG”), así como derivados de estas moléculas (tales como monometoxipolietilenglicol, “mPEG”). Preferiblemente, el PEG o un derivado del mismo tiene un peso molecular de menos de 20.000. Preferiblemente, el dextrano o derivado del mismo tiene un peso molecular de 10.000 a 500.000. En una realización preferida, los compuestos de la presente invención comprenden un fármaco y un PEG o derivado del mismo.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “aminoácido” significa una fracción que contiene tanto un grupo funcional amina como un grupo funcional carboxilo. Sin embargo, preferiblemente el aminoácido es un α -aminoácido. Preferiblemente, el aminoácido es un aminoácido proteinogénico, es decir un aminoácido seleccionado de entre alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, prolina, fenilalanina, pirrolisina, selenocisteína, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina. Sin embargo, el aminoácido también puede ser un aminoácido no proteinogénico. Ejemplos de aminoácidos no proteinogénicos incluyen lantionina, ácido 2-aminoisobutírico, dehidroalanina, ácido gamma-aminobutírico, ornitina, citrulina, canavanina y mimosina. Un aminoácido particularmente preferido es la cisteína.

Tal como se utiliza en la presente memoria, los términos “péptido” y “proteína” significan una fracción polimérica compuesta de restos de aminoácidos. Como sabrá un experto en la materia, el término “péptido” se utiliza habitualmente en la técnica para designar un polímero de una longitud relativamente corta, y el término proteína se utiliza habitualmente en la técnica para designar un polímero de longitud relativamente grande. Tal como se utiliza en la presente memoria, la convención es que un péptido comprende hasta 50 restos de aminoácidos, mientras que una proteína comprende más de 50 aminoácidos. Sin embargo, podrá apreciarse que esta distinción no es de vital importancia ya que las fracciones funcionales identificadas en la presente solicitud pueden representar de forma habitual o bien un péptido o una proteína.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “polipéptido” se utiliza de forma intercambiable con “proteína”.

Tal como se utiliza en la presente memoria, un péptido o una proteína pueden comprender cualquier aminoácido natural o no natural. Por ejemplo, un péptido o una proteína puede contener solamente restos de α -aminoácidos, por

ejemplo correspondientes a α -aminoácidos naturales. De manera alternativa, el péptido o proteína puede contener adicionalmente una o más modificaciones químicas. Por ejemplo, la modificación química puede corresponder a una modificación post-traducciona, que es una modificación que se produce en una proteína *in vivo* después de su traducción, tal como una acilación (por ejemplo, una acetilación), una alquilación (por ejemplo, una metilación), una amidación, una biotilación, una formilación, una glicosilación, una glicación, una hidroxilación, una yodación, una oxidación, una sulfatación o una fosforilación. Un experto en la materia por supuesto reconocería que tales péptidos o proteínas modificados de forma post-traducciona aún constituyen un "péptido" o una "proteína" dentro del significado de la presente invención. Por ejemplo, está bien establecido en la técnica que una glicoproteína (una proteína que lleva una o más cadenas laterales de oligosacáridos) es un tipo de proteína.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "célula" significa una célula individual de un organismo vivo.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "carbohidrato" incluye monosacáridos y oligosacáridos. Generalmente, un oligosacárido contiene de dos a nueve unidades de monosacáridos. Por tanto, tal como se utiliza en la presente memoria, un polisacárido se clasifica como una "fracción polimérica" más que como un carbohidrato.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "ADN" significa un ácido desoxirribonucleico compuesto de uno o más nucleótidos. El ADN puede ser de cadena única o de doble cadena. Preferiblemente, el ADN comprende más de un nucleótido.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "ARN" significa un ácido ribonucleico que comprende uno o más nucleótidos. Preferiblemente, el ARN comprende más de un nucleótido.

Tal como se utiliza en la presente memoria, "conjugado" significa una molécula que comprende una primera fracción funcional y una segunda fracción funcional. La primera fracción funcional y la segunda fracción funcional están unidas de forma covalente entre sí a través de una fracción reticulante, tal como se describe en la presente memoria.

Tal como se utiliza en la presente memoria, los términos "grupo" y "fracción" se utilizan de forma intercambiable.

Tal como se utiliza en la presente memoria, un "grupo reactivo" significa un grupo funcional en una primera molécula que es capaz de participar en una reacción química con un grupo funcional en una segunda molécula de tal manera que se forma un enlace covalente entre la primera molécula y la segunda molécula. Los grupos reactivos incluyen grupos salientes, grupos nucleófilos, y otros grupos reactivos tal como se describe en la presente memoria.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "grupo saliente electrófilo" significa un sustituyente unido a un átomo de carbono saturado o insaturado que puede ser reemplazado por un nucleófilo tras un ataque nucleófilo en ese átomo de carbono. Los expertos en la materia pueden seleccionar de forma rutinaria grupos salientes electrófilos que serían adecuados para localizar en un compuesto en particular y para hacer reaccionar con un nucleófilo en particular.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "nucleófilo" significa un grupo o compuesto funcional que es capaz de formar un enlace químico donando un par de electrones.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "grupo enlazador" significa un grupo que es capaz de unir una fracción química con otra. La naturaleza de los grupos enlazadores utilizados de acuerdo con la presente invención no es importante. Un experto en la materia reconocería que los grupos enlazadores se utilizan de forma rutinaria en la construcción de moléculas conjugadas. Generalmente, un grupo enlazador para su uso en la presente invención es un grupo orgánico. Generalmente, un grupo enlazador de ese tipo tiene un peso molecular de 50 a 1.000, preferiblemente 100 a 500. Ejemplos de grupos enlazadores apropiados para su uso de acuerdo con la presente invención son de conocimiento general en la técnica y están descritos en publicaciones de referencia estándar, tales como "Bioconjugate Techniques" (Greg T. Hermanson, Academic Press Inc., 1996), cuyo contenido se incorpora a la presente memoria a modo de referencia en su totalidad.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "alquilo" incluye grupos alquilo saturados tanto de cadena lineal como ramificada. Preferiblemente, un grupo alquilo es un grupo alquilo C_{1-20} , más preferiblemente un grupo alquilo C_{1-15} , más preferiblemente aún un grupo alquilo C_{1-12} , más preferiblemente aún un grupo alquilo C_{1-6} , y lo más preferiblemente un grupo alquilo C_{1-4} . Los grupos alquilo particularmente preferidos incluyen, por ejemplo, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, terc-butilo, pentilo y hexilo. El término "alquilenilo" ha de ser interpretado consecuentemente.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "alquenilo" hace referencia a un grupo que contiene uno o más enlaces dobles carbono-carbono, que pueden ser ramificados o no ramificados. Preferiblemente, el grupo alquenilo es un grupo alquenilo C_{2-20} , más preferiblemente un grupo alquenilo C_{2-15} , más preferiblemente aún un grupo alquenilo C_{2-12} o preferiblemente un grupo alquenilo C_{2-6} , y lo más preferiblemente un grupo alquenilo C_{2-4} . El término "alquenilenilo" debe ser interpretado consecuentemente.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “alquinilo” hace referencia a una cadena de carbono que contiene uno o más enlaces triples, que pueden ser ramificados o no ramificados. Preferiblemente, el grupo alquinilo es un grupo alquinilo C_{2-20} , más preferiblemente un grupo alquinilo C_{2-15} , más preferiblemente aún un grupo alquinilo C_{2-12} , o preferiblemente un grupo alquinilo C_{2-6} y lo más preferiblemente un grupo alquinilo C_{2-4} . El término “alquinileno” debe interpretarse consecuentemente.

A menos que se especifique de otro modo, un grupo alquilo, alquenilo o alquinilo es habitualmente no sustituido. Sin embargo, cuando se indica que un grupo de este tipo es no sustituido o sustituido, uno o más átomos de hidrógeno se reemplazan de manera opcional por átomos de halógeno o grupos de ácido sulfónico. Preferiblemente, un grupo alquilo, alquenilo o alquinilo sustituido tiene de 1 a 10 sustituyentes, más preferiblemente 1 a 5 sustituyentes, más preferiblemente aún 1, 2 o 3 sustituyentes y lo más preferiblemente 1 o 2 sustituyentes, por ejemplo 1 sustituyente. Preferiblemente, un grupo alquilo, alquenilo o alquinilo sustituido lleva más de 2 sustituyentes de ácido sulfónico. Los átomos de halógeno son sustituyentes preferidos. Preferiblemente, sin embargo, un grupo alquilo, alquenilo o alquinilo es no sustituido.

En la fracción que es un grupo alquilo, alquenilo o alquinilo o un grupo alquileno, alquenileno o alquinileno, en el cual (a) 0, 1 o 2 átomos de carbono pueden ser reemplazados por grupos seleccionados de grupos arileno C_{6-10} , heteroarileno de 5 a 10 miembros, carbociclileno C_{3-7} y heterociclileno de 5 a 10 miembros, y (b) 0, 1 o 2 grupos $-CH_2-$ pueden ser reemplazados por grupos seleccionados de grupos $-O-$, $-S-$, $-S-S-$, $-C(O)-$ y $-N(\text{alquilo } C_{1-6})-$, un total de 0, 1 o 2 de dichos átomos de carbono y grupos $-CH_2-$ son preferiblemente reemplazados, más preferiblemente un total de 0 o 1. Lo más preferiblemente, ninguno de los átomos de carbono o grupos $-CH_2-$ está reemplazado.

Grupos preferidos para reemplazar un grupo $-CH_2-$ son grupos $-O-$, $-S-$ y $-C(O)-$. Grupos preferidos para reemplazar un átomo de carbono son grupos fenileno, heteroarileno de 5 a 6 miembros, carbociclileno C_{5-6} y heterociclileno de 5 a 6 miembros. Tal como se utiliza en la presente memoria, la referencia a “0, 1 o 2 átomos de carbono” significa cualquier átomo de carbono terminal o no terminal en la cadena de alquilo, alquenilo o alquinilo, incluyendo cualquier átomo de hidrógeno unido a ese átomo de carbono. Tal como se utiliza en la presente memoria, la referencia a “0, 1 o 2 grupos $-CH_2-$ ” hace referencia a un grupo que no corresponde a un átomo de carbono terminal en la cadena de alquilo, alquenilo o alquinilo.

Tal como se utiliza en la presente memoria, un grupo arilo C_{6-10} es un sistema de anillos de hidrocarburo aromático de 6 a 10 miembros monocíclico o policíclico que tiene de 6 a 10 átomos de carbono. El fenilo es el preferido. El término “arileno” debe ser interpretado consecuentemente.

Tal como se utiliza en la presente memoria, un grupo heteroarilo de 5 a 10 miembros es un sistema de anillos aromático de 5 a 10 miembros monocíclico o policíclico, tal como un anillo de 5 o 6 miembros, que contiene al menos un heteroátomo, por ejemplo 1, 2, 3 o 4 heteroátomos, seleccionados de O, S y N. Cuando el anillo contiene 4 heteroátomos estos son preferiblemente todos átomos de nitrógeno. El término “heteroarileno” debe interpretarse consecuentemente. Ejemplos de grupos heteroarilo monocíclico incluyen grupos tienilo, furilo, pirrolilo, imidazolilo, tiazolilo, isotiazolilo, pirazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, triazolilo, tiadiazolilo, oxadiazolilo, piridinilo, piridazinilo, pirimidinilo, pirazinilo, triazinilo y tetrazolilo.

Ejemplos de grupos heteroarilo policíclicos incluyen grupos benzotienilo, benzofurilo, bencimidazolilo, benzotiazolilo, bencisotiazolilo, benzoxazolilo, bencisoxazolilo, benzotriazolilo, indolilo, isoindolilo e indazolilo. Grupos policíclicos preferidos incluyen grupos indolilo, isoindolilo, bencimidazolilo, indazolilo, benzofurilo, benzotienilo, benzoxazolilo, bencisoxazolilo, benzotiazolilo y bencisotiazolilo, más preferiblemente bencimidazolilo, benzoxazolilo y benzotiazolilo, lo más preferiblemente benzotiazolilo. Sin embargo, se prefieren grupos heteroarilo monocíclicos.

Preferiblemente, el grupo heteroarilo es un grupo heteroarilo de 5 a 6 miembros. Los grupos heteroarilo particularmente preferidos son grupos tienilo, pirrolilo, imidazolilo, tiazolilo, isotiazolilo, pirazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, triazolilo, piridinilo, piridazinilo, pirimidinilo y pirazinilo. Los grupos más preferidos son tienilo, piridinilo, piridazinilo, pirimidinilo, pirazinilo, pirrolilo y triazinilo, lo más preferiblemente piridinilo.

Tal como se utiliza en la presente memoria, un grupo heterociclilo de 5 a 10 miembros es un sistema de anillos carbocíclico C_{5-10} no aromático, saturado o insaturado, monocíclico o policíclico en el que uno o más, por ejemplo 1, 2, 3 o 4, de los átomos de carbono se reemplazan con una fracción seleccionada de N, O, S, $S(O)$ y $S(O)_2$. Preferiblemente, el grupo heterociclilo de 5 a 10 miembros es un anillo de 5 a 6 miembros. El término “heterociclileno” debe interpretarse consecuentemente.

Ejemplos de grupos heterociclilo incluyen grupos y fracciones azetidino, oxetano, tietano, pirrolidino, imidazolidino, oxazolidino, isoxazolidino, tiazolidino, isotiazolidino, tetrahidrofurano, tetrahidrotieno, tetrahidropirano, tetrahidrotiopirano, ditiolano, dioxolano, pirazolidino, piperidino, piperazino, hexahidropirimidino, metilendioxifenilo, etilendioxifenilo, tiomorfolino, S-oxo-tiomorfolino, S,S-dioxo-tiomorfolino, morfolino, 1,3-dioxolano, 1,4-dioxolano, trioxolano, tritiano, imidazolinilo, pirano, pirazolinilo, tiioxolano, tiotiazolidino, 1H-pirazol-5-(4H)-onilo, 1,3,4-tiadiazol-2(3H)-tionilo, oxopirrolidino, oxotiazolidino,

oxopirazolidinilo, succinimido y maleimido. Grupos heterociclilo preferido son grupos y fracciones pirrolidinilo, imidazolidinilo, oxazolidinilo, isoxazolidinilo, tiazolidinilo, isotiazolidinilo, tetrahidrofuranilo, tetrahidrotienilo, tetrahidropiranilo, tetrahidrotiopiranilo, ditiolanilo, dioxolanilo, pirazolidinilo, piperidinilo, piperazinilo, hexahidropirimidinilo, tiomorfolinilo y morfolinilo. Grupos heterociclilo más preferidos son grupos tetrahidropiranilo, tetrahidrotiopiranilo, tiomorfolinilo, tetrahidrofuranilo, tetrahidrotienilo, piperidinilo, morfolinilo y pirrolidinilo.

Para evitar cualquier duda, aunque las anteriores definiciones de grupos heteroarilos y heterociclilo hacen referencia a una fracción "N" que puede estar presente en el anillo, como será evidente para un químico experto, el átomo N será protonado (o llevará un sustituyente tal como se define más adelante) si está unido a cada uno de los átomos del anillo adyacente a través de un enlace único.

Tal como se utiliza en la presente memoria, un grupo carbociclilo C₃₋₇ es un anillo de hidrocarburo no aromático saturado o insaturado que tiene de 3 a 7 átomos de carbono. Preferiblemente, es un anillo de hidrocarburo saturado o mono-insaturado (es decir, una fracción cicloalquilo o una fracción cicloalqueno) que tiene de 3 a 7 átomos de carbono, más preferiblemente que tiene de 5 a 6 átomos de carbono. Ejemplos incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo y ciclohexilo y sus variantes mono-insaturadas. Grupos carbocíclicos particularmente preferidos son ciclopentilo y ciclohexilo. El término "carbociclileno" debe interpretarse consecuentemente.

Cuando se especifique, 0, 1 o 2 átomos de carbono en un grupo carbociclilo o heterociclilo pueden ser reemplazados por grupos -C(O)-. Tal como se utiliza en la presente memoria, se entiende que los "átomos de carbono" que se reemplazan incluyen los átomos de hidrógeno a los que están unidos. Cuando 1 o 2 átomos de carbono son reemplazados, preferiblemente dos de tales átomos de carbonos se reemplazan. Grupos carbociclilo de este tipo preferidos incluyen un grupo benzoquinona y grupos heterociclilo de este tipo preferidos incluyen grupos succinimido y maleimido.

A menos que se especifique de otro modo, un grupo arilo, heteroarilo, carbociclilo o heterociclilo es habitualmente no sustituido. Sin embargo, cuando se indica que un grupo de este tipo es no sustituido o sustituido, uno o más átomos de hidrógeno son reemplazados opcionalmente por átomos de halógeno o grupos alquilo C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆, alquiltiol C₁₋₆, -N(alquilo C₁₋₆)(alquilo C₁₋₆), nitro o ácido sulfónico. Preferiblemente, un grupo arilo, heteroarilo, carbociclilo o heterociclilo sustituido tiene de 1 a 4 sustituyentes, más preferiblemente de 1 a 2 sustituyentes y lo más preferiblemente 1 sustituyente. Preferiblemente, un grupo arilo, heteroarilo, carbociclilo o heterociclilo sustituido lleva no más de 2 sustituyentes nitro y no más de 2 sustituyentes de ácido sulfónico. Sustituyentes preferidos son átomos de halógeno y grupos alquilo C₁₋₄ y alcoxi C₁₋₄. Sustituyentes particularmente preferidos son átomos de halógeno. Preferiblemente, sin embargo, un grupo arilo, heteroarilo, carbociclilo o heterociclilo es no sustituido.

Tal como se utiliza en la presente memoria, los átomos de halógeno son generalmente átomos de F, Cl, Br o I, más preferiblemente átomos de Br.

Tal como se utiliza en la presente memoria, un grupo alcoxi C₁₋₆ es un grupo alquilo C₁₋₆ (por ejemplo, un alquilo C₁₋₄) que está unido a un átomo de oxígeno.

Tal como se utiliza en la presente memoria, un grupo alquiltiol C₁₋₆ es un grupo alquilo C₁₋₆ (por ejemplo, un alquilo C₁₋₄) que está unido a un átomo de azufre.

Tal como se utiliza en la presente memoria, un heterocicliol de 5 a 10 miembros es un grupo heterociclilo de 5 a 10 miembros que está unido a un átomo de azufre.

Tal como se utiliza en la presente memoria, un ariltiol C₆₋₁₀ es un grupo arilo C₆₋₁₀ (por ejemplo, un fenilo) que está unido a un átomo de azufre.

Tal como se utiliza en la presente memoria, un carbocicliol C₃₋₇ es un grupo carbociclilo C₃₋₇ (por ejemplo, un carbociclilo C₅₋₆) que está unido a un átomo de azufre.

En la presente invención el compuesto de fórmula (Ia) constituye una fracción reactiva de reticulación que es capaz de enlazar entre sí una primera fracción funcional y una segunda fracción funcional que contienen tiol.

Y es preferiblemente un átomo de halógeno o un grupo triflato, tosilato, mesilato, N-hidroxisuccinimidilo, N-hidroxisulfosuccinimidilo, alquiltiol C₁₋₆, heterocicliol de 5 a 10 miembros, ariltiol C₆₋₁₀, carbocicliol C₃₋₇, -OC(O)CH₃, -OC(O)CF₃, feniloxi, -NR_xR_yR_z⁺ o -PR_xR_yR_z⁺. Más preferiblemente, Y es un átomo de halógeno o un triflato, tosilato, mesilato, N-hidroxisuccinimidilo, N-hidroxisulfosuccinimidilo, alquiltiol C₁₋₆, heterocicliol de 5 a 10 miembros, ariltiol C₆₋₁₀ o carbocicliol C₃₋₇. Más preferiblemente aún, Y es un átomo de halógeno o un grupo alquiltiol C₁₋₆, heterocicliol de 5 a 10 miembros, ariltiol C₆₋₁₀ o carbocicliol C₃₋₇. Más preferiblemente, Y es un átomo de halógeno, en particular un átomo de bromo.

R_x, R_y y R_z se seleccionan cada uno preferiblemente de átomos de hidrógeno y grupos alquilo C₁₋₆. Más preferiblemente, R_x, R_y y R_z se seleccionan cada uno preferiblemente de átomos de hidrógeno y grupos metilo y

etilo. Preferiblemente, en un grupo particular $-NR_xR_yR_z^+$ o $-PR_xR_yR_z^+$, R_x , R_y y R_z son los mismos.

El compuesto de fórmula R_1-H comprende al menos un primer grupo tiol, SH. En la presente invención, el primer grupo tiol es capaz de reaccionar con el compuesto de fórmula (la) por ataque nucleófilo en la posición 2. El resultado de hacer reaccionar el compuesto de fórmula R_1-H con el compuesto de fórmula (la) es un compuesto en el que un grupo saliente electrófilo de fórmula Y en la posición 2 en el compuesto de fórmula (la) es reemplazado por el grupo de fórmula R_1 . Más específicamente, el grupo de fórmula R_1 se une en la posición 2-a través de un enlace tiol de fórmula $-S-$ que se obtiene del primer grupo SH en el compuesto correspondiente de fórmula R_1-H . Quedará claro, por lo tanto, que el átomo de hidrógeno en el primer grupo tiol SH de R_1-H constituye el átomo de hidrógeno unido al grupo de fórmula R_1 . Por lo tanto, cuando R_1 se une al reticulante, el átomo de hidrógeno en este primer grupo tiol se pierde para formar el enlace $-S-$ entre R_1 y el reticulante.

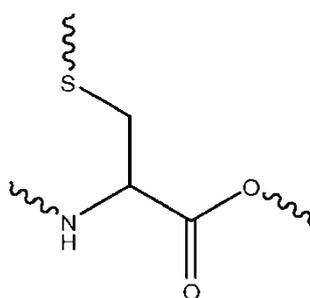
R_1 puede ser un grupo de fórmula $-S-L-F_1$, en cuyo caso el átomo de azufre del primer grupo tiol se une al grupo enlazador de fórmula L. En esta realización, por lo tanto, resultará claro que el enlazador puede ser utilizado para proporcionar un grupo tiol capaz de reaccionar con el compuesto de fórmula (la), grupo enlazador que a continuación se une a una primera fracción funcional que no contiene un grupo tiol de ese tipo. Sin embargo, preferiblemente R_1 es un grupo de fórmula F_1 , y más particularmente una primera fracción funcional que, junto con el átomo H- al que está unido en el compuesto de fórmula R_1-H , contiene un primer grupo SH.

Las combinaciones de la primera fracción funcional/segunda fracción funcional de acuerdo con la presente invención se exponen en la siguiente Tabla 1.

Tabla 1: Combinaciones de la primera fracción funcional/segunda fracción funcional

Primera o segunda fracción funcional	Segunda o primera fracción funcional
Anticuerpo o fragmento de anticuerpo que es capaz de unirse a un antígeno específico a través de un epítipo en el antígeno	Fracción detectable seleccionada del grupo que consiste en fracciones cromogénicas, fracciones fluorescentes, fracciones radiactivas y fracciones electroquímicamente activas
Anticuerpo o fragmento de anticuerpo que es capaz de unirse a un antígeno específico a través de un epítipo en el antígeno	Un grupo biológicamente activo que es un fármaco, por ejemplo, un agente citotóxico o un precursor de citoxina.
Una fracción biológicamente activa que es un fármaco.	Fracción polimérica seleccionada de péptidos, proteínas, polisacáridos, poliéteres, poliaminoácidos, poli(alcoholes vinílicos), polivinilpirrolidonas, poli(ácido(met) acrílico, poliuretanos y polifosfazenos.

En una realización particularmente preferida, R_1 es un grupo de fórmula F_1 , y F_1 es un péptido o proteína que comprende al menos un primer resto de cisteína. Para evitar cualquier duda, un resto de cisteína en un péptido o proteína es un resto de fórmula



en la que, en el compuesto de fórmula R_1-H el péptido o proteína se une al átomo de hidrógeno a través del átomo de azufre del resto de cisteína. En esta realización, se entenderá que el "primer resto de cisteína" significa un resto de cisteína que está situado en una posición de ese tipo en el péptido o proteína, de tal manera que puede reaccionar con el compuesto de fórmula (la). Más específicamente, el grupo R_1 se une al compuesto de fórmula (la) mediante el ataque nucleófilo del grupo tiol del primer resto de cisteína en la posición 2 del compuesto de fórmula (la), de tal manera que el grupo Y es reemplazado por el grupo tiol en el primer resto de cisteína en el grupo R_1 .

En una realización particularmente preferida de la invención en la que R_1 es un grupo de fórmula F_1 y F_1 es un péptido o proteína que comprende al menos un primer resto de cisteína, R_1 además comprende al menos un segundo resto de cisteína. Para evitar cualquier duda, el segundo resto de cisteína se sitúa en una posición de ese tipo en el péptido o proteína, de tal manera que también puede reaccionar con el compuesto de fórmula (la). Además, en esta realización el compuesto de fórmula (la) es un compuesto en el que el grupo R_2 es un grupo saliente electrófilo de fórmula Y. El grupo R_1 entonces se une adicionalmente al compuesto de fórmula (la) a través de ataque nucleófilo del grupo tiol del segundo resto de cisteína en la posición 3 de la fracción de fórmula (la), de tal

manera que el grupo R_2 es reemplazado por el grupo tiol en el segundo resto de cisteína en el grupo R_1 . Esta realización de la invención es particularmente útil cuando la primera fracción funcional es un péptido o proteína que contiene un puente de disulfuro, ya que permite que el agente reticulante sea añadido a través del puente de disulfuro. Preferiblemente, cuando un péptido o proteína que contiene un puente de disulfuro se va a hacer reaccionar con el compuesto de fórmula (Ia), el puente de disulfuro se reduce primero utilizando técnicas conocidas la técnica. Por ejemplo, la reducción puede realizarse utilizando reactivos de fosfina estándar, tales como (tris(2-carboxietil)fosfina) o realizando una reacción de intercambio tiol-disulfuro.

La reducción de un grupo disulfuro puede realizarse mediante reacción con un agente reductor tal como una fosfina, tiol o un agente hidruro. Agentes reductores preferidos son tris(2-carboxietil)fosfina, glutatión, 2-mercaptoetanol y ditiotreitól. Un grupo preferido de reactivos es 1,2-etanoditiol, 2-mercaptoetanol, ditiotreitól, glutatión y tris(2-carboxietil)fosfina.

Quedará claro que el compuesto de fórmula (Ia) representa la fracción reactiva clave que de acuerdo con la presente invención permite que una fracción funcional que contiene tiol sea conjugada con una fracción funcional secundaria. Por consiguiente, un compuesto de fórmula (Ia) puede ser utilizado como un reactivo para enlazar una primera fracción funcional con una segunda fracción funcional.

Como sería bien conocido para los expertos en la materia, se diseñan de forma rutinaria reactivos de reticulación que llevan grupos funcionales adaptados para reaccionar con fracciones funcionales que tienen grupos reactivos particulares que están separados por grupos enlazadores (que habitualmente no tienen una función significativa en las reacciones). Un experto en la materia entendería inmediatamente que el compuesto de fórmula (Ia) podría fácilmente ser incorporado en reactivos de reticulación habituales, por ejemplo, reemplazando fracciones convencionales diseñadas para reaccionar con grupos tiol (por ejemplo, grupos maleimida). Información detallada sobre el diseño de reactivos de reticulación adecuados para su adaptación de esta manera puede encontrarse, por ejemplo, en "Bioconjugate Techniques" (Greg T. Hermanson, Academic Press Inc., 1996), el contenido del cual se incorpora a la presente patente a modo de referencia en su totalidad.

El compuesto de fórmula (Ia) es capaz de unir entre sí al menos una primera fracción funcional y una segunda fracción funcional. La primera fracción funcional puede reaccionar en la posición 2 reemplazando el grupo saliente Y, y la segunda fracción funcional puede entonces añadirse por adición electrófila a través del enlace doble de carbono-carbono entre las posiciones 2 y 3. De forma alternativa, el reactivo reticulante puede comprender uno o más grupos reactivos capaces de reaccionar con fracciones funcionales adicionales.

En una realización adicional, la segunda fracción funcional puede ser una fracción que contiene una fracción alqueno y que puede unirse al compuesto de fórmula (Ia) acoplándose en una cicloadición [2+2] fotocatalítica con el enlace doble de carbono-carbono entre las posiciones 2 y 3 del compuesto de fórmula (Ia). Este procedimiento da como resultado una fracción de anillo de ciclobutano que contiene los átomos de carbono 2 y 3 del compuesto de fórmula (Ia) y en el que el enlace doble de carbono-carbono ha sido saturado.

Grupos Y preferidos en la fórmula (Ia) son tal como se define anteriormente.

$R_{33'}$ preferiblemente representa un átomo de hidrógeno o un grupo de fórmula $-L(Z)_n$ o IG. Grupos $R_{33'}$ particularmente preferidos son átomos de hidrógeno y grupos de fórmula IG. Lo más preferiblemente, $R_{33'}$ es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C_{1-6} .

R_2 es preferiblemente un átomo de hidrógeno o un grupo de fórmula Y, $-L(Z)_n$ o IG. Más preferiblemente, R_2 es preferiblemente un átomo de hidrógeno o un grupo de fórmula Y o IG. Lo más preferiblemente, R_2 es un átomo de hidrógeno o halógeno o un grupo alquilo C_{1-6} .

E es preferiblemente un átomo de halógeno o un grupo alcoxi C_{1-6} , tiol, alquiltiol C_{1-6} , $-N(\text{alquilo } C_{1-6})(\text{alquilo } C_{1-6})$, triflato, tosilato, mesilato, N-hidroxisuccinimidilo, N-hidroxisulfosuccinimidilo, imidazolilo, feniloxi o nitrofeniloxi. Los grupos de fórmula E más preferidos son átomos de halógeno y grupos triflato, tosilato y mesilato.

Nu es preferiblemente un grupo de fórmula $-OH$ o $-SH$. En otro modo de realización, Nu es preferiblemente un grupo de fórmula $-OH$, $-NH_2$ o $-SH$, más preferiblemente $-NH_2$ o $-SH$.

La fracción enlazadora L enlaza entre sí otras dos fracciones en los compuestos de la presente invención (es decir, es al menos una fracción divalente). Sin embargo, en algunas realizaciones ciertas fracciones enlazadoras L pueden enlazar entre sí más de otras dos fracciones (por ejemplo, cuando R_2 , R_3 , $R_{3'}$ o $R_{33'}$ representa $-L(Z)_n$ en la que n es 2 o 3), en cuyo caso se ha de entender que la otra tercera fracción y cualquier otra fracción, cada una reemplaza un átomo de hidrógeno en la correspondiente fracción enlazadora L divalente.

L representa preferiblemente una fracción que es un grupo alquilenilo C_{1-20} , un grupo alqueniлено C_{2-20} o un grupo alquiniлено C_{2-20} , que no está sustituido o está sustituido por uno o más sustituyentes seleccionados de átomos de halógeno y grupos ácido sulfónico, y en la que (a) 0, 1 o 2 átomos de carbono están reemplazados por grupos

seleccionados de grupos arileno C₆₋₁₀, heteroarileno de 5 a 10 miembros, carbociclileno C₃₋₇ y heterociclileno de 5 a 10 miembros, y (b) 0, 1 o 2 grupos -CH₂- están reemplazados por grupos seleccionados de los grupos -O-, -S-, -S-S-, -C(O)- y -N(alquilo C₁₋₆)-, en la que:

- 5 (i) dichos grupos arileno, heteroarileno, carbociclileno y heterociclileno no están sustituidos o están sustituidos por uno o más sustituyentes seleccionados de átomos de halógeno y grupos alquilo C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆, alquiltiol C₁₋₆, -N(alquilo C₁₋₆)(alquilo C₁₋₆), nitro y ácido sulfónico; y
 (ii) 0, 1 o 2 átomos de carbono en dichos grupos carbociclileno y heterociclileno están reemplazados por grupos -C(O)-.

10 Más preferiblemente, L representa una fracción que es un grupo alquileno C₁₋₆ no sustituido, un grupo alquenileno C₂₋₆ o un grupo alquinileno C₂₋₆, en el que (a) 0 o 1 átomo de carbono es reemplazado por un grupo seleccionado de grupos fenileno, heteroarileno de 5 a 6- miembros, carbociclileno C₅₋₆ y heterociclileno de 5 a 6 miembros, en la que dichos grupos fenileno, heteroarileno, carbociclileno y heterociclileno no están sustituidos o están sustituidos por uno o dos sustituyentes seleccionados de átomos de halógeno y grupos alquilo C₁₋₄ y alcoxi C₁₋₄, y (b) 0,1 o 2 grupos -CH₂- están reemplazados por grupos seleccionados de grupos -O-, -S- y -C(O)-.

15 Lo más preferiblemente, L es una fracción que es un grupo alquileno C₁₋₄ no sustituido, en el que 0 o 1 átomo de carbono es reemplazado por un grupo fenileno no sustituido.

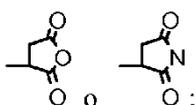
20 Z representa un grupo reactivo unido a un grupo de fórmula L que es capaz de reaccionar con una fracción funcional, de tal manera que la fracción funcional se enlaza al grupo de fórmula L. Como entenderían los expertos en la materia, la naturaleza del propio grupo reactivo no es importante. En la actualidad se utiliza una amplia gama de grupos reactivos de forma rutinaria en la técnica para conectar una fracción funcional a un reactivo reticulante. Tales grupos reactivos pueden ser capaces de, por ejemplo, unir un compuesto amina, un compuesto tiol, un compuesto carboxilo, un compuesto hidroxilo, un compuesto carbonilo, o un compuesto que contiene un hidrógeno reactivo a un reticulante. Los expertos en la materia reconocerían, por supuesto, inmediatamente que cualquier grupo reactivo de ese tipo sería adecuado para su uso de acuerdo con la presente invención. Los expertos en la materia podrían seleccionar un grupo reactivo apropiado a partir del conocimiento de la práctica habitual, en referencia a manuales estándar tales como "Bioconjugate Techniques" (Greg T. Hermanson, Academic Press Inc., 1996), el contenido del cual se incorpora a la presente memoria a modo de referencia en su totalidad.

Z es preferiblemente:

- 35 (a) un grupo de fórmula -LG, -C(O)-LG, -C(S)-LG o -C(NH)-LG en la que LG es un grupo saliente electrófilo;
 (b) un nucleófilo Nu' seleccionado de grupos -OH, -SH, -NH₂, -NH(alquilo C₁₋₆) y grupos -C(O)NHNH₂;
 (c) una fracción cíclica Cyc, que es capaz de una reacción electrófila por apertura del anillo con un nucleófilo;
 (d) un grupo de fórmula -S(O₂)(Hal) en la que Hal es un átomo de halógeno;
 (e) un grupo de fórmula -N=C=O o -N=C=S;
 40 (f) un grupo de fórmula -S-S(IG') en la que IG' representa un grupo de fórmula IG según se define en la presente memoria;
 (g) un grupo AH, que es un grupo arilo C₆₋₁₀ que está sustituido por uno o más átomos de halógeno;
 (h) un grupo fotorreactivo que es capaz de activarse por la exposición a la luz ultravioleta;
 (i) un grupo de fórmula -C(O)H o -C(O)(alquilo C₁₋₆);
 45 (j) un grupo maleimido;
 (k) un grupo de fórmula -C(O)CHCH₂;
 (l) un grupo de fórmula -C(O)C(N₂)H o -PhN²⁺, donde Ph representa un grupo fenilo; o
 (m) un grupo epóxido.

50 Lo más preferiblemente, Z se selecciona de:

- (a) grupos de fórmula -LG, -C(O)-LG y -C(S)-LG, en la que LG se selecciona de átomos de halógeno y grupos -O(alquilo C₁₋₆), -SH, -S(alquilo C₁₋₆), triflato, tosilato, mesilato, N-hidroxisuccinimidilo y N-hidroxisulfosuccinimidilo;
 55 (b) grupos de fórmula -OH, -SH y -NH₂;
 (c) un grupo de fórmula



- 60 y
 (d) un grupo maleimido.

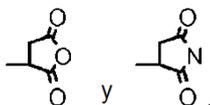
LG se selecciona preferentemente de átomos de halógeno y -O(IG'), -SH, -S(IG'), -NH₂, NH(IG'), -N(IG')(IG''), -N₃,

triflato, tosilato, mesilato, N-hidroxisuccinimidilo, N-hidroxisulfosuccinimidilo, imidazolilo y grupos azido, en la que IG' e IG'' son los mismos o diferentes y cada uno representa un grupo de fórmula IG.

Nu' se selecciona preferiblemente de grupos -OH, -SH y -NH₂.

5

Cyc se selecciona preferiblemente de los grupos



10 Hal es preferiblemente un átomo de cloro.

AH es preferiblemente un grupo fenilo que está sustituido por al menos un átomo de flúor.

El grupo fotorreactivo se selecciona preferiblemente de:

15

(a) un grupo arilo C₆₋₁₀ que está sustituido por al menos un grupo de fórmula -N₃ y que opcionalmente está sustituido adicionalmente por uno o más átomos de halógeno;

(b) un grupo benzofenona;

(c) un grupo de fórmula -C(O)C(N₂)CF₃; y

20

(d) un grupo de fórmula -PhC(N₂)CF₃, en la que Ph representa un grupo fenilo.

n es preferiblemente 1 o 2, y lo más preferiblemente 1.

25

IG representa preferiblemente una fracción que es un grupo alquilo C₁₋₆, un grupo alqueno C₂₋₆ o un grupo alquino C₂₋₆ no sustituido, en el que (a) 0 o 1 átomo de carbono es reemplazado por un grupo seleccionado de grupos fenileno, heteroarileno de 5 a 6 miembros, carbociclileno C₅₋₆ y heterociclileno de 5 a 6 miembros, en la que dichos grupos fenileno, heteroarileno, carbociclileno y heterociclileno no están sustituidos o están sustituidos por uno o dos sustituyentes seleccionados de átomos de halógeno y grupos alquilo C₁₋₄ y alcoxi C₁₋₄, y (b) 0, 1 o 2 grupos -CH₂- están reemplazados por grupos seleccionados de grupos -O-, -S- y -C(O)-

30

Más preferiblemente, IG representa una fracción que es un grupo alquilo C₁₋₆ no sustituido, en el que (a) 0 o 1 átomo de carbono está reemplazado por un grupo seleccionado de grupos fenileno, heteroarileno de 5 a 6 miembros, carbociclileno C₅₋₆ y heterociclileno de 5 a 6 miembros no sustituidos.

35

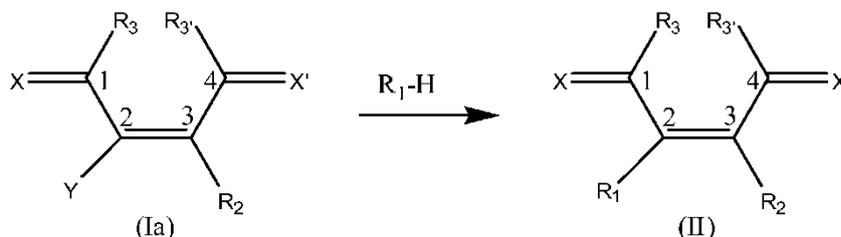
Lo más preferiblemente, IG representa un grupo alquilo C₁₋₆ no sustituido.

La realización (1) de la presente invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula (Ia), como se definió anteriormente, como un reactivo para la unión del compuesto de fórmula R₁-H que comprende una primera fracción funcional de fórmula F₁ a una segunda fracción funcional de fórmula F₂. Generalmente, este uso implica llevar a cabo un proceso de la presente invención, como se define en la realización (2) o la realización (3) descritas a continuación.

40

La realización (2) de la presente invención se refiere a un proceso para producir un conjugado. En una etapa (i) de este proceso, un compuesto de fórmula (Ia) se hace reaccionar con un compuesto de fórmula R₁-H para producir un compuesto de fórmula (II):

45



50

Esta etapa (i) implica unir el grupo R₁ mediante el ataque nucleófilo del primer grupo SH en el compuesto de fórmula R₁-H en la posición 2 del compuesto de fórmula (Ia), de manera que el grupo Y en la posición 2 se reemplaza por el grupo R₁.

En una etapa (ii) del proceso de la realización (2), una fracción de fórmula F₂ está unida al compuesto de fórmula (II), produciendo así el conjugado. Se pueden utilizar varios procedimientos para llevar a cabo la etapa (ii), por ejemplo, las descritas en los siguientes párrafos (a), (b) y (c):

55

(a) El proceso puede comprender unir F_2 al compuesto de fórmula (II) mediante una reacción de adición electrófila de F_2 a través del doble enlace carbono-carbono entre la posición 2 y la posición 3 de fórmula (II).

(b) donde R_{33} representa un átomo de hidrógeno o un grupo de fórmula Y, Nu o $-L(Z)_n$, el proceso puede comprender unir F_2 al compuesto de fórmula (II) a través de una reacción entre F_2 y (i) el átomo de nitrógeno de la fracción de fórmula $-N(R_{33})$ o (ii) dicho grupo de fórmula Y, Nu o $-L(Z)_n$.

(c) donde R_2 representa un grupo de fórmula Y, Nu o $-L(Z)_n$, el proceso puede comprender unir F_2 al compuesto de fórmula (II) a través de una reacción entre F_2 y dicho grupo de fórmula Y, Nu o $-L(Z)_n$.

En una realización adicional, la fracción de fórmula F_2 se une al compuesto de fórmula (II) mediante una reacción de cicloadición fotocatalítica [2+2] entre un grupo alqueno en la fracción de fórmula F_2 y el doble enlace carbono-carbono entre la posición 2 y la posición 3 de fórmula (II). Este procedimiento da como resultado una fracción de anillo de ciclobutano que contiene los átomos de carbono 2 y 3 del compuesto de fórmula (II) y en el que el doble enlace carbono-carbono es saturado.

La realización (3) de la presente invención proporciona un proceso alternativo para producir un conjugado. En este proceso, un compuesto de fórmula R_1-H se hace reaccionar con un compuesto de fórmula (IIa). El proceso implica unir el grupo R_1 mediante el ataque nucleófilo del primer grupo SH en el compuesto de fórmula R_1-H en la posición 2 del compuesto de fórmula (IIa), de modo que el grupo Y en la posición 2 se reemplaza por el grupo R_1 .

Como quedará claro para los expertos en la materia, el compuesto de fórmula (IIa) está relacionado con el compuesto de fórmula (II) como se describe anteriormente. Sin embargo, el compuesto de fórmula (IIa) comprende al menos una fracción funcional F_2 . Por consiguiente, el compuesto de fórmula (IIa) puede prepararse fácilmente uniendo una fracción funcional F_2 a su correspondiente compuesto de fórmula (II) usando métodos conocidos rutinariamente en la técnica.

Preferiblemente, el compuesto de fórmula (IIa) comprende a lo sumo tres grupos de fórmula F_2 , más preferiblemente uno o dos grupos de fórmula F_2 , y lo más preferiblemente un grupo de fórmula F_2 .

Claramente, después de llevar a cabo el proceso de la realización (2) o (3) de la presente invención, uno o más grupos reactivos adicionales pueden permanecer en el producto conjugado (incluido un doble enlace carbono-carbono situado en una posición correspondiente a las posiciones 2 y 3 del reactivo reticulante, así como otros grupos nucleófilos, grupos electrófilos y grupos reactivos de fórmula Z). Por consiguiente, en aspectos adicionales, los procesos de las realizaciones (2) y (3) de la presente invención comprenden además la unión de una o más fracciones funcionales adicionales a dicho conjugado, en el que cada fracción funcional adicional es igual o diferente y se selecciona de una fracción detectable, una fracción enzimáticamente activa, una etiqueta de afinidad, un hapteno, un vehículo inmunogénico, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, un antígeno, un ligando, una fracción biológicamente activa, un liposoma, una fracción polimérica, un aminoácido, un péptido, una proteína, una célula, un carbohidrato, un ADN y un ARN.

Las reacciones químicas que tienen lugar en los procesos de las realizaciones (2) y (3) pueden llevarse a cabo utilizando técnicas de rutina conocidas en la técnica para unir reactivos de reticulantes a fracciones funcionales, como las descritas en "Bioconjugate Techniques" (Greg T. Hermanson, Academic Press Inc., 1996), cuyo contenido se incorpora aquí como referencia en su totalidad. Otros ejemplos de condiciones adecuadas para llevar a cabo tales reacciones se pueden encontrar en la sección de Ejemplos de la presente memoria descriptiva.

Como entenderán los expertos en la materia, cuando un reactivo (por ejemplo, un compuesto que lleva una fracción funcional o un reactivo reticulante) lleva más de un grupo reactivo, puede ser deseable realizar la protección química de los grupos reactivos que no están destinados a participar en la reacción. Por ejemplo, puede ser necesario proteger grupos como los grupos hidroxilo, amino y carboxi, cuando se desean en el producto final, para evitar su participación no deseada en las reacciones (ver, por ejemplo, Greene, T.W., "Protecting Groups in Organic Synthesis", John Wiley and Sons, 1999). Los grupos protectores convencionales pueden usarse junto con la práctica estándar. En algunos casos, la desprotección se puede usar en una etapa intermedia o final, y por lo tanto, se entiende que los procesos de las realizaciones (2) y (3) de acuerdo con la invención descrita en la presente memoria se extienden a la adición y eliminación de tales grupos protectores.

En la realización (4), la presente invención se refiere a un proceso para escindir el enlace entre una fracción funcional que contiene tiol y la fracción de reticulante (que puede unirse adicionalmente a una o más fracciones funcionales adicionales).

En una realización preferida del proceso de la realización (4), la primera fracción funcional de fórmula F_1 es un fármaco ya que aquí la metodología puede ser aprovechada, por ejemplo, en métodos de administración de fármacos.

En una primera realización preferida del proceso de la realización (4), el compuesto es un compuesto de fórmula

(III). En una segunda realización preferida del proceso de la realización (4), el compuesto es un compuesto de fórmula (IIIa). De acuerdo con esto, esta segunda realización preferida proporciona un proceso para escindir una fracción reticulante de una fracción funcional que contiene al menos dos grupos tiol. Un ejemplo de tal fracción funcional es una fracción que contiene un grupo disulfuro, tal como una proteína que contiene dos restos de cisteína que están unidos entre sí a través de un puente disulfuro.

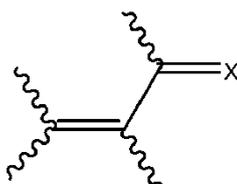
Preferiblemente, en el proceso de la realización (4), el compuesto también comprende al menos una fracción funcional de fórmula F₂.

En el proceso de la realización (4), la etapa (ii) de escisión del enlace o enlaces del grupo de fórmula R₁ se puede llevar a cabo utilizando métodos de rutina para escindir un enlace tiol en un centro de carbono insaturado, por ejemplo, utilizando métodos de rutina para escindir un tiol unido a un alqueno deficiente en electrones.

Preferiblemente, la etapa (ii) del proceso de la realización (4) se efectúa incubando el compuesto con un reactivo que es capaz de actuar como un nucleófilo en una reacción de Michael. Los ejemplos de reactivos que son conocidos por ser capaces de actuar como nucleófilos en una reacción de Michael incluyen compuestos de fosfina, compuestos de fosfito, tioles, selenoles, aminas y compuestos nucleófilos de carbono blando. Los compuestos de fosfina y los compuestos de fosfito contienen un átomo de fósforo trivalente. En una fosfina, el átomo de fósforo está unido a átomos de hidrógeno o carbono, mientras que en un fosfito, el átomo de fósforo está unido a átomos de oxígeno (entendiéndose que los átomos de carbono y los átomos de oxígeno están unidos a otros grupos en los compuestos respectivos). Los tioles son compuestos orgánicos que contienen un grupo tiol -SH. Los selenoles son compuestos orgánicos que contienen un grupo -SeH. Las aminas son compuestos que contienen un grupo funcional amina. Los nucleófilos de carbono blando son compuestos que contienen un centro de carbono nucleófilo blando. Ejemplos de nucleófilos de carbono blando se describen en la patente US-5.414.074. Los expertos en la materia, por supuesto, podrían seleccionar reactivos apropiados que sean capaces de actuar como nucleófilos en una reacción de Michael como una cuestión de rutina, por ejemplo, seleccionando rutinariamente un reactivo adecuado de entre la lista ilustrada de clases de reactivos descritas en la presente memoria.

Los reactivos actualmente preferidos son compuestos de fosfina y tioles. Una fosfina particularmente preferida es tris(2-carboxietil)fosfina, que se conoce comúnmente como "TCEP" y se usa comúnmente en la técnica para reducir los enlaces disulfuro en compuestos, por ejemplo, en proteínas. La tris(2-carboxietil)fosfina también se puede suministrar en forma de sal, como su sal clorhidrato. Un tiol particularmente preferido es el glutatión. Otros tioles preferidos son 1,2-etanoditiol, 2-mercaptoetanol y ditiotreitól (es decir, HSCH₂CH(OH)CH(OH)CH₂SH, comúnmente conocido como TDT). Un grupo preferido de reactivos es 1,2-etanoditiol, 2-mercaptoetanol, ditiotreitól, glutatión y tris(2-carboxietil)fosfina.

Para evitar dudas, como se usa en la presente memoria, el término "reactivo que es capaz de actuar como nucleófilo en una reacción de Michael" significa un reactivo que es capaz de reaccionar con una fracción α, β-insaturada en un compuesto, y en particular una fracción de fórmula (V)



(V)

en la que X es como se define en la presente memoria. Tales reactivos se conocen a veces como "reactivos que son capaces de actuar como un nucleófilo en una reacción de adición de conjugado". Claramente, los reactivos no se limitan a reactivos que reaccionan a través de un centro de carbono nucleófilo (por ejemplo, nucleófilos de carbono blando), sino que también incluyen reactivos que reaccionan a través de un centro nucleófilo sin carbono, como los reactivos ilustrativos que se describen en la presente memoria.

Se puede llevar a cabo un proceso que comprende:

- (i) llevar a cabo un proceso para producir un conjugado como se define en la realización (2) o (3); y
- (ii) posteriormente se regenera el compuesto de fórmula R₁-H de dicho conjugado.

Generalmente, en este proceso, la etapa (ii) se efectúa incubando el compuesto con un reactivo que puede actuar como un nucleófilo en una reacción de Michael, por ejemplo, un reactivo como se define en relación con la realización (4).

La metodología de la presente invención también da lugar a una serie de nuevos compuestos.

al átomo de carbono que es capaz de formar el intermedio catiónico más estable tras la adición de un protón al compuesto de fórmula (III) (es decir, de acuerdo con la regla de Markovnikov). Un experto en la materia apreciaría que si se desea una localización específica para la adición del grupo de fórmula R_4 , la selección rutinaria de las condiciones de reacción y la identidad de los otros grupos en el compuesto de fórmula (III) puede ser capaz de lograr dicha regioselectividad.

Como quedará claro para los expertos en la materia, la metodología de la presente invención es ampliamente aplicable a procesos y métodos conocidos que implican la conjugación de fracciones funcionales. Generalmente, los procesos y métodos convencionales de este tipo pueden modificarse directamente reemplazando un grupo reactivo con tiol conocido convencionalmente en una molécula de reticulación que une dos moléculas funcionales (como un grupo maleimida) por el compuesto de fórmula (Ia).

Los ejemplos de procesos de rutina incluyen procesos para detectar una sustancia, particularmente una sustancia de interés biológico, como un antígeno o un ADN, y procesos de ensayo para identificar si una sustancia interactúa con dicho compuesto. Por consiguiente, la presente invención también proporciona las realizaciones (7).

En un aspecto, la realización (7) se refiere a un proceso para detectar si una sustancia está presente en una muestra. Normalmente, la sustancia es una sustancia de interés biológico, por ejemplo, un antígeno. Un compuesto de la presente invención se incubaba con la muestra. Este compuesto es un conjugado que comprende al menos dos fracciones funcionales: en primer lugar, una fracción funcional que es capaz de generar una señal detectable y, en segundo lugar, una fracción funcional que es capaz de interactuar con la sustancia a ensayar. La fracción funcional que es capaz de generar una señal detectable es una fracción detectable. La fracción funcional que es capaz de interactuar con la sustancia a ensayar es generalmente un anticuerpo.

Preferiblemente, la etapa de incubación va seguida de una etapa de eliminación de cualquier cantidad de conjugado que no haya interactuado con (es decir, unido a) la sustancia a ensayar, por ejemplo, una etapa de lavado. Esto se puede lograr, por ejemplo, empleando un ensayo en el que la sustancia está unida a un sustrato sólido (por ejemplo, mediante una interacción entre la sustancia y una fracción funcional adicional que es (a) capaz de interactuar con la sustancia y (b) que se une al sustrato). En ese caso, el conjugado que no interactúa puede eliminarse fácilmente lavando a la vez que se retiene el conjugado que está unido a la sustancia a ensayar.

El proceso también comprende una etapa de control de una señal en condiciones que permiten la generación de una señal detectable a partir de dicha fracción funcional que es capaz de generar una señal detectable.

En otro aspecto, la realización (7) se refiere a un proceso para identificar si una sustancia interactúa con una fracción funcional de fórmula R_1 . El proceso implica las siguientes etapas:

- producir un conjugado que comprende (a) dicha fracción funcional de fórmula R_1 y (b) una fracción detectable que es capaz de producir una señal que puede ser modificada por dicha sustancia, llevando a cabo un proceso de la realización (2) o (3);
- incubar el conjugado con la sustancia;
- obtener una señal de la fracción detectable; y
- comparar la señal con una señal de control obtenible cuando el conjugado no ha entrado en contacto con la sustancia, determinando así si la sustancia interactúa con el conjugado.

Los ensayos de transferencia de energía de resonancia de Forster, o "FRET", son un ejemplo de realización de este aspecto del proceso de realización (7). En un ensayo FRET, la fracción detectable unida a la fracción funcional de fórmula R_1 es un cromóforo donante y la sustancia está marcada con un cromóforo aceptor. Los pares de cromóforo donante/ cromóforo aceptor son bien conocidos en la técnica. Un ejemplo es el par de proteína fluorescente cian (CFP)/proteína fluorescente amarilla (YFP). Los ensayos de FRET se pueden usar, por ejemplo, para estudiar interacciones proteína-proteína, interacciones proteína-ADN y cambios conformacionales de proteína.

Algunos conjugados de la presente invención pueden ser adecuados para su uso en métodos de tratamiento médico o diagnóstico. En la presente memoria se divulga el uso de dicho compuesto en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante cirugía o terapia o un método de diagnóstico practicado en el cuerpo humano o animal. Esta divulgación también se refiere a un método de tratamiento del cuerpo humano o animal o un método de diagnóstico practicado en el cuerpo humano o animal que comprende administrar al cuerpo humano o animal un compuesto de este tipo.

Como reconocerán inmediatamente los expertos en la materia, los conjugados adecuados para tal uso son generalmente aquellos que comprenden al menos una fracción biológicamente activa (específicamente un fármaco). En un aspecto preferido, la primera fracción funcional es un fármaco y la segunda fracción funcional es una fracción polimérica (por ejemplo, una fracción capaz de mejorar la biodisponibilidad y/o la estabilidad *in vivo*, tal como una fracción de polietilenglicol) o un anticuerpo (por ejemplo, para formar un conjugado de inmunotoxina para su uso en dirigirse a antígenos específicos, como en el tratamiento de cánceres).

Se entenderá que el nivel de dosis específico para cualquier paciente en particular dependerá de una variedad de factores que incluyen la actividad del compuesto específico empleado, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo, la dieta, el tiempo de administración, la vía de administración, la tasa de excreción, la combinación de fármacos y la gravedad de la enfermedad en particular que se está tratando. Los niveles de dosis óptimos y la frecuencia de la dosificación se determinarán mediante un ensayo clínico, pero un ejemplo de dosis sería de 0,1 a 1.000 mg por día. Los compuestos farmacéuticos pueden prepararse para la administración por cualquier vía compatible con sus propiedades farmacocinéticas. Las composiciones administrables por vía oral pueden estar en forma de comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos, pastillas, líquidos o preparaciones de gel, tales como soluciones o suspensiones parenterales orales, tópicas o estériles. Los comprimidos y cápsulas para administración oral pueden estar en forma de presentación de dosis unitaria, y pueden contener excipientes convencionales tales como agentes aglutinantes, por ejemplo jarabe, goma arábiga, gelatina, sorbitol, tragacanto o polivinilpirrolidona; cargas, por ejemplo lactosa, azúcar, almidón de maíz, fosfato de calcio, sorbitol o glicina; lubricante para la fabricación de comprimidos, por ejemplo estearato de magnesio, talco, polietilenglicol o sílice; disgregantes, por ejemplo, almidón de patata, o agentes humectantes aceptables como el lauril sulfato de sodio. Los comprimidos pueden recubrirse de acuerdo con métodos bien conocidos en la práctica farmacéutica normal. Las preparaciones orales líquidas pueden estar en forma de, por ejemplo, suspensiones acuosas u oleosas, soluciones, emulsiones, jarabes o elixires, o pueden presentarse como un producto seco para reconstituir con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Dichas preparaciones líquidas pueden contener aditivos convencionales tales como agentes de suspensión, por ejemplo sorbitol, jarabe, metilcelulosa, jarabe de glucosa, grasas comestibles hidrogenadas con gelatina; agentes emulsionantes, por ejemplo lecitina, monooleato de sorbitán o acacia; vehículos no acuosos (que pueden incluir aceites comestibles), por ejemplo, aceite de almendra, aceite de coco fraccionado, ésteres oleosos tales como glicerina, propilenglicol o alcohol etílico; conservantes, por ejemplo, p-hidroxibenzoato de metilo o propilo o ácido sórbico, y si se desea, agentes aromatizantes o colorantes convencionales.

Para la aplicación tópica en la piel, los compuestos farmacéuticos pueden prepararse en forma de crema, loción o pomada. Las formulaciones de crema o pomada que pueden usarse para el fármaco son formulaciones convencionales bien conocidas en la técnica, por ejemplo, como se describe en los libros de texto estándar de productos farmacéuticos tales como la Farmacopea Británica.

Para la aplicación tópica por inhalación, los compuestos farmacéuticos pueden formularse para la administración por aerosol, por ejemplo, mediante atomizadores a presión o atomizadores ultrasónicos, o preferiblemente mediante aerosoles medidos impulsados por propelente o por administración de polvos micronizados sin propelente, por ejemplo, cápsulas de inhalación u otros sistemas de administración de "polvo seco". Los excipientes, tales como, por ejemplo, propelentes (por ejemplo, Frigen en el caso de aerosoles medidos), sustancias tensioactivas, emulsionantes, estabilizantes, conservantes, saborizantes y cargas (por ejemplo, lactosa en el caso de inhaladores de polvo) pueden estar presentes en tales formulaciones inhaladas. Para propósitos de inhalación, hay una gran cantidad de aparatos disponibles con los cuales se pueden generar y administrar aerosoles de tamaño de partícula óptimo, utilizando una técnica de inhalación que es apropiada para el paciente. Además del uso de adaptadores (espaciadores, expansores) y recipientes en forma de pera (por ejemplo, Nebulator®, Volumatic®), y dispositivos automáticos que emiten una pulverización para inhalación (Autohaler®), para aerosoles medidos, en particular en el caso de inhaladores de polvo, existen varias soluciones técnicas (por ejemplo, Diskhaler®, Rotadisk®, Turbohaler® o los inhaladores, por ejemplo, como se describe en la Solicitud de Patente Europea EP 0 505 321).

Para la aplicación tópica en el ojo, los compuestos farmacéuticos pueden prepararse en una solución o suspensión en un vehículo acuoso o no acuoso estéril adecuado. Aditivos, por ejemplo, tampones tales como metabisulfito de sodio o edetato disódico; conservantes que incluyen agentes bactericidas y fungicidas, como acetato o nitrato fenil mercuríco, cloruro de benzalconio o clorhexidina, y agentes espesantes como la hipromelosa.

El principio activo también puede administrarse parenteralmente en un medio estéril. Dependiendo del vehículo y la concentración utilizada, el medicamento puede suspenderse o disolverse en el vehículo. Ventajosamente, los adyuvantes tales como un anestésico local, agentes conservantes y tampones pueden disolverse en el vehículo.

Los compuestos farmacéuticos pueden usarse junto con una serie de sustancias farmacéuticamente activas conocidas.

55 Ejemplos

Los siguientes Ejemplos ilustran los principios científicos subyacentes a la presente invención.

60 Abreviaturas

DMF Dimetilformamida
TCEP (tris(2-carboxietil)fosfina)

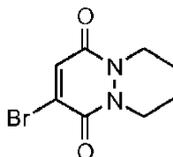
65

Procedimientos generales

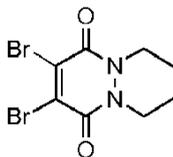
Los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C se registraron a temperatura ambiente en un instrumento Bruker Avance 500 que funciona a una frecuencia de 500 MHz para ^1H y 125 MHz para ^{13}C . Los espectros de RMN de ^1H fueron referenciados a la señal de CDCl_3 (7,26 ppm). Los espectros de RMN de ^{13}C fueron referenciados a la señal de CDCl_3 (77,67 ppm). Los espectros de infrarrojos se registraron en un espectrómetro PerkinElmer Spectrum 100 FT-IR que funciona en modo ATR con frecuencias en centímetros recíprocos (cm^{-1}). Los espectros de masas y los datos de masas de alta resolución para moléculas pequeñas se registraron en un espectrómetro de masas VG70-SE (modo EI y modo CI). Los puntos de fusión se tomaron en un bloque térmico Gallenkamp y están sin corregir. La 3,4-dibromomaleimida, la somatostatina liofilizada y la TCEP se adquirieron de Sigma-Aldrich y se usaron sin purificación adicional.

Espectrometría de masas de proteínas y péptidos

La LC-MS se realizó en muestras de proteínas utilizando un Waters Acquity uPLC conectado a un to Waters Acquity Single Quad Detector (SQD). Columna: Acquity uPLC BEH C18 $1,7 \mu\text{m}$, $2,1 \times 50 \text{ mm}$. Longitud de onda: 254 nm. Fase móvil: 95: Agua (0,1 % de ácido fórmico): MeCN (0,1 % de ácido fórmico). Gradiente durante 4 min (a 5:95 Agua (0,1 % de ácido fórmico):MeCN (0,1 % de ácido fórmico)). Caudal: 0,6 ml/min. Modo MS: ES+. Rango de exploración: $m/z = 85\text{-}2000$. Tiempo de exploración: 0,25 seg. Datos obtenidos en modo continuo. La fuente de electronebulización de la MS se operó con un voltaje capilar de 3,5 kV y un voltaje de cono de 50 V. Se usó nitrógeno como nebulizador y gas de desolvatación a un caudal total de 600 l/h. Los espectros de masas totales se reconstruyeron a partir de la serie de iones utilizando el algoritmo MaxEnt 1 preinstalado en el software MassLynx. El análisis MALDI-TOF fue realizado en un MALDI micro MX (Micromass). Los datos se obtuvieron en modo de ion positivo reflectrón con una fuente de voltaje de 12 kV y una tensión de reflectrón de 5 kV a una longitud de onda del láser de 337 nm. Las muestras se prepararon como se describe a continuación y las que contienen péptido se dializaron durante 24 h en H_2O desionizada. El péptido y sus derivados (0,1-0,3 mg/ml) se mancharon en una placa MALDI en 2 μl de ácido sinapínico (10 mg/ml) después de la detección previa de ácido trifluoroacético (10 mg/ml). Se usó ACTH (10 ng/ml) para la calibración de masas.

30 Ejemplo de referencia 1: Preparación de 4-bromo-1,2-dietil-1,2-dihidro-piridazina-3,6-diona (BrDDPD)

Una mezcla de anhídrido monobromomaleico (177 mg, 1,0 mmol) y *N,N'*- dietilhidrazina (88 mg, 1,0 mmol) se calentó en AcOH glacial (3 ml) a 130°C durante 16 h. El disolvente fue eliminado en vacío y el residuo crudo purificado por cromatografía en columna ($\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-}5\% \text{ MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ puro) para dar 4-bromo-1,2-dietil-1,2-dihidro-piridazina-3,6-diona como un sólido amarillo (159 mg, 0,64 mmol, 64 %): RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) δ 7,31 (s, 1H), 4,14 (c, $J = 7,0 \text{ Hz}$, 2H), 4,07 (c, $J = 7,0 \text{ Hz}$, 2H), 1,26 (t, $J = 7,0 \text{ Hz}$, 3H), 1,22 (t, $J = 7,0 \text{ Hz}$, 3H); RMN de ^{13}C (150 MHz, CDCl_3) δ 156,2 (s), 154,3 (s), 136,0 (d), 133,7 (s), 41,9 (t), 40,7 (t), 13,3 (c), 13,3 (c); IR (sólido) 3058, 2979, 2938, 1631, 1595 cm^{-1} ; LRMS (CI) 249 (100, $[\text{M}^{81}\text{Br}+\text{H}]^+$), 247 (100, $[\text{M}^{79}\text{Br}+\text{H}]^+$); HRMS (CI) calc. para $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{BrN}_2\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 249,0082, observado 249,0086.

Ejemplo de referencia 2: Preparación de 4,5-dibromo-1,2-dietil-1,2-dihidro-piridazina-3,6-diona (DiBrDDPD)

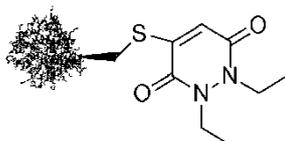
Una mezcla de anhídrido dibromomaleico (256 mg, 1,0 mmol) y *N,N'*-dietilhidrazina (88 mg, 1,0 mmol) se calentó en AcOH glacial (3 ml) a 130°C durante 16 h. El disolvente fue eliminado en vacío y el residuo crudo purificado por cromatografía en columna ($\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-}5\% \text{ MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ puro) para dar 4,5-dibromo-1,2-dietil-1,2-dihidro-piridazina-3,6-diona como un sólido amarillo (202 mg, 0,62 mmol, 62 %): RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) δ 4,17 (c, $J = 7,0 \text{ Hz}$, 4H), 1,28 (t, $J = 7,0 \text{ Hz}$, 6H); RMN de ^{13}C (150 MHz, CDCl_3) δ 153,3 (s), 136,1 (s), 42,4 (t), 13,2 (c); IR (sólido) 2979, 2937, 1630, 1574 cm^{-1} ; LRMS (EI) 328 (50, $[\text{M}^{81}\text{Br}^{81}\text{Br}]^{++}$), 326 (100, $[\text{M}^{81}\text{Br}^{79}\text{Br}]^{++}$), 324 (50, $[\text{M}^{79}\text{Br}^{79}\text{Br}]^{++}$); HRMS (EI) calc. para $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{Br}_2\text{N}_2\text{O}_2$ $[\text{M}^{79}\text{Br}^{79}\text{Br}]^{++}$ 323,9104, observado 323,9097.

Ejemplo de referencia 3: clonación y expresión del mutante Grb2-SH2 L111C

5 Secuencia de Grb2-SH2 L111C (restos 53-163): MGIEMKPHPWFFGKIP
 RAKAEEMLSKQRHDGAFLIRESESAPGDFSLSVKFGND VQHFVKCRDGAGKYFLWVVKFNSLNLVDYHRSTSVS
 RNQQIFLRDIEQVPQQPTYVQAGSRSHHHHHH Stop. Masa calculada = 14171

10 La construcción de ADN para el dominio Grb2 SH2 contenía la secuencia de aminoácidos primaria 53-163 y se clonó en el plásmido QE-60 (Qiagen). El mutante Grb2 SH2 L111C se construyó mediante mutagénesis dirigida al sitio (Stratagene Kit) utilizando oligonucleótidos que codifican el resto mutado. Ambas construcciones se expresaron en *Escherichia coli* (M15 [pREP4], Qiagen) utilizando un promotor T5 y una etiqueta 6-His C-terminal se incorporó para la purificación. Los cultivos (1 l) se cultivaron a 37 °C en T.B. de una sola colonia, y la expresión se indujo con IPTG 1,0 mM cuando se alcanzó una DO_{λ600} de 0,9. Los cultivos se dejaron expresar la proteína durante aproximadamente 3 h antes de que las células se sedimentaran. Los sedimentos se lisaron en fosfato de sodio 0,1 M, NaCl 300 mM, imidazol 50 mM, pH 7,2 que contenía un cóctel inhibidor de proteasa (Roche). El lisado se centrifugó y el sobrenadante se aplicó a una columna de Ni-NTA (Qiagen). Grb2-SH2 L111C se eluyó de la columna de Ni-NTA con fosfato de sodio 0,1 M, NaCl 300 mM, imidazol 200 mM a pH 7,2. El Grb2 SH2 L111C recogido tenía una pureza de aproximadamente el 95 % según se visualizó mediante SDS-PAGE teñida con Coomassie. La dimerización del dominio Grb2 SH2 a través del intercambio de dominios ha sido observada previamente. Grb2-SH2 dimerico y monomérico se separaron en una columna de Sephacryl S-100 (320 ml) que se había preequilibrado con fosfato de sodio 0,1 M y NaCl 150 mM a pH 8,0. Se eluyeron dos picos, correspondientes a los pesos moleculares del monómero (~14 kDa) y el dímero (~28 kDa) Grb2-SH2. Casi el 60 % del dominio Grb2-SH2 L111C se eluyó de la columna como monómero. Se encontró que el monómero y el dímero separados son sorprendentemente cinéticamente estables, ya que se observó muy poca interconversión durante un ciclo de meses a 4 °C. El monómero se concentró utilizando unidades de filtro centrifugo Amicon® Ultra-4 (Millipore) y la concentración final de la proteína se determinó mediante absorbancia a 280 nm utilizando el coeficiente de extinción obtenido por McNemar y colaboradores (15,600M⁻¹). La proteína se congeló a una concentración de 2 mg/ml en alícuotas de 100 ml que se descongelaron según lo requerido para los experimentos. La masa de la proteína monomérica (masa 14170) se obtuvo usando ESI-MS.

35 A una solución de proteína modelo (100 µl, [Proteína] 2,0 mg/ml, fosfato de sodio 100 mM, NaCl 150 mM, pH 8,0) a 0 °C se añadió reactivo de Ellman (5 µl, solución 282 mM en H₂O) a 0 °C. La mezcla se agitó en vórtex durante 1 s y se mantuvo a 0 °C durante 10 minutos, después de lo cual la mezcla se analizó mediante LC-MS. El análisis mostró que se había producido una única reacción que daba un solo producto con una masa de 14370 que mostraba que C111 estaba disponible para la funcionalización.

Ejemplo de referencia 4: Preparación del aducto dominio GrB2-SH2 L111C / BrDDPD

40 A una solución de proteína modelo (100 µl, [Proteína] 2,0 mg/ml, fosfato de sodio 100 mM, NaCl 150 mM, pH 8,0) se añadió BrDDPD (5 µl, solución 282 mM en DMF) a 0 °C. La mezcla se agitó en vórtex durante 1 s, luego se mantuvo a 37 °C durante 1 h. El análisis utilizando LC-MS mostró que el producto deseado se había formado con un rendimiento cuantitativo (masa 14348).

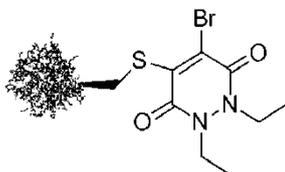
Ejemplo de referencia 5: Escisión mediada por β-mercaptoetanol del aducto dominio GrB2-SH2 L111C / BrDDPD

50 A una solución de proteína modelo (100 µl, [Proteína] 2,0 mg/ml, fosfato de sodio 100 mM, NaCl 150 mM, pH 8,0) se añadió BrDDPD (5 µl, solución 282 mM en DMF) a 0 °C. La mezcla se agitó en vórtex durante 1 s, luego se mantuvo a 37 °C durante 1 h. El análisis usando LC-MS mostró que el aducto proteína/BrDDPD se había formado con un rendimiento cuantitativo (masa 14348).

55 La mezcla se dializó durante 40 horas a 4 °C (fosfato de sodio 100 mM, NaCl 150 mM, pH 8,0) y se trató con β-

mercaptoetanol (5 μ l, solución 2,82 M en H₂O) a 37 °C. La mezcla se agitó en vórtex durante 1 s y se mantuvo a 37 °C durante 2 h, después de lo cual la mezcla se analizó mediante LC-MS. El análisis mostró que se había formado el producto deseado (masa = 14180) en conversión cuantitativa.

5 **Ejemplo de referencia 6: Preparación del aducto dominio GrB2-SH2 L111C / DiBrDDPD**



10 A una solución de proteína modelo (100 μ l, [Proteína] 2,0 mg/ml, fosfato de sodio 100 mM, NaCl 150 mM, pH 8,0) a 0 °C se añadió DiBrDDPD (5 μ l, solución 282 mM en DMF). La mezcla se agitó en vórtex durante 1 s, luego se mantuvo a 37 °C durante 1 h. El análisis utilizando LC-MS mostró que el producto deseado se había formado con un rendimiento cuantitativo (masa 14427).

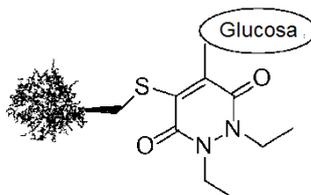
15 **Ejemplo de referencia 7: Escisión mediada por β -mercaptoetanol del aducto dominio GrB2-SH2 L111C / DiBrDDPD**



20 A una solución de proteína modelo (100 μ l, [Proteína] 2,0 mg/ml, fosfato de sodio 100 mM, NaCl 150 mM, pH 8,0) a 0 °C se añadió DiBrDDPD (5 μ l, solución 282 mM en DMF). La mezcla se agitó en vórtex durante 1 s, luego se mantuvo a 37 °C durante 1 h. El análisis con LC-MS mostró que el aducto proteína/DiBrDDPD se había formado en rendimiento cuantitativo (masa 14427).

25 La mezcla se dializó durante 40 horas a 4 °C (fosfato de sodio 100 mM, NaCl 150 mM, pH 8,0), luego se trató con β -mercaptoetanol (5 μ l, solución 2,82 M en H₂O) a 37 °C. La mezcla se agitó en vórtex durante 1 s y se mantuvo a 37 °C durante 2 h, después de lo cual la mezcla se analizó mediante LC-MS. El análisis mostró que se había formado el producto deseado (masa = 14180) en conversión cuantitativa.

30 **Ejemplo 1: Preparación del aducto dominio GrB2-SH2 L111C / DiBrDDPD/ β -1-tioglucosa**



35 A una solución de proteína modelo (100 μ l, [Proteína] 2,0 mg/ml, fosfato de sodio 100 mM, NaCl 150 mM, pH 8,0) a 0 °C se añadió DiBrDDPD (5 μ l, solución 282 mM en DMF). La mezcla se agitó en vórtex durante 1 s, luego se mantuvo a 37 °C durante 1 h. El análisis con LC-MS mostró que el aducto proteína / DiBrDDPD se había formado en rendimiento cuantitativo (masa 14427).

40 La mezcla se dializó durante 40 h a 4 °C (fosfato de sodio 100 mM, NaCl 150 mM, pH 8,0), luego se trató con β -1-tioglucosa (5 μ l, solución 28,2 mM en H₂O) a 0 °C. La mezcla se agitó en vórtex durante 1 s y se mantuvo a temperatura ambiente durante 1 h, después de lo cual la mezcla se analizó mediante LC-MS. El análisis mostró que el aducto proteína / DiBrDDPD / β -1-tioglucosa era la única especie de proteína presente (masa = 14543).

45 **Ejemplo 2: Escisión mediada por β -mercaptoetanol del aducto dominio GrB2-SH2 L111C / DiBrDDPD/ β -1-tioglucosa**



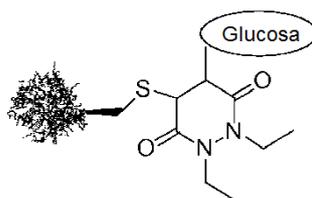
50 A una solución de proteína modelo (100 μ l, [Proteína] 2,0 mg/ml, fosfato de sodio 100 mM, NaCl 150 mM, pH 8,0) a 0 °C se añadió DiBrDDPD (5 μ l, solución 282 mM en DMF). La mezcla se agitó en vórtex durante 1 s, luego se mantuvo a 37 °C durante 1 h. El análisis con LC-MS mostró que el aducto proteína / DiBrDDPD se había formado en

rendimiento cuantitativo (masa 14427).

La mezcla se dializó durante 40 h a 4 °C (fosfato de sodio 100 mM, NaCl 150 mM, pH 8,0), luego se trató con β-1-tioglucona (5 μl, solución 28,2 mM en H₂O) a 0 °C. La mezcla se agitó en vórtex durante 1 s y se mantuvo a temperatura ambiente durante 1 h, después de lo cual la mezcla se analizó mediante LC-MS. El análisis mostró que el aducto proteína / DiBrDDPD / β-1-tioglucona era la única especie de proteína presente (masa = 14543).

La mezcla se trató con β-mercaptoetanol (5 μl, solución 2,82 M en H₂O) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó en vórtex durante 1 s y se mantuvo a temperatura ambiente durante 30 minutos, después de lo cual la mezcla se analizó mediante LC-MS. El análisis mostró que el producto deseado se había formado (masa = 14180) en conversión cuantitativa.

Ejemplo 3: Preparación del aducto dominio GrB2-SH2 L111C / BrDDPD / β-1-tioglucona

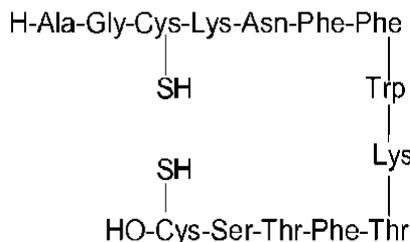


A una solución de proteína modelo (100 μl, [Proteína] 2,0 mg/ml, fosfato de sodio 100 mM, NaCl 150 mM, pH 8,0) se añadió BrDDPD (5 μl, solución 282 mM en DMF) a 0 °C. La mezcla se agitó en vórtex durante 1 s, luego se mantuvo a 37 °C durante 1 h. El análisis usando LC-MS mostró que el aducto proteína / BrDDPD se había formado en rendimiento cuantitativo (masa 14348).

La mezcla se dializó durante 40 h a 4 °C (fosfato de sodio 100 mM, NaCl 150 mM, pH 8,0), luego se trató con β-1-tioglucona (5 μl, solución 28,2 mM en H₂O) a 0 °C. La mezcla se agitó en vórtex durante 1 s y se mantuvo a 37 °C durante 1 h, después de lo cual la mezcla se analizó mediante LC-MS. El análisis mostró que el aducto proteína / BrDDPD / β-1-tioglucona se formó en una conversión del 17 % (masa = 14543).

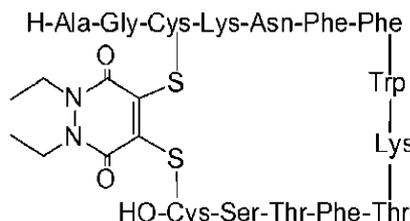
Ejemplo de referencia 8: Modificación y regeneración de la somatostatina

Preparación de somatostatina reducida



La somatostatina liofilizada (masa = 1638) se solubilizó en un tampón (fosfato de sodio 50 mM, pH 6,2, MeCN 40 %, DMF 2,5 %) para obtener una concentración de 152,6 μM (0,25 mg/ml) y se redujo con 1,1 equivalentes de TCEP durante 1 h a temperatura ambiente. La finalización de la reducción se confirmó mediante la adición de 4 equivalentes de dibromomaleimida a una parte alícuota de la muestra y el análisis por LC-MS.

Modificación de la somatostatina con DiBrDDPD



Se solubilizó la somatostatina liofilizada (masa = 1638) en tampón (fosfato de sodio 50 mM, pH 6,2, MeCN 40 %, DMF 2,5 %) para obtener una concentración de 152,6 μM (0,25 mg/ml) y se redujo con 1,1 equivalentes de TCEP durante 1 h a 21 °C. La finalización de la reducción se confirmó por LCMS (masa = 1640). Se añadió DiBrDDPD (100 moles eq) y la reacción se mantuvo a 21 °C durante 10 minutos. Se observó que el aducto de somatostatina /

DiBrDDPD forma una conversión cuantitativa (masa = 1803).

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> UCL Business PLC
<120> ENLACE COVALENTE REVERSIBLE DE MOLÉCULAS FUNCIONALES
<130> N.108262B
10 <140> 10742867.4
<141> 09-08-2010
<150> PCT/GB10/001499
15 <151> 09-08-2010
<150> GB 0914321.5
<151> 14-08-2009
20 <150> GB 0913965.0
<151> 10-08-2009
<150> GB 0913967.6
25 <151> 10-08-2009
<160> 5
<170> PatentIn versión 3.5
30 <210> 1
<211> 123
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
35 <220>
<223> Mutante Grb2-SH2 L111C
<400> 1

ES 2 699 312 T3

Ala Gly Xaa Lys Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Thr Ser Xaa
1 5 10

5 <210> 4
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Somatostatina modificada con anhídrido dibromomaleico

15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> Cisteína modificada con anhídrido dibromomaleico

20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (14)..(14)
 <223> Cisteína modificada con anhídrido dibromomaleico

<400> 4

Ala Gly Xaa Lys Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Thr Ser Xaa
1 5 10

25 <210> 5
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Somatostatina modificada con DiBrDDPD

35 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> Cisteína modificada con DiBrDDPD

40 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (14)..(14)
 <223> Cisteína modificada con DiBrDDPD

<400> 5

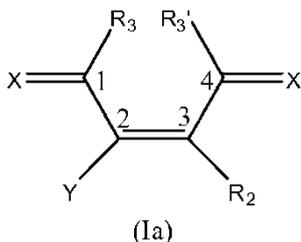
Ala Gly Xaa Lys Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Thr Ser Xaa
1 5 10

45

REIVINDICACIONES

1. Uso de un compuesto de fórmula (Ia) como un reactivo para unir un compuesto de fórmula R₁-H que comprende una primera fracción funcional de fórmula F₁ a una segunda fracción funcional de fórmula F₂

5



en la que:

- 10
- X y X' representan cada uno oxígeno;
 - Y es un grupo saliente electrófilo;
 - R₃ y R₃' juntos forman un grupo de fórmula -N(R_{33'})-N(R_{33'})-, en la que cada R_{33'} es igual o diferente y representa un átomo de hidrógeno o un grupo de fórmula Y, Nu, -L(Z)_n o IG;
 - R₁ es un grupo de fórmula -F₁ o -S-L-F₁ y R₁-H comprende al menos un primer grupo SH;

15

 - R₂ representa un átomo de hidrógeno o un grupo de fórmula Y, Nu, -L(Z)_n o IG;
 - cada grupo de fórmula Y es igual o diferente y representa un grupo saliente electrófilo;
 - cada grupo de fórmula Nu es igual o diferente y representa un nucleófilo seleccionado de -OH, -SH, -NH₂ y -NH(alquilo C₁₋₆);
 - cada grupo de fórmula L es igual o diferente y representa un grupo enlazador;

20

 - cada grupo de fórmula Z es igual o diferente y representa un grupo reactivo unido a un grupo de fórmula L que es capaz de reaccionar con un compuesto que contiene una segunda fracción funcional de fórmula F₂ de manera que dicha segunda fracción funcional se une a dicho grupo de fórmula L;
 - n es 1, 2 o 3; y
 - cada grupo de fórmula IG es igual o diferente y representa una fracción que es un grupo alquilo C₁₋₂₀, un grupo alqueno C₂₋₂₀ o un grupo alquino C₂₋₂₀, que está sin sustituir o está sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados de átomos de halógeno y grupos de ácido sulfónico, y en el cual (a) 0, 1 o 2 átomos de carbono se reemplazan por grupos seleccionados de arileno C₆₋₁₀, heteroarileno de 5 a 10 miembros, carbociclileno C₃₋₇ y grupos heterociclileno de 5 a 10 miembros, y (b) 0, 1 o 2 grupos -CH₂- se reemplazan por grupos seleccionados entre grupos -O-, -S-, -S-S-, -C(O)- y -N(alquilo C₁₋₆)-, en la que:

25

 - (i) dichos grupos arileno, heteroarileno, carbociclileno y heterociclileno están sin sustituir o están sustituidos con uno o más sustituyentes seleccionados de átomos de halógeno y grupos alquilo C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆, alquiltiol C₁₋₆, -N(alquilo C₁₋₆)(alquilo C₁₋₆), grupos nitro y ácido sulfónico; y
 - (ii) 0, 1 o 2 átomos de carbono en dichos grupos carbociclileno y heterociclileno están reemplazados por grupos -C(O)-; y

30

30

35

- o:

- 40
- una de la primera fracción funcional y la segunda fracción funcional es una proteína que es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que es capaz de unirse a un antígeno específico a través de un epítipo en el antígeno, y la otra de la primera fracción funcional y la segunda fracción funcional es un fármaco o
 - una de la primera fracción funcional y la segunda fracción funcional es una fracción polimérica seleccionada de péptidos, proteínas, polisacáridos, poliéteres, poliaminoácidos, poli(alcoholes vinílicos), polivinilpirrolidonas, poli(ácido(met)acrílico, poliuretanos y polifosfazenos, y la otra de la primera fracción funcional y la segunda fracción funcional es un fármaco; o

45

 - una de la primera fracción funcional y la segunda fracción funcional es una proteína que es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que es capaz de unirse a un antígeno específico a través de un epítipo en el antígeno, y la otra de la primera fracción funcional y la segunda fracción funcional es una fracción detectable seleccionada del grupo que consiste en fracciones cromogénicas, fracciones fluorescentes, fracciones radiactivas y fracciones electroquímicamente activas;

50

50

en la que el grupo R₁ se une al compuesto de fórmula (Ia) mediante el ataque nucleófilo del primer grupo SH en el compuesto de fórmula R₁-H en la posición 2 del compuesto de fórmula (Ia), de manera que el grupo Y en la posición 2 se reemplaza por el grupo R₁.

55

2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que:

(A):

Y es un átomo de halógeno o un grupo triflato, tosilato, mesilato, N-hidroxisuccinimidilo, N-hidroxisulfosuccinimidilo, alquiltiol C₁₋₆, heterociciltiol de 5 a 10 miembros, ariltiol C₆₋₁₀, carbociciltiol C₃₋₇, -OC(O)CH₃, -OC(O)CF₃, feniloxi, -NR_xR_yR_z⁺ o el grupo -PR_xR_yR_z⁺, en el cual R_x, R_y y R_z son iguales o diferentes y se seleccionan de átomos de hidrógeno y grupos alquilo C₁₋₆ y fenilo; y/o

(B):

L representa una fracción que es un grupo alquileo C₁₋₂₀, un grupo alquenileo C₂₋₂₀ o un grupo alquinileo C₂₋₂₀, que no está sustituido o está sustituido por uno o más sustituyentes seleccionados de átomos de halógeno y grupos ácido sulfónico, y en la que (a) 0, 1 o 2 átomos de carbono están reemplazados por grupos seleccionados de grupos arileno C₆₋₁₀, heteroarileno de 5 a 10 miembros, carbocicileno C₃₋₇ y heterocicileno de 5 a 10 miembros, y (b) 0, 1 o 2 grupos -CH₂- están reemplazados por grupos seleccionados de los grupos -O-, -S-, -S-S-, -C(O)- y -N(alquilo C₁₋₆)-, en la que:

(i) dichos grupos arileno, heteroarileno, carbocicileno y heterocicileno no están sustituidos o están sustituidos por uno o más sustituyentes seleccionados de átomos de halógeno y alquilo C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆, alquiltiol C₁₋₆, N(alquilo C₁₋₆)(alquilo C₁₋₆), grupos nitro y ácido sulfónico; y

(ii) 0, 1 o 2 átomos de carbono en dichos grupos carbocicileno y heterocicileno están reemplazados por grupos -C(O)-; y/o

(C)

Z representa:

(a) un grupo de fórmula -LG, -C(O)-LG, -C(S)-LG o -C(NH)-LG en la que LG es un grupo saliente electrófilo;

(b) un nucleófilo Nu' seleccionado de grupos -OH, -SH, -NH₂, -NH(alquilo C₁₋₆) y grupos -C(O)NHNH₂;

(c) una fracción cíclica Cyc, que es capaz de una reacción electrófila por apertura del anillo con un nucleófilo;

(d) un grupo de fórmula -S(O₂)(Hal) en la que Hal es un átomo de halógeno;

(e) un grupo de fórmula -N=C=O o -N=C=S;

(f) un grupo de fórmula -S-S(IG') en la que IG' representa un grupo de fórmula IG según se define en la reivindicación 2;

(g) un grupo AH, que es un grupo arilo C₆₋₁₀ que está sustituido por uno o más átomos de halógeno;

(h) un grupo fotorreactivo que es capaz de activarse por la exposición a la luz ultravioleta;

(i) un grupo de fórmula -C(O)H o -C(O)(alquilo C₁₋₆);

(j) un grupo maleimido;

(k) un grupo de fórmula -C(O)CHCH₂;

(l) un grupo de fórmula -C(O)C(N₂)H o -PhN²⁺, donde Ph representa un grupo fenilo; o

(m) un grupo epóxido; y/o

(D)

IG representa una fracción que es un grupo alquilo C₁₋₆, un grupo alquenilo C₂₋₆ o un grupo alquinilo C₂₋₆ no sustituido, en el que (a) 0 o 1 átomo de carbono es reemplazado por un grupo seleccionado de grupos fenileno, heteroarileno de 5 a 6 miembros, carbocicileno C₅₋₆ y heterocicileno de 5 a 6 miembros, en la que dichos grupos fenileno, heteroarileno, carbocicileno y heterocicileno no están sustituidos o están sustituidos por uno o dos sustituyentes seleccionados de átomos de halógeno y grupos alquilo C₁₋₄ y alcoxi C₁₋₄, y (b) 0, 1 o 2 grupos -CH₂- están reemplazados por grupos seleccionados de grupos -O-, -S- y -C(O)-; y/o

(E):

n es 1; y/o

(F):

dicho fármaco es un agente citotóxico.

3. Uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que:

- R₁ es un grupo de fórmula -F₁;

- F₁ es un péptido o proteína que comprende al menos un primer resto de cisteína; y

- el grupo R₁ se une al compuesto de fórmula (Ia) mediante el ataque nucleófilo del grupo tiol de dicho primer resto de cisteína en la posición 2 del compuesto de fórmula (Ia), de tal manera que el grupo Y es reemplazado por el grupo tiol en el primer resto de cisteína en el grupo R₁;

y en la que opcionalmente:

- R₂ es un grupo de fórmula Y;

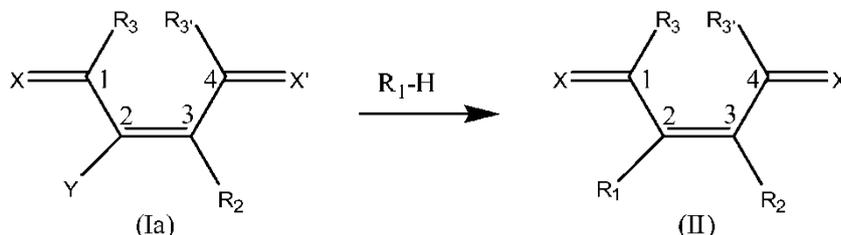
- R₁ comprende además al menos un segundo resto de cisteína y

- el grupo R₁ se une además al compuesto de fórmula (Ia) mediante el ataque nucleófilo del grupo tiol de dicho segundo resto de cisteína en la posición 3 de la fracción de fórmula (Ia), de tal manera que el grupo

R₂ es reemplazado por el grupo tiol en el segundo resto de cisteína en el grupo R₁;

4. Un proceso para producir un conjugado, proceso que comprende

- 5 (i) hacer reaccionar un compuesto de fórmula (Ia) con un compuesto de fórmula R₁-H, produciendo así un compuesto de fórmula (II)

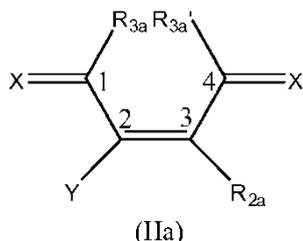


- 10 (ii) unir posteriormente una fracción de fórmula F₂ a dicho compuesto de fórmula (II);
 en la que la etapa (i) implica unir el grupo R₁ mediante el ataque nucleófilo del primer grupo SH en el compuesto de fórmula R₁-H en la posición 2 de la fracción de fórmula (Ia), de manera que el grupo Y en la posición 2 se reemplaza por el grupo R₁,
 y en la que X, X', Y, R₁, R₂, R₃, R₃' y F₂ son todos como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

5. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 4, en la que:

- (A):
 20 el proceso comprende unir F₂ al compuesto de fórmula (II) mediante una reacción de adición electrófila de F₂ en el doble enlace carbono-carbono entre la posición 2 y la posición 3 de la fórmula (II); o
 (B):
 R₂ representa un grupo de fórmula Y, Nu o -L(Z)_n y el proceso comprende unir F₂ al compuesto de fórmula (II) mediante una reacción entre F₂ y dicho grupo de fórmula Y, Nu o -L(Z)_n.

6. Un proceso para producir un conjugado, proceso que comprende hacer reaccionar un compuesto de fórmula R₁-H con un compuesto de fórmula (IIa)

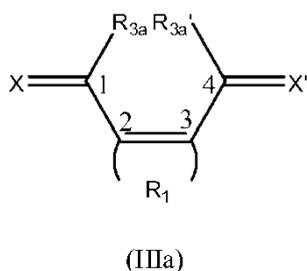
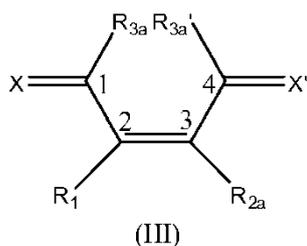


- 30 en la que:
- R_{3a} y R_{3a'} juntos forman un grupo de fórmula -N(R_{33a'})-N(R_{33a'})-, en la que cada R_{33a'} es igual o diferente y representa un grupo de fórmula R_{33'} o un grupo de fórmula F₂ o -L(F₂)_m(Z)_{n-m};
 - 35 - R_{2a} representa un grupo de fórmula R₂ o un grupo de fórmula F₂ o -L(F₂)_m(Z)_{n-m};
 - m es un número entero que tiene un valor de cero a n;
 - el compuesto de fórmula (IIa) comprende al menos un grupo de fórmula F₂;
 - F₂ es como se define en la reivindicación 1;
 - X, X', R₃, R₃', R_{33'}, R₂, L, Z y n son todos como se ha definido en la reivindicación 1 o 2;
 - 40 - R₁ es como se define en la reivindicación 1 o 3; y
 - el proceso implica unir el grupo R₁ mediante el ataque nucleófilo del primer grupo SH en el compuesto de fórmula R₁-H en la posición 2 del compuesto de fórmula (IIa), de modo que el grupo Y en la posición 2 se reemplaza por el grupo R₁.

45 7. Un proceso que comprende

- (i) proporcionar un compuesto de fórmula (III) o (IIIa); y
 (ii) escindir el enlace entre el grupo R₁ y el átomo de carbono en la posición 2 del compuesto de fórmula (III) o (IIIa)

50



5 en la que:

- R_{3a} y $R_{3a'}$ juntos forman un grupo de fórmula $-N(R_{33a'})-N(R_{33a})-$, en la que cada $R_{33a'}$ es igual o diferente y representa un grupo de fórmula $R_{33'}$ o un grupo de fórmula F_2 o $-L(F_2)_m(Z)_{n-m}$;
- R_{2a} representa un grupo de fórmula R_2 o un grupo de fórmula F_2 o $-L(F_2)_m(Z)_{n-m}$;
- 10 – m es un número entero que tiene un valor de cero a n ;
- R_1 es como se define en la reivindicación 1 o 3;
- F_2 es como se define en la reivindicación 1;
- $X, X', R_3, R_3', R_{33'}, R_2, L, Z$ y n son todos como se ha definido en la reivindicación 1 o 2.

15 y en la que cuando el proceso implica el compuesto de fórmula (IIIa):

- R_1 del compuesto de fórmula (IIIa) comprende al menos un primer grupo tiol y un segundo grupo tiol, estando dicho primer grupo tiol unido a la posición 2 en el compuesto de fórmula (IIIa) y estando un segundo grupo tiol unido a la posición 3 en el compuesto de fórmula (IIIa); y
- 20 – la etapa (ii) implica además escindir el enlace entre el grupo R_1 y el átomo de carbono en la posición 3 de la fracción de fórmula (IIIa).

8. Un compuesto, compuesto que es:

- 25 (A) un compuesto de fórmula (IIa) como se define en la reivindicación 6; o
- (B) un compuesto de fórmula (III) como se define en la reivindicación 7, que comprende al menos un grupo de fórmula F_2 y en la que R_{2a} no es un átomo de hidrógeno.

9. Un compuesto de fórmula (IIIa) como se define en la reivindicación 7.

30 10. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 9, que comprende al menos un grupo de fórmula F_2 .

35 11. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 9 o 10, en el que R_1 es un péptido o proteína que comprende al menos dos restos de cisteína, restos de cisteína que preferiblemente forman un puente disulfuro interno en el péptido o proteína cuando dicho péptido o proteína no está unido en el compuesto de fórmula (IIIa).

12. Un proceso que es:

40 (A) un proceso para detectar si una sustancia está presente en una muestra, proceso que comprende:

- proporcionar un compuesto como se define en (B) de la reivindicación 8 o la reivindicación 10, en el que una de dicha primera fracción funcional y dicha segunda fracción funcional es una fracción funcional que es capaz de generar una señal detectable y la otra de dicha primera fracción funcional y dicha segunda fracción funcional es una fracción funcional que es capaz de interactuar con dicha sustancia;
- 45 – incubar dicha muestra con dicho compuesto; y
- rastrear una señal en condiciones que permitan la generación de una señal detectable de dicha fracción funcional que es capaz de generar una señal detectable; o

(B) un proceso para identificar si una sustancia interactúa con una fracción funcional de fórmula R_1 , proceso que

comprende:

- 5
- producir un conjugado que comprende (a) dicha fracción funcional de fórmula R_1 y (b) una fracción detectable que es capaz de producir una señal que puede ser modificada por dicha sustancia, llevando a cabo un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6;
 - incubar dicho conjugado con dicha sustancia;
 - obtener una señal de dicha fracción detectable; y
 - comparar dicha señal con una señal de control obtenible cuando dicho conjugado no ha sido puesto en
- 10
13. Un proceso como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en el que el proceso comprende además unir una o más fracciones funcionales adicionales al conjugado, en el que cada fracción funcional adicional es igual o diferente y se selecciona de una fracción detectable, una fracción enzimáticamente activa, una etiqueta de afinidad, un hapteno, un vehículo inmunogénico, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, un antígeno, un ligando,
- 15
- una fracción biológicamente activa, un liposoma, una fracción polimérica, un aminoácido, un péptido, una proteína, una célula, un carbohidrato, un ADN y un ARN.