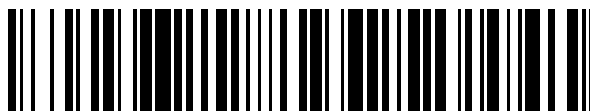


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 703 514**

51 Int. Cl.:

C07D 277/64 (2006.01)

C12Q 1/66 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.04.2014** **PCT/GB2014/051080**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.10.2014** **WO14162157**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.04.2014** **E 14717070 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.10.2018** **EP 2981527**

54 Título: **Derivados de luciferina**

30 Prioridad:

05.04.2013 GB 201306248

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

11.03.2019

73 Titular/es:

**UNIVERSITY COLLEGE CARDIFF CONSULTANTS
LIMITED (100.0%)
30-36 Newport Road, Cardiff
South Glamorgan CF24 0DE, GB**

72 Inventor/es:

**JATHOUL, AMIT P.;
GROUNDS, HELEN;
ANDERSON, JAMES C. y
PULE, MARTIN A.**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 703 514 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

Derivados de luciferina

La presente invención se refiere a compuestos y sus usos. En particular, aunque no exclusivamente, se refiere a compuestos luminogénicos y a su aplicación en técnicas de formación de imágenes *in vivo*.

- 5 La catálisis de un sustrato (por ejemplo, la luciferina) por una enzima de bioluminiscencia (BLI) (por ejemplo, luciferasa) produce la liberación de luz. Así, la formación de imágenes de bioluminiscencia de animales pequeños emplea la emisión de luz por la expresión transgénica, en particular, de la luciferasa de luciérnaga ("firefly luciferase", Fluc), en uno o más tejidos seleccionados. Esta modalidad rápida, barata y muy sensible ha revolucionado el uso de los modelos de animales pequeños, permitiendo el seguimiento cuantitativo y longitudinal
- 10 fácil de células marcadas de un modo no invasivo. Además, las enzimas y los sustratos funcionalizados permiten la formación de imágenes de acontecimiento biológicos dentro de animales pequeños.

Sin embargo, la extensión de esta modalidad para permitir formar imágenes multiparamétricas y tomográficas verdaderas ha demostrado ser difícil, principalmente porque las luciferasas emiten luz (de color amarillo verdoso) que en gran medida es absorbida por la hemoglobina. Esto provoca difusión y una atenuación diferencial que

15 depende de la densidad del tejido y de la profundidad de la fuente de luz. Por tanto, el desplazamiento de la emisión de la luciferasa hacia el infrarrojo cercano ("near infrared", nIR) eliminaría estas barreras, puesto que incluso los tejidos complejos de mamíferos son bastante transparentes en estas longitudes de onda (en la "ventana óptica" de aproximadamente 620-800 nm).

A pesar del gran interés existente, en la actualidad no existe ningún marcador de BLI de nIR codificado genéticamente. Además, debido a que la BLI se limita, en la actualidad, a animales relativamente pequeños, la

20 emisión en nIR con un rendimiento cuántico respetable permitiría obtener BLI en animales más grandes de lo que es posible hoy en día.

La luciferasa de luciérnaga (Fluc) se ha modificado mucho, aumentando su expresión y su estabilidad y desplazando su emisión con la luciferina de luciérnaga natural desde el amarillo verdoso al rojo. Sin embargo, es evidente que los

25 sistemas actuales están cerca del límite del desplazamiento hacia el rojo (aproximadamente 620 nm) que puede lograrse mediante la mutagénesis de Fluc de *Photinus pyralis*.

Se sabe que la luciferina de luciérnaga (que a menudo se denomina LH₂) produce al menos dos colores de bioluminiscencia con diferentes mutantes de luciferasa de luciérnaga, el color amarillo verdoso natural (máximo de la longitud de onda - λ_{max} 557 nm) y un color rojo (λ_{max} 620 nm). Los mutantes rojos son útiles en la formación de

30 imágenes *in vivo*, puesto que la atenuación de la luz roja es menos intensa y variable. Además, debido a que la dispersión de los fotones depende de la longitud de onda (la dispersión es proporcional a $1/\text{longitud de onda}^4$), se prevé que la emisión roja permita una mayor resolución y una formación de imágenes de bioluminiscencia de tejidos más profundos.

Debido a la atenuación diferencial de los dos colores y la atenuación variable de la emisión del amarillo verdoso (que depende de la profundidad, la concentración de hemoglobina y la densidad del tejido), hasta la fecha ha sido

35 imposible lograr una formación de imágenes de bioluminiscencia multiparamétrica *in vivo*. Debido a esto, debe utilizarse el espacio de información por encima de 600 nm (la ventana óptica por encima de la absorbancia de la hemoglobina). Por tanto, de modo ideal, la emisión debería desplazarse hasta aproximadamente 100 nm comparada con los sistemas actuales, hacia las regiones del rojo lejano o del infrarrojo cercano. También sería beneficioso que

40 la emisión máxima se produjera a diferentes longitudes de onda con diferentes mutantes, y conseguir una banda de emisión estrecha para lograr la formación de imágenes multiparamétricas.

No se conoce el mecanismo químico para los diferentes colores observados con diferentes Fluc mutantes y LH₂ nativa, y muchos estudios con mutantes y análogos de sustratos lo han intentado determinar sin éxito (Navizet *et al.*, J. Am. Chem. Soc., 2010, 132, 706-12). Una hipótesis es que el producto emisor de la reacción de Fluc, la oxiluciferina (OL), puede existir en dos formas tautómeras, concretamente 4-ceto emisor de rojo y 4-enolato emisor

45 de amarillo verdoso (White *et al.*, Bioorg. Chem., 1971, 1, 92-122); sin embargo, esta teoría es menos probable, puesto que los análogos 5-sustituidos con dimetilo preadenilados (que no pueden formar un enolato) pueden producir colores verdes y rojos con Fluc de tipo salvaje y mutantes, respectivamente (Branchini *et al.*, J. Am. Chem. Soc. Comm., 2002, 124, 2112-3).

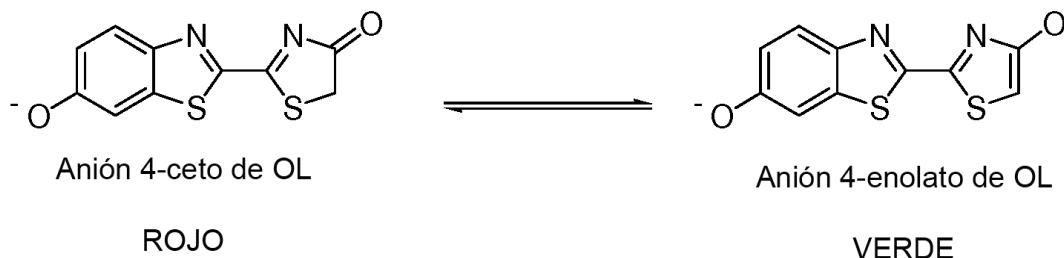
Existen otras teorías, que incluyen una solución que contempla que la molécula entera puede existir en dos formas de resonancia diferentes, dictadas por las interacciones electrostáticas y/o de enlaces de H en el sitio activo (Branchini *et al.*, Biochemistry, 2004, 43, 7255-62). Aunque en realidad no se ha demostrado, a esta teoría le apoyan los cálculos de la mecánica cuántica (Nakatani *et al.*, J. Am. Chem. Soc., 2007, 129, 8756-65). Además, el mecanismo postulado que conduce a la emisión con LH₂ (luminiscencia de intercambio de electrones inducida

50 químicamente, "chemically induced electron-exchange luminescence", CIEEL) apoya la idea del movimiento de electrones desde grupos 4 a grupos 6' (Koo *et al.*, PNAS, 1978, 75, 30-3). Sin embargo, parece probable que el límite del desplazamiento hacia el rojo que puede lograrse solo mediante la modificación de enzimas ya se haya

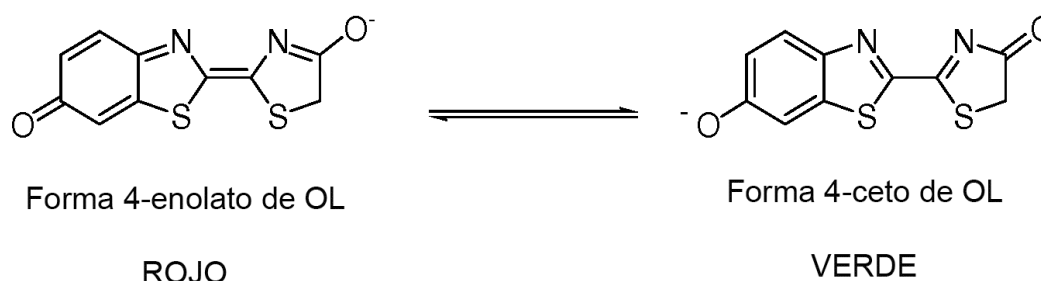
alcanzado (Wood, Biolum. Chemilum., 1990, 5, 107-14).

Los mecanismos químicos teóricos para la resonancia de la luciferina son los siguientes:

1. Formas tautoméricas de ceto-enolato de la oxiluciferina (OL)

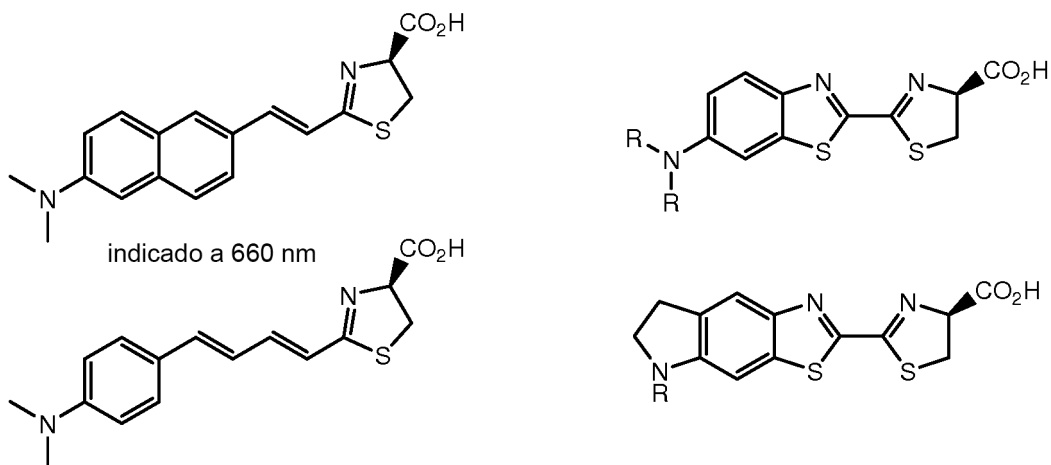


5 2. Deslocalización de resonancia basada en la carga de la oxiluciferina (OL)



Como se cree que se ha alcanzado el límite del desplazamiento hacia el rojo disponible mediante la modificación de enzimas, una opción alternativa es la modificación de la estructura química de la luciferina (LH₂). Ya se han sintetizado una serie de análogos de la LH₂ de luciérnaga para ensayar las teorías de emisión, para intentar mejorar el rendimiento luminoso o para desplazar los colores de emisión. Sin embargo, todos han demostrado tener unos rendimientos luminosos reducidos comparado con la LH₂ nativa, y ninguno ha desplazado la emisión lo suficiente hacia las regiones del rojo lejano o del infrarrojo cercano. Así, siguen siendo necesarios compuestos que no reduzcan el rendimiento luminoso significativamente, y que desplacen la emisión de luz hacia una región que pueda ser potencialmente útil fuera de la ventana de absorción de la hemoglobina.

15 Se ha indicado que las aminoluciferinas, que incluyen las que tienen las estructuras ilustradas a continuación, tienen mayor afinidad por Fluc que LH₂ (cinética ultrarrápida), una menor emisión de luz que LH₂ y una menor permeabilidad en células en estudios *in vitro* (Maki, J. Electrochem. Soc. Japan, 2006, 9; Iwano *et al.*, Tetrahedron, 2013, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tet.2013.03.050>; Ugarova *et al.*, Luminescence, 2002, 17, 321-30; publicación de patente japonesa JP2009184932).

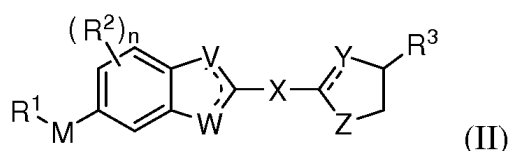


Sin embargo, no se han indicado datos sobre el efecto del pH sobre el máximo de longitud de onda de emisión ni del uso de Fluc mutada para cambiar la longitud de onda emitida. Además, no se han indicado estudios *in vivo*.

5 Los documentos WO 2013/027770, JP 2010/189359 y CN 10217536 describen cada uno compuestos heterocíclicos alternativos que no proporcionan un desplazamiento hacia el rojo significativo en la emisión ni permiten la formación de imágenes multiparamétrica.

10 Por tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar nuevos análogos de sustratos de la luciferina que produzcan un desplazamiento hacia el rojo de la emisión, en particular hacia el intervalo del nIR. Además, resulta deseable que dichos compuestos posean una biocompatibilidad similar (por ejemplo, una buena biodistribución y una baja toxicidad) a la luciferina natural, y que muestren diferentes colores de emisión (tengan formas de emisión diferenciadas) con diferentes mutantes de Fluc.

Según la invención, se proporciona un compuesto según la fórmula (II):



en la que:

15 R¹ es hidrógeno o un grupo alquilo opcionalmente sustituido;

cada R², cuando está presente, es un grupo seleccionado independientemente de hidroxilo opcionalmente sustituido, amino opcionalmente sustituido, tiol opcionalmente sustituido, alquilo opcionalmente sustituido, y arilo opcionalmente sustituido;

R³ es un grupo carboxilo o un grupo alquil(C₁₋₆)carbonilo opcionalmente sustituido;

20 M es un grupo seleccionado de O, S, y NR⁴, en el que R⁴ es un grupo seleccionado de hidrógeno, alquilo opcionalmente sustituido, alqueno opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, y heterociclo opcionalmente sustituido;

X es un grupo seleccionado de alqueno opcionalmente sustituido, alquino opcionalmente sustituido, arileno opcionalmente sustituido, y sus combinaciones, o alquilencarbonilo opcionalmente sustituido;

25 n es 0, 1, 2, o 3;

V e Y se seleccionan cada uno independientemente de CR⁵ y N;

W y Z se seleccionan cada uno independientemente de NR⁷, S y O;

R⁵ es un grupo seleccionado de hidrógeno, hidroxilo opcionalmente sustituido, alquilo opcionalmente sustituido, y amino opcionalmente sustituido; y

R⁷ es un grupo seleccionado de hidrógeno, alquilo opcionalmente sustituido, y arilo opcionalmente sustituido.

- 5 Se ha descubierto que los compuestos de fórmula (II) representan análogos de sustratos bioluminiscentes de la luciferina que muestran un desplazamiento hacia el rojo en la emisión hacia el intervalo del nIR. Así, son los primeros ejemplos de marcadores de BLI de nIR que tienen una verdadera bioluminiscencia que alcanza un pico en el nIR (es decir, no son el producto de la filtración o la transferencia de energía de resonancia). Las características estructurales, tales como el grupo conector insaturado X, permiten conseguir además diferentes colores de emisión (tienen formas emisoras distintivas) con diferentes enzimas mutantes y/o bajo condiciones variables de pH.
- 10 Estos análogos tienen el potencial de abrir una nueva época para la BLI multiespectral, facilitando la formación de imágenes multiparamétrica de mayor resolución y una mayor penetración en profundidad, e incluyen la formación de imágenes de animales más grandes, tales como perros, gatos, primates y sujetos humanos.
- 15 Se ha descubierto que los compuestos de fórmula (II) son activos *in vivo*, por ejemplo, cuando se inyectan en ratones que contienen linfomas derivados de células de Raji sistémicos. Se pueden formar imágenes con la luz generada para fines analíticos. Por tanto, los compuestos tienen el potencial para aumentar la penetración en profundidad y la resolución de BLI reduciendo la atenuación por la hemoglobina (Hb) y la dispersión (un porcentaje mayor de fotones no son absorbidos por la Hb y además viajan durante más tiempo en línea recta), así como para lograr una BLI multiespectral de alta sensibilidad empleada por sí misma o en combinación con la luciferina natural u otros análogos.
- 20 La expresión "alquilo C_{x-y}", tal como se emplea en la presente, se refiere a un grupo hidrocarbonado saturado lineal o ramificado que contiene de x a y átomos de carbono. Por ejemplo, alquilo C₁₋₆ se refiere a un grupo hidrocarbonado saturado lineal o ramificado que contiene de 1 a 6 átomos de carbono. Los ejemplos de grupos alquilo C₁₋₆ incluyen metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo, n-pentilo, isopentilo, neopentilo, hexilo e isohexilo.
- 25 La expresión "alquilenilo C_{x-y}", tal como se emplea en la presente, se refiere a un grupo hidrocarbonado divalente que se obtiene retirando un átomo de hidrógeno del anterior "alquilo C_{x-y}". Los ejemplos de grupos alquilenilo C₁₋₆ incluyen metileno, etileno, propileno, butileno, pentileno, y hexileno.
- 30 La expresión "alquenilo C_{x-y}", tal como se emplea en la presente, se refiere a un grupo hidrocarbonado lineal o ramificado que contiene uno o más dobles enlaces carbono-carbono y que tiene de x a y átomos de carbono. Los ejemplos de grupos alquenilo C₂₋₆ incluyen etenilo, 1-propenilo, 2-propenilo, 2-metil-1-propenilo, 1-butenilo, 2-butenilo, 3-butenilo, 3-metil-2-butenilo, 1-pentenilo, 2-pentenilo, 3-pentenilo, 4-pentenilo, 4-metil-3-pentenilo, 1-hexenilo, 3-hexenilo, y 5-hexenilo.
- 35 La expresión "alquenileno C_{x-y}", tal como se emplea en la presente, se refiere a un grupo hidrocarbonado divalente que se obtiene retirando un átomo de hidrógeno del anterior "alquenilo C_{x-y}". Los ejemplos de grupos alquenileno C₂₋₆ incluyen etenileno, propenileno, butenileno, 1,3-butadienileno, pentenileno, hexenileno, y 1,3,5 -hexatrienileno.
- La expresión "alquinilo C_{x-y}", tal como se emplea en la presente, se refiere a un grupo hidrocarbonado divalente que contiene uno o más triples enlaces carbono-carbono y que tiene de x a y átomos de carbono. Los ejemplos de grupos alquinilo C₂₋₆ incluyen etinilo, propinilo, butinilo y pentinilo.
- 40 La expresión "alquinileno C_{x-y}", tal como se emplea en la presente, se refiere a un grupo hidrocarbonado divalente que se obtiene retirando un átomo de hidrógeno del anterior "alquinilo C_{x-y}". Los ejemplos de grupos alquinileno C₂₋₆ incluyen etinileno, propinileno, butinileno, 1,3-butadiinileno, pentinileno, hexinileno, y 1,3,5 -hexatriinileno.
- La expresión "alcoxi C_{x-y}", tal como se emplea en la presente, se refiere a un grupo -O-alquilo C_{x-y}, en el que alquilo C_{x-y} es como se define en la presente. Los ejemplos de grupos alcoxi C₁₋₆ incluyen metoxi, etoxi, propoxi, isopropoxi, butoxi, terc-butoxi, pentoxi y hexoxi.
- 45 La expresión "anillo hidrocarbonado de x a y miembros", tal como se emplea en la presente, se refiere a un anillo de cicloalquilo, cicloalquenilo o arilo según se define a continuación con relación a la fórmula (II).
- La expresión "cicloalquilo de x a y miembros", tal como se emplea en la presente, se refiere a un anillo hidrocarbonado monocíclico saturado de x a y átomos de carbono. Por ejemplo, un cicloalquilo de 3 a 6 miembros se refiere a un anillo hidrocarbonado monocíclico saturado de 3 a 6 átomos de carbono. Los ejemplos de grupos cicloalquilo de 3 a 6 miembros incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, y ciclohexilo.
- 50 La expresión "cicloalquenilo de x a y miembros", tal como se emplea en la presente, se refiere a un anillo hidrocarbonado monocíclico que contiene uno o más dobles enlaces carbono-carbono de x a y átomos de carbono. Por ejemplo, un cicloalquenilo C₃₋₆ se refiere a un anillo hidrocarbonado monocíclico insaturado de 3 a 6 átomos de carbono. Los ejemplos de grupos cicloalquenilo C₃₋₆ incluyen 2-ciclopenten-1-ilo, 3-ciclopenten-1-ilo, 2-ciclohexen-1-

ilo, y 3-ciclohexen-1-ilo.

El término "arilo", tal como se emplea en la presente, se refiere a un anillo hidrocarbonado monocíclico de 5 a 6 miembros que contiene de x a y átomos de carbono, en el que el anillo es aromático. Un ejemplo de dicho grupo arilo es fenilo. Como alternativa, la expresión "arilo C_{x-y}", tal como se emplea en la presente, se refiere a un anillo monocíclico o bicíclico que contiene de x a y átomos de carbono, en el que al menos un anillo es aromático. Los ejemplos de grupos arilo C₆₋₁₄ incluyen fenilo, naftilo, tetrahidronaftalenilo, antrilo, fenantrilo, acenaftilenilo, bifenililo, antracenilo, fenantrenilo, y fenalenilo.

El término "arileno", tal como se emplea en la presente, se refiere a un grupo hidrocarbonado divalente que se obtiene retirando un átomo de hidrógeno del anterior "arilo C_{x-y}". Un ejemplo de dicho grupo arileno es fenileno. Como alternativa, la expresión "arileno C_{x-y}", tal como se emplea en la presente, se refiere a un anillo monocíclico o bicíclico que contiene de x a y átomos de carbono, en el que al menos un anillo es aromático. Los ejemplos de grupos arileno C₆₋₁₄ incluyen fenileno, naftileno, tetrahidronaftalenileno, antrileno, fenantrileno, acenaftilenileno, bifenilileno, antracenileno, fenantrenileno y fenalenileno.

El término "heteroarilo", tal como se emplea en la presente, representa un anillo aromático monocíclico de 5 a 6 miembros, en el que el anillo monocíclico contiene de 1 a 4 heteroátomos seleccionados de oxígeno, nitrógeno y azufre. Los ejemplos de dichos anillos aromáticos monocíclicos incluyen tienilo, furilo, furazanilo, pirrolilo, triazolilo, tetrazolilo, imidazolilo, oxazolilo, tiazolilo, oxadiazolilo, isotiazolilo, isoxazolilo, tiadiazolilo, piranilo, pirazolilo, pirimidilo, piridazinilo, pirazinilo, piridilo, triazinilo, y tetrazinilo.

El término "heterociclilo" se refiere a un anillo monocíclico de 5 a 6 miembros que puede estar saturado o parcialmente insaturado, en el que el anillo monocíclico contiene de 1 a 4 heteroátomos seleccionados de oxígeno, nitrógeno y azufre. Los ejemplos de dichos anillos monocíclicos incluyen aziridinilo, oxiranilo, pirrolidinilo, azetidínilo, pirazolidinilo, oxazolidinilo, piperidinilo, piperazinilo, morfolinilo, tiomorfolinilo, tiazolidinilo, hidantoinilo, valerolactamilo, oxiranilo, oxetanilo, dioxolanilo, dioxanilo, oxatolanilo, oxatianilo, ditianilo, dihidrofurano, tetrahydrofurano, dihidropirano, tetrahydropirano, tetrahydropiridinilo, tetrahydropirimidinilo, tetrahydrotiofenilo, tetrahydrotiopirano, diazepanilo y azeapanilo.

El término "amino", tal como se emplea en la presente, se refiere a un compuesto de organonitrógeno con la conectividad -N(R')(R''), en la que R' y R'' son cada uno independientemente un hidrógeno o un sustituyente opcional según se define a continuación con relación a la fórmula (II).

La expresión "(alquil C_{x-y})carboniloxi", tal como se emplea en la presente, se refiere a un grupo alquilo, en el que alquilo C_{x-y} es como se define en la presente, y al menos un grupo metileno (es decir, -CH₂-) está reemplazado por un grupo éster (por ejemplo, -CO₂-). Los ejemplos de grupos (alquil C₁₋₆)carboniloxi incluyen etanoato, propanoato, butanoato, pentanoato, y hexanoato. El término "carboniloxi", tal como se emplea en la presente, se refiere a un único grupo carboniloxi de fórmula: -CO₂-.

La expresión "(alquil C_{x-y})carbamoilo", tal como se emplea en la presente, se refiere a un grupo alquilo, en el que alquilo C_{x-y} es como se define en la presente, y al menos un grupo metileno (es decir, -CH₂-) está reemplazado por un grupo amida (por ejemplo, -C(O)NR-), en el que R es un átomo de hidrógeno, un grupo heterociclilo de 5 o 6 miembros, un grupo heteroarilo de 5 o 6 miembros, un grupo cicloalquilo de 3 a 6 miembros, un grupo alquilo C₁₋₆, o un grupo arilo C₆₋₁₄, preferiblemente un átomo de hidrógeno. Los ejemplos de grupos (alquil C₁₋₆)carbamoilo incluyen etilcarbamoilo, propilcarbamoilo, butilcarbamoilo, pentilcarbamoilo y hexilcarbamoilo. El término "carbamoilo", tal como se emplea en la presente, se refiere a un único grupo carbamoilo de fórmula: -C(O)NR-, en el que R es como se definió anteriormente.

La expresión "(alcoxi C_{x-y})carbonilo", tal como se emplea en la presente, se refiere a un grupo alquilo, en el que alquilo C_{x-y} es como se define en la presente, y al menos un grupo metileno (es decir, -CH₂-) está reemplazado por un grupo éster (por ejemplo, -OC(O)-). Los ejemplos de grupos (alquil C₁₋₆)carbonilo incluyen etiloxycarbonilo, propiloxycarbonilo, butiloxycarbonilo, pentiloxycarbonilo, y hexiloxycarbonilo. El término "oxycarbonilo", tal como se emplea en la presente, se refiere a un único grupo oxycarbonilo de fórmula: -OC(O)-.

La expresión "(alquil C_{x-y})carbonilo", tal como se emplea en la presente, se refiere a un grupo alquilo, en el que alquilo C_{x-y} es como se define en la presente, y al menos un grupo metileno (es decir, -CH₂-) está reemplazado por un grupo carbonilo (es decir, >C=O). Los ejemplos de grupos (alquil C₁₋₆)carbonilo incluyen etanoilo, propanoilo, butanoilo, pentanoilo, y hexanoilo. El término "carbonilo", tal como se emplea en la presente, se refiere a un único grupo carbonilo de fórmula: >C=O.

El término "hidroxilo", tal como se emplea en la presente, se refiere a un grupo de fórmula -OH. Si dicho grupo está sustituido, el grupo resultante es un éter de fórmula -O-.

El término "tio", tal como se emplea en la presente, se refiere a un grupo de fórmula -SH. Si dicho grupo está sustituido, el grupo resultante es un tioéter de fórmula -S-.

Cada símbolo en la fórmula (II) se describe en detalle a continuación.

R¹ es hidrógeno o un grupo alquilo opcionalmente sustituido. En una realización preferible, R¹ es hidrógeno o un grupo alquilo C₁₋₃ opcionalmente sustituido. En particular, para mejorar la resonancia y, por tanto, la estabilidad, R¹ es preferiblemente es hidrógeno.

Cada R², cuando está presente, es un grupo seleccionado independientemente de hidroxilo opcionalmente sustituido, amino opcionalmente sustituido, tiol opcionalmente sustituido, alquilo opcionalmente sustituido, y arilo opcionalmente sustituido. En una realización preferible, R², cuando está presente, es un grupo seleccionado independientemente de hidroxilo opcionalmente sustituido, amino opcionalmente sustituido, y alquilo opcionalmente sustituido. En particular, para mejorar la resonancia, R² es preferiblemente es un grupo seleccionado independientemente de hidroxilo y amino opcionalmente sustituido.

R³ es carboxilo o (alquil C₁₋₆)carboniloxi opcionalmente sustituido. En particular, cuando R³ es un grupo (alquil C₁₋₃)carboniloxi se obtiene un compuesto más estable, por ejemplo, se reduce la racemización en la posición α con respecto al carbonilo, y no aparecen unos efectos adversos significativos en términos de bioluminiscencia. En efecto, las esterasas habituales rompen estos grupos *in vivo* para producir análogos de luciferina funcionales que tienen funcionalidad carboxilo. Por tanto, aunque R³ es preferiblemente hidrógeno para mejorar la estabilidad de resonancia, R³ es preferiblemente un grupo (alquil C₁₋₃)carboniloxi para conseguir estabilidad y poder manipularlo *ex vivo*, escindiéndose el grupo éster *in vivo*.

M es un grupo seleccionado de O, S, y NR⁴, en el que R⁴ es un grupo seleccionado de hidrógeno, alquilo opcionalmente sustituido, alqueno opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, y heterociclilo opcionalmente sustituido. En una realización preferible, M se selecciona de O y S. En particular, M es preferiblemente O. Además, se ha descubierto que los compuestos en los que M es O y R¹ es hidrógeno son particularmente estables.

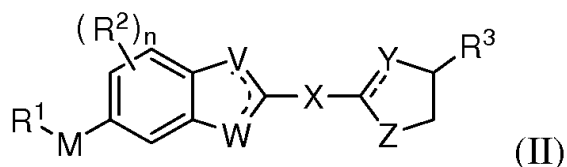
X es un grupo seleccionado de grupos alquenileno opcionalmente sustituido, alquinileno opcionalmente sustituido y arileno opcionalmente sustituido, y sus combinaciones, o un grupo alquillencarbonilo opcionalmente sustituido. En otra realización preferida, X es un grupo seleccionado independientemente de alquenileno opcionalmente sustituido, alquinileno opcionalmente sustituido, aralquileno opcionalmente sustituido y alquillencarbonilo opcionalmente sustituido. En particular, se prefiere un grupo (alquilen C₂₋₆)carbonilo, o un grupo seleccionado de alquenileno C₂₋₆, alquinileno C₂₋₆, arileno C₆₋₁₄, y sus combinaciones. Lo más preferiblemente, X es un grupo alquenileno opcionalmente sustituido. Preferiblemente, X proporciona la conjugación entre los dos sistemas de anillo, de modo que se proporciona la estabilización de la resonancia. Además, se ha descubierto que la conjugación adicional proporcionada por X, concretamente mediante múltiples enlaces insaturados, tales como -C₂H₂-C₂H₂-, desplaza aún más hacia el rojo la longitud de onda de emisión hacia el nIR.

El número de sustituyentes posibles, R², sobre el anillo de fenilo del compuesto de fórmula (II) se indica como n, en la que n es 0, 1, 2, o 3. En una realización preferible, n es 0, 1, o 2, aún más preferiblemente n es 0 o 1.

R⁵ es un grupo seleccionado de hidrógeno, hidroxilo opcionalmente sustituido, alquilo opcionalmente sustituido, y amino opcionalmente sustituido. R⁷ es un grupo seleccionado de hidrógeno, alquilo opcionalmente sustituido, y arilo opcionalmente sustituido.

V e Y se seleccionan cada uno independientemente de CR⁵ y N. W y Z se seleccionan cada uno independientemente de NR⁷, S, y O.

Preferiblemente, se proporciona un compuesto de fórmula (II):



en la que:

R¹ es hidrógeno o alquilo opcionalmente sustituido (preferiblemente hidrógeno);

R², cuando está presente, es un grupo seleccionado independientemente de hidroxilo opcionalmente sustituido, amino opcionalmente sustituido, y alquilo opcionalmente sustituido;

R³ es carboxilo o (alquil C₁₋₆)carboniloxi opcionalmente sustituido;

M se selecciona de O, S, y NR⁴, en la que R⁴ es un grupo seleccionado de hidrógeno, alquilo opcionalmente sustituido, y arilo opcionalmente sustituido (preferiblemente O);

V e Y se seleccionan cada uno independientemente de CR⁵ y N;

W y Z se seleccionan cada uno independientemente de NR⁷, S, y O,

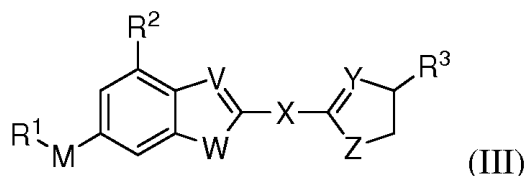
en la que R⁵ es un grupo seleccionado de hidrógeno, hidroxilo opcionalmente sustituido, alquilo opcionalmente sustituido y amino opcionalmente sustituido, y

- 5 R⁷ es un grupo seleccionado de hidrógeno, alquilo opcionalmente sustituido y arilo opcionalmente sustituido; y
n es 0 o 1.

Se ha demostrado que estos compuestos poseen una longitud de onda de emisión en el nIR y, por tanto, muestran unas propiedades espectrales mejoradas a través de la hemoglobina, concretamente, existe menos interferencia y/o dispersión cuando la formación de imágenes se realiza *in vivo*. Además, los compuestos muestran un excelente rendimiento cuántico, al menos comparable con los conocidos en la técnica, pero también proporcionan un desplazamiento hacia el rojo con mutantes de color de Fluc.

- 10

En otra realización preferida de la invención, se proporciona un compuesto que tiene la fórmula (III):



en la que:

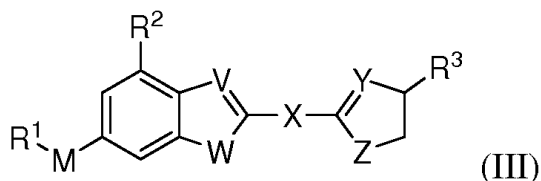
- 15 V e Y se seleccionan cada uno independientemente de CR⁵ y N;

W y Z se seleccionan cada uno independientemente de NR⁷, S, y O; y

el resto de los grupos son como se definió anteriormente con relación a la fórmula (II).

En esta realización, resulta preferible que V e Y sean cada uno N. También resulta preferible que W y Z sean cada uno S.

- 20 Preferiblemente, se proporciona un compuesto de fórmula (III):



en la que R¹ es hidrógeno o alquilo opcionalmente sustituido (preferiblemente hidrógeno);

R² es un grupo seleccionado independientemente de hidroxilo opcionalmente sustituido, amino opcionalmente sustituido, y alquilo opcionalmente sustituido;

- 25 R³ es carboxilo o (alquil C₁₋₆)carboniloxi opcionalmente sustituido;

M se selecciona de O y S (preferiblemente O);

V e Y se seleccionan cada uno independientemente de CR⁵ y N; y

W y Z se seleccionan cada uno independientemente de NR⁷, S, y O,

en la que R⁵ es un grupo seleccionado de hidrógeno, hidroxilo opcionalmente sustituido, alquilo opcionalmente sustituido y amino opcionalmente sustituido, y

- 30

R⁷ es un grupo seleccionado de hidrógeno, alquilo opcionalmente sustituido y arilo opcionalmente sustituido. Se ha demostrado que estos compuestos poseen una longitud de onda de emisión en el nIR y, por tanto, muestran unas propiedades espectrales mejoradas a través de la hemoglobina, concretamente, existe menos interferencia y/o dispersión cuando la formación de imágenes se realiza *in vivo*. Además, los compuestos muestran un excelente

rendimiento cuántico, al menos comparable con los conocidos en la técnica, pero también proporcionan un desplazamiento hacia el rojo con mutantes de color de Fluc. Además, los compuestos muestran una buena intensidad de bioluminiscencia *in vivo*, sin requerir una preadenilación.

Cada uno de los grupos opcionalmente sustituidos de los compuestos de fórmula (II) y (III) pueden estar sustituidos con:

(1) un grupo seleccionado de -J-arilo, -J-heteroarilo, -J-heterociclilo y -J-cicloalquilo C₃₋₆, en los que J representa un enlace o alquileo C₁₋₃, y dicho arilo se selecciona de fenilo, dicho heteroarilo se selecciona de triazolilo, tiazolilo, tienilo, pirazolilo, pirimidilo, piridazinilo, pirazinilo, y piridilo, dicho heterociclilo se selecciona de pirrolidinilo, azetidínilo, pirazolidínilo, oxazolidínilo, piperidinilo, piperazinilo, morfolinilo, y tiazolidínilo, y dicho cicloalquilo C₃₋₆ se selecciona de ciclopropilo, ciclopentilo y ciclohexilo; o

(2) uno a tres sustituyentes seleccionados de:

(a) alquilo C₁₋₆ (preferiblemente metilo, etilo o isopropilo),

(b) alqueno C₁₋₃ (preferiblemente propenilo),

(c) halógeno (preferiblemente Cl o Br),

(e) haloalquilo C₁₋₆ (preferiblemente trifluorometilo),

(d) ciano,

(e) amino, opcionalmente mono- o disustituido con alquilo C₁₋₃, *terc*-butoxicarbonilo o bencilo,

(f) alcoxi C₁₋₃ (preferiblemente metoxi),

(g) (alquil C₁₋₆)carbonilo (preferiblemente acetilo),

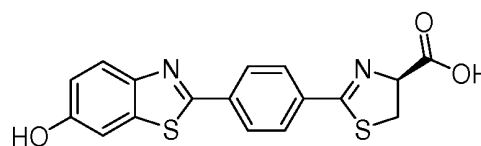
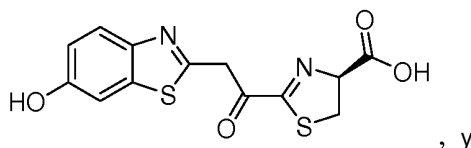
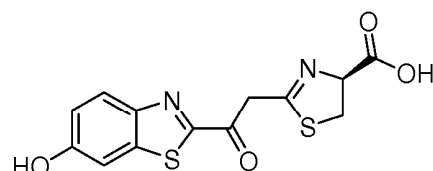
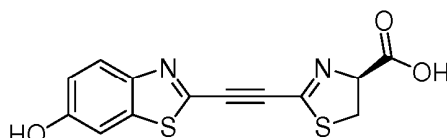
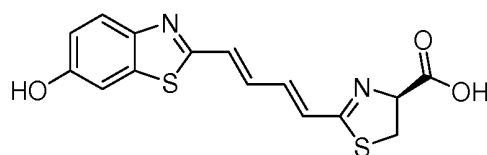
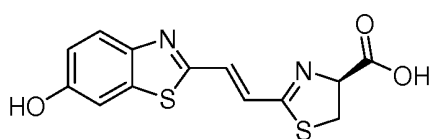
(h) (alcoxi C₁₋₃)carbonilo,

(i) (alquil C₁₋₃)carboniloxi, incluyendo carboxilo, y

(j) (alquil C₁₋₃)carbamoílo, incluyendo carbamoílo.

Los compuestos de la presente invención pueden estar en cualquier forma estereoisómera. No obstante, resulta preferible que los compuestos posean la misma forma estereoisomérica que la luciferina natural, es decir, la estereoquímica *S* en la posición α con respecto a la funcionalidad carbonilo (basándose en un anillo de dihidrotiazol).

En particular, el compuesto según la invención puede seleccionarse de:



y sus ésteres de alquilo C₁₋₆, por ejemplo, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo y *terc*-butilo (preferiblemente metilo y etilo).

Un compuesto según la invención puede usarse para la formación de imágenes *in vivo*, preferiblemente en la

formación de imágenes de bioluminiscencia *in vivo*. Además, cualquiera de los variantes estructurales preferidos mencionados anteriormente con relación a las fórmulas (II)-(III) también representa un aspecto preferido de esta realización como agente de formación de imágenes *in vivo*.

5 En particular, pueden detectarse células o animales que portan la luciferasa de luciérnaga empleando una serie de dispositivos de formación de imágenes habituales. La forma más habitual de dichos dispositivos detecta los fotones emitidos empleando una lente enfocada sobre un dispositivo de carga acoplada (CCD) enfriado con o sin una preintensificación a través de un tubo fotomultiplicador (por ejemplo, los sistemas de formación de imágenes IVIS, de Perkin Elmer, MA, EE. UU.; y el sistema Photon Imager, de Biospace Laboratories, París, Francia).

10 Además, pueden detectarse reacciones de quimioluminiscencia que implican a compuestos según la invención o la bioluminiscencia surgida empleando compuestos según la invención y la luciferasa de luciérnaga en ensayos de *in vitro* o de diagnóstico con tubos individuales que son habituales en los laboratorios o con luminómetros de microplacas, que emplean un tubo fotomultiplicador o detectores de fotones de CCD (por ejemplo, los comercializados por Promega, WI, EE. UU.).

15 En otro aspecto de la invención, se proporciona una composición que comprende un compuesto según la invención y uno o más ingredientes adicionales. Además, cualquiera de estos variantes estructurales preferidos mencionados anteriormente con relación a las fórmulas (II)-(III) también representa un aspecto preferido de esta composición.

20 Los ingredientes adicionales en la composición pueden incluir diluyentes, excipientes y vehículos farmacéuticamente aceptables. Los diluyentes, excipientes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden usarse en las composiciones incluyen, pero no se limitan a intercambiadores de iones, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas séricas, tales como la albúmina de suero humana, sustancias tamponantes, tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potasio, mezclas de glicéridos parciales de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos, tales como sulfato de protamina, bifosfato de disodio, bifosfato de potasio, cloruro de sodio, sales de cinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, coenzima A, sustancias a base de celulosa, polietilenglicol, carboximetilcelulosa sodio, poliacrilatos, ceras, polímeros en bloque de polietileno-polioxipropileno, polietilenglicol y lanolina.

30 La composición de la invención puede administrarse por vía oral, parenteral, mediante un pulverizado para la inhalación, por vía tópica, rectal, nasal, bucal, vaginal o mediante un depósito implantado. Preferiblemente, las composiciones se administran por vía parenteral, de modo más específico mediante inyección. La composición puede contener cualquier vehículo, adyuvante o portador farmacéuticamente aceptable convencional no tóxico. El término parenteral, tal como se emplea en la presente, incluye técnicas de infusión o inyección intraperitoneal, subcutánea, intracutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intrasinovial, intraesternal, intratecal, intraocular, intraorbital, intralesional e intracraneal. Preferiblemente, la vía de administración de la composición es la administración intraperitoneal, intravenosa o intramuscular (lo más preferiblemente intraperitoneal).

35 La composición puede estar en forma de una preparación inyectable estéril, por ejemplo, como una suspensión oleaginosa o acuosa inyectable estéril. Esta suspensión puede formularse según técnicas conocidas en la técnica empleando agentes dispersantes o humectantes adecuados (tales como, por ejemplo, Tween 80) y agentes suspensores. La preparación inyectable estéril también puede ser una disolución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable no tóxico, por ejemplo, como una disolución en 1,3-butandiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse se encuentran el manitol, agua, disolución de Ringer y disolución de cloruro de sodio isotónica. Además, de modo convencional se emplean aceites no volátiles estériles como disolvente o medio de suspensión. Para este fin puede emplearse cualquier aceite no volátil suave, que incluyen mono- o diglicéridos sintéticos. Los ácidos grasos, tales como el ácido oleico y sus derivados de glicéridos, son útiles para la preparación de inyectables, así como los aceites farmacéuticamente aceptables naturales, tales como el aceite de oliva o el aceite de ricino, en especial en sus versiones polioxietiladas. Estas disoluciones o suspensiones oleosas también pueden contener un dispersante o diluyente de alcohol de cadena larga, tal como Ph. Helv o un alcohol similar.

45 En otro aspecto de la invención, se proporciona el uso del compuesto según la invención como marcador bioluminiscente para la medición *in vitro* de la expresión de luciferasa. Además, cualquiera de los variantes estructurales preferidos mencionados anteriormente con relación a las fórmulas (II)-(III) también representa un aspecto preferido de este uso.

50 Puesto que el compuesto de la invención tiene una utilidad específica como agente de formación de imágenes *in vivo*, también se proporciona un método de formación de imágenes *in vivo*, que comprende administrar a un sujeto un compuesto según la invención, y una enzima luciferasa, o un polinucleótido que codifica una enzima luciferasa, y medir la emisión resultante de la acción de la enzima luciferasa sobre el compuesto. Además, cualquiera de los variantes estructurales preferidos mencionados anteriormente con relación a las fórmulas (II)-(III) también representa un aspecto preferido de este método.

El método puede comprender además generar una imagen basada en las mediciones obtenidas.

En un aspecto adicional de la invención, se proporciona un kit que comprende un compuesto según la invención y una enzima luciferasa o un polinucleótido que codifica una enzima luciferasa. Además, cualquiera de los variantes estructurales preferidos mencionados anteriormente con relación a las fórmulas (II)-(III) también representa un aspecto preferido de este kit.

- 5 La invención se describirá a continuación con más detalle solo como ejemplo y remitiéndose a las siguientes figuras.

Breve descripción de la figuras

Figura 1:

10 Espectros de fluorescencia del compuesto 9 (a menudo denominado "infraluciferina" o "iLH₂") en diferentes condiciones de pH. Los espectros de fluorescencia del compuesto 9 demuestran que presenta unos espectros de fluorescencia de emisión, excitación y absorbancia desplazados hacia el rojo, comparado con la LH₂ nativa. Además, cuando mayor es el pH, más se desplaza hacia el rojo la excitación y la emisión de fluorescencia, lo cual indica, potencialmente, una desprotonación y conjugación molecular en línea con el mecanismo basado en la carga de resonancia. De modo importante, el compuesto 9 parece tener unos máximos de emisión a diferentes longitudes de onda que dependen de las condiciones.

15 Figura 2:

20 Espectros de bioluminiscencia de la LH₂ nativa y el compuesto 9 ("análogo") con mutantes de color de Fluc (x5 termostable y x5 termostable rojos). Con un mutante que produce una emisión en el rojo con la LH₂ nativa (λ_{max} 620 nm), el compuesto 9 produce un color con un λ_{max} 700 nm, que está desplazado más significativamente hacia el rojo que los compuestos de la técnica. Detalles experimentales de los espectros: se añadieron 50 μl de Fluc o mutante rojo 5 μM en Tris-acetato 100 mM, sulfato de magnesio 10 mM y ácido etilendiaminotetraacético 2 mM (EDTA) (pH 7,8) a 20 μl de compuesto 9 500 μM con 70 μl de PBS. Los espectros se adquirieron en una máquina Luminoskan Ascent (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). Por el contrario, los análogos de luciferina conocidos en la técnica no muestran este desplazamiento hacia el rojo con mutantes de color de Fluc.

Figura 3:

25 Cinética de emisión de luz del compuesto 8 añadido a células Raji que expresan Fluc termoestable. Se observó que el éster metílico (Me) (compuesto 8) es enantioestable, y se descubrió que era activo en células de mamífero y bacterianas. La cinética de la saponificación en células de mamífero mostró un aumento lento (aproximadamente 2 min) hasta la actividad máxima. Detalles experimentales: se añadieron 20 μl del compuesto 8 1 mg/ml en tampón citrato (pH 5) a 10 μl que contenían 1×10^6 células Raji que expresan la Fluc termoestable, y la emisión de luz se registró a lo largo de 2 min en un instrumento Turner Designs TD20/20 (Turner Designs, CA, EE. UU.).

Figura 4:

35 Rendimiento luminoso relativo de los compuestos 8 y 12 *in vitro* comparado con el éster etílico de D-LH₂ medido en un formador de imágenes de fotones basado en CCD intensificado con una buena sensibilidad a la luz roja. Se observó que la diferencia en el rendimiento luminoso con respecto al compuesto 8 era de solo aproximadamente 150 veces menor que el del éster etílico de LH₂. Detalles experimentales: 10 μl de 1 mM de los compuestos se añadieron a 50 μg de esterasa de hígado mezclada con ATP 5 mM y enzimas Fluc 0,25 μM . La luz se capturó en una máquina Photon Imager (Biospace Lab, París, Francia).

Figura 5:

40 Espectros de bioluminiscencia *in vitro* de mutantes de luciferasa x5 (serie izquierda) y x5 rojo (serie derecha) con el compuesto 9. Los espectros de bioluminiscencia *in vitro* se adquirieron mediante la formación de imágenes de las muestras a través de diferentes conjuntos de filtros y se confirmaron los dos colores del compuesto 9 con x5 y x5 rojo. Es posible formar imágenes por separado aplicando filtros de paso de banda de 550-600 nm y de paso largo de 830 nm, respectivamente. Detalles experimentales: se añadieron 10 μg de esterasa de hígado porcino purificada en tampón TEM a 1 ml del compuesto 8 disuelto en tampón TEM y se incubó a 37 °C durante 15 min antes del ensayo, según los detalles de la figura 1. La emisión de luz se capturó en un dispositivo Photon Imager durante 30 s empleando diferentes filtros de paso de banda (Biospace Labs, París, Francia).

Figura 6:

50 Transmisión relativa del éster etílico de LH₂ y el compuesto 12 a través de sangre con Fluc natural y mutantes de color rojo. Cuando se inyectaron células Raji que expresan x5 Fluc en ratones que contenían linfomas de células de Raji sistémicos, la luz producida, con la cual se formaron las imágenes, tenía una intensidad aproximadamente 8 veces menor que la LH₂ en la región de interés mostrada.

Figura 7:

Rendimiento luminoso relativo del compuesto 12 (imagen en posición intermedia) *in vivo* comparado con D-

LH₂ (imagen derecha) medido en un formador de imágenes de fotones basado en CCD intensificado con una buena sensibilidad a la luz roja. La imagen izquierda es un control sin filtro y sin sustrato. El rendimiento luminoso *in vivo* potenciado, comparado con el correspondiente *in vitro*, puede ser explicado en parte por la mejor transmisión de la emisión de iLH₂ a través de la sangre, comparado con LH₂.

5 Figura 8:

Comparación de la emisión de luz del éster etílico de LH₂ (denominado "luciferina" en la figura) y el compuesto 8 (denominado "infraluciferina" en la figura) en un modelo de carcinoma de colon subcutáneo. En un modelo de xenoinjerto de carcinoma de colon en ratones atímicos (MFI NuNu), la luz de los ratones con injertos subcutáneos de células LS274T de tipo salvaje que expresan Fluc y que formaron imágenes con el éster etílico de iLH₂ fue aproximadamente 4 veces menor que con el compuesto 8. Cuando después las imágenes se formaron empleando un filtro 830LP (filtro de infrarrojo), el rendimiento luminoso del compuesto 8 fue aproximadamente 5 veces mayor que el del éster etílico de LH₂. Detalles experimentales: los ratones fueron inoculados con 3 x 10⁶ células LS174T que expresan Fluc de tipo salvaje y, 5 días después, fueron inyectados con 5 mg de éster etílico de LH₂ o el compuesto 8 y se formaron imágenes durante un total de 30 s en un instrumento Photon Imager (Biospace Labs, París, Francia). El filtro de infrarrojo utilizado era de 830 nm de paso largo (830 LP).

Figura 9:

Cuantificación de la emisión de luz del éster etílico de LH₂ y del compuesto 8 en un modelo de carcinoma de colon subcutáneo, sin filtro. Detalles experimentales: Se empleó el software M3 Vision (Biospace Labs, París, Francia) para procesar la emisión de luz.

20 Figura 10:

Cuantificación de la emisión de luz del éster etílico de LH₂ y del compuesto 8 en un modelo de carcinoma de colon subcutáneo, con filtro 830LP. Detalles experimentales: Se empleó el software M3 Vision (Biospace Labs, París, Francia) para procesar la emisión de luz.

Figura 11:

25 Espectro *in vivo* de emisión de luz del éster etílico de LH₂ (serie izquierda) y del compuesto 8 (serie derecha). Una mayor proporción de luz emitida con el compuesto 8 *in vivo* se situó en la porción del NIR del espectro electromagnético que con el éster etílico de LH₂. Los detalles experimentales fueron iguales que en la figura 8, pero se adquirieron múltiples adquisiciones durante 2 min cada una a través de una serie de filtro y se corrigieron para la descomposición de la luz.

30 Figura 12:

Emisión de luz del compuesto 17 (indicado como "ssLH₂"). Se descubrió que este compuesto también generaba una emisión de luz con x5 Fluc purificada, aunque era menos intensa que la emisión con el compuesto 8. Los detalles experimentales fueron iguales en que la figura 4.

Figura 13:

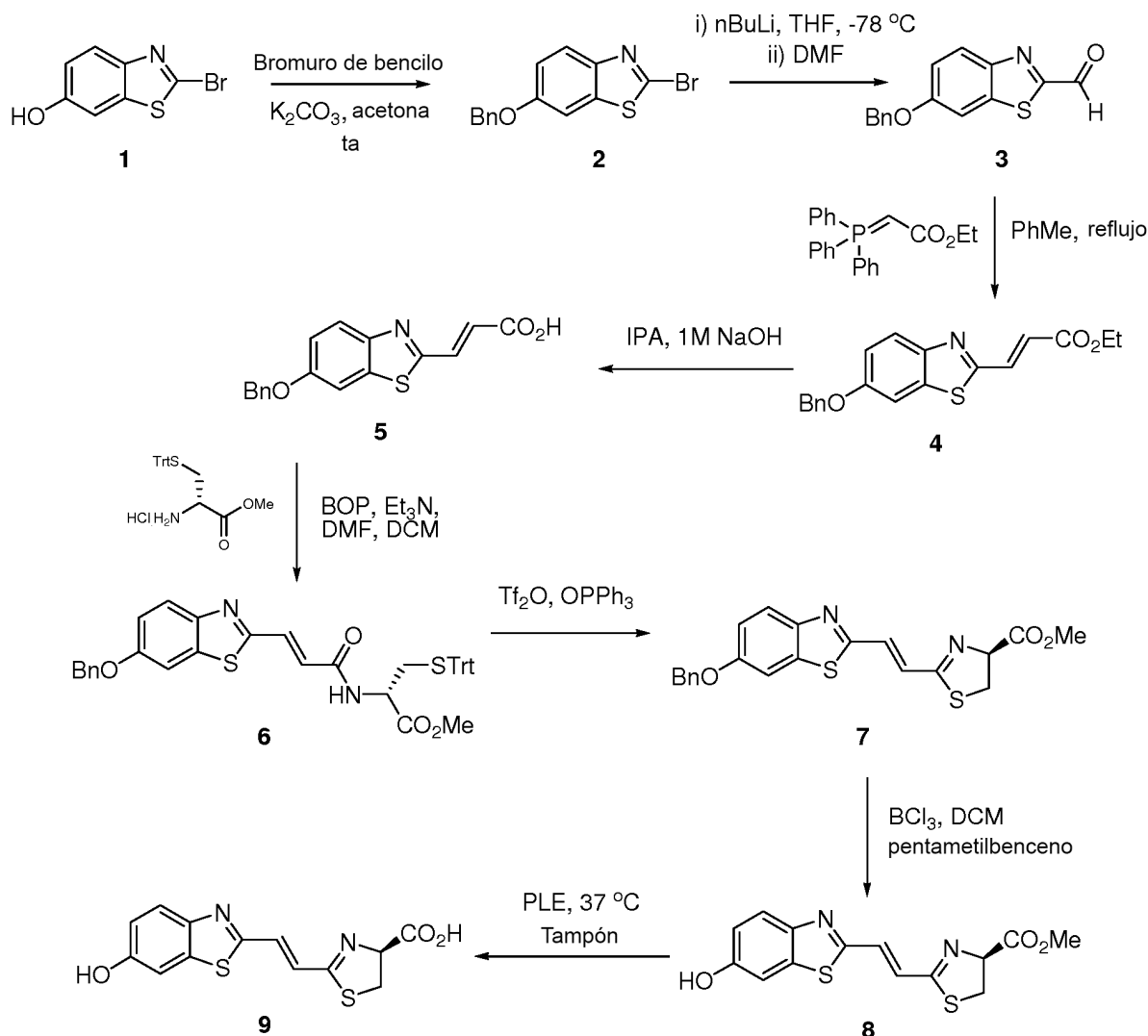
35 Espectro de iCCD de x5 Fluc con el compuesto 17. La emisión *in vitro* alcanzó un pico entre 630-680 nm. Los detalles experimentales fueron iguales en que la figura 5.

Figura 14:

40 Espectros de fluorescencia del compuesto 8 frente al compuesto 17. Los espectros de fluorescencia demuestran que el compuesto 17 estaba todavía más desplazado hacia el rojo que el compuesto 8 en sus propiedades de excitación y emisión de fluorescencia, y que también tenía acceso a las dos formas de color (dependiendo del pH). Los detalles experimentales fueron iguales en que la figura 1.

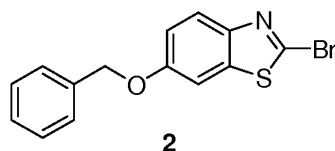
Ejemplos

6-hidroxi-2-(2-(4S-carboxi-4, 5-dihidrotiazol-2-il)etenil)benzotiazol (9)



El aminoácido D-TrtCysOMe se sintetizó empleando un método análogo al desarrollado para la L-cisteína por Rudolph *et al.*, J. Med. Chem., 2001, 44, 619, y fue protegido como el éster metílico empleando cloruro de tionilo (Mays *et al.*, Tetrahedron Lett., 2007, 48, 4579).

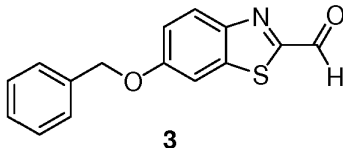
5 6-benzoxi-2-bromobenzotiazol (2)



Una disolución de 1 (640 mg, 2,78 mmol) y BnBr (0,38 ml, 3,33 mmol) en acetona (50 ml) se trató con K_2CO_3 (1,09 g, 7,77 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. Después de esto la reacción se filtró y se concentró al vacío. Se logró la purificación mediante una cromatografía en columna de resolución rápida (EtOAc al 5%/éter de petróleo) para producir 2 (759 mg, 85%) como un sólido blanco, p.f. $58-60^\circ\text{C}$; $R_f = 0,61$ (EtOAc al 20%/éter de petróleo); IR ν_{max} 2937 (ν_{CH}), 2873 (ν_{CH}), 1598, 1557, 1483, 1452, 1380, 1282, 1246, 1222, 1210, 1016, 946 cm^{-1} ; RMN de ^1H (CDCl_3) δ 5,13 (2H, s, OCH_2Ar), 7,14 (1H, dd, $J = 9,0, 2,6$, ArH), 7,33 (1H, d, $J = 2,5$, ArH), 7,35-7,46 (6H, m, ArH), 7,87 (1H, d, $J = 8,9$, ArH); RMN de ^{13}C (CDCl_3) δ 70,8 (CH_2), 105,0 (CH), 116,5 (CH), 123,4 (CH), 127,5 (CH), 128,3 (CH), 128,8 (CH), 135,7 (C), 136,4 (C), 138,6 (C), 147,1 (C), 157,2 (C); m/z (ES+) 322 (100%),

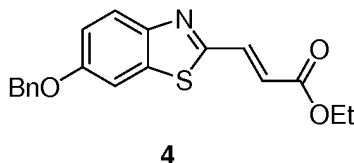
320 (100%, $M^+ + H$), 321 (18%), 272 (7%), 272 (7%); HRMS $C_{14}H_{11}BrNOS$ calc. 319,9745, encontrado 319,9730; Anal. calc. para $C_{14}H_{10}BrNOS$: C, 52,51; H, 3,15; N, 4,37. Encontrado: C, 52,19; H, 3,03; N, 4,33%.

6-benzoxi-2-formilbenzotiazol (3)



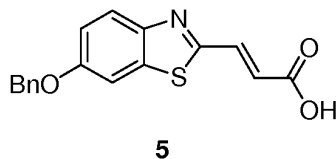
- 5 Una disolución de **2** (120 mg, 0,374 mmol) en THF (4 ml) se enfrió hasta $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, se trató con $n\text{BuLi}$ (1,93 M, 0,22 ml, 0,412 mmol) (cambio de color desde incoloro hasta amarillo pálido) y se agitó a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 min. Después de esto se añadió DMF (0,12 ml, 1,55 mmol) gota a gota y la disolución resultante se agitó a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 h. La reacción se extinguió con NaHCO_3 (ac.) (2 ml), se retroextrajo con EtOAc (2 x 10 ml), se separó y se concentró al vacío. Se logró la purificación mediante una cromatografía en columna de resolución rápida (EtOAc al 5-10%/éter de petróleo) para producir **3** (98 mg, 96%) como un sólido blanco, p.f. $112\text{--}114\text{ }^{\circ}\text{C}$; $R_f = 0,51$ (EtOAc al 20%/éter de petróleo); IR ν_{max} 3035 (ν_{CH}), 2854 (ν_{CH}), 1677 (ν_{CO}), 1598, 1547, 1489, 1455, 1380, 1269, 1192, 1120, 999 cm^{-1} ; RMN de ^1H (CDCl_3) δ 5,19 (2H, s, OCH_2Ar), 7,30 (1H, dd, $J = 9,1, 2,5$, ArH), 7,38–7,48 (7H, m, ArH), 8,12 (1H, d, $J = 9,1$, ArH), 10,1 (1H, s, C(O)H); RMN de ^{13}C (CDCl_3) δ 70,8 (CH_2), 105,0 (CH), 118,8 (CH), 126,7 (CH), 127,6 (CH), 128,5 (CH), 128,9 (CH), 136,0 (C), 138,6 (C), 148,5 (C), 159,5 (C), 163,2 (C), 185,2 (CH); m/z (ES+) 270 (100%, $M^+ + H$), 210 (6%), 132 (14%, $M^+ + \text{H-C(O)H}$, OBn); HRMS $C_{15}H_{12}NO_2S$ calc. 270,0589, encontrado 270,0585; Anal. calc. para $C_{15}H_{11}NO_2S$: C, 66,89; H, 4,12; N, 5,20. Encontrado: C, 66,62; H, 4,04; N, 5,10%.

Éster etílico del ácido (E)-3-(6-benzoxibenzotiazol-2-il)acrílico (4)



- 20 Una disolución de **3** (568 mg, 2,10 mmol) en PhMe (10 ml) se trató con (carboximetil)trifenilfosforano (2,16 g, 6,31 mmol) y se calentó a reflujo durante 3 h. Después de esto la reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente y se concentró al vacío. Se logró la purificación mediante una cromatografía en columna de resolución rápida (EtOAc al 10%/éter de petróleo) para producir **4** (660 mg, 92%) como un sólido de color amarillo pálido, p.f. $79\text{--}80\text{ }^{\circ}\text{C}$; $R_f = 0,38$ (EtOAc al 20%/éter de petróleo); IR ν_{max} 3063 (ν_{CH}), 3038 (ν_{CH}), 2979 (ν_{CH}), 1703 (ν_{CO}) 1595, 1551, 1488, 1445, 1386, 1368, 1254, 1106, 1018, 958 cm^{-1} ; 1,36 (3H, t, $J = 7,1$, CH_2CH_3), 4,31 (2H, q, $J = 7,1$, CH_2CH_3), 5,16 (2H, s, OCH_2Ar), 6,71 (1H, d, $J = 15,9$, CHC(O)OEt), 7,20 (1H, dd, $J = 9,0, 2,5$, ArH), 7,35–7,48 (6H, m, ArH), 7,85 (1H, d, $J = 15,9$, CHC(N)S), 7,96 (1H, d, $J = 9,0$, ArH); RMN de ^{13}C (CDCl_3) δ 14,3 (CH_3), 61,2 (CH_2), 70,7 (CH_2), 105,2 (CH), 117,3 (CH), 124,7 (CH), 125,1 (CH), 127,6 (CH), 128,3 (CH), 128,8 (CH), 136,4 (C), 136,8 (C), 137,0 (CH), 148,7 (C), 158,0 (C), 161,2 (C), 165,8 (C); m/z (ES+) 340 (100%, $M^+ + H$), 339 (7%, M^+), 294 (7%, $M^+ + \text{H-OEt}$), 91 (7%, PhCH_2); HRMS $C_{19}H_{18}NO_3S$ calc. 340,1007, encontrado 340,1003; Anal. calc. para $C_{19}H_{17}NO_3S$: C, 67,24; H, 5,05; N, 4,13. Encontrado: C, 67,04; H, 5,02; N, 4,09%.

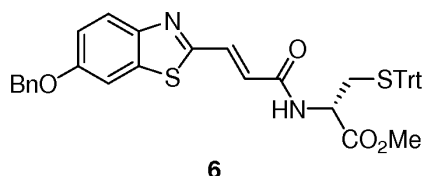
Ácido (E)-3-(6-benzoxibenzotiazol-2-il)acrílico (5)



- 35 Una suspensión de **4** (500 mg, 1,47 mmol) en $i\text{PrOH}$ (18,3 ml) se trató con NaOH (4,70 ml, 1,0 M) y se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se añadieron 10 ml más de H_2O para que todo el precipitado se disolviese, y la disolución resultante se acidificó hasta pH 1 con HCl (1 M). El precipitado amarillo se aisló mediante filtración y se lavó con H_2O (30 ml) para producir **5** (458 mg, cuant.) como un polvo amarillo fino, p.f. $174\text{--}176\text{ }^{\circ}\text{C}$; $R_f = 0,40$ (MeOH al 10%/DCM); IR ν_{max} 3031 (ν_{CH}), 2866 (ν_{CH}), 2543 (ν_{OH}), 1694 (ν_{CO}), 1599, 1558, 1497, 1451, 1312, 1259,

1205, 1051, 1013, 966 cm^{-1} ; RMN de ^1H (DMSO) δ 15,20 (2H, s, OCH_2Ar), 6,72 (1H, d, $J = 15,9$, $\text{CHC}(\text{O})\text{OEt}$), 7,23 (1H, dd, $J = 9,0$, 2,5, ArH), 7,32-7,50 (5H, m, ArH), 7,69 (1H, d, $J = 15,9$, $\text{CHC}(\text{N})\text{S}$), 7,83 (1H, d, $J = 2,4$, ArH), 7,97 (1H, d, $J = 9,0$, ArH); RMN de ^{13}C (DMSO) δ 69,9 (CH_2), 105,8 (CH), 117,2 (CH), 124,2 (CH), 126,0 (CH), 127,9 (CH), 128,0 (CH), 128,5 (CH), 135,9 (CH), 136,6 (C), 136,6 (C), 147,9 (C), 157,4 (C), 160,8 (C), 166,4 (C); m/z (CI) 402 (26%), 312 (100%, M^+H), 294 (11%, $\text{M}^+\text{H-OH}$), 91 (5%, PhCH_2); HRMS $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{NO}_3\text{S}$ calc. 312,0694, encontrado 312,0691.

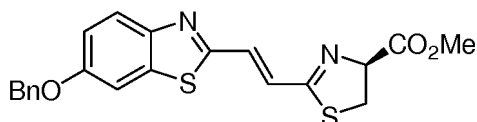
2-((*E*)-3-(6-benzoxibenzotiazol-2-il)acrilamido)-3-(trilitio)propanoato de *D*-(metilo) (**6**)



6

Una disolución de **5** (134 mg, 0,424 mmol) en DMF (4,2 ml) se trató con Et_3N (70 μl , 1,02 mmol) y se enfrió hasta to 0 °C. La disolución se trató con una disolución de aminoácido (192 mg, 0,508 mmol) en DCM (2 ml), seguido de una disolución de BOP (231 mg, 0,508 mmol) en DCM (2,2 ml) y la disolución resultante se agitó a 0 °C durante 2 h. Después de esto la mezcla de reacción se extinguió con NaHCO_3 saturado (ac.) (2 ml) y se suspendió en EtOAc (10 ml), la capa acuosa se retroextrajo empleando EtOAc (2 x 5 ml), la capa orgánica se secó sobre MgSO_4 , se filtró y se concentró al vacío. Se logró la purificación mediante una cromatografía en columna de resolución rápida (EtOAc al 20%/éter de petróleo) para producir **6** (220 mg, 80%) como un sólido de color amarillo, p.f. 83-86 °C; $R_f = 0,28$ (EtOAc al 30%/éter de petróleo); $[\alpha]_D +62,6$ (c 0,95, CHCl_3); un análisis de HPLC CSP (Chiracel OD-H (150 x 4,6 mm), eluyente: hexano:PrOH, 70:30, flujo: 0,5 ml/min, 14 bares) determinó 98% de ee [t_R (minoritario) = 43,07 min, t_R (mayoritario) = 26,59 min]; IR ν_{max} 1741 (ν_{CO}), 1662, 1627, 1596, 1488, 1446, 1346, 1319, 1260, 1196, 1051, 1001, 966 cm^{-1} ; RMN de ^1H (CDCl_3) δ 2,73 (1H, dd, $J = 12,7$, 4,6, CH_2STrt), 2,82 (1H, dd, $J = 12,7$, 5,6, CH_2STrt), 3,76 (3H, s, OCH_3), 4,76 (1H, dt, $J = 7,8$, 5,2, CHCH_2), 5,17 (2H, s, OCH_2Ph), 6,09 (1H, d, $J = 7,8$, NH), 6,65 (1H, d, $J = 15,5$, $\text{CHC}(\text{O})\text{N}$), 7,20-7,49 (22H, m, ArH), 7,73 (1H, d, $J = 15,5$, $\text{CHC}(\text{N})\text{S}$), 7,96 (1H, d, $J = 9,0$, ArH); RMN de ^{13}C (CDCl_3) δ 33,8 (CH_2), 51,4 (CH), 52,9 (CH_3), 67,2 (C), 70,7 (CH_2), 105,2 (CH), 117,2 (CH), 124,6 (CH), 126,8 (CH), 127,1 (CH), 127,6 (CH), 128,1 (CH), 128,3 (CH), 128,8 (CH), 129,6 (CH), 134,2 (CH), 136,4 (C), 144,3 (C), 154,2 (C), 157,9 (C), 161,4 (C), 163,8 (C), 170,7 (C); m/z (ES+) 693 (96%, M^+Na), 595 (9%), 244 (18%), 243 (100%, M^+STrt , CO_2Me , Bn , H), 228 (8%), 165 (22%); HRMS $\text{C}_{40}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_4\text{NaS}_2$ calc. 693,1858, encontrado 693,1855.

6-benzoxi-2-(2-(4*S*-metoxicarbonil-4,5-dihidrotiazol-2-il)etenil)benzotiazol (**7**)



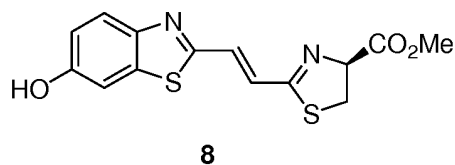
7

Una disolución de Ph_3PO (386 mg, 1,40 mmol) en DCM (10 ml) se enfrió hasta 0 °C en un baño de hielo y se trató con Tf_2O (0,160 ml, 0,874 mmol) que se añadió gota a gota a lo largo de 5 min. La disolución resultante se agitó a 0 °C durante 30 min y después se añadió gota a gota una disolución de **6** (220 mg, 0,329 mmol) en DCM (4 ml) a lo largo de 5 min. La reacción se agitó a 0 °C durante 10 min y después se extinguió con tampón fosfato (4 ml). Se extrajo en DCM (3 x 10 ml) y se separó. La capa orgánica se secó sobre MgSO_4 , se filtró y se concentró al vacío. Se logró la purificación mediante una cromatografía en columna de resolución rápida (EtOAc al 20-40%/éter de petróleo) para producir **7** (88 mg, 65%) como un sólido de color amarillo pálido, p.f. 98-100 °C; $R_f = 0,32$ (EtOAc al 40%/éter de petróleo); IR ν_{max} 3032, 2947 (ν_{CH}), 1726 (ν_{CO}), 1599, 1569, 1557, 1480, 1454, 1431, 1380, 1319, 1261, 1242, 1225, 1199, 1176, 1043, 1018, 946 cm^{-1} ; RMN de ^1H (CDCl_3) δ 3,63 (1H, dd, $J = 10,9$, 9,3, CH_2S), 3,71 (1H, dd, $J = 11,0$, 9,3, CH_2S), 3,86 (3H, s, OCH_3), 5,15 (2H, s, OCH_2Ph), 5,26 (1H, t, $J = 9,3$, CHCH_2), 7,18 (1H, dd, $J = 9,0$, 2,5, ArH), 7,31-7,48 (8H, m, ArH , 2 x $\text{CHC}(\text{N})\text{S}$), 7,93 (1H, d, $J = 9,0$, ArH); RMN de ^{13}C (CDCl_3) δ 35,1 (CH_2), 53,1 (CH_3), 70,7 (CH_2), 78,2 (CH), 105,2 (CH), 117,2 (CH), 124,6 (CH), 127,6 (CH), 128,4 (CH), 128,8 (CH), 129,0 (CH), 135,2 (CH), 136,4 (C), 136,7 (C), 148,7 (C), 158,0 (C), 162,0 (C), 169,4 (C), 170,9 (C); m/z (ES+) 474 (32%), 411 (100%, M^+H), 320 (12%); HRMS $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}_2$ calc. 411,0837, encontrado 411,0831; Anal. calc. para $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}_2$: C, 61,44; H, 4,42; N, 6,82. Encontrado: C, 61,38; H, 4,34; N, 6,74%.

Un análisis de HPLC CSP determinó un ee de 45-95% que depende de la escala de reacción y de la pureza de Tf_2O . Puede lograrse la pureza óptica disolviendo **7** en MeCN y concentrando al vacío hasta que aparece un precipitado. La filtración y la concentración del filtrado produce **7**. $[\alpha]_D -28,4$ (c 0,91, CHCl_3); un análisis de HPLC CSP (Chiracel OD-H, eluyente: hexano:PrOH, 70:30, flujo: 0,5 ml/min, 14 bares) determinó > 98% de ee [t_R (minoritario) = 21,8 min,

t_R (mayoritario) = 30,7 min].

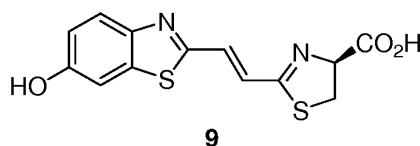
6-hidroxi-2-(2-(4S-metoxicarbonil-4,5-dihidrotiazol-2-il)etenil)benzotiazol (**8**)



Una disolución de **7** (55 mg, 0,133 mmol) en DCM (2 ml) se enfrió hasta $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ en un baño de acetona/ CO_2 (s) y se trató con pentametilbenceno (110 mg, 0,580 mmol), seguido de BCl_3 (0,39 ml, 0,399 mmol, 1 M en DCM) añadido gota a gota a lo largo de 5 min. La reacción se agitó a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 20 min y después se extinguió con tampón fosfato (2 ml). Se extrajo en DCM (3 x 5 ml) y se separó. La capa orgánica se secó sobre MgSO_4 , se filtró y se concentró al vacío. Se logró la purificación mediante una cromatografía en columna de resolución rápida (EtOAc al 40-100%/éter de petróleo) para producir **8** (34 mg, 79%, 98% b.r.s.m) como un sólido de color amarillo pálido, p.f. 163-165 $^{\circ}\text{C}$; R_f = 0,13 (EtOAc al 40%/éter de petróleo); IR ν_{max} 3210 (ν_{OH}), 3043 (ν_{CH}), 2954, 1731 (ν_{CO}), 1632, 1595, 1558, 1480, 1435, 1314, 1199, 1116, 1022, 949 cm^{-1} ; RMN de ^1H (MeOD) δ 3,70 (1H, dd, J = 20,1, 11,2, CH_2S), 3,72 (1H, dd, J = 20,8, 11,2, CH_2S), 3,81 (3H, s, OCH_3), 5,33 (1H, t, J = 9,0, CHCO_2Me), 7,03 (1H, dd, J = 8,9, 2,5, ArH), 7,29 (1H, d, J = 16,1, $\text{CHC}(\text{N})\text{S}$), 7,31 (1H, d, J = 2,3, ArH), 7,41 (1H, d, J = 16,1, $\text{CHC}(\text{N})\text{S}$), 7,82 (1H, d, J = 8,9, ArH); RMN de ^{13}C (MeOD) δ 35,7 (CH_2), 53,2 (CH_3), 79,0 (CH), 107,4 (CH), 118,1 (CH), 125,1 (CH), 128,9 (CH), 136,0 (CH), 138,1 (C), 148,6 (C), 158,5 (C), 162,2 (C), 171,6 (C), 172,2 (C).

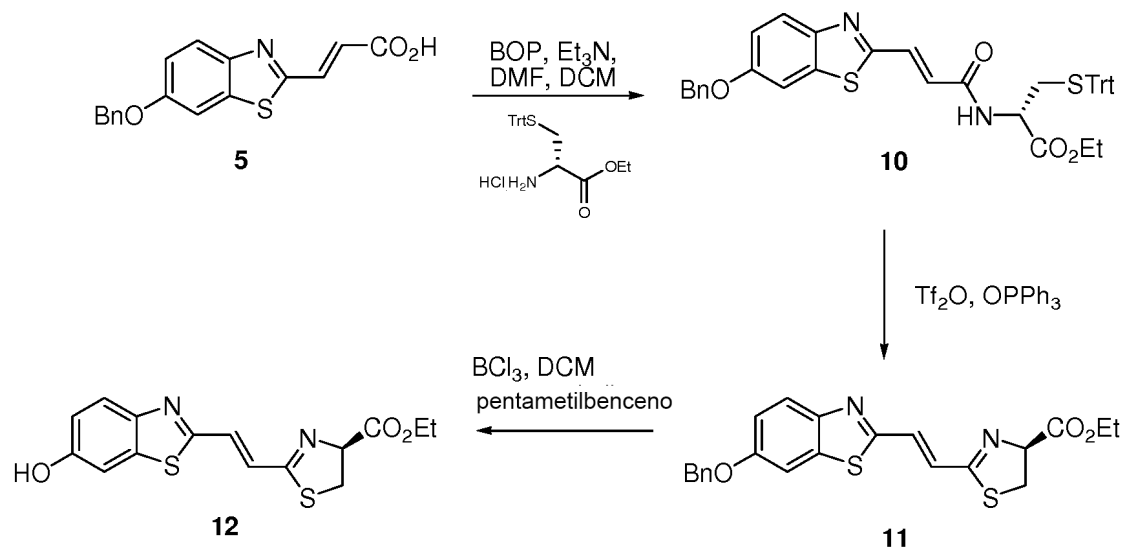
Un análisis de HPLC CSP determinó un ee de 65-90% que depende de la escala de reacción y de la pureza de BCl_3 . Puede lograrse la pureza óptica disolviendo **8** en MeCN y concentrando al vacío hasta que aparece un precipitado. La filtración y la concentración del filtrado produce **8**. Análisis de HPLC CSP (Chiracel AD, eluyente: hexano:PrOH, 70:30, flujo: 0,5 ml/min, 23 bar) > 98% de ee [t_R (mayoritario) = 6,35 min, t_R (minoritario) = 9,90 min].

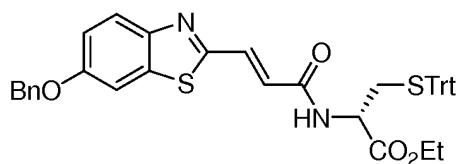
6-hidroxi-2-(2-(4S-carboxi-4,5-dihidrotiazol-2-il)etenil)benzotiazol (**9**)



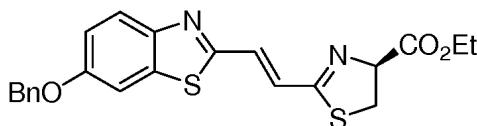
Una disolución de **8** en tampón fosfato (1 mg/ml) se trató con PLE (5 μg por 1 mg de **8**) y se incubó a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 h. Después de esto se empleó el éster saponificado **9** directamente sin aislamiento.

Síntesis de 6-hidroxi-2-(2-(4S-etoxicarbonil-4,5-dihidrotiazol-2-il)etenil)benzotiazol (**12**)



2-((E)-3-(6-benzoxibenzotiazol-2-il)acrilamido)-3-(trilitio)propanoato de D-(etilo) (**10**)**10**

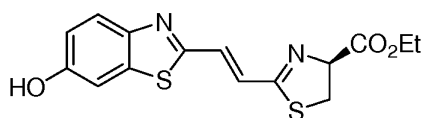
Una disolución de **5** (239 mg, 0,755 mmol) en DMF (7,6 ml) se trató con Et₃N (0,124 ml, 1,82 mmol) y se enfrió hasta 0 °C. La disolución se trató con una disolución de aminoácido (354 mg, 0,908 mmol) en DCM (3 ml), seguido de una disolución de BOP (414 mg, 0,908 mmol) en DCM (4,6 ml) y la disolución resultante se agitó a 0 °C durante 2 h. Después de esto la mezcla de reacción se extinguió con NaHCO₃ saturado (ac.) (5 ml) y se suspendió en EtOAc (20 ml), la capa acuosa se retroextrajo empleando EtOAc (2 x 10 ml), la capa orgánica se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró al vacío. Se logró la purificación mediante una cromatografía en columna de resolución rápida (EtOAc al 20%/éter de petróleo) para producir **10** (422 mg, 82%) como un sólido de color naranja, p.f. 75-78 °C; R_f = 0,23 (EtOAc al 30%/éter de petróleo); [α]_D +82,0 (c 1,05, CHCl₃); un análisis de HPLC CSP (Chiracel AD (300 x 4,6 mm), eluyente: hexano: iPrOH, 60:40, flujo: 1 ml/min, 26 bares) determinó > 99% de ee [t_R (minoritario) = 16,52 min, t_R (mayoritario) = 9,67 min]; IR ν_{max} 1735 (ν_{CO}), 1667, 1628, 1596, 1488, 1446, 1371, 1344, 1260, 1189, 1050, 1019, 966 cm⁻¹; RMN de ¹H (CDCl₃) δ 1,27 (3H, t, J = 7,2, CH₂CH₃), 2,70 (1H, dd, J = 12,6, 4,5, CH₂STrt), 2,80 (1H, dd, J = 12,6, 5,5, CH₂STrt), 4,22 (2H, m, CH₂CH₃), 4,75 (1H, dt, J = 7,7, 4,8, CHCH₂), 5,17 (2H, s, OCH₂Ph), 6,14 (1H, d, J = 7,8, NH), 6,68 (1H, d, J = 15,5, CHC(O)N), 7,20-7,49 (22H, m, ArH), 7,74 (1H, d, J = 15,5, CHC(N)S), 7,96 (1H, d, J = 9,0, ArH); RMN de ¹³C (CDCl₃) δ 14,3 (CH₃), 34,0 (CH₂), 51,5 (CH), 62,2 (CH₂), 67,1 (C), 70,7 (CH₂), 105,2 (CH), 117,2 (CH), 124,6 (CH), 126,9 (CH), 127,1 (CH), 127,6 (CH), 128,2 (CH), 128,4 (CH), 128,9 (CH), 129,6 (CH), 134,2 (CH), 136,4 (C), 136,8 (C), 144,4 (C), 148,8 (C), 157,9 (C), 161,5 (C), 163,8 (C), 170,2 (C); m/z (ES⁺) 707 (100%, M⁺+Na), 685 (5%, M⁺+H), 338 (27%, M⁺+H-STrt, CO₂Et), 243 (100%), 228 (23%), 165 (59%); HRMS C₄₁H₃₆NaN₂O₄S₂ calc. 707,2014, encontrado 707,2039; Anal. calc. para C₄₁H₃₆N₂O₄S₂: C, 71,90; H, 5,30; N, 4,09. Encontrado: C, 71,43; H, 5,30; N, 3,98%.

6-benzoxi-2-(2-(4S-etoxicarbonil-4,5-dihidrotiazol-2-il)etenil)benzotiazol (**11**)**11**

Una disolución de Ph₃PO (955 mg, 3,45 mmol) en DCM (26 ml) se enfrió hasta 0 °C en un baño de hielo y se trató con Tf₂O (0,39 ml, 2,16 mmol) que se añadió gota a gota a lo largo de 5 min. La disolución resultante se agitó a 0 °C durante 30 min y después se añadió gota a gota una disolución de **10** (544 mg, 0,797 mmol) en DCM (8 ml) a lo largo de 5 min. La reacción se agitó a 0 °C durante 10 min y después se extinguió con tampón fosfato (10 ml). Se extrajo en DCM (3 x 15 ml) y se separó. La capa orgánica se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró al vacío. Se logró la purificación mediante una cromatografía en columna de resolución rápida (EtOAc al 20-40%/éter de petróleo) para producir **11** (250 mg, 74%) como un sólido de color amarillo pálido, p.f. 114-117 °C; R_f = 0,39 (EtOAc al 40%/éter de petróleo); IR ν_{max} 2977 (ν_{CH}), 1729 (ν_{CO}), 1597, 1555, 1479, 1453, 1379, 1316, 1261, 1222, 1199, 1049, 1014, 947 cm⁻¹; RMN de ¹H (CDCl₃) δ 1,36 (3H, t, J = 6,6, CH₂CH₃), 3,63 (1H, dd, J = 11,0, 9,4, CH₂S), 3,68 (1H, dd, J = 11,0, 9,4, CH₂S), 4,27-4,38 (2H, m, CH₂CH₃), 5,16 (2H, s, OCH₂Ar), 5,24 (1H, t, J = 9,3, CHCO₂Et), 7,19 (1H, dd, J = 9,0, 2,5, ArH), 7,30-7,49 (8H, m, ArH), 7,93 (1H, d, J = 9,0, ArH); RMN de ¹³C (CDCl₃) δ 14,3 (CH₃), 35,1 (CH₂), 62,2 (CH₂), 70,7 (CH₂), 78,5 (CH), 105,2 (CH), 117,2 (CH), 124,6 (CH), 127,6 (CH), 128,4 (CH), 128,8 (CH), 129,2 (CH), 135,0 (CH), 136,4 (C), 136,6 (C), 148,7 (C), 158,0 (C), 162,1 (C), 169,2 (C), 170,5 (C); m/z (ES⁺) 425 (100%, M⁺+H), 334 (25%, M⁺-Bn), 293 (11%); HRMS C₂₂H₂₁N₂O₃S₂ calc. 425,0994, encontrado 425,0998.

Un análisis de HPLC CSP determinó un ee de 82-92% que depende de la escala de reacción y de la pureza de Tf₂O. Puede lograrse la pureza óptica disolviendo **11** en MeCN y concentrando al vacío hasta que aparece un precipitado. La filtración y la concentración del filtrado produce **11**. Un análisis de HPLC CSP (Chiracel AD, eluyente: hexano: iPrOH, 60:40, flujo: 1 ml/min, 26 bares) determinó > 98% de ee [t_R (minoritario) = 23,60 min, t_R (mayoritario) = 11,19 min].

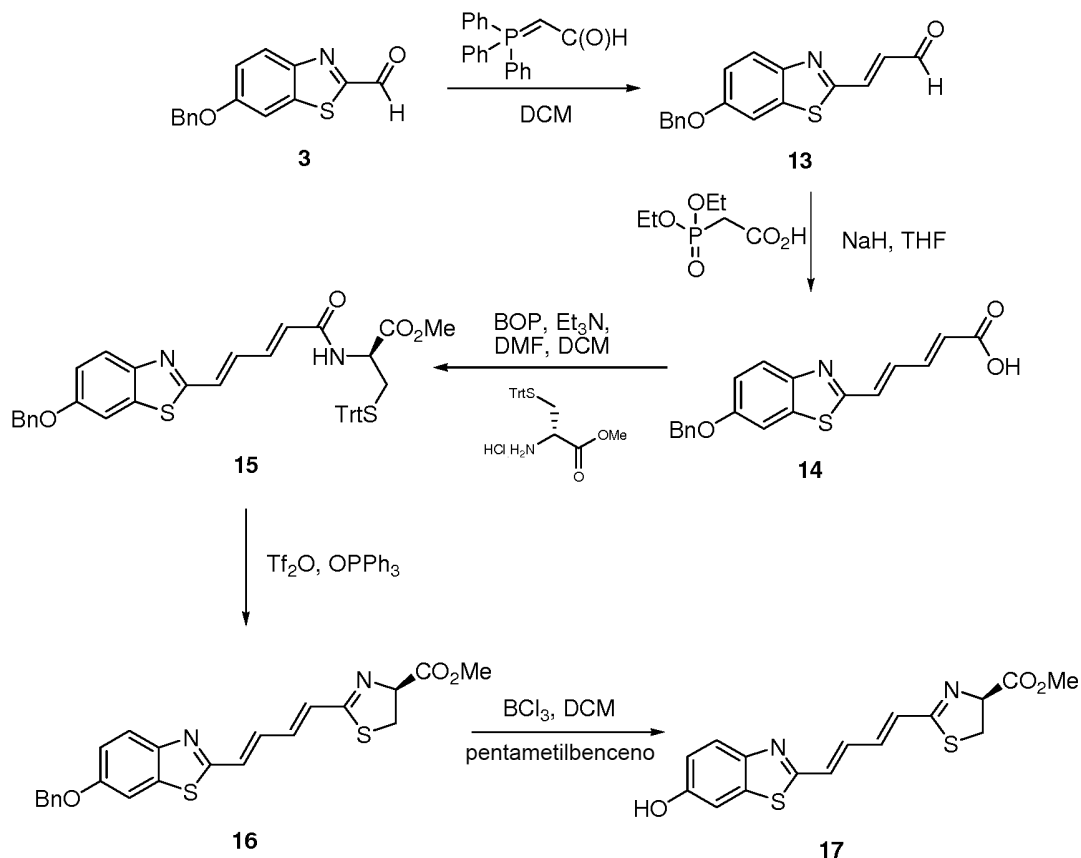
6-hidroxi-2-(2-(4S-etoxicarbonil-4,5-dihidrotiazol-2-il)etenil)benzotiazol (**12**)

**12**

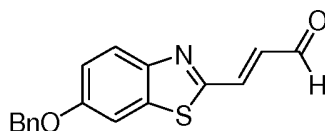
Una disolución de **11** (67 mg, 0,158 mmol) en DCM (2,7 ml) se enfrió hasta -78°C en un baño de acetona/ CO_2 (s) y se trató con pentametilbenceno (130 mg, 0,788 mmol), seguido de BCl_3 (0,46 ml, 0,472 mmol, 1 M en DCM) añadido gota a gota a lo largo de 5 min. La reacción se agitó a -78°C durante 20 min y después se extinguió con tampón fosfato (2 ml). Se extrajo en DCM (3 x 5 ml) y se separó. La capa orgánica se secó sobre MgSO_4 , se filtró y se concentró al vacío. Se logró la purificación mediante una cromatografía en columna de resolución rápida (EtOAc al 40-100%/éter de petróleo) para producir **12** (38 mg, 72%, 96% b.r.s.m) como un sólido de color amarillo pálido, p.f. $155-157^{\circ}\text{C}$; $R_f = 0,11$ (EtOAc al 40%/éter de petróleo); IR ν_{max} 3377 (ν_{OH}), 2983 (ν_{CH}), 1732 (ν_{CO}) 1592, 1568, 1476, 1449, 1379, 1369, 1321, 1281, 1254, 1192, 1116, 1062, 1027, 944 cm^{-1} ; RMN de ^1H (CDCl_3) δ 1,36 (3H, t, $J = 7,1$, CH_2CH_3), 3,64 (1H, dd, $J = 20,5$, 10,8, CH_2S), 3,68 (1H, dd, $J = 20,3$, 10,8, CH_2S), 4,30-4,36 (2H, m, CH_2CH_3), 5,25 (1H, t, $J = 9,2$, CHCO_2Et), 5,76 (1H, s, OH), 7,03 (1H, dd, $J = 8,8$, 2,4, ArH), 7,28 (1H, d, $J = 16,1$, $\text{CHC}(\text{N})\text{S}$) 7,30 (1H, d, $J = 2,4$, ArH), 7,38 (1H, d, $J = 16,1$, $\text{CHC}(\text{N})\text{S}$), 7,89 (1H, d, $J = 8,8$, ArH); RMN de ^{13}C (CDCl_3) δ 14,3 (CH_3), 35,1 (CH_2), 62,3 (CH_2), 78,4 (CH), 107,0 (CH), 116,7 (CH), 124,7 (CH), 129,1 (CH), 135,0 (CH), 136,7 (C), 148,6 (C), 155,0 (C), 162,0 (C), 169,5 (C), 170,6 (C); m/z (ES^+) 335 (100%, $\text{M}^+ + \text{H}$), 307 (12%, $\text{M}^+ + \text{H} - \text{Et}$), 261 (48%, $\text{M}^+ + \text{H} - \text{CO}_2\text{Et}$), 203 (47%, $\text{M}^+ + \text{H} - \text{SCH}_2\text{CHCO}_2\text{Et}$); HRMS $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}_2$ calc. 335,0524, encontrado 335,0526.

Un análisis de HPLC CSP determinó un ee de 80-92% que depende de la escala de reacción y de la pureza de BCl_3 . Puede lograrse la pureza óptica disolviendo **12** en MeCN y concentrando al vacío hasta que aparece un precipitado. La filtración y la concentración del filtrado produce **12**. Análisis de HPLC CSP (Chiracel AD, eluyente: hexano: i -PrOH, 70:30, flujo: 1,0 ml/min, 23 bares) > 98% de ee [t_R (mayoritario) = 6,85 min, t_R (minoritario) = 9,30 min].

Síntesis de 6-hidroxi-2-(4-1E,3E-(4S-etoxicarbonil-4,5-dihidrotiazol-2-il)buta-2,4-dienil)benzotiazol (**17**)



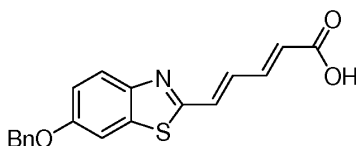
(E)-3-(6-benzoxibenzotiazol-2-il)prop-2-enal (**13**)

**13**

Una disolución de **3** (100 mg, 0,370 mmol) en DCM (2 ml) se trató con (trifenilfosforiliden)acetaldehído (124 mg, 0,407 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. La reacción se extinguió con NaHCO₃ saturado (ac.) (2 ml), se separó y se retroextrajo empleando DCM (2 x 5 ml). Las capas orgánicas se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron al vacío. Se logró la purificación mediante una cromatografía en columna de resolución rápida (EtOAc al 5%/éter de petróleo) para producir **13** (76 mg, 69%) como un sólido de color amarillo,

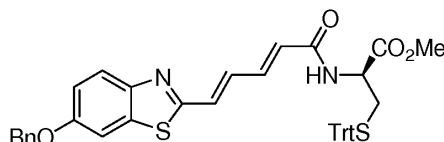
p.f. 124-126 °C; R_f = 0,27 (EtOAc al 20%/éter de petróleo); IR $\nu_{\max}$ 1674 (ν_{CO}), 1589, 1555, 1481, 1464, 1389, 1264, 1245, 1224, 1201, 1112, 1095, 1052, 1003, 992, 966 cm⁻¹; RMN de ¹H (CDCl₃) δ 5,17 (2H, s, OCH₂Ar), 6,89 (1H, dd, J = 16,0, 7,6, CHC(O)H), 7,23 (1H, dd, J = 9,0, 2,5, ArH), 7,34-7,50 (6H, m, ArH), 7,72 (1H, d, J = 16,0, CHC(N)S), 8,01 (1H, d, J = 9,0, ArH), 9,79 (1H, d, J = 7,2, C(O)H); RMN de ¹³C (CDCl₃) δ 70,8 (CH₂), 105,0 (CH), 117,8 (CH), 125,2 (CH), 127,6 (CH), 128,4 (CH), 128,9 (CH), 133,5 (CH), 136,2 (C), 137,4 (C), 143,8 (CH), 148,9 (C), 158,5 (C), 160,8 (C), 192,6 (CH); m/z (CI) 296 (100%, M⁺+H), 220 (21%, M⁺+2H-Ph), 217 (12%, M⁺-H, Ph); HRMS C₁₇H₁₄NO₂S calc. 296,0745, encontrado 296,0743.

Ácido (E)-5-(6-benzoxibenzotiazol-2-yl)-2,4-pentadienoico (**14**)

**14**

Una disolución de ácido dietilfosfonoacético (80 mg, 0,411 mmol) en THF (4 ml) se enfrió hasta 0 °C y se trató con NaH (8 mg, 0,333 mmol, 95%), con emisión de gas. La disolución se agitó a 0 °C durante 15 min y después se trató con una disolución de **13** (122 mg, 0,411 mmol) en THF (1 ml), que se añadió gota a gota. La disolución roja resultante se agitó a 0 °C durante 30 min y después se dejó que se calentase hasta la temperatura ambiente durante 1 h. Después de esto la disolución se concentró, se suspendió en H₂O, se acidificó (HCl 1 M) y el precipitado de color marrón resultante se filtró para producir **14** (119 mg, 86%) como un sólido de color marrón, p.f. 226-228 °C; R_f = 0,18 (MeOH al 5%/DCM); IR $\nu_{\max}$ 1678 (ν_{CO}), 1610, 1594, 1553, 1482, 1449, 1362, 1321, 1269, 1241, 1208, 1181, 1149, 1058, 1021, 1002, 935 cm⁻¹; RMN de ¹H (DMSO) δ 5,19 (2H, s, OCH₂Ar), 6,28 (1H, d, J = 14,9, CHC(O)OH), 7,20 (1H, dd, J = 8,9, 2,5, ArH), 7,32-7,50 (8H, m, 3 x CHCH, 5 x ArH), 7,79 (1H, d, J = 2,5, ArH), 8,01 (1H, d, J = 8,9, ArH); RMN de ¹³C (DMSO) δ 69,9 (CH₂), 105,9 (CH), 116,8 (CH), 123,7 (CH), 126,3 (CH), 128,0 (CH), 128,1 (CH), 128,5 (CH), 131,9 (CH), 133,9 (CH), 136,1 (C), 136,7 (C), 142,3 (CH), 148,1 (C), 157,0 (C), 162,8 (C), 167,3 (C); m/z (ES⁺) 338 (100%, M⁺+H), 320 (15%, M⁺-OH), 247 (19%, M⁺-H, Ph); HRMS C₁₉H₁₆NO₃S calc. 338,0851, encontrado 338,0845.

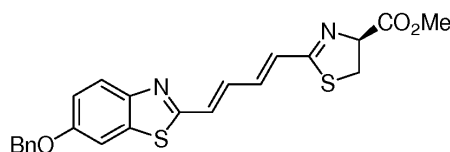
2-((2E,4E-5-(6-benzoxibenzotiazol-2-yl)penta-2,4-dienoilamido)-3-(trilitio)propononato de metilo (**15**)

**15**

Una disolución de **14** (118 mg, 0,350 mmol) en DMF (3,5 ml) se trató con Et₃N (58 μ l, 0,841 mmol) y se enfrió hasta 0 °C. La disolución se trató con una disolución de aminoácido (158 mg, 0,419 mmol) en DCM (1,5 ml), seguido de una disolución de BOP (191 mg, 0,419 mmol) en DCM (2,0 ml) y la disolución resultante se calentó hasta la temperatura ambiente y se agitó durante 16 h. Después de esto la mezcla de reacción se extinguió con NaHCO₃ saturado (ac.) (5 ml), se separó y la capa acuosa se retroextrajo empleando DCM (2 x 10 ml), la capa orgánica se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró al vacío. Se logró la purificación mediante una cromatografía en columna de resolución rápida (EtOAc al 20%/éter de petróleo) para producir **15** (128 mg, 53%) con un aceite de color naranja. R_f = 0,40 (EtOAc al 40%/éter de petróleo); [α]_D +56,3 (c 1,00, CHCl₃); IR $\nu_{\max}$ 3057 (ν_{CH}), 1734 (ν_{CO}), 1659, 1597,

1555, 1485, 1444, 1317, 1244, 1259, 1203, 1177, 1051, 996 cm^{-1} ; RMN de ^1H (CDCl_3) δ 2,71 (1H, dd, J = 12,6, 4,7, CH_2S), 2,76 (1H, dd, J = 12,6, 5,5, CH_2S), 3,74 (3H, s, OCH_3), 4,68 (1H, dt, J = 7,6, 5,2, CHCO_2Me), 5,16 (2H, s, OCH_2Ar), 6,05 (1H, d, J = 7,7, $\text{C}(\text{O})\text{NH}$), 6,09 (1H, d, J = 14,9, $\text{CHC}(\text{O})\text{NH}$), 7,10-7,50 (25H, m, 3 x CHCH , 22 x ArH), 7,92 (1H, d, J = 8,9, ArH); RMN de ^{13}C (CDCl_3) δ 33,9 (CH_2), 51,3 (CH_3), 52,8 (CH), 67,1 (C), 70,7 (CH_2), 105,3 (CH), 116,8 (CH), 124,1 (CH), 126,9 (CH), 127,0 (CH), 127,6 (CH), 128,1 (CH), 128,3 (CH), 128,8 (CH), 129,6 (CH), 131,9 (CH), 133,2 (CH), 136,3 (C), 136,5 (C), 139,9 (CH), 144,3 (C), 148,7 (C), 157,6 (C), 163,1 (C), 164,7 (C), 170,9 (C); m/z (ES^+) 719 (100%, $\text{M}^+ + \text{Na}$), 697 (12%, $\text{M}^+ + \text{H}$), 643 (10%), 244 (22%, $\text{M}^+ - \text{Bn}$, $\text{C}(\text{CO}_2\text{Me})(\text{CH}_2\text{STrt})$), 243 (78%, $\text{M}^+ - \text{H}$, Bn , $\text{C}(\text{CO}_2\text{Me})(\text{CH}_2\text{STrt})$), 228 (12%, Trt), 165 (32%); HRMS $\text{C}_{42}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_4\text{NaS}_2$ calc. 719,2014, encontrado 719,1990.

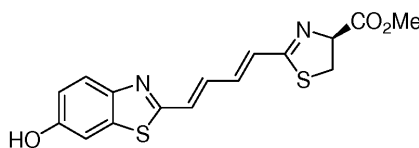
10 **6-benzoxi-2-(4-1E,3E-(4S-metoxycarbonil-4,5-dihidrotiazol-2-il)buta-2,4-dienil)benzotiazol (16)**



16

Una disolución de Ph_3PO (217 mg, 0,784 mmol) en DCM (6,0 ml) se enfrió hasta 0 °C en un baño de hielo y se trató con Tf_2O (89 μl , 0,491 mmol) que se añadió gota a gota a lo largo de 5 min. La disolución resultante se agitó a 0 °C durante 30 min y después se añadió gota a gota una disolución de **15** (127 mg, 0,182 mmol) en DCM (2,5 ml) a lo largo de 5 min. La reacción se agitó a 0 °C durante 20 min y después se extinguió con tampón fosfato (10 ml). Se extrajo en DCM (3 x 10 ml) y se separó. La capa orgánica se secó sobre MgSO_4 , se filtró y se concentró al vacío. Se logró la purificación mediante una cromatografía en columna de resolución rápida (EtOAc al 20-40%/éter de petróleo) para producir **16** (41 mg, 52%) como un sólido de color amarillo, p.f. 104-107 °C; R_f = 0,36 (EtOAc al 40%/éter de petróleo); IR ν_{max} 3032 (ν_{CH}), 2949 (ν_{CH}), 1739 (ν_{CO}), 1596, 1560, 1484, 1448, 1260, 1232, 1204, 1173, 1053, 983 cm^{-1} ; RMN de ^1H (CDCl_3) δ 3,58 (1H, dd, J = 11,0, 9,3, CH_2S), 3,65 (1H, dd, J = 11,0, 9,3, CH_2S), 3,84 (3H, s, OCH_3), 5,14, (2H, s, OCH_2Ar), 5,21 (1H, t, J = 9,3, 5,2, CHCO_2Me), 6,78 (1H, d, J = 15,4, $\text{CHC}(\text{N})\text{S}$), 6,97 (1H, dd, J = 15,4, 10,7, $\text{C CHCHC}(\text{N})\text{S}$), 7,04 (1H, d, J = 15,5, $\text{CHC}(\text{N})\text{S}$), 7,13-7,49 (8H, m, 1 x CHCH , 7 x ArH), 7,90 (1H, d, J = 8,9, ArH); RMN de ^{13}C (CDCl_3) δ 34,9 (CH_2), 53,1 (CH_3), 70,7 (CH), 78,1 (CH_2), 105,3 (CH), 116,9 (CH), 124,1 (CH), 126,9 (CH), 127,6 (CH), 128,8 (CH), 129,9 (CH), 134,0 (CH), 136,3 (C), 136,5 (C), 140,3 (CH), 148,7 (C), 157,6 (C), 163,1 (C), 169,6 (C), 171,1 (C); m/z (ES^+) 459 (25%, $\text{M}^+ + \text{Na}$), 437 (100%, $\text{M}^+ + \text{H}$), 342 (42%, $\text{M}^+ - \text{Bn}$, 4H), 279 (93%,), 243 (39%), 196 (22%), 165 (25%); HRMS $\text{C}_{23}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}_2$ calc. 437,0994, encontrado 437,0989.

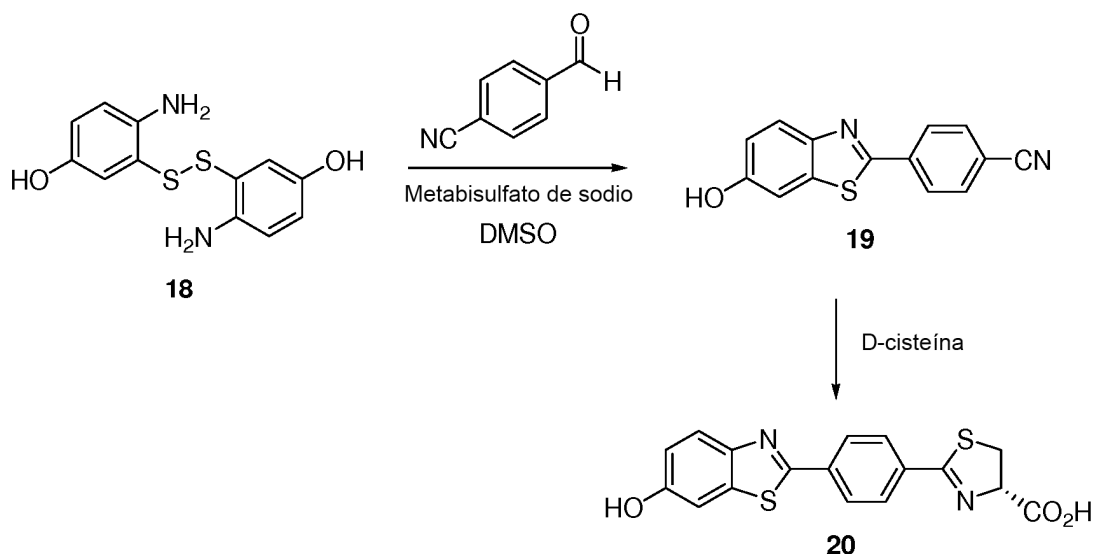
6-hidroxi-2-(4-1E,3E-(4S-metoxycarbonil-4,5-dihidrotiazol-2-il)buta-2,4-dienil)benzotiazol (17)



17

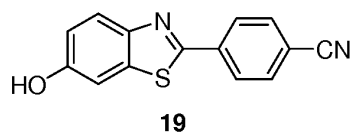
Una disolución de **16** (40 mg, 0,0916 mmol) en DCM (1,5 ml) se enfrió hasta -78 °C en un baño de acetona/ CO_2 (s) y se trató con pentametilbenceno (75 mg, 0,456 mmol), seguido de BCl_3 (0,27 ml, 0,275 mmol, 1 M en DCM) añadido gota a gota a lo largo de 5 min. La reacción se agitó a -78 °C durante 20 min y después se extinguió con tampón fosfato (2 ml). Se extrajo en DCM (3 x 5 ml) y se separó. La capa orgánica se secó sobre MgSO_4 , se filtró y se concentró al vacío. Se logró la purificación mediante una cromatografía en columna de resolución rápida (EtOAc al 30-60%/éter de petróleo) para producir **17** (17 mg, 54%, 79% b.r.s.m) como un sólido de color amarillo pálido, p.f. 156-158 °C; R_f = 0,20 (EtOAc al 40%/éter de petróleo); IR ν_{max} 3210 (ν_{OH}), 3046 (ν_{CH}), 2920, 2853, 1731 (ν_{CO}), 1631, 1595, 1557, 1480, 1435, 1314, 1199, 1116, 1022, 949 cm^{-1} ; RMN de ^1H (MeOD) δ 3,64 (1H, dd, J = 19,9, 11,2, CH_2S), 3,66 (1H, dd, J = 22,5, 11,2, CH_2S), 3,81 (3H, s, OCH_3), 5,27 (1H, t, J = 9,0, CHCO_2Me), 6,78 (1H, d, J = 15,4, $\text{CHC}(\text{N})\text{S}$), 6,99 (1H, dd, J = 15,4, 2,4, $\text{CHCHC}(\text{N})\text{S}$), 7,08-7,18 (2H, m, $\text{CHC}(\text{N})\text{S}$, ArH), 7,25-7,31 (1H, m, $\text{CHC}(\text{N})\text{S}$), 7,29 (1H, d, J = 2,4, ArH), 7,76 (1H, d, J = 8,9, ArH); RMN de ^{13}C (MeOD) δ 35,3 (CH_2), 53,1 (CH_3), 78,6 (CH), 107,4 (CH), 117,7 (CH), 124,5 (CH), 129,3 (CH), 131,9 (CH), 135,5 (CH), 142,2 (CH), 148,4 (C), 158,1 (C), 164,2 (C), 172,3 (C), 172,6 (C); m/z (ES^+) 347 (100%, $\text{M}^+ + \text{H}$), 279 (39%), 229 (15%), 202 (28%), 196 (58%); HRMS $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}_2$ calc. 347,0524, encontrado 347,0536.

Síntesis de ácido 2-(4-(6-hidroxibenzotiazol-2-il)aryl)-4,5-dihidrotiazol-4-carboxílico (20)



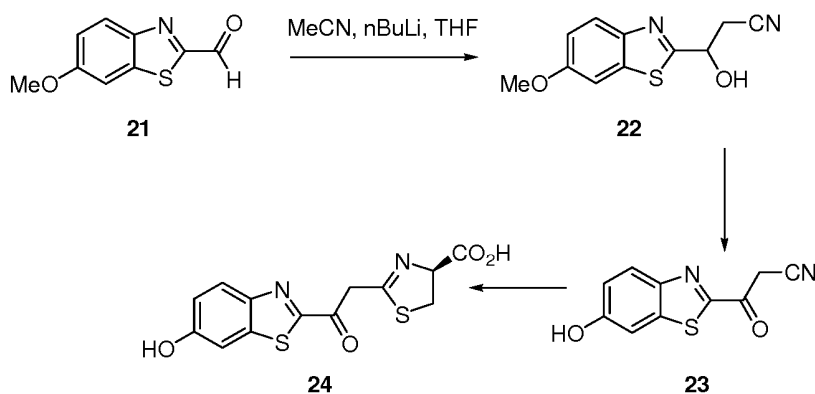
La síntesis puede comenzar con el 2-amino-6-metoxibenzotiazol disponible en el mercado. La amina después puede convertirse en el tiol con puente (**18**) empleando KOH siguiendo el método descrito por Fink *et al.*, Bioorg. & Med. Chem. Lett., 2006, 16, 1532.

5 **4-(6-hidroxibenzotiazol-2-il)benzonitrilo (**18**)**

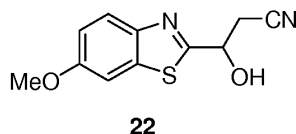


Una disolución de **18** (104 mg, 0,371 mmol) y 4-cianobenzaldehído (99 mg, 0,757 mmol) en DMSO anhidro (3 ml) se trató con metabisulfato de sodio y se calentó hasta 140 °C durante 3 h. Después de esto la reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente y se añadió H₂O (10 ml). El precipitado de color marrón resultante se filtró para producir **19** (55 mg, 29%) como un sólido de color marrón. R_f = 0,51 (EtOAc al 40%/éter de petróleo); RMN de ¹H (MeOD) δ 7,04 (1H, dd, J = 10,9, 2,3, ArH), 7,36 (1H, d, J = 2,3, ArH), 7,88 (2H, d, J = 8,4, ArH), 7,88 (1H, d, ArH), 8,19 (2H, d, J = 8,4, ArH); RMN de ¹³C (MeOD) δ 107,5 (CH), 114,7 (C), 117,9 (CH), 119,3 (C), 125,1 (CH), 128,6 (CH), 134,1 (CH), 138,2 (C), 138,9 (C), 148,9 (C), 158,1 (C), 163,6 (C).

Síntesis de 6-hidroxi-2-(1-ceto-2-(4S-metoxicarbonil-4,5-dihidrotiazol-2-il)etil)benzotiazol (24**)**

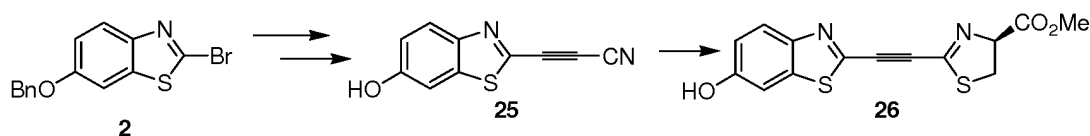


La síntesis puede comenzar con el 6-metoxi-2-metilbenzotiazol disponible en el mercado. El grupo metilo después puede oxidarse empleando SeO₂ siguiendo el método descrito en la patente de EE. UU. US4826833.

2-hidroxi-3-(6-metoxibenzotiazol-2-il)propionitrilo (22)

Se enfrió THF (5 ml) hasta -78 °C empleando un baño de acetona/CO₂ (s) y se añadió gota a gota nBuLi (0,39 ml, 0,621 mmol, 1,6 M en hexanos). La disolución resultante se agitó durante 5 min y después se trató con MeCN (34 µl, 0,650 mmol), se agitó durante 15 min y se añadió gota a gota una disolución de **21** (100 mg, 0,518 mmol) en THF (2 ml). La mezcla de reacción se retiró del baño de CO₂ (s) y se agitó durante 2 h. Después de esto la mezcla de reacción se extinguió con NaHCO₃ saturado (ac.) (2 ml), se extrajo con EtOAc (10 ml), se lavó con H₂O (5 ml), se secó (MgSO₄), se filtró y se concentró al vacío. Se logró la purificación mediante una cromatografía en columna de resolución rápida (EtOAc al 50%/éter de petróleo) para producir **22** (51 mg, 42%) como un sólido de color naranja, p.f. 78-80 °C; R_f = 0,32 (EtOAc al 50%/éter de petróleo); IR ν_{max} 3209 (ν_{OH}), 2013 (ν_{CN}), 1605 (ν_{CO}), 1559, 1519, 1469, 1436, 1262, 1227, 1091, 1056, 1025 cm⁻¹; RMN de ¹H (CDCl₃) δ 3,30 (1H, dd, J = 16,8, 7,3, CH₂CN), 3,20 (1H, dd, J = 16,8, 4,4, CH₂CN), 3,70 (1H, d, J = 5,7, OH), 3,90 (3H, s, OCH₃), 5,38 (1H, ap dd, J = 5,8, 10,7, CHOH), 7,12 (1H, dd, J = 8,9, 2,5, ArH), 7,36 (1H, J = 2,4, ArH), 7,88 (1H, J = 9,0, ArH); RMN de ¹³C (CDCl₃) δ 26,8 (CH₂), 56,0 (CH), 68,2 (CH), 104,2 (CH), 116,2 (CH), 116,7 (C), 123,9 (CH), 136,6 (C), 147,2 (C), 158,1 (C), 168,3 (C); m/z (EI⁺) 234 (27%, M⁺), 194 (100%, M⁺-CH₂CN), 166 (10%, M⁺-CH(OH)CH₂CN), 151 (29%), 123 (14%, M⁺-Me, CCH(OH)CH₂CN), 95 (7%); HRMS C₁₁H₁₀N₂O₂S calc. 234,0458, encontrado 234,0459.

Después puede lograrse la oxidación y la desprotección de **22** para proporcionar **23**, y **23** puede convertirse en **24** mediante la manipulación del grupo nitrilo y una condensación con cisteína.

Síntesis de 6-hidroxi-2-(2-(4S-metoxicarbonil-4,5-dihidrotiazol-2-il)etinil)benzotiazol (26)

Un acoplamiento de Sonagashira de **2** y etiniltrimetilsilano y una posterior hidrólisis y reacción con cianato de fenilo puede proporcionar el nitrilo **25**. Este entonces puede convertirse en **26** mediante la manipulación del grupo nitrilo y una condensación con cisteína.

Caracterización de la bioluminiscencia de los compuestos

Polinucleótidos que codifican luciferasas mutantes

x5 luciferasa:

```
ATGGAAGACGCCAAAAACATAAAGAAAGGCCCGGCACCACGCTATCCTCTAGAGGATGGA
ACCGCTGGAGAGCAACTGCATAAGGCTATGAAGAGATACGCCCAGGTTCTTGGAACAATT
GCTTTTACAGATGCACATATCGAGGTGAACATCACGTACGCGGAATACTTCGAAATGTCC
GTTCGGTTGGCAGAAGCTATGAAACGATATGGGCTGAATACAAATCACAGAATCGTCGTA
TGCAGTGAAAACCTCTCTTCAATTCTTTATGCCGGTGTGTTGGGCGCGTTATTTATCGGAGTT
GCAGTTGCGCCCGCGAACGACATTTATAATGAACGTGAATTGCTCAACAGTATGAACATT
TCGCAGCCTACCGTAGTGTGTTTGTTCACAAAAAGGGGTTGCAAAAAATTTTGAACGTGCAA
AAAAAATTACCAATAATCCAGAAAATTATTATCATGGATTCTAAAACGGATTACCAGGGA
TTTCAGTCGATGTACACGTTTCGTACATCTCATCTACCTCCCGGTTTTAATGAATACGAT
TTTAAACCAGAAAGCTTTGATCGTGACAAAACAATTGCACTGATAATGAATTCTCTGGA
```

TCTACTGGGTTACCTAAGGGTGTGGCCCTTCCGCATAGAAGTGCCTGCGTCAGATTCTCG
CACGCCAGAGATCCTATTTTTGGCAATCAAATCAAACCGGATACTGCGATTTTAAAGTGTT
GTTCCATTCCATCACGGTTTTGGAATGTTTACTACACTCGGATATTTGATATGTGGATTT
CGAGTCGTCTTAATGTATAGATTTGAAGAAGAGCTGTTTTTACGATCCCTTCAGGATTAC
AAAATTCAAAGTGCGTTGCTAGTACCAACCCTATTTTCATTCTTCGCCAAAAGCACTCTG
ATTGACAAATACGATTTATCTAATTTACACGAAATTGCTTCTGGGGGCGCACCTCTTTTCG
AAAGAAGTCGGGAAGCGGTTGCAAAACGCTTCCATCTTCCAGGGATACGACAAGGATAT
GGGCTCACTGAGACTACATCAGCTATTCTGATTACACCCGAGGGGGATGATAAACCAGGGC
GCGGTGCGTAAAGTTGTTCCATTTTTTGAAGCGAAGGTTGTGGATCTGGATACCGGGAAA
ACGCTGGGCGTTAATCAGAGAGGCGAATTATGTGTCAGAGGACCTATGATTATGTCCGGT
TATGTAAACAATCCGGAAGCGACCAACGCCTTGATTGACAAGGATGGATGGCTACATTCT
GGAGACATAGCTTACTGGGACGAAGACGAACACTTCTTCATAGTTGACCGCTTGAAGTCT
TTAATTTAAATACAAAGGATATCAGGTGGCCCCCGCTGAATTGGAATCGATATTGTTACAA
CACCCCAACATCCGCGACGCCGGCGTGGCAGGTCTTCCCGACGATGACGCCGGTGAACCT
CCCGCCGCCGTTGTTGTTTTGGAGCACGGAAAGACGATGACGGAAAAAGAGATCGTGGAT
TACGTCGCCAGTCAAGTAACAACCGCGAAAAAGTTGCGCGGAGGAGTTGTGTTTGTGGAC
GAAGTACCGAAAGGTCTTACCGGAAAACTCGACGCAAGAAAAATCAGAGAGATCCTCATA
AAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGTAA

x5 rojo:

ATGGAGGACGCCAAGAACATCAAGAAGGGACCAGCCCCCAGATACCCCCTGGAGGACGGC
ACAGCCGGCGAGCAGCTGCACAAGGCCATGAAGCGGTACGCCAGGTGCCAGGCACCATC
GCCTTCACCGACGCCACATCGAGGTGAACATCACCTACGCCGAGTACTTCGAGATGAGC
GTGCGGCTGGCCGAGGCCATGAAGCGGTACGGCCTGAACACCAACCACCGGATCGTGGTG
TGCAGCGAGAACAGCCTGCAGTTCTTCATGCCCGTGCTGGGAGCCCTGTTTCATCGGCGTG
GCCGTGGCCCCAGCCAACGACATCTACAACGAGCGGGAGCTGCTGAACAGCATGAACATC
AGCCAGCCCACCGTGGTGTTCGTGAGCAAGAAGGGCCTGCAGAAGATCCTGAATGTGCAG
AAGAAGCTGCCCATCATCCAGAAGATCATCATCATGGACAGCAAGACCGATTACCAGGGC
TTCCAGAGCATGTACACCTTCGTGACCAGCCACCTGCCCCAGGCTTCAACGAGTACGAC
TTCAAGCCCCGAGAGCTTCGACCGGGACAAGACCATCGCCCTGATCATGAACAGCAGCGGC
AGCACCGGCCTGCCAAGGGCGTGGCCCTGCCCCACCGGACCGCCTGCGTGCGGTTACAGC
CACGCCAGAGACCCCATCTTCGGCAACCAGATCATCCCCGACACCGCCATCCTGAGCGTG
GTGCCCTTCCACCACGGCTTCGGCATGTTACACCACCCTGGGCTACCTGATCTGCGGCTTC
CGGGTGGTGCTGATGTACAGGTTTCGAGGAGGAGCTGTTCTGCGGAGCCTGCAGGACTAC
AAGATCCAGACCGCCCTGCTGGTGCCACCCCTGTTTCAGCTTCTTCGCCAAGAGCACCCCTG
ATCGACAAGTACGACCTGAGCAACCTGCACGAGATCGCCTCTGGCGGAGCCCCACTGAGC
AAGGAGGTGGGCGAGGCCGTGGCCAAGCGGTTCCACCTGCCAGGCATCCGGCAGGGCTAC
GGCCTGACCGAGACCACCAGCGCCATCCTGATCACCCCCGAGGGGCGACGACAAGCCCCGA
GCCGTGGGCAAGGTGGTGGCCCTTCTTCGAGGCCAAGGTGGTGGACCTGGACACCGGCAAG
ACCCTGGGCGTGAACCAGAGAGGCGAGCTGTGCGTGAGAGGGCCCCATGATCATGAGCGGC
TACGTGAACAACCCCGAGGCCACCAACGCCCTGATCGACAAGGACGGCTGGCTGCACAGC
GGCGACATCGCCTACTGGGACGAGGACGAGCACTTCTTCATCGTGGACCGGCTGAAGAGC
CTGATCAAGTACAAGGGCTACCAGGTGGCCCCAGCCGAGCTGGAGAGCATCCTGCTGCAG
CACCCCAACATCTTCGACGCCGGAGTGGCCGACTGCCCGACGACGACGCCGGAGAGCTG
CCAGCCGCCGTGGTGGTGGTGGAGCACGGCAAGACCATGACCGAGAAGGAGATCGTGGAC
TACGTGGCCAGCCAGGTGACCACCGCCAAGAAGCTGAGAGGGCGGCGTGGTGTTCGTGGAC
GAGGTGCCCAAGGGCCTGACCGGCAAGCTGGACGCCAGAAAGATCCGGGAGATCCTGATC
AAGGCCAAGAAGGGCGGCAAGTAA

Bioluminiscencia

- 5 Tabla de los máximos de longitudes de onda de emisión de bioluminiscencia (λ_{max}) con LH₂ nativa y el compuesto 9.

Nombre del mutante	λ_{max} con luciferina (nm)	λ_{max} con el compuesto 9 (nm)
Fluc de tipo salvaje	557	662
Fluc x5	557	638
Fluc x5 rojo	620	700

Los valores de λ_{max} de bioluminiscencia para LH₂ y el compuesto 9 se ensayaron con enzimas purificadas. Los detalles experimentales fueron iguales en que la figura 2. Estos resultados demuestran que el compuesto 9 representa un análogo de la luciferina multiparamétrico cercano al infrarrojo (nIR).

5 Cinética de saponificación

Parámetros cinéticos aparentes para el éster etílico de LH₂ y el compuesto 12.

Sustrato	Km aparente (μM)	Kcat aparente (RLU s^{-1}) ($\times 10^{15}$)	Kcat/Km aparente ($\text{s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$) ($\times 10^{15}$)
Éster etílico de LH ₂	$11,9 \pm 0,6$	861 ± 206	75 ± 18
Compuesto 12	$11,8 \pm 1,9$	$17,5 \pm 9$	$1,5 \pm 1$

10 Cinética de Michaelis-Menten: se incubaron concentraciones de cada éster entre 1,9 mM y 0,38 mM con 100 μg de esterasa de hígado de cerdo a 37 °C durante 15 min y se dejó que se alcanzase la temperatura ambiente antes de que la luz se iniciase mediante la adición de 10 pmol de enzima Fluc y ATP 5,3 mM en reacciones de 55 μl . La luz se capturó empleando el instrumento Photon Imager (Biospace Labs, París, Francia) y se empleó la gráfica de Hanes-Woolf para analizar los parámetros cinéticos. La temperatura PMT varió entre -9-12 °C.

15 La cinética de la saponificación en células de mamífero mostró un aumento lento (aproximadamente 2 min) hasta la actividad máxima. Se observó que la Km aparente del compuesto 12 era la misma que LH₂, lo cual indica una afinidad similar por el sustrato, aunque la Kcat es menor, probablemente debido a la extinción por el emisor.

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> UCL Business Plc	
5	<120> Compuestos y sus usos	
	<130> P527941PCT	
	<150> GB1306248.4	
10	<151> 05-04-2013	
	<160> 2	
	<170> PatentIn versión 3.5	
15	<210> 1	
	<211> 1644	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
20	<220>	
	<223> Construcción sintética	
	<400> 1	
	atggaagacg ccaaaaacat aaagaaaggc ccggcaccac gctatcctct agaggatgga	60
	accgctggag agcaactgca taaggctatg aagagatacg ccaggttcc tggaacaatt	120
	gcttttacag atgcacatat cgaggatgaac atcacgtacg cggaatactt cgaaatgtcc	180
	gttcggttg cagaagctat gaaacgatat gggctgaata caaatcacag aatcgctcgt	240
	tgcagtgaat actctcttca attctttatg ccggtgttg gcgcgttatt tatcggagtt	300
	gcagttgcgc ccgcgaacga cttttataat gaacgtgaat tgctcaacag tatgaacatt	360
	tcgcagccta ccgtagtgtt tgtttccaaa aagggttgcc aaaaaatttt gaacgtgcaa	420
	aaaaaattac caataatcca gaaaattatt atcatggatt ctaaaacgga ttaccaggga	480
	tttcagtcga tgtacacgtt cgtcacatct catctacctc ccggttttaa tgaatacgat	540
	tttaaacag aaagctttga tcgtgacaaa acaattgcac tgataatgaa ttcctctgga	600
	tctactgggt tacctaagggt tgtggccctt ccgcatagaa ctgcctgcgt cagattctcg	660
	cacgccagag atcctatattt tggcaatcaa atcaaaccg atactgcgat tttaagtgtt	720
	gttcattcc atcacggttt tggaatgttt actacactcg gatatttgat atgtggattt	780
	cgagtcgtct taatgtatag atttgaagaa gagctgtttt tacgatccct tcaggattac	840
	aaaattcaaa gtgcgttgct agtaccaccc ctattttcat tcttcgcca aagcactctg	900
	attgacaaat acgattttatc taatttacac gaaattgctt ctgggggccc acctctttcg	960
	aaagaagtcg ggggaagcgt tgcaaaacgc ttccatcttc cagggatagc acaaggatat	1020
	gggctcactg agactacatc agctattctg attacaccgc agggggatga taaaccgggc	1080
	gcggtcggta aagttgttcc attttttgaa gcgaaggttg tggatctgga taccgggaaa	1140
	acgctgggcg ttaatcagag aggcgaatta tgtgtcagag gacctatgat tatgtccggt	1200

ES 2 703 514 T3

tatgtaaaca atccggaagc gaccaacgcc ttgattgaca aggatggatg gctacattct	1260
ggagacatag cttactggga cgaagacgaa cacttcttca tagttgaccg cttgaagtct	1320
ttaattaaat acaaaggata tcaggtggcc cccgctgaat tggaatcgat attgttacia	1380
cacccaaca tccgcgacgc cggcgtggca ggtcttcccg acgatgacgc cggatgaactt	1440
cccgccgccg ttgttggttt ggagcacgga aagacgatga cggaaaaaga gatcgtggat	1500
tacgtcgcca gtcaagtaac aaccgcgaaa aagtgcgcg gaggagttgt gtttgtggac	1560
gaagtaccga aaggtcttac cggaaaactc gacgcaagaa aaatcagaga gatcctcata	1620
aaggccaaga agggcggaaa gtaa	1644

<210> 2

<211> 1644

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 2

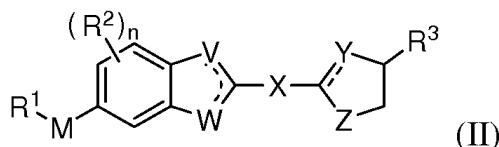
atggaggacg ccaagaacat caagaaggga ccagcccca gataccccct ggaggacggc	60
acagccggcg agcagctgca caaggccatg aagcggtagc cccaggtgcc aggcaccatc	120
gccttcaccg acgccacat cgaggtgaac atcacctacg ccgagtactt cgagatgagc	180
gtgcggctgg ccgaggccat gaagcgttac ggcctgaaca ccaaccaccg gatcgtggtg	240
tgcagcgaga acagcctgca gttcttcacg cccgtgctgg gagccctgtt catcggcgtg	300
gccgtggccc cagccaacga catctacaac gagcgggagc tgctgaacag catgaacatc	360
agccagccca ccgtgggtgtt cgtgagcaag aagggcctgc agaagatcct gaatgtgcag	420
aagaagctgc ccatcatcca gaagatcatc atcatggaca gcaagaccga ttaccagggc	480
ttccagagca tgtacacctt cgtgaccagc cacctgcccc caggcttcaa cgagtacgac	540
ttcaagcccg agagcttcga ccgggacaag accatcgccc tgatcatgaa cagcagcggc	600
agcaccggcc tgcccaaggc cgtggccctg cccacccgga ccgcctgcgt gcggttcagc	660
cacgccagag accccatctt cggcaaccag atcatccccg acaccgccat cctgagcgtg	720
gtgcccttcc accacggctt cggcatgttc accaccctgg gctacctgat ctgcggcttc	780
cgggtggtgc tgatgtacag gttcgaggag gagctgttcc tgccggagcct gcaggactac	840
aagatccaga ccgccctgct ggtgcccacc ctgttcagct tcttcgcca gagcaccctg	900
atcgacaagt acgacctgag caacctgcac gagatgcct ctggcggagc cccactgagc	960
aaggaggtgg gcgaggccgt ggccaagcgg ttccacctgc caggcatccg gcagggctac	1020
ggcctgaccg agaccaccag cgccatcctg atcacccccg agggcgacga caagcccgga	1080

ES 2 703 514 T3

gccgtgggca aggtggtgcc cttcttcgag gccaaagtgg tggacctgga caccggcaag	1140
accctgggcg tgaaccagag aggcgagctg tgcgtgagag gcccctgat catgagcggc	1200
tacgtgaaca accccgaggc caccaacgcc ctgatcgaca aggacggctg gctgcacagc	1260
ggcgacatcg cctactggga cgaggacgag cacttcttca tcgtggaccg gctgaagagc	1320
ctgatcaagt acaagggcta ccaggtggcc ccagccgagc tggagagcat cctgctgcag	1380
cacccaaca tcttcgacgc cggagtggcc ggactgcccg acgacgacgc cggagagctg	1440
ccagccgccg tgggtggtgct ggagcacggc aagaccatga ccgagaagga gatcgtggac	1500
tacgtggcca gccaggtgac caccgccaag aagctgagag gcggcgtggt gttcgtggac	1560
gaggtgcca agggcctgac cggcaagctg gacgccagaa agatccggga gatcctgac	1620
aaggccaaga agggcggcaa gtaa	1644

REIVINDICACIONES

1.- Un compuesto según la fórmula (II):



en la que:

5 R¹ es hidrógeno o un grupo alquilo opcionalmente sustituido;

cada R², cuando está presente, es un grupo seleccionado independientemente de hidroxilo opcionalmente sustituido, amino opcionalmente sustituido, tiol opcionalmente sustituido, alquilo opcionalmente sustituido, y arilo opcionalmente sustituido;

R³ es un grupo carboxilo o un grupo alquil((C₁₋₆)carbonilo) opcionalmente sustituido;

10 M es un grupo seleccionado de O, S, y NR⁴, en el que R⁴ es un grupo seleccionado de hidrógeno, alquilo opcionalmente sustituido, alqueno opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, y heterociclilo opcionalmente sustituido;

X es un grupo seleccionado de alqueno opcionalmente sustituido, alquino opcionalmente sustituido, arileno opcionalmente sustituido, y sus combinaciones, o alquilencarbonilo opcionalmente sustituido;

15 n es 0, 1, 2, o 3;

V e Y se seleccionan cada uno independientemente de CR⁵ y N;

W y Z se seleccionan cada uno independientemente de NR⁷, S y O;

R⁵ es un grupo seleccionado de hidrógeno, hidroxilo opcionalmente sustituido, alquilo opcionalmente sustituido, y amino opcionalmente sustituido; y

20 R⁷ es un grupo seleccionado de hidrógeno, alquilo opcionalmente sustituido, y arilo opcionalmente sustituido;

en la que cada uno de los grupos opcionalmente sustituidos listados anteriormente está opcionalmente sustituido con:

25 (1) un grupo seleccionado de -J-arilo, -J-heteroarilo, -J-heterociclilo y -J-cicloalquilo C₃₋₆, en los que J representa un enlace o alqueno C₁₋₃, y dicho arilo se selecciona de fenilo, dicho heteroarilo se selecciona de triazolilo, tiazolilo, tienilo, pirazolilo, pirimidilo, piridazino, pirazino, y piridilo, dicho heterociclilo se selecciona de pirrolidinilo, azetidino, pirazolidinilo, oxazolidinilo, piperidinilo, piperazinilo, morfolinilo, y tiazolidinilo, y dicho cicloalquilo C₃₋₆ se selecciona de ciclopropilo, ciclopentilo y ciclohexilo; o

(2) uno a tres sustituyentes seleccionados de:

(a) alquilo C₁₋₆ (preferiblemente metilo, etilo o isopropilo),

30 (b) alqueno C₁₋₃ (preferiblemente propenilo),

(c) halógeno (preferiblemente Cl o Br),

(e) haloalquilo C₁₋₆ (preferiblemente trifluorometilo),

(d) ciano,

(e) amino, opcionalmente mono- o disustituido con alquilo C₁₋₃, *tert*-butoxicarbonilo o bencilo,

35 (f) alcoxi C₁₋₃ (preferiblemente metoxi),

(g) (alquil C₁₋₆)carbonilo (preferiblemente acetilo),

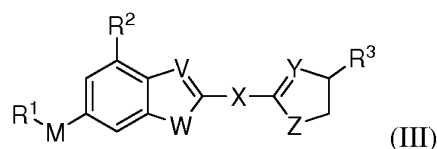
(h) (alcoxi C₁₋₃)carbonilo,

(i) (alquil C₁₋₃)carbonilo, incluyendo carboxilo, y

(j) (alquil C₁₋₃)carbamoilo, incluyendo carbamoilo.

2.- Un compuesto según la reivindicación 1, en el que n es 0 o 1.

3.- Un compuesto según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que tiene la fórmula (III):



5 en la que:

V e Y se seleccionan cada uno independientemente de CR⁵ y N; y

W y Z se seleccionan cada uno independientemente de NR⁷, S, y O.

4.- Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que V e Y son cada uno N y/o en el que W y Z son cada uno S.

10 5.- Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que R¹ es hidrógeno y/o

en el que R² es un grupo seleccionado de hidroxilo opcionalmente sustituido, amino opcionalmente sustituido, y alquilo opcionalmente sustituido, y/o

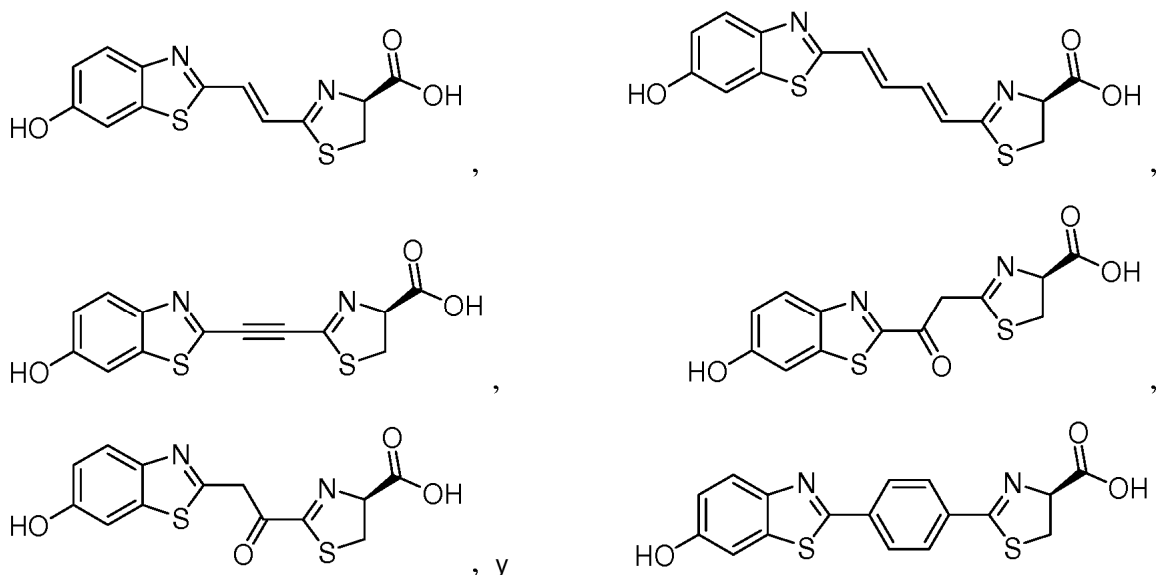
en el que X es un grupo seleccionado de alquenileno opcionalmente sustituido, alquinileno opcionalmente sustituido, y alquilencarbonilo opcionalmente sustituido, preferiblemente en el que X es un grupo alquenileno opcionalmente sustituido, y/o

15 en el que M es O;

en el que M es O;

en el que los sustituyentes opcionales de cada uno de los grupos opcionalmente sustituidos son como se define en la reivindicación 1.

6.- Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores seleccionado de:



20

y sus ésteres de alquilo C₁₋₆.

7.- Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su uso para la formación de imágenes *in vivo*.

8.- Una composición que comprende un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, y uno o más

ingredientes adicionales.

9.- El uso del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 como marcador bioluminiscente para la medición *in vitro* de la expresión de luciferasa.

10.- Un método para la formación de imágenes *in vivo*, que comprende:

- 5 administrar a un sujeto un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y una enzima luciferasa o un polinucleótido que codifica una enzima luciferasa, y

medir la emisión resultante de la acción de la enzima luciferasa sobre el compuesto.

11.- Un método según la reivindicación 10, que comprende además generar una imagen basada en las mediciones obtenidas.

- 10 12.- Un kit que comprende un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, y una enzima luciferasa o un polinucleótido que codifica una enzima luciferasa.

Figura 1

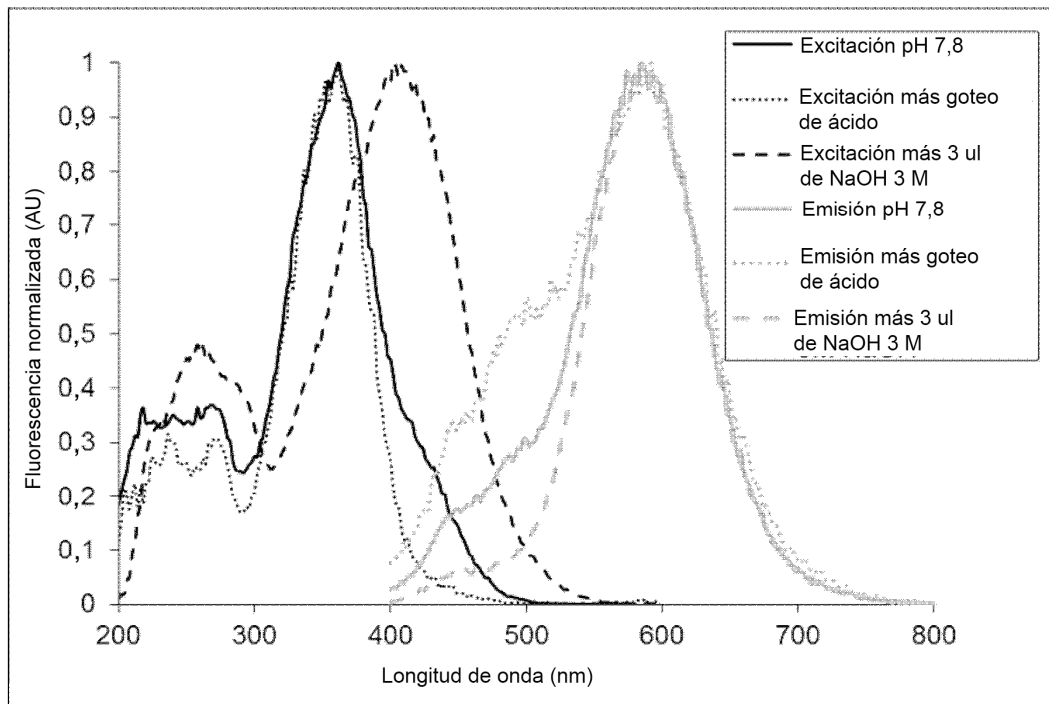


Figura 2

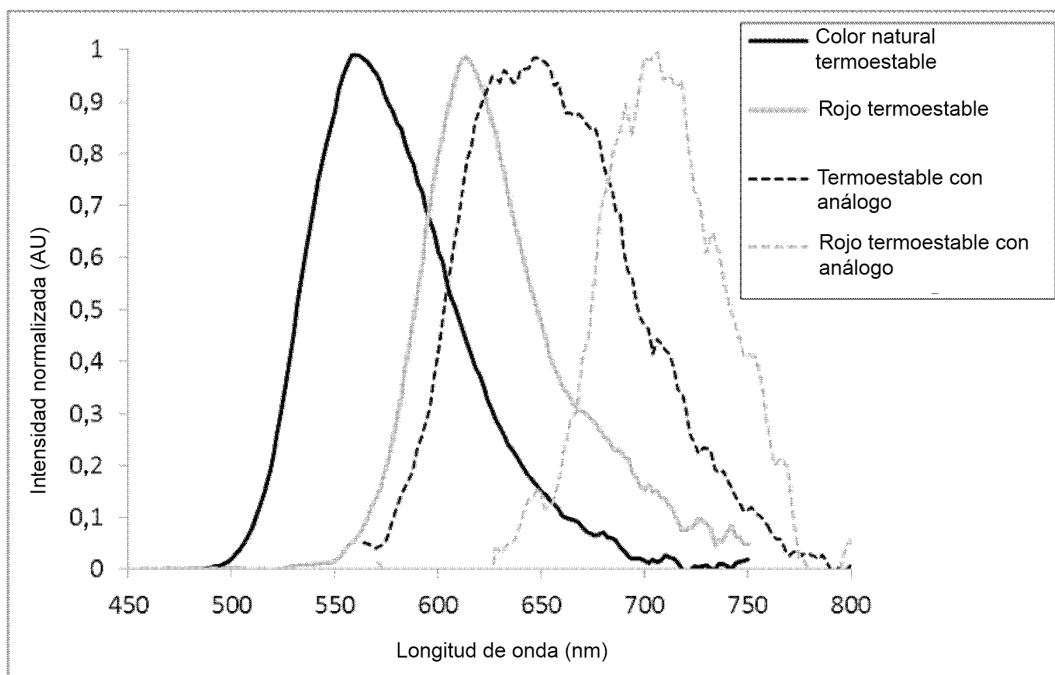


Figura 3

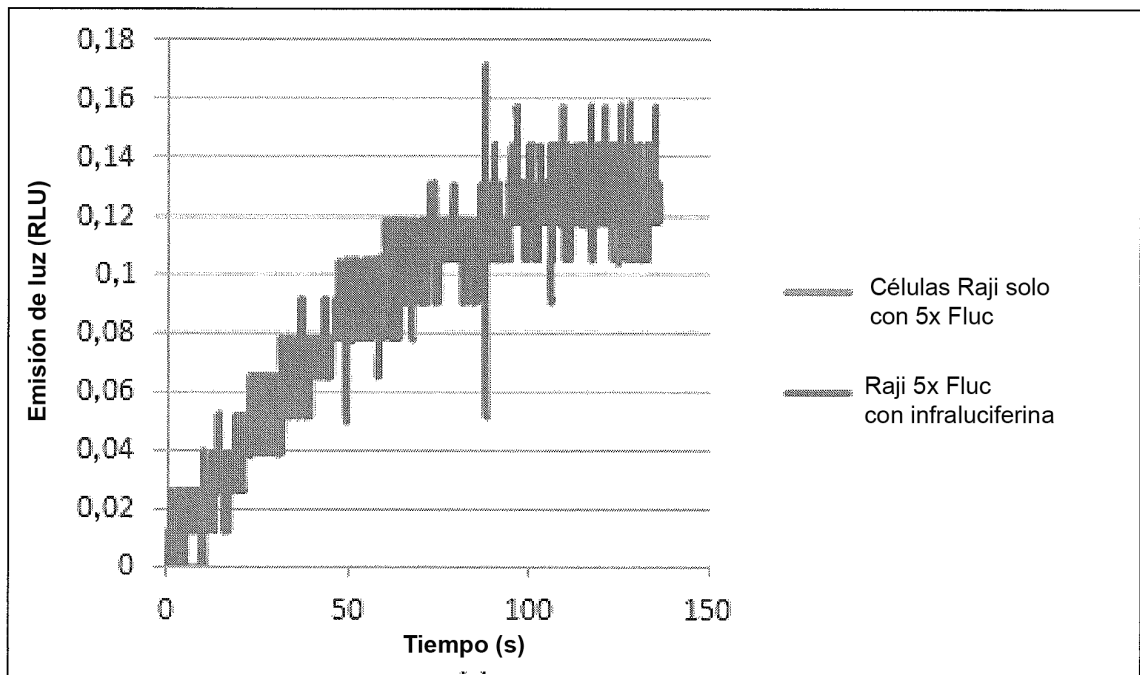


Figura 4

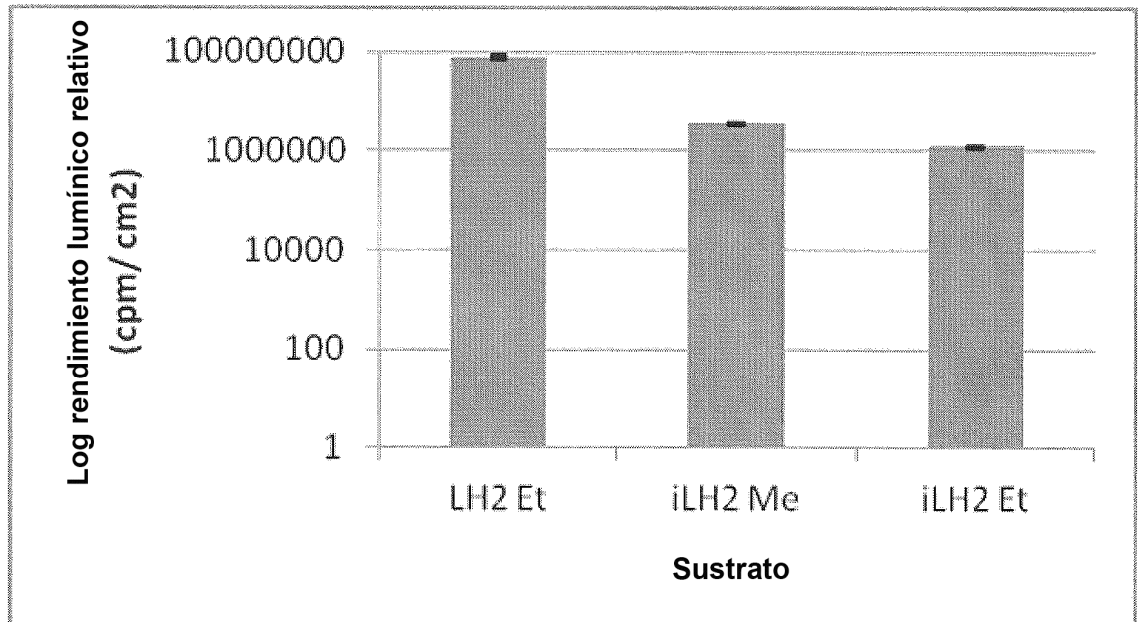


Figura 5

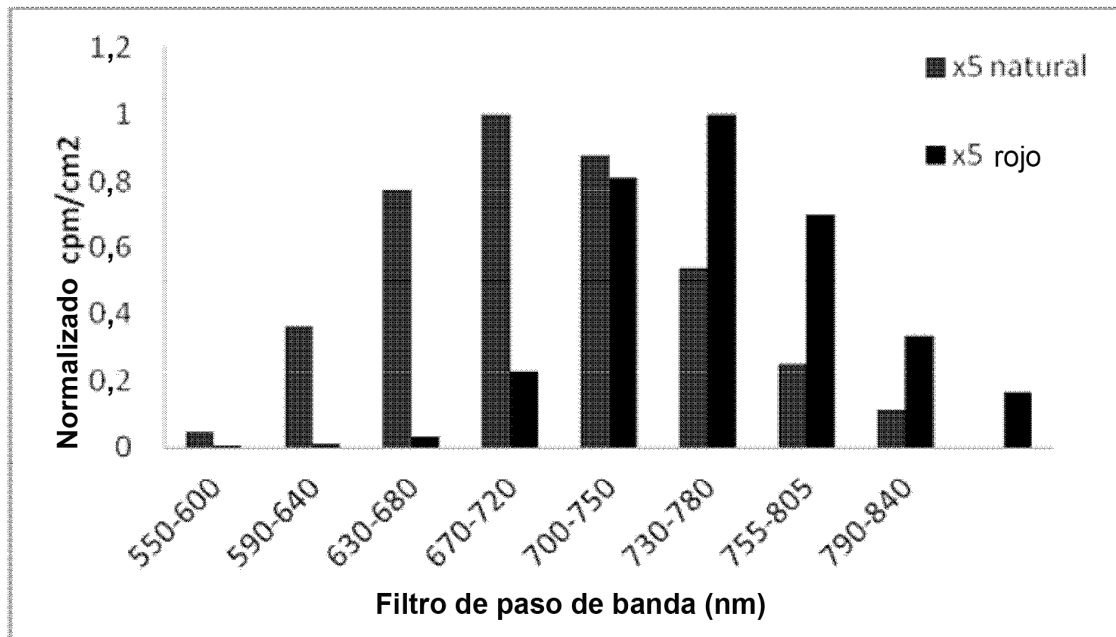


Figura 6

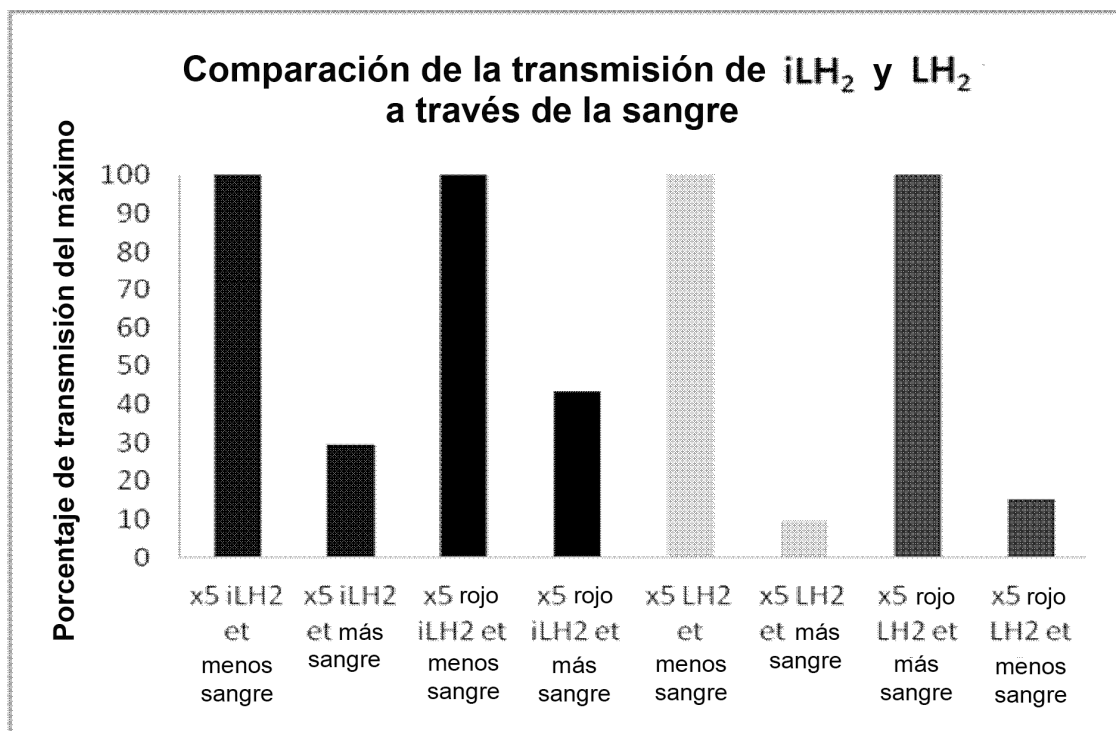


Figura 7

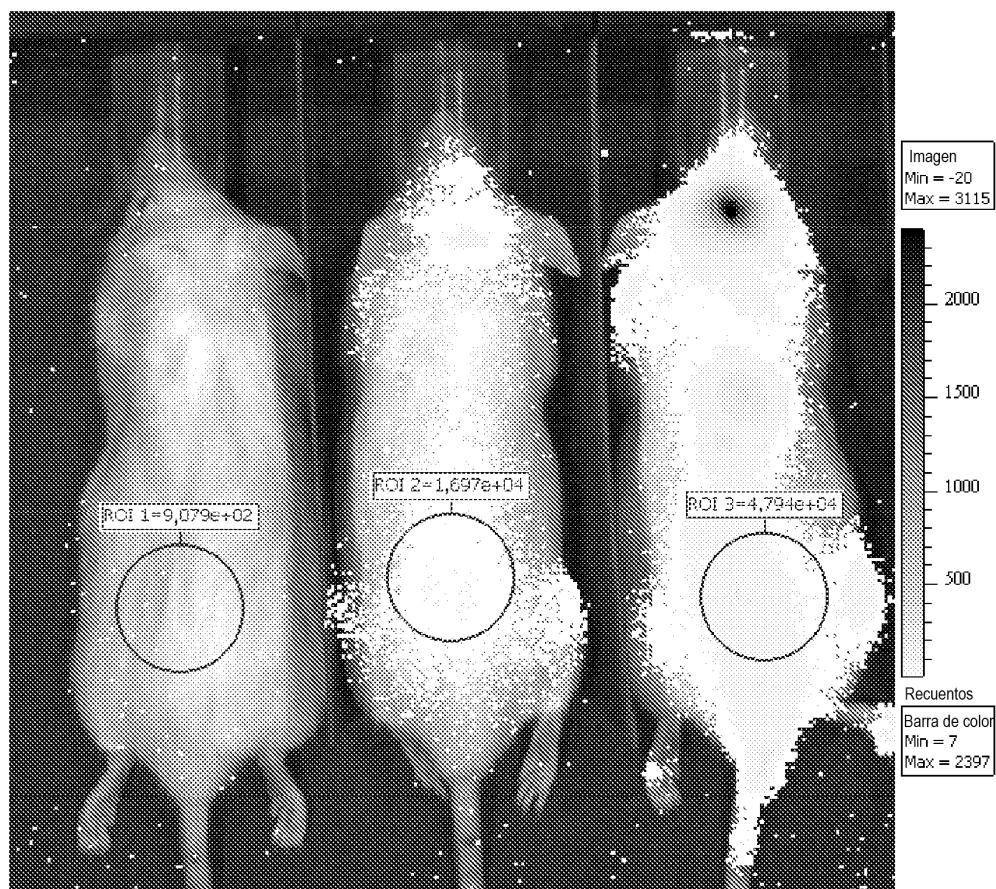


Figura 8

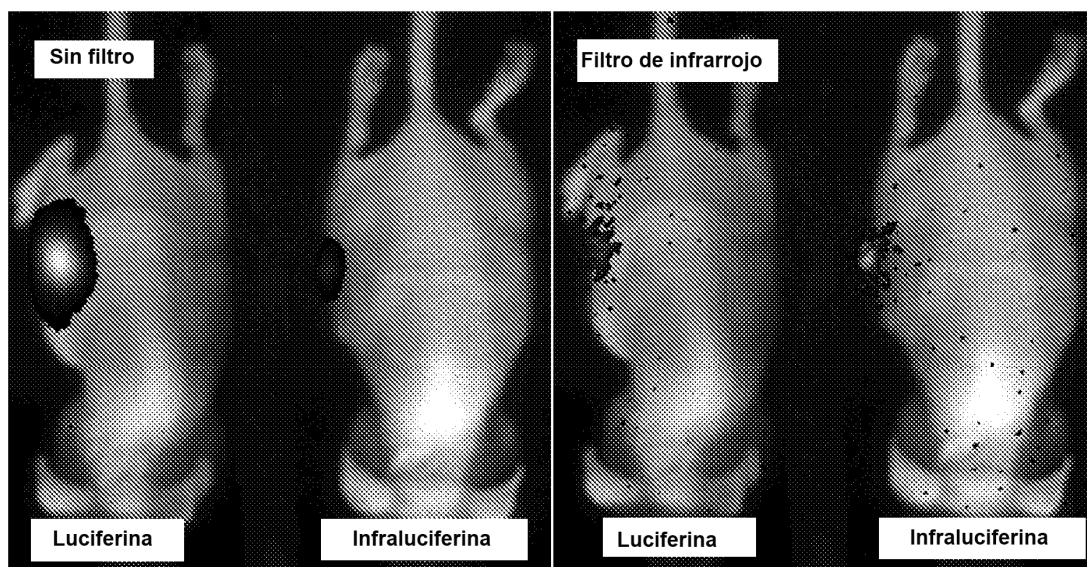


Figura 9

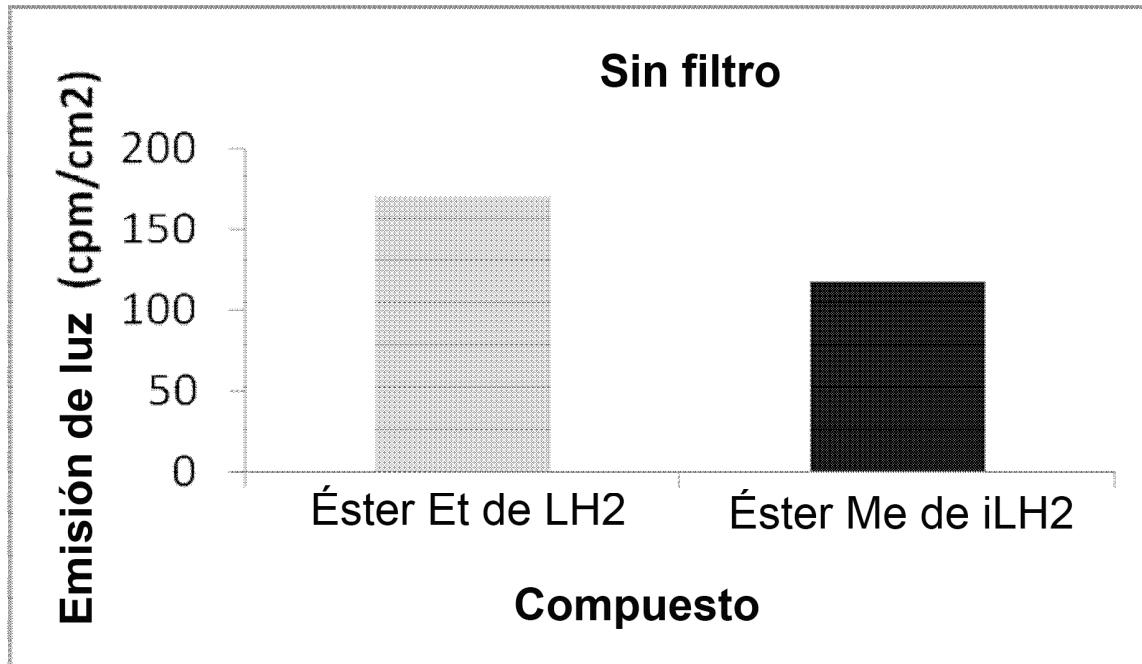


Figura 10

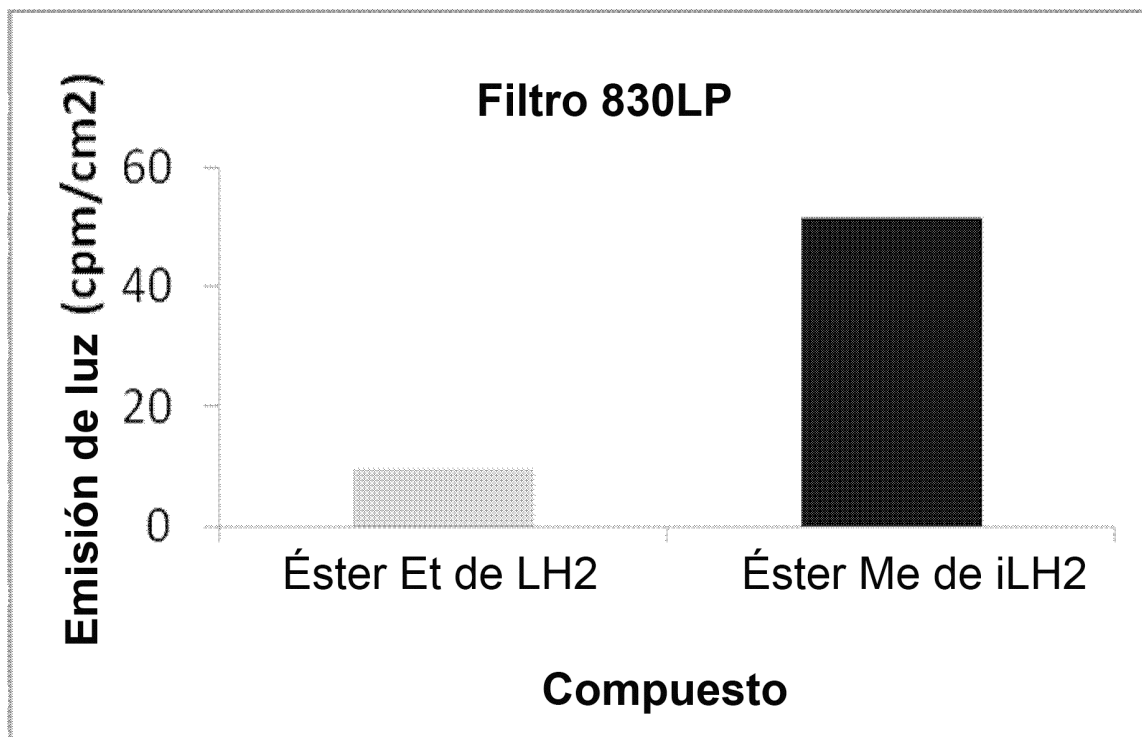


Figura 11

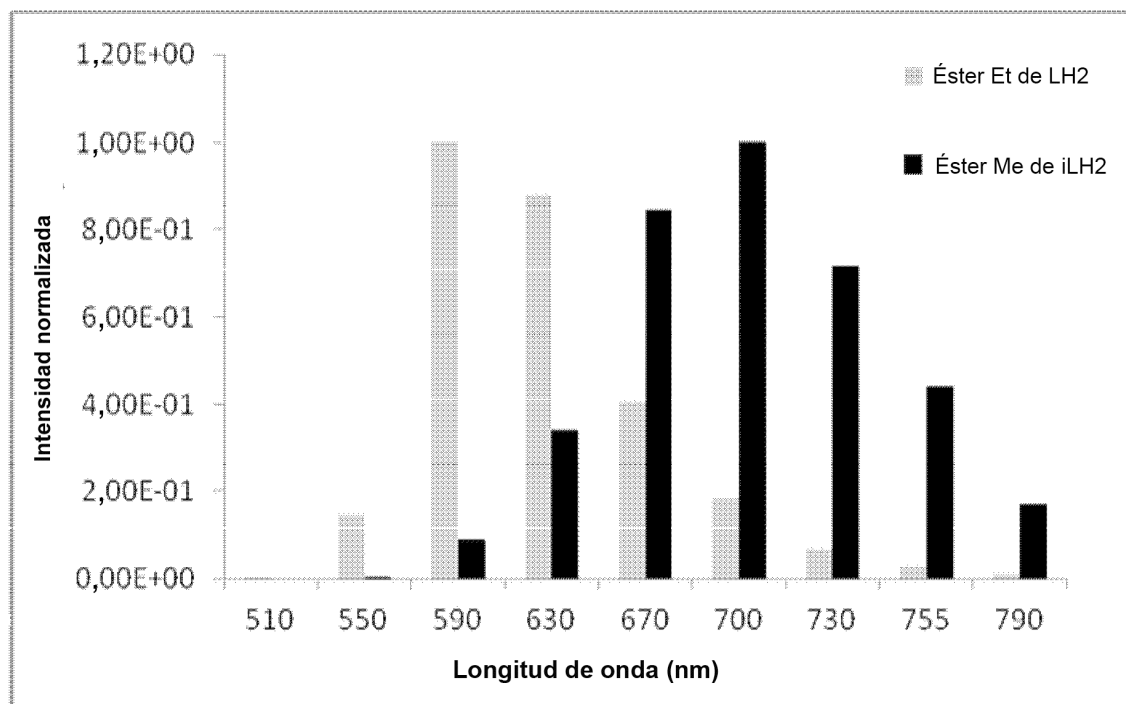


Figura 12

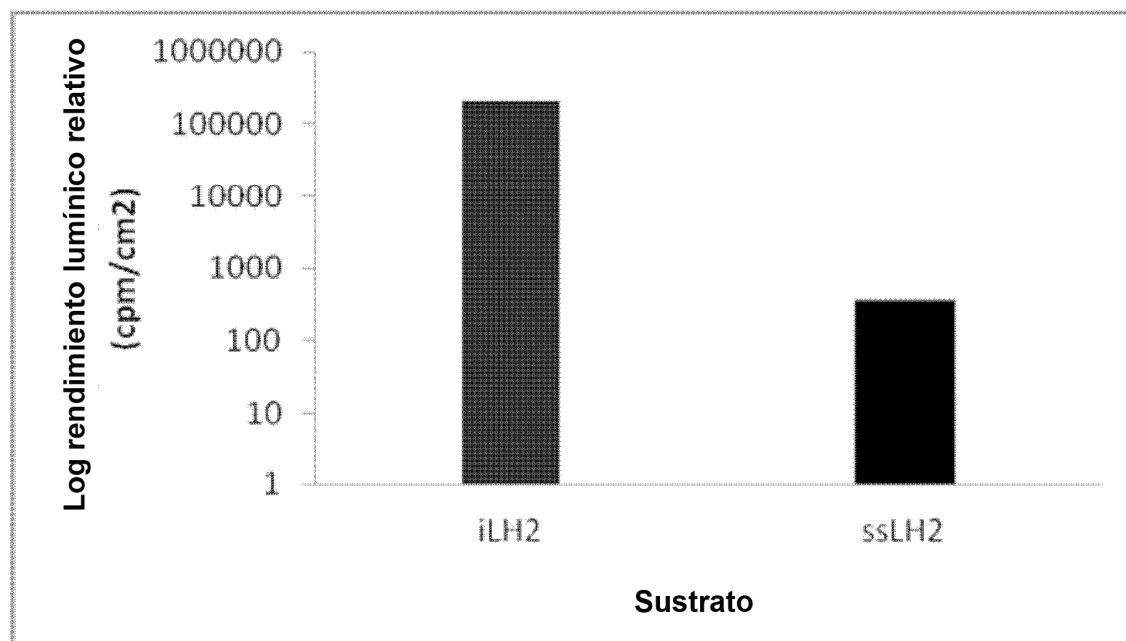


Figura 13

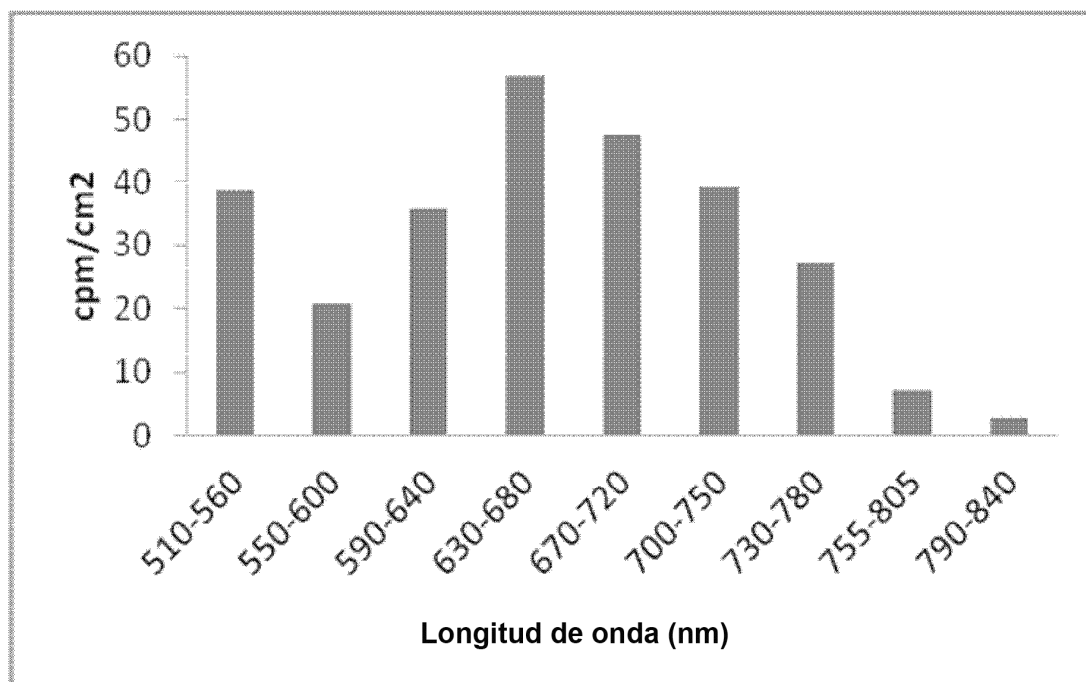


Figura 14

