

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 726 476**

21 Número de solicitud: 201830330

51 Int. Cl.:

**C07C 321/06** (2006.01)

**G01N 33/493** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**04.04.2018**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**04.10.2019**

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS (CSIC) (100.0%)**

**C/ Serrano, 117  
28006 Madrid ES**

72 Inventor/es:

**ALFONSO RODRÍGUEZ, Ignacio;  
SOLÀ OLLER, Jordi y  
LAFUENTE FABRA, María**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

54 Título: **QUIMIOTECA COMBINATORIA DINÁMICA BASADA EN PSEUDOPÉPTIDOS Y SU USO PARA LA DETECCIÓN DE CISTEINA Y OTROS BIOTIOLES**

57 Resumen:

Quimioteca combinatoria dinámica basada en pseudopéptidos y su uso para la detección de cisteína y otros biotioles.

La presente invención se refiere a una red química dinámica que mimetiza la transferencia de información y produce en última instancia una respuesta química, por ejemplo una señal legible. Más específicamente, la invención desvela un sistema dinámico capaz de detectar selectivamente un analito biológicamente pertinente, tal como cisteína, en su forma reducida o su forma oxidada (cistina) en medios acuosos y en un fluido biológico (tal como orina) para aplicación diagnóstica. Debido a esta propiedad, dicho sistema dinámico es útil para la detección de cisteína o sus derivados en fluidos biológicos tales como orina.

ES 2 726 476 A1

**QUIMIOTECA COMBINATORIA DINÁMICA BASADA EN PSEUDOPÉPTIDOS Y SU USO  
PARA LA DETECCIÓN DE CISTEÍNA Y OTROS BIOTIOLES**

**DESCRIPCIÓN**

5

La invención se refiere a una mezcla de moléculas que contienen grupos tiol que forma una red química dinámica basada en unidades de construcción pseudo-peptídicas mediante intercambio de enlaces disulfuro.

10 **ESTADO DE LA TÉCNICA**

15 La química combinatoria dinámica propone la creación de una mezcla de compuestos (quimiotecas combinatorias dinámicas, DCL) interconectados a través de procesos químicos reversibles. Los cambios de distribución de las especies implicadas en una DCL contienen información valiosa acerca de cambios en la estabilidad, con las correspondientes implicaciones en el campo recientemente emergido de la Química de Sistemas.

20 Las moléculas pequeñas que contienen tioles tales como cisteína (Cys) desempeñan un papel esencial en la función celular. Por lo tanto, la detección selectiva de estos tioles es de gran importancia para el diagnóstico clínico. Sin embargo, los métodos específicos y selectivos para la detección de cisteína aún son escasos (D. Zhang, Z. Yang, H. Li, Z. Pei, S. Sun, Y. Xu. *Chem. Commun.*, 2016, 52, 749-752).

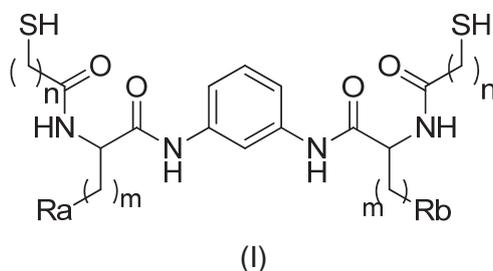
25 Solá et al. (*Chem. Commun.*, 2014, 50, 4564-4566) describieron la formación de una constitución específica que surge de la combinación de unidades de construcción con diferentes topologías (mono, di y tritioles) mediante química de disulfuro en una DCL.

30 El documento WO2015/097041 divulga una quimioteca combinatoria de moléculas basada en péptidos dinámicos capaces de llevar a cabo una reacción química reversible en condiciones fisiológicas. Esta DCL es útil para el descubrimiento de principios terapéuticamente activos.

## DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención describe una red química dinámica que mimetiza la transferencia de información y produce al final una respuesta química, por ejemplo una señal detectable. Más específicamente, la invención describe un sistema dinámico capaz de detectar un analito de importancia biológica, tal como cisteína, en sus formas reducida u oxidada (cistina) en medio acuoso y en un fluido biológico (tal como orina) para aplicación diagnóstica.

De ese modo, un primer aspecto de la presente invención se refiere a una mezcla de moléculas que comprende al menos un compuesto que se define mediante la fórmula (I):



15

o un isómero o una sal del mismo, donde:

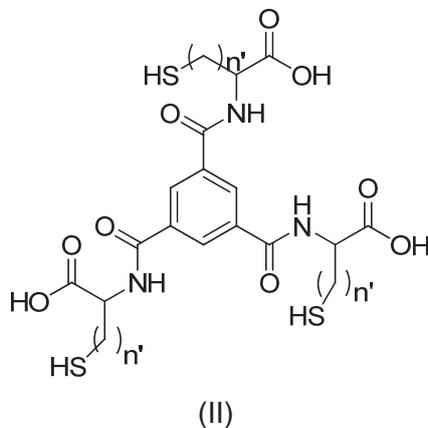
Ra y Rb se seleccionan independientemente entre H, -CONRR', -COOR, -NRR', -OH, -C(NH)NH<sub>2</sub>, -CH(OH)CH<sub>3</sub>, arilo (C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>) o heteroarilo (C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>);

R y R' se seleccionan independientemente entre H o alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>);

20 m es un número entero seleccionado entre 0, 1, 2, 3 o 4;

n es un número entero seleccionado entre 1 o 2;

y al menos un compuesto de fórmula (II):



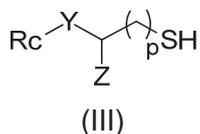
25

o un isómero o una sal del mismo, donde:

n' es un número entero seleccionado entre 1 o 2;

y al menos un compuesto de fórmula (III):

5



o un isómero o una sal del mismo, donde:

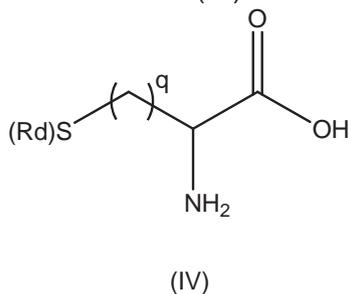
Rc representa un cromóforo aromático;

10 Y se selecciona entre NHCO o CONH;

Z se selecciona entre H, -NH<sub>2</sub>, -OH o -COOH;

p es un número entero seleccionado entre 0, 1, 2 o 3.

Preferiblemente, la mezcla de moléculas como se ha descrito anteriormente también  
15 comprende al menos un compuesto de fórmula (IV):



o un isómero o una sal del mismo, donde:

Rd se selecciona entre H o -S(CH<sub>2</sub>)<sub>q</sub>CH(NH<sub>2</sub>)COOH;

20 q es un número entero seleccionado entre 1, 2 o 3.

Preferiblemente, en la mezcla de moléculas como se ha descrito anteriormente, m es  
1 y n es 1.

25 Preferiblemente, en la mezcla de moléculas como se ha descrito anteriormente, Ra  
es -CONH<sub>2</sub>.

Preferiblemente, en la mezcla de moléculas como se ha descrito anteriormente, Rb  
es -CONH<sub>2</sub>.

30

Preferiblemente, en la mezcla de moléculas como se ha descrito anteriormente, n' es  
1.

Preferiblemente, en la mezcla de moléculas como se ha descrito anteriormente, m es 1, n es 1 y Ra y Rb se seleccionan entre -OH, -COOH, -CONH<sub>2</sub>, NH<sub>2</sub>, 3-indolilo o 4-fenilo.

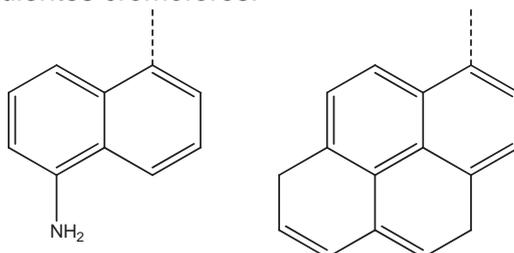
5 Preferiblemente, en la mezcla de moléculas que se ha descrito anteriormente, m es 2, n es 1 y Ra y Rb se seleccionan entre -COOH o -CONH<sub>2</sub>.

Preferiblemente, en la mezcla de moléculas como se ha descrito anteriormente, m es 3, n es 1 y Ra y Rb se seleccionan entre -NHC(NH)NH<sub>2</sub> o NH<sub>2</sub>.

10 Preferiblemente, en la mezcla de moléculas como se ha descrito anteriormente, m es 4, n es 1 y Ra y Rb son NH<sub>2</sub>.

Preferiblemente, en la mezcla de moléculas como se ha descrito anteriormente, m es 0, n es 1 y Ra y Rb son -CH(OH)CH<sub>3</sub>.

15 Preferiblemente, en la mezcla de moléculas como se ha descrito anteriormente, Rc se selecciona entre los siguientes cromóforos:



Preferiblemente, en la mezcla de moléculas como se ha descrito anteriormente, Y es NHCO.

20 Preferiblemente, en la mezcla de moléculas como se ha descrito anteriormente, Z es -NH<sub>2</sub>.

25 Preferiblemente, en la mezcla de moléculas como se ha descrito anteriormente, p es 1.

Preferiblemente, en la mezcla de moléculas como se ha descrito anteriormente, Rd es H.

30 Preferiblemente, en la mezcla de moléculas como se ha descrito anteriormente, q es 1.

En la presente invención, el término “arilo” se refiere a un grupos de hidrocarburo

aromático monocíclico o bicíclico que contiene de 6 a 10 carbonos en la parte del anillo, tales como fenilo, naftilo (incluyendo 1-naftilo y 2-naftilo), bifenilo o indenilo. Los radicales arilo pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes, tales como alquilo, hidroxilo, aminas, amida, ciano, halógeno (F, Cl, Br y I), etc.

5

En la presente invención, el término "heteroarilo" se refiere a un grupo de hidrocarburo aromático monocíclico o bicíclico de 5 a 10 miembros que consiste en átomos de carbono y de uno a tres heteroátomos seleccionados entre el grupo que consiste en N, O y S, tal como benzoimidazolilo, benzotiazolilo, indolilo, piridilo, pirimidilo, pirrolilo, pirazolilo, imidazolilo, furanilo o, tiofenilo. Los radicales heteroarilo pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes, tales como alquilo, hidroxilo, aminas, amida, ciano, halógeno (F, Cl, Br y I), etc.

10

El término "alquilo" se refiere, en la presente invención, a cadenas de hidrocarburo saturado lineales o ramificadas que tienen preferiblemente de 1 a 5 átomos de carbono, y que se unen al resto de la molécula mediante un enlace sencillo, por ejemplo, metilo, etilo, *n*-propilo, *i*-propilo, *n*-butilo, *terc*-butilo, *sec*-butilo, *n*-pentilo, etc. Los grupos alquilo pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes tales como halógeno, hidroxilo, alcoxilo, carboxilo, carbonilo, ciano, acilo, alcoxycarbonilo, amino, nitro, mercapto y alquiltio.

15

20

El término "cromóforo" se refiere, en la presente invención, a un grupo químico capaz de absorber o emitir luz selectivamente. Algunos ejemplos de cromóforos pueden ser radicales de una serie de enlaces sencillos y dobles alternados, sistemas aromáticos, etc. Preferiblemente, en la presente invención, los cromóforos contienen sistemas poliaromáticos, formados por dos a cinco anillos de hidrocarburo aromático que contienen de 9 a 22 átomos de carbono, y que se unen al resto de la molécula mediante un enlace sencillo, por ejemplo, naftilo, antraceno, fenantreno, pirenilo, benzopirenilo. Los radicales de sistemas poliaromáticos pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes, tales como alquilo, hidroxilo, aminas, amida, ciano, halógeno (F, Cl, Br y I), arilo, etc.

25

30

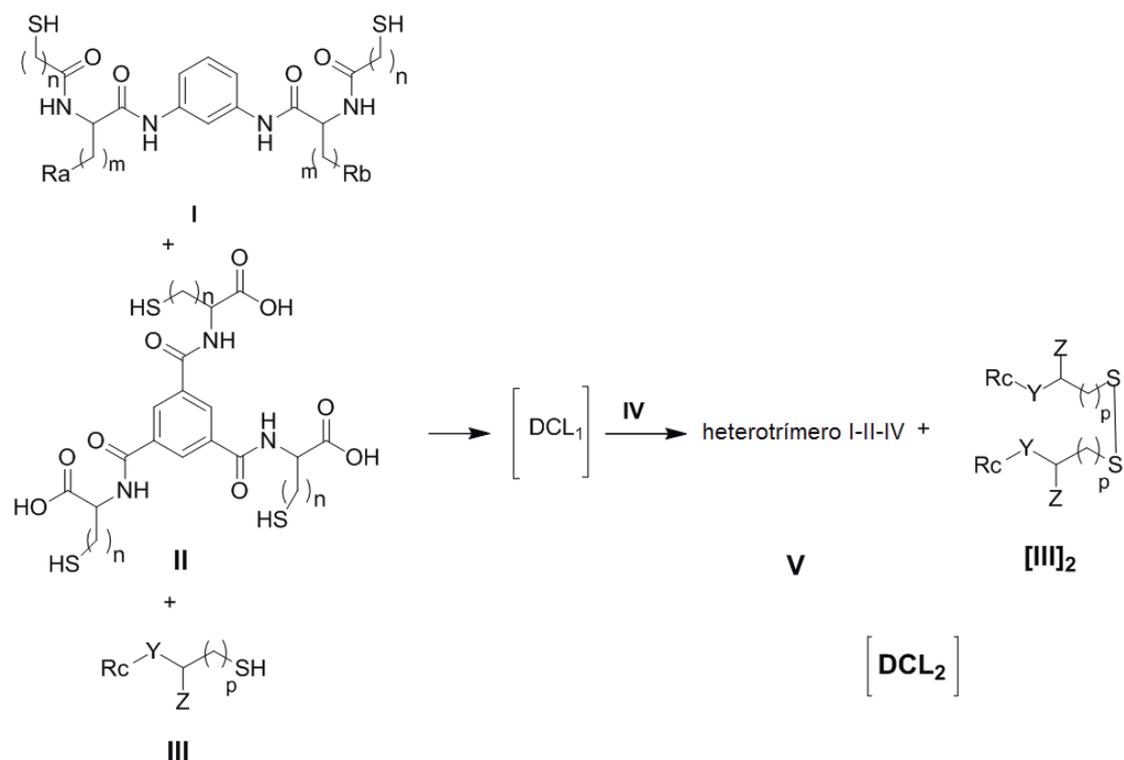
Los compuestos de la presente invención representados por las fórmulas I, II III y IV pueden comprender isómeros, incluyendo isómeros ópticos o enantiómeros, dependiendo de la presencia de centros quirales. Los isómeros, enantiómeros o diastereómeros y las mezclas de los mismos caen dentro del alcance de la presente invención. Los enantiómeros o diastereómeros, y sus mezclas, se pueden separar mediante técnicas convencionales.

35

Otro aspecto de la invención se refiere a una quimioteca combinatoria dinámica (DCL) que comprende la mezcla de moléculas que se ha descrito anteriormente.

5 La expresión "quimioteca combinatoria dinámica" o el término "DCL" se definen en el presente documento para referirse a una quimioteca combinatoria o una mezcla que es dinámica en el sentido de que las moléculas de la quimioteca combinatoria o mezcla se pueden reorganizar entre sí intercambiando grupos atómicos específicos o formando enlaces covalentes dinámicos. En particular, tal reorganización se puede producir cuando cambian una o más condiciones externas, por ejemplo tal como el cambio de uno o más  
10 parámetros químicos, tal como, por ejemplo, la adición de una o más moléculas potencialmente activas a la quimioteca o mezcla, y/o la adición de aditivos químicos a la quimioteca o mezcla, o la adición o el cambio de disolvente de la quimioteca o mezcla, y/o uno o más parámetros físicos, tales como, por ejemplo, temperatura, presión, pH, corriente eléctrica, radiación magnética o electromagnética, etc.

15 Para la preparación de las DCL, se mezclan los unidades de construcción (BB) I, II y III a un pH próximo a la neutralidad en medio acuoso o cualquier otro disolvente adecuado, tal como H<sub>2</sub>O-DMSO. Se forma una quimioteca dinámica de una mezcla de diferentes compuestos covalentes tras intercambio de disulfuro, es decir, homo y/o heterodímeros, trímeros, o tetrámeros (DCL1). Una vez se añade el compuesto IV al medio, la quimioteca  
20 dinámica se reorganiza para obtener principalmente el compuesto más estable V, formado por I, II y IV, liberando el fluoróforo que es un dímero de III en su forma oxidada [III]<sub>2</sub> (Esquema 1).



Esquema 1

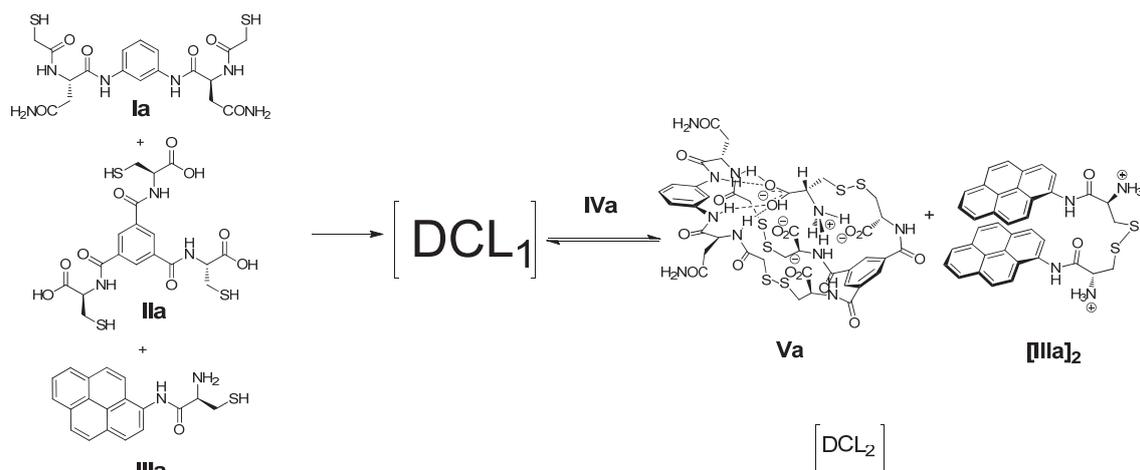
De ese modo, la invención se refiere a una DCL formada por una mezcla de compuestos de tipo **I**, **II** y **III** tras intercambio de disulfuro, que forma diferentes dímeros, trímeros y tetrámeros dinámicos. Por consiguiente, la invención se refiere a moléculas que comprenden enlaces disulfuro intramoleculares. La invención también se refiere a una DCL2 formada por adición del compuesto **IV** a dicha mezcla de compuestos, formando de ese modo una quimioteca dinámica de **I**, **II**, **III**, y **IV**.

10

La invención también se refiere al intercambio dinámico entre **III** y **IV** de la DCL anterior para formar un heterotrímero definido formado por **I**, **II** y **IV** y un homodímero excitado o excímero **[III]2**.

15

Preferiblemente, el heterotrímero formado en la DCL2 es el que comprende **Ia**, **Ila** y **IVa-e** y el excímero es **[IIIa-e]2**. Más preferiblemente, el heterotrímero es **Va**, que comprende **Ia**, **Ila** y **IVa** y el excímero es **[IIIa]2** (Esquema 2).



Esquema 2.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método *in vitro* para la detección de un compuesto de fórmula (IV) que se ha descrito anteriormente, en una muestra, que comprende las siguientes etapas:

- a) mezclar al menos un compuesto de fórmula (I) con al menos un compuesto de fórmula (II) y al menos un compuesto de fórmula (III) como se han descrito anteriormente;
- b) poner en contacto la muestra que comprende el compuesto de fórmula (IV) con la mezcla de la etapa (a);
- c) medir la emisión de fluorescencia de la mezcla obtenida en la etapa (b);
- d) detectar una desviación significativa de un patrón y
- e) asignar la muestra al grupo de muestras que comprende un compuesto de fórmula (IV) cuando se haya detectado una diferencia significativa en la etapa (d).

Preferiblemente, la emisión de fluorescencia medida en la etapa (c) se debe a la formación del excímero  $[\text{III}]_2$ , que se puede leer mediante espectroscopía, preferiblemente espectroscopía de fluorescencia.

De ese modo, la presencia del compuesto IV en la quimioteca se puede determinar analizando la proporción entre la banda de emisión debida al monómero III, en un intervalo entre 350 y 425 nm, y la banda de emisión del excímero, en un intervalo entre 450 y 550 nm. Más preferiblemente, la proporción es entre  $I_{\lambda 501}/I_{\lambda 385}$ .

Preferiblemente, en el método, la molécula de fórmula (IV) es cisteína (IVa o Cys) o su forma oxidada cistina (IVb o CySS).

Preferiblemente, en el método, la molécula de fórmula (IV) está en una muestra biológica. Más preferiblemente, la muestra biológica es orina.

5 Otro aspecto de la invención se refiere al uso de las DCL de la invención para el diagnóstico de enfermedades relacionadas con la presencia de cisteína o cistina en un fluido biológico. Preferiblemente, la enfermedad es cistinuria o cistinosis. Más Preferiblemente, la enfermedad es cistinuria.

10 Otro aspecto de la invención se refiere a un kit para la detección de un compuesto de fórmula IV en una muestra, en particular cisteína o cistina, que comprende una mezcla de compuestos de fórmulas I, II y III como se han descrito anteriormente. Además, el kit puede comprender otros componentes y reactivos necesarios para llevar a cabo el análisis de muestras.

15 A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos que se usan en el presente documento tienen el mismo significado que el entendido habitualmente por el experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. Se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los que se describen en el presente documento en la práctica de la presente invención. En la descripción y las  
20 reivindicaciones, no se pretende que la palabra "comprende" y sus variaciones excluyan otras características técnicas, aditivos, componentes, o etapas. Otros objetos, ventajas y características de la invención serán evidentes para los expertos en la materia tras el examen de la descripción o se pueden aprender poniendo en práctica la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración y no se pretende que  
25 sean limitantes de la presente invención.

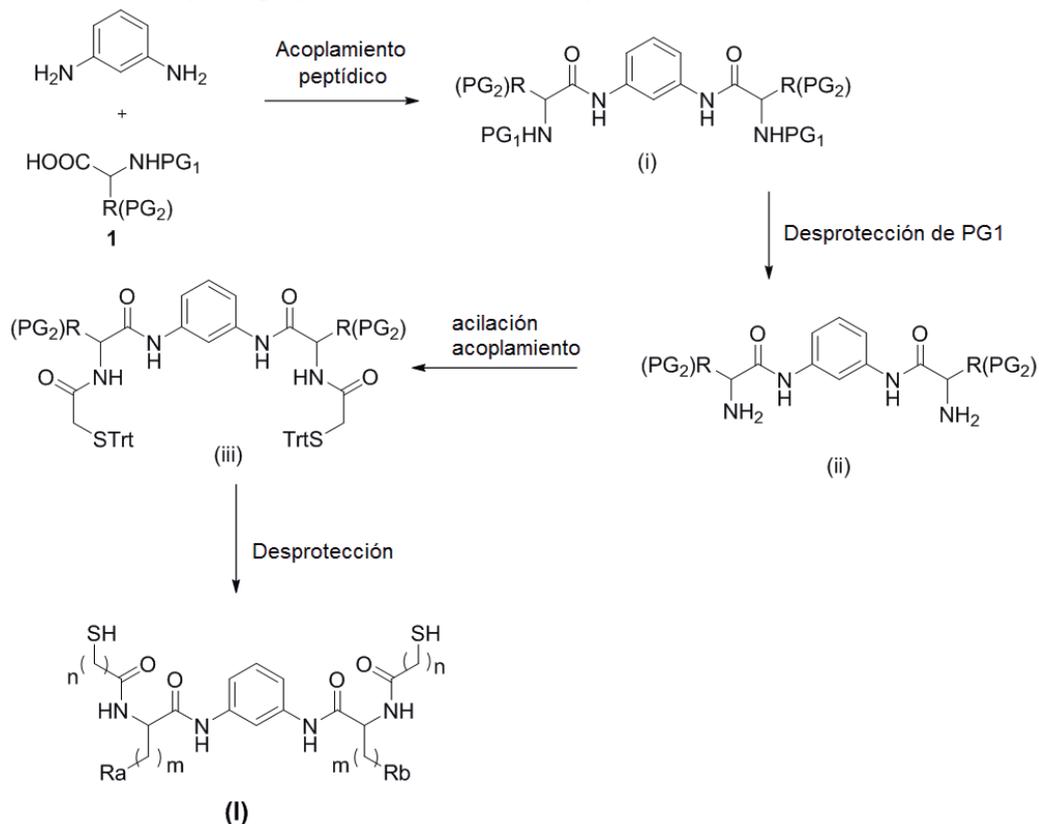
Los compuestos de fórmulas I, II, III se pueden preparar siguiendo diferentes métodos conocidos por cualquier experto en el campo de la síntesis orgánica, particularmente siguiendo los procesos generales que se muestran en los siguientes  
30 esquemas. Los materiales de partida para los métodos preparativos están disponibles comercialmente o se pueden preparar por medio de métodos de la bibliografía.

Compuestos de fórmula I:

35 De acuerdo con el esquema 3, un ácido carboxílico 1, en el que PG representa grupos protectores, tales como Fmoc para la amina, se hace reaccionar con 1,3-diaminobenceno para obtener la diamida (i), usando un agente de acoplamiento tal como, por ejemplo, la combinación de *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC) e 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) en un disolvente apropiado tal como *N,N*-dimetilformamida. Después de la

desprotección del compuesto (i) obtenida en las condiciones básicas apropiadas, tales como piperidina, el compuesto desprotegido (ii) se acila con un ácido con sulfanilo protegido. La reacción se puede llevar a cabo en presencia de un agente de acoplamiento adecuado, por ejemplo 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y HOBt. Finalmente el compuesto resultante (iii) se desprotege para obtener el correspondiente tiol libre (I).

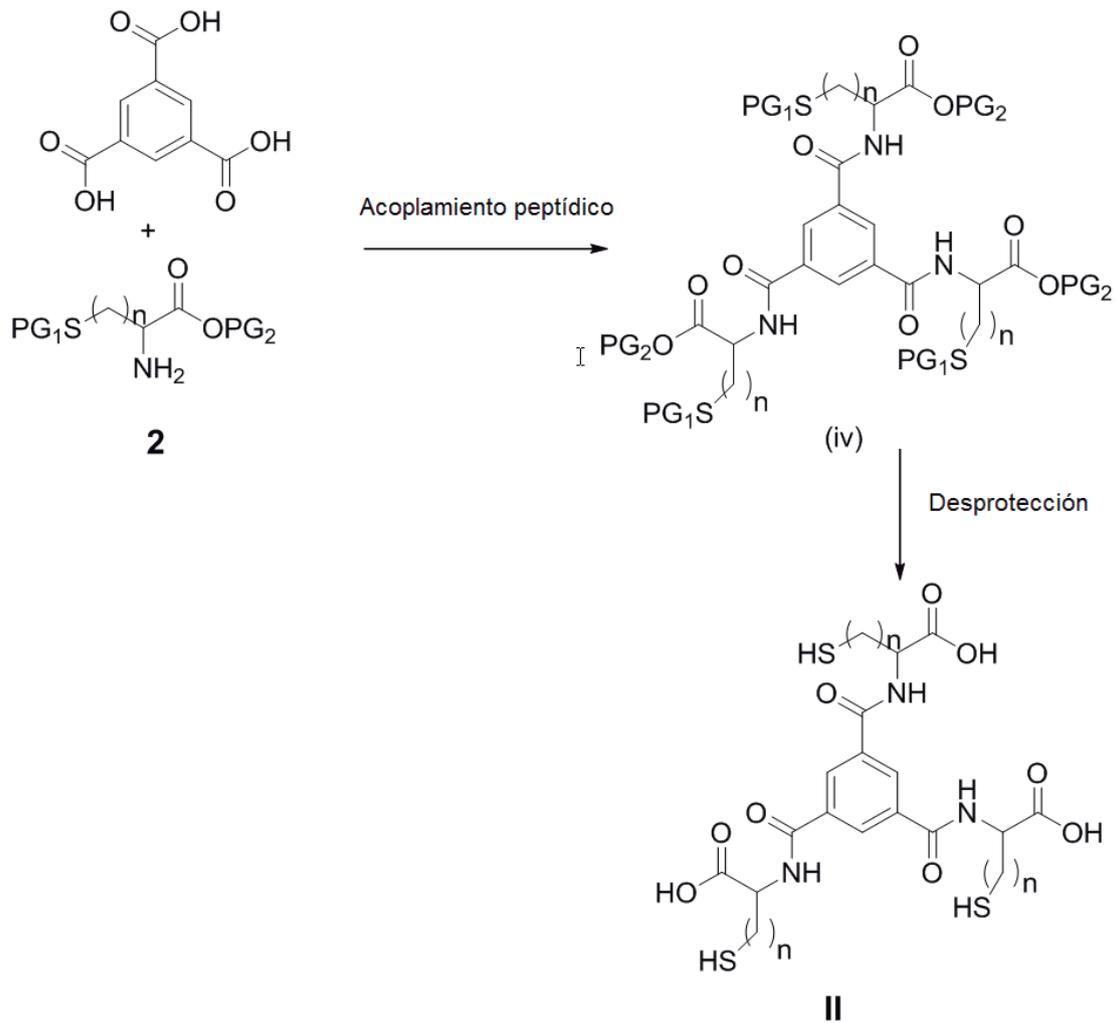
5



Esquema 3

Compuestos de fórmula (II):

De acuerdo con el esquema 4, II se puede sintetizar como se ha descrito  
10 previamente en K. R. West, K. D. Bake y S. Otto, *Org. Lett.*, **2005**, 7, 2615-2618.

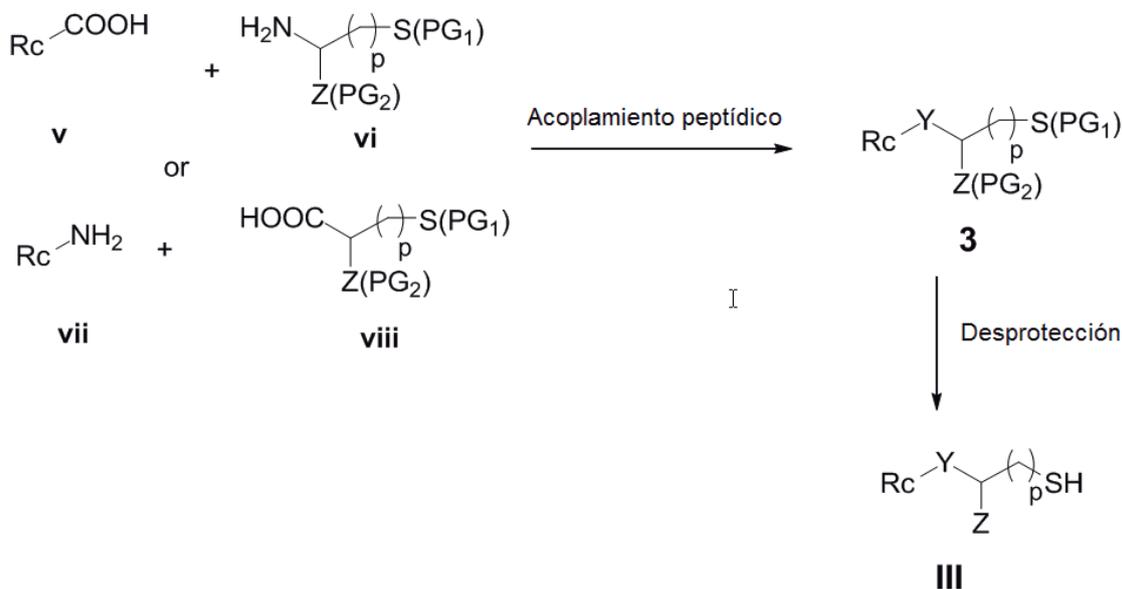


Esquema 4

Compuestos de fórmula (III):

- 5 De acuerdo con el esquema 5, un ácido (v) o una amina (vii) poliaromático se acopla con la amina (vi) o el ácido (viii) con sulfanilo protegido correspondiente, respectivamente, usando un agente de acoplamiento adecuado, tal como EDC y HOBt en condiciones básicas. El compuesto resultante 3 se puede desproteger en condiciones ácidas, tales como, por ejemplo, ácido trifluoroacético.

10



### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

5

**Figura 1:** muestra los espectros de emisión de fluorescencia de la quimioteca dinámica formada por Ia, IIa y IIIa (sensor) (al 25 % en DMSO en tampón bis-tris acuoso a pH 6,5) y en concentraciones crecientes de Cys. [Cys] = sin L-Cys (línea discontinua), 0,025 mM, 0,05 mM, 0,1 mM, 0,25 mM, 0,5 mM, 1 mM, 2,5 mM.

10

**Figura 2:** (A) muestra los espectros de emisión de fluorescencia de la quimioteca formada por Ia, IIa y IIIa solo (línea negra) y en presencia de Cys 0,5 mM ( $\Delta$ ), cistina 0,25 mM ( $\bullet$ ), N-acetil-Cys 0,5 mM ( $\circ$ ) y GSH 0,5 mM ( $\blacktriangle$ ). (B) muestra el gráfico de la proporción excímero/monómero para los diferentes biotioles. (C) y (D) muestra la detección de Cys (0-1,0 mM) y CySS (0-0,5 mM)) respectivamente, en presencia de tres aminoácidos básicos (Lys, Orn y Arg) para las concentraciones de límite superior no patológico que se encuentran en la orina. (E) y (F) muestra, lo mismo que en (C) y (D), pero para concentraciones patológicas en muestras de orina (Lys 5 mM, Orn 1,4 mM y Arg 1,2 mM). [Cys] o [CySS] = sin L-Cys (línea discontinua), 0,05 mM, 0,1 mM, 0,25 mM, 0,5 mM. (G) muestra, lo mismo que en (C) pero en un tampón que contiene (Lys, Orn, Arg, Asn, Gly, Ala, His, Asp,  $\beta$ -Ala, Ser, Tyr y Met). [Cys] = sin L-Cys (línea discontinua), 0,05 mM, 0,1 mM, 0,25 mM, 0,5 mM, 1 mM.

15

20

**Figura 3:** (A) muestra los espectros de fluorescencia normalizados de orina seleccionados (línea discontinua), sensor solo (línea negra continua), sensor + orina ( $\circ$ ) y después de aumentar las concentraciones de Cys añadida (0,25, 0,5, 1 mM (gris) a 2,5 mM

(•). (B) muestra el gráfico de dispersión de la emisión de excímero/monómero de la quimioteca sola (blanco), para diferentes muestras de orina (U) de voluntarios sanos y para las muestras de orina más Cys adicional.

## 5 EJEMPLOS

### 1. SÍNTESIS DE LOS COMPUESTOS DE LA MEZCLA DE MOLÉCULAS DE LA INVENCION

#### 10 A) Compuestos de fórmula (I)

Etapa 1: a una solución de aminoácido protegido **1** (PG1 es Fmoc y PG2 es Boc o tBu) (7,11 mmol) en DMF anhidra (15 ml), se añadieron HOBt (1,25 g, 9,27 mmol) y DCC (2,23 g, 10,8 mmol) en atmósfera de nitrógeno. La mezcla resultante se enfrió a 0 °C y a  
15 continuación se añadió una solución de m-fenilendiamina (334 mg, 3,09 mmol) en DMF anhidra (10 ml) mediante una cánula. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 60 horas, se filtró, y el filtrado se diluyó con DCM, se lavó con NaHCO<sub>3</sub> acuoso saturado y NaCl acuoso saturado, se secó sobre MgSO<sub>4</sub> y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna usando AcOEt/hexano como eluyentes para producir  
20 los compuestos (i).

Etapa 2: los compuestos (i) (0,5 mmol) se disolvieron en 4,0 ml de piperidina al 20 % en DMF anhidra. Se dejó que la mezcla reaccionara durante 4 horas y a continuación se añadió éter dietílico a la mezcla de reacción y el producto se filtró y se lavó con éter dietílico  
25 para obtener los compuestos (ii) que se usaron sin purificación adicional.

Etapa 3: se disolvió ácido tritilsulfanilacético (501 mg, 1,50 mmol) en DMF anhidra (20 ml) y se añadieron EDC·HCl (312 mg, 1,63 mmol), HOBt (228 mg, 1,69 mmol) y DIPEA (1,6 ml, 4,59 mmol) a la solución. La mezcla de reacción se enfrió a 0 °C y se añadió (ii)  
30 (0,715 mmol) a la mezcla. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 48 horas y a continuación se diluyó con DCM, se lavó con NaHCO<sub>3</sub> acuoso saturado y NaCl acuoso saturado, y se secó a presión reducida. El crudo se purificó por cromatografía en columna usando AcOEt/hexano como eluyentes para dar los compuestos (iii).

Etapa 4: a una solución de (iii) (0,16 mmol) en DCM (1,0 ml), se añadieron TFA (8,5 ml), TIS (332 µl, 1,28 mmol) y EDT (160 µl, 1,91 mmol) rápidamente y con agitación. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas, después de lo cual se evaporaron parcialmente los disolventes usando un flujo de N<sub>2</sub>. Se añadió éter dietílico a la

mezcla de reacción y el producto se filtró y se lavó con éter dietílico. El producto se purificó por cromatografía en columna de fase reversa usando una mezcla de MeCN + 0,07 % (v/v) de TFA y H<sub>2</sub>O + 0,1 % (v/v) de TFA como fase móvil. Los compuestos (**I**) se obtuvieron después de liofilización de la fase móvil.

5

**(2S,2'S)-N1,N1'-(1,3-fenilen)bis(2-(2-mercaptoacetamido)succinamida)** (Ia) (Asn): RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 9,97 (s, 2H), 8,34 (d, 2H), 7,93 (t, 1H), 7,36 (s, 2H), 7,29 (dd, 2H), 7,24–7,15 (m, 1H), 6,91 (s, 2H), 4,67 (c, 2H), 3,17 (d, 4H), 2,73 (t, 2H), 2,62–2,41 (m, 4H) ppm. HRMS (ESI+) calc. para C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub>S<sub>2</sub> [M + H]<sup>+</sup> (m/z): 485,1277, encontrado: 485,1279.

10

**(2S,2'S)-N1,N1'-(1,3-fenilen)bis(2-(2-mercaptoacetamido)pentanodiamida)** (Ib) (Gln): RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 10,09 (s, 2H), 8,30 (d, J = 7,7 Hz, 2H), 7,96 (t, 1H), 7,35–7,27 (m, 4H), 7,26–7,20 (m, 1H), 6,77 (s, 2H), 4,39 (td, 2H), 3,25–3,12 (m, 4H), 2,75 (t, 2H), 2,22–2,04 (m, 4H), 1,99–1,88 (m, 2H), 1,88–1,76 (m, 2H) ppm. HRMS (ESI+) calc. para C<sub>20</sub>H<sub>28</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub>S<sub>2</sub> [M + H]<sup>+</sup> (m/z): 513,1590, encontrado: 513,1592.

15

**(2S,2'S)-N,N'-(1,3-fenilen)bis(3-hidroxi-2-(2-mercaptoacetamido)propanamida)** (Ic) Ser: RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, MeOD-d<sub>4</sub>): δ = 7,92 (t, 1H), 7,37–7,30 (m, 2H), 7,29–7,23 (m, 1H), 4,56 (t, 2H), 3,93–3,82 (m, 4H), 3,28 (s, 4H) ppm. HRMS (ESI+) calc. para C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>S<sub>2</sub> [M + H]<sup>+</sup> (m/z): 431,1059, encontrado: 431,1054.

20

**(2S,2'S)-N,N'-(1,3-fenilen)bis(3-hidroxi-2-(2-mercaptoacetamido)butanamida)** (Id) (Thr): RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, MeOD-d<sub>4</sub>): δ = 9,80 (s, 2H), 8,18 (d, 2H), 7,95–7,89 (m, 1H), 7,36–7,30 (m, 2H), 7,29–7,23 (m, 1H), 4,48–4,42 (m, 2H), 4,24 (cd, 2H), 3,35–3,29 (m, 4H), 1,24 (d, 6H) ppm. HRMS (ESI+) calc. para C<sub>18</sub>H<sub>26</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>S<sub>2</sub> [M + H]<sup>+</sup> (m/z): 459,1372, encontrado: 459,1371.

25

**(2S,2'S)-N,N'-(1,3-fenilen)bis(3-(4-hidroxifenil)-2-(2-mercaptoacetamido)propanamida)** (Ie) (Tyr): RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 10,11 (s, 2H), 9,17 (s a, 2H), 8,34 (d, 2H), 7,88 (t, 1H), 7,32–7,25 (m, 2H), 7,25–7,18 (m, 1H), 7,06 (d, 4H), 6,64 (d, 4H), 4,58 (td, 2H), 3,12 (d, 4H), 2,92 (dd, 2H), 2,75 (dd, 2H), 2,63 (t, 2H) ppm. HRMS (ESI+) calc. para C<sub>28</sub>H<sub>30</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>S<sub>2</sub> [M + H]<sup>+</sup> (m/z): 583,1685, encontrado: 583,1696.

30

**(2S,2'S)-N,N'-(1,3-fenilen)bis(3-(1H-indol-3-il)-2-(2-mercaptoacetamido)propanamida)** (If) (Trp): RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 10,82 (d, 2H), 10,17 (s, 2H), 8,37 (d, 2H), 7,93 (s, 1H), 7,64 (d, 2H), 7,35–7,27 (m, 4H), 7,24–7,18 (m, 1H), 7,16 (d, 2H), 7,05 (ddd, 2H), 6,97 (ddd, 2H), 4,72 (td, 2H), 3,23–3,11 (m, 6H), 3,02 (dd,

35

2H), 2,65 (t, 2H) ppm. HRMS (ESI+) calc. para  $C_{32}H_{32}N_6O_4S_2$   $[M + H]^+$  (m/z): 629,2004, encontrado: 629,2003.

5 **(3S,3'S)-4,4'-(1,3-fenilenbis(azanodiil))bis(ácido 3-(2-mercaptoacetamido)-4-oxobutanoico)** (lg) (Asp): RMN  $^1H$  (400 MHz, MeOD- $d_4$ ):  $\delta$  = 7,85 (t, 1H), 7,35–7,29 (m, 2H), 7,28–7,22 (m, 1H), 4,90–4,81 (m, 2H), 3,24 (s, 4H), 2,91 (dd, 2H), 2,78 (dd, 2H) ppm. HRMS (ESI+) calc. para  $C_{18}H_{22}N_4O_8S_2$   $[M + H]^+$  (m/z): 487,0957, encontrado: 487,0956.

10 **(4S,4'S)-5,5'-(1,3-fenilenbis(azanodiil))bis(ácido 4-(2-mercaptoacetamido)-5-oxopentanoico)** (lh) Glu: RMN  $^1H$  (400 MHz, MeOD- $d_4$ ):  $\delta$  = 7,90 (t, 1H), 7,35–7,30 (m, 2H), 7,29–7,23 (m, 1H), 4,53 (dd, 2H), 3,24 (s, 4H), 2,45 (t, 4H), 2,25–2,12 (m, 2H), 2,08–1,96 (m, 2H) ppm. HRMS (ESI+) calc. para  $C_{20}H_{26}N_4O_8S_2$   $[M + H]^+$  (m/z): 515,1270, encontrado: 515,1271.

15 **(2S,2'S)-N,N'-(1,3-fenilen)bis(6-amino-2-(2-mercaptoacetamido)hexanamida)** (li) (Lys): RMN  $^1H$  (400 MHz, MeOD- $d_4$ ):  $\delta$  = 8,01–7,96 (m, 1H), 7,35–7,19 (m, 3H), 4,49 (dd, 2H), 3,24 (s, 4H), 2,93 (t, 4H), 2,01–1,87 (m, 2H), 1,86–1,63 (m, 6H), 1,62–1,39 (m, 4H) ppm. HRMS (ESI+) calc. para  $C_{22}H_{36}N_6O_4S_2$   $[M + H]^+$  (m/z): 513,2318, encontrado: 513,2319.

20 **(2S,2'S)-N,N'-(1,3-fenilen)bis(5-amino-2-(2-mercaptoacetamido)pentanamida)** (lj) (Orn): RMN  $^1H$  (400 MHz, MeOD- $d_4$ ):  $\delta$  = 8,02–7,97 (m, 1H), 7,34–7,18 (m, 3H), 4,54 (dd, 2H), 3,25 (s, 4H), 3,07–2,90 (m, 4H), 2,05–1,89 (m, 2H), 1,88–1,68 (m, 6H) ppm. HRMS (ESI+) calc. para  $C_{20}H_{32}N_6O_4S_2$   $[M + H]^+$  (m/z): 485,2005, encontrado: 485,2007.

25 **(2S,2'S)-N,N'-(1,3-fenilen)bis(5-guanidino-2-(2-mercaptoacetamido)pentanamida)** (lk) Arg: RMN  $^1H$  (400 MHz, MeOD- $d_4$ ):  $\delta$  = 7,99 (s, 1H), 7,33–7,20 (m, 3H), 4,52 (dd, 2H), 3,29–3,11 (m, 8H), 2,00–1,87 (m, 2H), 1,86–1,57 (m, 6H) ppm. HRMS (ESI+) calc. para  $C_{22}H_{36}N_{10}O_4S_2$   $[M + H]^+$  (m/z): 569,2441, encontrado: 30 569,2435.

## B) Compuestos de fórmula (II)

35 Los compuestos de fórmula (II) se pueden sintetizar como se ha descrito previamente en K. R. West, K. D. Bake y S. Otto, *Org. Lett.*, 2005, 7, 2615-2618.

**2,2',2''-(bencenotricarboniltris(azanodiil))tris(ácido 3-mercaptopropanoico)** (IIa)  
RMN  $^1H$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  9,04 (d, 1H), 8,52 (s, 1H), 4,58 (m, 1H) 3,03 (m, 1H), 2,93

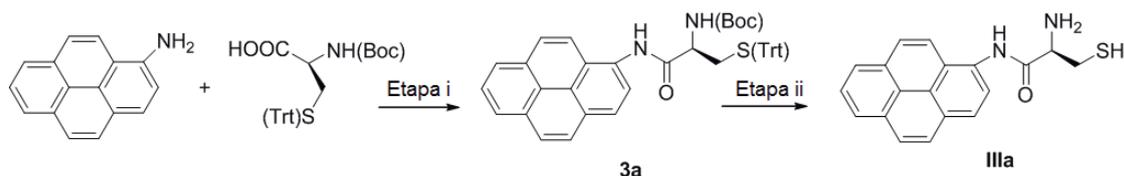
(m, 1H), 2,61 (t, 1H) ppm. HRMS: calc. para  $C_{18}H_{21}N_3O_9S_3$   $[M + H]^+$  520,0518, encontrado 520,0526.

### C) Compuestos de fórmula (III)

5

Los compuestos de fórmula (III) se pueden sintetizar como sigue a continuación:

#### -Síntesis del Compuesto IIIa



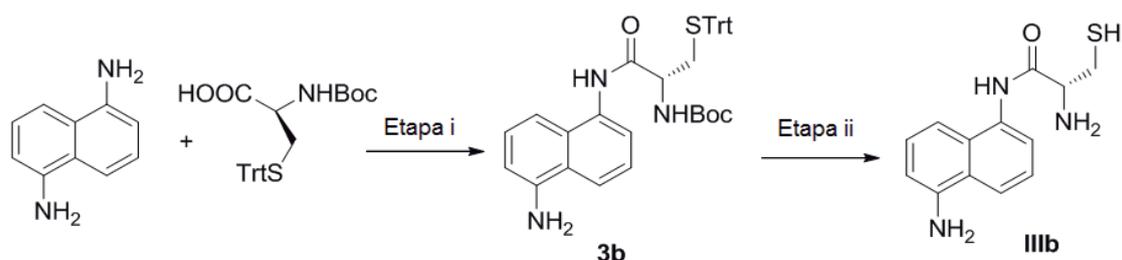
**(R)-2-amino-N-(piren-1-il)-3-(trilitio)propanamida (3a):** se disolvió Boc-Cys(Trt)-OH (2,134 g, 4,60 mmol) en DMF anhidra (6 ml) y a continuación se añadieron HBTU (2,094 g, 5,52 mmol) y HOBt (0,746 g, 5,52 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 2 min y después se añadió 1-aminopireno (200 mg, 0,92 mmol). La solución se agitó a temperatura ambiente en una atmósfera inerte de Ar durante 5 horas (monitorización por TLC). La mezcla se diluyó con DCM, se lavó con  $\text{NaHCO}_3$  acuoso saturado y  $\text{NaCl}$  acuoso saturado, se secó sobre  $\text{MgSO}_4$  y se concentró a presión reducida. El crudo se purificó por cromatografía en columna usando AcOEt/hexano/tolueno como eluyente (de 20/60/20 a 40/40/20) para dar 311 mg (51 % de rendimiento) de **3a** en forma de un sólido de color rosa claro.

RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ -d):  $\delta$  = 8,90 (s, 1H,  $\text{NHCO}^*\text{H}$ ), 8,46 (d, 1H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ), 8,19 – 8,11 (m, 3H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ), 8,09 – 7,96 (m, 4H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ), 8,00 (s, 1H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ), 7,52 (dd, 6H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ), 7,33 (dd, 6H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ), 7,26 (d, 3H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ), 4,98 (d, 1H,  $\text{C}^*\text{H}\text{NHCO}$ ), 4,24 – 4,11 (m, 1H,  $\text{C}^*\text{H}$ ), 2,89 (ddd, 2H,  $\text{C}^*\text{HCH}_2$ ), 1,53 (s, 9H,  $\text{CH}_3$ ) ppm. HRMS (ESI) calc. para  $C_{43}H_{38}N_2O_3S$   $[M - H]^-$  (m/z): 661,2575, encontrado: 661,2525.

**(R)-2-amino-3-mercapto-N-(piren-1-il)propanamida (IIIa):** a una solución de **3a** (280 mg, 0,42 mmol) en DCM (1,5 ml), se añadieron 1 ml de ácido trifluoroacético (TFA), 1,2-etanoditiol (EDT, 0,64 ml, 7,61 mmol) y triisopropilsilano (TIS, 1,30 ml, 6,34 mmol) rápidamente y con agitación. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas, después de lo cual se evaporaron parcialmente los disolventes usando un flujo de  $\text{N}_2$ . Se añadió éter dietílico a la mezcla de reacción y el producto se filtró y se lavó con éter dietílico. El producto se purificó por cromatografía en columna de fase reversa usando una mezcla de MeCN + 0,07 % (v/v) de TFA y  $\text{H}_2\text{O}$  + 0,1 % (v/v) de TFA como fase móvil (gradiente: de un 0 % a un 10 % de MeCN en  $\text{H}_2\text{O}$ ). Después de liofilización, se obtuvieron 75 mg (55 % de rendimiento) de **IIIa**·1TFA en forma de un sólido de color blanco.

RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, MeOH- $d_4$ ):  $\delta$  = 8,29 – 8,17 (m, 6H, H<sub>5</sub>, H<sub>6</sub>, H<sub>8</sub>, H<sub>10</sub>, H<sub>12</sub>, H<sub>13</sub>), 8,11 (c, 2H, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>), 8,05 (t, 1H, H<sub>9</sub>), 4,48 (dd, 1H, C\*HCH<sub>2</sub>), 3,38- 3,24 (dd, 2H, C\*HCH<sub>2</sub>) ppm. HRMS (ESI<sup>+</sup>) calc. para C<sub>19</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>OS [M + H]<sup>+</sup> (m/z): 321,1061, encontrado: 321,1041.

## 5 - Síntesis del Compuesto IIIb



**(R)-(1-((5-aminonaftalen-1-il)amino)-1-oxo-3-(trilitio)propan-2-il)carbamato de terc-butilo (3b).** A una solución de Boc-Cys(Trt)-OH (1 g, 2,15 mmol) en DMF anhidra (10 ml) y EDC·HCl (0,723 g, 3,77 mmol), se añadieron HOBt (0,597 g, 4,42 mmol) y DIPEA (1,32 ml, 9,7 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 2 min y se añadió a la mezcla 1,5-diaminonaftaleno (170 mg, 1,08 mmol). La solución se agitó a temperatura ambiente en una atmósfera inerte de Ar durante 48 horas, y la formación del producto se siguió por TLC. La mezcla se diluyó con DCM, se lavó con NaHCO<sub>3</sub> acuoso saturado y NaCl acuoso saturado, y se secó a presión reducida. El crudo se purificó por cromatografía en columna usando AcOEt/Hexano como eluyente (de un 30 % a un 50 % AcOEt) para dar 356 mg (55 % de rendimiento) de **3b** en forma de un sólido de color rosa oscuro.

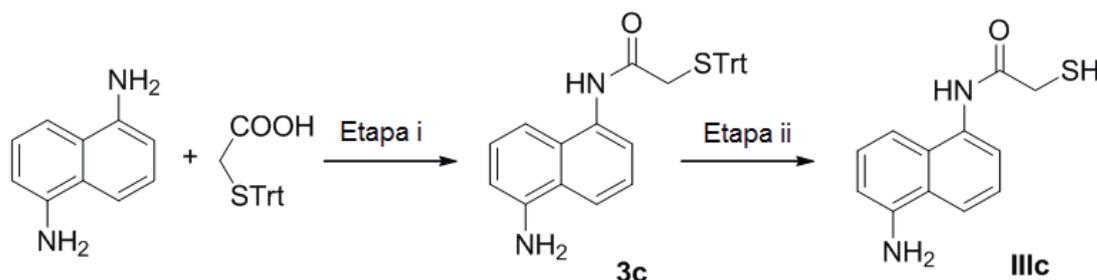
RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>- $d$ ):  $\delta$  = 8,51 (s, 1H, CONH), 7,99 (d, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 7,62 (d,  $J$  = 8,5 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 7,46 (d, 5H), 7,39 (t, 1H), 7,32 – 7,19 (m, 12H, CH<sub>Ar</sub>, CONH), 6,80 – 6,73 (m, 2H, CH<sub>Ar</sub>), 4,90 (d, 1H, C\*HCH<sub>2</sub>), 2,80 (ddd, 2H, CH<sub>2</sub>STrt), 1,46 (s, 9H, CH<sub>3</sub>) ppm. HRMS (ESI<sup>+</sup>) calc. para C<sub>37</sub>H<sub>37</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>S [M + H]<sup>+</sup> (m/z): 604,2634, encontrado: 604,2637.

**(R)-2-amino-N-(5-aminonaftalen-1-il)-3-mercaptopropanamida (IIIb).** A una solución de **3b** (200 mg, 0,191 mmol) en DCM (1 ml), se añadieron 1 ml de ácido trifluoroacético (TFA), 1,2-etanoditiol (EDT, 0,3 ml, 3,44 mmol) y triisopropilsilano (TIS, 0,6 ml, 2,29 mmol) rápidamente y con agitación. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas, después de lo cual se evaporaron parcialmente los disolventes usando un flujo de N<sub>2</sub>. Se añadió éter dietílico a la mezcla de reacción y el producto se filtró y se lavó con éter dietílico. El producto se purificó por cromatografía en columna de fase reversa usando una mezcla de MeCN + 0,07 % (v/v) de TFA y H<sub>2</sub>O + 0,1 % (v/v) de TFA como fase móvil (gradiente: de un 0 % a un 10 % MeCN en H<sub>2</sub>O). Después de liofilización, se obtuvieron 77 mg (83 % de rendimiento) de **IIIb**-2TFA en forma de un sólido de color blanco.

RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, MeOH- $d_4$ ):  $\delta$  = 7,92 (d, 2H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ), 7,75 (d, 1H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ), 7,61 (t, 1H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ), 7,50 (t, 1H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ), 7,36 (d, 1H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ), 4,38 (t, 1H,  $\text{C}^*\text{HCH}_2$ ), 3,30 – 3,12 (dd, 2H,  $\text{CH}_2\text{SH}$ ) ppm. HRMS (ESI $^+$ ) calc. para  $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{OS}$  [ $\text{M} + \text{H}$ ] $^+$  (m/z): 262,1014, encontrado: 262,1001.

5

### -Síntesis del Compuesto IIIc



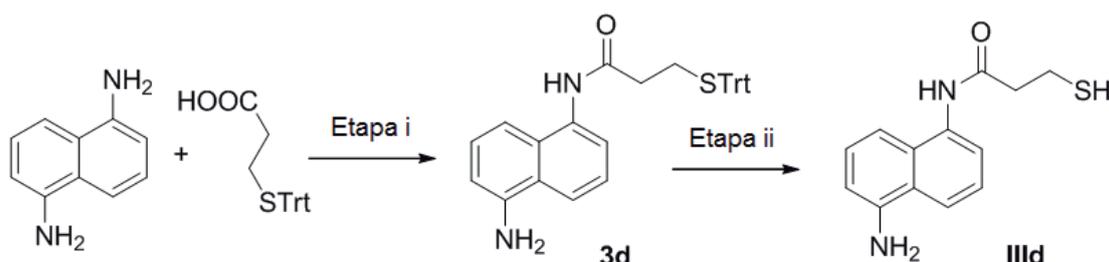
**N-(5-aminonaftalen-1-il)-2-(tritilio)acetamida (3c).** Se disolvió ácido tritilsulfanilacético (500 mg, 1,50 mmol) en DMF anhidra (6 ml) y se añadieron EDC·HCl (383 mg, 2 mmol), HOBt (304 mg, 2,25 mmol) y DIPEA (0,87 ml, 5 mmol) a la solución. La mezcla de reacción se agitó durante 2 min y se añadió a la mezcla 1,5-diaminonaftaleno (158 mg, 1 mmol). La solución se agitó a temperatura ambiente en una atmósfera inerte de Ar durante 48 horas, y la formación del producto se siguió por TLC. La mezcla se diluyó con DCM, se lavó con  $\text{NaHCO}_3$  acuoso saturado y  $\text{NaCl}$  acuoso saturado, y se secó a presión reducida. El crudo se purificó por cromatografía en columna usando AcOEt/Hexano como eluyente (de un 30 % a un 50 % AcOEt) para dar 287 mg (61 % de rendimiento) de **3c** en forma de un sólido de color rosa.

RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ - $d$ ):  $\delta$  = 8,44 (s, 1H,  $\text{CH}_2\text{CONH}$ ), 7,83 (d, 1H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ), 7,61 (d, 1H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ), 7,48 (d, 6H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ), 7,37 (t, 1H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ), 7,30–7,23 (m, 7H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ), 7,18 (t, 3H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ), 7,06 (d, 1H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ), 6,78 (d, 1H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ), 3,46 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{CONH}$ ) ppm. HRMS (ESI $^+$ ) calc. para  $\text{C}_{31}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{OS}$  [ $\text{M} + \text{H}$ ] $^+$  (m/z): 475,1844, encontrado: 475,1815.

**N-(5-aminonaftalen-1-il)-2-mercaptoacetamida (IIIc).** A una solución de **3c** (166 mg, 0,35 mmol) en DCM (1 ml), se añadieron 1 ml de ácido trifluoroacético (TFA), 1,2-etanoditiol (EDT, 0,53 ml, 6,30 mmol) y triisopropilsilano (TIS, 1,07 ml, 5,24 mmol) rápidamente y con agitación. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas, después de lo cual se evaporaron parcialmente los disolventes usando un flujo de  $\text{N}_2$ . Se añadió éter dietílico a la mezcla de reacción y el producto se filtró y se lavó con éter dietílico. El producto se purificó por cromatografía en columna de fase reversa usando una mezcla de MeCN + 0,07 % (v/v) de TFA y  $\text{H}_2\text{O}$  + 0,1 % (v/v) de TFA como fase móvil (gradiente: de un 0 % a un 8 % MeCN en  $\text{H}_2\text{O}$ ). Después de liofilización, se obtuvieron 60 mg (51 % de rendimiento) de IIIc·1TFA en forma de un sólido de color blanco.

RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, MeOH- $d_4$ ):  $\delta$  = 7,96 (d, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 7,88 (d, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 7,74 (d, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 7,63 (t, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 7,53 (t, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 7,41 (d, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 3,48 (s, 2H, CH<sub>2</sub>SH) ppm. HRMS (ESI<sup>+</sup>) calc. para C<sub>12</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>OS [M + H]<sup>+</sup> (m/z): 233,3035, encontrado: 233,3015.

## 5 -Síntesis del Compuesto III d



**N-(5-aminonaftalen-1-il)-3-(tritilio)propanamida (3d).** A una solución de ácido 3-(tritilsulfanyl)propanoico (500 mg, 1,43 mmol) en DMF anhidra (10 ml), se añadieron EDC·HCl (383 mg, 2 mmol), HOBT (304 mg, 2,25 mmol) y DIPEA (0,87 ml, 5 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 2 min y se añadió a la mezcla 1,5-diaminonaftaleno (158 mg, 1 mmol). La solución se agitó a temperatura ambiente en una atmósfera inerte de Ar durante 48 horas, y la formación del producto se siguió por TLC. La mezcla se diluyó con DCM, se lavó con NaHCO<sub>3</sub> acuoso saturado y NaCl acuoso saturado, y se secó a presión reducida. El crudo se purificó por cromatografía en columna usando AcOEt/Hexano como eluyente (de un 30 % a un 50 % AcOEt) para dar 301 mg (62 % de rendimiento) de **3d** en forma de un sólido de color rosa oscuro.

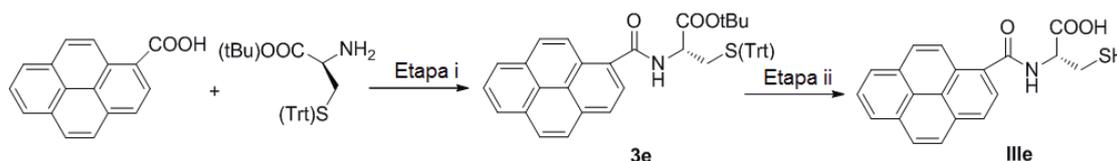
RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 9,70 (s, 1H, CONH), 7,90 (d, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 7,54 (d, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 7,38 – 7,32 (m, 12H, CH<sub>Ar</sub>), 7,30 – 7,17 (m, 6H, CH<sub>Ar</sub>), 6,69 (dd, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 5,73 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 2,56 (t, 2H, COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2,39 (t, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S*Trt*) ppm. HRMS (ESI<sup>+</sup>) calc. para C<sub>32</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>OS [M + H]<sup>+</sup> (m/z): 489,2001, encontrado: 489,2003.

**N-(5-aminonaftalen-1-il)-3-mercapto-propanamida (III d).** A una solución de **3d** (240 mg, 0,49 mmol) en DCM (1 ml), se añadieron 1 ml de ácido trifluoroacético (TFA), 1,2-etanoditiol (EDT, 0,74 ml, 8,84 mmol) y triisobutilsilano (TIS, 1,52 ml, 5,89 mmol) rápidamente y con agitación. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas, después de lo cual se evaporaron parcialmente los disolventes usando un flujo de N<sub>2</sub>. Se añadió éter dietílico a la mezcla de reacción y el producto se filtró y se lavó con éter dietílico. El producto se purificó por cromatografía en columna de fase reversa usando una mezcla de MeCN + 0,07 % (v/v) de TFA y H<sub>2</sub>O + 0,1 % (v/v) de TFA como fase móvil (gradiente: de un 0 % a un 10 % MeCN en H<sub>2</sub>O). Después de liofilización, se obtuvieron 107 mg (61 % de rendimiento) de **III d**·1TFA en forma de un sólido de color blanco.

RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, MeOH- $d_4$ ):  $\delta$  = 8,01 (d, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 7,87 (d, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 7,69 (d, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 7,63 (t, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 7,52 (t, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 7,43 (d, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 3,28 (dt, 2H, COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2,86 (d, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SH) ppm. HRMS (ESI<sup>+</sup>) calc. para C<sub>13</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>OS [M + H]<sup>+</sup> (m/z): 233,3035, encontrado: 233,3015.

5

### - Síntesis del Compuesto IIIe



#### (R)-2-(8,10-dihidropireno-1-carboxamido)-3-(trilitio)propanoato de terc-butilo

**(3e).** A una solución de ácido pirenocarboxílico (250 mg, 1,06 mmol) en DMF anhidra (6 ml) se añadieron EDC·HCl (681 mg, 3,55 mmol), HOBt (562 mg, 4,16 mmol) y DIPEA (1,25 ml, 9,13 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 2 min y a continuación se añadió H-Cys(Trt)-OtBu (468 mg, 1,12 mmol). La solución se agitó a temperatura ambiente en una atmósfera inerte de Ar durante 48 horas, y la formación del producto se siguió por TLC. La mezcla se diluyó con DCM, se lavó con NaHCO<sub>3</sub> acuoso saturado y NaCl acuoso saturado, y se concentró por destilación a presión reducida. El crudo se purificó por cromatografía en columna usando AcOEt/Hexano como eluyente (de un 10 % a un 30 % AcOEt) para dar 470 mg (77 % de rendimiento) de **5e** en forma de un sólido de color amarillo.

RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>- $d$ ):  $\delta$  = 8,72 (d, 1H, CONHC\*H), 8,32 – 8,08 (m, 8H, CH<sub>Ar</sub>), 7,47 (dd, 6H, CH<sub>Ar</sub>), 7,32 – 7,15 (m, 9H, CH<sub>Ar</sub>), 6,64 (d, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 4,98 (dt, 1H, C\*H), 2,96 – 2,81 (m, 2H, C\*HCH<sub>2</sub>), 1,58 (s, 9H, CH<sub>3</sub>) ppm. HRMS (ESI<sup>+</sup>) calc. para C<sub>43</sub>H<sub>37</sub>NO<sub>3</sub>S [M + H]<sup>+</sup> (m/z): 647,8330, encontrado: 647,8310.

**Ácido (R)-2-(8,10-dihidropireno-1-carboxamido)-3-mercaptopropanoico (IIIe).** A una solución de **5e** (215 mg, 0,33 mmol) en DCM (1,5 ml), se añadieron 1 ml de ácido trifluoroacético (TFA), 1,2-etanoditiol (EDT, 0,5 ml, 5,97 mmol) y triisobutilsilano (TIS, 1,30 ml, 4,98 mmol) rápidamente y con agitación. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas, después de lo cual se evaporaron parcialmente los disolventes usando un flujo de N<sub>2</sub>. Se añadió éter dietílico a la mezcla de reacción y el producto se filtró y se lavó con éter dietílico. El producto se purificó por cromatografía en columna de fase reversa usando una mezcla de MeCN + 0,07 % (v/v) de TFA y H<sub>2</sub>O + 0,1 % (v/v) de TFA como fase móvil (gradiente: de un 0 % a un 10 % MeCN en H<sub>2</sub>O). Después de liofilización, se obtuvieron 67 mg (58 % de rendimiento) de **3e** en forma de un sólido de color blanco.

RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 13,04 (s, 1H, OH), 8,99 (d, 1H, CONH), 8,60 (d, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 8,36 (dd, 3H, CH<sub>Ar</sub>), 8,30 – 8,22 (m, 3H, CH<sub>Ar</sub>), 8,19 (d, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 8,13 (t, 1H,

CH<sub>Ar</sub>), 4,71 (td, 1H, C\*H), 3,14 – 2,89 (m, 2H, CH<sub>2</sub>SH), 2,70 (s, 1H, SH) ppm. HRMS (ESI<sup>+</sup>) calc. para C<sub>20</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>3</sub>S [M + H]<sup>+</sup> (m/z): 350,0851, encontrado: 350,0839.

## 2. PROCEDIMIENTO GENERAL PARA LA PREPARACIÓN DE SENSORES DCL Y ANÁLISIS DE FLUORESCENCIA DE LAS DCL

### a) Procedimiento general para la preparación de DCLs:

Se preparó un tampón BIS-TRIS metano 66,7 mM por disolución de 1,39 g de la amina libre en 100 ml de agua mili-Q y ajuste del pH de la solución a 6,5 mediante la adición de HCl (ac.). Se prepararon soluciones stock concentradas individuales en DMSO para los diferentes unidades de construcción (BB). Se prepararon soluciones stock de mezclas que contenían los BB necesarios para la generación de las quimiotecas (I, II y III) a partir de estas soluciones individuales. A continuación se prepararon las mezclas de reacción por dilución de las soluciones stock asegurando que no hubiera ninguna diferencia en la concentración entre las mezclas de reacción del mismo lote.

A menos que se especifique de otro modo, las DCL usadas como sensores se prepararon en las mezclas de reacción a concentraciones finales de 0,1 mM para los BB bi y tripodales (I y II) y 0,05 mM para BB monopodal III, en un tampón acuoso BIS-TRIS metano 50 mM final (pH 6,5) con un 25 % de DMSO.

Las muestras se prepararon por adición de 15 µl de la mezcla stock en DMSO a 45 µl de la solución tamponada 66,7 mM, para un volumen final de 60 µl.

De acuerdo con este procedimiento general, se prepararon los siguientes sensores basados en quimiotecas dinámicas de compuestos por una mezcla de compuestos:

- Ia, IIa, IIIa
- Ia, IIa, IIIb
- Ia, IIa, IIIc
- Ia, IIa, IIId
- Ia, IIa, IIIe

### b) Procedimiento general para el análisis por fluorescencia de las DCL:

Una vez se completó la oxidación de los tioles libres (medida por HPLC o L-MS), las mezclas de reacción se analizaron por espectroscopía de fluorescencia.

Para las DCL realizadas a 0,05 mM de III, las muestras de fluorescencia se

prepararon por dilución de la mezcla de reacción hasta un volumen final de 2060  $\mu\text{l}$  con una solución de un 50 % de tampón acuoso BIS-TRIS 100 mM y un 50 % de DMSO, para alcanzar una concentración teórica final de 1,5  $\mu\text{M}$  para **III**. Se diluyeron mezclas que contenían una concentración diferente de **III** para alcanzar una concentración final de 1,5  $\mu\text{M}$ . Por lo tanto, para los fines de la medición, las muestras se diluyeron 1:34 con  $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$  (1:1 (v:v)) antes de la adquisición de datos. Después de estudiar el efecto del DMSO en el sistema de detección, se descubrió que el uso de una solución tamponada a 50 mM con un 50 % de DMSO para llevar a cabo las mediciones fue óptimo para evitar procesos de precipitación/agregación y la alteración de la señal del excímero.

Después de medir los diferentes espectros de fluorescencia para todas las DCL, se seleccionó la DCL formada por los compuestos **Ia**, **Ia** y **IIIa** para estudios posteriores.

### 3. EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD Y LA SELECTIVIDAD DEL MÉTODO DE LA INVENCION

El compuesto **IIIa** presenta espectros de fluorescencia adecuados de sus formas reducida y oxidada (**[IIIa]<sub>2</sub>**). De ese modo, **[IIIa]<sub>2</sub>** presenta una banda de emisión de excímero a aproximadamente 500 nm que no está presente en el monómero, que se caracteriza por una banda de baja longitud de onda con estructura fina (aproximadamente 350-450 nm). Una quimioteca que contiene **Ia** y **Ia** (0,1 mM cada uno), y **IIIa** (0,05 mM) minimiza la formación del homodímero **[IIIa]<sub>2</sub>** según se lee mediante LC-MS y espectroscopía de fluorescencia, sin casi ninguna emisión de excímero (Figura 1, línea discontinua). Cuando se añade cisteína (**IVa**) al medio de reacción, la banda de excímero aumenta (Figura 1, líneas grises a negras) debido a la formación de **[IIIa]<sub>2</sub>**.

La emisión a 501 nm se detecta después de la adición de una concentración de Cys tan baja como 50  $\mu\text{M}$  y el aumento de la concentración de Cys (**IVa**) da como resultado un aumento de la respuesta de fluorescencia (Figura 2). Esto se puede leer mediante medida proporcional analizando la relación de la emisión del excímero (501 nm) con respecto al monómero (385 nm). De ese modo, teniendo en cuenta esta proporción, la respuesta de la presencia de Cys es de 1,4 (50  $\mu\text{M}$ ) a 3,8 (1 mM) veces el blanco. Considerando que la presencia normal de Cys en orina es  $\sim 35 \mu\text{M}$  y la aparición de cistinuria productora de cálculos comienza desde aproximadamente 0,8 mM, este método se adecúa bien de ese modo a estos valores.

Gracias a la naturaleza dinámica del sistema de detección basado en formación e intercambio de disulfuro, la presencia de cistina (CySS o **IVb**) se comporta de forma similar a

Cys (Figura 2A, • y Δ, respectivamente).

5 Esta capacidad permite que este sensor dinámico detecte cisteína en sus formas reducida u oxidada en medios acuosos sin la necesidad de una etapa de preparación adicional.

### SELECTIVIDAD

#### - Selectividad en presencia de otros tioles tales como GSH o N-acetilcisteína

10 El sistema de la invención, preferiblemente el formado por Ia, IIa y IIIa, no da casi ninguna respuesta a la presencia de otros derivados de cisteína biológicamente pertinentes tales como GSH (Figura 2A, ▲) o N-acetilcisteína (Figura 2A, ○), superando la posible incidencia de falsos positivos.

15 La selectividad para **IVa y IVb** se ilustra en la Figura 2B mediante la representación de la proporción excímero/monómero.

#### - Reactividad cruzada

20 Además, también se sometió a ensayo el comportamiento del sistema sensor dinámico en presencia de los aminoácidos que se pueden encontrar típicamente en la orina, a concentraciones normales o patológicas.

25 Se inició con los aminoácidos básicos (Lys, Orn, Arg), debido a que también muestran valores elevados en pacientes con cistinuria. El sensor dinámico (Ia, IIa y IIIa) es capaz de detectar **IVa y IVb** (Figuras 2C y D) en presencia de estos aminoácidos básicos para concentraciones en el límite superior del esperado en las muestras de orina habituales. De forma más importante, el sensor también proporciona una lectura clara de **IVa** (Cys) en presencia de concentraciones patológicas de estos aminoácidos básicos (Figuras 2E y 2F).

30 Esto destaca la robustez del sensor de red, que es capaz de detectar concentraciones muy inferiores de los tioles analitos en presencia de concentraciones elevadas potencialmente competidoras de aminoácidos básicos.

35 De forma análoga, el sensor respondió de forma muy eficaz a concentraciones muy bajas tanto de Cys como de cistina en un medio extremadamente competitivo que contenía la mayoría de los aminoácidos que se pueden encontrar en la orina (Lys, Orn, Arg, Asn, Gly, Ala, His, Asp, β-Ala, Ser, Tyr, Met) en sus concentraciones fisiológicas (Figura 2G).

#### 4. MEDICIÓN DE LOS NIVELES DE CISTINA EN MUESTRAS DE ORINA

Una vez evaluadas la sensibilidad y la selectividad del método, se sometió a ensayo el sistema de detección dinámico en muestras reales de orina de voluntarios sanos.

5

##### Procedimiento general para la preparación de las DCL en orina humana:

Se preparó tampón BIS-TRIS metano 300 mM como se ha explicado anteriormente.

Se prepararon soluciones stock individuales de los unidades de construcción (BB) **Ia**, **Ila y Ila** en DMSO. Las DCL se prepararon en las mezclas de reacción a concentraciones finales de 0,1 mM para **Ia** y **Ila** y 0,05 mM de **Ila** en una solución de orina de tampón acuoso BIS-TRIS metano 50 mM final (pH 6,5) con un 25 % de DMSO.

Las muestras se prepararon por adición de 15 µl de la mezcla stock a 45 µl de la solución de orina tamponada 300 mM (que contenía 35 µl de muestra de orina y 10 µl de solución tamponada 300 mM), para un volumen final de 60 µl. Se realizaron adiciones al sistema de diferentes concentraciones de Cys (**Iva**).

##### Procedimiento general para el análisis de fluorescencia de las DCL:

20

Una vez se completó la oxidación de los tioles libres, cada mezcla de reacción se analizó por espectroscopía de fluorescencia.

Las muestras de fluorescencia se prepararon por dilución de la mezcla de reacción hasta un volumen final de 2060 µl con una solución de un 50 % de tampón acuoso BIS-TRIS 100 mM y un 50 % de DMSO, para alcanzar una concentración teórica final de 1,5 µM para **Ila**. Por lo tanto, para los fines de la medición, las muestras se diluyeron 1:34 con H<sub>2</sub>O/DMSO 1:1 (v:v) antes de la adquisición de datos.

Se sometieron a ensayo once muestras de voluntarios diferentes, y también se sometieron a ensayo tres medidas adicionales de la combinación de dos muestras para evitar respuesta cruzada (Tabla 1). Se midieron los espectros de fluorescencia de la orina sin el sensor añadido para confirmar que no interfiriera ningún otro metabolito de este fluido con el análisis. También se midió la respuesta positiva del sensor a la cisteína excretada de forma natural.

35

Número de la muestra	Edad del voluntario	Género
1	29	F
2	24	F
3	34	F
4	38	F
5	29	F
6	30	M
7	23	M
8	62	F
9	65	M
10	34	F
11	27	F
12 (1 + 6)	29 + 30	F + M
13 (2 + 7)	24 + 23	F + M
14 (8 + 9)	62 + 65	F + M

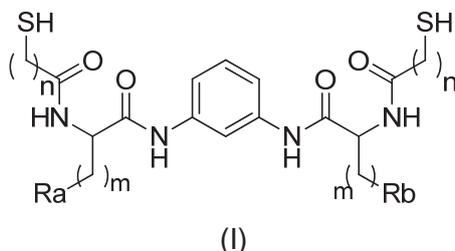
**Tabla 1:** muestras de orina reales seleccionadas entre voluntarios sanos usadas para someter a ensayo el sistema de detección descrito.

Se llevaron a cabo los espectros de fluorescencia de la orina sin el sensor añadido para confirmar que no interfiriera ningún otro metabolito de este fluido con el análisis (Figura 3A, línea discontinua). También se midió la respuesta positiva del sensor a la cisteína excretada de forma natural en las muestras de orina (línea negra continua con círculos vacíos de la Figura 3A y muestras U de la Figura 3B). Además, la adición de cisteína (IVa) en la muestra produjo el aumento de la banda a 501 nm, con un intervalo de detección que va desde la Cys que aparece normalmente en la orina (U en la Figura 3B) a concentraciones patológicas (U + 1,0, 2,5 mM, gris). De ese modo, se podrían detectar concentraciones anómalas de cisteína que aún no producirían cálculos (U + 0,25, 0,5 mM, negro).

**REIVINDICACIONES**

1. Una mezcla de moléculas que comprende al menos un compuesto que se define mediante la fórmula (I):

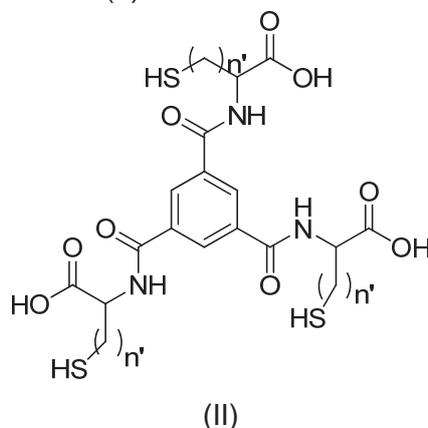
5



o un isómero o una sal del mismo, donde:

- 10 Ra y Rb se seleccionan independientemente entre H, -CONRR', -COOR, -NRR', -OH, -C(NH)NH<sub>2</sub>, -CH(OH)CH<sub>3</sub>, arilo (C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>) o heteroarilo (C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>);  
 R y R' se seleccionan independientemente entre H o alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>);  
 m es un número entero seleccionado entre 0, 1, 2, 3 o 4;  
 n es un número entero seleccionado entre 1 o 2;  
 y al menos un compuesto de fórmula (II):

15

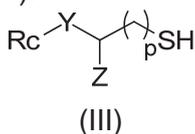


o un isómero o una sal del mismo, donde:

n' es un número entero seleccionado entre 1 o 2;

y al menos un compuesto de fórmula (III):

20



o un isómero o una sal del mismo, donde:

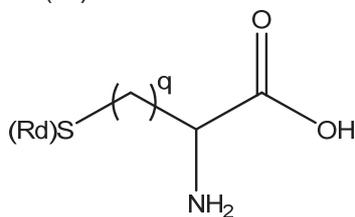
Rc representa un cromóforo aromático;

Y se selecciona entre NHCO o CONH;

25 Z se selecciona entre H, -NH<sub>2</sub>, -OH o -COOH;

p es un número entero seleccionado entre 0, 1, 2 o 3.

2. La mezcla de moléculas de acuerdo con la reivindicación 1, que también comprende al menos un compuesto de fórmula (IV):



(IV)

o un isómero o una sal del mismo, donde:

5 Rd se selecciona entre H o S(CH<sub>2</sub>)<sub>q</sub>CH(NH<sub>2</sub>)COOH;  
q es un número entero seleccionado entre 1, 2 o 3.

3. La mezcla de moléculas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, donde m es 1 y n es 1.

10

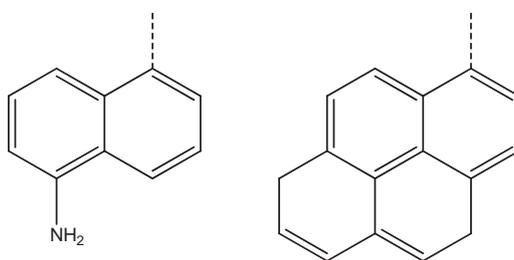
4. La mezcla de moléculas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde Ra es CONH<sub>2</sub>.

5. La mezcla de moléculas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde Rb es CONH<sub>2</sub>.

15

6. La mezcla de moléculas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde n' es 1.

20 7. La mezcla de moléculas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde Rc se selecciona entre los siguientes cromóforos:



8. La mezcla de moléculas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde Y es -NHCO.

25

9. La mezcla de moléculas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde Z es -NH<sub>2</sub>.

10. La mezcla de moléculas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde p es 1.
- 5 11. La mezcla de moléculas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde Rd es H.
12. La mezcla de moléculas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde q es 1.
- 10 13. Una quimioteca combinatoria dinámica que comprende la mezcla de moléculas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.
14. Un método *in vitro* para la detección de un compuesto de fórmula (IV) de acuerdo  
15 con la reivindicación 2 en una muestra que comprende las siguientes etapas:  
a) mezclar al menos un compuesto de fórmula (I) con al menos un compuesto de  
fórmula (II) y al menos un compuesto de fórmula (III) de acuerdo con la reivindicación  
1;  
b) poner en contacto la muestra que comprende el compuesto de fórmula (IV) con la  
20 mezcla de la etapa (a);  
c) medir la emisión de fluorescencia de la mezcla obtenida en la etapa (b);  
d) detectar una desviación significativa de un patrón y  
e) asignar la muestra al grupo de muestras que comprende un compuesto de fórmula  
(IV) cuando se haya detectado una diferencia significativa en la etapa (d).
- 25 15. El método de acuerdo con la reivindicación 14, en el que la molécula de fórmula (IV)  
se selecciona entre cisteína o cistina.
16. Un kit para la detección de un compuesto de fórmula (IV) de acuerdo con la  
30 reivindicación 2 en una muestra, que comprende una mezcla de los compuestos de fórmulas  
(I), (II) y (III) que se describen en la reivindicación 1.

FIG. 1

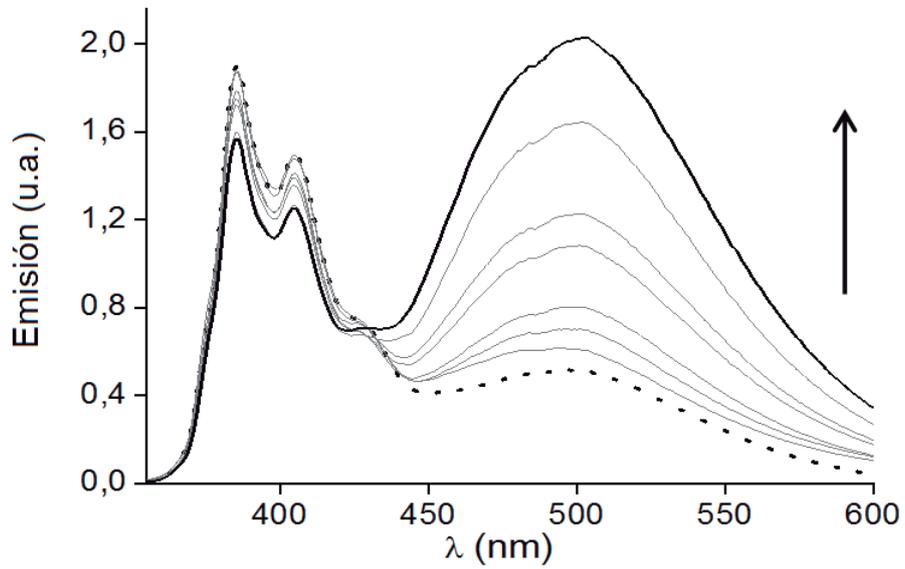


FIG. 2

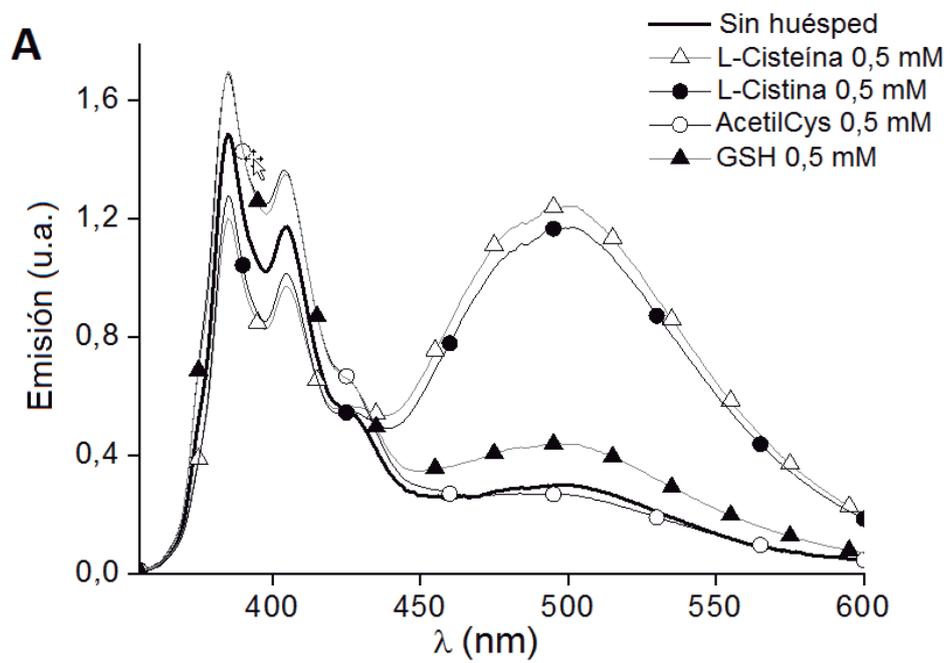


FIG. 2 cont.

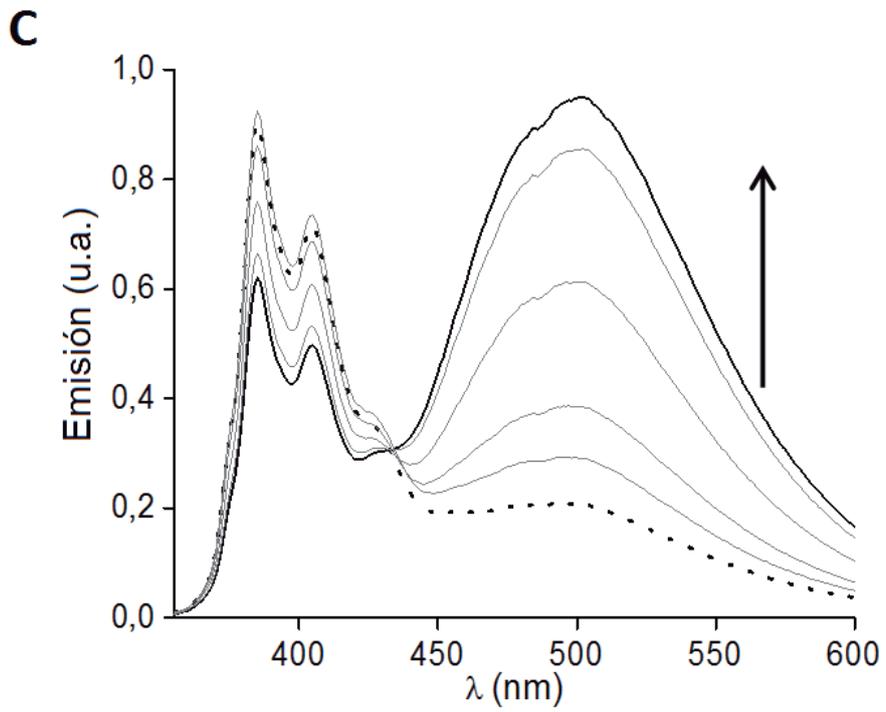
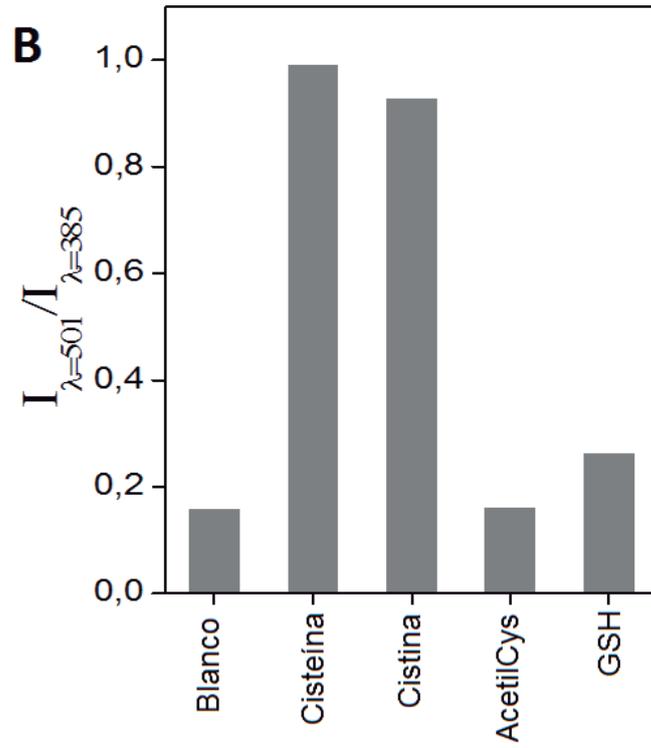


FIG. 2 cont.

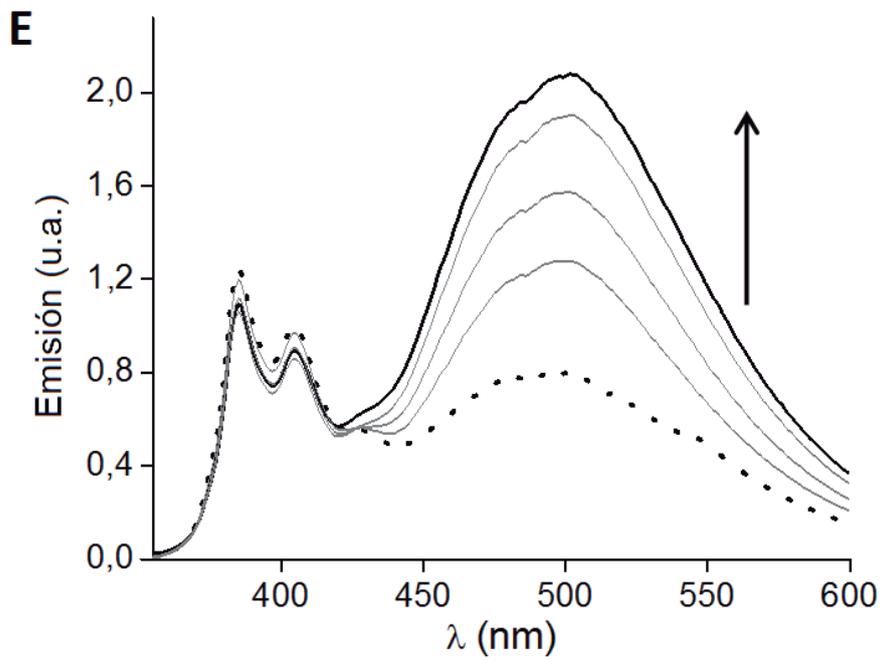
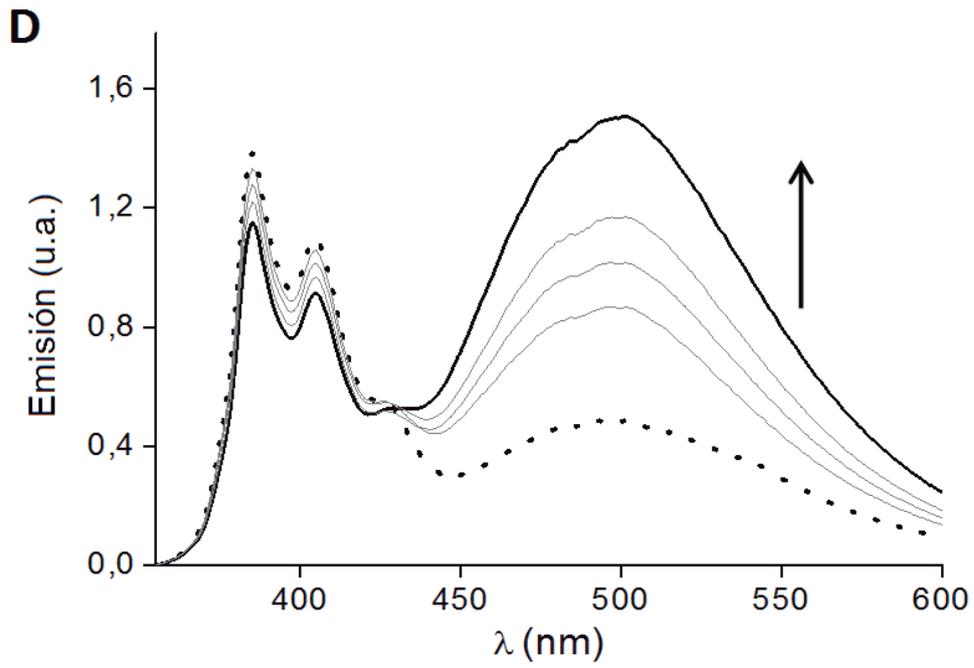


FIG. 2 cont.

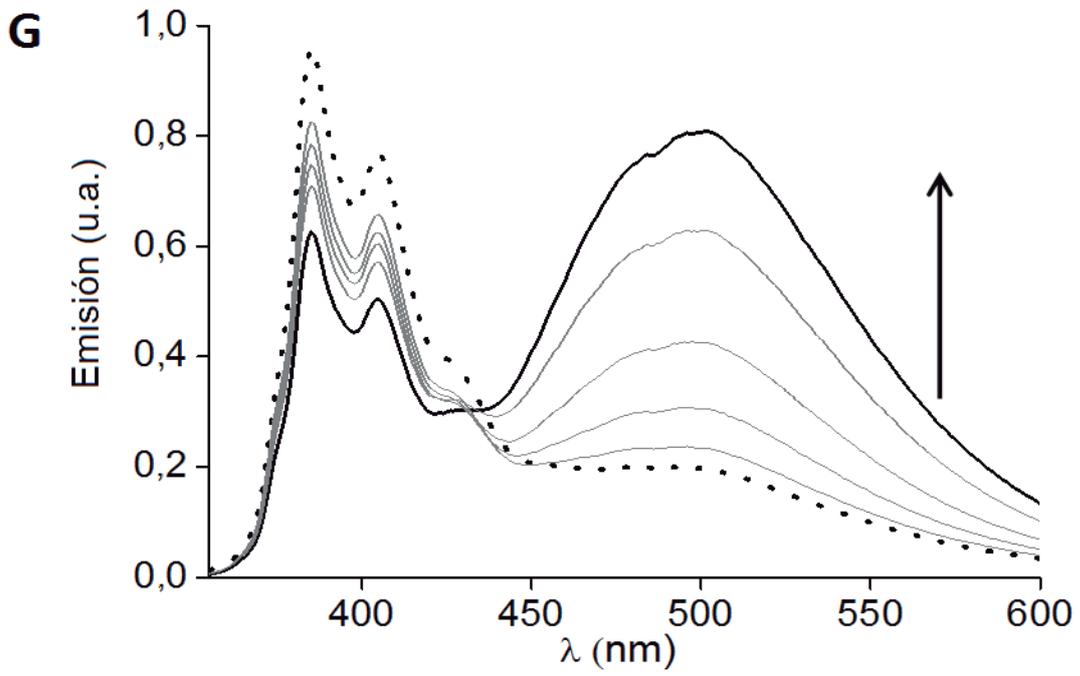
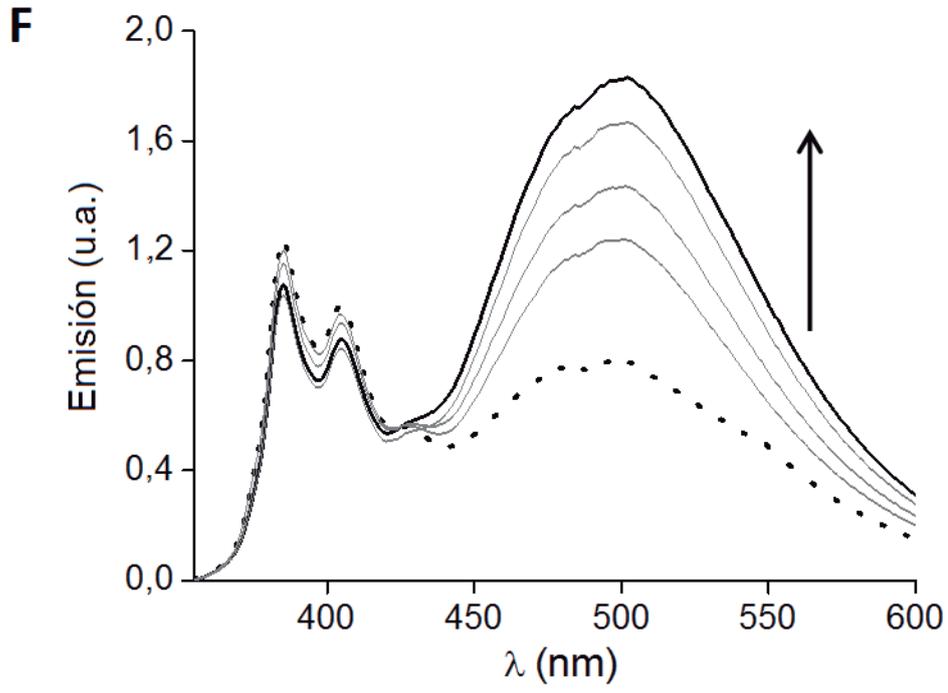
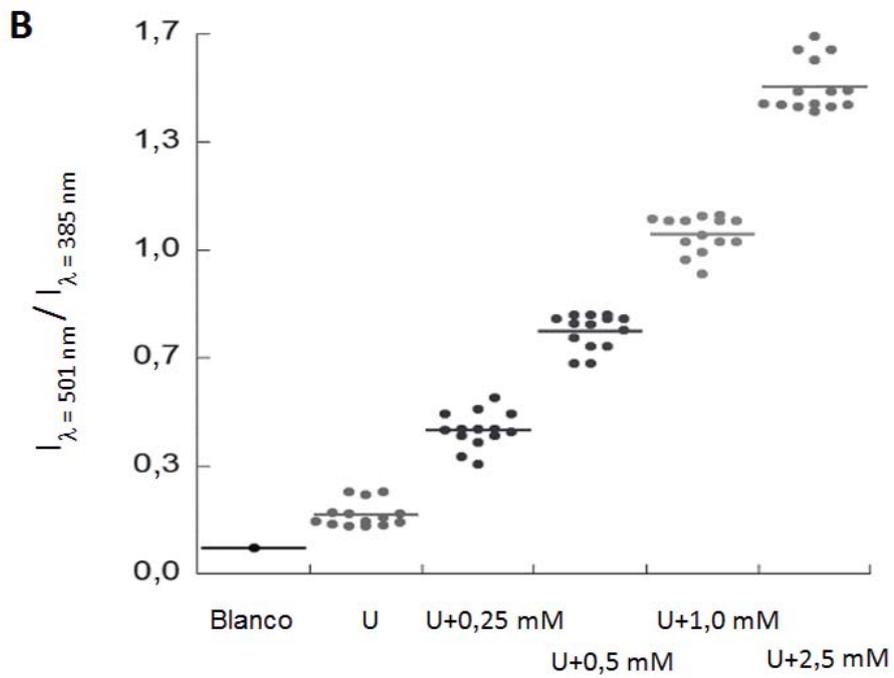
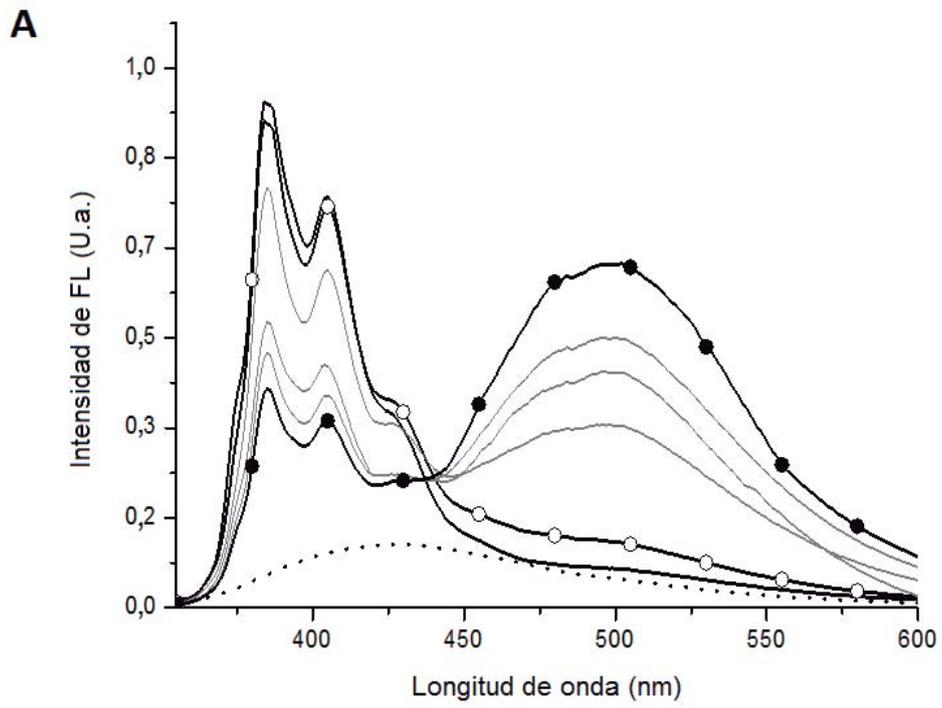


FIG. 3





OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201830330

②② Fecha de presentación de la solicitud: 04.04.2018

③② Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C07C321/06** (2006.01)  
**G01N33/493** (2006.01)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	SOLÁ, JORDI et al. "Constitutional self-selection from dynamic combinatorial libraries in aqueous solution through supramolecular interactions". Chemical Communications (Cambridge, England) England 07 May 2014. , 07/05/2014, Vol. 50, Páginas 4564 - 4566, ISSN 1364-548X (Electronic), <DOI: doi:10.1039/c4cc00245h pubmed:24647648>. Ver esquema 1; página 4564, columna 1, párrafo 1 y columna 2, párrafo 3.	1-16
A	LAFUENTE, MARIA et al. "Adaptive Correction from Virtually Complex Dynamic Libraries: The Role of Noncovalent Interactions in Structural Selection and Folding". Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany) Germany 16 Nov 2015. , 16/11/2015, Vol. 21, Páginas 17002 - 17009, ISSN 1521-3765 (Electronic), <DOI: doi:10.1002/chem.201501415 pubmed:26447975>. Ver resumen; resultados y discusión; figura 1.	1-16

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
05.12.2018

Examinador  
N. Martín Laso

Página  
1/2

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07C, G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, TXT-DB, NPL, XPESP, BIOSIS, CAS.