

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(10) Número de publicación internacional

WO 2021/152199 A1

(43) Fecha de publicación internacional
05 de agosto de 2021 (05.08.2021)

WIPO | PCT

(51) Clasificación internacional de patentes:

C07D 215/24 (2006.01) G01N 33/52 (2006.01)
G01N 21/64 (2006.01)

(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(21) Número de la solicitud internacional:

PCT/ES2021/070062

(22) Fecha de presentación internacional:

27 de enero de 2021 (27.01.2021)

(25) Idioma de presentación:

español

Publicada:

— con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))

(26) Idioma de publicación:

español

(30) Datos relativos a la prioridad:

P202030074 31 de enero de 2020 (31.01.2020) ES

(71) Solicitantes: CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC) [ES/ES]; C/ Serrano, nº

117, 28006 Madrid (ES). UNIVERSIDAD DE GRANADA [ES/ES]; Complejo Administrativo, Triunfo. Avda. del Hospicio s/n, 18071 Granada (ES).

(72) Inventores: HERRANZ HERRANZ, María del Rosario;

INSTITUTO DE QUÍMICA MÉDICA, C/ JUAN DE LA CIERVA, 3, 28006 Madrid (ES). FUEYO GONZÁLEZ, Francisco José; INSTITUTO DE QUÍMICA MÉDICA, C/ JUAN DE LA CIERVA, 3, 28006 Madrid (ES). GONZÁLEZ VERA, Juan Antonio; Universidad de Granada, Complejo Administrativo, Triunfo. Avda. del Hospicio s/n, 18071 Granada (ES).

(74) Mandatario: PONS ARIÑO, Angel; Glorieta Rubén Darío

4, 28010 Madrid (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,

para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,

para toda clase de protección regional admisible): ARIPO

(54) Title: HALOACETAMIDES DERIVED FROM LANTHANIDE ANTENNAS AND USE THEREOF AS REAGENTS FOR LABELLING LANTHANIDE LUMINESCENCE

(54) Título: HALOACETAMIDAS DERIVADAS DE ANTENAS DE LANTÁNIDOS Y SU APLICACIÓN COMO REACTIVOS DE MARCAJE DE LA LUMINISCENCIA DE LANTÁNIDOS

(57) Abstract: The present invention relates to haloacetamides derived from quinolin-2(IH)-ones having formula (I), which sensitise lanthanide luminescence, and to the use thereof as reagents for labelling lanthanide luminescence in different biomolecules, including in peptides and proteins.

(57) Resumen: La presente invención se refiere a haloacetamidas derivadas de quinolin-2(IH)-onas de fórmula (I), que sensibilizan la luminiscencia de lantánidos, y su aplicación como reactivos de marcaje de la luminiscencia de lantánidos en diversas biomoléculas, entre otras, en péptidos y proteínas.



WO 2021/152199 A1

DESCRIPCIÓN

HALOACETAMIDAS DERIVADAS DE ANTENAS DE LANTÁNIDOS Y SU APLICACIÓN COMO REACTIVOS DE MARCAJE DE LA LUMINISCENCIA DE 5 LANTÁNIDOS

La presente invención se refiere a haloacetamidas derivadas de quinolin-2(1*H*)-onas de fórmula (I), que sensibilizan la luminiscencia de lantánidos, y su aplicación como reactivos de marcaje de la luminiscencia de lantánidos en diversas biomoléculas, entre
10 otras, en péptidos y proteínas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El conocimiento de la estructura y funciones de células, órganos y organismos vivos
15 constituye un reto constante en la biología y la medicina modernas, que requiere el desarrollo de técnicas analíticas y de visualización ingeniosas e innovadoras y de biosensores apropiados. Entre estos, los biosensores ópticos ocupan un lugar destacado por su rapidez de respuesta, su sensibilidad y la posibilidad de detección simultánea de varios analitos. Dentro de este grupo, en los últimos años, los biosensores
20 luminiscentes se encuentran entre los más utilizados, por su alta selectividad, sensibilidad y versatilidad, pudiéndose utilizar incluso en aplicaciones in vivo con alta resolución espacial y temporal (Morris, M. C. ACS Med Chem Lett. 2014, 5, 99). Esta técnica implica la excitación de las biomoléculas, mediante irradiación con luz UV/visible, seguida de relajación a su estado fundamental, mediante emisión de gran parte de la
25 energía absorbida en forma de luz.

En los últimos años los sensores o sondas basados en la luminiscencia de lantánidos están emergiendo como potentes herramientas en los campos de la Biología Molecular, la Bioquímica y la Biomedicina, debido a las ventajas que presenta su uso frente a los
30 fluoróforos orgánicos y las proteínas fluorescentes, entre las que destacan: a) Largos tiempos de vida de luminiscencia (μs - ms), que posibilitan la fluorimetría en tiempo resuelto, donde se aplica un retraso entre el pulso de excitación y la ventana de detección, eliminando las interferencias por la autofluorescencia de los medios biológicos y aumentando sensiblemente la relación señal-ruido y, por tanto, la
35 sensibilidad; b) Bandas de emisión muy finas que no solapan, permitiendo el uso simultáneo de sondas de diferentes lantánidos para detectar cuantitativamente distintos

analitos sin interferencia cruzada (detección multicanal). c) Grandes desplazamientos de Stokes entre las longitudes de onda de excitación y las de emisión, evitando los problemas de auto-absorción dependiente de la concentración (Heffern, M. C. et al. Chem. Rev. 2014, 114, 4496). Las bandas de absorción y emisión de los cationes lantánidos corresponden a transiciones electrónicas entre los orbitales 4f que son prohibidas. Por ello, presentan bajos coeficientes de absorción, lo que dificulta su excitación. Este problema se evita aprovechando la posibilidad de excitación indirecta mediante transferencia de energía desde cromóforos orgánicos con alto coeficiente de absorción molar. Este proceso se conoce como sensibilización o efecto antena y al cromóforo se le denomina "antena". Heffern, M. C. et al. Chem. Rev. 2014, 114, 4496).

A pesar de las excepcionales propiedades fotofísicas de las antenas de lantánidos, actualmente, se dispone de un número muy limitado de compuestos de este tipo para el estudio de sistemas biológicos y su aplicación resulta limitada debido a la falta de herramientas que permitan el marcaje de biomoléculas (ej: péptidos y proteínas) o nanopartículas de una forma eficaz y sencilla (Sy, M. Chem. Commun. 2016, 52, 5080). El marcaje luminiscente de material biológico con antenas de lantánidos requiere la introducción de una funcionalidad reactiva en la antena para su unión covalente de forma específica al material o diana de interés, generalmente, a través de grupos nucleófilos amino o tioles (Sy, M. Chem. Commun. 2016, 52, 5080; Hagan, A. K. Anal. Bioanal. Chem. 2011, 400, 2847). Para el marcaje en grupos amino se han utilizado isocianatos, ésteres de N-hidroxisuccinimida o cloruros de ácidos sulfónicos, mientras que, para el marcaje en grupos tioles se han utilizado los grupos maleimida, haloacetamida, ditiopiridina o metanosulfonato (Sy, M. Chem. Commun. 2016, 52, 5080). Estos grupos se unen a través de un espaciador a la antena. Esta funcionalización requiere el diseño y manipulación química apropiada de la antena, que, no debe afectar significativamente a las propiedades fotofísicas de la antena. La utilización de estos reactivos generalmente requiere el lavado de la muestra marcada para eliminar el exceso de reactivo de marcaje y evitar su interferencia en el análisis fotofísico de la muestra.

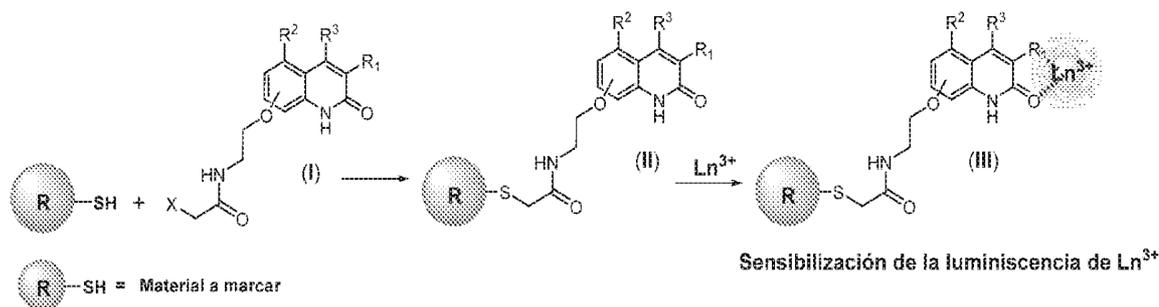
La presente invención surgió dentro de un amplio proyecto de investigación para el diseño y síntesis de nuevos fluoróforos con aplicación en el desarrollo de biosensores de fluorescencia, en el que se descubrió una nueva familia de antenas de lantánidos. Dado el alto interés de estas antenas como herramientas para el desarrollo de diversos biosensores luminiscentes, se prepararon haloacetamidas derivadas de dichas antenas

que son el objetivo de la presente invención, así como su aplicación para el marcaje luminiscente de biomoléculas, tales como péptidos y proteínas. El agrupamiento haloacetamida es uno de los grupos reactivos más utilizados para el anclaje de sondas fluorescentes a biomoléculas, que se conoce como marcaje fluorescente (Corrie, J. E. T. et al. J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 1994, 2975; Loving, G. et al. Bioconjug. Chem. 2009, 20, 2133; Ge, P. et al. Bioconjug. Chem. 2003, 14, 870).

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Los inventores han diseñado y sintetizado haloacetamidas derivadas de quinolin-2(1H)-onas de fórmula general (I) capaces de sensibilizar la luminiscencia de cationes lantánidos y con aplicación en el marcaje luminiscente de diversas biomoléculas y, por ello, en el desarrollo de biosensores luminiscentes, tal y como muestra el siguiente esquema donde R^1 , R^2 , R^3 y X se definen más adelante:

15



Entre las ventajas que presenta la presente invención destacar que:

- a) Las biomoléculas marcadas con los compuestos de fórmula (I) sensibilizan de forma eficiente la emisión de luminiscencia de cationes lantánidos, preferentemente la de Eu^{3+} , que emite en el rojo, y la del Tb^{3+} , que emite en el verde.
- b) Grandes desplazamientos de Stokes entre la longitud de onda de absorción de la antena (≈ 300 nm) y las longitudes de onda de emisión de los lantánidos, que evitan problemas de autoabsorción.
- c) Largos tiempos de vida de luminiscencia de los lantánidos (μs -ms), que posibilitan la fluorimetría en tiempo resuelto, donde se aplica un retraso entre el pulso de excitación y la ventana de detección, eliminando las interferencias por la autofluorescencia de

donde m se selecciona de entre 2, 3 y 4; y Ln³⁺ es un lantánido, que se selecciona de entre La³⁺, Ce³⁺, Pr³⁺, Nd³⁺, Pm³⁺, Sm³⁺, Eu³⁺, Gd³⁺, Tb³⁺, Dy³⁺, Ho³⁺, Er³⁺, Tm³⁺, Yb³⁺, y Lu³⁺.

5 En una realización preferida X es Br.

En otra realización preferida R² es H.

En otra realización preferida R³ es metilo.

10

En otra realización preferida R² y R³ forman un puente -CH₂-CH₂-.

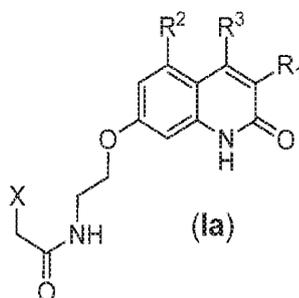
En otra realización preferida R¹ es -CO₂H.

15 En otra realización preferida R¹ es -CONHR⁵ siendo R⁵ un grupo de estructura (A), donde m se selecciona de entre 2, 3 y 4; y más preferiblemente m es 2.

En otra realización preferida R¹ es -CONHR⁵ siendo R⁵ un grupo de estructura (A'), donde m se selecciona de entre 2, 3 y 4 y Ln³⁺ se selecciona de entre La³⁺, Ce³⁺, Eu³⁺,

20 y Tb³⁺; más preferiblemente m es 2 y Ln³⁺ es La³⁺, Eu³⁺, o Tb³⁺.

En otra realización preferida el compuesto de la invención tiene una estructura de fórmula general (Ia):



25

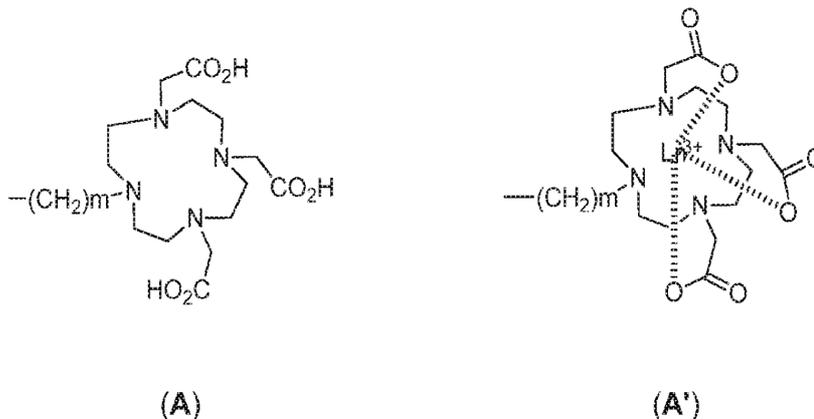
o cualquiera de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables, donde

X es un halógeno que se selecciona de entre Cl, Br y I;

R² y R³ se seleccionan independientemente de entre H, alquilo(C₁-C₆) opcionalmente sustituido; y

30 R¹ se selecciona de entre -CO₂H, -PO₃H₂, -SO₃H, -SO₂NH₂, -CONHR⁵, -PO(OH)NHR⁵, -PO(NHR⁵)₂ y -SO₂NHR⁵, siendo R⁵ seleccionado de entre alquilo(C₁-C₆), la estructura

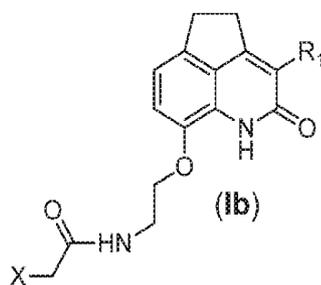
(A) y la estructura (A'):



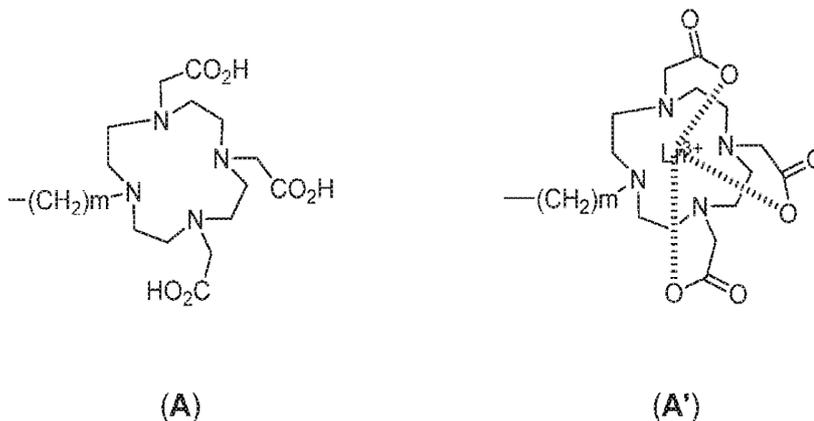
donde m se selecciona de entre 2, 3 y 4; y Ln³⁺ es un lantánido, que se selecciona de entre La³⁺, Ce³⁺, Pr³⁺, Nd³⁺, Pm³⁺, Sm³⁺, Eu³⁺, Gd³⁺, Tb³⁺, Dy³⁺, Ho³⁺, Er³⁺, Tm³⁺, Yb³⁺, y Lu³⁺.

5

En otra realización preferida, el compuesto de la invención tiene una estructura de fórmula general (Ib):



o cualquiera de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables, donde X es un halógeno que se selecciona de entre Cl, Br y I; y R¹ se selecciona de entre -CO₂H, -PO₃H₂, -SO₃H, -SO₂NH₂, -CONHR⁵, -PO(OH)NHR⁵, -PO(NHR⁵)₂ y -SO₂NHR⁵, siendo R⁵ seleccionado de entre alquilo(C₁-C₆), la estructura (A) y la estructura (A'):



15

donde m se selecciona de entre 2, 3 y 4; y Ln³⁺ es un lantánido, que se selecciona de

entre La^{3+} , Ce^{3+} , Pr^{3+} , Nd^{3+} , Pm^{3+} , Sm^{3+} , Eu^{3+} , Gd^{3+} , Tb^{3+} , Dy^{3+} , Ho^{3+} , Er^{3+} , Tm^{3+} , Yb^{3+} , y Lu^{3+} .

Asimismo, hay que entender que la presente invención abarca todos los isómeros de los compuestos de fórmula (I), es decir, todas las formas geométricas, tautoméricas y ópticas, y sus mezclas (por ejemplo, mezclas racémicas).

El término "tautómero" o "forma tautomérica", tal y como se usa en la presente invención, se refiere a isómeros estructurales de diferentes energías que son interconvertibles vía una barrera de baja energía. Por ejemplo, tautómeros protónicos (también conocidos como tautómeros prototrópicos) que incluyen interconversiones mediante la migración de un protón, como por ejemplo isomerizaciones ceto-enólicas o imina-enamina. Los tautómeros de valencia incluyen interconversiones por reorganización de algunos electrones de enlace.

La presente invención también incluye compuestos marcados con isótopos, que son idénticos a los citados en la fórmula (I) salvo en que uno o más átomos se han reemplazado por un átomo que tiene una masa atómica o número másico diferente de la masa atómica o número másico encontrado habitualmente en la naturaleza. Los ejemplos de isótopos que pueden incorporarse en compuestos de la invención incluyen isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, flúor, yodo y cloro, tales como ^2H , ^3H , ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}F , ^{123}I y ^{125}I .

En este sentido, dentro del alcance de la presente invención se encuentran las sales farmacéuticamente aceptables de dichos compuestos que contienen los isótopos mencionados anteriormente y/u otros isótopos de otros átomos. Los compuestos marcados con isótopos de la presente invención, por ejemplo, aquéllos en que se incorporan isótopos radioactivos tales como ^3H o ^{14}C , son útiles en ensayos de distribución de fármacos y/o sustratos en tejidos. Se prefieren particularmente los isótopos tritio, es decir ^3H , y carbono-14, es decir, ^{14}C , por su facilidad de preparación y detectabilidad. Los isótopos ^{11}C y ^{18}F son particularmente útiles en PET (tomografía de emisión de positrones), y los isótopos ^{125}I son particularmente útiles en SPECT (tomografía computerizada de emisión de un solo fotón), todos útiles en la formación de imágenes del cerebro. Además, la sustitución con isótopos más pesados tales como deuterio, es decir, ^2H , puede proporcionar algunas ventajas terapéuticas que resultan de la mayor estabilidad metabólica, por ejemplo, mayor vida media *in vivo* o menores requisitos de dosificación, y por lo tanto en algunos casos pueden ser preferidos. Los

compuestos isotópicamente marcados de fórmula (I) se pueden preparar generalmente llevando a cabo los procedimientos descritos en los siguientes ejemplos, sustituyendo un reactivo no marcado isotópicamente por un reactivo isotópicamente marcado fácilmente disponible.

5

Por otro lado, las sales mencionadas anteriormente serán sales fisiológica y farmacéuticamente aceptables. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las descritas por Berge, Bighley y Monkhouse, J. Pharm. Sci., 1977, 66, 1-19. Así, la expresión "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales preparadas a partir de bases farmacéuticamente aceptables no tóxicas incluyendo bases inorgánicas y bases orgánicas. Las sales derivadas de bases inorgánicas incluyen sales de aluminio, amonio, calcio, cobre, férricas, ferrosas, de litio, de magnesio, sales mangánicas, manganosas, de potasio, de sodio, de cinc y similares. Las sales derivadas de bases orgánicas no tóxicas farmacéuticamente aceptables incluyen sales de aminas primarias, secundarias y terciarias, aminas sustituidas incluidas aminas sustituidas naturales, aminas cíclicas, y resinas de intercambio iónico básicas, tales como arginina, betaína, cafeína, colina, N,N'-dibenciletilendiamina, dietilamina, 2-dietilaminoetanol, 2-dimetilaminoetanol, etanolamina, etilendiamina, N-etil-morfolina, N-etilpiperidina, glucamina, glucosamina, histidina, hidrabamina, isopropilamina, lisina, metilglucamina, morfolina, piperazina, piperidina, resinas de poliamina, procaína, purinas, teobromina, trietilamina, trimetilamina, tripropilamina, trometamina, y similares. Cuando el compuesto de la presente invención es básico, pueden prepararse sales a partir de ácidos no tóxicos farmacéuticamente aceptables, incluyendo ácidos inorgánicos y orgánicos. Tales ácidos incluyen el ácido acético, bencenosulfónico, benzoico, canforsulfónico, cítrico, etanosulfónico, fumárico, glucónico, glutámico, bromhídrico, clorhídrico, isetiónico, láctico, maleico, málico, mandélico, metanosulfónico, múcico, nítrico, pamoico, pantoténico, fosfórico, succínico, sulfúrico, tartárico, p-toluenosulfónico y similares.

Los ejemplos preferidos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales de amonio, calcio, magnesio, potasio y sodio, y las formadas a partir de ácidos maleico, fumárico, benzoico, ascórbico, pamoico, succínico, clorhídrico, sulfúrico, bismetilensalicílico, metanosulfónico, etanodisulfónico, propiónico, tartárico, salicílico, cítrico, glucónico, aspártico, esteárico, palmítico, itacónico, glicólico, p-aminobenzoico, glutámico, bencenosulfónico, ciclohexilsulfámico, fosfórico y nítrico.

35

Asimismo, los compuestos de fórmula (I) pueden estar en forma cristalina como compuestos libres o como solvatos y ambas formas están dentro del alcance de la presente invención. Los métodos de solvatación se conocen generalmente dentro de la técnica. Los solvatos adecuados son solvatos farmacéuticamente aceptables. En una
5 realización particular, los solvatos son hidratos o bien las moléculas de solvatación son moléculas de disolvente, como por ejemplo alcoholes.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de los compuestos de fórmula (I) tal y como se ha definido anteriormente como reactivos para el marcaje luminiscente de
10 muestras biológicas que contienen péptidos, proteínas, y/o nanopartículas, con utilidad en el desarrollo de biosensores luminiscentes.

En una realización preferida, el marcaje de péptidos se selecciona de entre secuencias peptídicas de substratos de quinasas, concretamente, de entre péptidos de 15
15 aminoácidos derivados de la proteína tau.

En una realización más preferida, la secuencia peptídica a marcar se selecciona de entre las que poseen una única cisteína.

20 En una realización más preferida, el marcaje luminiscente de péptidos se selecciona de entre marcaje en disolución o marcaje en fase sólida.

Otro aspecto de la invención se refiere a biosensores luminiscentes que comprenden al menos un compuesto de fórmula (I) tal y como se ha definido anteriormente.

25

Otro aspecto de la invención se refiere a un procedimiento de marcaje luminiscente de muestras biológicas aisladas que comprende poner en contacto la muestra biológica con al menos un compuesto de fórmula (I) tal y como se ha definido anteriormente. Cuando el compuesto de fórmula (I) no incorpora el lantánido en su estructura, éste
30 debe ser añadido *in situ* a través de su sal correspondiente.

En la presente invención el término "alquilo" se refiere a radicales de cadenas hidrocarbonadas, lineales o ramificadas, que tienen de 1 a 6 átomos de carbono, preferiblemente de 1 a 4, y que se unen al resto de la molécula mediante un enlace
35 sencillo, por ejemplo, metilo, etilo, *n*-propilo, *i*-propilo, *n*-butilo, *terc*-butilo, *sec*-butilo, *n*-pentilo, *n*-hexilo etc. Opcionalmente puede estar sustituido por al menos un sustituyente,

donde los sustituyentes se seleccionan de entre OR', =O, SR', SOR', SO₂R', NO₂, NHR', N(R')₂, =N-R', NHCOR', N(COR')₂, NHSO₂R', NR'C(=NR')NHR', CN, halógeno, C(O)R', COOR', OC(O)R', CONHR', CON(R')₂, alquilo (C₁-C₁₀) sustituido o no sustituido, alqueno (C₂-C₁₀) sustituido o no sustituido, alquino (C₂-C₁₀) sustituido o no sustituido, arilo (C₆-C₁₈) sustituido o no sustituido y heterociclo (C₅-C₁₈) sustituido o no sustituido, donde cada grupo R' es seleccionado independientemente entre H, OH, NO₂, NH₂, SH, CN, halógeno, O, C(O)H, C(O)alquilo, COOH, alquilo (C₁-C₅) sustituido o no sustituido, alqueno (C₂-C₅) sustituido o no sustituido, alquino (C₂-C₅) sustituido o no sustituido.

10 En la presente invención el término "halógeno", tal como se entiende en la presente invención, incluye flúor, cloro, bromo y yodo.

En la presente invención el término "lantánido" se refiere a cualquiera de los elementos químicos del periodo 6 de la tabla periódica comprendidos entre los números atómicos 15 57 y 71 (Lantano, Cerio, Praseodimio, Neodimio, Prometio, Samario, Europio, Gadolinio, Terbio, Disproso, Holmio, Erblio, Tulio, Iterbio y Lutecio), preferentemente Europio o Terbio.

En la presente invención el término "muestra biológica" se refiere a materiales tanto de 20 origen natural como sintético que presentan actividad biológica, comprendiendo fundamentalmente biomoléculas, tales como por ejemplo péptidos y proteínas, nanopartículas y células.

En la presente invención el término "nanopartícula" se refiere a partículas de diversos 25 materiales de tamaño inferior a 100 nm.

En la presente invención se entiende "marcaje en disolución" cuando el material a marcar está disuelto en un disolvente, como por ejemplo diversos tampones acuosos; y "marcaje en fase sólida" cuando el material a marcar se encuentra anclado a una resina 30 polimérica sólida.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los 35 siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende

que sean limitativos de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

5 FIG. 1: Esquema del marcaje luminiscente de péptidos en fase sólida con el reactivo (8).

FIG. 2: Gráfico de luminiscencia de péptidos marcados y no marcados con el fluoróforo (8), en presencia y en ausencia de cationes Ln^{3+} .

10 FIG. 3. Esquema del marcaje luminiscente de péptidos en fase sólida con el reactivo (13).

FIG. 4. Gráfico de luminiscencia de péptidos marcados y no marcados con el fluoróforo (13), en presencia y en ausencia de cationes Ln^{3+} .

15

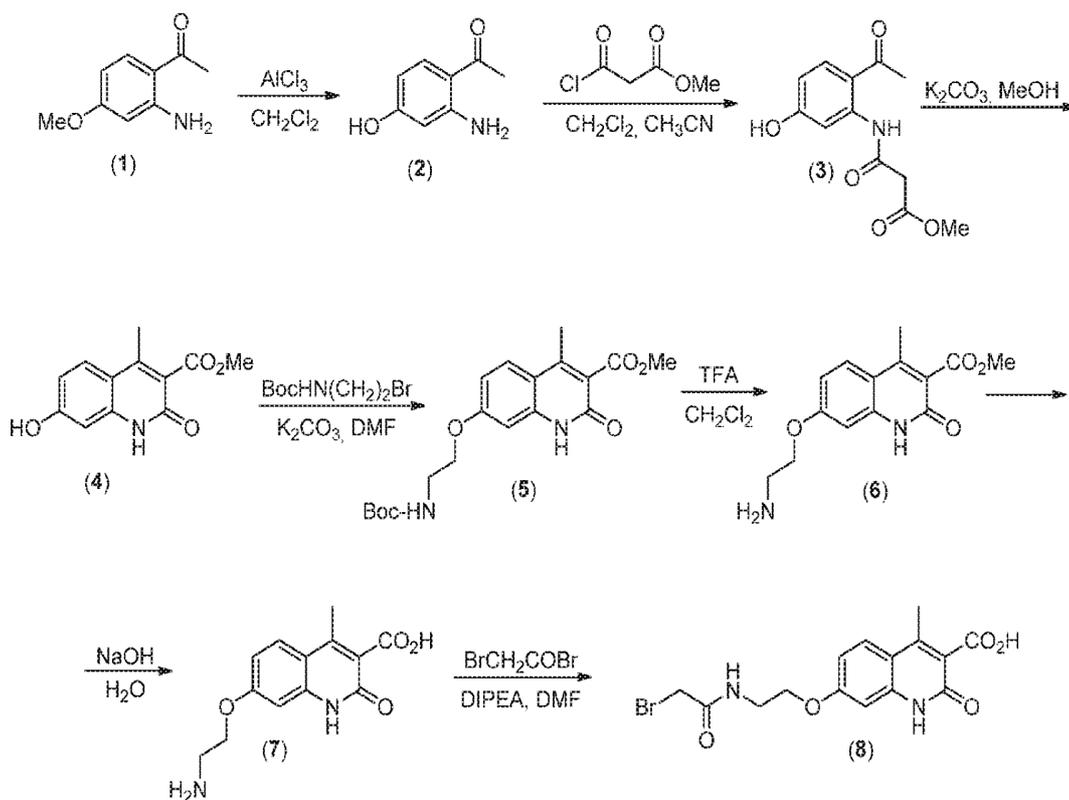
EJEMPLOS

A continuación, se ilustra la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la efectividad del producto de la invención.

20

Ejemplo 1: Síntesis del ácido 7-(2-(2-bromoacetamido)etoxi)-4-metil-2-oxo-1,2-dihidroquinolina-3-carboxílico (8)

25 El compuesto del epígrafe se sintetizó a partir de 2-amino-4-metoxi-acetofenona (1), tal como se indica en el siguiente esquema de reacción:



Síntesis de 2-amino-4-hidroxi-acetofenona (2)

Una disolución de 2-amino-4-metoxi-acetofenona (1) (320 mg, 1.93 mmol) y AlCl_3 en CH_2Cl_2 (20 ml), se agitó a 50 °C durante 2 h. A continuación, se vertió sobre hielo, generándose un precipitado que se filtró, obteniendo el producto del epígrafe (233 mg, 80%) como un sólido blanco. Pf: 236 °C). HPLC-MS (gradiente 15-95% de disolución 0,1 % de ácido fórmico en acetonitrilo en disolución 0,1 % de fórmico en H_2O , 10 min) t_R = 5.21 min. ^1H -RMN (400 MHz, CD_3OD) δ : 2.46 (s, 3H), 6.18 (s, 1H), 6.19 (d, 1H, J = 8.5 Hz), 7.66 (d, 1H, J = 8.5 Hz). ^{13}C -RMN (100 MHz, CD_3OD) δ : 27.4, 103.1, 107.4, 114.0, 135.8, 153.0, 164.5, 200.7. HRMS (ESI) m/z : Calcd. para $\text{C}_8\text{H}_9\text{NO}_2$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 152.0706, encontrada: 152.0707.

Síntesis de 3-((2-acetil-5-hidroxifenil)amino)-3-oxopropanoato de metilo (3)

A una disolución de la acetofenona (2) (150 mg, 0.99 mmol) en CH_2Cl_2 (4 ml)/ ACN (1 ml) se le añadió 3-cloro-3-oxipropionato (106 μl , 0.99 mmol), y se agitó durante 6 h a temperatura ambiente. A continuación, se evaporó el disolvente y el residuo se recristalizó de MeOH , obteniéndose el producto del epígrafe (220 mg, 90 %) como sólido cristalino en agujas transparente. Pf: 170.3 °C. HPLC-MS (gradiente 30-95% de disolución 0,1 % de ácido fórmico en acetonitrilo en disolución 0,1 % de fórmico en H_2O , 10 min) t_R = 1.96 min. ^1H -RMN (400 MHz, Cl_3CD) δ : 2.52 (s, 3H), 3.45 (s, 2H), 3.73 (s,

3H), 6.54 (dd, 1H, $J = 9$ y 2.5 Hz), 7.74 (d, 1H, $J = 9$ Hz), 8.05 (d, 1H, $J = 2.5$ Hz), 12.42 (s, 1H). ^{13}C -RMN (100 MHz, Cl_3CD) δ : 28.2, 45.0, 52.7, 106.6, 111.2, 115.0, 134.5, 142.5, 163.5, 165.2, 167.8, 201.3. HRMS (ESI) m/z : Calcd. para $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{NO}_5$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 252.0867, encontrada: 252.0874.

5

Síntesis de 7-hidroxi-4-metil-2-oxo-1,2-dihidroquinolina-3-carboxilato de metilo (4)

A una disolución de (3) (230 mg, 0.91 mmol) en MeOH (8 ml) se añadió K_2CO_3 (139 mg, 1.07 mmol) y se calentó a 70 °C mediante irradiación con MW durante 30 min. La mezcla de reacción se enfrió y se evaporó a presión reducida. Después el crudo de la reacción se redisolvió en CH_2Cl_2 (50 ml) y la disolución resultante se lavó con H_2O (20 ml), salmuera (20 ml), se secó sobre Na_2SO_4 y se evaporó a sequedad, para obtener la quinolin-2-ona (4) (190 mg, 90 %) como un sólido amarillo. Pf: 187 °C. HPLC-MS (gradiente 5-95% de disolución 0,1 % de ácido fórmico en acetonitrilo en disolución 0,1 % de fórmico en H_2O , 10 min) $t_R = 5.87$ min. ^1H -RMN (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 2.16 (s, 3H), 3.69 (s, 3H), 5.79 (s, 1H), 6.04 (dd, 1H, $J=9$ y 2.5 Hz), 7.13 (d, 1H, $J=9$ Hz), 10.53 (s, 1H). ^{13}C -RMN (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 15.6, 51.3, 100.4, 104.6, 119.7, 125.5, 142.5, 145.2, 159.8, 166.4, 168.5, 170.3. HRMS (ESI) m/z : Calcd. para $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{NO}_4$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 234.0761, encontrada: 234.0775.

20 Síntesis de 7-(2-((*tert*-butoxicarbonil)amino)etoxi)-4-metil-2-oxo-1,2-dihidroquinolina-3-carboxilato de metilo (5)

A una disolución de la quinolin-2-ona (4) (115 mg, 0.49 mmol) en DMF seca (5 ml), se le añadió Na_2CO_3 (76 mg, 0.73 mmol) y *N*-Boc-2-bromoetilamina (164 mg, 0.735 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 120 °C en tubo sellado durante 3 horas. A continuación, se enfrió y evaporó a presión reducida. Después el crudo de la reacción se disolvió en CH_2Cl_2 (50 ml) y se lavó con H_2O (20 ml), salmuera (20 ml), se secó sobre Na_2SO_4 y se evaporó hasta sequedad. El residuo se purificó mediante cromatografía flash sobre sílica gel, usando como eluyente un gradiente 0-1.5 % de MeOH en CH_2Cl_2 para obtener el compuesto del epígrafe (50 mg, 30 %) como un sólido marrón. Pf: 170 °C. HPLC-MS (gradiente 30-95% de disolución 0,1 % de ácido fórmico en acetonitrilo en disolución 0,1 % de fórmico en H_2O , 10 min) $t_R = 3.89$ min. ^1H -RMN (300 MHz, CD_3OD) δ : 1.37 (s, 9H), 2.38 (s, 3H), 3.46 (q, 2H, $J = 5.5$ Hz), 3.87 (s, 3H), 4.01 (t, 2H, $J = 5.5$ Hz), 5.67 (t, 1H, $J = 5.5$ Hz), 6.70 (d, 1H, $J = 2.5$ Hz), 6.79 (dd, 1H, $J = 9$ y 2.5 Hz), 7.57 (d, 1H, $J = 9$ Hz). ^{13}C -RMN (75 MHz, CD_3OD) δ : 16.5, 28.4, 40.0, 52.7, 67.4, 80.0, 99.1, 112.9, 114.1, 123.1, 127.0, 139.9, 147.4, 156.8, 160.9, 161.7, 167.7. HRMS (ESI) m/z : Calcd. para $\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_6$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 377.1707, encontrada: 377.1717.

Síntesis de 7-(2-aminoetoxi)-4-metil-2-oxo-1,2-dihidroquinolina-3-carboxilato de metilo (6)

A una disolución de la quinolin-2-ona (5) (50 mg, 0.132 mmol) en CH₂Cl₂ (4 ml) con 0.5
5 % de MeOH y se le añadió TFA (508 µl, 6.6 mmol). La disolución se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Posteriormente, se evaporó, se disolvió en H₂O (4 ml) y se liofilizó obteniéndose el compuesto del epígrafe (6) (52 mg, 100 %) como un sirupe incoloro. ¹H-RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 2.36 (s, 3H), 3.28 (m, 2H), 3.81 (s, 3H), 4.22 (t, 2H, *J* = 5.5), 6.85 (dd, 1H, *J* = 2.5 y 1 Hz), 6.92 (dd, 1H, *J* = 9 y 2.5 Hz), 7.77 (dd, 1H,
10 *J* = 9 y 1 Hz), 8.04 (m, 2H), 11.95 (s, 1H). ¹³C-RMN (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 16.0, 38.2, 52.2, 65.7, 99.3, 110.9, 113.0, 123.8, 127.4, 139.8, 144.9, 159.0, 160.2, 166.8. HRMS (ESI) *m/z*: Calcd. para C₁₄H₁₇N₂O₄ ([M+H]⁺): 277.1183, encontrada: 277.1181.

Síntesis del ácido 7-(2-aminoetoxi)-4-metil-2-oxo-1,2-dihidroquinolina-3-carboxílico (7)

15 El éster metílico (6) (25 mg, 0.09 mmol) se disolvió en disolución 1 N de NaOH (3 ml) y la disolución se calentó a reflujo durante 4 horas. A continuación, la mezcla de reacción se enfrió y se liofilizó. El residuo se purificó mediante HPLC semipreparativa en fase reversa (C₁₈), obteniéndose el derivado deseado (7) (7 mg, 30 %) como un sólido blanco. Pf: 167 °C. HPLC-MS (gradiente 5-95% de disolución 0,1 % de ácido fórmico en acetoneitrilo en disolución 0,1 % de fórmico en H₂O, 10 min) *t_R* = 7.64 min. ¹H-RMN (500 MHz, D₂O) δ: 2.44 (s, 3H), 3.45 (t, 2H, *J* = 5.5 Hz), 4.11 (t, 2H, *J* = 5.5 Hz), 6.73 (d, 1H, *J* = 2.5 Hz), 6.92 (dd, 1H, *J* = 2.5 y 9 Hz), 7.69 (d, 1H, *J* = 9 Hz). ¹³C-RMN (125 MHz, D₂O) δ: 15.78, 40.57, 68.0, 99.1, 112.70, 114.8, 126.6, 128.6, 137.7, 143.3, 160.1, 161.4, 174.3.

25

Síntesis del ácido 7-(2-(2-bromoacetamido)etoxi)-4-metil-2-oxo-1,2-dihidroquinolina-3-carboxílico (8)

La dihidroquinolina (7) (7 mg, 0.025 mmol) se disolvió en DMF seco (3 ml) bajo atmosfera de Ar₂. La disolución agitó durante 1 min y se adicionó DIPEA (5 µl, 0.03
30 mmol) y bromuro de bromoacético (2.6 µl, 0.03 mmol) dejándose reaccionar durante 30 min. A continuación, se evaporó el disolvente y el residuo se purificó mediante cromatografía flash de fase reversa, usando como eluyente un gradiente 0-10 % de ACN en H₂O, para obtener el compuesto deseado (8) (5 mg, 53%) como sirupe incoloro. HPLC-MS (gradiente 5-95% de disolución 0,1 % de ácido fórmico en acetoneitrilo en disolución 0,1 % de fórmico en H₂O, 10 min) *t_R* = 7.30 min. ¹H-RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 2.63 (s, 3H), 3.51 (q, 2H, *J* = 5 Hz), 3.89 (s, 2H), 4.09 (m, 2H), 6.86 (d, 1H, *J* = 2.5

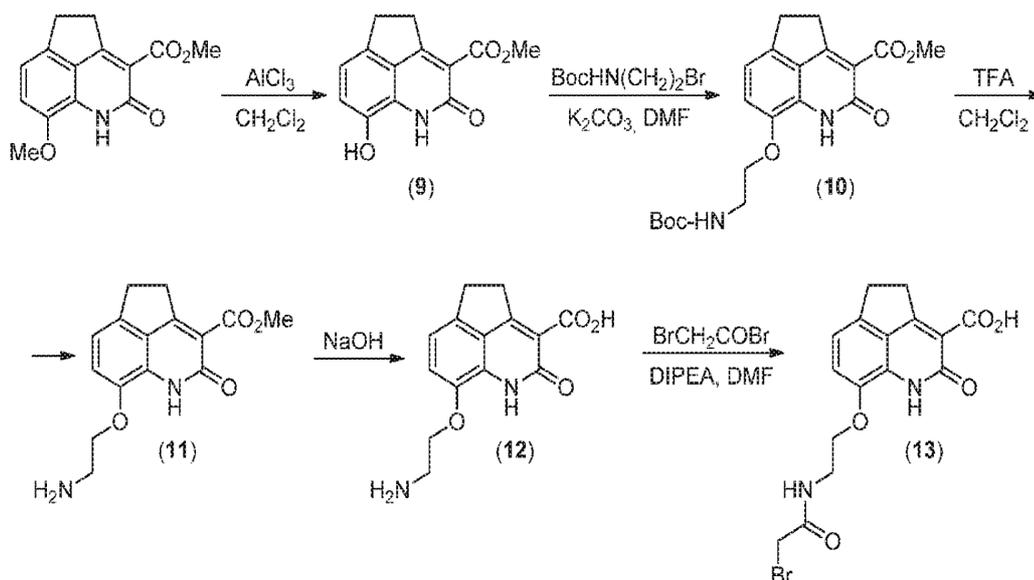
35

Hz), 6.95 (dd, 1H, $J = 9$ y 2.5 Hz), 7.87 (d, 1H, $J = 9$ Hz), 11.50 (s, 1H). ^{13}C -RMN (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 16.3, 29.4, 38.7, 66.5, 99.0, 112.1, 113.9, 120.0, 128.0, 139.6, 149.7, 161.2, 161.5, 166.4, 166.9. HRMS (ESI): Calcd. para $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{BrN}_2\text{O}_5$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 383.0198, encontrada: 383.0204.

5

Ejemplo 2: Síntesis del ácido 8-(2-(2-bromoacetamido)etoxi)-2-oxo-1,2,4,5-tetrahidrociclopenta[de]quinolina-3-carboxílico (13)

El compuesto del epígrafe se sintetizó a partir de 8-metoxi-2-oxo-1,2,4,5-tetrahidrociclopenta[de]quinolina-3-carboxilato de metilo (González-Vera, J. A. *et al.* *Chem. Commun.* 2016, 52, 9652), tal como se indica en el siguiente esquema de reacción:



15 **Síntesis de 8-hidroxi-2-oxo-1,2,4,5-tetrahidrociclopenta[de]quinolina-3-carboxilato de metilo (9)**

A una disolución de 8-metoxi-2-oxo-1,2,4,5-tetrahidrociclopenta[de]quinolina-3-carboxilato de metilo (50 mg, 0.19 mmol) en CH_2Cl_2 (5 ml) se le añadió AlCl_3 (50 mg, 0.38 mmol) y se calentó a 50 °C durante 12 h. Al cabo de este tiempo, se evaporó el disolvente y al residuo se añadió H_2O , generándose un precipitado sólido, que se filtró y se secó a vacío, para obtener el compuesto del epígrafe (9) como sólido de color rosa oscuro (32 mg, 82 %). Pf: 247 °C. HPLC-MS (gradiente 5-95% de disolución 0,1 % de ácido fórmico en acetonitrilo en disolución 0,1 % de fórmico en H_2O , 10 min) $t_R = 6.94$ min. ^1H -RMN ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz) δ : 3.10 (t, 2H, $J = 5.5$ Hz), 3.23 – 3.33 (m, 2H), 3.76 (s, 3H), 6.89 (d, 1H, $J = 8$ Hz), 7.00 (d, 1H, $J = 8$ Hz), 9.74 (s, 1H), 10.89 (s, 1H). ^{13}C -

25

RMN (DMSO- d_6 , 126 MHz) δ : 29.5, 31.8, 51.5, 116.4, 117.2, 119.5, 125.5, 125.8, 137.6, 140.7, 160.3, 164.1, 165.3. HRMS (ESI) m/z : Calcd. para $C_{13}H_{11}NO_4$ ($[M+H]^+$): 246.076, encontrada: 246.077.

5 Síntesis de 8-(2-((*tert*-butoxicarbonil)amino)etoxi)-2-oxo-1,2,4,5-tetrahidrociclopenta-
[*de*]-quinolina-3-carboxilato de metilo (10)

A una disolución del carboxilato (9) (450 mg, 1.83 mmol) en DMF anhidra (15 ml) se le añadieron bromuro de 2-(Boc-amino)etilo (491 mg, 2.19 mmol) y K_2CO_3 (304mg, 2.19 mmol) y la mezcla se calentó a 90 °C, en atmosfera de Ar_2 durante 24 h. Al día siguiente,
10 se evaporó el disolvente y el residuo se purificó mediante cromatografía flash, usando como eluyente un gradiente 0-4 % de MeOH en CH_2Cl_2 , obteniéndose el compuesto del epígrafe (10) como un sólido marrón claro (90 mg, 13 %). Pf: 169.5 °C HPLC-MS (gradiente 30-95% de disolución 0,1 % de ácido fórmico en acetonitrilo en disolución 0,1 % de fórmico en H_2O , 10 min) t_R = 4.31 min. 1H -RMN (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ : 1.40 (s, 9H), 3.17 (t, 2H, $J=5.5$ Hz), 3.32 – 3.37 (m, 2H), 3.38 – 3.43 (m, 2H), 3.79 (s, 3H), 3.98
15 (t, 2H, $J=5$ Hz), 7.01 (d, 1H, $J=8$ Hz), 7.15 (d, 1H, $J=8$ Hz), 7.42 (t, 1H, $J=6$ Hz), 11.28 (s, 1H). ^{13}C -RMN (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ : 28.2, 29.5, 31.9, 51.5, 68.3, 77.9, 115.7, 116.9, 117.0, 125.6, 126.6, 138.7, 142.1, 155.5, 160.6, 163.9, 165.19. HRMS (ESI) m/z : Calcd. para $C_{20}H_{24}N_2O_6$ ($[M+H]^+$): 389.1707, encontrada: 389.1729.

20

Síntesis de 8-(2-aminoetoxi)-2-oxo-1,2,4,5-tetrahidrociclopenta[*de*]quinolina-3-
carboxilato de metilo (11)

A una disolución del compuesto (10) (90 mg, 0.31 mmol) en CH_2Cl_2 (4 ml) se le añadió TFA (1,2 ml, 15.5 mmol) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 12 h.
25 Después, la mezcla de reacción se evaporó a sequedad, el residuo se disolvió en H_2O (3 ml) y la disolución se liofilizó, obteniendo el producto del epígrafe (11) (90 mg, 100 %) como un sirupe marrón. HPLC-MS (gradiente 5-95% de disolución 0,1 % de ácido fórmico en acetonitrilo en disolución 0,1 % de fórmico en H_2O , 10 min) t_R = 5.01 min. 1H -RMN (500 MHz, D_2O) δ 2.44 (s, 3H), 3.45 (t, $J = 5.4$ Hz, 2H), 4.11 (t, $J = 5.4$ Hz, 2H),
30 6.73 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 6.92 (d, 1H), 7.69 (d, 1H). ^{13}C NMR (125 MHz, D_2O) δ 15.8, 40.6, 68.0, 99.1, 112.7, 114.7, 126.6, 128.6, 137.7, 143.3, 160.1, 164.2, 174.2.

Síntesis del ácido 8-(2-aminoetoxi)-2-oxo-1,2,4,5-tetrahidrociclopenta[*de*]quinolina-3-
carboxílico (12)

35 El éster metílico (11) fue disuelto en disolución 1 N de NaOH (3 ml) y la mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 3 h. Después, la mezcla de reacción se dejó enfriar

a temperatura ambiente y se liofilizó. El residuo se purificó mediante cromatografía flash de fase reversa, usando como eluyente un gradiente 0-10 % de acetonitrilo en H₂O, obteniéndose el ácido deseado (12) como un sirope marrón (37 mg, 60 %). HPLC-MS (gradiente 5-95% de disolución 0,1 % de ácido fórmico en acetonitrilo en disolución 0,1 % de fórmico en H₂O, 10 min) t_R = 4.55 min. ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆) 3.15 (t, 2H, J = 5.5 Hz), 3.51 (t, 2H, J = 5.5 Hz), 4.03 (t, 2H, J = 4.5 Hz), 6.92 (d, 1H, J = 7.5 Hz), 7.01 (d, 1H, J = 7.5 Hz). HRMS (ESI) m/z . Calcd. para C₁₄H₁₄N₂O₄ ([M+H]⁺): 275.1026, encontrada: 275.1021.

10 Síntesis del ácido 8-(2-(2-bromoacetamido)etoxi)-2-oxo-1,2,4,5-tetrahidrociclopenta[de]quinolina-3-carboxílico (13)

Una disolución de la 2-oxo-1,2,4,5-tetrahidrociclopenta[de]quinolina (12) (27 mg, 0.098 mmol) en DMF seco (3 ml), y bajo atmosfera de Ar₂, se agitó durante 1 minuto y después se le añadió DIPEA (17.17 µl, 0.098 mmol) y bromuro de bromoacético (9.46 µl, 0.1078 mmol) dejándose reaccionar durante 1 hora a temperatura ambiente. Al cabo de este tiempo, se evaporó el disolvente y el residuo se disolvió en CH₂Cl₂ (25 ml). La disolución se lavó sucesivamente con H₂O (5 ml) y disolución saturada de NaCl (5 ml), se secó sobre Na₂SO₄ y se evaporó a sequedad. El residuo se purificó mediante cromatografía flash, usando como eluyente un gradiente 0-4 % de MeOH en CH₂Cl₂, obteniéndose el compuesto del epígrafe (13) (20 mg, 53%) como un sirope incoloro. HPLC-MS (gradiente 5-95% de disolución 0,1 % de ácido fórmico en acetonitrilo en disolución 0,1 % de fórmico en H₂O, 10 min) t_R = 7.74 min.

25 Ejemplo 3: Marcaje luminiscente en disolución de péptidos con la bromoacetamida (8)

Los péptidos utilizados en este estudio fueron derivados de la proteína Tau (Wada, Y. *et al. J. Biochem.* **1998**, *124*, 738), que incorporan un único residuo de cisteína en posición -2 con respecto a una treonina, se sintetizaron mediante síntesis en fase sólida y después de aislarlos y purificarlos, se disolvieron en tampón Hepes a pH 7.4 y se marcaron en el residuo de cisteína por reacción con el compuesto (8) en exceso (de 5-10 veces), durante 16h a 4 °C. Posteriormente, el exceso de antena se eliminó por purificación en columnas NAP-5 (GE Healthcare; rendimiento 100% por HPLC-MS analítico) y los péptidos marcados resultantes se coordinaron con el correspondiente lantánido tras adición *in situ* de la respectiva sal de lantánido (TbCl₃, EuCl₃, Sc(OTf)₃, Y(OTf)₃ o La(OTf)₃) en exceso (de 5-100 veces) a 25 °C en buffer Hepes a pH 7.4.

Ejemplo 4: Marcaje luminiscente en fase sólida de péptidos con la bromoacetamida (8)

5 Al igual que en el ejemplo 3, los péptidos utilizados en este estudio fueron derivados de la proteína Tau (Wada, Y. *et al. J. Biochem.* 1998, 124, 738), incorporan un único residuo de cisteína y se sintetizaron en fase sólida. Tal como se muestra de forma simplificada en la Figura 1, estos péptidos unidos a la resina (PAL-PEG, 50 mg, 0.0095 mmol, 1 equiv.), que incorporaba el residuo de cisteína protegido como Cys(Mmt), lábil en medio
10 ácido, se hincharon con CH₂Cl₂ (5 min) y DMF (5 min). El grupo protector Mmt se eliminó por tratamiento con TFA al 1% y triisopropilsilano (TIS) al 5% en CH₂Cl₂ bajo atmósfera de N₂ (4 x 20 min o hasta que la mayor parte del color amarillo debido al catión Mmt desapareció). A continuación, la resina se sometió a un lavado riguroso con CH₂Cl₂ (5 x) y DMF (5 x), se le añadió DIEA (0,0475 mmol, 5 equiv.) en DMF anhidra (200 µL) y la
15 mezcla resultante se agitó durante 2-3 min a 25 °C. Seguidamente se añadió el compuesto (8) (17 mg, 0,0285 mmol, 3 equiv.) a la resina en DMF anhidra (150 µL) y, tras 12 horas agitando a temperatura ambiente, la resina se filtró para eliminar los reactivos en exceso y se lavó con DMF, CH₂Cl₂, MeOH y CH₂Cl₂ (5 x cada uno). El desanclaje del péptido de la resina y eliminación de los grupos protectores se llevó a
20 cabo por tratamiento de los péptidos unidos a la resina con TFA/EDT/H₂O/TIS (94:2.5:2.5:1% v/v). La disolución resultante se concentró bajo una corriente de N₂ y se precipitó mediante la adición de Et₂O frío. El sedimento se trituró con Et₂O frío (3 x), se redisolvió en agua, se filtró y se liofilizó. Los péptidos se purificaron mediante HPLC-MS de fase reversa semipreparativa. Los péptidos marcados resultantes se coordinaron con
25 el correspondiente lantánido tras adición *in situ* de la respectiva sal (TbCl₃, EuCl₃, Sc(OTf)₃, Y(OTf)₃ o La(OTf)₃) en exceso (de 5-100 veces) a 25 °C en buffer Hepes a pH 7.4. La coordinación del péptido marcado con (8) y TbCl₃ dio lugar a un incremento de luminiscencia de 2.069 veces, mientras que la coordinación con EuCl₃ dio lugar a un incremento de luminiscencia de 490 veces (Figura 2).

30

Ejemplo 5: Marcaje luminiscente en disolución de péptidos con la bromoacetamida (13)

Al igual que en el ejemplo 3, los péptidos se disolvieron en tampón Hepes a pH 7.4 y se
35 marcaron en el residuo de cisteína por reacción con el compuesto (13) en exceso (de 5-10 veces), durante 16h a 4 °C. Posteriormente, el exceso de antena se eliminó por

purificación en columnas NAP-5 (GE Healthcare; rendimiento 100% por HPLC-MS analítico) y los péptidos marcados resultantes se coordinaron con el correspondiente lantánido tras adición *in situ* de la respectiva sal de lantánido ($TbCl_3$, $EuCl_3$, $Sc(OTf)_3$, $Y(OTf)_3$ o $La(OTf)_3$) en exceso (de 5-100 veces) a 25 °C en buffer Hepes a pH 7.4.

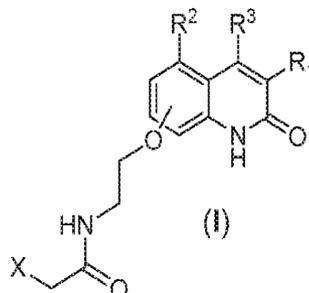
5

Ejemplo 6: Marcaje lumíniscente en fase sólida de péptidos con la bromoacetamida (13)

Al igual que en el ejemplo 4, los péptidos utilizados en este estudio fueron derivados de la proteína Tau (Wada, Y. *et al. J. Biochem.* 1998, 124, 738), incorporan un único residuo de cisteína y se sintetizaron en fase sólida. Tal como se muestra de forma simplificada en la Figura 3, estos péptidos unidos a la resina (PAL-PEG, 50 mg, 0.0095 mmol, 1 equiv.), que incorporaba el residuo de cisteína protegido como Cys(Mmt), lábil en medio ácido, se hincharon con CH_2Cl_2 (5 min) y DMF (5 min). El grupo protector Mmt se eliminó por tratamiento con TFA al 1%, triisopropilsilano (TIS) al 5% en CH_2Cl_2 bajo atmósfera de N_2 (4 x 20 min o hasta que la mayor parte del color amarillo debido al catión Mmt desapareció). A continuación, la resina se sometió a un lavado riguroso con CH_2Cl_2 (5 x) y DMF (5 x), se le añadió DIEA (0,0475 mmol, 5 equiv.) en DMF anhidra (200 μ L) y la mezcla resultante se agitó durante 2-3 min a 25 °C. Seguidamente se añadió el compuesto (13) (17 mg, 0,0285 mmol, 3 equiv.) a la resina en DMF anhidra (150 μ L) y tras 12 horas agitando a temperatura ambiente, la resina se filtró para eliminar los reactivos en exceso y se lavó con DMF, CH_2Cl_2 , MeOH, CH_2Cl_2 (5 x cada uno). El desanclaje del péptido de la resina y eliminación de los grupos protectores se llevó a cabo por tratamiento de los péptidos unidos a la resina con TFA/EDT/ H_2O /TIS (94:2.5:2.5:1% v/v). La disolución resultante se concentró bajo una corriente de N_2 y se precipitó mediante la adición de Et_2O frío. El sedimento se trituró con Et_2O frío (3 x), se redisolvió en agua, se filtró y se liofilizó. Los péptidos se purificaron mediante HPLC-MS de fase reversa semipreparativa. Los péptidos marcados resultantes se coordinaron con el correspondiente lantánido tras adición *in situ* de la respectiva sal ($TbCl_3$, $EuCl_3$, $Sc(OTf)_3$, $Y(OTf)_3$ o $La(OTf)_3$) en exceso (de 5-100 veces) a 25 °C en buffer Hepes a pH 7.4. La coordinación con $TbCl_3$ dio lugar a un incremento de luminiscencia de 1.097 veces, mientras que la coordinación con $EuCl_3$ dio lugar a un incremento de luminiscencia de 7.600 veces (Figura 4).

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula (I):



5

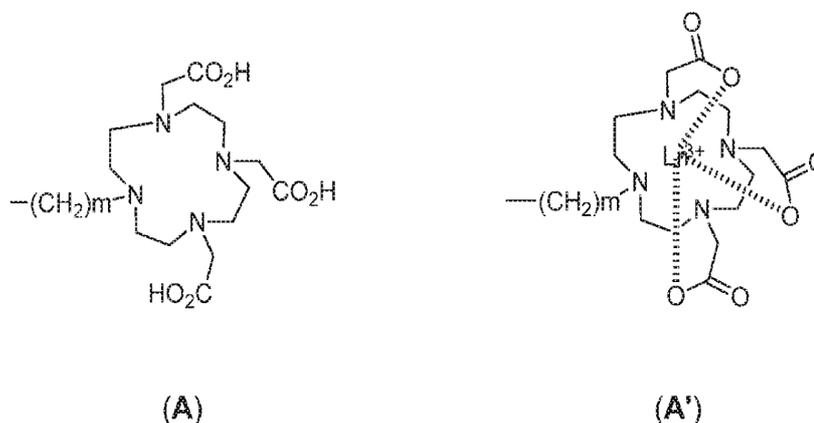
o cualquiera de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables, donde:

X es un halógeno que se selecciona de entre Cl, Br y I;

R² y R³ se seleccionan independientemente de entre H, alquilo(C₁-C₆) opcionalmente sustituido, o R² y R³ forman un puente alcanodiilo del tipo -(CH₂)_n-, donde n se

10 selecciona de entre 2 y 3; y

R¹ se selecciona de entre -CO₂H, -PO₃H₂, -SO₃H, -SO₂NH₂, -CONHR⁵, -PO(OH)NHR⁵, -PO(NHR⁵)₂ y -SO₂NHR⁵, siendo R⁵ seleccionado de entre alquilo(C₁-C₆), la estructura (A) y la estructura (A'):



15 donde m se selecciona de entre 2, 3 y 4; y Ln³⁺ es un lantánido, que se selecciona de entre La³⁺, Ce³⁺, Pr³⁺, Nd³⁺, Pm³⁺, Sm³⁺, Eu³⁺, Gd³⁺, Tb³⁺, Dy³⁺, Ho³⁺, Er³⁺, Tm³⁺, Yb³⁺, y Lu³⁺.

20

2. Compuesto según la reivindicación 1, donde X es Br.

3. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde R² es H.

4. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde R³ es metilo.

5. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, donde R^2 y R^3 forman un puente $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$.
- 5 6. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde R^1 es $-\text{CO}_2\text{H}$.
7. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 donde R^1 es $-\text{CONHR}^5$ siendo R^5 un grupo de estructura (A), donde m se selecciona de entre 2, 3 y 4.
- 10 8. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 donde R^1 es $-\text{CONHR}^5$ siendo R^5 un grupo de estructura (A'), donde m se selecciona de entre 2,3 y 4 y Ln^{3+} se selecciona de entre La^{3+} , Ce^{3+} , Eu^{3+} , y Tb^{3+} .
9. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 8 donde m es 2.
- 15 10. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 8 donde Ln^{3+} es La^{3+} , Eu^{3+} , o Tb^{3+} .
11. Compuesto según la reivindicación 1 donde el compuesto de fórmula (I) es:
20 - ácido 7-(2-(2-bromoacetamido)etoxi)-4-metil-2-oxo-1,2-dihidroquinolina-3-carboxílico; o
- ácido 8-(2-(2-bromoacetamido)etoxi)-2-oxo-1,2,4,5-tetrahidrociclopenta-[de]quinolina-3-carboxílico.
- 25 12. Uso de los compuestos de fórmula (I) según las reivindicaciones 1 a 11 como reactivos para el marcaje luminiscente de muestras biológicas.
13. Uso según la reivindicación anterior donde las muestras biológicas contienen péptidos, proteínas, y/o nanopartículas.
- 30 14. Uso según la reivindicación anterior donde el péptido se selecciona de entre secuencias peptídicas de substratos de quinasas y/o péptidos de 15 aminoácidos derivados de la proteína tau.
- 35 15. Uso según la reivindicación anterior donde la secuencia peptídica se selecciona de entre las que poseen una única cisteína.

16. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15 donde el marcaje se realiza en disolución o en fase sólida.
- 5 17. Biosensores luminiscentes que comprenden al menos un compuesto de fórmula (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.
- 10 18. Procedimiento de marcaje luminiscente de muestras biológicas aisladas que comprende poner en contacto dicha muestra biológica con al menos un compuesto de fórmula (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.
19. Procedimiento de marcaje según la reivindicación anterior donde el lantánido se añade *in situ* a través de su sal correspondiente.

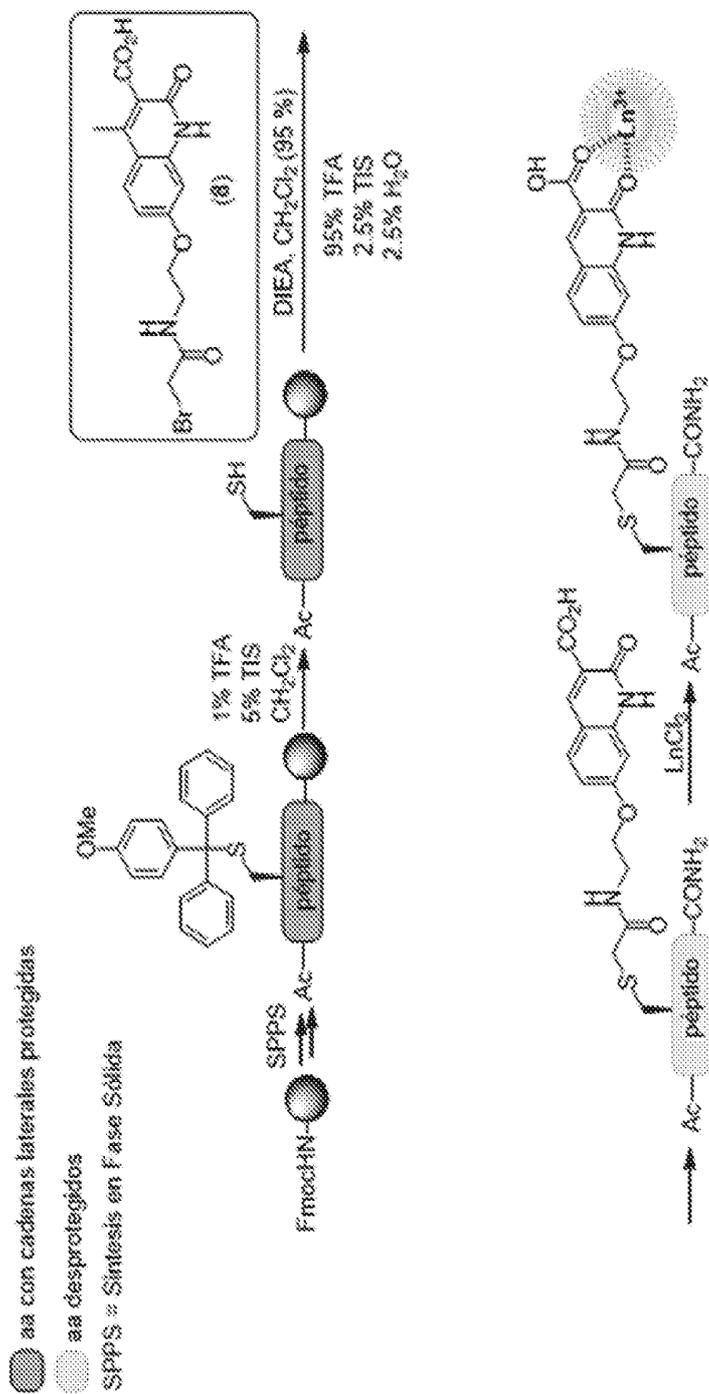


FIG. 1

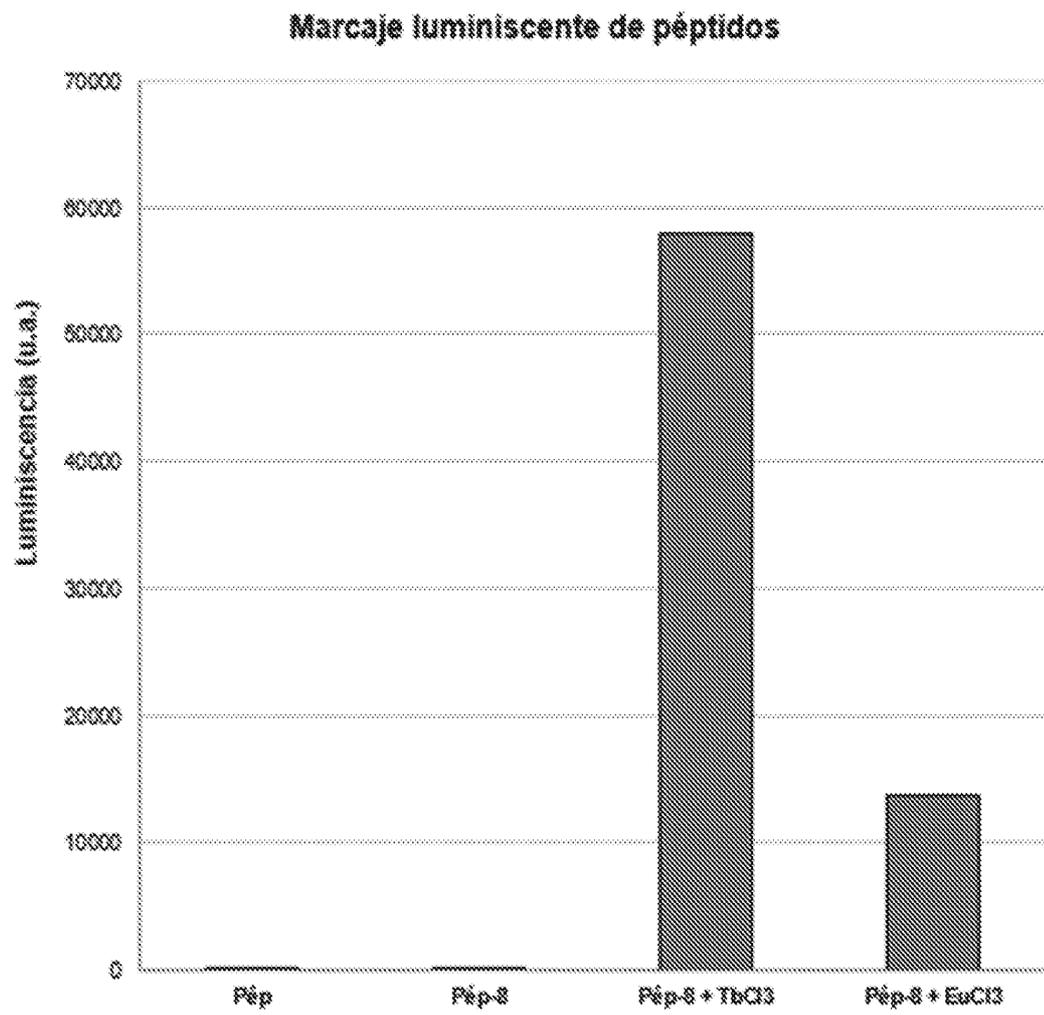


FIG. 2

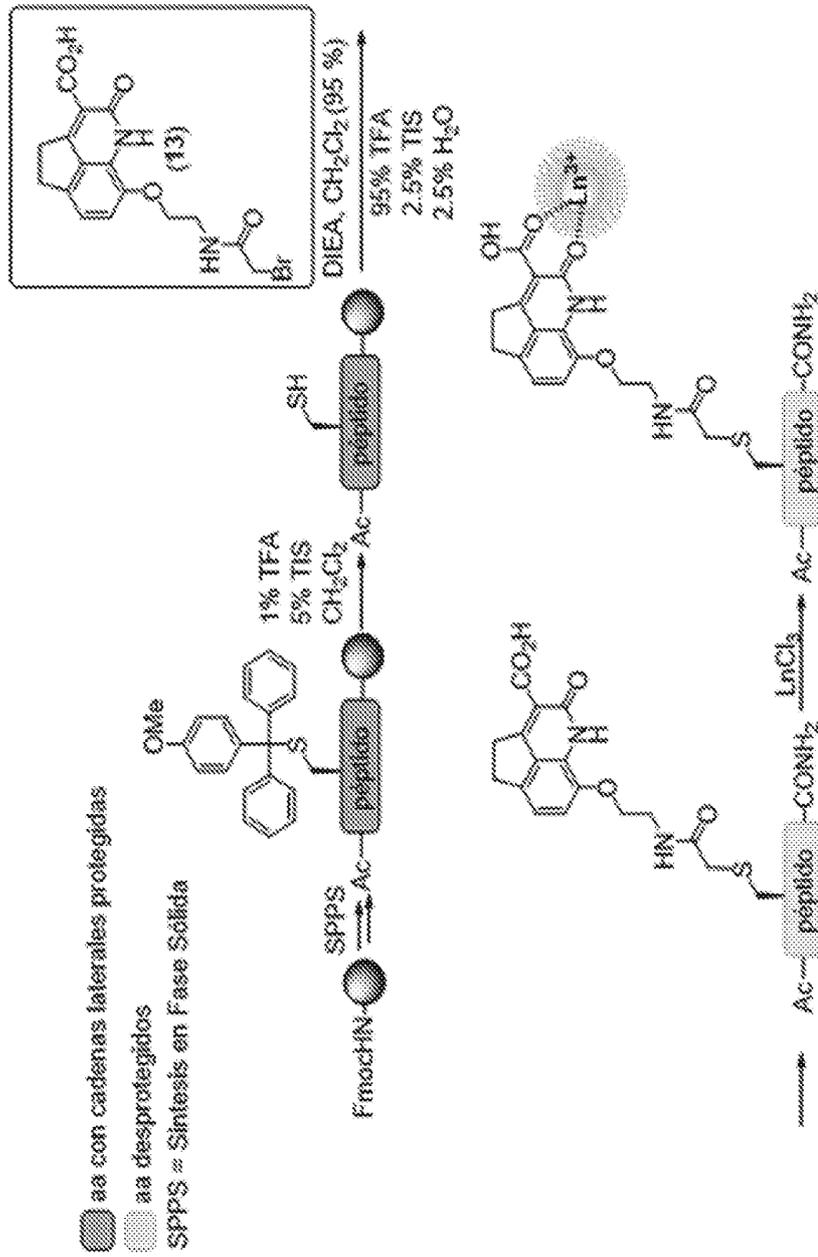


FIG. 3

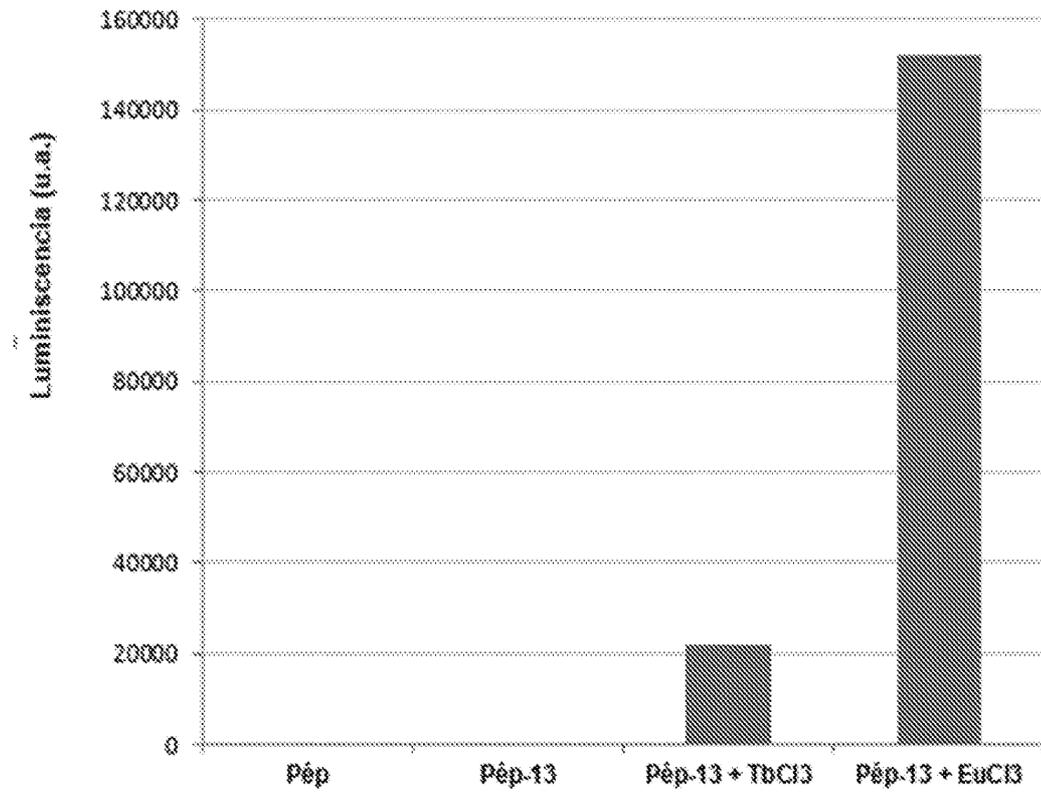
Marcaje luminiscente de péptidos

FIG. 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2021/070062

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07D, G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, WPI, NPL, XPESP, BIOSIS, REGISTRY, CAS.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| A | GE PINGHUA et al. "Carbostyryl derivatives as antenna molecules for luminescent lanthanide chelates". Bioconjugate Chemistry. September 31/08/2004, Vol. 15, Pages 1088-1094, ISSN 1043-1802. See abstract; experimental methods; figure 3; table 2. | 1-19 |
| A | QUICI et al. "Luminescence properties and solution dynamics of lanthanide complexes composed by a macrocycle hosting site and naphthalene or quinoline appended chromophore". INORGANICA CHIMICA ACTA, 29/04/2007, Vol. 360, Pages 2549 - 2557. ISSN 0020-1693, <DOI: doi:10.1016/j.ica.2006.12.040>. See abstract; scheme 1; experimental. | 1-19 |

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| * Special categories of cited documents: | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance. | |
| "E" earlier document but published on or after the international filing date | |
| "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone |
| "O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means. | "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art |
| "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | "&" document member of the same patent family |

Date of the actual completion of the international search
16/04/2021

Date of mailing of the international search report
(26/04/2021)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer
N. Martín Laso

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: 91 349 53 04

Telephone No. 91 3493278

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2021/070062

| C (continuation). | | DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |
|-------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|
| Category * | Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| A | JUAN A GONZALEZ-VERA et al. "Highly solvatochromic and tunable fluorophores based on a 4,5-quinolimide scaffold: novel CDK5 probes". Chemical Communications, 20160101 Royal Society of Chemistry, 01/01/2016, Vol. 52, Pages 9652 - 9655. , ISSN 1359-7345, <DOI: doi:10.1039/C6CC04566A>. See page 9652; scheme 2. | 1-19 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2021/070062

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07D215/24 (2006.01)

G01N21/64 (2006.01)

G01N33/52 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2021/070062

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver Hoja Adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

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

C07D, G01N

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

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

EPODOC, INVENES, WPI, NPL, XPESP, BIOSIS, REGISTRY, CAS.

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

| Categoría* | Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes | Relevante para las reivindicaciones nº |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| A | GE PINGHUA et al. " Carbostyryl derivatives as antenna molecules for luminescent lanthanide chelates". Bioconjugate Chemistry. September 31/08/2004, Vol. 15, Páginas 1088-1094, ISSN 1043-1802. Ver resumen; métodos experimentales; figura 3; tabla 2. | 1-19 |
| A | QUICI et al. "Luminescence properties and solution dynamics of lanthanide complexes composed by a macrocycle hosting site and naphthalene or quinoline appended chromophore". INORGANICA CHIMICA ACTA, 29/04/2007, Vol. 360, Páginas 2549 - 2557. , ISSN 0020-1693, <DOI: doi:10.1016/j.ica.2006.12.040>. Ver resumen; esquema 1, experimental. | 1-19 |

En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| * Categorías especiales de documentos citados: | "T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención. |
| "A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante. | |
| "E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior. | |
| "L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada). | "X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado. |
| "O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio. | "Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia. |
| "P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada. | |
| | "&" documento que forma parte de la misma familia de patentes. |

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
16/04/2021

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
26 de abril de 2021 (26/04/2021)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
N. Martín Laso

Nº de teléfono 91 3493278

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2021/070062

| C (Continuación). | | DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES |
|-------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| Categoría * | Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes | Relevante para las reivindicaciones nº |
| A | JUAN A GONZALEZ-VERA et al. "Highly solvatochromic and tunable fluorophores based on a 4,5-quinolimide scaffold: novel CDK5 probes". Chemical Communications, 20160101 Royal Society of Chemistry, 01/01/2016, Vol. 52, Páginas 9652 - 9655. , ISSN 1359-7345, <DOI: doi:10.1039/C6CC04566A>. Ver página 9652; esquema 2. | 1-19 |

CLASIFICACIONES DE INVENCION

C07D215/24 (2006.01)

G01N21/64 (2006.01)

G01N33/52 (2006.01)