

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 963 606**

51 Int. Cl.:

C09K 11/07	(2006.01) C07K 7/06	(2006.01)
A61K 38/05	(2006.01) C07K 5/062	(2006.01)
G01N 33/573	(2006.01)	
A61K 38/04	(2006.01)	
C09K 11/06	(2006.01)	
C07D 413/14	(2006.01)	
C07D 405/14	(2006.01)	
C07D 405/12	(2006.01)	
C07D 321/00	(2006.01)	
C07C 271/22	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.05.2018 PCT/IL2018/050557**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **29.11.2018 WO18216012**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.05.2018 E 18804980 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.08.2023 EP 3630742**

54 Título: **Sondas quimioluminiscentes para la obtención de imagen/detección de proteasas**

30 Prioridad:

24.05.2017 US 201762510370 P
13.09.2017 US 201762557881 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.04.2024

73 Titular/es:

RAMOT AT TEL-AVIV UNIVERSITY LTD. (100.0%)
P.O. Box 39296
6139201 Tel-Aviv, IL

72 Inventor/es:

SHABAT, DORON y
ROTH-KONFORTI, MICHAL ELI

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 963 606 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Sondas quimioluminiscentes para la obtención de imagen/detección de proteasas

CAMPO TÉCNICO

La presente invención proporciona sondas de quimioluminiscencia basadas en dioxetano capaces de detectar proteasas, así como composiciones y usos de las mismas.

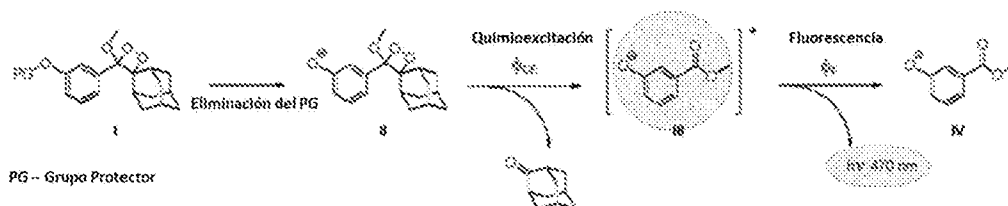
Abreviaturas: ACN, acetonitrilo; MCD, diclorometano; DIPEA, diisopropiletilamina; DMF, N,N'-dimetilformamida; EEDQ, N-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinolina; Et₂O, éter dietílico; Et₃N, trietilamina; EtOAc, acetato de etilo; HBTU, hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio; HPLC, cromatografía líquida de alta presión; K₂CO₃, Carbonato de potasio; MeOH, Alcohol metílico; Na₂S₂O₃, tiosulfato de sodio; Na₂SO₄, sulfato de sodio; NH₄Cl, cloruro amónico; PABA, ácido p-aminobenzoico; PEG, polietilenglicol; RLU, unidades de luz relativas; RP-HPLC, cromatografía líquida de alta presión en fase reversa; TFA, ácido trifluoroacético; TIPS, triisopropilsilano; TLC, cromatografía de capa fina; TMS-Cl, cloruro de trimetilsililo; 7HC, 7-hidroxycumarina.

ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA

Las proteasas son una clase de enzimas que realizan el catabolismo de las proteínas mediante la hidrólisis de enlaces peptídicos. Las proteasas tienen papeles fundamentales en numerosos procesos biológicos y se asocian con una amplia variedad de afecciones patológicas, incluyendo cáncer, artritis, trastornos neurodegenerativos y cardiovasculares. Con pruebas contundentes de la participación de las proteasas en las enfermedades, las proteasas desempeñan un papel importante en la obtención de imágenes y el desarrollo de fármacos. La catepsina B, una cisteína-proteasa lisosomal, es de gran importancia ya que se sobreexpresa en la matriz extracelular y pericelular en condiciones patológicas, en muchos tipos diferentes de cáncer, incluyendo, por ejemplo, cánceres de mama, cuello uterino, colon, colorrectal, gástrico, cabeza y cuello, hígado, pulmón, melanoma, ovario, páncreas, próstata y tiroides. Como tal, se han puesto muchos esfuerzos en desarrollar tecnologías de obtención de imágenes médicas y moleculares, centrándose en la actividad de la proteasa en general y la actividad de la catepsina B en particular. La mayor parte del desarrollo ha girado en torno a la obtención de imágenes ópticas, dirigidas a la obtención de imágenes por fluorescencia.

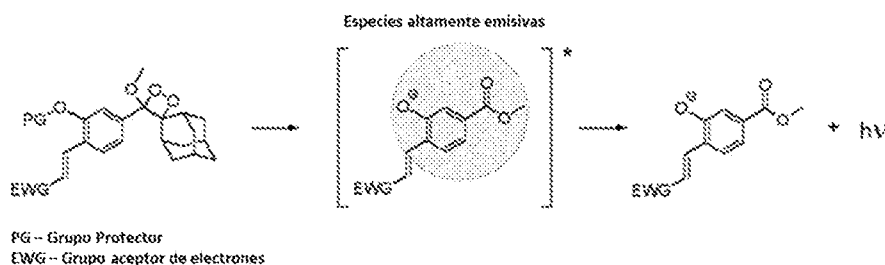
Aunque las imágenes de fluorescencia permiten una monitorización sensible, tienen desventajas, principalmente debido a que la autofluorescencia conduce a una baja relación señal-ruido. Por ejemplo, el documento de Patente US 2013/078188 A1 proporciona composiciones útiles como sondas moleculares y, en particular, proporciona péptidos activables que penetran en las células que comprenden un donante de fluorescencia y un aceptor de fluorescencia. Los ejemplos de donantes de fluorescencia y aceptores de fluorescencia incluyen compuestos derivados de cianina. Además, el documento de Patente WO 2012/123916 A2 describe compuestos fluorogénicos diseñados de manera que, ante un suceso químico, se generen compuestos capaces de emitir luz NIR. Los compuestos comprenden dos o más restos que contienen aceptor y un resto que contiene un donante escindible, que están en conjugación completa de electrones π y son tales que no se permite ninguna deslocalización de los electrones π . También se describen compuestos fluorescentes generados al someter los compuestos fluorogénicos a un suceso químico (por ejemplo, desprotonación). También se describen usos de los compuestos fluorogénicos como sondas NIR con un mecanismo de encendido para controlar la presencia y/o el nivel de diversos analitos. A diferencia de los ensayos basados en fluorescencia, los ensayos de quimioluminiscencia no requieren excitación luminosa, lo que da como resultado una sensibilidad añadida y una mayor relación señal-ruido. Por ejemplo, Green *et al.* (2017) describen una nueva metodología molecular para diseñar y prever las propiedades de emisión de luz de sondas de quimioluminiscencia de dioxetano de encendido adecuadas para su uso en condiciones fisiológicas.

Entre las sondas de quimioluminiscencia conocidas, las sondas de adamantilideno-dioxetano de Schaap (Esquema 1, estructura I) son las de mayor aplicabilidad, ya que contienen un resto de dioxetano estable, lo que las hace adecuadas para muchas condiciones químicas y biológicas. Como se muestra en Esquema 1, la sonda de quimioluminiscencia basada en adamantilideno-dioxetano de Schaap (estructura I) está equipada con un grupo protector sensible al analito utilizado para enmascarar el resto de fenol de la sonda. La eliminación del grupo protector por el analito de interés genera una especie II de fenolato-dioxetano inestable, que se descompone mediante un proceso de quimioexcitación para producir el éster de benzoato III intermedio excitado y adamantanona. El intermedio excitado decae a su estado fundamental (éster de benzoato IV) mediante la emisión de un fotón de luz azul.

Esquema 1: vía de activación quimioluminiscente del adamantiliden-dioxetano de Schaap

Richard *et al.* (2007) desarrollaron previamente sondas de quimioluminiscencia de encendido, que llevan un sustrato sensible a proteasa (penicilina g-amidasa o caspasa-3) que enmascara el fenol de los luminóforos de dioxetano. Aunque estas sondas muestran una relación señal-ruido destacada, prohíben la obtención de imágenes de proteasas de células vivas, ya que requieren un ensayo de dos etapas. Primero, la proteasa escinde el grupo protector a pH fisiológico (7,4) y después la mezcla se añade a un tampón con un pH de 12,3, lo que permite que ocurra el proceso de quimioexcitación. Más ejemplarmente, Richard *et al.* (2009) describen una nueva generación de sustratos quimioluminiscentes basados en dioxetano adecuados para detectar actividades de proteasa que implican el uso de un espaciador autoescindible como componente molecular clave de las sondas de quimioluminiscencia sensibles a proteasa.

El documento de Patente International Publication No. WO 2017/130191 describe sondas de quimioluminiscencia basadas en la sonda de adamantilideno-dioxetano de Schapp, en las que la emisión de quimioluminiscencia se amplifica a través de un modo de acción directo, más particularmente en las que la sonda de adamantilideno-dioxetano de Schapp está sustituida en la posición *orto* del anillo fenólico con un grupo aceptor π^* tal como un grupo aceptor de electrones de acrilato y acrilonitrilo para aumentar la naturaleza emisiva de las especies de benzoato (Esquema 2). Como se muestra en esta publicación, las sondas de quimioluminiscencia descritas permiten que la hidrólisis enzimática y el proceso de quimioexcitación se produzcan simultáneamente en condiciones fisiológicas, con intensidades de quimioluminiscencia notables.

Esquema 2: modo de quimioluminiscencia directa obtenida sustituyendo la sonda de adamantiliden-dioxetano de Schaap en la posición *orto* del anillo fenólico con un grupo aceptor π^* 

Más ejemplarmente, Eilon-Shaffer *et al.* (2018) describen una metodología que ha permitido mejorar la naturaleza emisiva de las especies excitadas, formadas durante la quimioexcitación de dioxetanos en condiciones fisiológicas. Este enfoque ha dado como resultado el descubrimiento de distintos luminóforos de fenoxi-dioxetano que producen una señal de quimioluminiscencia a través de un modo de emisión directa. Se ha demostrado un efecto significativo del pKa de los fenoxi-dioxetanos en su quimioexcitación y en su capacidad para servir como sondas de quimioluminiscencia de encendido para aplicaciones biológicas. Utilizando una sonda de fenoxi-dioxetano adecuada con un modo de emisión directa, se han podido obtener imágenes de la actividad de la β -galactosidasa en células cancerosas y en ratones con tumores.

Además, Tsuchikama *et al.* (2018) revisa los aspectos moleculares de cada componente de los conjugados anticuerpo-fármaco (el anticuerpo, la carga útil y el enlazador) y analiza las tecnologías tradicionales y nuevas de la conjugación y la química del enlazador para la construcción exitosa de ADCs clínicamente eficaces. Por ejemplo, el desarrollo de metodologías de conjugación específicas de sitio para construir ADCs homogéneos se describe como un camino especialmente prometedor para mejorar el diseño de ADC.

Más ejemplarmente, Harris *et al.* (2003) revisa cómo la PEGilación puede dar lugar a fármacos que a menudo son más eficaces y seguros, y que muestran una mayor comodidad y cumplimiento por parte del paciente, en particular en lo que respecta a los fármacos proteicos y peptídicos.

En un ejemplo adicional, Griffin *et al.* (2017) describen que la lesión mecánica focal del urotelio mejora en gran medida la unión y la penetración del péptido penetrante de células CGKRK (Cys-Gly-Lys-Arg-Lys) administrado por vía intravesical. Se describe que el CGKRK se une a todo el urotelio y el péptido es capaz de penetrar en la capa muscular. También se demostró que la capacidad de CGKRK para unirse y penetrar eficazmente en el urotelio se puede aplicar

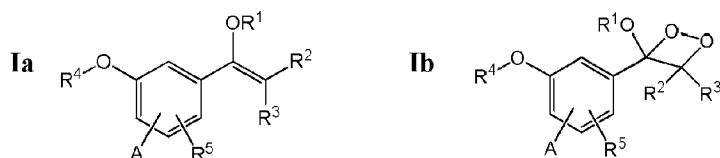
a la mucosa dirigida a nanogeles conjugados con CGKRR para permitir el suministro eficaz y generalizado de una carga útil modelo (rodamina) a la mucosa de la vejiga.

Como un ejemplo adicional, el documento de Patente WO 2012/092373 A2 describe composiciones para el suministro de polinucleótidos del RNA de interferencia (RNAi) a células in vivo. Las composiciones comprenden poliaminas activas de membrana anfipática modificadas reversiblemente con agentes enmascarantes de dipéptido-amidobencil-carbonato escindible con enzimas. La modificación enmascara la actividad de la membrana del polímero, mientras que la reversibilidad proporciona una capacidad de respuesta fisiológica. Las poliaminas modificadas de forma reversible (policonjugado dinámico o DPC) se unen además covalentemente a un polinucleótido de RNAi o se coadministran con un conjugado de molécula dirigida a polinucleótido de RNAi dirigido.

COMPENDIO DE LA INVENCIÓN

La presente invención proporciona sondas de quimioluminiscencia basadas en dioxetano de encendido basadas en las descritas en el documento de Patente International Publication No. WO 2017/130191 y construidas con un sustrato escindible por proteasa, que tras la degradación enzimática revela luminóforos de dioxetano capaces de emitir una señal quimioluminiscente. Las sondas descritas incluyen un luminóforo de dioxetano que se puede adaptar con diferentes halógenos, cambiando el pKa del luminóforo, y un grupo aceptor de electrones, que produce un par donador-aceptor que proporciona una fuerte señal quimioluminiscente, lo que permite que las sondas se utilicen en condiciones acuosas.

Más particularmente, en un aspecto, la presente invención proporciona un compuesto de la fórmula Ia o Ib:

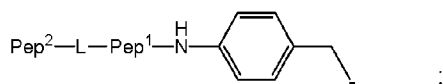


en donde

R¹ se selecciona de un alquilo de (C₁-C₁₈), o cicloalquilo de (C₃-C₇) lineal o ramificado;

R² y R³ se seleccionan cada uno independientemente de un alquilo de (C₃-C₁₈) o cicloalquilo de (C₃-C₇) ramificado, o R² y R³ junto con el átomo de carbono al que están unidos forman un anillo cíclico o policíclico fusionado, espiro o con puente;

R⁴ es un grupo de la fórmula:



R⁵ es H, o halógeno unido en *orto* o *para* al grupo -O-R⁴;

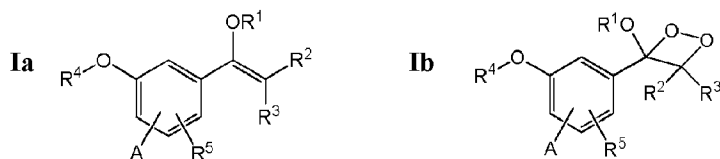
A es un grupo aceptor π* de fórmula -CH=CH-E, unido ya sea en *orto* o *para* al grupo -O-R⁴, en donde E es -CN, -COOH, -COO-alquilo de (C₁-C₁₈), 4-piridinilo, metilpiridin-4-ilo, 3,3-dimetil-3H-indolilo o 1,3,3-trimetil-3H-indol-1-ilo-2-ilo;

Pep¹ es un resto peptídico escindible por proteasa que consiste en al menos dos restos de aminoácidos y está unido mediante un grupo carboxílico del mismo al grupo anilina, en donde dicho resto peptídico está protegido o unido a través de un grupo amino del mismo a un grupo que contiene polietilenglicol (PEG);

L está ausente; y

Pep² está ausente.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un compuesto de la fórmula Ia o Ib:

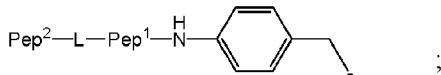


en donde

R¹ se selecciona de un alquilo de (C₁-C₁₈), o cicloalquilo de (C₃-C₇) lineal o ramificado;

R² y R³ se seleccionan cada uno independientemente de un alquilo de (C₃-C₁₈) o cicloalquilo de (C₃-C₇) ramificado, o R² y R³ junto con el átomo de carbono al que están unidos forman un anillo cíclico o policíclico fusionado, espiro o con puente;

R⁴ es un grupo de la fórmula:



R⁵ es H, o halógeno unido en *orto* o *para* al grupo -O-R⁴;

A es un grupo aceptor π^* de fórmula -CH=CH-E, unido ya sea en *orto* o *para* al grupo -O-R⁴, en el que E es -CN, -COOH, -COO-alquilo de (C₁-C₁₈), 4-piridinilo, metilpiridin-4-ilo, 3,3-dimetil-3H-indolilo o 1,3,3-trimetil-3H-indol-1-ilo-2-ilo;

10 Pep¹ es un resto peptídico escindible por proteasa que consiste en al menos dos restos de aminoácidos y está unido mediante un grupo carboxílico del mismo al grupo anilina;

L es un enlazador unido a Pep¹ mediante un enlace amida a través de un grupo carboxilo o amino de Pep¹; y

Pep² es un resto peptídico que penetra en las células unido a L mediante un enlace amida a través de un grupo amino o carboxilo del mismo, o a través de un grupo tiol del mismo.

15 En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, que comprende una sonda de quimioluminiscencia basada en dioxetano como se describe en la presente memoria, es decir, un compuesto de fórmula Ia/Ib como se define anteriormente, y un vehículo, por ejemplo, un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los compuestos y composiciones de la invención se pueden usar para la obtención de imágenes/detección de una proteasa tal como catepsina, legumaina, antígeno específico de la próstata (PSA) y una metaloproteasa, tanto *in vitro* como *in vivo*.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere por lo tanto a una sonda de quimioluminiscencia basada en dioxetano como se describe en la presente memoria, es decir, un compuesto de fórmula Ia/Ib como se define anteriormente, o una composición farmacéutica que comprende dicho compuesto, para su uso *in vivo* en diagnóstico u obtención de imágenes, más específicamente, para determinar la presencia o medir el nivel de una proteasa *in vivo*.

25 En otro aspecto más, la presente invención se refiere a un método para determinar la presencia, o medir el nivel, de una proteasa en una muestra, por ejemplo, una muestra biológica tal como un fluido corporal, una solución basada en fluido corporal o una muestra de biopsia de tejido, comprendiendo dicho método (i) poner en contacto dicha muestra con una sonda de quimioluminiscencia basada en dioxetano de fórmula Ia/Ib como se define anteriormente en donde Pep¹ es un grupo escindible por dicha proteasa, o una composición que comprende dicho compuesto, para de ese modo hidrolizar dicho compuesto a una especie emisiva por dicha proteasa, cuando está presente en dicha muestra; y (ii) detectar la emisión de quimioluminiscencia de dichas especies emisivas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

35 Las Figuras 1A-1C muestran los perfiles cinéticos de quimioluminiscencia de las sondas 1, 2, 3 y 4 [1 μ M] en tampón de actividad (pH 7,4, DMSO al 10%) en presencia de 2,5 unidades/mL de catepsina B a temperatura ambiente (1A; el recuadro se centra en el perfil cinético de la sonda 1); la luz total emitida por cada sonda (1B); y la señal máxima producida por cada sonda (1C).

La Figura 2 muestra el perfil cinético de quimioluminiscencia y el análisis por HPLC de la degradación enzimática de la sonda 4 [10 μ M] en tampón de actividad (pH 7,4, DMSO al 10%) con 2,5 U/mL de catepsina B. La sonda 4 se muestra esquemáticamente.

40 La Figura 3 muestra la luz transmitida y las imágenes de quimioluminiscencia de la actividad de la catepsina B en Raw 264.7, células tumorales CT26 y células normales 3T3. Las imágenes se obtuvieron después de 30 minutos de incubación con medio de cultivo celular que contenía la sonda 3 o la sonda 4 (5 μ M) y se tomaron usando el microscopio LV200 Olympus con un objetivo de 60 $\times$ y un tiempo de exposición de 20 minutos. Imagen de microscopía de quimioluminiscencia e imagen de luz transmitida de células Raw 246.7 incubadas con la sonda 3 (a y b, respectivamente); Imagen de microscopía de quimioluminiscencia e imagen de luz transmitida de células Raw 246.7 incubadas con la sonda 4 (c y d, respectivamente); Imagen de microscopía de quimioluminiscencia e imagen de luz transmitida de células CT26 incubadas con la sonda 3 (e y f, respectivamente); Imagen de microscopía de quimioluminiscencia e imagen de luz transmitida de células CT26 incubadas con la sonda 4 (g y h, respectivamente); Imagen de microscopía de quimioluminiscencia e imagen de luz transmitida de células 3T3 incubadas con la sonda 3 (i y j, respectivamente); Imagen de microscopía de quimioluminiscencia e imagen de luz transmitida de células 3T3 incubadas con la sonda 4 (k y l, respectivamente).

La Figura 4 muestra los valores de la relación señal/ruido para la sonda 4 y Z-Val-Cit-PABA-7HC representados frente a diferentes concentraciones de catepsina B en escalas logarítmicas.

La Figura 5 muestra los perfiles cinéticos de quimioluminiscencia de la sonda 5 [10 μ M] en tampón Tris (pH 7,8, DMSO al 10%) en presencia de 10 mg/mL de PSA a temperatura ambiente.

5

DESCRIPCIÓN DETALLADA

En un aspecto, la presente invención proporciona una sonda de quimioluminiscencia de encendido basada en dioxetano, más específicamente un compuesto de la fórmula Ia o Ib, como se define anteriormente.

El término "alquilo" normalmente significa un radical de hidrocarburo lineal o ramificado que tiene, por ejemplo, de 1-18 átomos de carbono e incluye metilo, etilo, *n*-propilo, isopropilo, *n*-butilo, sec-butilo, isobutilo, *tert*-butilo, *n*-pentilo, isoamilo, 2,2-dimetilpropilo, *n*-hexilo, *n*-heptilo, *n*-octilo, *n*-nonilo, *n*-decilo, *n*-undecilo, *n*-dodecilo, *n*-tridecilo, *n*-tetradecilo, *n*-pentadecilo, *n*-hexadecilo y similares. Los preferidos son grupos alquilo de (C_1 - C_8), más preferiblemente grupos alquilo de (C_1 - C_4), lo más preferiblemente metilo, etilo e isopropilo.

El término "alquilenos" se refiere a un radical de hidrocarburo divalente lineal o ramificado derivado después de la eliminación del átomo de hidrógeno de un alquilo. Los ejemplos de alquilenos incluyen, sin estar limitado a, metileno, etileno, propileno, butileno, 2-metilpropileno, pentileno, 2-metilbutileno, hexileno, 2-metilpentileno, 3-metilpentileno, 2,3-dimetilbutileno, heptileno, octileno, *n*-tridecanileno, *n*-tetradecanileno, *n*-pentadecanileno, *n*-hexadecanileno, *n*-heptadecanileno, *n*-octadecanileno, *n*-nonadecanileno, icosanileno, henicosanileno, docosanileno, tricosanileno, tetracosanileno, pentacosanileno y similares. El término "cadena de alquilenos" se refiere a un grupo de fórmula $-(CH_2)_n$ - derivado después de la eliminación de dos átomos de hidrógeno de un hidrocarburo lineal de la fórmula C_nH_{2n+2} .

El término "cicloalquilo" significa un grupo hidrocarburo saturado mono o bicíclico que tiene, por ejemplo, de 3 a 7 átomos de carbono, tal como ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo y similares, que puede estar sustituido, por ejemplo, por uno o más grupos alquilo.

El término "halógeno", tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un halógeno e incluye flúor, cloro, bromo y yodo, pero es preferiblemente flúor o cloro.

El término "aminoácido", tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un compuesto orgánico que comprende grupos funcionales tanto de amina como de ácido carboxílico, que puede ser un aminoácido natural o no natural. Los veintidós aminoácidos de origen natural en las proteínas son ácido aspártico (Asp), tirosina (Tyr), leucina (Leu), triptófano (Trp), arginina (Arg), valina (Val), ácido glutámico (Glu), metionina (Met), fenilalanina (Phe), serina (Ser), alanina (Ala), glutamina (Gln), glicina (Gly), prolina (Pro), treonina (Thr), asparagina (Asn), lisina (Lys), histidina (His), isoleucina (Ile), cisteína (Cys), selenocisteína (Sec) y pirrolisina (Pyl). Los ejemplos no limitantes de otros aminoácidos incluyen citrulina (Cit), ácido diaminopropiónico (Dap), ácido diaminobutírico (Dab), ornitina (Orn), ácido aminoadípico, β -alanina, 1-naftilalanina, 3-(1-naftil)alanina, 3-(2-naftil)alanina, ácido γ -aminobutírico (GABA), ácido 3-(aminometil)benzoico, *p*-etilfenilalanina, *p*-propargly-oxi-fenilalanina, *m*-etilfenilalanina, *p*-bromofenilalanina, *p*-yodofenilalanina, *p*-azidofenilalanina, *p*-acetil fenilalanina, norleucina (Nle), azidonorleucina, 6-etil-triptófano, 5-etil-triptófano, 3-(6-cloroindolil)alanina, 3-(6-bromoindolil)alanina, 3-(5-bromoindolil)alanina, azidohomoalanina, *p*-clorofenilalanina, ácido α -aminocaprílico, O-metil-L-tirosina, N-acetilgalactosamina- α -treonina y N-acetilgalactosamina- α -serina.

El término "resto de aminoácido" como se usa en la presente memoria se refiere a un resto de un aminoácido después de la eliminación de un átomo de hidrógeno de un grupo amino del mismo, por ejemplo, su grupo α -amino o grupo amino de la cadena lateral si está presente, y el grupo -OH de un grupo carboxilo del mismo, por ejemplo, su grupo α -carboxilo o grupo carboxilo de la cadena lateral si está presente.

El término "péptido" se refiere a una cadena corta de monómeros (restos) de aminoácidos, por ejemplo, una cadena que consiste en 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más restos de aminoácidos, unidos por enlaces peptídicos, es decir, el enlace covalente formado cuando un grupo carboxilo de un aminoácido reacciona con un grupo amino de otro. El término "resto peptídico" como se usa en la presente memoria se refiere a un resto de un péptido como se define en la presente memoria después de la eliminación de un átomo de hidrógeno de un grupo carboxílico, es decir, el grupo carboxílico terminal o de la cadena lateral del mismo, y/o un átomo de hidrógeno de un grupo amino, es decir, el grupo amino terminal o de la cadena lateral del mismo.

El término "enlace peptídico" o "enlace amida" tal y como se usa en la presente memoria se refiere al enlace covalente $-C(O)NH-$ formado entre dos moléculas, por ejemplo, dos aminoácidos, cuando un grupo carboxilo de una de las moléculas reacciona con un grupo amino de la otra molécula, provocando la liberación de una molécula de agua.

El término "grupo protector de amino" tal y como se usa en la presente memoria se refiere a cualquier grupo protector de amino conocido en la técnica. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente qué grupo(s) protector(s) pueden ser útiles para la protección del(los) grupo(s) amino, y los métodos estándar son conocidos en la técnica y se

describen en la bibliografía. Por ejemplo, los grupos protectores adecuados se describen en Green and Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis", John Wiley and Sons, Chapter 7, 1991. Los grupos protectores de amino preferidos incluyen carbobenciloxi (carboxibencilo, Cbz), N-morfolincarbonilo, *p*-metoxibencil carbonilo, *tert*-butiloxycarbonilo (Boc), 9-fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc), acetilo, bencilo, un grupo carbamato, *p*-metoxibencilo (PMB), 3,4-dimetoxibencilo (DMPM), *p*-metoxifenilo (PMP) y un grupo tosilo.

El término "grupo aceptor π^* " tal y como se usa en la presente memoria se refiere a un grupo que contiene un sistema aceptor π^* capaz de aceptar electrones, más específicamente a un grupo de la fórmula $-\text{CH}=\text{CH}-\text{E}$, en donde E es $-\text{CN}$, $-\text{COOH}$, $-\text{COO}-\text{alquilo}$ de (C_1-C_{18}), preferiblemente $-\text{COO}-\text{alquilo}$ de (C_1-C_8), más preferiblemente $-\text{COO}-\text{alquilo}$ de (C_1-C_4), 4-piridinilo, metilpiridin-4-ilo, 3,3-dimetil-3H-indolilo o 1,3,3-trimetil-3H-indol-1-ilo-2-ilo (véase también la Tabla 1).

Tabla 1: Diversos grupos A aceptores π^* de fórmula $-\text{CH}=\text{CH}-\text{E}$ (los nombres se refieren al grupo E)

4-piridinilo	metilpiridin-4-ilo	3,3-dimetil-3H-indolilo	1,3,3-trimetil-3H-indol-1-ilo-2-ilo

En ciertas realizaciones, la invención proporciona un compuesto de fórmula Ia o Ib, en el que R^1 es un alquilo de (C_1-C_8) lineal o ramificado, preferiblemente alquilo de (C_1-C_4), más preferiblemente metilo, etilo o isopropilo.

En ciertas realizaciones, la invención proporciona un compuesto de fórmula Ia o Ib, en el que R^2 y R^3 cada uno de forma independiente es un alquilo de (C_3-C_{18}) o cicloalquilo de (C_3-C_7) lineal o ramificado. En otras realizaciones, R^2 y R^3 junto con el átomo de carbono al que están unidos forman un anillo policíclico fusionado, espiro o con puente. En una realización particular de este tipo, R^2 y R^3 junto con el átomo de carbono al que están unidos forman adamantilo.

En ciertas realizaciones, la invención proporciona un compuesto de la fórmula Ia o Ib, en el que R^5 es halógeno, por ejemplo, Cl o F, unido en *orto* al grupo $-\text{O}-\text{R}^4$.

En determinadas realizaciones, la invención proporciona un compuesto de la fórmula Ia o Ib, en el que A es $-\text{CH}=\text{CH}-\text{E}$ unido en *orto* al grupo $-\text{O}-\text{R}^4$, en donde E es $-\text{CN}$, $-\text{COOH}$, $-\text{COO}-\text{alquilo}$ de (C_1-C_8), por ejemplo, $-\text{COO}-\text{alquilo}$ de (C_1-C_4) tal como $-\text{COOCH}_3$, $-\text{COOC}_2\text{H}_5$, $-\text{COOC}_3\text{H}_7$, $-\text{COOCH}(\text{CH}_3)_2$, o $-\text{COOC}(\text{CH}_3)_3$, 4-piridinilo, metilpiridin-4-ilo, 3,3-dimetil-3H-indolilo o 1,3,3-trimetil-3H-indol-1-ilo-2-ilo. En particular dichas realizaciones, E es $-\text{CN}$, $-\text{COOH}$, $-\text{COOCH}_3$, $-\text{COOC}_2\text{H}_5$, $-\text{COOC}_3\text{H}_7$, $-\text{COOCH}(\text{CH}_3)_2$, o $-\text{COOC}(\text{CH}_3)_3$.

En ciertas realizaciones, la invención proporciona un compuesto de la fórmula Ia o Ib, en el que R^1 es un alquilo de (C_1-C_8) lineal o ramificado, preferiblemente un alquilo de (C_1-C_4), más preferiblemente metilo, etilo o isopropilo; R^2 y R^3 junto con el átomo de carbono al que están unidos forman un anillo policíclico fusionado, espiro o con puente; R^5 es un halógeno unido en *orto* al grupo $-\text{O}-\text{R}^4$; y A es $-\text{CH}=\text{CH}-\text{E}$ unido en *orto* al grupo $-\text{O}-\text{R}^4$, en donde E es $-\text{CN}$, $-\text{COOH}$, $-\text{COO}-\text{alquilo}$ de (C_1-C_8), 4-piridinilo, metilpiridin-4-ilo, 3,3-dimetil-3H-indolilo o 1,3,3-trimetil-3H-indol-1-ilo-2-ilo. Dichas realizaciones particulares son aquellas en las que R^1 es metilo; R^2 y R^3 junto con el átomo de carbono al que están unidos forman adamantilo; R^5 es halógeno unido en *orto* al grupo $-\text{O}-\text{R}^4$; y E es $-\text{CN}$, $-\text{COOH}$ o $-\text{COO}-\text{alquilo}$ de (C_1-C_4) tal como $-\text{COOCH}_3$, $-\text{COOC}_2\text{H}_5$, $-\text{COOC}_3\text{H}_7$, $-\text{COOCH}(\text{CH}_3)_2$, o $-\text{COOC}(\text{CH}_3)_3$. Dichas realizaciones más particulares son aquellas en las que E es $-\text{CN}$, $-\text{COOH}$, $-\text{COOCH}_3$, o $-\text{COOC}(\text{CH}_3)_3$, es decir, A es un sustituyente acrilonitrilo, ácido acrílico, metilacrilato o *tert*-acrilato de butilo, respectivamente, unido en *orto* al grupo $-\text{O}-\text{R}^4$.

Como se describió anteriormente, las sondas de quimioluminiscencia de la presente invención tienen un resto peptídico escindible por proteasa (también denominado "peptidasa" o "proteínasa") (identificado en la presente memoria como Pep¹ que es parte del grupo R^4), es decir, un resto de una secuencia de aminoácidos, opcionalmente modificada, que es escindible por una proteasa, es decir, una enzima capaz de realizar la proteólisis (catabolismo de proteínas) mediante hidrólisis de enlaces peptídicos, en donde la eliminación de dicho grupo escindible por la proteasa particular de interés genera una especie inestable de fenolato-dioxetano que se descompone mediante un proceso de quimioexcitación para producir el intermedio excitado, que después decae a su estado fundamental mediante la emisión de luz.

La proteasa a la que se hace referencia a lo largo de esta especificación puede ser cualquier proteasa tal como una proteasa de serina, una proteasa de cisteína, una proteasa de treonina, una proteasa de aspártico, una proteasa de

glutámico o una metaloproteasa, es decir, una enzima de proteasa cuyo mecanismo catalítico implica un metal (normalmente zinc).

En determinadas realizaciones, la proteasa a la que se hace referencia en la presente memoria es una catepsina tal como catepsina A o G (proteasas de serina); catepsina B, C, F, H, K, L1, L2, O, S, W o Z (proteasas de cisteína); y catepsina D o E (proteasa de aspartilo).

En ciertas realizaciones particulares de este tipo, la sonda de quimioluminiscencia de la fórmula Ia/Ib tiene como objetivo detectar la presencia, más particularmente la sobreexpresión, de catepsina B, una proteasa de cisteína lisosomal implicada en la proteólisis intracelular, que se sobreexpresa en lesiones premalignas y diversas afecciones patológicas, así como en cánceres, por ejemplo, en células endoteliales tumorales y muchas otras células tumorales en el lisosoma (Miller *et al.*, 2009). Los péptidos escindibles por catepsina B incluyen, sin limitación, péptidos que comprenden o consisten en la secuencia de aminoácidos Val-Cit, Phe-Lys o Gly-Phe-Leu-Gly (dichos péptidos se unirán a través del grupo carboxílico de la citrulina, lisina o glicina, respectivamente, al grupo anilina de R⁴).

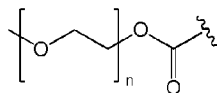
En otras realizaciones particulares de este tipo, la sonda de quimioluminiscencia de la fórmula Ia/Ib tiene como objetivo detectar la presencia, más particularmente la sobreexpresión, de catepsina K, una proteasa de cisteína lisosomal implicada en la remodelación y resorción ósea, que se expresa predominantemente en osteoclastos y se sobreexpresa extracelularmente en neoplasias óseas (Segal *et al.*, 2009). Los péptidos escindibles por catepsina K incluyen, sin limitación, péptidos que comprenden la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Pro-Nle (dichos péptidos se unirán a través del grupo carboxílico de la norleucina al grupo anilina de R⁴).

En determinadas realizaciones, la proteasa a la que se hace referencia en la presente memoria es legumaina, una enzima lisosomal que se sobreexpresa en células tumorales (Stern *et al.*, 2009), y la sonda de quimioluminiscencia de la fórmula Ia/Ib tiene como objetivo detectar la presencia, más particularmente la sobreexpresión, de dicha proteasa. Los péptidos escindibles por legumaina incluyen, sin limitación, péptidos que comprenden la secuencia de aminoácidos Ala-Ala-Asn (dichos péptidos se unirán a través del grupo carboxílico de la asparagina al grupo anilina de R⁴).

En determinadas realizaciones, la proteasa a la que se hace referencia en la presente memoria es PSA (también conocida como calicreína-3), un miembro de la familia de proteasas relacionadas con la calicreína que es secretada por las células epiteliales de la glándula prostática y utilizada como marcador para el cáncer de próstata u otros trastornos de la próstata, y la sonda de quimioluminiscencia de fórmula Ia/Ib tiene como objetivo detectar la presencia, más particularmente la sobreexpresión, de dicha proteasa. Los péptidos escindibles por PSA incluyen, sin estar limitados a, péptidos que comprenden la secuencia de aminoácidos His-Ser-Ser-Lys-Leu-Gln (dichos péptidos se unirán a través del grupo carboxílico de la glutamina al grupo anilina de R⁴).

En determinadas realizaciones, la proteasa a la que se hace referencia en la presente memoria es una metaloproteasa de matriz (MMP), es decir, un miembro de la familia de endopeptidasas dependientes de Zn que son colectivamente capaces de hidrolizar todas las proteínas de la matriz extracelular y, por lo tanto, desempeñan funciones importantes en procesos fisiológicos tales como morfogénesis y reparación de tejidos. Las MMPs también contribuyen de manera importante a la progresión del cáncer al promover la invasión de células tumorales de la membrana basal y el estroma, la penetración de los vasos sanguíneos y la metástasis. Numerosos estudios han demostrado, por ejemplo, que MMP9 es fundamental para la formación del nicho premetastático y tiene un papel distinto en la angiogénesis tumoral al regular la biodisponibilidad del factor de crecimiento endotelial vascular. Clínicamente, los niveles elevados de MMP9 se correlacionan con la agresividad, el estadio y el mal pronóstico del tumor en una amplia gama de tipos de cáncer. También se han publicado datos con respecto a MMP2.

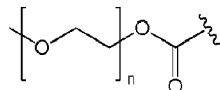
En determinadas realizaciones, la invención proporciona un compuesto de la fórmula Ia o Ib como se define en una cualquiera de las realizaciones anteriores, en donde Pep¹ es un resto peptídico escindible por proteasa que comprende, o consiste en, la secuencia de aminoácidos Val-Cit, Phe-Lys, Gly-Phe-Leu-Gly, Gly-Gly-Pro-Nle, Ala-Ala-Asn o His-Ser-Ser-Lys-Leu-Gln, en donde dicha secuencia de aminoácidos se une mediante el grupo carboxílico de la citrulina, lisina, glicina, norleucina, asparagina o glutamina, respectivamente, al grupo anilina de R⁴; y se protege en un grupo amino del mismo, o se une mediante un enlace amida y a través de dicho grupo amino a un grupo que contiene PEG, por ejemplo, un grupo que contiene PEG de la fórmula:



en donde n es un número entero de 1 a 227.

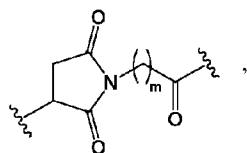
En determinadas realizaciones particulares de este tipo, Pep¹ es un resto peptídico escindible por proteasa de la secuencia Val-Cit, Phe-Lys, Gly-Phe-Leu-Gly, Gly-Gly-Pro-Nle, Ala-Ala-Asn o His-Ser-Ser-Lys-Leu-Gln, unidos a través del grupo carboxílico de la citrulina, lisina, glicina, norleucina, asparagina o glutamina, respectivamente, al grupo anilina, y protegidos en el grupo α-amino de la valina, fenilalanina, glicina, glicina, alanina o histidina, respectivamente, con un grupo protector de amino, por ejemplo, carboxibencilo o N-morfolincarbonilo.

En otras realizaciones particulares de este tipo, Pep¹ es un resto peptídico escindible por proteasa de la secuencia Val-Cit, Phe-Lys, Gly-Phe-Leu-Gly, Gly-Gly-Pro-Nle, Ala-Ala-Asn o His-Ser-Ser-Lys-Leu-Gln, unidos mediante el grupo carboxílico de la citrulina, lisina, glicina, norleucina, asparagina o glutamina, respectivamente, al grupo anilina, y unidos mediante el grupo α-amino de la valina, fenilalanina, glicina, glicina, alanina o histidina, respectivamente, a un grupo que contiene PEG de la fórmula:



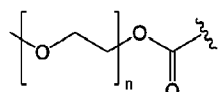
en donde n es un número entero de 1 a 227.

En determinadas realizaciones, la invención proporciona un compuesto de la fórmula Ia o Ib como se define en una cualquiera de las realizaciones anteriores, en donde Pep¹ es un resto peptídico escindible por proteasa que comprende, o consiste en, la secuencia de aminoácidos Val-Cit, Phe-Lys, Gly-Phe-Leu-Gly, Gly-Gly-Pro-Nle, Ala-Ala-Asn o His-Ser-Ser-Lys-Leu-Gln, unidos mediante el grupo carboxílico de la citrulina, lisina, glicina, norleucina, asparagina o glutamina, respectivamente, al grupo anilina; L es un enlazador unido a Pep¹ mediante un enlace amida a través de un grupo carboxilo o amino de Pep¹; y Pep² es un resto peptídico solubilizante y penetrante de células unido a L a través de un grupo tiol del mismo. En dichas realizaciones particulares, L es un enlazador de la fórmula:



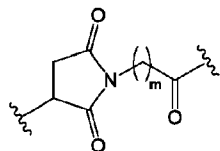
unido a Pep¹ mediante un enlace amida a través de un grupo amino de Pep¹, en donde m es un número entero de 1-20, y la cadena de alquileo de L está opcionalmente interrumpida con uno o más grupos -O-; y Pep² es un resto peptídico solubilizante y penetrante de células, por ejemplo, un resto peptídico de la secuencia Cys-Gly-Lys-Arg-Lys, unido a L a través del grupo tiol del resto de cisteína.

En realizaciones específicas, el compuesto descrito en la presente memoria es un compuesto de la fórmula Ia o Ib, en el que R¹ es metilo; R² y R³ junto con el átomo de carbono al que están unidos forman adamantilo; R⁵ es Cl unido en *orto* al grupo -O-R⁴; A es -CH=CH-E unido en *orto* al grupo -O-R⁴; E es -COOCH₃ o -CN; y (i) Pep¹ es un resto peptídico de la secuencia Val-Cit, unido mediante el grupo carboxílico de la citrulina al grupo anilina, y protegido en el grupo amino de la valina con carboxibencilo (por ejemplo, los compuestos Ib-1a y Ib-1b en la Tabla 2); (ii) Pep¹ es un resto peptídico de la secuencia His-Ser-Ser-Lys-Leu-Gln, unido mediante el grupo carboxílico de la glutamina al grupo anilina y protegido en el grupo α-amino de la histidina con N-morfolincarbonilo (por ejemplo, compuestos Ib-2a y Ib-2b en la Tabla 2); (iii) Pep¹ es un resto peptídico de la secuencia Val-Cit, unido mediante el grupo carboxílico de la citrulina al grupo anilina, y unido mediante el grupo amino de la valina a un grupo que contiene PEG de la fórmula



en donde n es 17 (por ejemplo, los compuestos Ib-3a y 3b-1b en la Tabla 2); o

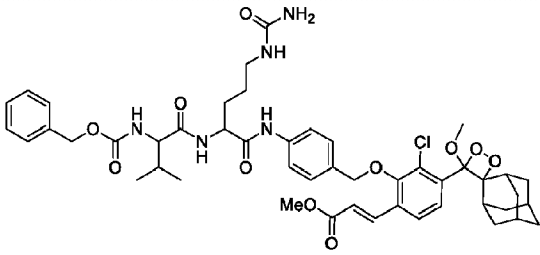
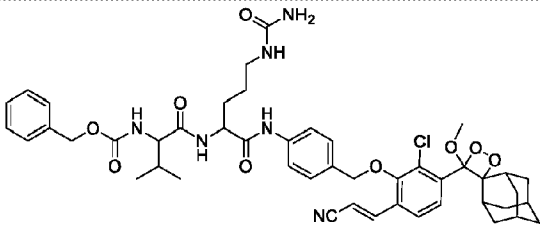
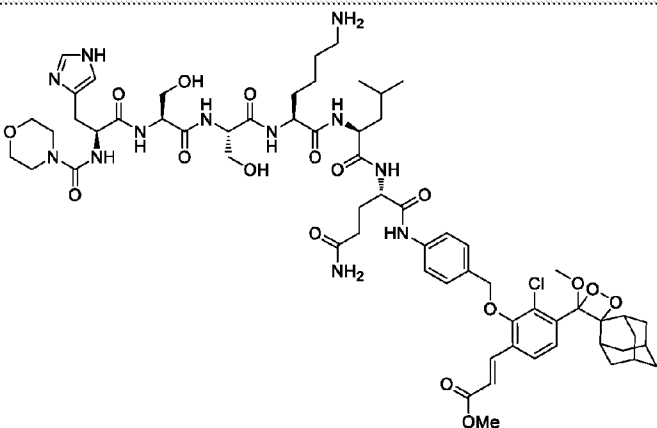
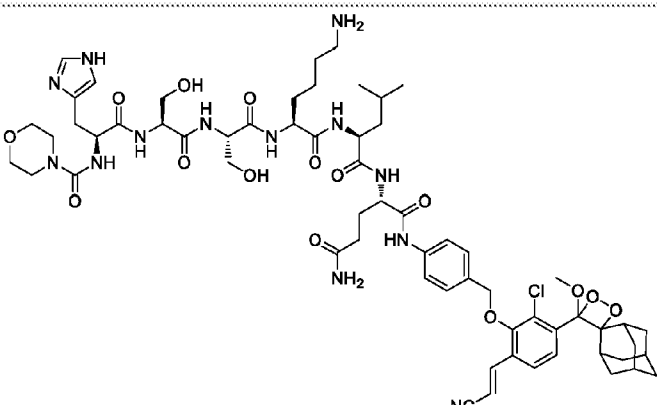
(iv) Pep¹ es un resto peptídico de la secuencia Val-Cit o His-Ser-Ser-Lys-Leu-Gln, unido mediante el grupo carboxílico de la citrulina o la glutamina, respectivamente, al grupo anilina; L es un enlazador de la fórmula:

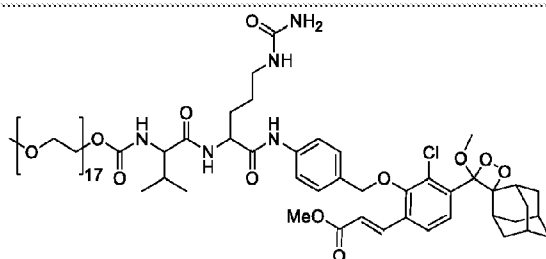


en donde m es un número entero de 5,

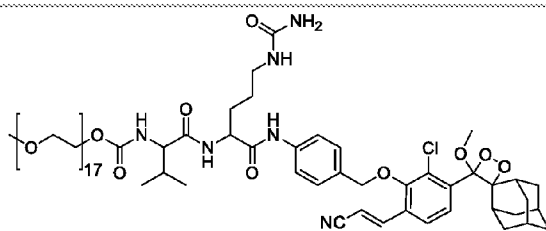
unido a Pep¹ mediante un enlace amida a través del grupo α-amino de la valina o histidina, respectivamente; y Pep² es un resto peptídico de la secuencia Cys-Gly-Lys-Arg-Lys, unido a L a través del grupo tiol del resto de cisteína (por ejemplo, los compuestos Ib-4a, Ib-4b, Ib-5a y Ib-5b en la Tabla 2).

Tabla 2: Compuestos específicos de la fórmula Ia/Ib descritos en la presente memoria

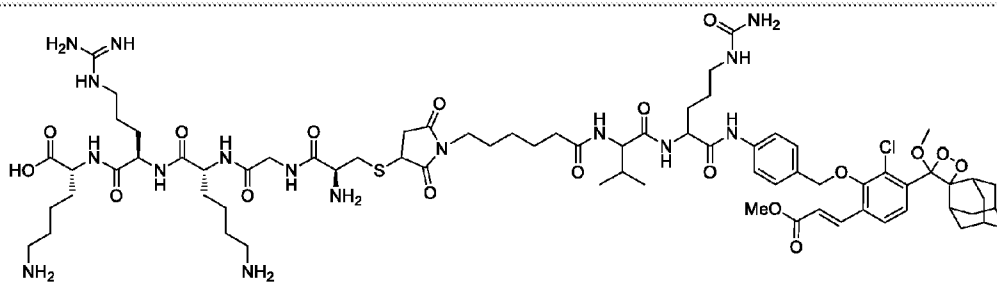
Ib-1a

Ib-1b

Ib-2a

Ib-2b

Ib-3a



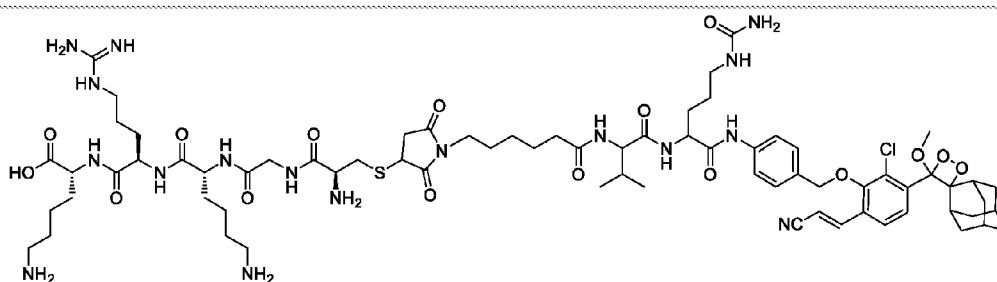
Ib-3b



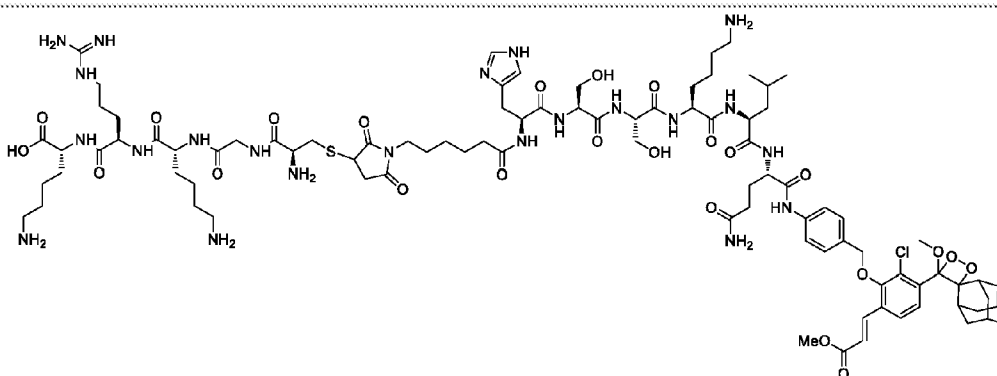
Ib-4a

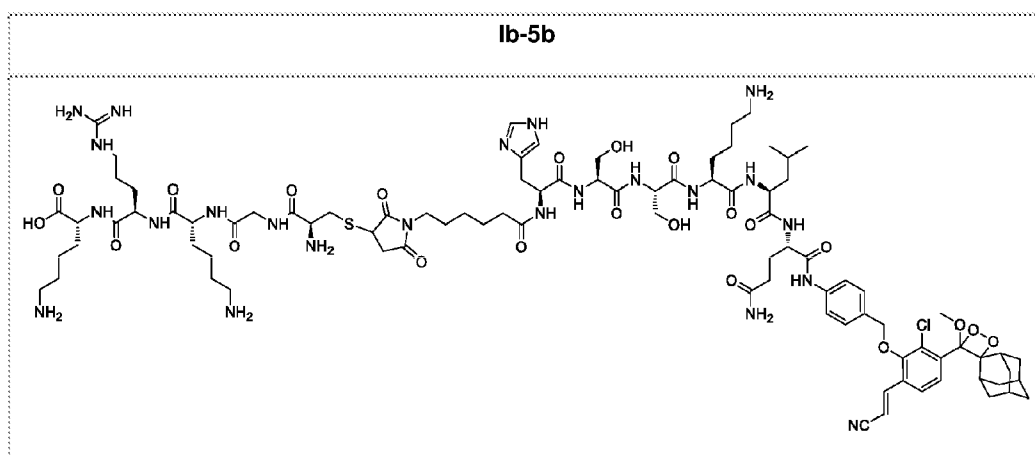


Ib-4b



Ib-5a





En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende una sonda de quimioluminiscencia basada en dioxetano como se describe en la presente memoria, es decir, un compuesto de la fórmula la/lb como se define en una cualquiera de las realizaciones anteriores, y un vehículo. Dichas composiciones particulares son composiciones farmacéuticas que comprenden dicha sonda de quimioluminiscencia y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En realizaciones específicas, la composición de la presente invención comprende una sonda de quimioluminiscencia de la fórmula la/lb seleccionada de las enumeradas en Tabla 2.

La sonda de quimioluminiscencia de fórmula la/lb puede usarse para diagnóstico y/o obtención de imágenes *in vivo*, más específicamente, para determinar la presencia, o medir el nivel, de una proteasa tal como una proteasa de serina, una proteasa de cisteína, una proteasa de treonina, una proteasa de aspártico, una proteasa de glutámico o una metaloproteasa. Ejemplos de dichas proteasas incluyen, sin limitación, catepsinas tales como catepsina A, B, C, D, E, F, G, H, K, L1, L2, O, S, W y Z, legumaina y PSA.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere por lo tanto a (i) una sonda de quimioluminiscencia basada en dioxetano de la fórmula la/lb como se define en una cualquiera de las realizaciones anteriores; o (ii) una composición farmacéutica que comprende dicha sonda de quimioluminiscencia, para su uso *in vivo* en diagnóstico y obtención de imágenes, es decir, para determinar la presencia, o medir el nivel, de una proteasa como se define anteriormente *in vivo*.

En otras palabras, la presente divulgación se refiere a un método para determinar la presencia, o medir el nivel, de una proteasa como se define anteriormente en un individuo que lo necesita, comprendiendo dicho método (i) administrar a dicho individuo un compuesto de la fórmula la/lb como se define en una cualquiera de las realizaciones anteriores, o una composición que comprende dicho compuesto, para hidrolizar de ese modo dicho compuesto a una especie emisiva mediante dicha proteasa, cuando está presente en dicho individuo; y (ii) detectar la emisión de quimioluminiscencia de dichas especies emisivas. La sonda de quimioluminiscencia se puede administrar sistémica o localmente, por ejemplo, a un órgano particular de dicho individuo, para así determinar la presencia, o medir el nivel, de dicha proteasa en el cuerpo entero de dicho individuo, o en dicho órgano particular.

En otro aspecto más, la presente invención se refiere a un método para determinar la presencia, o medir el nivel, de una proteasa en una muestra, es decir, *in vitro*, comprendiendo dicho método (i) poner en contacto dicha muestra con un compuesto de la fórmula la/lb como se define en una cualquiera de las realizaciones anteriores en donde Pep¹ es un grupo escindible por dicha proteasa, o una composición que comprende dicho compuesto, para de este modo hidrolizar dicho compuesto a una especie emisiva por dicha proteasa, cuando está presente en dicha muestra; y (ii) detectar la emisión de quimioluminiscencia de dichas especies emisivas.

La muestra analizada según este método puede ser cualquier muestra, por ejemplo, una muestra biológica. El término "muestra biológica", tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una muestra de biopsia de tejido; un fluido corporal tal como líquido amniótico, humor acuoso, humor vítreo, bilis, suero sanguíneo, leche materna, líquido cefalorraquídeo, cerumen (cerumen), endolinfa, perilinfa, eyaculación femenina, jugo gástrico, moco, líquido peritoneal, saliva, sebo (aceite de piel), semen, sudor, lágrimas, secreción vaginal, vómito y orina; o una solución basada en fluido corporal, es decir, una solución acuosa en la que se disuelve un fluido corporal.

Las composiciones farmacéuticas según la presente invención se pueden preparar mediante técnicas convencionales, por ejemplo, como se describe en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th ed., 1995. Las composiciones se pueden preparar, por ejemplo, asociando uniforme e íntimamente el agente activo, es decir, la sonda de quimioluminiscencia basada en dioxetano descrita en la presente memoria, con un vehículo líquido, un vehículo sólido finamente dividido o ambos, y después, si es necesario, dando forma al producto en la formulación deseada.

Las composiciones pueden estar en forma líquida, sólida o semisólida y pueden incluir además cargas, vehículos, diluyentes o adyuvantes farmacéuticamente aceptables y otros ingredientes y excipientes inertes. En una realización, la composición farmacéutica de la presente invención se formula como nanopartículas.

5 Una composición farmacéutica según la presente invención se puede formular para cualquier vía de administración adecuada, por ejemplo, para administración parenteral tal como administración intravenosa, intraarterial, intratecal, intrapleuraleal, intratraqueal, intraperitoneal, intramuscular o subcutánea, administración tópica, administración oral o enteral o para inhalación. En realizaciones particulares, dicha composición se formula para administración intravenosa o intraperitoneal, o para administración subcutánea.

10 La composición farmacéutica de la invención puede estar en forma de una suspensión acuosa u oleaginosa inyectable estéril, que puede formularse según la técnica conocida utilizando agentes dispersantes, humectantes o de suspensión adecuados. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente no tóxico parenteralmente aceptable. Los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse incluyen, por ejemplo, agua, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro de sodio.

15 La emisión de quimioluminiscencia de las sondas de la presente invención se puede detectar utilizando cualquier técnica o procedimiento conocido en la técnica.

20 La imagen molecular óptica es una técnica prometedora que proporciona un alto grado de sensibilidad y especificidad en la detección de márgenes tumorales. Además, las aplicaciones clínicas existentes han demostrado que las imágenes moleculares ópticas son una poderosa herramienta intraoperatoria para guiar a los cirujanos que realizan procedimientos de precisión, lo que permite la resección radical y mejores tasas de supervivencia. Un ejemplo de instrumento clínicamente aprobado para procedimientos quirúrgicos mínimamente invasivos guiados por fluorescencia es da Vinci Surgical System (Haber *et al.*, 2010). Este instrumento cuenta con un sistema de visión 3D HD para una vista clara y ampliada del interior del cuerpo del paciente y permite a los cirujanos realizar procedimientos complejos y rutinarios a través de unas pocas aberturas pequeñas, similar a la laparoscopia tradicional. Además, los siguientes sistemas ya se han aplicado en cirugías de cáncer de mama, metástasis hepáticas y cirugía de injerto de bypass: The Hamamatsu's Photodynamic Eye (PDE™), Artemis™ y Novadaq SPY™ (Novadaq Technologies Inc., Toronto, Canadá) (Chi *et al.*, 2014). En ensayos clínicos se evaluaron varios sistemas intraoperatorios de imágenes moleculares de fluorescencia NIR existentes; incluyendo, Fluobeam®, FLARE™ y GXMI Navigator. Han desempeñado un papel importante en la comodidad de operación, mejorando la evaluación de imágenes y aumentando la profundidad de detección (Chi *et al.*, 2014).

30 En los últimos años se ha producido un gran avance en el desarrollo de cámaras y láseres para la obtención de imágenes de fluorescencia óptica en el intervalo IR (Mieog *et al.*, 2011; Troyan *et al.*, 2009). Paralelamente, existe un amplio uso clínico de colorantes orgánicos de bajo MW, tal como el ICG y azul de metileno, para determinar el gasto cardíaco, la función hepática y el flujo sanguíneo hepático, y para la angiografía oftálmica. En 2015, el sistema de obtención de imágenes de fluorescencia, Xiralite®, obtuvo la aprobación de la FDA para la visualización de la microcirculación en las manos (para trastornos relacionados con la inflamación y la perfusión).

35 La invención se ilustrará ahora mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

EJEMPLOS

Experimental

Métodos generales

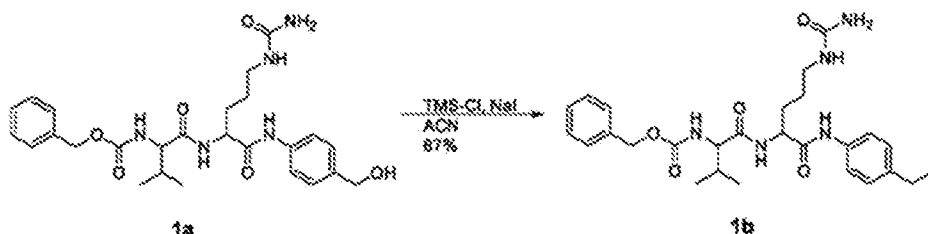
40 Todas las reacciones que requirieron condiciones anhidras se realizaron bajo atmósfera de argón. Todas las reacciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente a menos que se indique lo contrario. Los productos químicos y disolventes fueron de grado A.R. o purificado mediante técnicas estándar. TLC: placas de gel de sílice Merck 60 F₂₅₄: los compuestos se visualizaron mediante irradiación con luz ultravioleta. Cromatografía en columna (FC): gel de sílice Merck 60 (tamaño de partícula 0,040-0,063 mm), eluyente indicado entre paréntesis. RP-HPLC: C18 5u, 250 x 4,6 mm, eluyente indicado entre paréntesis. RP-HPLC preparativa: C18 5u, 250 x 21 mm, eluyente indicado entre paréntesis. Los espectros de ¹H-NMR se midieron utilizando Bruker Avance operado a 400 MHz. Los espectros de ¹³C-NMR se midieron utilizando Bruker Avance operado a 100 MHz. Los desplazamientos químicos se reportaron en ppm en la escala δ en relación con un disolvente residual (CDCl₃: δ=7,26 para ¹H-NMR y 77,16 para ¹³C-NMR, DMSO-d₆: δ=2,50 para ¹H-NMR y 39,52 para ¹³C-NMR). Los espectros de masas se midieron en Waters Xevo TQD. La quimioluminiscencia se registró en Molecular Devices Spectramax i3x. Todos los reactivos generales, incluyendo las sales y los disolventes, se adquirieron en Sigma-Aldrich. Irradiación luminosa para reacciones fotoquímicas: Lámpara LED PAR38 (19W, 3000K).

Síntesis de la sonda 1

55 **Compuesto 1b.** Como se muestra en Esquema 3, el compuesto 1a (Dubowchik *et al.*, 2002) (300 mg, 0,58 mmol, 1 eq) se disolvió en 7 mL de ACN y se enfrió a 0°C. Se añadió yoduro de sodio (264 mg, 1,76 mmol, 3 eq) seguido de la rápida adición de TMS-Cl (222 µl, 1,76 mmol, 3 eq). Se dejó que la reacción se calentara hasta temperatura ambiente

y se controló mediante TLC (MeOH:DCM 10:90). Después de completarse, la mezcla de reacción se diluyó con EtOAc y se lavó con Na₂S₂O₃ saturado seguido de salmuera. La fase orgánica se separó, se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y el disolvente se evaporó a presión reducida, para proporcionar el compuesto 1b (245 mg, 67 % de rendimiento) como un sólido blanquecino. El compuesto se hizo reaccionar sin purificación adicional. MS (ES⁺): *m/z* calc. para C₂₆H₃₄IN₅O₅: 623,16; encontrado: 624,4 [M+H]⁺.

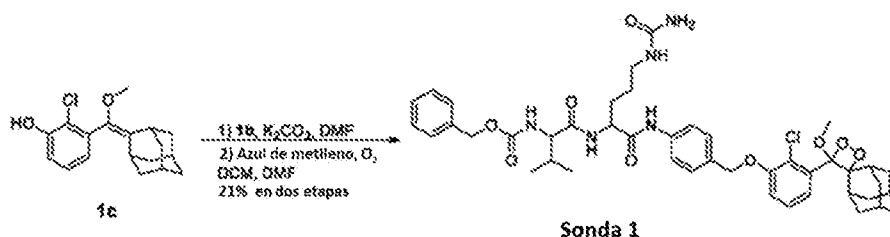
Esquema 3: Síntesis del compuesto 1b



Sonda 1. Como se muestra en Esquema 4, el compuesto 1b (69 mg, 0,115 mmol, 1 eq) y el compuesto 1c (Green et al., 2017) (37 mg, 0,127 mmol, 1,1 eq) se disolvieron en 0,5 mL de DMF y se añadió K₂CO₃ (35 mg, 0,253 mmol, 2,2 eq). La reacción se controló mediante TLC (MeOH:DCM 10:90). Después de completarse, la mezcla de reacción se diluyó con EtOAc y se lavó con NH₄Cl saturado. La fase orgánica se separó, se lavó con salmuera, se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y el disolvente se evaporó a presión reducida. El producto crudo se hizo reaccionar sin purificación adicional. MS (ES⁺): *m/z* calc. para C₄₄H₅₄ClN₅O₇: 799,37; encontrado: 800,5 [M+H]⁺.

El crudo se disolvió en 5 mL de DCM y unas gotas de DMF (para mejorar la solubilidad). Se añadieron unos pocos miligramos de azul de metileno y se burbujeó oxígeno a través de la solución, mientras se irradiaba con luz amarilla. La reacción se controló mediante RP-HPLC (50-100 % de ACN en agua, 20 min). Después de completarse, la mezcla de reacción se concentró por evaporación a presión reducida y el producto crudo se purificó mediante RP-HPLC preparativa (50-100 % de ACN en agua, 20 min) para proporcionar la sonda 1 (20 mg, 21 % de rendimiento) como un sólido blanco. MS (ES⁺): *m/z* calc. para C₄₄H₅₄ClN₅O₉: 831,36; encontrado: 854,5 [M+Na]⁺. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO) δ 10,07 (s, 1H), 8,10 (d, J=7,6 Hz, 1H), 7,60 (d, J=8,5 Hz, 2H), 7,54 (d, J=7,7 Hz, 1H), 7,44 (t, J=8,0 Hz, 1H), 7,41-7,25 (m, 7H), 5,97 (s, 1H), 5,74 (s, 1H), 5,41 (s, 2H), 5,16 (q, J= 12,0 Hz, 2H), 5,02 (s, 2H), 4,40 (dd, J=13,4, 7,9 Hz, 1H), 3,95-3,86 (m, 1H), 3,07 (s, 3H), 3,05-2,97 (m, 1H), 2,92 (dd, J=13,0, 6,1 Hz, 1H), 2,85 (s, 1H), 2,24 (d, J=12,8 Hz, 1H), 2,03-1,86 (m, 2H), 1,75-1,49 (m, 9H), 1,37 (dd, J=37,8, 8,8 Hz, 3H), 1,28-1,12 (m, 4H), 0,86 (d, J=6,8 Hz, 3H), 0,82 (d, J=6,7 Hz, 3H). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 171,77, 171,17, 159,42, 156,68, 155,07, 139,27, 137,62, 132,84, 131,60, 128,87, 128,29, 128,17, 125,05, 120,70, 119,55, 116,55, 112,02, 95,77, 70,85, 65,92, 60,59, 53,58, 49,75, 36,46, 33,76, 33,48, 32,25, 31,62, 31,31, 30,90, 30,00, 27,31, 26,05, 25,72, 19,74, 18,68.

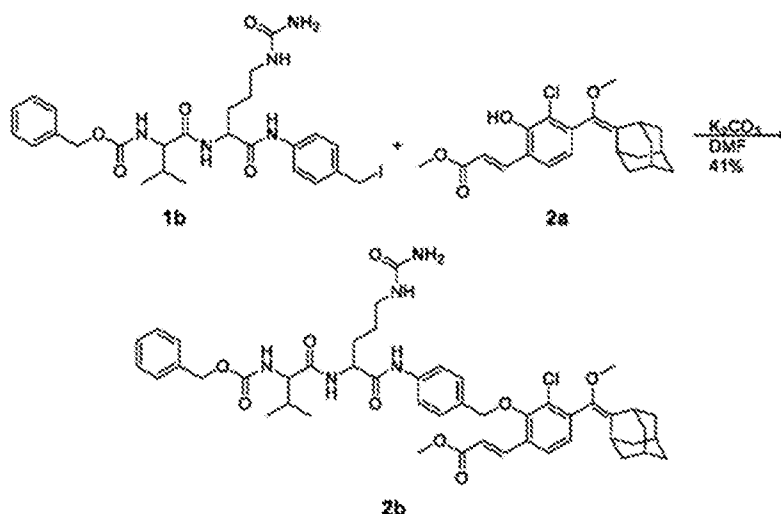
Esquema 4: Síntesis de la sonda de quimioluminiscencia 1



Síntesis de la sonda 2

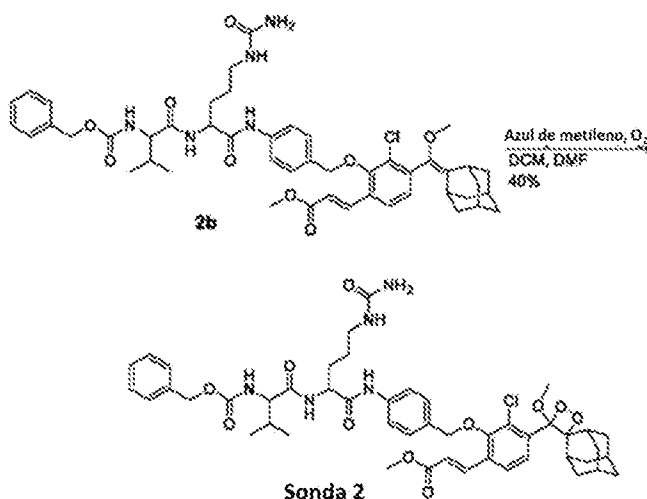
Compuesto 2b. Como se muestra en Esquema 5, el compuesto 1b (50 mg, 0,08 mmol, 1 eq) y el compuesto 2a (Green et al., 2017) (34 mg, 0,09 mmol, 1,1 eq) se disolvieron en 0,5 mL de DMF y se añadió K₂CO₃ (24 mg, 0,18 mmol, 2,2 eq). La reacción se controló mediante TLC (MeOH:DCM 10:90). Después de completarse, la mezcla de reacción se diluyó con EtOAc y se lavó con NH₄Cl saturado. La fase orgánica se separó, se lavó con salmuera, se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y el disolvente se evaporó a presión reducida. El producto crudo se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (MeOH:DCM 10:90) para proporcionar el compuesto 2b (29 mg, 41 % de rendimiento) como un sólido amarillento. MS (ES⁺): *m/z* calc. para C₄₈H₅₈ClN₅O₉: 883,39; encontrado: 884,8 [M+H]⁺. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7,83 (d, J=16,2 Hz, 1H), 7,53 (d, J=8,2 Hz, 2H), 7,35 (t, J=8,5 Hz, 3H), 7,30-7,18 (m, 5H), 7,00 (d, J=8,0 Hz, 1H), 6,36 (d, J=16,2 Hz, 1H), 5,02 (q, J=12,3 Hz, 3H), 4,87 (d, J=3,1 Hz, 2H), 4,49 (dd, J=8,8, 4,9 Hz, 1H), 3,96 (d, J=6,2 Hz, 1H), 3,71 (s, 3H), 3,25 (s, 3H), 3,22-2,98 (m, 4H), 2,06-1,94 (m, 3H), 1,92-1,80 (m, 6H), 1,80-1,70 (m, 5H), 1,70-1,56 (m, 5H), 1,46 (s, 3H), 0,88 (d, J= 6,7 Hz, 3H), 0,84 (d, J=6,8 Hz, 3H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 172,55, 170,37, 167,50, 157,00, 153,69, 139,29, 139,04, 138,32, 138,26, 138,20, 138,12, 136,17, 132,78, 131,83, 129,61, 128,51, 128,18, 127,88, 125,15, 119,91, 119,74, 75,82, 67,07, 60,48, 57,26, 53,16, 51,84, 39,13, 38,59, 36,99, 32,94, 31,00, 29,72, 29,29, 28,31, 25,99, 19,17, 17,79.

Esquema 5: Síntesis del compuesto 2b



Sonda 2. Como se muestra en Esquema 6, se disolvió el compuesto 2b (20 mg, 0,02 mmol) en 5 mL de DCM y unas gotas de DMF (para mejorar la solubilidad). Se añadieron unos pocos miligramos de azul de metileno y se burbujeó oxígeno a través de la solución, mientras se irradiaba con luz amarilla. La reacción se controló mediante RP-HPLC (50-100 % de ACN en agua, 20 min). Después de completarse, la mezcla de reacción se concentró por evaporación a presión reducida y el producto crudo se purificó mediante RP-HPLC preparativa (50-100 % de ACN en agua, 20 min) para proporcionar la sonda 2 (8 mg, 40 % de rendimiento) como un sólido blanco. MS (ES⁻): *m/z* calc. para $C_{48}H_{58}ClN_5O_{11}$: 915,38; encontrado: 950,6 [M+Cl]⁻. ¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 10,09 (s, 1H), 8,11 (d, *J*=7,6 Hz, 1H), 7,94 (d, *J*=8,4 Hz, 1H), 7,77 (d, *J*=8,4 Hz, 1H), 7,71 (d, *J*=16,2 Hz, 1H), 7,60 (d, *J*=8,5 Hz, 2H), 7,37-7,27 (m, 6H), 6,67 (d, *J*=16,2 Hz, 1H), 5,98 (s, 1H), 5,42 (s, 1H), 5,02 (s, 2H), 4,92-4,85 (m, 2H), 4,41 (dd, *J*=13,4, 8,0 Hz, 1H), 3,96-3,85 (m, 1H), 3,71 (s, 3H), 3,10 (s, 3H), 2,98 (d, *J*=23,1 Hz, 2H), 2,87 (s, 1H), 2,22 (d, *J*=12,4 Hz, 1H), 1,96 (dd, *J*=13,5, 6,7 Hz, 1H), 1,89 (s, 1H), 1,77-1,48 (m, 11H), 1,49-1,11 (m, 7H), 0,86 (d, *J*=6,8 Hz, 3H), 0,82 (d, *J*=6,7 Hz, 3H). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 171,79, 171,22, 166,73, 159,43, 156,69, 154,23, 139,86, 137,90, 137,62, 134,85, 131,79, 130,73, 130,20, 128,87, 128,30, 128,19, 127,39, 126,56, 121,77, 119,39, 111,72, 95,95, 76,26, 65,93, 60,59, 53,60, 52,24, 49,95, 39,83, 39,62, 39,41, 36,39, 33,81, 33,59, 32,36, 32,18, 31,61, 31,38, 30,91, 30,00, 27,31, 26,03, 25,69, 19,73, 18,68.

Esquema 6: Síntesis de la sonda de quimioluminiscencia 2

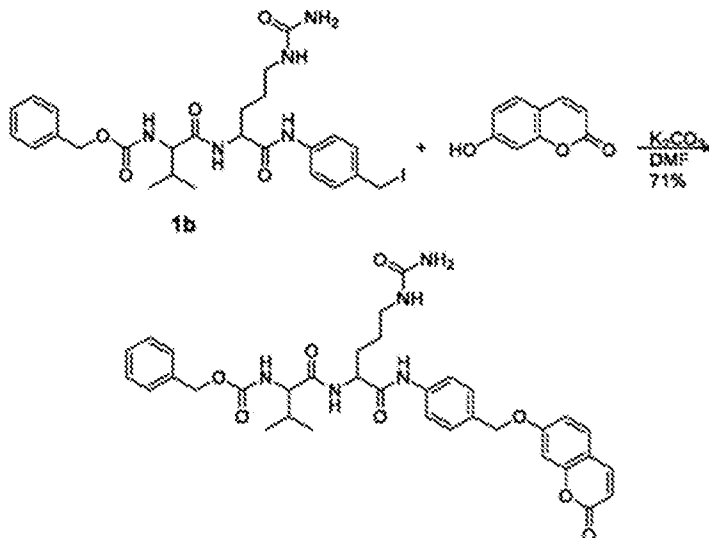


Síntesis de Z-Val-Cit-PABA-7HC

Como se muestra en Esquema 7, el compuesto 1b (40 mg, 0,064 mmol, 1 eq) y 7-hidroxycumarina (12 mg, 0,07 mmol, 1,1 eq) se disolvieron en 0,5 mL de DMF y se añadió K_2CO_3 (20 mg, 0,141 mmol, 2,2 eq). La reacción se controló mediante TLC (MeOH:DCM 10:90). Después de completarse, la mezcla de reacción se diluyó con EtOAc y se lavó con NH_4Cl saturado. La fase orgánica se separó, se lavó con salmuera, se secó sobre Na_2SO_4 , se filtró y el disolvente se evaporó a presión reducida. El producto crudo se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice

(MeOH:DCM 10:90) para producir Z-Val-Cit-PABA-7HC (29 mg, 71 % de rendimiento) como un sólido amarillento. MS (ES⁺): *m/z* calc. para C₃₅H₃₉N₅O₈: 657,28; encontrado: 680,52 [M+Na]⁺.

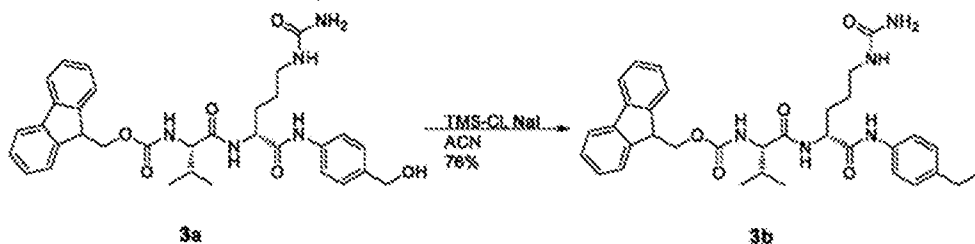
Esquema 7: Síntesis de Z-Val-Cit-PABA-7HC



Síntesis de la Sonda 3

- 5 **Compuesto 3b.** Como se muestra en el Esquema 8, el compuesto 3a (Dubowchik *et al.*, 2002) (100 mg, 0,2 mmol, 1 eq) se disolvió en 7 mL de ACN y se enfrió a 0°C. Se añadió yoduro de sodio (90 mg, 0,6 mmol, 3 eq) seguido de la rápida adición de TMS-Cl (78 µl, 0,6 mmol, 3 eq). Se dejó que la reacción se calentara hasta temperatura ambiente y se controló mediante TLC (MeOH:DCM 10:90). Después de completarse, la mezcla de reacción se diluyó con EtOAc y se lavó con Na₂S₂O₃ seguido de salmuera. La fase orgánica se separó, se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y el disolvente se evaporó a presión reducida, para proporcionar el compuesto 3b (108 mg, 76 % de rendimiento) como un sólido amarillento. MS (ES⁺): *m/z* calc. para C₃₃H₃₈N₅O₅: 711,19; encontrado: 712,5 [M+H]⁺. ¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 10,10 (d, J=7,4 Hz, 1H), 8,13 (d, J=7,1 Hz, 1H), 7,87 (d, J=7,4 Hz, 2H), 7,73 (t, J=7,4 Hz, 2H), 7,59 (d, J=8,2 Hz, 1H), 7,52 (d, J=8,2 Hz, 2H), 7,46-7,25 (m, 4H), 7,21 (s, 1H), 4,70 (s, 1H), 4,60 (s, 1H), 4,41 (s, 2H), 4,34-4,15 (m, 4H), 3,94-3,89 (m, 2H), 3,00 (s, 1H), 2,94 (s, 1H), 1,97 (d, J=6,4 Hz, 1H), 1,67 (s, 1H), 1,59 (s, 1H), 1,50-1,26 (m, 2H), 1,21 (s, 1H), 0,86 (d, J=6,8 Hz, 3H), 0,84 (d, J=6,7 Hz, 3H). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 171,84, 171,23, 159,46, 156,65, 144,43, 144,30, 141,23, 139,50, 132,96, 130,06, 128,18, 127,61, 125,90, 120,64, 120,11, 119,64, 118,09, 66,20, 63,11, 60,57, 57,25, 53,64, 47,21, 46,71, 39,83, 39,63, 39,42, 30,97, 29,93, 29,53, 27,29, 19,75, 18,82.

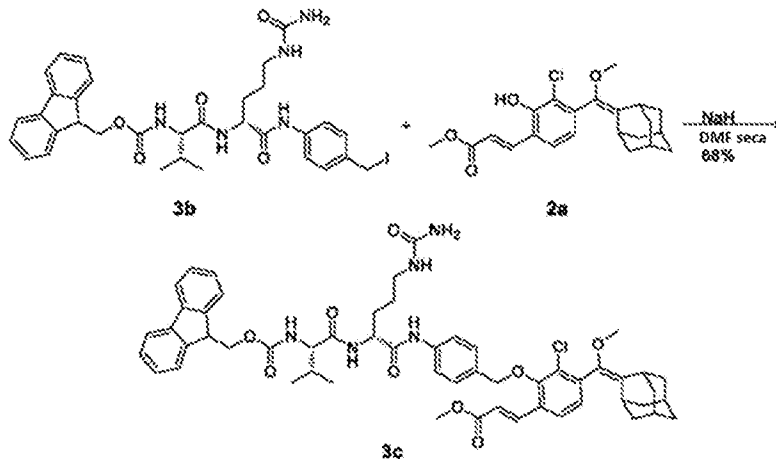
Esquema 8: Síntesis del compuesto 3b



- 20 **Compuesto 3c.** Como se muestra en el Esquema 9, se disolvió el compuesto 2a (120 mg, 0,31 mmol, 1,2 eq) en DMF seco, en atmósfera de argón y se enfrió a 0°C. Se añadió yoduro de sodio (11,2 mg, 0,28, 1,1 eq) y la reacción se dejó calentar hasta temperatura ambiente. Después de agitar durante 15 minutos, se añadió el compuesto 3b (184 mg, 0,26 mmol, 1 eq) y la reacción se controló mediante TLC (MeOH:DCM 10:90). Después de completarse, el disolvente se eliminó a presión reducida. El aceite resultante se precipitó con 2 mL de EtOAc, seguido de trituración con Et₂O (7 mL) durante 10 minutos. Después, la mezcla se filtró mediante filtración al vacío y el sólido se secó para proporcionar el compuesto 3c (236 mg, 68%) como un sólido blanquecino. MS (ES⁺): *m/z* calc. para C₅₅H₆₂ClN₅O₉: 971,42; encontrado: 972,7 [M+H]⁺. ¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 10,10 (s, 1H), 8,13 (d, J=7,4 Hz, 1H), 7,87 (d, J=7,5 Hz, 2H), 7,77 (dd, J=8,3, 4,4 Hz, 2H), 7,72 (d, J=7,8 Hz, 2H), 7,60 (d, J=8,3 Hz, 2H), 7,41 (dd, J=17,4, 8,5 Hz, 3H), 7,31 (t, J=7,9 Hz, 4H), 7,09 (d, J=8,0 Hz, 1H), 6,64 (d, J=16,2 Hz, 1H), 5,98-5,95 (m, 1H), 5,40 (s, 2H), 4,92 (dd, J=15,0 Hz, 2H), 4,41 (s, 1H), 4,31-4,18 (m, 3H), 3,96-3,86 (m, 1H), 3,70 (s, 3H), 3,36 (dd, J=14,0, 7,0 Hz, 1H), 3,20 (s, 3H), 3,17 (s, 1H), 3,07-2,97 (m, 1H), 2,97-2,86 (m, 1H), 2,03-1,82 (m, 6H), 1,80-1,50 (m, 9H), 1,50-1,27 (m, 2H), 1,07 (t, J=7,0 Hz, 1H), 0,87 (d, J=6,7 Hz, 3H), 0,84 (d, J=6,7 Hz, 3H). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 171,82, 171,21, 166,95, 159,41,

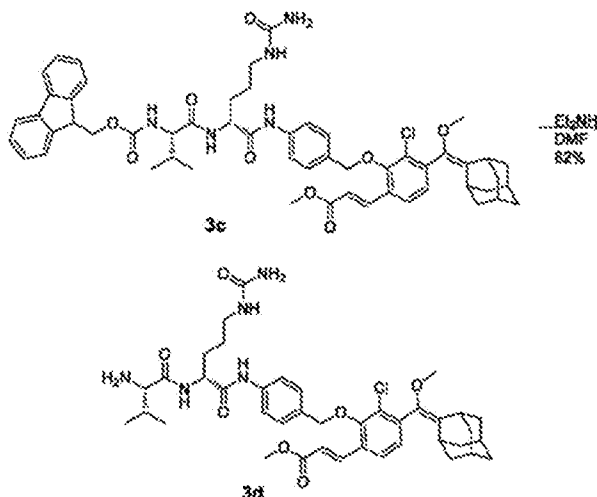
156,64, 153,54, 144,44, 144,31, 141,23, 139,86, 138,41, 137,90, 130,92, 130,75, 130,10, 129,87, 129,26, 128,17, 127,60, 126,39, 125,91, 120,63, 119,33, 76,03, 66,21, 65,46, 60,57, 57,06, 53,63, 52,16, 47,21, 38,95, 38,63, 36,98, 32,93, 30,99, 30,00, 29,55, 28,09, 27,34, 19,75, 18,80, 15,70.

Esquema 9: Síntesis del compuesto 3c



- 5 **Compuesto 3d.** Como se muestra en el Esquema 10, se disolvió el compuesto 3c (220 mg, 0,23 mmol, 1 eq) en DMF (6 mL) y se añadió dietilamina (2 mL). La reacción se controló mediante RP-HPLC (50-100 % de ACN en agua, 20 min). Después de completarse, el disolvente se eliminó a presión reducida. El aceite resultante se precipitó con 1,5 mL de EtOAc, seguido de trituración con Et₂O (20 mL) durante 10 minutos. Después, la mezcla se filtró mediante filtración al vacío y el sólido se secó para proporcionar el compuesto 3d (140 mg, 82%) como un sólido blanquecino.
- 10 MS (ES⁺): *m/z* calc. para C₄₀H₅₂ClN₅O₇: 749,36; encontrado: 750,6 [M+H]⁺. ¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 10,18 (s, 1H), 8,23 (s, 1H), 7,81-7,71 (m, J=11,2 Hz, 2H), 7,60 (d, J=8,3 Hz, 2H), 7,33 (d, J=8,3 Hz, 2H), 7,10 (d, J=8,1 Hz, 1H), 6,63 (d, J=16,1 Hz, 1H), 5,98 (s, 1H), 5,42 (s, 2H), 4,93 (dd, J=30,5, 9,9 Hz, 2H), 4,47 (s, 1H), 3,71 (s, 3H), 3,20 (s, 3H), 3,17 (s, 1H), 3,13 (d, J=4,7 Hz, 1H), 3,05-2,97 (m, 1H), 2,97-2,88 (m, 1H), 1,94-1,85 (m, J=24,5 Hz, 6H), 1,78-1,55 (m, 9H), 1,46-1,32 (m, 3H), 1,22 (s, 2H), 0,88 (d, J=6,7 Hz, 3H), 0,80 (d, J=6,7 Hz, 3H). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 173,82, 171,24, 166,96, 159,43, 153,55, 139,87, 139,72, 138,42, 137,91, 131,01, 130,77, 130,11, 129,88, 129,26, 128,19, 126,40, 120,58, 119,41, 76,02, 59,72, 57,06, 53,17, 52,16, 40,04, 39,83, 39,62, 39,41, 38,96, 38,63, 36,98, 32,92, 31,62, 30,46, 29,55, 28,08, 27,26, 22,60, 19,85, 17,61, 14,50.
- 15

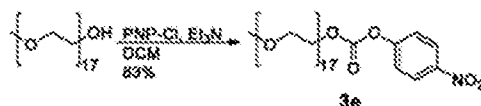
Esquema 10: Síntesis del compuesto 3d



- 20 **Compuesto 3e.** Como se muestra en el Esquema 11, mPEG₇₈₀ (100 mg, 0,128 mmol, 1 eq) se disolvió en DCM seco, en atmósfera de argón, y se enfrió a 0°C. Se añadieron Et₃N (36 µl, 0,256 mmol, 2 eq) y clorocarbonato de p-nitrofenilo (PNP-Cl, 52 mg, 0,256 mmol, 2 eq) y la reacción se dejó calentar hasta temperatura ambiente. La reacción se controló mediante TLC (MeOH:DCM 10:90). Después de completarse, la mezcla de reacción se diluyó con DCM y se lavó con NH₄Cl saturado. La fase orgánica se separó, se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y el disolvente se evaporó a presión reducida. El producto crudo se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (MeOH:DCM 20:80)
- 25 para proporcionar el compuesto 3e (101 mg, 83 % de rendimiento) como un sólido blanco-amarillento. MS (ES⁺): *m/z* calc. para C₄₂H₇₅NO₂₂: 946,04; encontrado: 946,8. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8,2 (d, 2H, J=8 Hz), 7,32

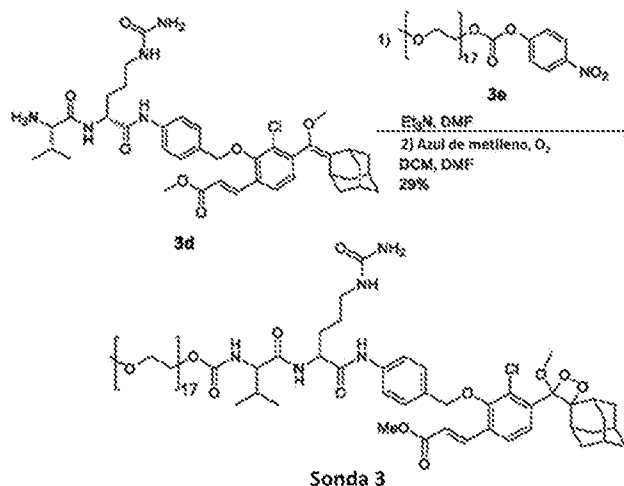
(d, 2H, $J=8$ Hz), 4,41-4,33 (m, 2H), 3,77-3,72 (m, 2H), 3,64-3,60 (m, 6H), 3,56-3,58 (m, 56H), 3,46-3,48 (m, 2H), 3,30 (s, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 155,54, 152,49, 145,38, 125,32, 121,86, 71,92, 70,69, 70,55, 68,62, 68,33, 59,02.

Esquema 11: Síntesis del compuesto 3e



Sonda 3. Como se muestra en el Esquema 12, el compuesto 3d (10 mg, 0,013 mmol, 1 eq) y el compuesto 3e (19 mg, 0,02 mmol, 1,5 eq) se disolvieron en DMF y se añadieron unas pocas gotas de Et_3N . La reacción se calentó a 50°C durante la noche. La reacción se controló mediante RP-HPLC (30-100 % de ACN en agua, 20 min). Después de completarse, la mezcla de reacción se concentró mediante evaporación a presión reducida y el producto crudo se usó para la siguiente etapa sin purificación adicional. MS (ES+): m/z calc. para $\text{C}_{76}\text{H}_{122}\text{ClN}_5\text{O}_{26}$: 1557,25; encontrado: 790,4 $[(\text{M}+\text{Na})/2]^+$.

Esquema 12: Síntesis de la sonda de quimioluminiscencia 3



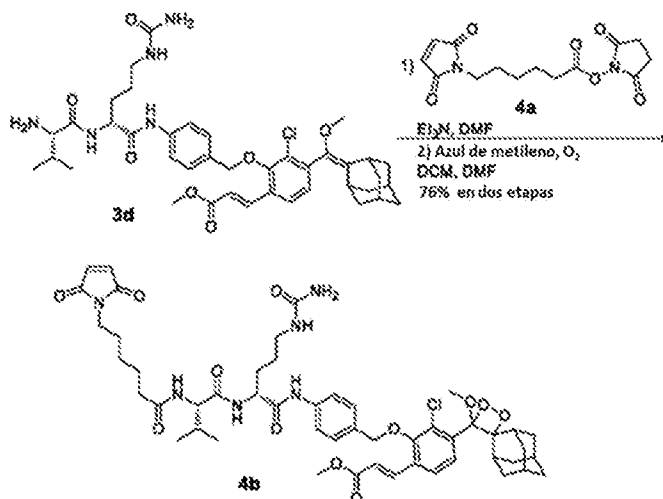
El crudo (12 mg, 0,008 mmol) se disolvió en 5 mL de DCM. Se añadieron unos pocos miligramos de azul de metileno y se burbujó oxígeno a través de la solución, mientras se irradiaba con luz amarilla. La reacción se controló mediante RP-HPLC (30-100 % de ACN en agua, 20 min). Después de completarse, la mezcla de reacción se concentró mediante evaporación a presión reducida y el producto crudo se purificó mediante RP-HPLC preparativa (30-100 % de ACN en agua, 20 min) para proporcionar la sonda 3 (6 mg, 29 % de rendimiento, en dos etapas) como un sólido blanco. MS (ES+): m/z calc. para $\text{C}_{76}\text{H}_{122}\text{ClN}_5\text{O}_{28}$: 1587,80; encontrado: 1589,0 $[\text{M}+\text{H}]^+$. ^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 10,06 (s, 1H), 8,05 (d, $J=7,6$ Hz, 1H), 7,94 (d, $J=8,4$ Hz, 1H), 7,77 (d, $J=8,4$ Hz, 1H), 7,74-7,68 (m, 1H), 7,60 (d, $J=8,6$ Hz, 2H), 7,32 (d, $J=8,3$ Hz, 2H), 7,23 (d, $J=8,7$ Hz, 1H), 6,67 (d, $J=16,1$ Hz, 2H), 5,95 (t, $J=5,5$ Hz, 1H), 5,39 (s, 2H), 4,88 (t, $J=11,6$ Hz, 2H), 4,41 (d, $J=5,1$ Hz, 2H), 4,05 (s, 2H), 3,88 (d, $J=11,7$ Hz, 2H), 3,71 (s, 3H), 3,70 (s, 1H), 3,56 (d, $J=4,5$ Hz, 6H), 3,49 (s, 56H), 3,41 (dd, $J=5,8$, 3,5 Hz, 2H), 3,22 (s, 3H), 3,11 (s, 3H), 3,07-2,90 (m, 2H), 2,87 (s, 1H), 2,28-2,11 (m, 2H), 2,01-1,83 (m, 3H), 1,64 (dd, $J=48,9$, 13,1 Hz, 9H), 1,39 (dd, $J=52,0$, 12,3 Hz, 5H), 1,22 (s, 2H), 0,86 (d, $J=6,7$ Hz, 3H), 0,82 (d, $J=6,7$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ 171,80, 171,24, 169,86, 169,80, 168,91, 166,76, 164,34, 159,45, 156,78, 154,29, 152,20, 139,94, 137,90, 134,91, 133,96, 133,65, 131,83, 131,41, 130,85, 130,20, 129,00, 127,38, 126,60, 123,76, 121,77, 119,46, 116,80, 111,80, 111,77, 96,06, 76,18, 71,86, 70,36, 70,16, 69,39, 64,06, 60,53, 58,62, 53,54, 53,29, 52,27, 49,94, 40,74, 40,54, 40,33, 40,12, 39,91, 39,70, 39,49, 36,46, 36,40, 33,88, 33,78, 33,65, 32,42, 32,23, 31,77, 31,44, 30,94, 30,07, 29,57, 29,21, 27,34, 26,08, 25,79, 22,66, 19,77, 18,70.

Síntesis de la sonda 4

Compuesto 4b. Como se muestra en el Esquema 13, el compuesto 3d (10 mg, 0,013 mmol, 1 eq) y el compuesto 4a (Ikeda *et al.*, 2012) se disolvieron en DMF (0,5 mL) y se añadieron unas pocas gotas de Et_3N . La reacción se controló mediante RP-HPLC (30-100 % de ACN en agua, 20 min). Después de completarse, la mezcla de reacción se concentró a presión reducida. El producto crudo se hizo reaccionar adicionalmente sin purificación. El producto crudo y unos pocos miligramos de azul de metileno se disolvieron en 5 mL de DCM y unas pocas gotas de DMF (para mejorar la solubilidad). Se burbujó oxígeno a través de la solución mientras se irradiaba con luz amarilla. La reacción se controló mediante RP-HPLC (30-100% de ACN en agua, 20 min). Después de completarse, la mezcla de reacción se concentró mediante evaporación a presión reducida. El producto crudo se purificó mediante RP-HPLC preparativa (30-100% de ACN en agua, 20 min) para proporcionar el compuesto 4b (11 mg, 76 % de rendimiento) como un sólido blanco. MS

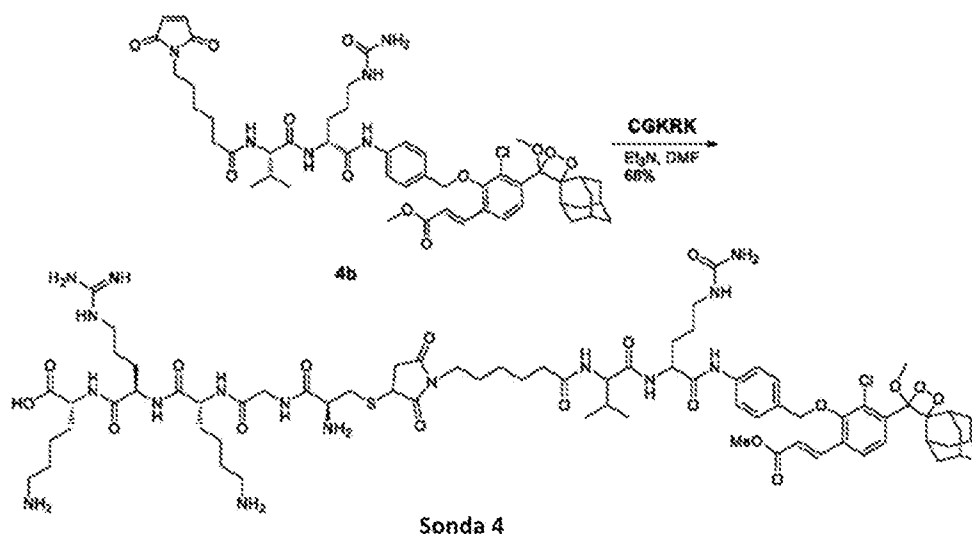
(ES+): m/z calc. para $C_{50}H_{63}ClN_6O_{12}$: 974,42; encontrado: 975,8 [M+H]⁺. ¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 10,02 (s, 1H), 8,09 (d, J=7,5 Hz, 1H), 7,94 (d, J=8,4 Hz, 1H), 7,78 (t, J=9,4 Hz, 2H), 7,70 (d, J=16,2 Hz, 1H), 7,60 (d, J=8,5 Hz, 2H), 7,32 (d, J=7,2 Hz, 2H), 6,98 (s, 2H), 6,67 (d, J=16,2 Hz, 1H), 5,97 (s, 1H), 5,40 (s, 2H), 4,95-4,80 (m, 2H), 4,37 (d, J=5,4 Hz, 1H), 4,26-4,10 (m, 1H), 3,71 (s, 3H), 3,35 (t, J=7,0 Hz, 3H), 3,10 (s, 3H), 3,06-2,97 (m, 1H), 2,97-2,89 (m, 1H), 2,87 (s, 1H), 2,29-2,02 (m, 3H), 1,99-1,85 (m, 2H), 1,79-1,52 (m, 9H), 1,47 (dd, J=14,3, 7,9 Hz, 6H), 1,32 (d, J=11,3 Hz, 2H), 1,18 (dd, J=17,9, 10,0 Hz, 3H), 0,84 (d, J=6,7 Hz, 3H), 0,80 (d, J=6,7 Hz, 3H). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 172,80, 171,61, 171,22, 166,74, 159,43, 154,25, 139,89, 137,90, 134,99, 130,19, 127,40, 121,79, 119,37, 111,72, 95,96, 76,27, 58,07, 53,63, 52,24, 49,96, 39,83, 39,62, 39,42, 37,54, 36,39, 35,45, 33,58, 32,18, 31,38, 30,93, 29,82, 28,30, 27,36, 26,31, 26,02, 25,69, 25,44, 19,78, 18,72.

Esquema 13: Síntesis del compuesto 4b



CGKRK. El péptido CGKRK (Cys-Gly-Lys-Arg-Lys) se sintetizó mediante síntesis de péptidos en fase sólida con Fmoc. La resina Fmoc-Lys(Boc)-Wang se agitó en DMF durante 30 min. La desprotección de Fmoc se realizó con piperidina al 20 % (15 minutos) seguido del acoplamiento del siguiente aminoácido (4 eq) con HBTU (4 eq) en una mezcla de DIPEA (6 eq) y DMF (30 minutos). Estas dos etapas se repitieron hasta completar la secuencia. Finalmente, se completó la desprotección del Fmoc de la cisteína y la secuencia CGKRK se escindió de la resina usando una solución TFA/TIPS/H₂O (90/5/5). El péptido se precipitó y se lavó con una solución fría de éter dietílico y se liofilizó. El producto se obtuvo como un precipitado blanco. MS (ES+): m/z calc. para $C_{23}H_{46}N_{10}O_6S$: 590,33; encontrado: 591,3 [M+H]⁺.

Sonda 4. Como se muestra en el Esquema 14, se disolvieron el compuesto 4b (7 mg, 0,007 mmol, 1 eq) y el péptido CGKRK (7,5 mg, 0,008 mmol, 1,1 eq) en DMF y se añadieron unas pocas gotas de Et₃N. La reacción se controló mediante RP-HPLC (30-100 % de ACN en agua, 20 min). Después de completarse, la mezcla de reacción se concentró mediante evaporación a presión reducida. El producto crudo se purificó mediante RP-HPLC preparativa (30-100 % de ACN en agua, 20 min) para proporcionar la sonda 4 (8 mg, 68 % de rendimiento) como un sólido blanco. MS (ES+): m/z calc. para $C_{73}H_{109}ClN_{16}O_{16}S$: 1566,26; encontrado: 784,1 [(M+H)/2]⁺. ¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 10,06 (s, 1H), 8,88-8,74 (m, 1H), 8,36 (s, 2H), 8,23-8,06 (m, 4H), 7,93 (t, J=12,1 Hz, 1H), 7,85-7,74 (m, 9H), 7,71 (d, J=16,2 Hz, 1H), 7,60 (t, J=7,5 Hz, 2H), 7,33 (d, J=8,4 Hz, 3H), 6,70-6,65 (m, 1H), 6,05 (s, 1H), 4,93-4,83 (m, 2H), 4,46-4,02 (m, 13H), 3,85 (s, 2H), 3,71 (s, 3H), 3,33 (dd, J=14,4, 7,3 Hz, 2H), 3,24-2,90 (m, 8H), 2,87 (s, 1H), 2,71 (dd, J=13,8, 9,6 Hz, 4H), 2,52 (d, J=3,0 Hz, 1H), 2,28-2,04 (m, 2H), 2,01-1,86 (m, 1H), 1,76-1,40 (m, 28H), 1,37-1,26 (m, 6H), 1,23-1,11 (m, 3H), 0,85 (d, J=6,7 Hz, 3H), 0,81 (d, J=6,8 Hz, 3H). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 177,35, 175,41, 173,84, 172,76, 171,95, 171,85, 171,23, 168,35, 167,82, 166,74, 159,53, 159,12, 158,80, 157,34, 154,24, 139,88, 137,89, 134,85, 131,77, 130,72, 130,19, 128,87, 127,39, 126,57, 121,77, 119,37, 118,78, 115,83, 111,71, 95,95, 76,26, 57,99, 53,63, 52,67, 52,55, 52,24, 49,95, 42,52, 40,02, 39,81, 39,61, 39,40, 39,21, 39,09, 38,71, 36,39, 35,45, 33,81, 33,59, 32,19, 31,60, 31,38, 30,99, 30,88, 29,84, 27,35, 27,11, 26,36, 26,02, 25,69, 25,45, 22,85, 22,76, 19,78, 18,70.

Esquema 14: Síntesis de la sonda de quimioluminiscencia 4**Datos espectroscópicos**

El tampón de actividad contenía: tampón fosfato 0,1 M, NaCl 55 mM, EDTA 1 mM, glutatión 5 mM. Todas las mediciones espectroscópicas se realizaron por triplicado. Las mediciones del blanco para el cálculo del límite de detección se repitieron diez veces. El límite de detección (LOD) se calculó como tal:

$$LOD = Media_{blanco} + 3 \times SD$$

en donde SD - desviación estándar.

Imágenes de microscopía de quimioluminiscencia.

Las imágenes de quimioluminiscencia se adquirieron utilizando un microscopio invertido Olympus LV200 equipado con una cámara EMCCD (Hamamatsu C9100-13). Se cultivaron células tumorales inducidas por el virus de la leucemia murina RAW 264.7 Abelson, células de carcinoma de colon CT26CL25 y células de fibroblastos de ratón 3T3 del NIH (control) en placas de Petri con fondo de vidrio de 35 mm a 37°C durante 24 h. El medio de cultivo celular se cambió a una solución Molecular Probes® Solución de imágenes de células vivas Live Cell Imaging Solution que contiene 5 µM de sondas MR 3-128 o MR 3-131. Las células se incubaron durante otros 20 minutos a 37°C. Para la visualización de la emisión de quimioluminiscencia, se registraron imágenes con tiempos de exposición de 20 minutos.

Las imágenes se importaron en el software ImageJ. Para la visualización de imágenes se aplicó un filtro de bola rodante (con un radio de 20 píxeles) y se ajustó el brillo y el contraste de la imagen.

Estudio 1. Las sondas 2-4 son efectivas en la detección de catepsina B

En este estudio, se sintetizaron cuatro sondas identificadas en la presente memoria como sondas 1, 2, 3 y 4 como se describe en la Experimental. La sonda 1 se basó en el adamantilideno-dioxetano de Schaap convencional, con un grupo protector lábil de catepsina B, mientras que la sonda 2 se construyó con la adición de un sistema pi alargado y un grupo aceptor de electrones. Este diseño de par donante-aceptor aumenta la emisión del luminóforo en condiciones fisiológicas, lo que le permite servir como un buen luminóforo para ensayos de una sola etapa con activación enzimática e imágenes de células vivas. Para mejorar la solubilidad en agua y las probabilidades de que las sondas entren en las células, también sintetizamos las sondas 3 y 4. En la sonda 3, el apéndice de N-carboxibencilo (Cbz) se sustituyó por un PEG de longitud media. El PEG se utiliza ampliamente en la construcción de sistemas biológicamente aplicables, ya que es soluble en agua, mejora las propiedades farmacocinéticas de las moléculas adheridas y está aprobado por la FDA.

En la sonda 4, se añadió un enlazador y se unió al péptido CGKRRK (Cys-Gly-Lys-Arg-Lys). El péptido CGKRRK contiene múltiples residuos básicos. Un alto contenido de residuos básicos es una característica compartida entre los péptidos internalizantes, lo que convierte al CGKRRK en un péptido solubilizante y penetrante en las células eficaz. El pentapéptido se identificó por primera vez en un cribado de cánceres epidérmicos de ratones transgénicos. Cuando se acopla una pequeña molécula al péptido CGKRRK, internaliza el conjugado en la mayoría de las células tumorales objetivo, pero no lo absorbe en los tejidos normales. Esto se debe a la sobreexpresión del receptor p32, que reconoce CGKRRK, en la superficie de las células endoteliales y tumorales activadas. Como CGKRRK es reconocido por múltiples

tipos de cánceres, que en su mayoría se correlacionan con los cánceres en los que se sobreexpresa la catepsina B, esperábamos ver un aumento de la absorción celular en células cancerosas vivas cuando utilizamos la sonda 4.

A continuación, se midió la emisión de quimioluminiscencia de las sondas, en función del tiempo, con o sin la adición de catepsina B. Los perfiles cinéticos de las señales de quimioluminiscencia y sus emisiones relativas de fotones totales se muestran en las Figuras 1A y 1B, respectivamente. Las sondas muestran un perfil cinético de quimioluminiscencia característico tras la adición de catepsina B, con un aumento de la señal inicial hasta un máximo seguido de una disminución más lenta hasta la terminación. Hay un aumento distinto en la señal quimioluminiscente de la sonda 1 a las sondas 2, 3 y 4. La sonda 1 produjo una emisión extremadamente débil (Figura 1A, recuadro), como se esperaba debido a la falta del par donante-aceptor añadido. A partir de entonces, se observa un patrón de la señal de quimioluminiscencia aumentada, que se correlaciona con el cambio de apéndice y la solubilidad mejorada de la sonda en medios acuosos. La evaluación de las sondas para las próximas imágenes celulares requirió que también evaluáramos la señal máxima producida por cada sonda, ya que culminará en una mayor sensibilidad y resolución (Figura 1C). La señal máxima de las diferentes sondas palidece en comparación con la de la sonda 4, lo que la convierte en la principal opción para futuras investigaciones. No se observó emisión de luz de las sondas en ausencia de catepsina B.

Para confirmar la conexión entre la degradación enzimática y la señal de quimioluminiscencia de las sondas, se utilizó HPLC para seguir la degradación enzimática de la sonda 4. El análisis por HPLC revela el rápido desmontaje enzimático de la sonda 4 y la eliminación 1,6 ultrarrápida del enlazador de la anilina. Las comparaciones de los datos de HPLC y quimioluminiscencia muestran una fuerte correlación entre la señal máxima de quimioluminiscencia y la terminación de la escisión enzimática. Además, es evidente una relación entre la decadencia de la quimioluminiscencia y el proceso de quimioexcitación (como se ve por la degradación cinética del fenolato desenmascarado al benzoato). Además, esto demuestra la eficacia y rapidez de la descomposición del éster de benzoato hasta su estado fundamental (que va acompañada de la emisión de luz).

Después del cribado inicial mediante cinética de quimioluminiscencia con catepsina B extracelular, se eligieron las sondas 3 y 4 para la evaluación de la formación de imágenes celulares. Estas sondas se seleccionaron porque mostraban la mayor emisión de luz tras la incubación con catepsina B. La obtención de imágenes se realizó con un microscopio adecuado para localizar y cuantificar señales quimioluminiscentes (LV200). Se incubaron células tumorales Raw 264.7, CT26 y células normales 3T3 con la sonda 3 o la sonda 4 y se obtuvieron imágenes utilizando el LV200. Como se muestra en Figura 3, la incubación con la sonda 4 condujo a que se tomaran imágenes de las células cancerosas Raw 246.7 y CT26 a través de la señal de quimioluminiscencia, mientras que no se observó ninguna señal de quimioluminiscencia para las células 3T3. Esto se correlaciona con el hecho de que se encontró que las células Raw 246.7 y CT26 sobreexpresan catepsina B, mientras que las células de fibroblastos de ratón 3T3, como células de tejido normal, producen niveles de catepsina B significativamente más bajos. Como tal, se puede concluir que la sonda 4 es capaz de diferenciar células cancerosas del tejido normal. Por otro lado, la incubación con la sonda 3 no mostró señal de quimioluminiscencia para ninguno de los tipos de células. Esto puede deberse a la menor solubilidad de la sonda 3 en comparación con la sonda 4 (que se puede concluir a partir de los experimentos *in vitro*), o la falta del péptido localizador del tumor que puede aumentar la capacidad de la sonda 4 para encapsularse dentro de las células.

Se midió la sensibilidad de la sonda 4 para detectar la catepsina B y se comparó con la de una sonda fluorescente clásica (Z-Val-Cit-PABA-7HC) basada en 7-hidroxycumarina. Para ver directamente la comparación entre los dos métodos de detección, la relación señal/ruido usando diferentes concentraciones de catepsina B se representó frente a la concentración de enzima usando escalas logarítmicas (Figura 4). Sorprendentemente, la sonda 4 mostró un valor de límite de detección (LOD) de 76,29 $\mu\text{U/mL}$, mientras que Z-Val-Cit-PABA-7HC detectó catepsina B con un valor de LOD de 1,25 U/mL . Esta sensibilidad superior (más de 16000 veces) demuestra claramente la ventaja de la modalidad de quimioluminiscencia frente a la fluorescencia para ensayos de diagnóstico.

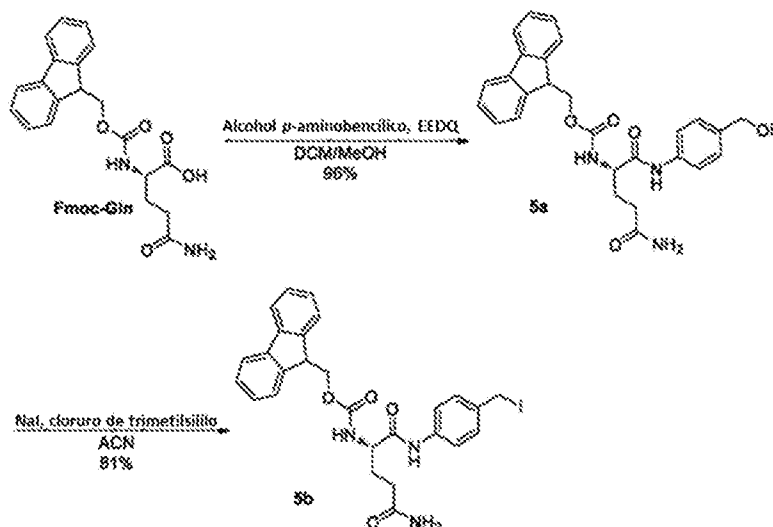
Estudio 2. Sonda 5 para su uso en la detección del antígeno específico de la próstata

Síntesis de la Sonda 5 (sonda PSA)

Compuesto 5a. Como se muestra en el Esquema 15, Fmoc-Glutamina (Fmoc-Gln) (380 mg, 1,03 mmol, 1 eq) y alcohol *p*-aminobencílico (133 mg, 1,08 mmol, 1,05 eq) se disolvieron en THF (7 mL) y se añadió EEDQ (266,3 mg, 1,08, 1,05 eq). Después de 16 h, la mezcla se evaporó hasta sequedad a 30°C y el residuo se trituró con éter (15 mL). El producto sólido blanquecino resultante se recogió mediante filtración, se lavó con éter y se secó al vacío (467 mg, 96%).

Compuesto 5b. Como se muestra en el Esquema 15, se disolvió el compuesto 5a (250 mg, 0,525 mmol, 1 eq) en 7 mL de ACN y se enfrió a 0°C. Se añadió yoduro de sodio (237,5 mg, 1,585 mmol, 3 eq) seguido de la rápida adición de TMS-Cl (200 μL , 1,585 mmol, 3 eq). Se dejó que la reacción se calentara hasta temperatura ambiente y se controló mediante TLC (MeOH:DCM 5:95). Después de completarse, la mezcla de reacción se diluyó con EtOAc y se lavó con $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ saturado seguido de salmuera. La fase orgánica se separó, se secó sobre Na_2SO_4 , se filtró y el disolvente se evaporó a presión reducida, para proporcionar el compuesto 1b (248 mg, 81 % de rendimiento) como un sólido blanquecino.

Esquema 15: Síntesis del compuesto 5b

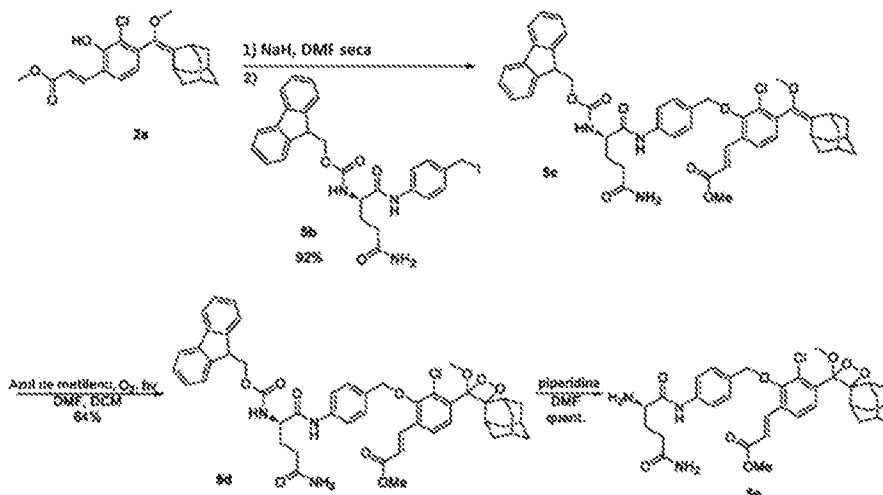


Compuesto 5c. Como se muestra en el Esquema 16, se disolvió el compuesto 2a (100 mg, 0,25 mmol, 1,2 eq) en DMF seco, en atmósfera de argón y se enfrió a 0°C. Se añadió yoduro de sodio (9,23 mg, 0,23, 1,1 eq) y la reacción se dejó calentar hasta temperatura ambiente. Después de agitar durante 15 minutos, se añadió el compuesto 5b (123 mg, 0,21 mmol, 1 eq) y la reacción se controló mediante TLC (EtOAc). Después de completarse, el disolvente se eliminó a presión reducida. El aceite resultante se precipitó con 1,5 mL de EtOAc, seguido de trituración con Et₂O (5 mL) durante 10 minutos. Después, la mezcla se filtró mediante filtración al vacío y el sólido se secó para proporcionar el compuesto 5c (163 mg, 92%) como un sólido blanquecino. MS (ES⁻): *m/z* calc. para C₄₉H₅₀ClN₃O₈: 843,33; encontrado: 878,64 [M+Cl]⁻.

Compuesto 5d. Como se muestra en el Esquema 16, se disolvió el compuesto 5a (110 mg, 0,13 mmol) en 5 mL de DCM. Se añadieron unos pocos miligramos de azul de metileno y se burbujeó oxígeno a través de la solución, mientras se irradiaba con luz amarilla. La reacción se controló mediante RP-HPLC (70-100 % de ACN en agua, 20 min). Después de completarse, la mezcla de reacción se concentró mediante evaporación a presión reducida y el producto crudo se purificó mediante RP-HPLC preparativa (70-100 % de ACN en agua, 20 min) para proporcionar el compuesto 5d (72 mg, 64 % de rendimiento) como un sólido blanco.

Compuesto 5e. Como se muestra en el Esquema 16, se disolvió el compuesto 5d (30 mg, 0,034 mmol) en DMF (8 mL) y se añadió piperidina (2 mL). La reacción se controló mediante RP-HPLC (50-100 % de ACN en agua, 20 min). Después de completarse, el disolvente se eliminó a presión reducida. El aceite resultante se precipitó con 1,5 mL de EtOAc, seguido de trituración con Et₂O (20 mL) durante 10 minutos. Después, la mezcla se filtró mediante filtración al vacío y el sólido se secó para proporcionar el compuesto 5e (22 mg, cuant.) como un sólido blanquecino.

Esquema 16: Síntesis del compuesto 5e



Mu-HSSKL. El péptido Mu-HSSKL (morfolino-His-Ser-Ser-Lys-Leu) se sintetizó mediante síntesis de péptidos en fase sólida-Fmoc. La resina Fmoc-Leu-Wang se agitó en DMF durante 30 min. La desprotección del Fmoc se realizó con

piperidina al 20 % (15 minutos) seguido del acoplamiento del siguiente aminoácido (4 eq) con HBTU (4 eq) en una mezcla de DIPEA (6 eq) y DMF (30 minutos). Estas dos etapas se repitieron hasta completar la secuencia. Finalmente, se completó la desprotección del Fmoc de la His y la secuencia HSSKL se acopló con cloruro de 4-morfolincarbonilo. Posteriormente, el péptido se escindió de la resina usando una solución de TFA/TIPS/H₂O (90/5/5). El péptido se precipitó y se lavó con una solución fría de éter dietílico y se liofilizó. El producto se obtuvo como un precipitado blanco. MS (ES⁻): *m/z* calc. para C₂₉H₄₉N₉O₁₀: 683,36; encontrado: 682,6 [M-H]⁻.

Compuesto 5f. Como se muestra en el Esquema 17, se disolvió Mu-HSSKL (175 mg, 0,25 mmol, 1,5 eq) en DMF (3 mL) y se añadieron Fmoc-OSu (129 mg, 0,38 mmol, 1,5 eq) y DIPEA (134 µl, 0,66 mmol, 3 eq). La reacción se controló mediante RP-HPLC (10-90 % de ACN en agua, 20 min). Después de completarse, la mezcla de reacción se concentró mediante evaporación a presión reducida y el producto crudo se purificó mediante RP-HPLC preparativa (10-90 % de ACN en agua, 40 min) para proporcionar el compuesto 5f (162 mg, 70 % de rendimiento) como un sólido blanco. MS (ES⁺): *m/z* calc. para C₄₄H₅₉N₉O₁₂: 905,43; encontrado: 906,7 [M+H]⁺.

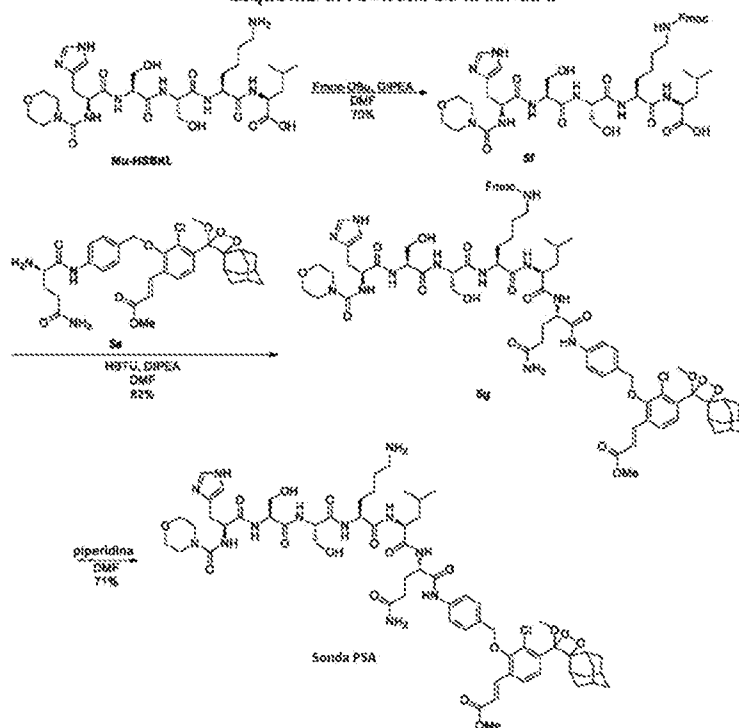
Compuesto 5g. Como se muestra en el Esquema 17, se disolvió el compuesto 5f (10 mg, 0,0114 mmol, 1,1 eq) en DMF (3 mL) y se añadieron HBTU (4,8 mg, 0,0125 mmol, 1,1 eq) y DIPEA (4 µl, 0,028 mmol, 2 eq). Después de 15 minutos, se añadió el compuesto 5e (1,83 mg, 0,028 mmol, 2 eq). La reacción se controló mediante RP-HPLC (10-90 % de ACN en agua, 20 min). Después de completarse, la mezcla de reacción se concentró mediante evaporación a presión reducida y el producto crudo se purificó mediante RP-HPLC preparativa (10-90 % de ACN en agua, 20 min) para proporcionar el compuesto 5g (18 mg, 82 % de rendimiento) como un sólido blanco. MS (ES⁺): *m/z* calc. para C₇₈H₉₇ClN₁₂O₁₉: 1540,67; encontrado: 1541,8 [M+H]⁺.

Sonda 5. Como se muestra en el Esquema 17, se disolvió el compuesto 5g (9 mg, 0,0057 mmol) en piperidina al 20 % en DMF (1 mL). La reacción se controló mediante RP-HPLC (10-90 % de ACN en agua, 20 min). Después de completarse, el disolvente se eliminó a presión reducida. El aceite resultante se precipitó, se lavó con una solución fría de éter dietílico y se liofilizó. El producto se obtuvo como un precipitado blanquecino (7 mg, cuant.). MS (ES⁺): *m/z* calc. para C₆₃H₈₇ClN₁₂O₁₇: 1318,60; encontrado: 1319,8 [M+H]⁺.

En este estudio, se sintetizó una sonda de quimioluminiscencia diferente, identificada en la presente memoria como sonda 5, con un péptido escindible por PSA (HSSKLQ, histidina-serina-serina-lisina-leucina-glutamina) como un grupo protector, y una capa de 4-morfolincarbonilo que es estable y que supuestamente aumenta la solubilidad. La sonda se basa en un adamantilideno-dioxetano de Schaap convencional con la adición de un sistema pi alargado y un grupo aceptor de electrones. Este diseño de par donante-aceptor aumenta la emisión del luminóforo en condiciones fisiológicas, lo que le permite servir como un buen luminóforo para ensayos de una sola etapa con activación enzimática y formación de imágenes de células vivas.

La Figura 5 muestra los perfiles cinéticos de quimioluminiscencia de la sonda 5 [10 µM] en tampón Tris (pH 7,8, DMSO al 10%) en presencia de 10 mg/mL de PSA a temperatura ambiente.

Esquema 17: Síntesis de la sonda 5



REFERENCIAS

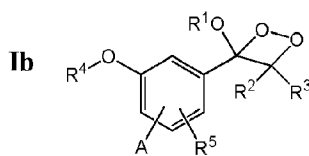
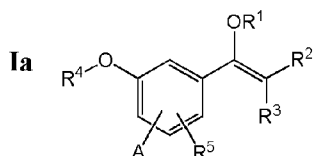
- Chi, C.; Du, Y.; Ye, J.; Kou, D.; Qiu, J.; Wang, J.; Tian, J.; Chen, X. *Theranostics* **2014**, 4(11), 1072-1084
- Dubowchik, G.M.; Firestone, R.A.; Padilla, L.; Willner, D.; Hofstead, S.J.; Mosure, K.; Knipe, J.O.; Lasch, S.J.; Trail, P.A. *Bioconjug. Chem.* **2002**, 13, 855-869
- Eilon-Shaffer, T.; Roth-Konforti, M.; Eldar-Boock, A.; Satchi-Fainaro, R.; Shabat, D. *Org. Biomol. Chem.* **2018**, 16, 1708-1712
- Green, O.; Eilon, T.; Hananya, N.; Gutkin, S.; Bauer, C.; Shabat, D. *ACS Cent. Sci.* **2017**, 3, 349-358
- Griffin, J. I.; Cheng, S. K.; Hayashi, T.; Carson, D.; Saraswathy, M.; Nair, D. P.; Simberg, D. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, **2017**, 13(6), 1925-1932
- Haber, G.P.; White, M.A.; Autorino, R.; Escobar, P.F.; Kroh, M.D.; Chalíkonda, S.; Khanna, R.; Forest, S.; Yang, B.; Altunrende, F.; Stein, R.J.; Kaouk, J.H. *Urology* **2010**, 76, 1279-1282
- Harris, J., Chess, R. *Nat Rev Drug Discov* **2003**, 2, 214-221
- Ikeda, M.; Ochi, R.; Kurita, Y.; Pochan, D.J.; Hamachi, I. *Chem. - A Eur. J.* **2012**, 18, 13091-13096
- Mieog, J.S.; Troyan, S.L.; Hutteman, M.; Donohoe, K.J.; van der Vorst, J.R.; Stockdale, A.; Liefers, G.J.; Choi, H.S.; Gibbs-Strauss, S.L.; Putter, H.; Gioux, S.; Kuppen, P.J.; Ashitate, Y.; Lowik, C.W.; Smit, V.T.; Oketokoun, R.; Ngo, L.H.; van de Velde, C.J.; Frangioni, J.V.; Vahrmeijer, A.L. *Annals of surgical oncology* **2011**, 18, 2483-2491
- Miller, K.; Erez, R.; Segal, E.; Shabat, D.; Satchi-Fainaro, R. *Angew Chem Int Ed Engl.* **2009**, 48(16), 2949-2954
- Richard, J.A.; Jean, L.; Romieu, A.; Massonneau, M.; Noack-Fraissignes, P.; Renard, P.Y. *Org Lett.*, **2007**, 9(23), 4853-4855
- Richard, J.A.; Jean, L.; Schenkels, C.; Massonneau, M.; Romier, A.; Renard, P-Y. *Org. Biomol. Chem.*, **2009**, 7, 2941-2957
- Segal, E.; Pan, H.; Ofek, P.; Udagawa, T.; Kopeckova, P.; Kopecek, J.; Satchi-Fainaro, R. *PLoS One* **2009**, 4(4), e5233

Troyan, S.L.; Kianzad, V.; Gibbs-Strauss, S.L.; Gioux, S.; Matsui, A.; Oketokoun, R.; Ngo, L.; Khamene, A.; Azar, F.; Frangioni, J.V. *Annals of surgical oncology* **2009**, 16, 2943-2952

Tsuchikama, K., An, Z. *Protein Cell* **2018**, 9, 33–46

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la fórmula Ia o Ib:

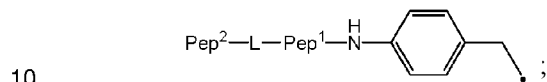


en donde

5 R¹ se selecciona de un alquilo de (C₁-C₁₈), o cicloalquilo de (C₃-C₇) lineal o ramificado;

R² y R³ se seleccionan cada uno independientemente de un alquilo de (C₃-C₁₈) o un cicloalquilo de (C₃-C₇) ramificado, o R² y R³ junto con el átomo de carbono al que están unidos forman un anillo cíclico o policíclico fusionado, espiro o con puente;

R⁴ es un grupo de la fórmula:



R⁵ es H, o halógeno unido en *orto* o *para* al grupo -O-R⁴;

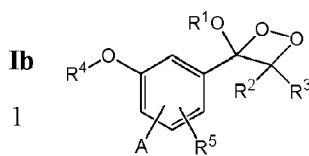
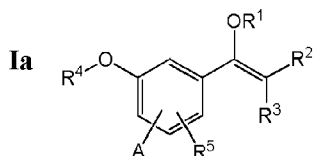
A es un grupo π* aceptor de fórmula -CH=CH-E, unido ya sea en *orto* o *para* al grupo -O-R⁴, en el que E es -CN, -COOH, -COO-alquilo de (C₁-C₁₈), 4-piridinilo, metilpiridin-4-ilo, 3,3-dimetil-3H-indolilo o 1,3,3-trimetil-3H-indol-1-ilo-2-ilo;

15 Pep¹ es un resto peptídico escindible por proteasa que consiste en al menos dos restos de aminoácidos y está unido mediante un grupo carboxílico del mismo al grupo anilina, en el que dicho resto peptídico está protegido o unido a través de un grupo amino del mismo a un grupo que contiene polietilenglicol (PEG);

L está ausente; y

Pep² está ausente.

20 2. Un compuesto de la fórmula Ia o Ib:

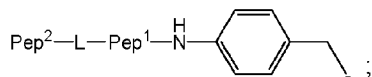


en donde

R¹ se selecciona de un alquilo de (C₁-C₁₈), o un cicloalquilo de (C₃-C₇) lineal o ramificado;

25 R² y R³ se seleccionan cada uno independientemente de un alquilo de (C₃-C₁₈) o cicloalquilo de (C₃-C₇) ramificado, o R² y R³ junto con el átomo de carbono al que están unidos forman un anillo cíclico o policíclico fusionado, espiro o con puente;

R⁴ es un grupo de la fórmula:



R⁵ es H, o halógeno unido en *orto* o *para* al grupo -O-R⁴;

30 A es un grupo π* aceptor de fórmula -CH=CH-E, unido ya sea en *orto* o *para* al grupo -O-R⁴, en el que E es -CN, -COOH, -COO-alquilo de (C₁-C₁₈), 4-piridinilo, metilpiridin-4-ilo, 3,3-dimetil-3H-indolilo o 1,3,3-trimetil-3H-indol-1-ilo-2-ilo;

Pep¹ es un resto peptídico escindible por proteasa que consiste en al menos dos restos de aminoácidos y está unido mediante un grupo carboxílico del mismo al grupo anilina;

L es un enlazador unido a Pep¹ mediante un enlace amida a través de un grupo carboxilo o amino de Pep¹; y

Pep² es un resto peptídico que penetra en las células unido a L mediante un enlace amida a través de un grupo amino o carboxilo del mismo, o mediante un grupo tiol del mismo.

3. El compuesto de la reivindicación 1 o 2, en el que:

5 (i) R¹ es un alquilo de (C₁-C₈) lineal o ramificado; o

(ii) R² y R³ junto con el átomo de carbono al que están unidos forman un anillo policíclico fusionado, espiro o con puente; o

(iii) R⁵ es un halógeno unido en *orto* al grupo -O-R⁴; o

(iv) A es $-\text{CH}=\text{CH}-\text{E}$ unido en *orto* al grupo $-\text{O}-\text{R}^4$, en el que E es $-\text{CN}$, $-\text{COOH}$, $-\text{COO}$ -alquilo de (C_1-C_8), 4-piridinilo, metilpiridin-4-ilo, 3,3-dimetil-3H-indolilo o 1,3,3-trimetil-3H-indol-1-ilo-2-ilo.

4. El compuesto de la reivindicación 3, en el que:

(i) R^2 y R^3 junto con el átomo de carbono al que están unidos forman adamantilo; o

(ii) E es -CN, -COOH o -COO-alquilo de (C₁-C₄).

5. El compuesto de la reivindicación 1 o 2, en el que:

15 R¹ es un alquilo de (C₁-C₈) lineal o ramificado;

R² y R³ junto con el átomo de carbono al que están unidos forman un anillo policíclico fusionado, espiro o con puente;

R⁵ es un halógeno unido en *orto* al grupo -O-R⁴; y

A es $-\text{CH}=\text{CH}-\text{E}$ unido en *orto* al grupo $-\text{O}-\text{R}^4$, en el que E es $-\text{CN}$, $-\text{COOH}$, $-\text{COO}$ -alquilo de (C_1-C_8) , 4-piridinilo, metilpiridin-4-ilo, 3,3-dimetil-3H-indolilo o 1,3,3-trimetil-3H-indol-1-ilo-2-ilo.

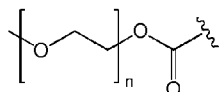
20 6. El compuesto de la reivindicación 5, en el que R¹ es metilo; R² y R³ junto con el átomo de carbono al que están unidos forman adamantilo; R⁵ es un halógeno unido en *orto* al grupo -O-R⁴; y E es -CN, -COOH o -COO-alkilo de (C₁-C₄).

7. El compuesto de la reivindicación 6, en el que E es -CN, -COOH, -COOCH₃, o -COOC(CH₃)₃.

25 8. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 a 7, en el que Pep¹ es un resto peptídico que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos Val-Cit, Phe-Lys, Gly-Phe-Leu-Gly, Gly-Gly-Pro-Nle, Ala-Ala-Asn o His-Ser-Ser-Lys- Leu-Gln, en donde dicha secuencia de aminoácidos está (i) unida mediante el grupo carboxílico de la citrulina, lisina, glicina, norleucina, asparagina o glutamina, respectivamente, al grupo anilina; e (ii) protegido en un grupo amino del mismo, o unido mediante un enlace amida y a través de dicho grupo amino a un grupo que contiene PEG.

30 9. El compuesto de la reivindicación 8, en el que:

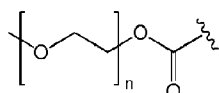
(i) dicho grupo que contiene PEG es de la fórmula



en donde n es un número entero de 1 a 227; o

(ii) Pep¹ es un resto peptídico de secuencia Val-Cit, Phe-Lys, Gly-Phe-Leu-Gly, Gly-Gly-Pro-Nle, Ala-Ala-Asn o His-Ser-Ser-Lys-Leu-Gln, unidos a través del grupo carboxílico de la citrulina, lisina, glicina, norleucina, asparagina o glutamina, respectivamente, al grupo anilina, y protegido en el grupo α-amino de la valina, fenilalanina, glicina, glicina, alanina o histidina, respectivamente, con un grupo protector amino; o

(iii) Pep¹ es un resto peptídico de la secuencia Val-Cit, Phe-Lys, Gly-Phe-Leu-Gly, Gly-Gly-Pro-Nle, Ala-Ala-Asn o His-Ser-Ser-Lys-Leu-Gln, unidos a través del grupo carboxílico de la citrulina, lisina, glicina, norleucina, asparagina o glutamina, respectivamente, al grupo anilina, y unido a través del grupo α-amino de la valina, fenilalanina, glicina, glicina, alanina o histidina, respectivamente, a un grupo que contiene PEG de la fórmula

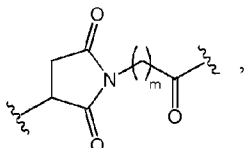


en donde n es un número entero de 1 a 227.

- 5 10. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, en el que Pep¹ es un resto peptídico que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos Val-Cit, Phe-Lys, Gly-Phe-Leu-Gly, Gly-Gly-Pro-Nle, Ala-Ala-Asn o His-Ser-Ser-Lys-Leu-Gln, unida mediante el grupo carboxílico de la citrulina, lisina, glicina, norleucina, asparagina o glutamina, respectivamente, al grupo anilina; L es un enlazador unido a Pep¹ mediante un enlace amida a través de un grupo carboxilo o amino de Pep¹; y Pep² es un resto peptídico unido a L a través de un grupo tiol del mismo.

11. El compuesto de la reivindicación 10, en el que

L es un enlazador de la fórmula:



10

unido a Pep¹ mediante un enlace amida a través de un grupo amino de Pep¹, en donde m es un número entero de 1-20, y la cadena de alquileo de L está opcionalmente interrumpida con uno o más grupos -O-; y

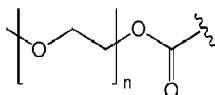
Pep² es un resto peptídico de la secuencia Cys-Gly-Lys-Arg-Lys, unido a L a través del grupo tiol del resto de cisteína.

- 15 12. El compuesto de la reivindicación 1 o 2, en el que R¹ es metilo; R² y R³ junto con el átomo de carbono al que están unidos forman adamantilo; R⁵ es un cloro unido en *orto* al grupo -OR⁴; A es -CH=CH-E unido en *orto* al grupo -O-R⁴; E es -COOCH₃ o -CN; y

(i) Pep¹ es un resto peptídico de la secuencia Val-Cit, unido mediante el grupo carboxílico de la citrulina al grupo anilina, y protegido en el grupo amino de la valina con carboxibencilo;

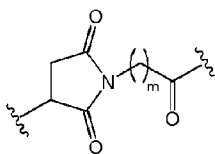
- 20 (ii) Pep¹ es un resto peptídico de la secuencia His-Ser-Ser-Lys-Leu-Gln, unido mediante el grupo carboxílico de la glutamina al grupo anilina y protegido en el grupo α-amino de la histidina con N-morfolincarbonilo;

(iii) Pep¹ es un resto peptídico de la secuencia Val-Cit, unido mediante el grupo carboxílico de la citrulina al grupo anilina, y unido mediante el grupo amino de la valina a un grupo que contiene PEG de la fórmula



en donde n es 17; o

- 25 (iv) Pep¹ es un resto peptídico de la secuencia Val-Cit o His-Ser-Ser-Lys-Leu-Gln, unido mediante el grupo carboxílico de la citrulina o la glutamina, respectivamente, al grupo anilina; L es un enlazador de la fórmula:

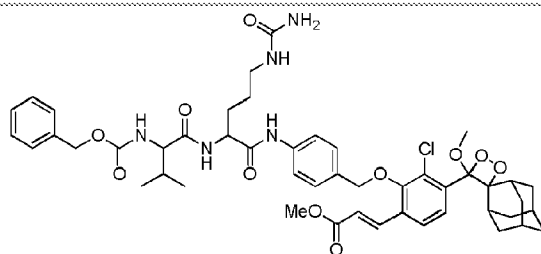


en donde m es un número entero de 5,

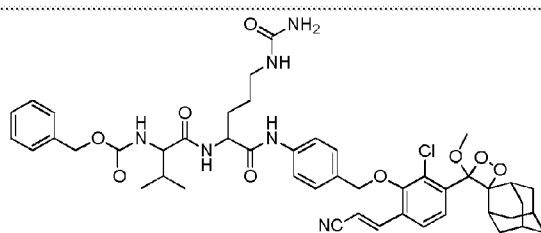
- 30 unido a Pep¹ mediante un enlace amida a través del grupo α-amino de la valina o histidina, respectivamente; y Pep² es un resto peptídico de la secuencia Cys-Gly-Lys-Arg-Lys, unido a L a través del grupo tiol del resto de cisteína.

13. El compuesto de la reivindicación 12, seleccionado de los compuestos Ib-1a, Ib-1b, Ib-2a, Ib-2b, Ib-3a, Ib-3b, Ib-4a, Ib-4b, Ib-5a o Ib-5b.

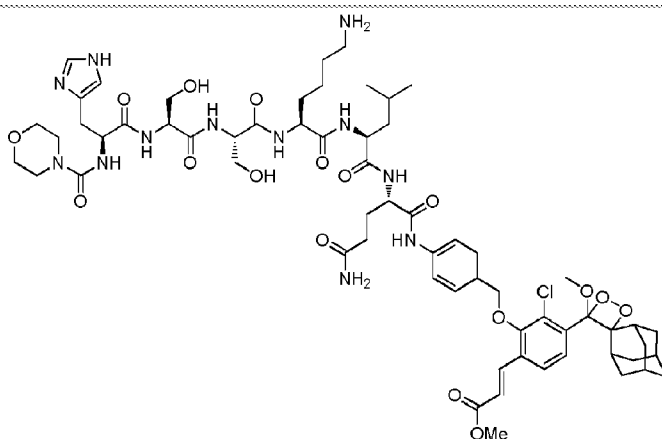
Ib-1a



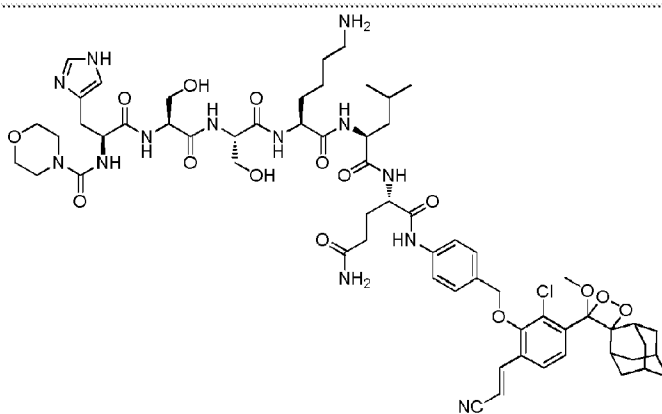
Ib-1b



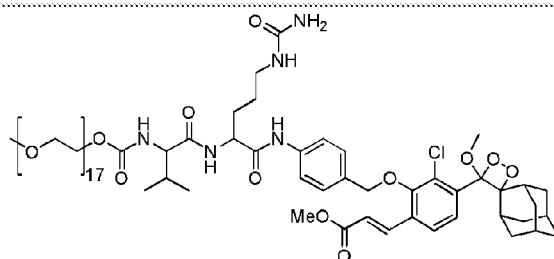
Ib-2a



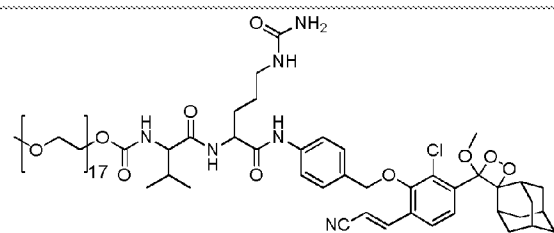
Ib-2b



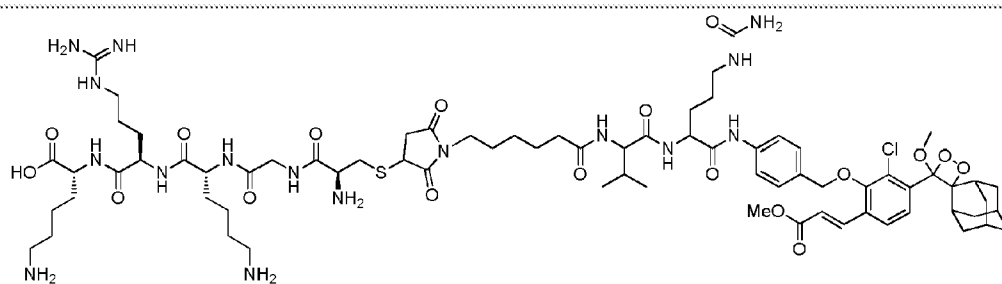
Ib-3a



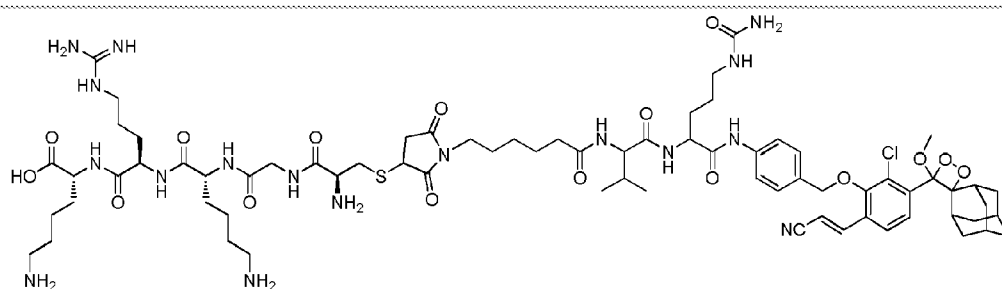
Ib-3b



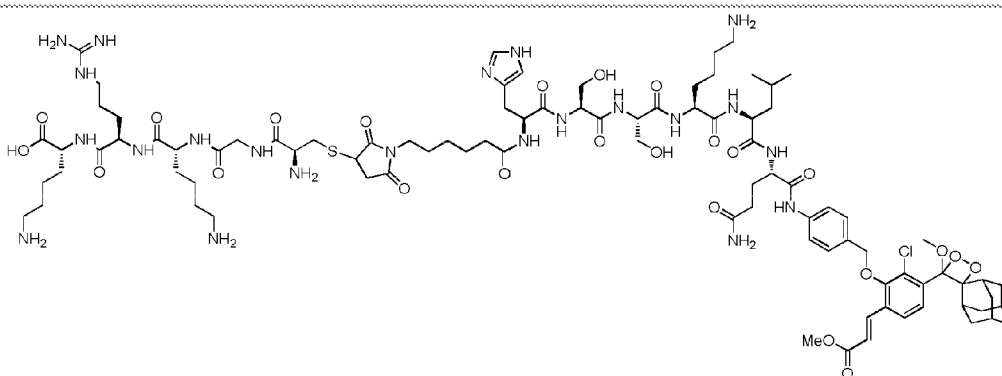
Ib-4a

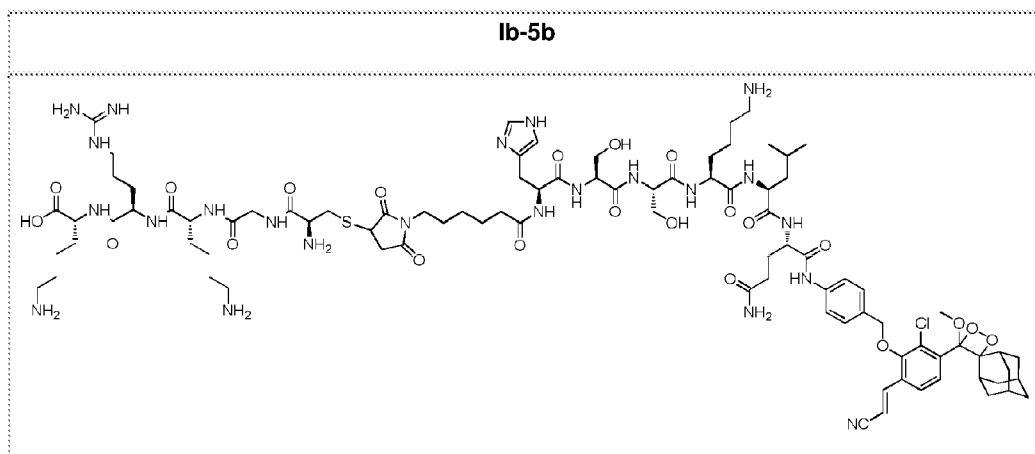


Ib-4b



Ib-5a





14. Una composición que comprende un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 y un vehículo.

5 15. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, o una composición según la reivindicación 14, para su uso *in vivo* en diagnóstico o formación de imágenes.

10 16. Un método para determinar la presencia *in vitro*, o medir el nivel, de una proteasa en una muestra, comprendiendo dicho método (i) poner en contacto dicha muestra con un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde Pep¹ es un grupo escindible por dicha proteasa, o una composición que comprende dicho compuesto, para de este modo hidrolizar dicho compuesto a una especie emisiva por dicha proteasa, cuando está presente en dicha muestra; y (ii) detectar la emisión de quimioluminiscencia de dichas especies emisivas.

17. El método de la reivindicación 16, en el que dicha muestra es una muestra biológica tal como un fluido corporal, una solución acuosa en la que se disuelve dicho fluido corporal o una muestra de biopsia de tejido.

18. El método de la reivindicación 16 o 17, en el que dicha proteasa es una catepsina tal como catepsina A, B, C, D, E, F, G, H, K, L1, L2, O, S, W y Z, legumaina, antígeno específico de la próstata (PSA) o una metaloproteasa.

Figura 1A

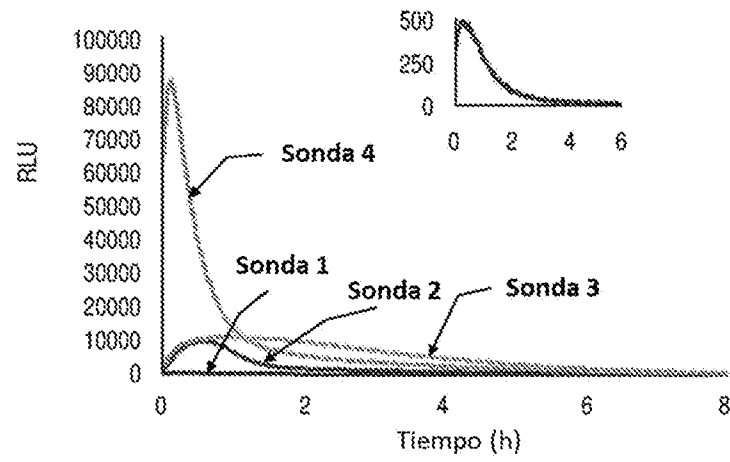


Figura 1B

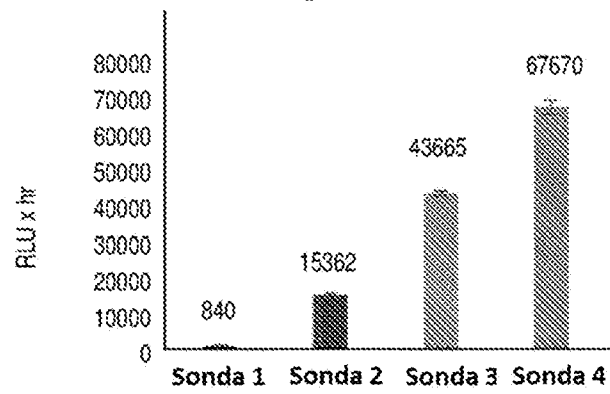


Figura 1C

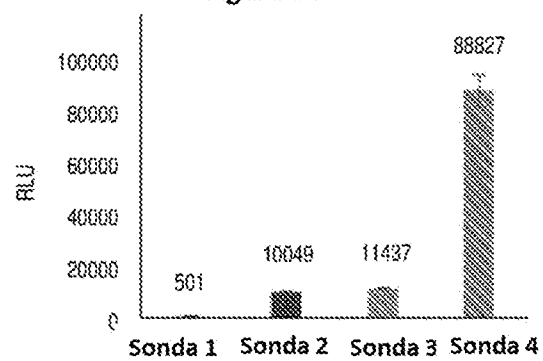


Figura 2

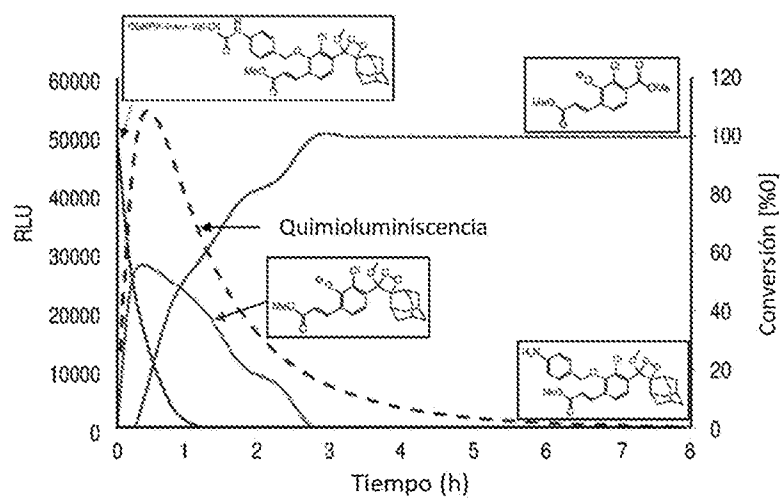


Figura 3

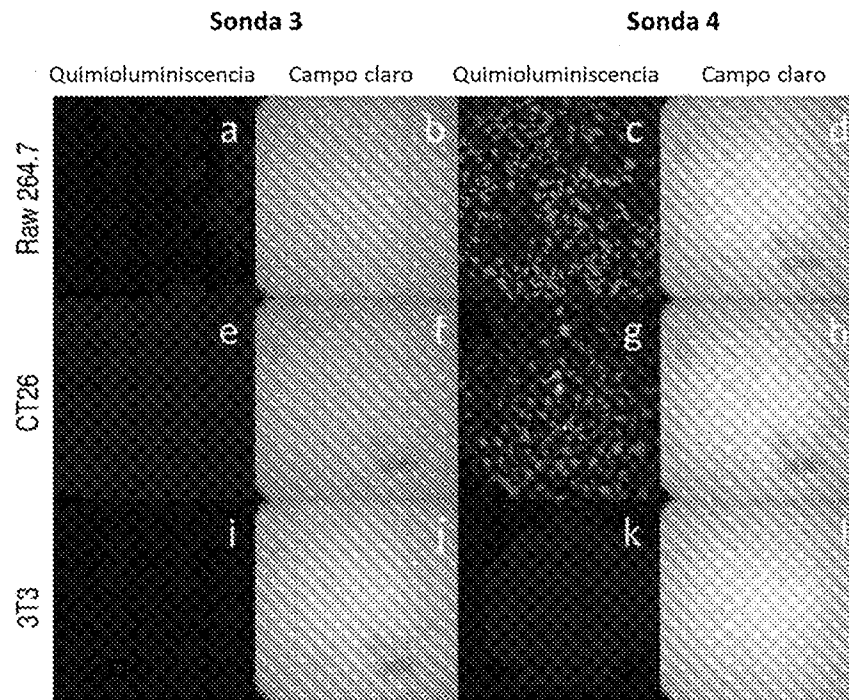


Figura 4

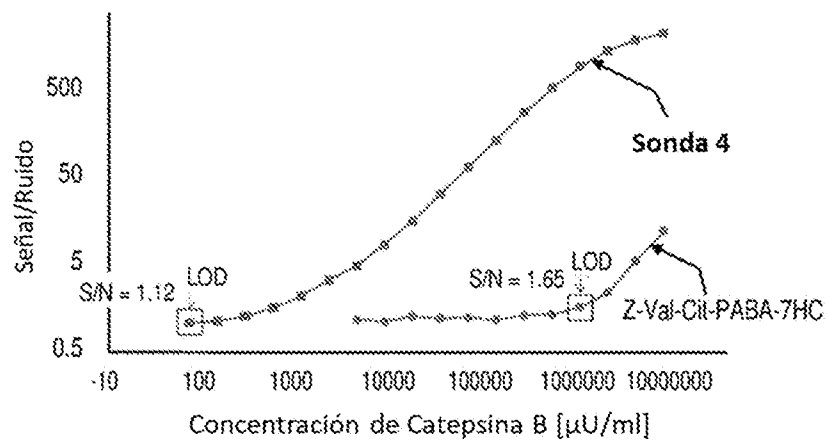


Figura 5

