

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 878 581**

51 Int. Cl.:

**C07D 498/04** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2008.01)

**C12N 9/99** (2006.01)

**C12N 9/12** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.07.2017 PCT/FR2017/051925**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.01.2018 WO18011527**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.07.2017 E 17748542 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.04.2021 EP 3484891**

54 Título: **Reactivos para la protección reversible de moléculas biológicas**

30 Prioridad:

**13.07.2016 FR 1656791**

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

**19.11.2021**

73 Titular/es:

**BIOMÉRIEUX (50.0%)  
69280 Marcy-L'Etoile, FR y  
UNIVERSITÉ DE CAEN NORMANDIE (50.0%)**

72 Inventor/es:

**URSUEGUI, SYLVAIN;  
LAURENT, ALAIN;  
LAAYOUN, ALI y  
FABIS, FRÉDÉRIC**

74 Agente/Representante:

**VEIGA SERRANO, Mikel**

**ES 2 878 581 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

Reactivos para la protección reversible de moléculas biológicas

5 **Sector de la técnica**

La presente invención se refiere a reactivos para la protección reversible de moléculas biológicas. En particular, trata de compuestos derivados del anhídrido azaisoico y sus usos para la protección de moléculas biológicas, particularmente las enzimas, para bloquear su actividad. La invención está dirigida igualmente a las moléculas biológicas así protegidas y a los procedimientos de implementación de estos reactivos.

**Estado de la técnica**

Las pruebas modernas de diagnóstico *in vitro*, que utilizan técnicas de biología molecular para una detección específica, rápida y cuantitativa de los ácidos nucleicos objetivo presentes en una muestra biológica suelen utilizar enzimas polimerasas que permiten la amplificación de los ácidos nucleicos objetivo a partir de cebadores específicos.

Las polimerasas denominadas "*hot-start*" se han desarrollado porque presentan numerosas ventajas con respecto a su versión nativa y, en particular, proporcionan unas mejores prestaciones de sensibilidad a las pruebas de diagnóstico.

El principio de funcionamiento de una polimerasa "*hot-start*" es bloquear su actividad de forma transitoria, ya sea por un anticuerpo, un aptámero o por un agente químico, y después restaurar la actividad en cuanto se eleva la temperatura durante la amplificación de la PCR.

El bloqueo por un agente químico es especialmente ventajoso por su bajo coste. La inactivación de las polimerasas por una acilación de las funciones amino de los residuos de lisina se ha descrito en la técnica anterior (véase, por ejemplo: Enzyme and Microbial Technology 36 (2005) 947-952 "Thermally reversible inactivation of Taq polymerase in an organic solvent for application in hot start PCR", Ariel Louwrier, Anne van der Valk). En la etapa de desnaturalización a 95 °C durante el primer ciclo de PCR o durante una etapa de preactivación a temperatura elevada, los grupos protectores se escinden y la actividad de la enzima se restaura.

Las patentes US5677152 y US5773258 describen la utilización de anhídrido citracónico y sus derivados en un medio acuoso para proteger temporalmente los grupos NH<sub>2</sub> de las lisinas de la polimerasa *Taq*. La amida generada tras la reacción del anhídrido y una amina es hidrolizable después por el medio acidificado tras el tratamiento térmico en presencia del tampón Tris utilizado en las reacciones de PCR.

Además, se ha demostrado que los derivados del anhídrido isatoico son capaces de reaccionar con grupos nucleófilos tales como las aminas presentes en las proteínas. En 1982, Moorman A.R. *et al.* describieron la acilación de una proteína, la quimotripsina  $\alpha$ , por el anhídrido isatoico (Moorman A.R., Abeles R.H. J. Am. Chem. Soc., 1982, 104, 6785-6786). Esta reacción implica la inactivación de la proteína generando derivados antranílicos estables. Más recientemente, Hooker *et al.* utilizaron la reactividad del anhídrido isatoico para modificar los residuos de lisina de las moléculas de lisozima e introducir así unidades de anilina que luego pueden ser funcionalizadas a través de un acoplamiento oxidante (Hooker J. M., Esser-Kahn A. B., B. Francis M. B. J. Am. Chem. Soc., 2006, 106, 1558-1559). La acilación del grupo amino presente en la cadena lateral de las lisinas por el anhídrido isatoico conduce así a la formación de enlaces amídicos muy estables.

La solicitud de patente FR1257526 describe además agentes acilantes, derivados de anhídrido isatoico para la funcionalización, el marcaje, la captura o la separación de ácidos ribonucleicos (ARN) o de ácidos nucleicos quiméricos (ARN/ADN). Los agentes acilantes se describen más específicamente para la fijación de grupos de interés a estas moléculas biológicas.

La presente invención se propone proporcionar nuevos reactivos para la protección reversible de moléculas biológicas, y en particular para la preparación de las denominadas enzimas "*Hot Start*", es decir, que pueden desprotegerse fácilmente mediante un tratamiento térmico, presentando dichos nuevos reactivos preferentemente una o más de las siguientes ventajas:

- son baratos,
- son estables,
- son solubles en medio acuoso,
- son eficaces en cuanto a su velocidad de reacción, pero también en cuanto a su velocidad de desprotección,
- el producto de su reacción con una biomolécula es estable,
- no requieren el uso de tampón Tris para la desprotección en caliente, y/o,
- no generan reacciones secundarias indeseables.

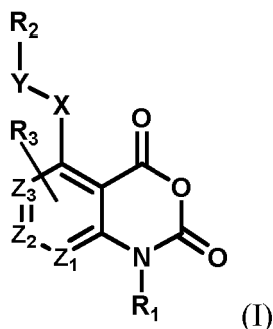
Los reactivos descritos en la presente solicitud son, por tanto, particularmente apropiados para inactivar

transitoriamente las enzimas implicadas en la polimerización de ácidos nucleicos, tales como la polimerasa *Taq* o ciertas transcriptasas inversas, y más generalmente, las enzimas utilizadas en las técnicas de diagnóstico *in vitro*.

**Objeto de la invención**

5

Así, la presente invención tiene por objeto un compuesto de la siguiente fórmula (I):



10 en la que

X es un enlace covalente o un alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>4</sub>,

15 Y es un radical nucleófilo elegido entre O, S, NR<sub>4</sub>, O-NR<sub>4</sub>, NH-O, NH-NR<sub>4</sub>, C(O)-O-NR<sub>4</sub>, C(O)-NH-O, C(O)-NH-NR<sub>4</sub>, O-C(O)-NH-NR<sub>4</sub>, NH-C(O)-NH-NR<sub>4</sub>, OC(O)-NH-O, NH-C(O)-NH-O, O-C(O)-O-NR<sub>4</sub>, NH-C(O)-O-NR<sub>4</sub>, C(O)-S, preferentemente O, S, NR<sub>4</sub>, O-NR<sub>4</sub>, NH-O o NH-NR<sub>4</sub>, y R<sub>4</sub> es H o un grupo alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>4</sub>

y cuando Y se elige entre O, S y NR<sub>4</sub>, X no es un enlace,

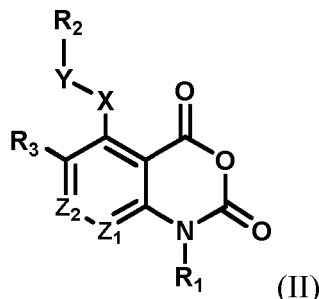
20 Z<sub>1</sub>, Z<sub>2</sub>, Z<sub>3</sub> representan cada uno independientemente entre sí, N o C, preferentemente Z<sub>3</sub> representa C, más preferentemente Z<sub>3</sub> es C y R<sub>3</sub> está en la posición Z<sub>3</sub>,

25 R<sub>1</sub> es H, un grupo alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>, sustituido o no sustituido, un alqueno sustituido o no sustituido, un grupo arilo sustituido o no sustituido o un heterociclo sustituido o no sustituido, preferentemente R<sub>1</sub> es un grupo metilo o etilo.

R<sub>2</sub> es un grupo protector termolábil y/o acidolábil,

30 R<sub>3</sub> es H, un grupo alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>12</sub> sustituido o no sustituido, por ejemplo, un grupo *iso*-propilo, isobutilo, *sec*-butilo, *tert*-butilo, isopentilo o 2,2-dimetilpropilo, un grupo arilo sustituido o no sustituido, un heterociclo sustituido o no sustituido, un grupo acilo, un grupo alqueno sustituido o no sustituido, un halógeno (por ejemplo, F, Cl, Br y I), o un grupo ciano.

En un modo de realización preferido, el compuesto según la invención es de la siguiente fórmula (II):



35

En la que X, Y, Z<sub>1</sub>, Z<sub>2</sub>, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> son tales como los definidos anteriormente para la fórmula (I).

40 En un modo de realización específico, el grupo termolábil y/o acidolábil R<sub>2</sub> en las anteriores fórmulas (I) y (II) se elige entre los grupos *tert*-butoxicarbonilo (BOC), fenoxiacetilo sustituido o no sustituido, tritilo, metoxitritilo, dimetoxitritilo o citraconilo.

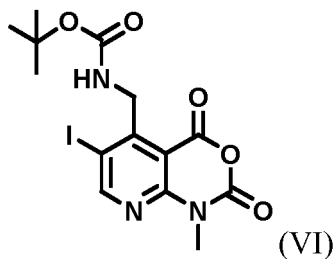
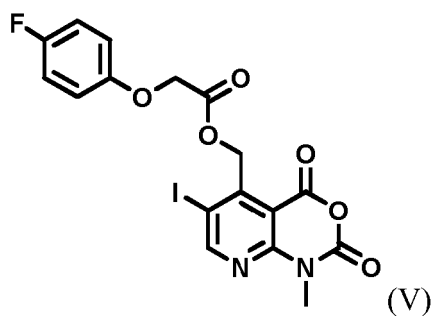
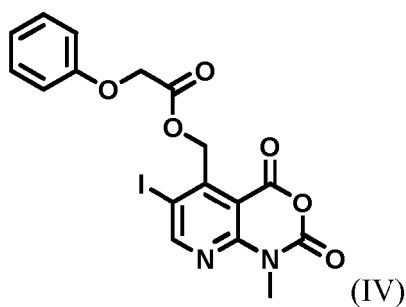
En otro modo de realización particular, que puede combinarse con los modos de realización anteriores, R<sub>1</sub> es un grupo

metilo.

En otro modo de realización particular, opcionalmente combinado con los modos de realización anteriores, R<sub>3</sub> es yodo.

- 5 En otro modo de realización particular, que puede combinarse con los modos de realización anteriores, Z<sub>1</sub> es N y Z<sub>2</sub> es C.

En particular, la invención se refiere a uno de los compuestos de las siguientes estructuras:



10

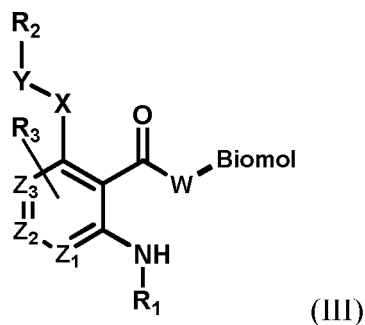
La invención está dirigida igualmente a un procedimiento de preparación de una molécula biológica protegida, que comprende poner en contacto un compuesto según la invención, como se ha descrito anteriormente, con una molécula biológica que comprende uno o varios grupos nucleófilos en unas condiciones que permitan la acilación de uno o varios grupos nucleófilos de dicha molécula biológica, para formar una molécula biológica protegida.

15

En un modo de realización más particularmente preferido, la molécula biológica comprende funciones amino. En particular, la molécula biológica es una proteína que comprende funciones nucleófilas, y en particular, las funciones amino de sus residuos de lisina o del aminoácido terminal, las funciones alcohol de las serinas y/o las funciones tiol de las cisteínas.

20

La invención trata en particular de una molécula biológica protegida y representada por la siguiente fórmula (III):



25

en la que

Biomol es una molécula biológica;

30

W es un radical nucleófilo de la molécula biológica, preferentemente NH, S u O; y,

X es un enlace covalente o un alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>4</sub>,

5 Y es un radical nucleófilo elegido entre O, S, NR<sub>4</sub>, O-NR<sub>4</sub>, NH-O, NH-NR<sub>4</sub>, C(O)-O-NR<sub>4</sub>, C(O)-NH-O, C(O)-NH-NR<sub>4</sub>, O-C(O)-NH-NR<sub>4</sub>, NH-C(O)-NH-NR<sub>4</sub>, O-C(O)-NH-O, NH-C(O)-NH-O, O-C(O)-O-NR<sub>4</sub>, NH-C(O)-O-NR<sub>4</sub>, C(O)-S, preferentemente O, S, NR<sub>4</sub>, O-NR<sub>4</sub>, NH-O o NH-NR<sub>4</sub>, y R<sub>4</sub> es H o un grupo alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>4</sub>

y cuando Y se elige entre O, S y NR<sub>4</sub>, X no es un enlace,

10 Z<sub>1</sub>, Z<sub>2</sub>, Z<sub>3</sub> representan cada uno independientemente entre sí, N o C, preferentemente Z<sub>3</sub> representa C, más preferentemente Z<sub>3</sub> es C y R<sub>3</sub> está en la posición Z<sub>3</sub>,

15 R<sub>1</sub> es H, un grupo alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>, sustituido o no sustituido, un alqueno sustituido o no sustituido, un grupo arilo sustituido o no sustituido o un heterociclo sustituido o no sustituido, preferentemente R<sub>1</sub> es un grupo metilo o etilo,

R<sub>2</sub> es un grupo protector termolábil y/o acidolábil,

20 R<sub>3</sub> es H, un grupo alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>12</sub> sustituido o no sustituido, por ejemplo, un grupo iso-propilo, isobutilo, *sec*-butilo, *terc*-butilo, isopentilo o 2,2-dimetilpropilo, un grupo arilo sustituido o no sustituido, un heterociclo sustituido o no sustituido, un grupo acilo, un grupo alqueno sustituido o no sustituido, un halógeno (por ejemplo, F, Cl, Br y I), o un grupo ciano.

En un modo de realización específico, Biomol se elige entre las proteínas, y en particular, las enzimas.

25 En un modo de realización más particularmente preferido, Biomol es una enzima destinada a ser utilizada en una reacción de polimerización de ácidos nucleicos, por ejemplo, una ADN polimerasa.

30 Igualmente se describen procedimientos de desprotección de grupos nucleófilos de una molécula biológica protegida por los compuestos según la invención, comprendiendo dicho procedimiento una etapa de escisión del grupo o grupos termolábiles y/o acidolábiles R<sub>2</sub>, por tratamiento térmico y/o ácido, respectivamente, y la desprotección concomitante de los grupos nucleófilos de la molécula biológica.

35 Así, la invención concierne igualmente a las utilizaciones de un compuesto según la invención para la inactivación reversible de una enzima. En un modo preferido, el compuesto según la invención se utiliza para la inactivación reversible de una enzima destinada a ser utilizada en una reacción de polimerización de ácidos nucleicos, por ejemplo, una ADN polimerasa. La invención se refiere además a un procedimiento de amplificación de un ácido nucleico que comprende la implementación de una enzima polimerasa inactivada por los compuestos según la invención, y al menos una etapa de tratamiento térmico a una temperatura que permita la escisión del grupo o grupos termolábiles R<sub>2</sub> y la desprotección de los grupos nucleófilos, precediendo dicha etapa de tratamiento térmico a dicha etapa de amplificación del ácido nucleico.

## Definiciones

45 El término "sustituido o no sustituido" significa que uno o varios hidrógenos presentes en un grupo pueden estar sustituidos por un grupo funcional elegido entre los grupos amino, imino, nitrilo, ciano, amida, imida, hidroxilo, alcoxilo, carbonilo, carboxilo, éster, tiol, tioéter, tioéster y halogenuro.

50 El término "un grupo alquilo C<sub>x</sub>-C<sub>y</sub>" se refiere a una cadena alquílica lineal o ramificada, o un cicloalquilo, que tiene de x a y átomos de carbono. Como ejemplo de cadena alquílica lineal se pueden citar: metilo, etilo, n-propilo, n-butilo, n-pentilo, n-hexilo, n-heptilo, n-octilo, n-nonilo y n-decilo. Como ejemplo de cadena alquílica ramificada, se pueden citar: iso-propilo, isobutilo, *sec*-butilo y *terc*-butilo, isopentilo, 2,2-dimetilpropilo, iso-octilo, iso-nonilo e iso-decilo. Como ejemplo de cicloalquilo, se pueden citar ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo y ciclooctilo.

55 El término "arilo" se refiere a hidrocarburos cíclicos aromáticos que no comprenden heteroátomos en el anillo. Por ejemplo, el grupo arilo puede comprender entre 6 y 14 átomos de carbono en la fracción del anillo aromático. Como ejemplo de un grupo arilo, se pueden citar: fenilo, bifenilo, fenantrenilo, pirenilo, crisenilo, antraceno y naftilo.

60 El término "heterociclo" se refiere a un grupo que comprende al menos un anillo, saturado o insaturado, en el que al menos uno de los átomos del anillo es un heteroátomo, como, por ejemplo, N, O o S. Un heterociclo puede estar compuesto por varios anillos fusionados. Por ejemplo, el heterociclo puede comprender entre 6 y 14 átomos en la fracción cíclica.

65 El término "acilo" se refiere a un grupo que comprende un grupo carbonilo, estando el grupo acilo unido a la molécula a través del átomo de carbono del carbonilo. Este átomo de carbono también está unido a otro átomo de carbono perteneciente a un grupo alquilo sustituido o no sustituido, un grupo arilo sustituido o no sustituido o un heterociclo sustituido o no sustituido. Por ejemplo, el grupo acilo comprende entre 2 y 12 átomos de carbono.

5 El término "alqueniilo" se refiere a una cadena alquílica lineal o ramificada, o a un cicloalquilo, que comprende al menos un doble enlace carbono-carbono. Como ejemplo de grupos alqueniilo, se pueden citar: vinilo,  $-\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_3)$ ,  $-\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ,  $-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}_2$ ,  $-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}(\text{CH}_3)$ ,  $-\text{C}(\text{CH}_2\text{CH}_3)=\text{CH}_2$ , ciclohexeniilo, ciclopenteniilo, ciclohexadieniilo, butadieniilo, pentadieniilo y hexadieniilo. Por ejemplo, el grupo alqueniilo comprende entre 2 y 12 átomos de carbono.

10 El término "nucleófilo" o "grupo nucleófilo" se refiere a un grupo capaz de formar un enlace covalente con un sitio reactivo (electrófilo) donando los dos electrones necesarios para la creación del enlace, en unas condiciones de reacción apropiadas. Uno o varios grupos nucleófilos pueden estar presentes de forma natural en una molécula biológica, por ejemplo, el grupo amino de una lisina, la amina terminal de una cadena polipeptídica, el alcohol de una serina o incluso el grupo tiol de una cisteína presente en una proteína o una enzima.

15 El término "grupo protector" se refiere a un grupo funcional introducido en una molécula a partir de una función química para enmascarar toda o parte de su reactividad. El enmascaramiento (protección) de una función química en la molécula mejora así la selectividad de las reacciones posteriores. El término "protección" o "protegido" hace así referencia al estado de la molécula tras la reacción con un grupo protector. Una "molécula biológica protegida" es una molécula biológica que presenta una o varias funciones químicas protegidas por grupos protectores. Si se trata de una enzima, una enzima protegida puede entonces estar inactiva. La desprotección hace referencia a la etapa de liberación de todos o parte de los grupos protectores de una molécula protegida y, preferentemente, a la obtención de la molécula en su estado original, antes de su protección por los compuestos según la invención.

20 El término "grupo protector termolábil" se refiere a un grupo protector que es estable a una temperatura de entre 15 °C y 25 °C, y que se escinde, se disocia o se libera de una molécula a la que está unido, por un tratamiento térmico (etapa de calentamiento) a una temperatura comprendida entre 50 y 100 °C, particularmente en presencia de un tampón apropiado para el funcionamiento óptimo de una molécula biológica, por ejemplo, de una enzima.

Los grupos protectores termolábiles incluyen, en particular, los descritos por Koukhareva et al, Anal. Chem., 2009, 81, 4955-4962; o Trinlink Biotechnologies (WO2012/09434 y US8.133.669).

30 Los ejemplos de grupos protectores termolábiles incluyen de forma general amidas, éteres, ésteres, acetales, carbonatos, tioéteres, tioésteres, tioacetales, tiocarbonatos y en particular los descritos en Koukhareva et al, Anal. Chem. 2009, 81, 4955-4962, o incluso, monometoxitritilo (MMT), dimetoxitritilo (DMT) y/o fenoxiacetato, sustituido o no.

35 El término "grupo protector acidolábil" se refiere a un grupo protector que es estable en condiciones neutras o básicas y que se escinde, se disocia o se libera, en condiciones ácidas por tratamiento a un pH inferior a 6,0, o incluso inferior a 5,0. Los ejemplos de grupos protectores acidolábiles incluyen, en particular, citraconilo, *tert*-butoxicarbonilo (BOC), benciloxicarbonilo, tritilo (Trt), metoxitritilo, dimetoxitritilo, benciloximetilo (Bom) o incluso *t*-butoximetilo (Bum). Otros ejemplos de grupos protectores acidolábiles se describen en particular en Chem. Rev., 2009, 109 (6), págs. 2455-2504, y más particularmente en las páginas 2467 y 2493, según se trate de un grupo protector de una función amino o hidroxilo.

45 El término "molécula biológica" se entiende en sentido amplio como que incluye el conjunto de las macromoléculas que pueden ser sintetizadas por los organismos biológicos. En particular, el término incluye los polímeros de ácidos nucleicos, y en particular ADN o ARN, polisacáridos, péptidos, polipéptidos y proteínas, particularmente enzimas.

50 Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" son intercambiables y se refieren a polímeros u oligómeros de aminoácidos. Los aminoácidos de dicho polímero están unidos entre sí por un enlace peptídico entre un grupo carboxilo y un grupo amino de dos aminoácidos. Una proteína puede comprender varios polipéptidos unidos entre sí por enlaces no covalentes y/o por puentes de disulfuro.

En el sentido de la invención, el término "aminoácidos" incluye los aminoácidos naturales o no naturales o sus derivados sustituidos.

## 55 Reactivos para la protección de moléculas biológicas

Los compuestos según la invención o reactivos para la protección de moléculas biológicas son derivados del anhídrido isatoico útiles para la protección transitoria (protección "reversible") de grupos nucleófilos, por ejemplo, aminas, de una molécula biológica, por ejemplo, una proteína.

60 Los compuestos según la invención reaccionan con el grupo nucleófilo de una molécula biológica, y en particular de una proteína. Por ejemplo, pueden reaccionar con el  $\epsilon$ -amino de una lisina de una proteína (o enzima) o con la amina del extremo amínico de una proteína (o enzima), el alcohol de una serina de una proteína (o enzima) o incluso el tiol de una cisteína de una proteína para formar, respectivamente, un enlace amida, éster o tioéster. Entre las funciones nucleófilas de una proteína o de una enzima, preferentemente, al menos una contribuye de forma esencial al mantenimiento de la conformación de la proteína y/o de la función enzimática. La protección de dicha función

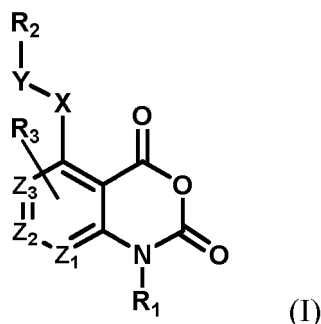
nucleofílica esencial (por ejemplo, una lisina, una serina o una cisteína) implica así la inactivación de la proteína o de la enzima.

5 Ventajosamente, el enlace amida, éster y/o tioéster así obtenido entre las moléculas biológicas y los compuestos según la invención es particularmente estable, a baja temperatura o a la temperatura ambiente. Las moléculas biológicas pueden quedar inactivas con los compuestos según la invención, por ejemplo, en condiciones de almacenamiento o de transporte a la temperatura ambiente. Más particularmente, es posible controlar el punto de partida de una reacción enzimática induciendo las condiciones para la desprotección de una enzima, según el siguiente principio:

- 10
- En primer lugar, se hacen reaccionar los compuestos según la invención por una reacción de acilación de los grupos nucleofílicos de una enzima con el compuesto, y se obtiene una enzima protegida.
  - En segundo lugar, se desprotege una función nucleofílica del compuesto según la invención por un tratamiento ácido y/o térmico por escisión de un grupo protector termolábil y/o acidolábil presente en el compuesto según la invención y que protege dicha función nucleofílica del compuesto según la invención.
  - 15 - En tercer lugar, se obtiene la ciclación entre la función nucleofílica desprotegida del compuesto según la invención y el carbonilo de la amida, el éster o el tioéster obtenido por la acilación de la enzima, que concomitantemente permite la reversión de la acilación, la desprotección de la enzima y la restauración de la actividad enzimática.

20 Salvo lo que se indica a continuación en el texto que sigue, la expresión "compuestos según la invención" se refiere a los siguientes compuestos de fórmula (I), así como a todas sus subfórmulas específicamente descritas (y en particular las fórmulas (II) a (VI)), las sales de estos compuestos, sus estereoisómeros (incluyendo los diastereómeros y los enantiómeros), los tautómeros y los compuestos radiomarcados (incluyendo las sustituciones con deuterio y con isótopos radiactivos).

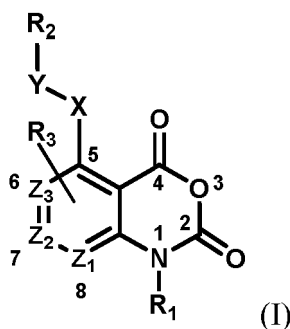
25 El compuesto según la invención de la siguiente fórmula (I)



30 presenta en particular

- una unidad de anhídrido azaisatoico que permite la acilación de los grupos nucleofílicos de una molécula,
- una función nucleofílica Y protegida por un grupo termolábil y/o acidolábil R<sub>2</sub> y que permite, una vez liberado, la escisión del enlace amida generado por la acilación,
- 35 - un brazo de unión X entre el anhídrido isatoico y la función nucleofílica diseñado de forma que favorezca la ciclación tras la desprotección de la función nucleofílica,
- un grupo protector termolábil y/o acidolábil R<sub>2</sub> del grupo nucleofílo Y que permita liberar la función nucleofílica Y durante la etapa de calentamiento y/o de tratamiento con ácido y que permita así la ciclación intramolecular,
- preferentemente, un grupo voluminoso R<sub>3</sub> que permite un impedimento estérico alrededor del nucleofílo y la aceleración de la cinética de ciclación intramolecular. En efecto, se descubrió fortuitamente que la presencia de dicho impedimento estérico aportaba muchas ventajas a la cinética de ciclación intramolecular y, por tanto, a la velocidad de desprotección de los grupos nucleofílicos de las moléculas biológicas.

45 Así, la presente invención tiene por objeto un compuesto de la siguiente fórmula (I):



en la que

5 X es un enlace covalente o un alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>4</sub>,

Y es un radical nucleófilo elegido entre O, S, NR<sub>4</sub>, O-NR<sub>4</sub>, NH-O, NH-NR<sub>4</sub>, C(O)-O-NR<sub>4</sub>, C(O)-NH-O, C(O)-NH-NR<sub>4</sub>, O-C(O)-NH-NR<sub>4</sub>, NH-C(O)-NH-NR<sub>4</sub>, O-C(O)-NH-O, NH-C(O)-NH-O, O-C(O)-O-NR<sub>4</sub>, NH-C(O)-O-NR<sub>4</sub>, C(O)-S, y R<sub>4</sub> es H o un grupo alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>4</sub>,

10 y cuando Y se elige entre O, S y NR<sub>4</sub>, X no es un enlace,

Z<sub>1</sub>, Z<sub>2</sub>, Z<sub>3</sub> representan cada uno independientemente entre sí, N o C, preferentemente Z<sub>3</sub> representa C, más preferentemente Z<sub>3</sub> es C y R<sub>3</sub> está en la posición Z<sub>3</sub>,

15 R<sub>1</sub> es H, un grupo alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>, sustituido o no sustituido, un alqueno sustituido o no sustituido, un grupo arilo sustituido o no sustituido o un heterociclo sustituido o no sustituido, preferentemente R<sub>1</sub> es un grupo metilo o etilo.

R<sub>2</sub> es un grupo protector termolábil y/o acidolábil,

20 R<sub>3</sub> es H, un grupo alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>12</sub> sustituido o no sustituido, por ejemplo, un grupo *iso*-propilo, isobutilo, *sec*-butilo, *tert*-butilo, isopentilo o 2,2-dimetilpropilo, un grupo arilo sustituido o no sustituido, un heterociclo sustituido o no sustituido, un grupo acilo, un grupo alqueno sustituido o no sustituido, un halógeno (por ejemplo, F, Cl, Br y I), o un grupo ciano.

25 Preferentemente, solo uno de los radicales Z<sub>1</sub>, Z<sub>2</sub> y Z<sub>3</sub> es N.

En un modo de realización particular, X es un alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>3</sub> no sustituido, por ejemplo, un metilo.

30 En un modo de realización, R<sub>1</sub> es H, un grupo alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>, un alqueno, un grupo arilo o un heterociclo, estando dichos grupos alquilo, alqueno, arilo o heterociclo, opcionalmente sustituidos con uno o varios grupos funcionales elegidos entre nitrilo, ciano, amida, imida, alcoxilo, carbonilo, carboxilo, éster, tioéter, tioéster y halogenuro.

35 En un modo de realización, R<sub>1</sub> es un grupo alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>, opcionalmente sustituidos con uno o varios grupos funcionales elegidos entre nitrilo, ciano, amida, imida, alcoxilo, carbonilo, carboxilo, éster, tioéter, tioéster y halogenuro.

40 En un modo de realización, R<sub>2</sub> es un grupo protector elegido entre amidas, éteres, ésteres, acetales, carbonatos, tioéteres, tioésteres, tioacetales, tiocarbonatos, monometoxitritilo (MMT), dimetoxitritilo (DMT), fenoxiacetato sustituido o no sustituido, citraconilo, *tert*-butoxicarbonilo (BOC), benciloxicarbonilo, tritilo (Trt), metoxitritilo, dimetoxitritilo, benciloximetilo (Bom) o *t*-butoximetilo (Bum).

45 En un modo de realización, R<sub>3</sub> es H, un grupo alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>12</sub>, un grupo arilo, un heterociclo, un grupo acilo, un grupo alqueno, un halógeno (por ejemplo, F, Cl, Br y I), o un grupo ciano, dichos grupos alquilo, arilo, heterociclo o alqueno están opcionalmente sustituidos con uno o varios grupos funcionales elegidos entre los grupos nitrilo, ciano, amida, imida, alcoxilo, carbonilo, carboxilo, éster, tioéter, tioéster y halogenuro. En un modo de realización, R<sub>3</sub> es un grupo alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>12</sub> o un halógeno (por ejemplo, F, Cl, Br y I), estando dicho grupo alquilo opcionalmente sustituido con uno o varios grupos funcionales elegidos entre los grupos nitrilo, ciano, amida, imida, alcoxilo, carbonilo, carboxilo, éster, tioéter, tioéster y halogenuro.

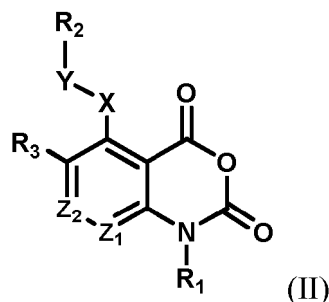
50 R<sub>3</sub> está ubicado de forma que favorezca la cinética de ciclación. Por ejemplo, en un modo de realización, R<sub>3</sub> está preferentemente en la posición 6.

En un modo de realización particular, R<sub>3</sub> es un grupo *tert*-butilo, un grupo *iso*-propilo, un grupo ciano o un átomo de yodo.

55

En un modo de realización, el número de átomos X + Y lineales, es decir, el número de átomos de la cadena principal que unen el anillo a R<sub>2</sub> (no se tienen en cuenta los diferentes sustituyentes H o R<sub>4</sub>), es superior o igual a 2, por ejemplo, está comprendido entre 2 y 4. Preferentemente, Y se elige entre O, S y NH. En este caso, X no es un enlace.

- 5 En un modo de realización más particularmente preferido, el compuesto según la invención es de la siguiente fórmula (II):



- 10 En un modo de realización específico, el grupo termolábil o acidolábil R<sub>2</sub> en las anteriores fórmulas (I) y (II) se elige entre los grupos *tert*-butoxicarbonilo (BOC), fenoxiacetilo sustituido o no sustituido, tritilo, metoxitritilo, dimetoxitritilo o citraconilo.

- 15 El carácter termolábil de los grupos fenoxiacetato fue demostrado por Lebedev A. *et al.* (Koukhareva I., Lebedev A. Anal. Chem., 2009, 81, 4955-4962). En un modo de realización particular, el grupo protector R<sub>2</sub> es el grupo protector termolábil fenoxiacetilo, sustituido o no sustituido, preferentemente, se trata de un fenoxiacetilo sustituido con un halógeno, por ejemplo, fluorofenoxiacetilo.

- 20 El experto en la materia podrá identificar otros grupos protectores R<sub>2</sub> termolábiles y/o acidolábiles particularmente adaptados para la función deseada, como se describe, por ejemplo, en el documento WO2012/094343, el documento US8.133.669 o en los siguientes libros:

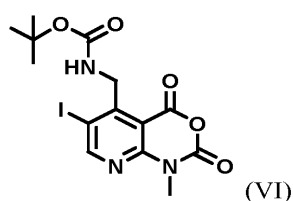
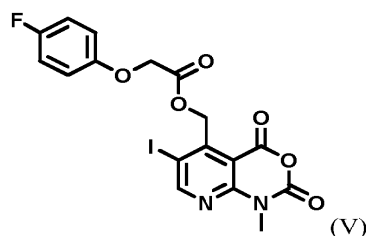
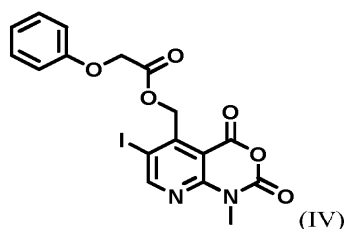
- Greene's Protective Groups in Organic Synthesis de Peter G. M. Wuts, Editorial: Wiley-Blackwell; Edición: 5ª edición (23 de diciembre de 2014), o
- 25 - Protecting Groups de P.J. Editorial Kocienski: Grupo editorial Thieme; Edición: 3ª edición revisada (1 de enero de 2005).

- 30 En otro modo de realización particular del compuesto según la fórmula (II), que puede combinarse con los modos de realización anteriores, R<sub>1</sub> es un grupo metilo.

En otro modo de realización particular del compuesto según la fórmula (II), opcionalmente combinado con los modos de realización anteriores, R<sub>3</sub> es un halógeno, por ejemplo, yodo.

- 35 En otro modo de realización particular del compuesto según la fórmula (II), que puede combinarse con los modos de realización anteriores, Z<sub>1</sub> es N y Z<sub>2</sub> es C.

En particular, la invención se refiere a uno de los compuestos con las siguientes estructuras, igualmente descritos en los ejemplos:



40

### Procedimiento de preparación de los compuestos según la invención

Los compuestos según la invención pueden sintetizarse fácilmente según los procedimientos descritos en los ejemplos u otros procedimientos sintéticos conocidos en la técnica anterior.

5 Por ejemplo, algunos de los compuestos según la invención de fórmula (II) pueden sintetizarse a partir del compuesto hidroxilado precursor **6**, cuya síntesis se describe en el ejemplo 1. A continuación, el compuesto precursor **6** puede modificarse mediante la reacción de un grupo termolábil o acidolábil  $R_2$  con la función hidroxilo del precursor. También es posible hacer reaccionar los grupos  $R_1$  y/o  $R_3$  con estos compuestos precursores o sus derivados por métodos químicos convencionales. El compuesto según la invención de fórmula (II) puede obtenerse finalmente por ciclación por sustitución nucleófila, como se describe, por ejemplo, en la etapa (i) del esquema 3 del siguiente ejemplo 1, para dar los compuestos según la invención.

### Procedimiento de protección de moléculas biológicas

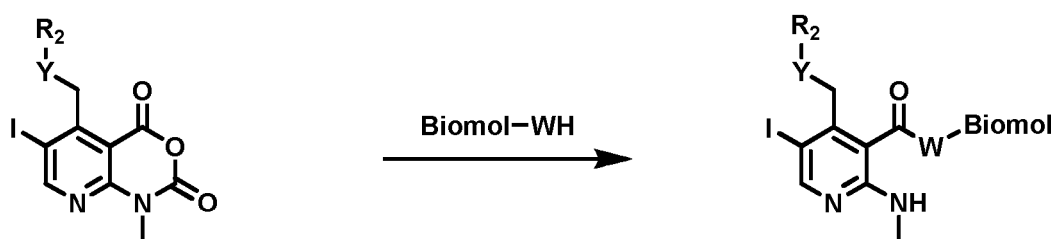
15 Los compuestos según la invención son útiles para la protección, la modificación o la inactivación reversible de enzimas, de proteínas y, más generalmente, de moléculas biológicas que comprenden uno o varios grupos nucleófilos, por ejemplo, moléculas biológicas que comprenden una o varias aminas.

20 La invención se dirige en particular a un procedimiento de preparación de una molécula biológica que comprende uno o varios grupos nucleófilos protegidos, que comprende poner en contacto un compuesto según la invención, como se ha descrito anteriormente, con una molécula biológica en unas condiciones que permitan la acilación de uno o varios grupos nucleófilos de dicha molécula biológica, para formar una molécula biológica que comprenda uno o varios grupos nucleófilos protegidos (en lo sucesivo denominada también "molécula biológica protegida").

25 La acilación se realiza por sustitución nucleófila en una de las funciones carbonilo del anhídrido con la adición del grupo nucleófilo de la molécula biológica y la eliminación de  $CO_2$ .

30 En un modo de realización más particularmente preferido, la molécula biológica comprende funciones amino. En particular, la molécula biológica es una proteína que comprende las funciones  $\epsilon$ -amino de los residuos de lisina o amina del aminoácido terminal. En estos modos de realización, la acilación de las funciones  $\epsilon$ -amino de los residuos de lisina o de la amina terminal permite la formación de enlaces amídicos muy estables, en particular, en unas condiciones de almacenamiento a largo plazo (por ejemplo, de más de 24 horas, o incluso varios días a la temperatura ambiente).

35 Como ejemplo, la reacción de acilación está representada en el siguiente esquema 1 con un reactivo preferido de fórmula (II) en el que  $R_1$  es un grupo metilo,  $Z_1$  es N,  $Z_2$  es C y  $R_3$  es un átomo de yodo.



40 **Esquema 1:** reacción de acilación del compuesto según la invención con una molécula biológica

45 En caso de que la molécula biológica comprenda varios grupos nucleófilos que hay que proteger, la cantidad de reactivos utilizada puede ajustarse en función del grado de modificación (protección) deseado. En particular, en el caso de una enzima, ventajosamente, el grado de modificación deseado corresponde al umbral de modificación más allá del cual la enzima se inactiva. Este umbral puede determinarse empíricamente mediante ensayos sencillos.

50 El tampón utilizado para la reacción de protección es, en general, un tampón con un pH comprendido entre 6 y 9, preferentemente entre 7 y 9, más preferentemente entre 7 y 8. Los ejemplos de tampones incluyen particularmente los tampones de fosfato y los tampones no nucleófilos que operan en esta zona de pH, pudiendo contener hasta un 50 % de DMSO. Tales tampones son conocidos por el experto en la materia, como se indica en <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/core-bioreagents/biological-buffers.html>

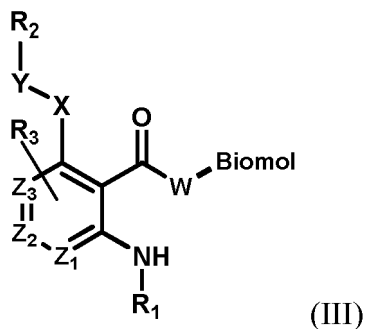
55 La reacción de acilación, en particular, la acilación de una enzima con al menos un compuesto de fórmula (I) o (II), se obtiene preferentemente en un tampón de fosfato, por ejemplo, a un pH de 7,4.

El procedimiento de protección se implementa preferentemente a una temperatura comprendida entre 4 °C y 40 °C,

por ejemplo, a una temperatura comprendida entre 4 °C y 25 °C.

Las moléculas biológicas que comprenden uno o varios grupos nucleófilos protegidos, susceptibles de ser obtenidas por el procedimiento anterior, también forman parte de la presente invención. En particular, una enzima puede comprender múltiples grupos amino protegidos debido a la presencia de múltiples lisinas en su secuencia polipeptídica, o incluso grupos OH o SH debido a la presencia de serina o de cisteína, respectivamente.

La invención trata, por consiguiente, de una molécula biológica protegida y representada por la siguiente fórmula (III):



10

en la que

15

Biomol es una molécula biológica,

W es un grupo nucleófilo de la molécula biológica, preferentemente NH, S u O, X es un enlace covalente o un alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>4</sub>,

20

Y es un radical nucleófilo elegido entre O, S, NR<sub>4</sub>, O-NR<sub>4</sub>, NH-O, NH-NR<sub>4</sub>, C(O)-O-NR<sub>4</sub>, C(O)-NH-O, C(O)-NH-NR<sub>4</sub>, O-C(O)-NH-NR<sub>4</sub>, NH-C(O)-NH-NR<sub>4</sub>, O-C(O)-NH-O, NH-C(O)-NH-O, O-C(O)-O-NR<sub>4</sub>, NH-C(O)-O-NR<sub>4</sub>, C(O)-S, preferentemente O, S, NR<sub>4</sub>, O-NR<sub>4</sub>, NH-O o NH-NR<sub>4</sub>, y R<sub>4</sub> es H o un grupo alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>4</sub>

y cuando Y se elige entre O, S y NR<sub>4</sub>, X no es un enlace,

25

Z<sub>1</sub>, Z<sub>2</sub>, Z<sub>3</sub> representan cada uno independientemente entre sí, N o C, preferentemente Z<sub>3</sub> representa C, más preferentemente Z<sub>3</sub> es C y R<sub>3</sub> está en la posición Z<sub>3</sub>,

30

R<sub>1</sub> es H, un grupo alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>, sustituido o no sustituido, un alqueno sustituido o no sustituido, un grupo arilo sustituido o no sustituido o un heterociclo sustituido o no sustituido, preferentemente R<sub>1</sub> es un grupo metilo o etilo,

35

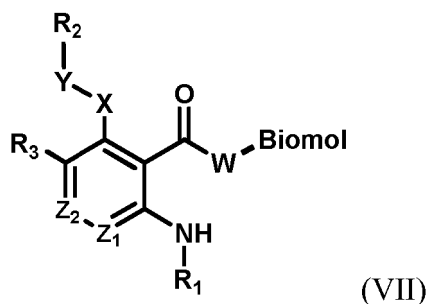
R<sub>2</sub> es un grupo protector termolábil y/o acidolábil,

R<sub>3</sub> es H, un grupo alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>12</sub> sustituido o no sustituido, por ejemplo, un grupo iso-propilo, isobutilo, *sec*-butilo, *tert*-butilo, isopentilo o 2,2-dimetilpropilo, un grupo arilo sustituido o no sustituido, un heterociclo sustituido o no sustituido, un grupo acilo, un grupo alqueno sustituido o no sustituido, un halógeno (por ejemplo, F, Cl, Br y I), o un grupo ciano.

40

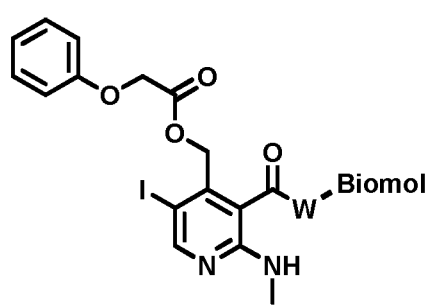
Por supuesto, cuando la molécula biológica comprende varios grupos nucleófilos, por ejemplo, una proteína que comprende varias lisinas, una misma molécula biológica puede comprender todos o parte de estos grupos nucleófilos así protegidos por acilación con el reactivo según la invención.

En particular, cuando el reactivo de fórmula (II) se hace reaccionar con una molécula biológica que comprende uno o varios grupos nucleófilos, se obtiene una molécula biológica protegida de la siguiente fórmula (VII):

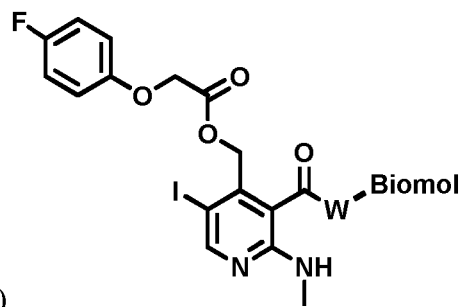


45

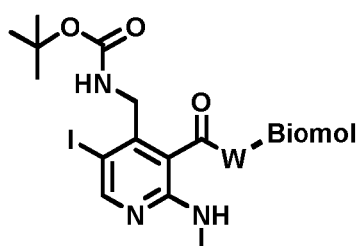
Eligiendo uno de los reactivos de las fórmulas (IV), (V) y (VI) anteriores, se obtienen moléculas biológicas protegidas según una de las fórmulas (VIII), (IX) y (X), respectivamente.



(VIII)



(IX)



(X)

5

En un modo de realización específico, la molécula biológica (o Biomol) se elige entre enzimas.

10 El procedimiento es aplicable a cualquier tipo de enzima. Entre las enzimas de interés, se citarán más particularmente las enzimas utilizadas en las técnicas de biología molecular, para la ingeniería genética o la polimerización de ácidos nucleicos, y más particularmente, las enzimas utilizadas en las técnicas de diagnóstico *in vitro*.

Estas enzimas comprenden, como ejemplo, lipasas, proteasas, glicolasas o nucleasas.

15 En particular, las enzimas de interés comprenden enzimas de restricción, ligasas, ARN polimerasas, ADN polimerasas, tales como la ADN polimerasa I, II o III, o la ADN polimerasa  $\alpha$ ,  $\beta$  o  $\gamma$ , la transferasa de desoxinucleotidilo terminal (TdT) o la telomerasa, la ARN polimerasa dependiente de ADN, la primasa o incluso la ADN polimerasa dependiente de ARN (transcriptasa inversa).

20 En un modo de realización más particularmente preferido, la molécula biológica según la invención es una enzima destinada a ser utilizada en una reacción de polimerización de ácidos nucleicos, por ejemplo, una ADN polimerasa. Las polimerasas que pueden utilizarse para la polimerización de ácidos nucleicos son bien conocidas por el experto en la materia. La reacción de polimerización es, en particular, una reacción de polimerización en el contexto de una amplificación por polimerización en cadena (PCR).

25

En un modo de realización, una enzima de interés implementada en el procedimiento de protección según la invención se elige entre las siguientes polimerasas: la ADN polimerasa T7, la ADN polimerasa de Kornberg, la ADN polimerasa de Klenow, la ADN polimerasa Taq, la ADN polimerasa microcócica, la ADN polimerasa alfa, la ADN polimerasa Pfu, la transcriptasa inversa del AMV, la transcriptasa inversa del MMLV, la ARN polimerasa de *E. coli*, la ARN polimerasa SP6, T3 o T7. En particular, en un modo de realización, las ADN polimerasas termoestables y/o las que presentan actividad exonucleasa (por ejemplo, exonucleasa 3'5') se utilizan en el procedimiento según la invención para preparar polimerasas protegidas.

30

Estas polimerasas así protegidas son más particularmente útiles para aplicaciones de arranque en caliente "Hot-Start". La protección de las polimerasas evita la amplificación inespecífica del ADN a baja temperatura y favorece así una reacción de amplificación más eficaz, siendo la enzima desprotegida únicamente a alta temperatura, por escisión del grupo termolábil.

35

Entre estas polimerasas termoestables, se citarán particularmente aquellas que no están sujetas a la desnaturalización de su estructura y/o a una inactivación de su actividad enzimática entre 50 °C y 100 °C, aquellas que funcionan y están activas una vez desprotegidas, entre 50 °C y 100 °C. Más particularmente, las polimerasas: polimerasa TAQ y polimerasa KLen TAQ.

40

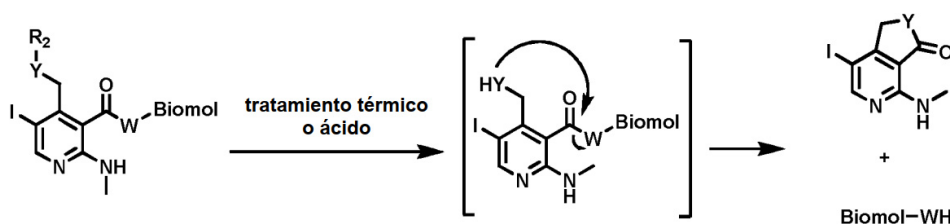
Otras enzimas termoestables pueden derivarse de los siguientes organismos biológicos: *Thermus antranikianii*,

*Thermus aquaticus, Thermus caldophilus, Thermus chliarophilus, Thermus filiformis, Thermus flavus, Thermus igniterrae, Thermus lacteus, Thermus oshimai, Thermus ruber, Thermus rubens, Thermus scotoductus, Thermus silvanus, La especie de Thermus Z05, La especie de Thermus 17, Thermus thermophilus, Thermotoga maritima, Thermotoga neapolitana, Thermosipho africanus, Anaerocellum thermophilum, Bacillus caldotenax, Bacillus stearothermophilus, etc...*

### Procedimientos de utilización de los compuestos según la invención

Las moléculas biológicas protegidas según la presente invención pueden desprotegerse ventajosamente por un simple tratamiento térmico y/o ácido según el grupo R<sub>2</sub> elegido.

El principio de la desprotección por tratamiento térmico o ácido se describe a continuación en el esquema 2 con una molécula biológica (enzima) protegida, según la fórmula (VII) en la que R<sub>1</sub> es un grupo metilo, Z<sub>1</sub> es N, Z<sub>2</sub> es C y R<sub>3</sub> es un átomo de yodo:



**Esquema 2:** ejemplo de procedimiento de desprotección de una molécula biológica protegida según la invención

Un tratamiento térmico o ácido permite liberar la función nucleófila del compuesto según la invención por escisión del grupo termolábil o acidolábil. Esta función nucleófila así liberada puede entonces permitir la reversión de la acilación por ciclación y desprotección de la molécula biológica. Ventajosamente, el subproducto generado por la reacción de desprotección no es reactivo. Además, la presente reacción de desprotección no requiere el empleo de un tampón Tris o de un tampón que genere condiciones ácidas a alta temperatura. En particular, la etapa de desprotección puede llevarse a cabo mediante un tratamiento térmico en unas condiciones de pH comprendidas entre 6,5 y 9,5, preferentemente entre 8 y 9,0, más preferentemente aún, entre 8,5 y 9,0.

Así, igualmente se describen procedimientos de desprotección de grupos nucleófilos de una molécula biológica protegida por los compuestos según la invención, comprendiendo dicho procedimiento una etapa de escisión del grupo o grupos termolábiles y/o acidolábiles R<sub>2</sub>, por tratamiento térmico y/o ácido, respectivamente, y la desprotección concomitante de los grupos nucleófilos.

Una de las ventajas del procedimiento descrito anteriormente es permite inactivar las enzimas. Por "inactivación" debe entenderse que la actividad catalítica de una enzima protegida por el procedimiento de la invención se reduce considerablemente o incluso se anula con respecto a su actividad catalítica antes de la protección en condiciones óptimas de actividad.

El procedimiento de desprotección descrito anteriormente permite entonces restaurar la actividad enzimática de las enzimas protegidas.

Así, la invención concierne igualmente a las utilizaciones de un compuesto según la invención para la inactivación reversible de una enzima. En un modo preferido, el compuesto según la invención se utiliza para la inactivación reversible de una enzima destinada a ser utilizada en una reacción de amplificación de ácidos nucleicos, por ejemplo, una polimerasa.

La invención es especialmente apropiada para las aplicaciones de arranque en caliente ("*Hot Start*") de las enzimas, por ejemplo, las polimerasas utilizadas en una reacción de amplificación de ácidos nucleicos (las denominadas reacciones de "PCR").

Por consiguiente, la invención también se refiere a un procedimiento de amplificación de un ácido nucleico que comprende (i) implementar una enzima polimerasa protegida o inactivada por los compuestos según la invención, (ii) al menos una etapa para la desprotección de la polimerasa, por ejemplo, mediante un tratamiento térmico a una temperatura que permita la escisión del grupo o grupos termolábiles R<sub>2</sub>, (iii) una etapa de amplificación del ácido nucleico con la ayuda de la polimerasa desprotegida en la etapa (ii).

En un modo de realización específico, el procedimiento de amplificación se implementa con la ayuda de una ADN polimerasa, tal como la polimerasa Taq, la polimerasa Pfu, la polimerasa T7, el fragmento Klenow de la ADN

polimerasa de *E. coli* y/o una transcriptasa inversa, o cualquier otra polimerasa descrita anteriormente.

En otro modo de realización que puede combinarse con el anterior, el procedimiento de amplificación es una reacción de amplificación en cadena de la polimerasa (reacción de PCR), bien conocido por el experto en la materia. El protocolo de la PCR comprende, por ejemplo, de 20 a 40 ciclos, cada ciclo comprende al menos (i) una fase de desnaturalización del ADN que se va a amplificar a una temperatura comprendida generalmente entre 90 °C y 95 °C, (ii) una fase de hibridación de los cebadores con el ADN que se va a amplificar a una temperatura comprendida generalmente entre 55 °C y 65 °C y (iii) una fase de extensión a una temperatura comprendida generalmente entre 68 °C y 75 °C.

La polimerasa protegida según la invención es en este caso preferentemente una polimerasa termoestable protegida, por ejemplo, una polimerasa *Taq* (*Thermus aquaticus*) protegida, una polimerasa Pfu (*Pyrococcus furiosus*) protegida, la polimerasa Vent o Tli (*Thermococcus litoralis*) protegida o sus variantes, especialmente las recombinantes. Preferentemente, se protege un número suficiente de aminos de dicha polimerasa, de manera que la polimerasa protegida es inactiva o prácticamente inactiva a la temperatura ambiente y puede ser desprotegida a una temperatura equivalente o superior a la temperatura de hibridación de los cebadores (*primer*) utilizados para la amplificación por PCR.

Las enzimas y las polimerasas protegidas según la invención también se implementan ventajosamente en variantes de los procedimientos de amplificación nucleica por PCR. En particular, se citará la PCR anidada (*Nested PCR*), las PCR cuantitativas (o qPCR), semicuantitativas o en tiempo real, las PCR "propensas a error" o la PCR tras la transcripción inversa (RT-PCR).

#### Kits y envases de implementación

La invención se dirige igualmente a kits o envases de implementación que comprenden las enzimas protegidas según la invención, y opcionalmente reactivos, tampones, controles y/o instrucciones de uso.

En particular, la invención se refiere a un envase para la amplificación de ácidos nucleicos en un arranque en caliente "*Hot-start*", que comprende

- i) una ADN polimerasa termoestable protegida según la invención, por ejemplo, de fórmula (III), (VII), (VIII), (IX) o (X) en las que Biomol es una ADN polimerasa termoestable,
- ii) en su caso, reactivos de detección de ácidos nucleicos, por ejemplo, un reactivo fluorescente,
- iii) en su caso, un tampón, los dNTP...

Estos kits son útiles en particular para la implementación de procedimientos de amplificación tales como los descritos anteriormente.

La invención se entenderá mejor con la ayuda de los ejemplos que se detallan a continuación y a la vista de las figuras adjuntas.

#### Descripción de las figuras

**Figura 1:** seguimiento por HPLC de la escisión del derivado de aza-antranilato fenoxiacetato **10** y de la liberación de feniletilamina.

**Figura 2:** seguimiento por HPLC de la escisión del derivado de aza-antranilato fluorofenoxiacetato **14** y de la liberación de feniletilamina.

**Figura 3:** seguimiento por HPLC de la escisión del derivado de aza-antranilato N-Boc **19** y de la liberación de feniletilamina.

**Figura 4:** acilación de la hemoglobina por el compuesto **13** utilizado en diferentes concentraciones.

**Figura 5:** reversión de la acilación de la hemoglobina tras un tratamiento térmico.

Figura superior (A): hemoglobina en GuHC 8 M

Figura central (B): hemoglobina acilada por el compuesto **13** y después recogida en GuHCL 8 M

Figura inferior (C): hemoglobina acilada con el compuesto **13** y después calentada a 95 °C en Tris a pH 9 y recogida en GuHCl 8 M.

**Figura 6:** inactivación de la polimerasa *Taq* tras su acilación por el compuesto **13** y restauración de su actividad tras un tratamiento térmico a 95 °C durante 15 minutos en condiciones de PCR (experimentos realizados por duplicado, se representa la media). Línea punteada clara a la izquierda: sin activación; línea punteada a la derecha:

tras 15 minutos de activación a 95 °C.

### Descripción detallada de la invención

#### 5 Ejemplos

En los ejemplos que se describen a continuación, se utilizarán las siguientes abreviaturas:

- ACN: acetonitrilo,
- 10 • AcOEt: acetato de etilo,
- Boc<sub>2</sub>O: dicarbonato de di-*tert*-butilo,
- CCM: cromatografía en capa fina,
- CDCl<sub>3</sub>: cloroformo deuterado,
- d: doblete,
- 15 • DCM: diclorometano,
- dd: doblete desdoblado,
- DMF: dimetilformamida,
- DMSO: dimetilsulfóxido,
- DMSO-*d*<sub>6</sub>: dimetilsulfóxido deuterado,
- 20 • Agua MilliQ: agua ultrapura (Millipore, Molsheim, Francia),
- EDC: N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
- eq: equivalentes,
- EP: éter de petróleo,
- Et<sub>2</sub>O: éter dietílico,
- 25 • HPLC: cromatografía de líquidos de gran rendimiento,
- LCMS: aparato de cromatografía de líquidos acoplado a un espectrómetro de masas
- HOBt: hidroxibenzotriazol,
- IA: anhídrido isatoico,
- m: multiplete,
- 30 • nd: no determinado,
- NIS: N-yodosuccinimida,
- q: cuádruplete,
- Rdt: rendimiento,
- Rf o TR: tiempo de retención,
- 35 • RMN: resonancia magnética nuclear,
- s: singulete,
- t: triplete,
- t.a.: temperatura ambiente
- TBDMS: *tert*-butildimetilsililo
- 40 • TEA: trietilamina
- THF: tetrahidrofurano.

#### Condiciones generales

- 45 A continuación se describen las condiciones generales para el análisis y la síntesis de los compuestos químicos utilizados en los siguientes ejemplos:

Los análisis de LC-MS se realizaron con una cadena HPLC WATERS Alliance 2795 equipada con un detector de matriz de diodos PDA 996 (Waters), un detector de espectrometría de masas ZQ 2000 (Waters), se utilizó el programa informático Empower versión 2 y una columna WATERS XTerra MS C18 (4,6 x 30, 2,5 μm) con un caudal de 1 ml/minuto a 30 °C (detección a 260 nm o en *max plot*). El espectrómetro de masas ZQ 2000 posee una fuente de ionización por *electrospray*. Las ionizaciones se realizaron en modo positivo con una tensión de cono de 20 V y una tensión capilar de 3,5 kV.

55 Las condiciones utilizadas para los análisis por HPLC son las siguientes:

Eluyente A	Eluyente B	Eluyente C (formiato de amonio: AF)	Gradiente lineal
Agua milliQ	ACN	AF 500 mM, pH 7	98 % de A / 0 % de B a 24 % de A / 74 % de B en 18 min con un 2 % de eluyente C en modo isocrático

Los espectros de RMN se registraron con un espectrómetro Jeol Lambda a 400 MHz. Los desplazamientos químicos (δ) se indican en ppm respecto al pico del disolvente tomado como referencia interna (CDCl<sub>3</sub>: 7,26 ppm; DMSO-*d*<sub>6</sub>: 2,49 ppm). Los espectros se describen con las abreviaturas anteriores: s, d, t, q, qu y m. Las constantes de acoplamiento (J) se expresan en hercios (Hz).

Las cromatografías en columna se realizaron en gel de sílice Macherey-Nagel Kieselgel 60, de 0,063-0,2 mm / 70-230

mesh o Merck LiChroprep® RP-18 de 40-63 µm.

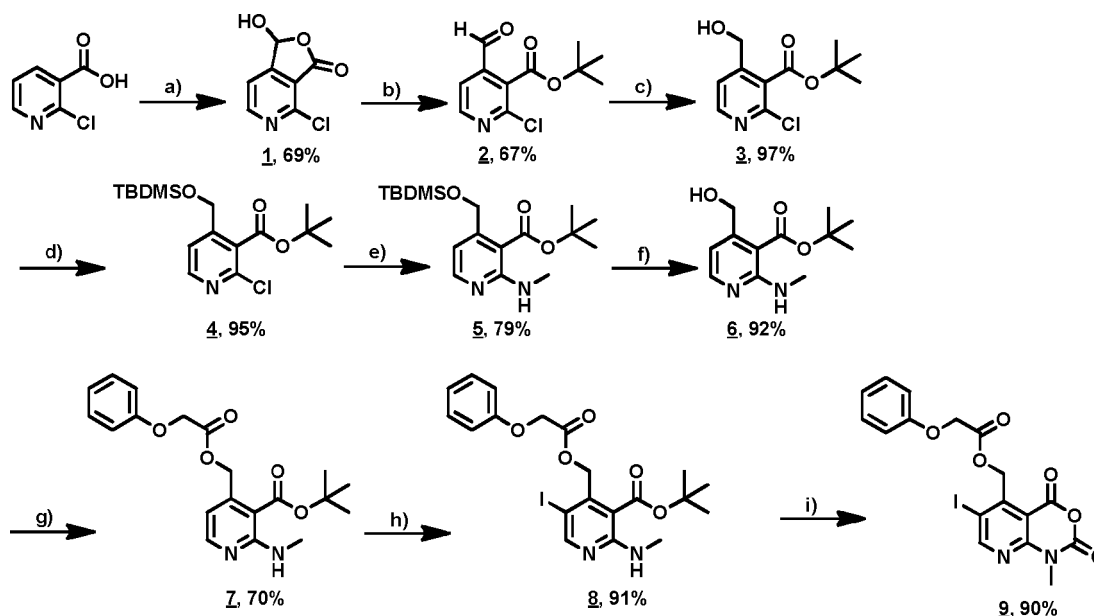
Los análisis de cromatografía en capa fina se realizaron en placas Macherey-Nagel POLYGRAM® SIL G/UV254, de 0,20 mm o ALUGRAM® RP-18 W/UV254 de 0,15 mm.

5

**Ejemplo 1: síntesis de una molécula de anhídrido azaisatoico según la invención provista de un grupo protector O-fenoxiacetato termolábil (9) (correspondiente al compuesto IV)**

En este ejemplo se describe la síntesis de un compuesto según la invención (según el esquema 3). En primer lugar se sintetiza un primer compuesto hidroxilado precursor **6** en 6 etapas. Puede servir como compuesto de partida para la síntesis de otros compuestos según la invención. El compuesto **6** es entonces fenoxiacetilado para dar el compuesto **7**, y después yodado para dar el compuesto **8** y finalmente se cicla con el fin de obtener el compuesto **9** azaisatoico esperado que reacciona directamente con una proteína o cualquier otra molécula biológica para protegerla de forma transitoria.

15

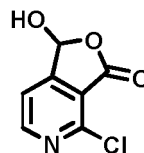


**Esquema 3:** síntesis del compuesto **9** O-fenoxiacetilado. a) LiTMP, THF, 3 h, -50 °C; DMF, 1,5 h, -80 °C a la t.a.; HCl, pH 2. b) NEt<sub>3</sub>, DCM, 10 min, t.a.; t-BuBr, Ag<sub>2</sub>O, 2 h, t.a. c) NaBH<sub>4</sub>, EtOH, 30 min, -10 °C. d) TBDMSC1, imidazol, DCM, 4 h, t.a. e) MeNH<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, t-BuOH, 24 h, 100 °C. f) TBAF, AcOH, DCM, 15 h, t.a. g) cloruro de fenoxiacetilo, HOBT, DCM, 5 min, t.a., y después 6, 24 h, t.a. h) NIS, DCM, AcOH, 2-3 h, t.a. i) COCl<sub>2</sub>, TEA, Et<sub>2</sub>O, 30 min, t.a.

20

**Ejemplo 1.1: síntesis de la 4-cloro-1-hidroxifuro[3,4-c]piridin-3(1H)-ona (1)**

25



**M = 185,56 g/mol**

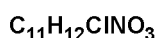
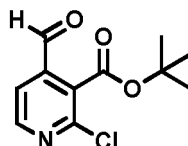
En un matraz Shlenk de 500 ml bajo nitrógeno se disuelven 19,30 ml de 2,2,6,6-tetrametilpiperidina (114,24 mmol, 3 eq) en 150 ml de THF. A -10 °C se añaden 60,13 ml de *n*-BuLi (1,9 M en hexano, 114,24 mmol, 3 eq), y la mezcla de reacción se deja en agitación durante 10 min. A -80 °C se añaden 6,00 g de ácido 2-cloronicotínico (38,08 mmol, 1 eq) y la reacción se deja en agitación durante 3 h a -50 °C. A continuación se introducen 17,69 ml de DMF (228,48 mmol, 6 eq) a -80 °C y la mezcla de reacción se deja en agitación durante 1,5 h. Después de volver a la temperatura ambiente, se añaden 100 ml de agua y la solución se extrae con AcOEt (3 x 150 ml). A continuación, la fase acuosa se acidifica a pH 2 con una solución de HCl concentrado y después se extrae con AcOEt (3 x 200 ml).

35

Las fases orgánicas se combinan a continuación, se secan sobre  $\text{MgSO}_4$ , se filtran y finalmente se evaporan. El aceite obtenido se purifica a continuación en una columna de gel de sílice utilizando un gradiente de eluyente (de DCM a DCM/AcOEt, 85/15).

- 5 El producto final se obtiene en forma de un polvo de color blanco con un rendimiento del 69 % (4,88 g, 26,30 mmol). **Pf** = 191-193 °C; **IR (KBr)**:  $\nu$ , 3100 (OH), 2913, 2766, 1776 (C=O), 1609, 1584, 1408, 1194, 1136, 1093, 1047, 925, 755  $\text{cm}^{-1}$ ; **RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**:  $\delta$  6,67 (bs, 1H); 7,79 (d, 1H, <sup>3</sup>J = 5,0 Hz); 8,50 (bs, 1H); 8,74 (d, 1H, <sup>3</sup>J = 5,0 Hz); **RMN-<sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**:  $\delta$  96,9; 118,8; 120,4; 147,0; 154,6; 159,3; 164,6.

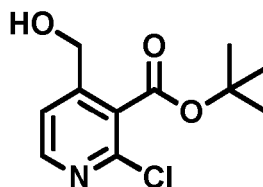
- 10 **Ejemplo 1.2:** síntesis del 2-cloro-4-formilnicotinato de *tert*-butilo (**2**)



**M = 241,67 g/mol**

- 15 En un matraz de 250 ml, a la temperatura ambiente, se introducen 3,50 g de **1** (18,86 mmol, 1 eq), 35 ml de DCM y 2,62 ml de TEA (18,86 mmol, 1 eq). La mezcla se deja en agitación durante 10 min a la temperatura ambiente. Entonces se añaden en porciones 8,54 ml de *t*-BuBr (75,45 mmol, 4 eq) y 8,74 g de  $\text{Ag}_2\text{O}$  (37,72 mmol, 2 eq) a 0 °C. La reacción se deja en agitación a la temperatura ambiente durante 2 h. La mezcla se filtra a través de celita, se  
20 evapora y se purifica en una columna de gel de sílice utilizando un gradiente de eluyente (de ciclohexano/AcOEt, 95/5, a ciclohexano/AcOEt, 90/10). El producto final se obtiene en forma de un polvo de color blanco con un rendimiento del 67 % (3,07 g, 12,70 mmol). **Pf** = 97-99 °C; **IR (KBr)**:  $\nu$ , 3077, 1732 (C=O), 1708 (C=O), 1578, 1370, 1294, 1261, 1178, 1133, 847  $\text{cm}^{-1}$ ; **RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**:  $\delta$  1,64 (s, 9H); 7,65 (d, 1H, <sup>3</sup>J = 5,0 Hz); 8,65 (d, 1H, <sup>3</sup>J = 5,0 Hz); 10,06 (s, 1H); **RMN-<sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**:  $\delta$  27,9 (3C); 85,1; 121,0; 130,1; 140,6; 149,1; 150,9; 163,0; 188,2.

- 25 **Ejemplo 1.3:** síntesis del 2-cloro-4-(hidroximetil)nicotinato de *tert*-butilo (**3**)

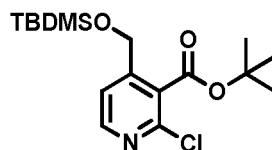


- 30 **M = 243,69 g/mol**

- En un matraz de 100 ml se disuelven 3,00 g de **2** (12,41 mmol, 1 eq) en 35 ml de EtOH. A -10 °C se añaden 0,51 g de  $\text{NaBH}_4$  (13,65 mmol, 1,1 eq) en porciones y la mezcla de reacción se deja en agitación durante 30 min. A continuación se añaden 50 ml de agua y la solución se extrae con DCM (3 x 75 ml). Las fases orgánicas se combinan a continuación,  
35 se lavan con una solución saturada de NaCl (2 x 50 ml), se secan sobre  $\text{MgSO}_4$  y se evaporan.

- El producto final se obtiene en forma de un polvo de color blanco con un rendimiento del 97 % (2,94 g, 12,06 mmol). **Pf** = 122-124 °C; **IR (KBr)**:  $\nu$ , 3263 (OH), 3003, 2980, 1717 (C=O), 1592, 1387, 1365, 1299, 1170, 1131, 1080, 1063, 869, 846  $\text{cm}^{-1}$ ; **RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**:  $\delta$  1,60 (s, 9H); 2,89 (t, 1H, <sup>3</sup>J = 6,3 Hz); 4,69 (d, 2H, <sup>3</sup>J = 6,3 Hz); 7,39 (d, 1H, <sup>3</sup>J = 5,0 Hz); 8,37 (d, 1H, <sup>3</sup>J = 5,0 Hz); **RMN-<sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**:  $\delta$  27,9 (3C); 61,3; 84,3; 120,6; 128,6; 147,2; 149,8; 150,8; 164,8.

- Ejemplo 1.4:** síntesis del 4-((*tert*-butildimetilsilil)oxi)metil)-2-cloronicotinato de *tert*-butilo (**4**)



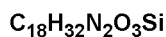
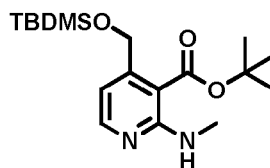
**M = 357,95 g/mol**

- 5 En un matraz de 100 ml a la temperatura ambiente, se introducen 2,25 g de **3** (9,23 mmol, 1 eq), 30 ml de DCM, 1,88 g de imidazol (27,70 mmol, 3 eq) y 2,78 g de TBDMSC1 (18,47 mmol, 2 eq). La mezcla de reacción se deja en agitación durante 4 h a la temperatura ambiente. A continuación se añaden 50 ml de agua y la solución se extrae con DCM (3 x 75 ml). Las fases orgánicas se combinan a continuación, se lavan con una solución saturada de NaCl (2 x 50 ml), se secan sobre MgSO<sub>4</sub> y se evaporan. A continuación, el bruto de reacción se purifica en una columna de gel de sílice utilizando un gradiente de eluyente (de EP a EP/Et<sub>2</sub>O, 95/5). El producto final se obtiene en forma de un aceite incoloro en un rendimiento del 95 % (3,15 g, 8,80 mmol).

10 **IR (KBr):**  $\nu$ , 2956, 2931, 2859, 1717 (C=O), 1584, 1369, 1291, 1259, 1168, 1127, 840 cm<sup>-1</sup>; **RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  0,10 (s, 6H); 0,94 (s, 9H); 1,60 (s, 9H); 4,74 (s, 2H); 7,50 (d, 1H, <sup>3</sup>J = 5,0 Hz); 8,39 (d, 1H, <sup>3</sup>J = 5,0 Hz); **RMN-<sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  -5,6 (2C); 18,2; 25,7 (3C); 27,9 (3C); 61,1; 83,6; 119,7; 127,6; 146,7; 149,7; 151,0; 164,1.

15

**Ejemplo 1.5:** síntesis del 4-(((*tert*-butildimetilsilil)oxi)metil)-2-metilamino nicotinato de *tert*-butilo (**5**)



20 **M = 352,54 g/mol**

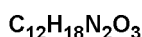
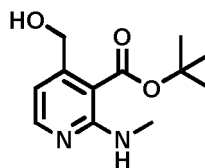
En un tubo sellado a la temperatura ambiente se introducen 4,00 g de **4** (11,17 mmol, 1 eq), 15 ml de *t*-BuOH y 4,83 ml de MeNH<sub>2</sub> (40 % p/p en H<sub>2</sub>O, 55,87 mmol, 5 eq). La mezcla de reacción se deja entonces en agitación durante 24 h a 100 °C. Después de la evaporación, se añaden a continuación 50 ml de agua y la solución se extrae con DCM (3 x 75 ml). Las fases orgánicas se combinan a continuación, se secan sobre MgSO<sub>4</sub> y se evaporan. A continuación, el bruto de reacción se purifica en una columna de gel de sílice utilizando un gradiente de eluyente (de EP a EP/Et<sub>2</sub>O, 90/10).

25

El producto final se obtiene en forma de un aceite incoloro en un rendimiento del 79 % (3,10 g, 8,79 mmol).

30 **IR (KBr):**  $\nu$ , 3377 (N-H), 2931, 2857, 1732 (C=O), 1584, 1370, 1291, 1259, 1190, 1169, 1127, 1112, 839 cm<sup>-1</sup>; **RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  0,11 (s, 6H); 0,96 (s, 9H); 1,59 (s, 9H); 3,02 (d, 3H, <sup>3</sup>J = 4,9 Hz); 4,90 (s, 2H); 6,97 (d, 1H, <sup>3</sup>J = 5,2 Hz); 7,87 (bs, 1H); 8,25 (d, 1H, <sup>3</sup>J = 5,2 Hz); **RMN-<sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  -5,4 (2C); 18,4; 25,9 (4C); 28,4 (3C); 63,9; 82,2; 104,9; 109,0; 151,8; 154,6; 159,5; 167,8.

35 **Ejemplo 1.6:** síntesis del 4-(hidroximetil)-2-(metilamino)nicotinato de *tert*-butilo (**6**)



**M = 238,28 g/mol**

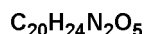
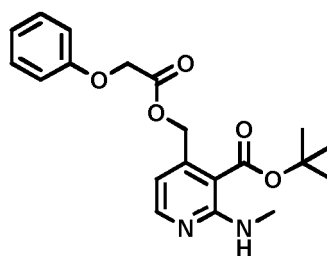
40

En un matraz de 100 ml se disuelven 3,00 g de **5** (8,51 mmol, 1 eq) en 30 ml de DCM. Simultáneamente se añaden

0,97 ml de AcOH (17,02 mmol, 2 eq) y 17,02 ml de TBAF (1 M en THF, 17,02 mmol, 2 eq). La reacción se deja en agitación a la temperatura ambiente durante 15 h. A continuación se añaden 70 ml de agua y la solución se extrae con DCM (3 x 70 ml). Las fases orgánicas se combinan a continuación, se secan sobre MgSO<sub>4</sub> y se evaporan. A continuación, el bruto de reacción se purifica en una columna de gel de sílice utilizando un gradiente de eluyente (de EP/AcOEt, 80/20, a EP/AcOEt, 60/40).

El producto final se obtiene en forma de un polvo de color blanco con un rendimiento del 92 % (1,86 g, 7,81 mmol). **IR (KBr)**:  $\nu$ , 3348 (N-H), 3242 (O-H), 2980, 2944, 1667 (C=O), 1596, 1557, 1530, 1367, 1242, 1165, 1126, 1074, 1061, 805 cm<sup>-1</sup>; **RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**:  $\delta$  1,60 (s, 9H); 3,01 (d, 3H, <sup>3</sup>J = 4,9 Hz); 4,73 (s, 2H); 6,73 (d, 1H, <sup>3</sup>J = 5,2 Hz); 7,58 (bs, 1H); 8,22 (d, 1H, <sup>3</sup>J = 5,2 Hz); **RMN-<sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**:  $\delta$  28,3 (3C); 28,4; 64,0; 83,0; 106,4; 110,7; 151,8; 153,2; 159,2; 167,5.

**Ejemplo 1.7:** 2-(metilamino)-4-((2-fenoxiacetoxi)metil)nicotinato de *terc*-butilo (**7**)



15

**M = 372,41 g/mol**

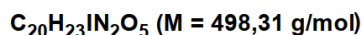
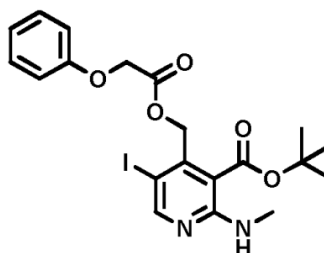
En un matraz de 50 ml se disuelven 204  $\mu$ l de cloruro de fenoxiacetilo (1,47 mmol, 1 eq) en 5 ml de DCM. Se añaden 198 mg de HOBt (1,47 mmol, 1eq) y el medio de reacción se deja en agitación a la temperatura ambiente. Después de 10 minutos se añaden 350 mg de **6** (1,47 mmol, 1 eq) y la reacción se agita después a la temperatura ambiente durante 24 h. A continuación se añaden 40 ml de agua y la solución se extrae con Et<sub>2</sub>O (4 x 30 ml). Las fases orgánicas se combinan a continuación, se secan sobre MgSO<sub>4</sub> y se evaporan. A continuación, el bruto de reacción se purifica en una columna de gel de sílice utilizando un gradiente de eluyente (de EP a EP/AcOEt, 8/2).

25

El producto final se obtiene en forma de un polvo de color blanco con un rendimiento del 70 % (385 mg, 1,03 mmol). **Pf** = 149-151 °C; **IR (KBr)**:  $\nu$ , 3365, 2970, 1760, 1668, 1583, 1192, 752; **RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)**:  $\delta$  1,59 (s, 9H); 3,01 (d, 3H, <sup>3</sup>J = 4,9 Hz); 4,75 (s, 2H); 5,45 (s, 2H); 6,53 (d, 1H, <sup>3</sup>J = 5,1 Hz); 6,94 (m, 2H); 7,01 (t, 1H, <sup>3</sup>J = 7,3 Hz); 7,30 (m, 2H); 7,89 (d, 1H, <sup>3</sup>J = 4,2 Hz); 8,18 (d, 1H, <sup>3</sup>J = 5,12 Hz); **RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)**:  $\delta$  28,3 (4C); 65,2; 65,4; 83,1; 105,6; 108,9; 114,6 (2C); 121,8; 129,6 (2C); 147,4; 152,0; 157,6; 159,6; 167,1; 168,6.

30

**Ejemplo 1.8:** 5-yodo-2-(metilamino)-4-((2-fenoxiacetoxi)metil)nicotinato de *terc*-butilo (**8**)



35

En un matraz de 25 ml se introducen 280 mg de **7** (0,75 mmol, 1 eq), 5 ml de DCM, 253 mg de NIS (1,12 mmol, 1,5 eq) y 500  $\mu$ l de ácido acético. La mezcla de reacción se deja en agitación durante 3 h a la temperatura ambiente. A continuación, la mezcla de reacción se neutraliza con 20 ml de una solución acuosa saturada de tiosulfato de sodio, se recoge en 20 ml de una solución saturada de NaHCO<sub>3</sub>, luego se extrae con Et<sub>2</sub>O (4 x 30 ml). Las fases orgánicas se combinan a continuación, se secan sobre MgSO<sub>4</sub> y se evaporan. A continuación, el bruto de reacción se purifica en una columna de gel de sílice utilizando un gradiente de eluyente (de EP a EP/AcOEt, 9/1).

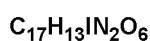
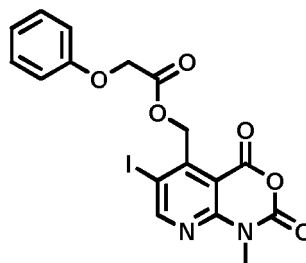
40

El producto final se obtiene en forma de un polvo de color amarillo con un rendimiento del 91 % (340 mg, 0,68 mmol).

**Pf** = 127-129 °C; **IR** (KBr)  $\nu$ , 3424, 2934, 1755, 1704, 1576, 1193, 752; **RMN-<sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  1,56 (s, 9H); 2,97 (d, 3H, <sup>3</sup>J = 4,6 Hz); 4,64 (s, 2H); 5,4 (s, 2H); 6,90 (d, 2H, <sup>3</sup>J = 7,8 Hz); 6,99 (t, 1H, <sup>3</sup>J = 7,3 Hz); 7,27 (m, 2H); 8,50 (s, 1H); la señal N-H está ausente; **RMN-<sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):  $\delta$  28,1 (3C); 28,4; 65,0; 68,7; 82,5; 83,7; 112,7; 114,6 (2C); 121,8; 129,5 (2C); 144,6; 157,5; 157,7; 158,3; 166,5; 168,3.

5

**Ejemplo 1.9:** 2-fenoxiacetato de (6-yodo-1-metil-2,4-doxo-2,4-dihidro-1H-pirido[2,3-d][1,3]oxacin-5-il)metilo (**9**)



10 **M** = 468,20 g/mol

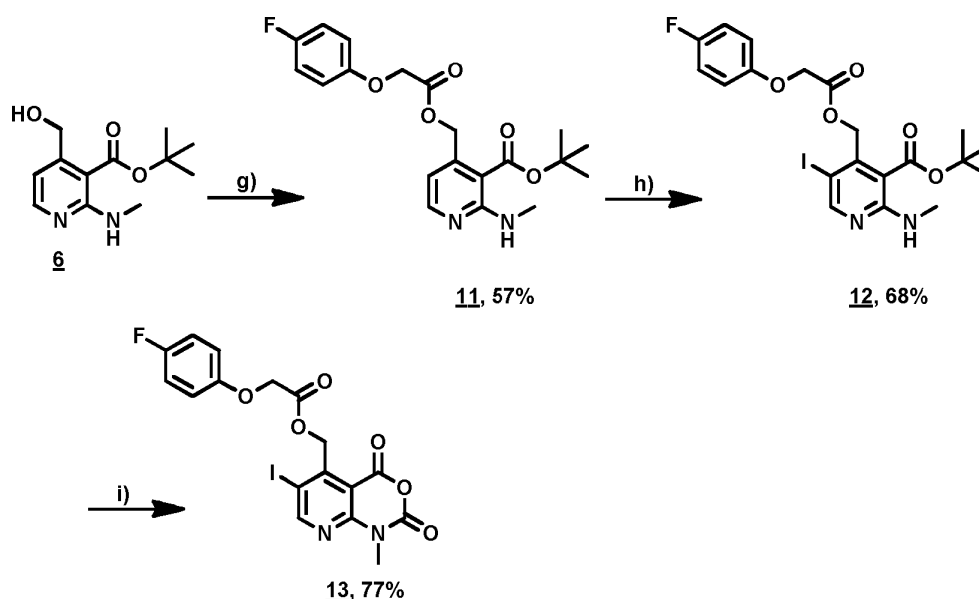
En un matraz de 50 ml bajo una atmósfera de nitrógeno se disuelven 300 mg de **8** (0,60 mmol, 1 eq) en 10 ml de DCM. Se añaden simultáneamente 951  $\mu$ l de fosgeno (20 % en tolueno), 1,80 mmol, 3 eq) y 251  $\mu$ l de TEA (1,80 mmol, 3 eq) y la reacción se deja en agitación a la temperatura ambiente. Esta operación se repite tres veces para convertir toda la materia prima. A continuación se añaden 40 ml de agua y la solución se extrae con Et<sub>2</sub>O (5 x 50 ml). Las fases orgánicas se combinan a continuación, se secan sobre MgSO<sub>4</sub> y se evaporan. La mezcla de reacción se evapora a sequedad y se purifica directamente en una columna de gel de sílice injertada C18, utilizando un gradiente de eluyente (H<sub>2</sub>O/ACN 95/5 a H<sub>2</sub>O/ACN, 5/95). El producto final se obtiene en forma de un polvo de color blanco con un rendimiento del 90 % (255 mg; 0,54 mmol).

15 **Pf** = 162-164 °C; **IR** (KBr)  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>): 3439, 2935, 1787, 1757, 1728, 1450, 1176, 756; **RMN-<sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  3,65 (s, 3H); 4,65 (s, 2H); 5,79 (s, 2H); 6,86 (d, 2H, <sup>3</sup>J = 8,5 Hz); 6,96 (t, 1H, <sup>3</sup>J = 7,5 Hz); 7,27 (m, 2H); 9,00 (s, 1H); **RMN-<sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):  $\delta$  31,2; 64,8; 66,7; 94,7; 107,7; 114,6 (2C); 121,8; 129,5 (2C); 146,8; 150,0; 153,3; 155,1; 157,5; 162,7; 168,2.

25 **Ejemplo 2: síntesis de un tipo de molécula de anhídrido azaisatoico según la invención provista de un grupo protector O-fluorofenoxi acetato termolábil **13** (correspondiente al compuesto V)**

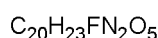
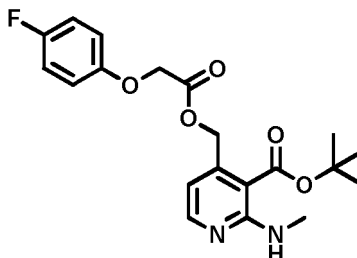
Aquí se describe la síntesis de otro ejemplo de un compuesto según la invención (según el esquema 4). El compuesto precursor **6** es fluoro-fenoxiacetilado (un grupo que puede ser más termolábil) para dar el compuesto **11**, después se yoda para dar el compuesto **12** y finalmente se cicla con el fin de obtener el compuesto **13** azaisatoico.

30



**Esquema 4:** síntesis del compuesto 13 O-fluorofenoxiacetilado. g) X = F, ácido 4-fluorofenoxiacético, EDC, HOBT, 5 min, t.a., y después 6, 3 h, t.a. h) NIS, DCM, AcOH, 2-3 h, t.a. i) COC12, TEA, Et2O, 30 min, t.a.

5 **Ejemplo 2.1:** 4-((2-(4-fluorofenoxi)acetoxi)metil)-2-(metilamino)nicotinato de *terc*-butilo (11)

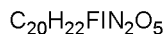
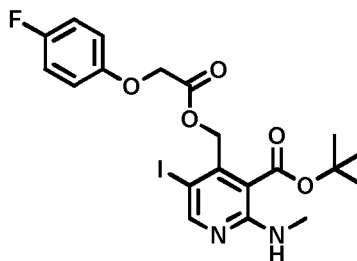


M = 390,40 g/mol

10 En un matraz de 50 ml se introducen 149 mg de ácido 4-fluorofenoxiacético (0,88 mmol, 1,05 eq), 5 ml de DCM, 169 mg de EDC (0,88 mmol, 1,05 eq) y 119 mg de HOBT (0,88 mmol, 1,05 eq). Después de 5 min a la temperatura ambiente, se añaden 200 mg de **6** (0,84 mmol, 1 eq) y la reacción se deja en agitación a la temperatura ambiente durante 3 h. A continuación se añaden 30 ml de agua y la solución se extrae con Et<sub>2</sub>O (3 x 30 ml). Las fases orgánicas se combinan a continuación, se secan sobre MgSO<sub>4</sub> y se evaporan. A continuación, el bruto de reacción se purifica en una columna de gel de sílice utilizando un gradiente de eluyente (de EP/AcOEt, 9/1, a EP/AcOEt, 8/2).

15 El producto final se obtiene en forma de un polvo amarillento con un rendimiento del 57 % (190 mg, 0,49 mmol). Pf = 151-153 °C; IR (KBr) v, (cm<sup>-1</sup>): 3376, 2977, 2935, 1758 (CO), 1683 (CO), 1586, 1189, 831; RMN-1H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 1,60 (s, 9H); 3,02 (d, 3H, 3J = 4,6 Hz); 4,71 (s, 2H); 5,45 (s, 2H); 6,54 (d, 1H, 3J = 5,2 Hz); 6,88 (m, 2H); 6,99 (t, 2H, 3J = 8,3 Hz); 7,88 (s, 1H); 8,20 (d, 1H, 3J = 5,2 Hz); RMN-13C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz): δ 28,1; 28,3 (3C); 65,4; 65,9; 83,1; 105,6; 109,0; 115,9 (d, 3JC-F = 8 Hz, 2C); 116,0 (d, 2JC-F = 23 Hz, 2C); 147,3; 152,0; 153,8 (d, 4JC-F = 2 Hz, 1C); 157,8 (d, 1JC-F = 239 Hz, 1C); 159,5; 167,1; 168,4.

25 **Ejemplo 2.2:** 2-(4-fluorofenoxi)acetato de (6-yodo-1-metil-2,4-doxo-2,4-dihidro-1H-pirido[2,3-d][1,3]oxacin-5-il)metilo (**12**)

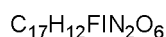
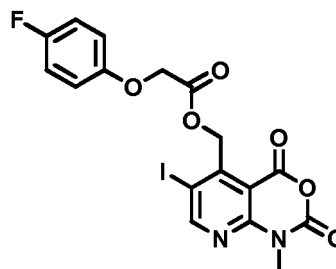


30 M = 516,30 g/mol

35 En un matraz de 25 ml se disuelven 200 mg de **11** (0,51 mmol, 1 eq) en 3 ml de DCM. Se añaden 172 mg de NIS (0,77 mmol, 1,5 eq) y 150 µl de ácido acético, y el medio de reacción se deja en agitación durante 2 h. A continuación, la mezcla de reacción se neutraliza con 20 ml de una solución acuosa saturada de tiosulfato de sodio, se recoge en 20 ml de una solución saturada de NaHCO<sub>3</sub>, luego se extrae con Et<sub>2</sub>O (4 x 30 ml). Las fases orgánicas se combinan a continuación, se secan sobre MgSO<sub>4</sub> y se evaporan. A continuación, el bruto de reacción se purifica en una columna de gel de sílice utilizando un gradiente de eluyente (de EP a EP/AcOEt, 9/1). El producto final se obtiene en forma de un aceite de color amarillo con un rendimiento del 68 % (180 mg, 0,35 mmol).

40 IR (KBr): v, 3413, 2926, 1763, 1688, 1506, 1183, 828; RMN-1H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 1,56 (s, 9H); 2,97 (d, 3H, 3J = 4,64 Hz); 4,60 (s, 2H); 5,37 (s, 2H); 6,85 (m, 2H); 6,96 (m, 2H); 8,50 (s, 1H); RMN-13C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz): δ 28,1 (3C); 28,4; 65,7; 68,7; 82,4; 83,7; 112,7; 115,9 (d, 2JC-F = 23 Hz, 2C); 116,0 (d, 3JC-F = 8 Hz, 2C); 144,5; 153,7; 157,7; 157,8 (d, 1JC-F = 239 Hz, 1C); 158,3; 166,4; 168,2.

**Ejemplo 2.3:** 2-(4-fluorofenoxi)acetato de (6-yodo-1-metil-2,4-doxo-2,4-dihidro-1H-pirido[2,3-d][1,3]oxacin-5-il)metilo (**13**)



5

M = 486,19 g/mol

En un matraz de 50 ml bajo una atmósfera de nitrógeno se disuelven 160 mg de **12** (0,31 mmol, 1 eq) en 3 ml de DCM. Se añaden simultáneamente 489  $\mu$ l de fosgeno (20 % en THF, 0,98 mmol, 9 eq) y 129  $\mu$ l de TEA (0,98 mmol, 9 eq) y la reacción se deja en agitación durante 30 min. A continuación se añaden 30 ml de agua y la solución se extrae con Et<sub>2</sub>O (3 x 30 ml). Las fases orgánicas se combinan a continuación, se secan sobre MgSO<sub>4</sub> y se evaporan. La mezcla de reacción se evapora a sequedad y se purifica directamente en una columna de gel de sílice injertada C18, utilizando un gradiente de eluyente (H<sub>2</sub>O/ACN 95/5 a H<sub>2</sub>O/ACN, 5/95).

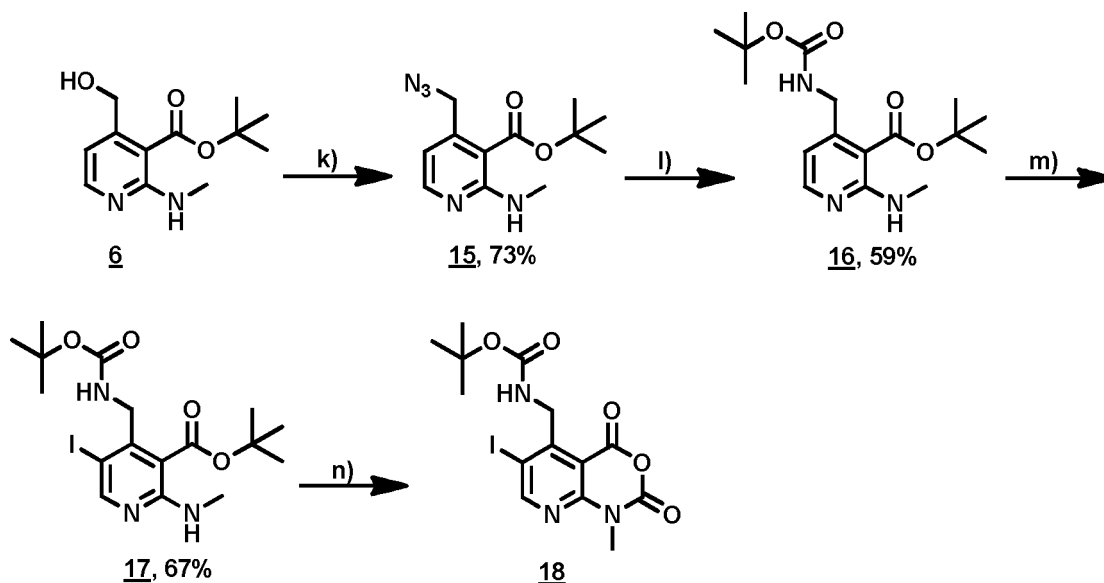
El producto final se obtiene en forma de un polvo de color blanco con un rendimiento del 77 % (115 mg; 0,24 mmol). Pf = 150-152 °C; IR (KBr)  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>): 3454, 3078, 2934, 1787, 1745, 1504, 1194, 825; RMN-1H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  3,66 (s, 3H); 4,62 (s, 2H); 5,78 (s, 2H); 6,83 (m, 2H); 6,95 (m, 2H); 9,01 (s, 1H); RMN-13C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):  $\delta$  31,2; 65,6; 66,8; 94,7; 107,7; 115,9 (d, 2JC-F = 23 Hz, 2C); 115,9 (d, 3JC-F = 8 Hz, 2C); 146,7; 150,0; 153,4; 153,7 (d, 4JC-F = 2 Hz, 1C); 155,2; 157,8 (d, 1JC-F = 239 Hz, 1C); 162,8; 168,1.

20

**Ejemplo 3: síntesis de un tipo de molécula de anhídrido azaisatoico según la invención provista de un grupo protector ácido/termolábil N-Boc **18** (correspondiente al compuesto VI)**

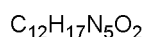
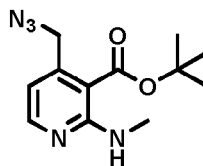
Aquí se describe la síntesis de otro ejemplo de un compuesto según la invención (según el esquema 5). El compuesto precursor **6** se transforma inicialmente en un compuesto azido **15** precursor de un compuesto aminado en cuya función amino se acoplará el grupo protector BOC para obtener el compuesto **16**. Una reacción de yodación da el compuesto **17** y finalmente una reacción de ciclación permite obtener el compuesto **18** azaisatoico.

25



30

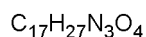
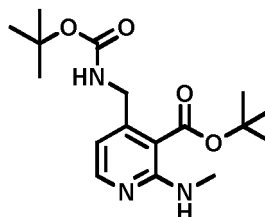
**Esquema 5:** síntesis del compuesto N-boc **18**. k) MeSO<sub>2</sub>Cl, NEt<sub>3</sub>, DCM, 3 h, 0 °C a la t.a. y después NaN<sub>3</sub>, TEA, DCM, 3 h, t.a. l) Boc<sub>2</sub>O, NaOH, PCy<sub>3</sub>, THF, 2 h, t.a. m) NIS, DCM, AcOH, 12 h, t.a. n) COC12, TEA, Et<sub>2</sub>O, 30 min, t.a.

**Ejemplo 3:** 4-(azidometil)-2-(metilamino)nicotinato de *tert*-butilo (**15**)

5 M = 263,30 g/mol

En un matraz de 100 ml bajo nitrógeno se disuelven 1,40 g de **6** (5,88 mmol, 1 eq) en 20 ml de DMF. A 0 °C se añaden simultáneamente 0,91 ml de MeSO<sub>2</sub>Cl (11,76 mmol, 2 eq) y 4,08 ml de TEA (29,3 mmol, 5 eq). La mezcla de reacción se deja en agitación a la temperatura ambiente y el seguimiento se realiza por CCM (EP/Et<sub>2</sub>O, 1/1). Tras la formación completa del correspondiente derivado de mesilato, se añaden 1,15 g de NaN<sub>3</sub> (17,64 mmol, 3 eq) y la reacción se deja en agitación durante 3 h a la temperatura ambiente. A continuación se añaden 50 ml de agua y la solución se extrae con Et<sub>2</sub>O (3 x 60 ml). Las fases orgánicas se combinan a continuación, se secan sobre MgSO<sub>4</sub> y se evaporan. A continuación, el bruto de reacción se purifica en una columna de gel de sílice utilizando un gradiente de eluyente (de EP/Et<sub>2</sub>O, 9/1, a EP/Et<sub>2</sub>O, 8/2). El producto final se obtiene en forma de un aceite de color amarillo con un rendimiento del 73 % (1,13 g, 4,29 mmol). IR (KBr): ν, 3374, 2978, 2104 (N<sub>3</sub>), 1679, 1586, 1425, 1125, 847, 655; RMN-1H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 1,60 (s, 9H); 3,01 (d, 3H, 3J = 5,0 Hz); 4,58 (s, 2H); 6,61 (d, 1H, 3J = 5,0 Hz); 7,73 (s, 1H); 8,24 (d, 1H, 3J = 5,0 Hz); RMN-13C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz): δ 28,3 (3C); 53,9; 77,0; 83,1; 106,7; 111,5; 146,8; 152,0; 159,5; 167,1.

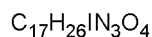
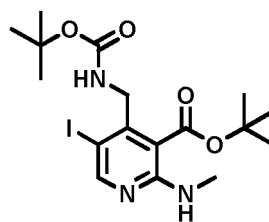
20 **Ejemplo 3,1:** 4-(((*tert*-butoxicarbonil)amino)metil)-2-(metilamino)nicotinato de *tert*-butilo (**16**)



M = 337,41 g/mol

25 En un matraz de 25 ml se disuelven 180 mg de **15** (0,68 mmol, 1 eq) y 447 mg de Boc<sub>2</sub>O (2,05 mmol, 3 eq) en 5 ml de THF. Se añaden sucesivamente 750 μl de una solución acuosa de NaOH (0,75 mmol, 1,1 eq, 1 M en H<sub>2</sub>O) y 230 mg de PCy<sub>3</sub>. La reacción se deja en agitación a la temperatura ambiente durante 2 h. A continuación se añaden 30 ml de agua y la solución se extrae con Et<sub>2</sub>O (3 x 30 ml). Las fases orgánicas se combinan a continuación, se secan sobre MgSO<sub>4</sub> y se evaporan. A continuación, el bruto de reacción se purifica en una columna de gel de sílice utilizando un gradiente de eluyente (de EP/AcOEt, 9/1, a EP/AcOEt, 8/2). El producto final se obtiene en forma de un aceite de color amarillo con un rendimiento del 59 % (135 mg, 0,40 mmol). RMN-1H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 1,44 (s, 9H); 1,60 (s, 9H); 3,01 (d, 3H, 3J = 4,6 Hz); 4,40 (d, 2H, 3J = 6,1 Hz); 5,02 (sl, 1H); 6,57 (d, 1H, 3J = 5,1 Hz); 7,52 (sl, 1H); 8,18 (d, 1H, 3J = 5,1 Hz); RMN-13C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz): δ 28,4 (6C); 28,5; 35 43,9; 79,6; 83,0; 107,6; 111,6; 150,5; 151,5; 155,7; 159,2; 167,4.

**Ejemplo 3,2:** 4-(((*tert*-butoxicarbonil)amino)metil)-5-yodo-2-(metilamino)nicotinato de *tert*-butilo (**17**)

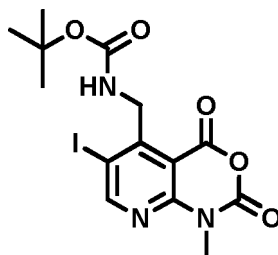


M = 463,31 g/mol

- 5 En un matraz de 25 ml se disuelven 130 mg de **16** (0,39 mmol, 1 eq) en 4 ml de DCM. Se añaden 225 mg de NIS (0,58 mmol, 1,5 eq) y 200  $\mu$ l de ácido acético, y el medio de reacción se deja en agitación durante 12 h. A continuación, la mezcla de reacción se neutraliza con 10 ml de una solución acuosa saturada de tiosulfato de sodio, se recoge en 10 ml de una solución saturada de NaHCO<sub>3</sub>, luego se extrae con Et<sub>2</sub>O (4  $\times$  30 ml)). Las fases orgánicas se combinan a continuación, se secan sobre MgSO<sub>4</sub> y se evaporan. A continuación, el bruto de reacción se purifica en una columna de gel de sílice utilizando un gradiente de eluyente (de EP a EP/AcOEt, 9/1).

15 El producto final se obtiene en forma de un polvo de color amarillo con un rendimiento del 67 % (121 mg, 0,26 mmol). RMN-1H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  1,44 (s, 9H); 1,60 (s, 9H); 2,95 (d, 3H, 3J = 4,6 Hz); 4,39 (d, 2H, 3J = 5,2 Hz); 4,82 (sl, 1H); 6,67 (sl, 1H); 8,48 (s, 1H); RMN-13C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):  $\delta$  28,1 (3C); 28,3 (4C); 47,6; 79,5; 82,9; 83,9; 113,1; 147,7; 154,9; 157,5; 158,3; 166,7.

**Ejemplo 3,4:** (6-yodo-1-metil-2,4-doxo-2,4-dihidro-1H-pirido[2,3-d][1,3]oxacin-5-il) metil carbamato de *terc*-butilo (**18**)

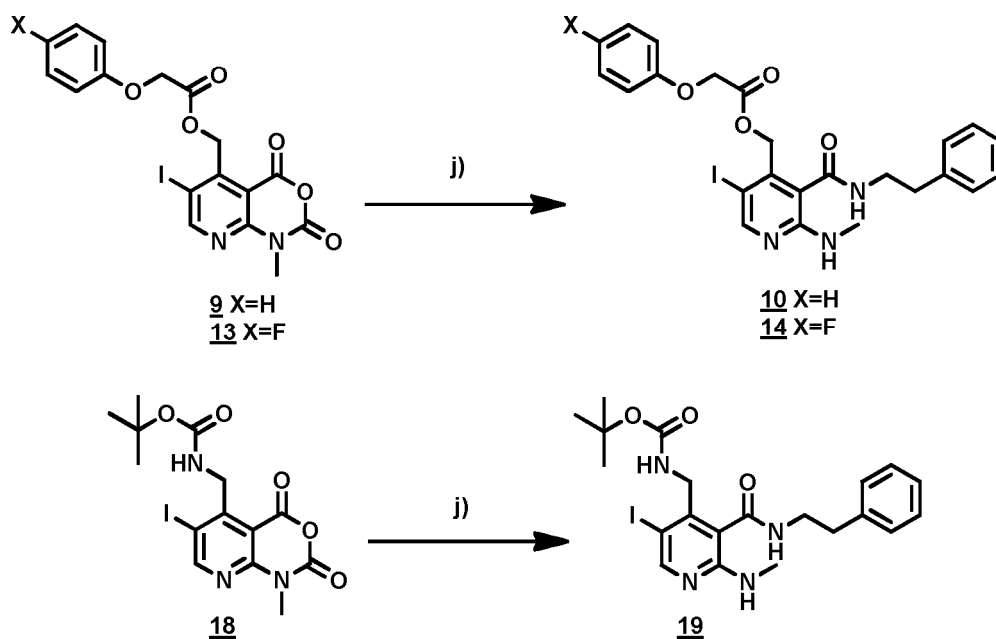


**18**

- 20 En un matraz de 25 ml bajo una atmósfera de nitrógeno se disuelven 100 mg de 17 (0,22 mmol, 1 eq) en 3 ml de DCM. Se añaden simultáneamente 342  $\mu$ l de fosgeno (0,65 mmol, 20 % en tolueno, 3 eq) y 90  $\mu$ l de TEA (0,65 mmol, 3 eq) y la reacción se deja en agitación a la temperatura ambiente durante 30 min. Esta operación se repite tres veces para convertir toda la materia prima. A continuación se añaden 30 ml de agua y la solución se extrae con DCM (3  $\times$  30 ml).
- 25 Las fases orgánicas se combinan a continuación, se secan sobre MgSO<sub>4</sub> y se evaporan. El anhídrido azaisatoico **18** así obtenido se hizo reaccionar directamente sin ninguna etapa suplementaria de purificación.

**Ejemplo 4:** reacción de las moléculas derivadas del anhídrido azaisatoico según la invención con un compuesto aminado

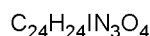
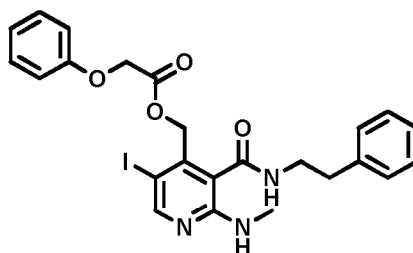
- 30 Este ejemplo demuestra que las moléculas sintetizadas en los ejemplos 1 a 3, es decir, respectivamente las moléculas **9**, **13**, y **18**, reaccionan con un compuesto aminado tal como la feniletilamina.



**Esquema 6:** apertura de los anhídridos azaisatoicos 9, 13, y 18 según la invención por parte de la feniletilamina, j) feniletilamina, DCM, 1 h, t.a.

5

**Ejemplo 4,1:** 2-fenoxiacetato de (5-yodo-2-(metilamino)-3-(fenetilcarbamoil)piridin-4-il)metilo (10)



10 M = 545,37 g/mol

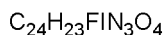
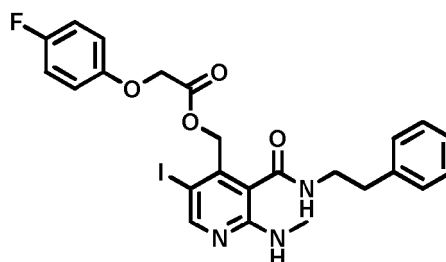
En un matraz de 10 ml se introducen 65 mg de 9 (0,13 mmol, 1 eq), 1 ml de DCM y 17,4  $\mu\text{l}$  de feniletilamina (0,13 mmol, 1 eq). La mezcla de reacción se deja en agitación durante 1 h a la temperatura ambiente. A continuación se añaden 15 ml de agua y la solución se extrae con Et<sub>2</sub>O (5 x 20 ml). Las fases orgánicas se combinan a continuación, se secan sobre MgSO<sub>4</sub> y se evaporan. A continuación, el bruto de reacción se purifica en una columna de gel de sílice utilizando un gradiente de eluyente (de EP/AcOEt, 9/1, a EP/AcOEt, 7/3).

15

El producto final se obtiene en forma de un polvo amarillento con un rendimiento del 71 % (50 mg, 0,09 mmol). Pf = 164-166 °C; IR (KBr)  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>): 3428, 3296, 2924, 1761, 1627, 1433, 1170, 754; RMN-1H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  2,86 (s, 3H); 2,88 (d, 2H, 3J = 7,1 Hz); 3,69 (m, 2H); 4,57 (s, 2H); 4,98 (s, 2H); 5,58 (d, 1H, 3J = 4,5 Hz); 6,54 (t, 1H, 3J = 5,6 Hz); 6,88 (d, 2H, 3J = 8,8 Hz); 7,00 (t, 1H, 3J = 7,6 Hz); 7,21 (m, 2H); 7,28 (m, 5H); 8,40 (s, 1H); RMN-13C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):  $\delta$  28,4; 35,2; 40,6; 64,9; 67,3; 80,3; 114,6 (2C); 118,6; 122,0; 126,8; 128,6 (2C); 128,7 (2C); 129,7 (2C); 138,1; 140,7; 156,3; 156,8; 157,5; 166,5; 168,3.

20

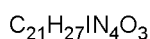
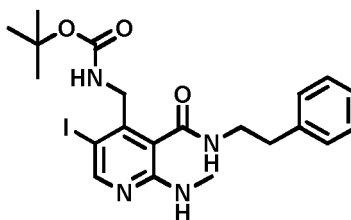
25 **Ejemplo 4,2:** 2-(4-fluorofenoxi)-acetato de (5-yodo-2-(metilamino)-3-(fenetilcarbamoil)piridin-4-il)metilo (14)



M = 563,36 g/mol

- 5 En un matraz de 10 ml se introducen 50 mg de **13** (0,10 mmol, 1 eq), 1 ml de DCM y 12,9  $\mu$ l de feniletilamina (0,10 mmol, 1 eq). La reacción se deja en agitación a la temperatura ambiente durante 1 h. A continuación se añaden 10 ml de agua y la solución se extrae con Et<sub>2</sub>O (5 x 15 ml). Las fases orgánicas se combinan a continuación, se secan sobre MgSO<sub>4</sub> y se evaporan. A continuación, el bruto de reacción se purifica en una columna de gel de sílice utilizando un gradiente de eluyente (de EP/AcOEt, 7/3, a EP/AcOEt, 6/4). El producto final se obtiene en forma de un polvo amarillento con un rendimiento del 87 % (50 mg, 0,09 mmol).
- 10 Pf = 165-167 °C; IR (KBr):  $\nu$ , 3388, 3376, 2924, 1742, 1661, 1577, 1504, 1191, 824; RMN-1H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  2,86 (d, 3H, 3J = 4,64 Hz); 2,89 (t, 2H, 3J = 6,84 Hz); 3,72 (m, 2H); 4,51 (s, 2H); 4,99 (s, 2H); 5,55 (d, 1H, 3J = 4,6 Hz); 6,51 (t, 1H, 3J = 8,0 Hz); 6,83 (m, 2H); 6,97 (m, 2H); 7,21 (m, 3H); 7,30 (m, 2H); 8,40 (s, 1H); RMN-13C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):  $\delta$  28,4; 35,1; 40,5; 65,6; 67,3; 80,2; 115,9 (d, 3JC-F = 8 Hz, 2C); 116,1 (d, 2JC-F = 23 Hz, 2C); 118,6; 126,8; 128,6 (2C); 128,7 (2C); 138,1; 140,7; 153,6 (d, 4JC-F = 2 Hz, 1C); 156,3; 156,8; 157,9 (d, 1JC-F = 222 Hz, 1C); 166,5; 168,1.

**Ejemplo 4.3:** ((5-yodo-2-(metilamino)-3-(fenetilcarbamoil)piridin-4-il)metil)carbamato de *terc*-butilo (**19**)



20

M = 510,37 g/mol

- 25 En un matraz de 10 ml se disuelve el anhídrido azaisatoico **18** en 1 ml de DCM. Después se añaden 27,6  $\mu$ l de feniletilamina (0,22 mmol, 1 eq) y el medio de reacción se deja en agitación a la temperatura ambiente durante 1 h. A continuación se añaden 10 ml de agua y la solución se extrae con Et<sub>2</sub>O (4 x 20 ml). Las fases orgánicas se combinan a continuación, se secan sobre MgSO<sub>4</sub> y se evaporan. A continuación, el bruto de reacción se purifica en una columna de gel de sílice utilizando un gradiente de eluyente (de EP/AcOEt, 7/3, a EP/AcOEt, 4/6).
- 30 El producto final se obtiene en forma de un polvo amarillento con un rendimiento del 54 % (61 mg, 0,12 mmol). RMN-1H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  1,34 (s, 9H); 2,79 (d, 3H, 3J = 4,6 Hz); 2,88 (t, 2H, 3J = 7,1 Hz); 3,67 (m, 2H); 3,87 (d, 2H, 3J = 6,5 Hz); 5,47 (s1, 1H); 5,72 (s1, 1H); 7,18 (m, 5H); 8,27 (s, 1H); 8,98 (s1, 1H); RMN-13C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):  $\delta$  28,3 (3C); 28,4; 30,0; 40,6; 44,9; 80,0; 80,6; 118,9; 126,4; 128,4 (2C); 128,7 (2C); 138,8, 143,1; 156,1; 156,2; 156,7; 166,7.

- 35 **Ejemplo 5:** procedimiento de desprotección de compuestos de aza-antranilato y liberación de la feniletilamina en unas condiciones de PCR "*hot-start*"

Aquí mostramos que los derivados **10**, **14**, y **19** sintetizados en el ejemplo 3 pueden escindirse en condiciones de PCR "*hot-start*" y liberar la feniletilamina que imita a una proteína.

40

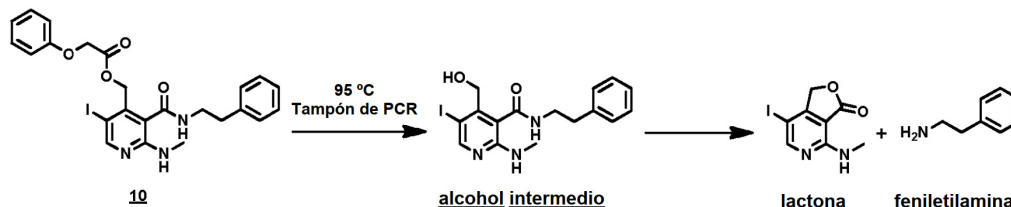
**Procedimiento general:**

En un tubo de 1,5 ml se introducen: 20  $\mu$ l de una solución de amida (**10**, **14** o **19**) a 2,5 mM en DMSO y 180  $\mu$ l de un tampón utilizado convencionalmente en una reacción de amplificación del material genético (60 mM de Tris a pH 9,

KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM). A continuación, la mezcla se deja en agitación a 95 °C en una termomezcladora. Los seguimientos por LCMS (condición 1) se realizaron en los t = 15 min, 30 min y 1 h.

**Ejemplo 5.1:** evaluación de la escisión a 95 °C del derivado de aza-antranilato fenoxiacetato **10**

5



**Esquema 7:** escisión del compuesto de aza-antranilato **10** en condiciones de PCR "Hot-start"

10 La desprotección térmica del grupo fenoxiacetato conduce a la formación del correspondiente alcohol bencílico (véase el esquema 7). El ataque nucleófilo del alcohol sobre el carbonilo implicado en el enlace amida permite entonces la liberación de la feniletilamina en el medio, generando la correspondiente lactona.

Esta cascada de reacción está representada en los cromatogramas de HPLC de la figura 1.

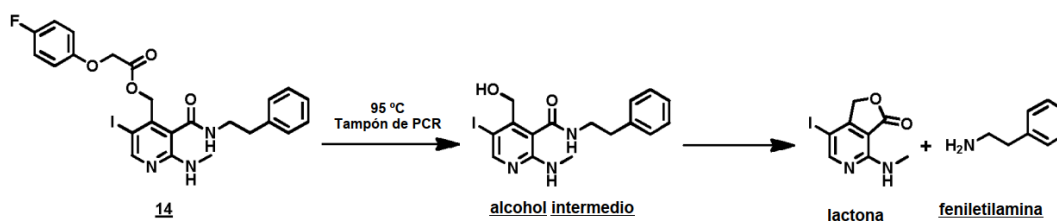
15

Después de 15 minutos a 95 °C, se aprecia la formación del alcohol desprotegido y la lactona esperada, lo que indica la liberación de feniletilamina. Este resultado muestra el carácter termolábil del grupo fenoxiacetato que conduce a la formación del alcohol correspondiente. Después de la ciclación, se encuentra la presencia de la lactona esperada, lo que demuestra la escisión del enlace amida y, por tanto, la liberación de la feniletilamina en el medio. Después de 1 h a 95 °C, la población de la amida de partida y del alcohol ha desaparecido casi por completo en favor de la lactona.

20

Este resultado demuestra la posibilidad de escindir un enlace amida a 95 °C mediante este sistema de ciclación intramolecular.

25 **Ejemplo 5.2:** evaluación de la escisión a 95 °C del derivado de aza-antranilato fluoro-fenoxiacetato **14**

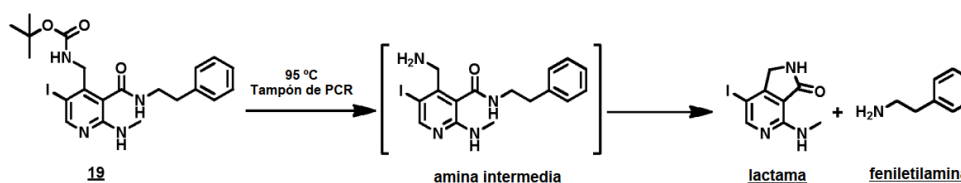


30 **Esquema 8:** escisión de los compuestos de aza-antranilato **14** en condiciones de PCR "Hot-start"

El procedimiento de desprotección también se llevó a cabo a partir del derivado **14** de fluorofenoxiacetato. Después de 15 minutos a 95 °C, la población de la amida es muy baja. En particular, es menor en comparación con el resultado observado con el derivado **10** (véase la figura 2). La presencia del átomo de flúor acelera la escisión del grupo fenoxiacetato. Así, después de 30 minutos, esta población de la amida ha desaparecido casi totalmente en favor del alcohol y la lactona, que son mayoritarios, lo que indica la liberación de feniletilamina.

35

**Ejemplo 5.3:** evaluación de la escisión a 95 °C del derivado de aza-antranilato N-Boc **19**



40

**Esquema 9:** escisión de los compuestos de aza-antranilato N-Boc - **19** en condiciones de PCR "Hot-start"

En este caso, la desprotección del grupo N-boc conduce al derivado intermedio de amina bencílica.

Este último puede entonces ciclar para formar la lactama correspondiente, liberando la feniletilamina en el medio (esquema 9 anterior). En la figura 3 se representa el seguimiento por HPLC de los diferentes compuestos intermedios.

- 5 Para este derivado, no se detecta la forma desprotegida no ciclada (amina intermedia). Por tanto, este ejemplo demuestra la ciclación inmediata tras la desprotección del grupo N-boc para formar la feniletilamina. Esto confirma la ventaja de la función amino en la posición 5 con respecto a la función alcohol, para la velocidad de ciclación. El experto en la materia sabrá, por tanto, encontrar el grupo protector apropiado para la función NH<sub>2</sub> en la posición 5 del anillo aromático para obtener una desprotección suficientemente rápida que conduzca a una ciclación instantánea y a la liberación de la feniletilamina.

**Ejemplo 6:** protección reversible de la hemoglobina por parte del compuesto azaisatoico **13** tal como se describe en la invención

- 15 Demostramos aquí que el derivado azaisatoico **13** dotado del grupo termolábil fluorofenoxi es capaz de reaccionar con una proteína en condiciones suaves y en medio acuoso para formar un derivado de proteína-aza antranilato fluorofenoxi.

La eliminación de este grupo protector tras un tratamiento térmico a 95 °C permite regenerar la proteína nativa.

20 **Protocolo:**

Las mezclas se realizan tal como se describe a continuación, donde los experimentos AL600 1x a AL 600 0,25X corresponden respectivamente a 33 µg de hemoglobina que ha reaccionado con concentraciones crecientes del compuesto azaisatoico en una mezcla de DMSO y PBS a pH 7,4 (PBS = *Phosphate buffered Saline* resultante de la disolución de una pastilla de la referencia Sigma P4417 en 200 ml de agua (pH 7,4)). Las mezclas se incuban a la temperatura ambiente durante 2 horas antes de tomar una alícuota para el análisis por HPLC en una columna de Waters (Milford, EE.UU.) XBridge BEH 300 C4 con un gradiente del 20 al 72 % de acetonitrilo en solución de ácido trifluoroacético 10 mM en 120 min.

30

**Tabla 1:** concentración relativa de reactivos para realizar la acilación reversible de la hemoglobina

	Hemoglobina humana (Sigma H7379) 6,6 µg/µl en PBS	PBS a pH 7,4	DMSO	<b>13</b> (41 mM en DMSO)
EXPERIMENTOS	µl	µl	µl	µl
AL 600 0,25x	5	5	8,75	1,25
AL 600 0,5x	5	5	7,5	2,5
AL 600 1x	5	5	5	5
CTRLS SIN Reactivo de acilación				
AL 602 CTRL 0,25X	5	5	10	0

- 35 En la figura 4, el cromatograma AL602 CTRL 0,25X muestra la hemoglobina de control que no ha reaccionado con el compuesto **13**. El hemo y las 2 subunidades alfa y beta de la fracción proteica son visibles. Los 3 cromatogramas siguientes (AL 600 0,25 X-1X) muestran la desaparición de la fracción proteica en favor de una masa desplazada hacia la derecha correspondiente a las subunidades alfa y beta aciladas por el compuesto azaisatoico **13**. El ensanchamiento del pico corresponde a la acilación aleatoria de los sitios reactivos de la proteína.

- 40 Así se demuestra que el compuesto azaisatoico tal como se describe según la invención puede reaccionar con una proteína.

45 Cuando el medio de reacción AL 600 1X se somete a un tratamiento térmico a 95 °C durante 15 min en tampón de PCR (constituido principalmente por Tris a pH 9), se observa una hidrólisis de la fracción de bencilamida, lo que conduce a restaurar el perfil cromatográfico de la hemoglobina nativa. Esto es visible en la figura 5, donde el cromatograma superior (A) representa la hemoglobina nativa y recogida en GuHCl 8 M, el cromatograma central (B) representa la hemoglobina acilada por el compuesto **13** y recogida en GuHCl 8 M y, donde el cromatograma inferior (C) representa la hemoglobina acilada con el compuesto **13** y después calentada en tampón Tris a pH 8 y recogida en GuHCl 8 M. Se puede ver claramente, como antes, que la acilación de la hemoglobina conduce a la formación de un conjunto de proteínas aciladas, y que este conjunto desaparece después de un tratamiento térmico para regenerar la proteína nativa.

50 Obsérvese que los medios de reacción se recogieron en GuHCl 8 M después de la reacción con el fin de solubilizar la fracción proteica que habría precipitado durante el tratamiento térmico. Este ejemplo demuestra la acilación reversible de un modelo de proteína por parte del compuesto **13** tal como se describe en la invención.

55

**Ejemplo 7:** demostración de la acilación reversible de la polimerasa TAQ por parte del compuesto azaisatoico **13** tal como se describe en la invención

Demostramos aquí que el derivado azaisatoico **13** dotado del grupo termolábil fluorofenoxi es capaz de reaccionar con una polimerasa termoestable (*Taq*) en condiciones suaves y en medio acuoso para formar un derivado *Taq-aza* antranilato fluorofenoxi. La eliminación de este grupo protector tras un tratamiento térmico a 95 °C en condiciones de PCR permite restaurar la actividad de la polimerasa, lo que se demuestra por el análisis de su actividad.

Se demuestra así el concepto de utilizar anhídridos azaisatoicos convenientemente modificados para enmascarar transitoriamente la actividad de una polimerasa y restaurarla después de un tratamiento térmico.

#### Protocolo:

Hemos utilizado la *Taq* Genscript (2500 u /100 µl REF E00012), pero para eliminar todo rastro de nucleófilos en esta enzima hemos realizado previamente un cambio de tampón mediante el paso por un microcon de 10 KD Amicon (n° 42407). La suspensión enzimática se deposita así en el microcon y se centrifuga hasta agotar el tampón. Se realizan cinco lavados con 100 µl de PBS a pH 7,4, luego se recupera el último retenido por inversión del tubo y se completa hasta QSP 20 µl con PBS para obtener una suspensión a 125 n/µl. Hemos demostrado así que el Tris y el glicerol se eliminaron muy satisfactoriamente por este método.

A continuación, se realizan las mezclas tal como se describe en la tabla **2**, donde los experimentos AL604 0,25x a AL 604 0,375X corresponden respectivamente a 625 unidades de polimerasa *Taq* que ha reaccionado con concentraciones crecientes del compuesto azaisatoico en una mezcla de DMSO y PBS a pH 7,4 (PBS = *Phosphate buffered Saline* resultante de la disolución de una pastilla de la referencia Sigma P4417 en 200 ml de agua (pH 7,4)). Las mezclas se incuban a la temperatura ambiente durante 3 horas con un vórtice suave antes de evaluar su actividad enzimática en condiciones de PCR "*hot-start*".

**Tabla 2:** concentración relativa de reactivos para realizar la acilación reversible de la polimerasa TAQ

	<i>Taq</i> Genscript (125 u/µl)	PBS a pH 7,4	DMSO	<b>13</b> (41 mM en DMSO)	Concentración final de TAQ] (20 µl a 50/50 de PBS/DMSO)
EXPERIMENTOS	Unidades/µl	µl	µl	µl	u/µl
AL 604 0,25x	625 u/5 µl	5	8,75	1,25	31
AL 604 0,375x	625 u/5 µl	5	8,1	1,9	31

#### Análisis de la actividad polimerasa de la TAQ modificada por el compuesto **13**:

La actividad de polimerización de la polimerasa TAQ se realiza con la ayuda de una sonda de oligonucleótidos de 45 bases terminada en una estructura en "horquilla". Ésta se caracteriza por la presencia de un inactivador de la fluorescencia al principio de la estructura y por un fluoróforo al final de la secuencia de la sonda, de tal manera que el inactivador está espacialmente próximo al fluoróforo y no se pueda medir ninguna señal de fluorescencia en esta configuración. Bajo la acción de la actividad polimerasa, esta sonda se alarga con la ayuda de un oligonucleótido de 19 bases complementario al inicio de la sonda anterior. Bajo la acción de la elongación, la estructura en horquilla de la sonda se despliega y el fluoróforo puede emitir, y entonces se puede medir una fluorescencia. Esta medición de la fluorescencia se realiza a una temperatura de 60 °C durante 20 minutos en presencia de los reactivos necesarios para la actividad de la enzima, es decir, los dNTP, mgCl<sub>2</sub> y un tampón básico a pH 9,5.

El aumento de la fluorescencia es lineal al principio de la medición y permite calcular una velocidad inicial correspondiente a la cantidad de fluorescencia emitida por minuto de elongación. Midiendo esta velocidad inicial para diferentes concentraciones de una polimerasa dada con una actividad conocida en U/µl, es posible establecer una recta patrón que permite medir la actividad de una enzima similar de actividad desconocida.

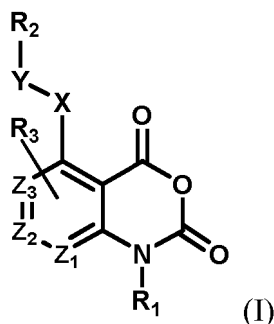
La modificación química de la polimerasa para hacerla inactiva se mide con este método. Midiendo el nivel de actividad residual tras la modificación de la enzima, es posible determinar la eficacia de la protección implementada. Una polimerasa totalmente inactivada por modificación química no debería generar actividad sin activación térmica a unas temperaturas superiores a 90 °C.

La capacidad de restaurar la actividad de la enzima después de calentarla durante 15 minutos a 95 °C, por ejemplo, se mide fácilmente con el mismo método.

La figura 6 muestra por tanto que, en función de la concentración elegida de agente acilante, la actividad de la polimerasa *Taq* activada puede inactivarse totalmente y restaurarse tras un tratamiento a 95 °C durante 15 minutos en unas condiciones de PCR "*Hot-start*" (véase la columna de AL 604 0,375X).

## REIVINDICACIONES

1. Compuesto de la siguiente fórmula (I):



5

en la que

X es un enlace covalente o un alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>4</sub>,

10 Y es un radical nucleófilo elegido entre O, S, NR<sub>4</sub>, O-NR<sub>4</sub>, NH-O, NH-NR<sub>4</sub>, C(O)-O-NR<sub>4</sub>, C(O)-NH-O, C(O)-NH-NR<sub>4</sub>, O-C(O)-NH-NR<sub>4</sub>, NH-C(O)-NH-NR<sub>4</sub>, O-C(O)-NH-O, NH-C(O)-NH-O, O-C(O)-O-NR<sub>4</sub>, NH-C(O)-O-NR<sub>4</sub>, C(O)-S, y R<sub>4</sub> es H o un grupo alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>4</sub>,

Z<sub>1</sub>, Z<sub>2</sub>, Z<sub>3</sub> representan cada uno independientemente entre sí, N o C, preferentemente Z<sub>3</sub> representa C, más preferentemente Z<sub>3</sub> es C y R<sub>3</sub> está en la posición Z<sub>3</sub>,

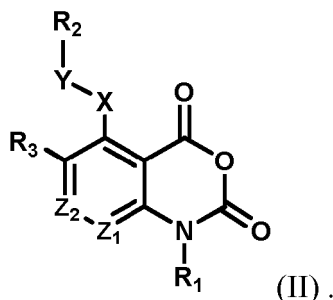
15 R<sub>1</sub> es H, un grupo alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>, un alquenoilo, un grupo arilo o un heterociclo, estando dichos grupos alquilo, alquenoilo, arilo o heterociclo, opcionalmente sustituidos con uno o varios grupos funcionales elegidos entre los grupos amino, imino, nitrilo, ciano, amida, imida, hidroxilo, alcoxilo, carbonilo, carboxilo, éster, tiol, tioéter, tioéster y halogenuro, preferentemente R<sub>1</sub> es un grupo metilo o etilo,

20 R<sub>2</sub> es un grupo protector termolábil, es decir, un grupo protector que es estable a una temperatura de entre 15 °C y 25 °C y que se escinde, se disocia o se libera de una molécula a la que está unido, por un tratamiento térmico a una temperatura comprendida entre 50 y 100 °C; y/o R<sub>2</sub> es un grupo protector acidolábil, es decir, un grupo protector que es estable en condiciones neutras o básicas y que se escinde, se disocia o se libera, por tratamiento a un pH inferior a 6,0,

25 R<sub>3</sub> es H, un grupo alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>12</sub>, por ejemplo, un grupo iso-propilo, isobutilo, *sec*-butilo, *terc*-butilo, isopentilo o 2,2-dimetilpropilo, un grupo arilo, un heterociclo, un grupo acilo, un grupo alquenoilo, un halógeno (por ejemplo, F, Cl, Br y I), o un grupo ciano, dichos grupos alquilo, arilo, heterociclo o alquenoilo, estando opcionalmente sustituidos con uno o varios grupos funcionales elegidos entre los grupos amino, imino, nitrilo, ciano, amida, imida, hidroxilo, alcoxilo, carbonilo, carboxilo, éster, tiol, tioéter, tioéster y halogenuro, y cuando Y se elige entre O, S y NR<sub>4</sub>, X no es un enlace.

30

2. Compuesto según la reivindicación 1 de la siguiente fórmula (II):



(II).

35 3. Compuesto según una de las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizado por que** el grupo termolábil y/o acidolábil R<sub>2</sub> se elige entre los grupos *terc*-butoxicarbonilo (BOC), fenoxiacetilo sustituido o no sustituido, tritilo, metoxitritilo, dimetoxitritilo o citraconilo.

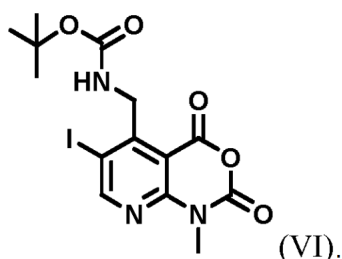
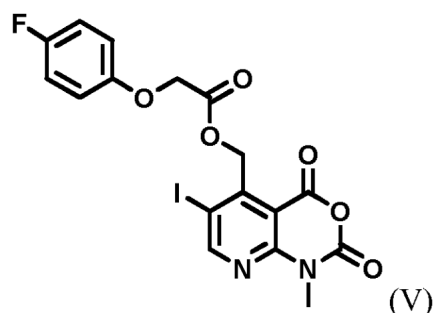
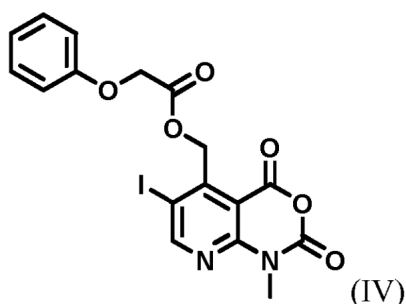
40 4. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** R<sub>1</sub> es un grupo metilo.

5. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** R<sub>3</sub> es yodo.

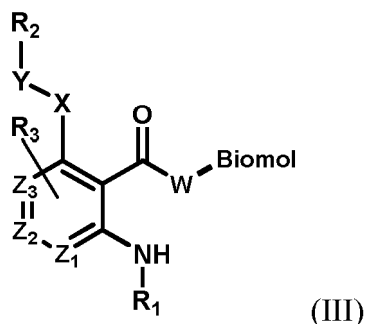
6. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** Z<sub>1</sub> es N y Z<sub>2</sub> es C.

45 7. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores **caracterizado por** una de las siguientes

estructuras:



- 5 8. Procedimiento de preparación de una molécula biológica protegida, que comprende poner en contacto un compuesto según una de las reivindicaciones 1 a 7 con una molécula biológica que comprende uno o varios grupos nucleófilos, en unas condiciones que permitan la acilación de uno o varios grupos nucleófilos de dicha molécula biológica, para formar una molécula biológica protegida.
- 10 9. Molécula biológica protegida, susceptible de obtenerse por el procedimiento de la reivindicación 8.
10. Molécula biológica protegida, de la siguiente fórmula (III):



15 en la que

- Biomol es una molécula biológica
- W es un grupo nucleófilo de la molécula biológica, por ejemplo, NH, S u O,
- 20 X es un enlace covalente o un alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>4</sub>,
- Y es un radical nucleófilo elegido entre O, S, NR<sub>4</sub>, O-NR<sub>4</sub>, NH-O, NH-NR<sub>4</sub>, C(O)-O-NR<sub>4</sub>, C(O)-NH-O, C(O)-NH-NR<sub>4</sub>, O-C(O)-NH-NR<sub>4</sub>, NH-C(O)-NH-NR<sub>4</sub>, O-C(O)-NH-O, NH-C(O)-NH-O, O-C(O)-O-NR<sub>4</sub>, NH-C(O)-O-NR<sub>4</sub>, C(O)-S, y R<sub>4</sub> es H o un grupo alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>4</sub>,
- 25 Z<sub>1</sub>, Z<sub>2</sub>, Z<sub>3</sub> representan cada uno independientemente entre sí, N o C, preferentemente Z<sub>3</sub> representa C, más preferentemente Z<sub>3</sub> es C y R<sub>3</sub> está en la posición Z<sub>3</sub>,
- R<sub>1</sub> es H, un grupo alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>, un alqueno, un grupo arilo o un heterociclo, dichos grupos alquilo, alqueno, arilo o heterociclo, estando opcionalmente sustituidos con uno o varios grupos funcionales elegidos entre los grupos amino, imino, nitrilo, ciano, amida, imida, hidroxilo, alcoxilo, carbonilo, carboxilo, éster, tiol, tioéter, tioéster y halogenuro, preferentemente R<sub>1</sub> es un grupo metilo o etilo,
- 30 R<sub>2</sub> es un grupo protector termolábil, es decir, un grupo protector que es estable a una temperatura de entre 15 °C y 25 °C y que se escinde, se disocia o se libera de una molécula a la que está unido, por un tratamiento térmico a una temperatura comprendida entre 50 y 100 °C; y/o R<sub>2</sub> es un grupo protector acidolábil, es decir, un grupo protector que es estable en condiciones neutras o básicas y que se escinde, se disocia o se libera, por tratamiento

a un pH inferior a 6,0,

R<sub>3</sub> es H, un grupo alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>12</sub>, por ejemplo, un grupo iso-propilo, isobutilo, *sec*-butilo, *terc*-butilo, isopentilo o 2,2-dimetilpropilo, un grupo arilo, un heterociclo, un grupo acilo, un grupo alqueno, un halógeno o un grupo ciano, dichos grupos alquilo, arilo, heterociclo o alqueno, estando opcionalmente sustituidos con uno o varios grupos funcionales elegidos entre los grupos amino, imino, nitrilo, ciano, amida, imida, hidroxilo, alcoxilo, carbonilo, carboxilo, éster, tiol, tioéter, tioéster y halogenuro, y cuando Y se elige entre O, S y NR<sub>4</sub>, X no es un enlace.

- 5
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
11. Molécula biológica protegida de la reivindicación 10, **caracterizada por que** Biomol se elige entre las enzimas.
  12. Molécula biológica protegida de la reivindicación 11 **caracterizada por que** Biomol es una enzima destinada a ser utilizada en una reacción de polimerización de ácidos nucleicos, por ejemplo, una ADN polimerasa.
  13. Utilización de un compuesto según una de las reivindicaciones 1 a 7 para la inactivación reversible de una enzima.
  14. Utilización según la reivindicación 13, **caracterizada por que** la enzima es una enzima destinada a ser utilizada en una reacción de polimerización de ácidos nucleicos, por ejemplo, una ADN polimerasa.
  15. Utilización de una molécula biológica protegida según la reivindicación 12, en una reacción de amplificación de ácido nucleico, por ejemplo, para aplicaciones de arranque en caliente "*Hot Start*".
  16. Procedimiento de desprotección de grupos nucleófilos de una molécula biológica protegida según una de las reivindicaciones 9 a 12, comprendiendo dicho procedimiento una etapa de escisión del grupo o grupos termolábiles y/o acidolábiles R<sub>2</sub>, por tratamiento térmico y/o ácido, respectivamente, y la desprotección concomitante de los grupos nucleófilos.
  17. Procedimiento de polimerización de un ácido nucleico que comprende (i) implementar una molécula biológica protegida según la reivindicación 12, (ii) al menos una etapa para la desprotección de dicha molécula biológica, por ejemplo, mediante un tratamiento térmico a una temperatura que permita la escisión del grupo o grupos termolábiles R<sub>2</sub>, (iii) una etapa de polimerización de los ácidos nucleicos con la ayuda de la polimerasa desprotegida en la etapa (ii).

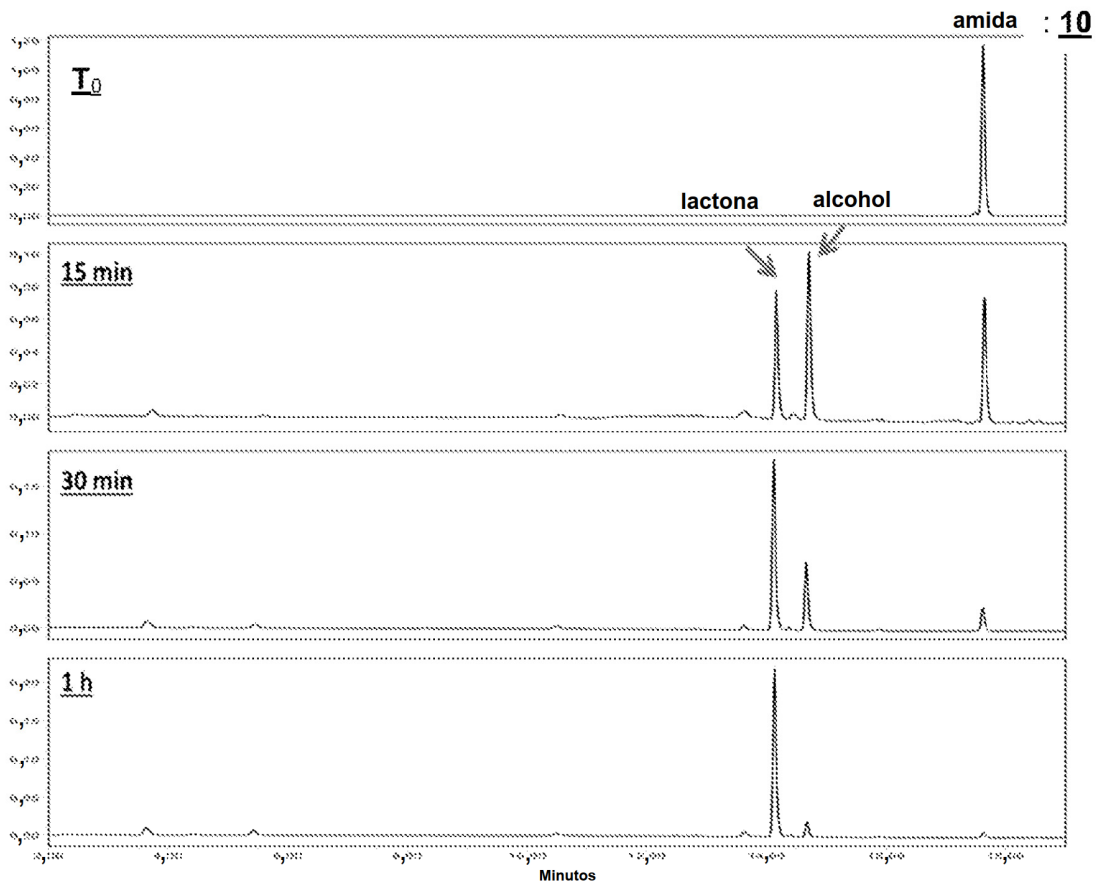


Figura 1

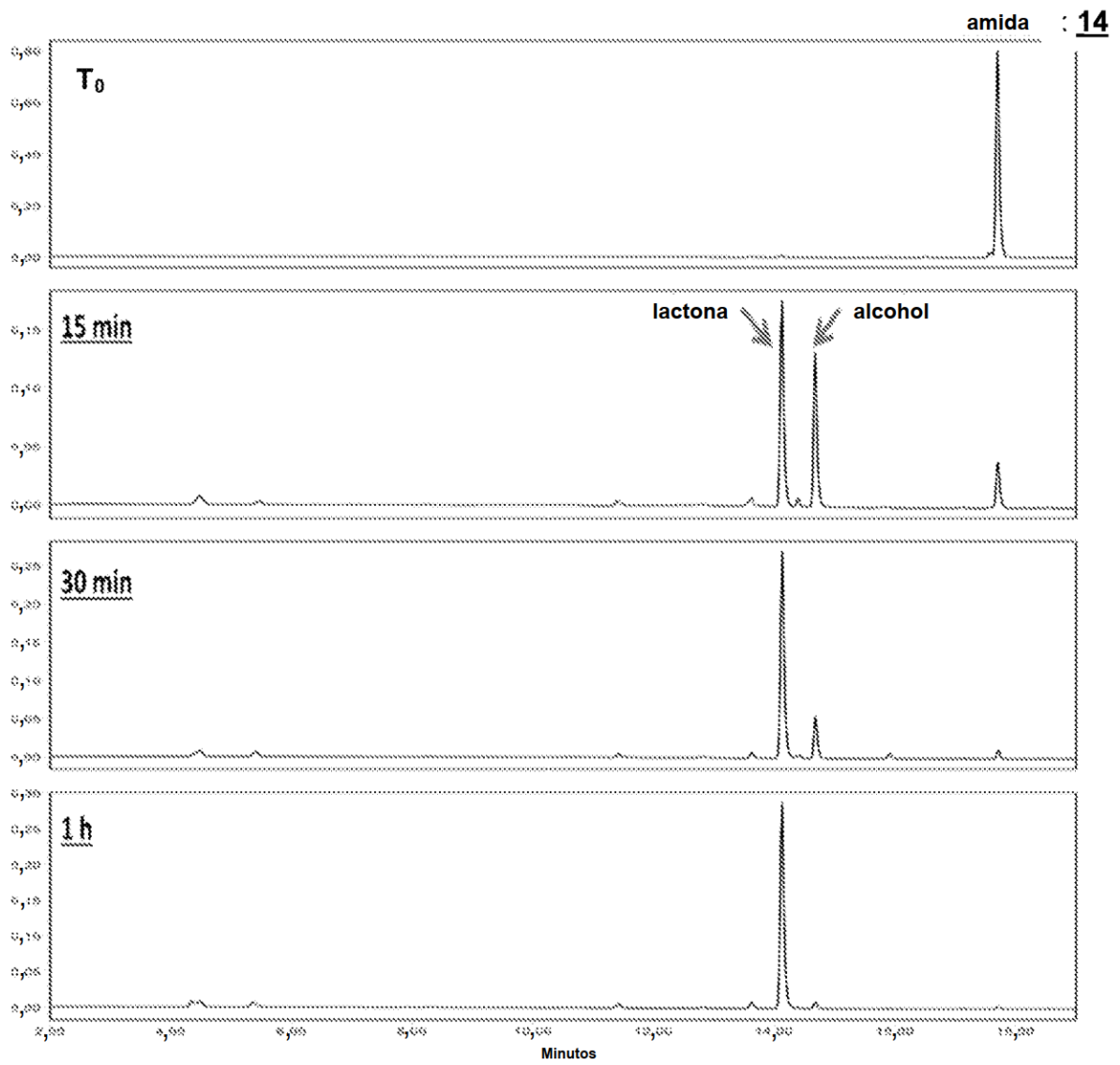


Figura 2

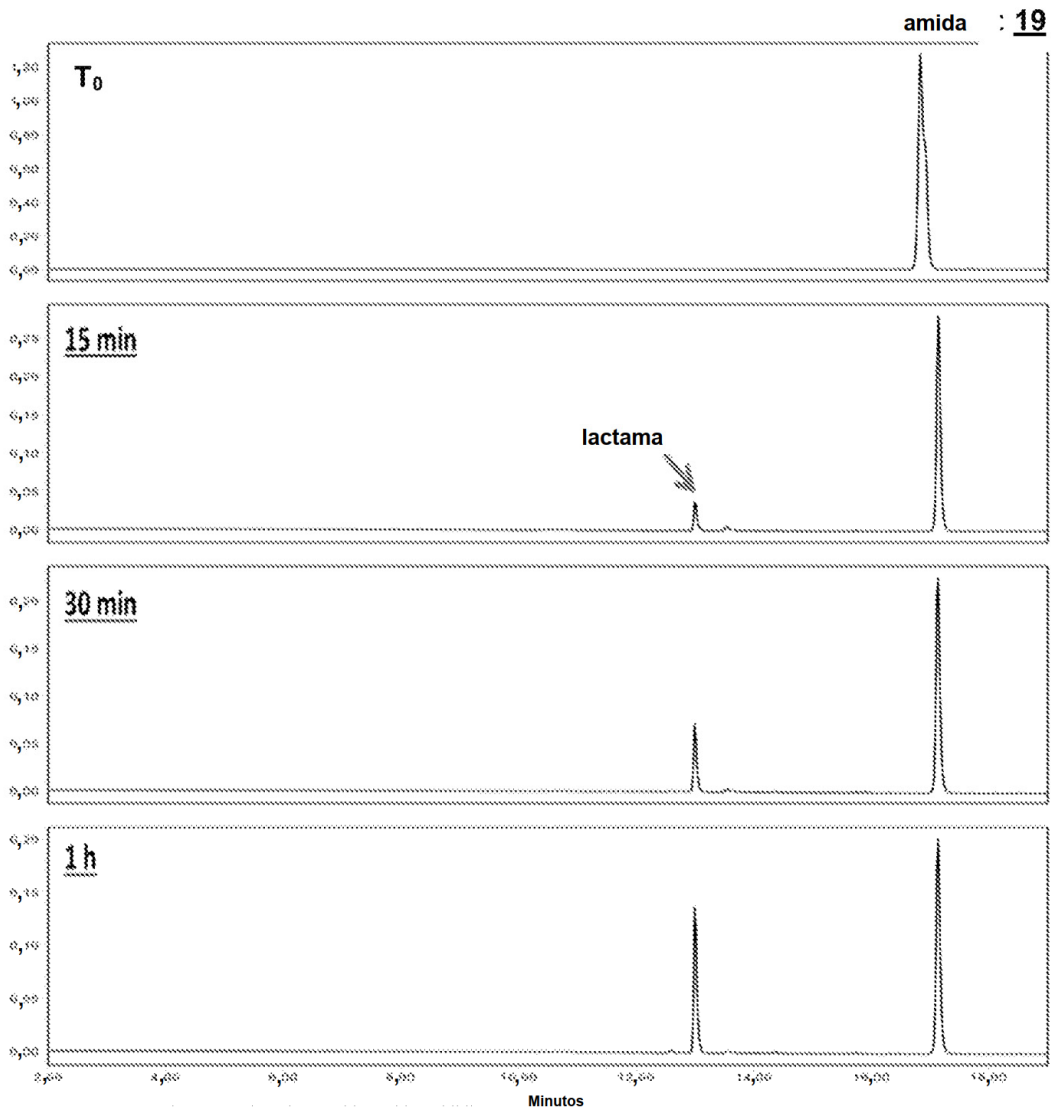


Figura 3

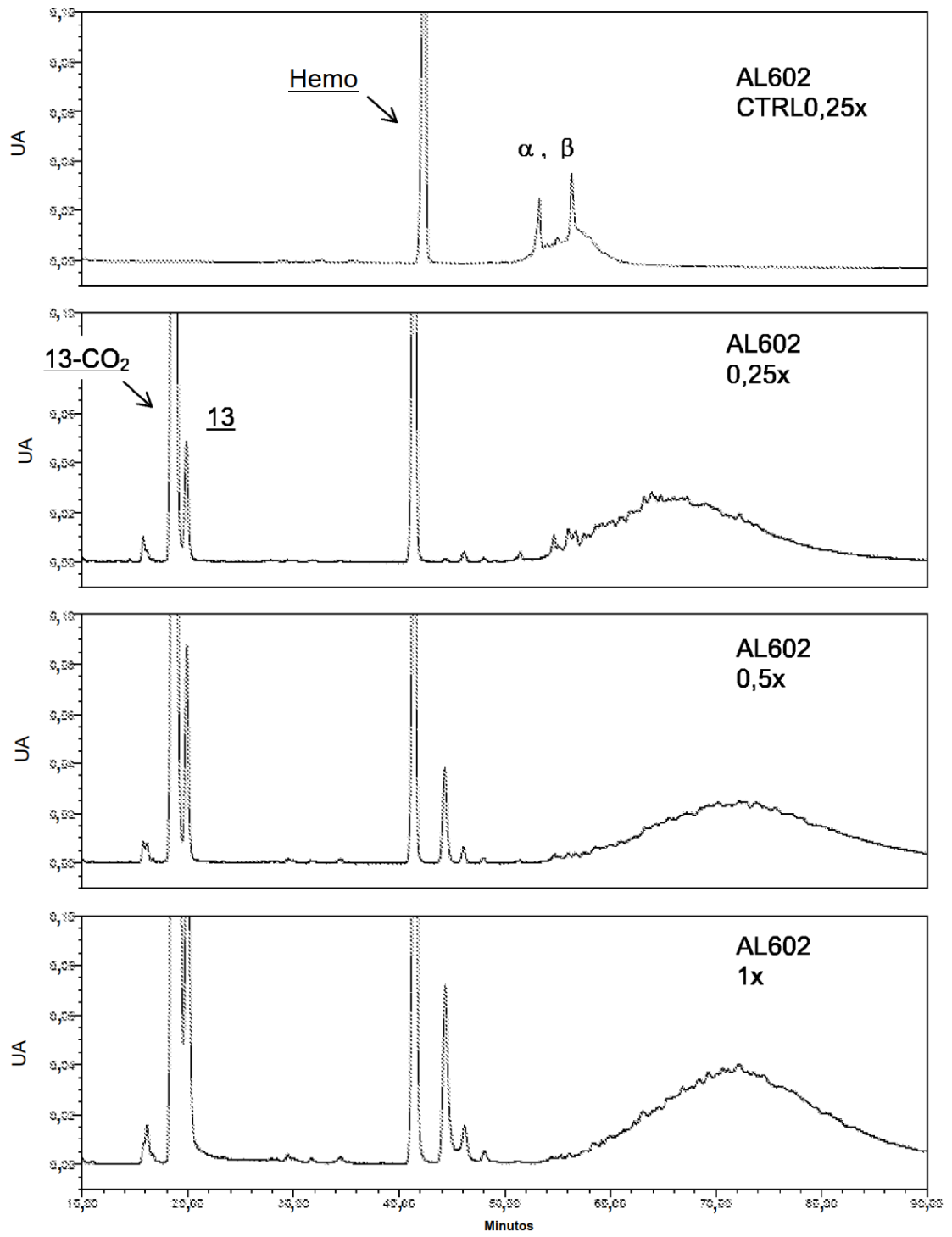
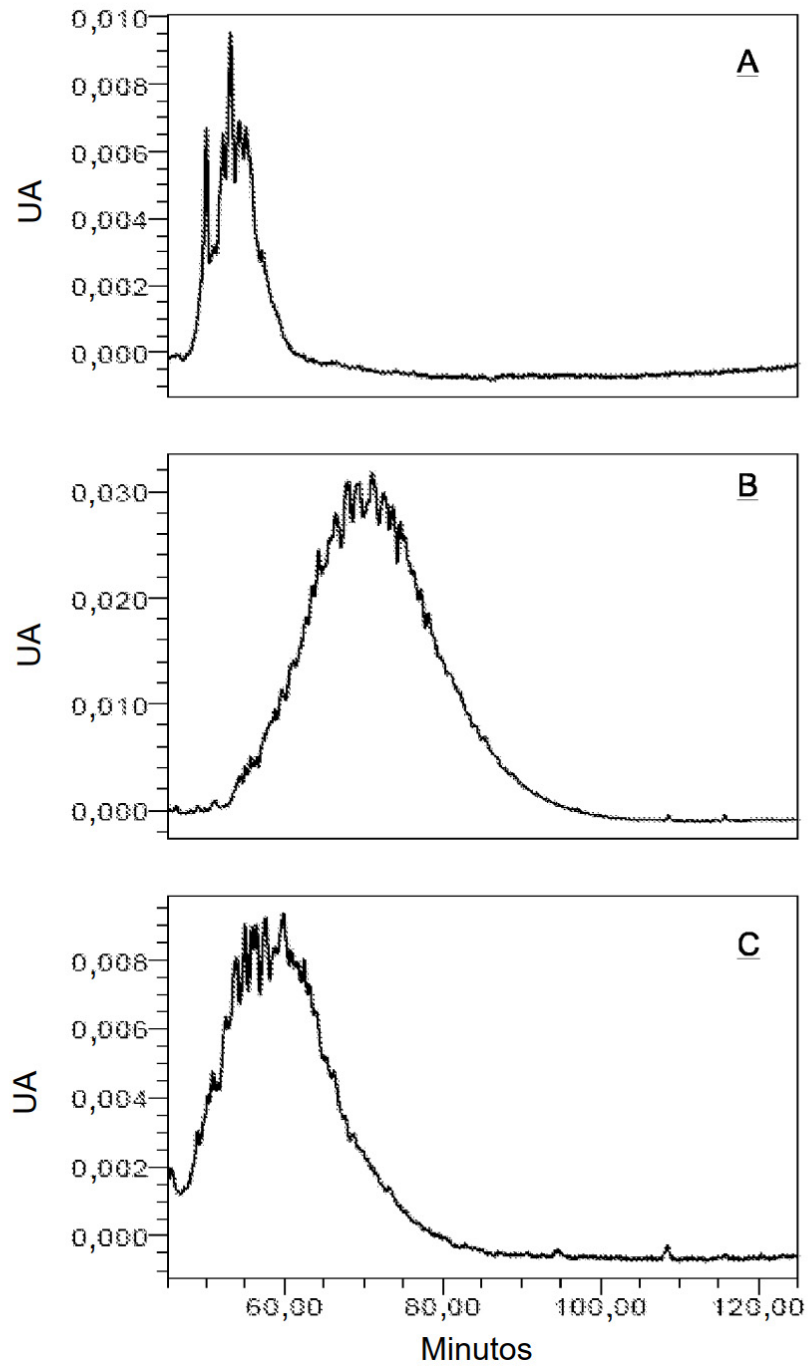


Figura 4



**Figura 5**

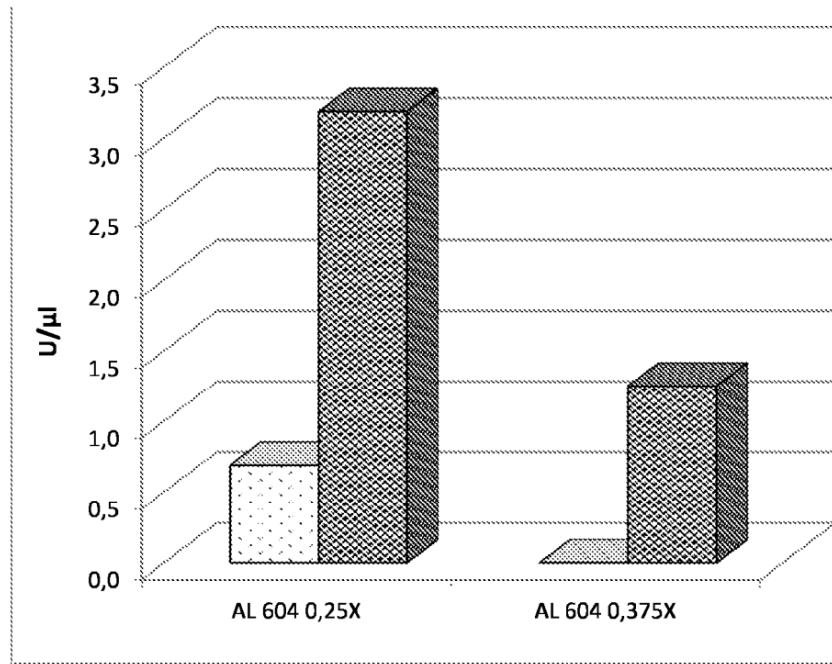


Figura 6