



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 316 765**

51 Int. Cl.:  
**G01N 33/50** (2006.01)  
**G01N 33/542** (2006.01)  
**G01N 33/543** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03732051 .2**  
96 Fecha de presentación : **22.01.2003**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1476576**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.11.2004**

54 Título: **Colorantes fluorógenos.**

30 Prioridad: **22.01.2002 US 351168 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.04.2009**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.04.2009**

73 Titular/es: **Novartis Vaccines and Diagnostics, Inc.**  
**4560 Horton Street**  
**Emeryville, California 94608, US**

72 Inventor/es: **Suich, Daniel, J. y**  
**Zuckermann, Ronald, N.**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 316 765 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

Colorantes fluorógenos.

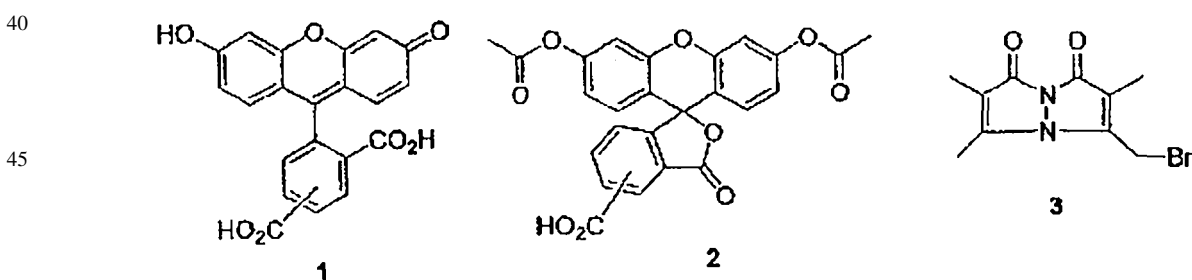
5 **Fundamento de la invención****Campo de la invención**

10 La presente invención se refiere al uso de colorantes fluorógenos como moléculas informadoras para detectar la entrada en células por una molécula específica. La presente invención tiene aplicación en ensayos celulares, incluyendo ensayos de alta capacidad que utilizan informadores fluorógenos para detectar el transporte de una molécula a través de una membrana celular.

**La técnica relacionada**

15 Se han usado numerosos colorantes fluorescentes y fluorógenos como informadores en ensayos de fluorodetección. En particular, se ha informado de numerosos derivados de fluoresceína que poseen grupos funcionales que son adecuados para reaccionar con otras moléculas y se han usado como indicadores en aplicaciones analíticas que van desde el sondeo de funciones celulares a la comprobación del nivel de uno o más fármacos en muestras de ensayos fisiológicos. Véase, por ejemplo, C. Dive *et al.*, *Mol. Cell Probes* 211 (1988); Graber *et al.*, *Anal. Biochem.* 156:202 (1986); P.J. Brynes *et al.*, Patente de los EE.UU. N° 4.869.132 y N.Y. Wang *et al.*, documento EP 264797. Los ejemplos de aplicaciones analíticas en las que se usan tales compuestos incluyen, como ejemplo, inmunoensayos de polarización fluorescente (FPIAs) de uso en instrumentos disponibles comercialmente tales como los instrumentos Abbott AD<sub>x</sub> y Abbott TD<sub>x</sub> (ambos disponibles de Abbott Labs, Abbott Park, Illinois). Los ejemplos de tales derivados incluyen 20 5 y 6-amino fluoresceína (M.T. Ship Chandler *et al.*, *Anal. Biochem.* 162:89; Mattingly, Patentes de los EE.UU. N° 5.573.904 (1996) y 5.756.771 (1996), y Ghoshal *et al.*, Patente de los EE.UU. N° 5.986.094 (1999)).

30 Se han usado particularmente colorantes de fluoresceína para detectar la entrada en células. Por ejemplo, se ha empleado especialmente fluoresceína 1 para detectar la entrada en células por péptidos. Adicionalmente, el diacetato de carboxifluoresceína 2 y sus derivados encuentran aplicación conocida en la coloración de células del hígado porque al entrar una esterasa celular divide el resto éster produciendo la generación de fluoresceína, que es altamente fluorescente (A. Laurent *et al.*, *Bioconjugate Chem.* 8:856 (1997)). Se ha usado también para detectar la entrada en células monobromobimano 3, que no fluoresce hasta reaccionar con un tiol. En particular, este compuesto no fluoresce hasta tomar contacto con el citoplasma celular e interactuar con glutatión, un tripéptido tiol. Así, puede usarse 3 para 35 detectar la entrada en células o los niveles de tiol intracelular en base a un aumento de fluorescencia con relación al entorno extracelular, que contiene típicamente poco o nulo tiol libre. Además, se han usado colorantes fluorescentes sustituidos con heterociclo deficientes en electrones como moléculas informadoras fluorimétricas (véase, por ejemplo, Patente de los EE.UU. N° 6.221.604).



55 Sin embargo, aunque se han usado ampliamente derivados de fluoresceína como moléculas informadoras para detectar la entrada en células, los derivados de fluoresceína conocidos padecen desventajas significativas. Por ejemplo, el uso de colorantes de fluoresceína conocidos para detectar la entrada en células requiere una separación tediosa de fluorescencia intracelular de fluorescencia extracelular y, por tanto, el uso de colorantes de fluoresceína para detectar entrada en células no es susceptible para ensayos de alta capacidad. Además, el diacetato de carboxifluoresceína 2 padece una vida media corta, que se ha atribuido a la hidrólisis de sus restos éster a pH fisiológico.

60 Se reconoce que ciertos péptidos poseen la capacidad de entrar en células así como transportar a células moléculas incorporadas. Los ejemplos de tales péptidos incluyen los derivados de proteína tat de HIV, polímeros de lisina, homeodominio de Antennapedia y Arg 9 entre otros. (Véase, por ejemplo, Patente de los EE.UU. N° 5.804.604 de Frank *et al.*, relativa al uso de derivados de proteína tat de HIV para facilitar el suministro intracelular de moléculas de carga; el documento WO 98/52614, que describe el uso de polímeros de arginina que contienen cadenas secundarias de guanidino o amidino para facilitar la entrada en células; el documento WO 79/00515, que describe el uso de polímeros de lisina de alto peso molecular para facilitar la entrada en células de moléculas objetivo; y el documento 65 WO 94/04686 (1984) y Fawell *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 91:664-668 (1994), cada uno de los cuales describe el uso de péptidos derivados de tat de HIV para promover el transporte de moléculas a través de membranas celulares). Se ha demostrado también que ciertas secuencias de peptoides facilitan el transporte intracelular (Wender *et al.*, *Proc.*

## ES 2 316 765 T3

*Natl. Acad. Sci., USA* 97:13003-13008 (2000)). Se ha informado también de que oligómeros de arginina suministran tópicamente un fármaco péptido cíclico, ciclosporina A, a células para inhibir inflamación (Rothbard *et al.*, *Nature Med.* 6:1253-7 (2000)).

5 Se han desarrollado métodos fisicoquímicos para facilitar el suministro de macromoléculas a células. Tales métodos incluyen, a título de ejemplo, electroporación, fusión a membrana con liposomas, precipitación de ADN con fosfato cálcico, transfección mediada por DEAE-dextrano, infección con ácidos nucleicos modificados y microinyección directa en células.

10 Sin embargo, a pesar de las descripciones anteriores de compuestos fluorógenos y moléculas vehículo, serían beneficiosos la identificación de nuevas moléculas fluorógenas que se transporten efectivamente a células y métodos más eficaces para identificar tales moléculas.

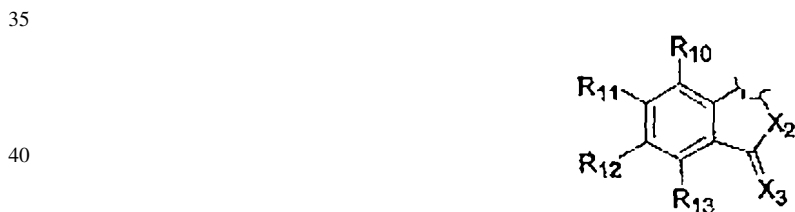
### Sumario de la invención

15 La presente invención proporciona nuevos compuestos fluorógenos y composiciones asociadas y métodos que incluyen tales compuestos. Los compuestos, composiciones y métodos proporcionados por la invención son útiles en aplicaciones que requieren una detección cuantitativa de la absorción celular de compuestos.

20 Así, en un aspecto, la presente invención proporciona nuevos compuestos fluorógenos que producen una señal detectable tras absorción por una célula. En una realización, los nuevos compuestos proporcionados por la invención tienen la estructura mostrada a continuación (4):



El sustituyente  $R_3$  es un resto espirocíclico que tiene la fórmula:



45 en la que el anillo fenilo de  $R_3$  puede orientarse por encima o por debajo de la cara del plano definido por el sistema de anillos condensados del compuesto 4.  $R_2$  y  $R_8$  tienen independientemente la estructura:



65 en las que los índices  $m$  y  $n$  son independientemente números enteros entre 0 y 5 inclusive, de tal modo que la suma  $m + n$  es igual o menor que diez.  $R_1$ ,  $R_3$ ,  $R_4$ ,  $R_6$ ,  $R_7$  y  $R_9-16$  se seleccionan independientemente del grupo constituido por hidrógeno, halo, ciano, amino, azido, aldehído, mercapto, hidroxilo, nitro y, opcionalmente sustituidos, alquilo, cicloalquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, acilo, mono o di o trialquilamonio, guanidino, carboxamido, carboxi, metila-

## ES 2 316 765 T3

5 mino, haloacetamido, hidrazido, maleimido, ceto, oxima, (mono, di, tri)halometilo, ácido hidroxámico, hidroxilamino, alcoxi, sulfato, sulfonato, fosfato, fosfonato, sulfonilo, sulfonamida, isotiocianato, halosulfonilo, carboxiazido, semi-carbazido, tiosemicarbazido, sulfonilhidrazido, carbodimida.  $X_1$ - $X_5$  pueden ser independientemente oxígeno, azufre o  $NR_{17}$ , en el que  $R_{17}$  es hidrógeno o alquilo inferior opcionalmente sustituido. Los índices m y n son independiente-

10 En algunas realizaciones, m y n se seleccionan independientemente entre números enteros de 1 a 3 inclusive. En realizaciones más particulares, m y n se seleccionan independientemente entre números enteros de 1 a 3 inclusive, y  $R_3$ - $R_6$  se seleccionan independientemente entre hidrógeno, alquilo y cicloalquilo. En realizaciones más particulares todavía, m y n se seleccionan independientemente entre números enteros de 1 a 3 inclusive, y  $R_3$ - $R_6$  se seleccionan independientemente entre hidrógeno, alquilo y cicloalquilo; y  $X_1$ - $X_7$  son cada uno oxígeno.

15 En otro aspecto todavía, la invención proporciona métodos mejorados para identificar moléculas capaces de entrar en células y, más particularmente, moléculas útiles para facilitar la entrada de otras moléculas en células, tales como colorantes fluorógenos, cuyos colorantes pueden incorporarse opcionalmente a otro compuesto tal como un compuesto terapéutico. En algunas realizaciones, los métodos para identificación de moléculas comprenden ensayos de alta capacidad para detectar la entrada de células.

20 Específicamente, la invención proporciona un método de examen de alta capacidad para identificar compuestos de una biblioteca de compuestos que son compuestos de transporte, en los que un compuesto de transporte se refiere a un compuesto que es internalizado por una célula, que comprende:

- 25 a) incorporar los compuestos individuales de una biblioteca de compuestos a una fase sólida mediante un enlace divisible, en el que cada uno de dichos compuestos individuales se incorpora directa o indirectamente a un informador fluorógeno que se hace fluorescente tras entrar en la célula, en el que el informador fluorógeno es un colorante fluorógeno como se ha definido antes;
- b) liberar de la fase sólida el conjugado informador-compuesto;
- 30 c) poner en contacto con una célula los conjugados informador-compuesto liberados; y
- d) determinar si dicho compuesto es una molécula transportadora en base a si hay un cambio de fluorescencia detectable.

35 En otras realizaciones, las moléculas a identificar son peptoides. En realizaciones más particulares, los peptoides se conjugan con un compuesto fluorógeno de la invención, de manera que puede determinarse eficazmente la absorción celular del peptoides.

40 En otro aspecto todavía, la invención proporciona un método para determinar si un compuesto es una molécula transportadora que se internaliza por una célula que comprende:

- 45 a) poner en contacto una célula con un conjugado que comprende un compuesto informador que sólo genera fluorescencia después de la entrada en la célula, cuyo informador está unido covalentemente a un compuesto de transporte potencial del que ha de examinarse su capacidad para ser internalizado por la célula contactada, y en el que el informador fluorógeno es un colorante fluorógeno como se ha definido antes;
- b) detectar si se genera fluorescencia después de dicha etapa de puesta en contacto; y
- 50 c) correlacionar la generación de fluorescencia con la internalización del compuesto de transporte por la célula.

55 Además, se proporciona una biblioteca de compuestos de la que ha de examinarse la capacidad de los compuestos para ser internalizados por una célula, comprendiendo la biblioteca una pluralidad de diferentes compuestos, en la que los diferentes compuestos de la biblioteca están incorporados covalentemente a una molécula informadora fluorógena según la invención.

60 También se proporciona un método para determinar si tal biblioteca contiene compuestos que son transportados a una célula, en el que dicho método comprende:

- a) proporcionar una biblioteca de conjugados informador-compuesto como se ha definido antes;
- b) poner en contacto los diferentes conjugados informador-compuesto con un cultivo de células; y
- 65 c) determinar si dicho cultivo de células fluoresce cuando se pone en contacto con el conjugado informador-compuesto y correlacionar la generación de fluorescencia con la internalización del compuesto por la célula.

## ES 2 316 765 T3

En otras realizaciones específicas, la presente invención incluye métodos que comprenden examinar bibliotecas de peptoides combinatorias para identificar peptoides que cruzan la membrana celular y/o peptoides que funcionan para facilitar transporte molecular, en los que los peptoides examinados están incorporados covalentemente a una molécula informadora fluorógena, y determinar si el conjugado resultante produce fluorescencia aumentada cuando se pone en contacto con una célula. Los peptoides pueden conjugarse con un compuesto fluorógeno de la invención.

Éstos y otros aspectos y ventajas se evidenciarán de la lectura de la siguiente descripción conjuntamente con los dibujos que se acompañan.

### Descripción breve de los dibujos

La Figura 1 muestra la fluorescencia de bis(4-(2'-(trimetilamino)etanoditio)-2-2-dimetilbutiril)carboxifluoresceína (compuesto 9, véanse Ejemplos) a lo largo del tiempo a pH 7,5 y 37°C en un ensayo basado en células HeLa.

La Figura 2 muestra la fluorescencia del compuesto 9 y un análogo no sustituido a lo largo del tiempo a pH 7,5, 37°C.

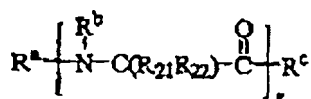
La Figura 3 muestra la fluorescencia del compuesto 9 después de 60 minutos en presencia de  $\beta$ -mercaptoetanol (" $\beta$ -ME") a pH 7,5, 37°C, con concentraciones de 0,1, 1, 10 y 100 mM de  $\beta$ -ME.

### Descripción de algunas realizaciones de la invención

#### Definiciones

##### 1.1.1. Peptoide

Un "peptoide" es una poli(amida N-sustituida), preferiblemente una poli(glicina N-sustituida), como se conoce en las técnicas de química y química bioorgánica, por ejemplo, en las Publicaciones PCT de propiedad común WO 94/06451, WO 98/06437, WO 99/08711 y las Patentes de los EE.UU. N° 5.877.278, 6.251.433, 6.197.332, 6.075.121, 5.977.301, 5.965.695, 5.877.278 y 5.831.005. En algunas realizaciones de la invención, los peptoides tienen la estructura mostrada a continuación:



5

$\text{R}^a$  y  $\text{R}^c$  se seleccionan independientemente del grupo constituido por alquilo, arilo, aralquilo, aralqueno y aralquino, cualquiera de los cuales puede estar sustituido. En algunas realizaciones,  $\text{R}^a$  y/o  $\text{R}^c$  está sustituido con un resto lípido, en el que el resto lípido puede estar conjugado a un resto enlazador.  $\text{R}^b$  se selecciona independientemente del grupo constituido por alquilo, arilo, aralquilo, aralqueno y aralquino, cualquiera de los cuales puede estar sustituido.  $\text{R}_{21}$  y  $\text{R}_{22}$  se seleccionan independientemente entre hidrógeno y alquilo inferior y alcoxi inferior opcionalmente sustituidos. El índice p es un número entero seleccionado de 2 a aproximadamente 50, más específicamente entre alrededor de 4 y aproximadamente 30, todavía más específicamente entre alrededor de 6 y aproximadamente 20 y aún más específicamente entre alrededor de 8 y aproximadamente 15. Según se usa aquí, el término "peptoide" abarca lipitoides y colesteroides, que se describen en la Sección 1.1.3 y en las Patentes de los EE.UU. de propiedad común N° 6.251.433 y 6.197.332 y en las Publicaciones PCT N° WO 99/08711 y WO 98/06437.

##### 1.1.2. Resto lípido

Un "resto lípido" es un resto hidrófobo que tiene un componente hidrocarbonado sustancial, que comprende preferiblemente un grupo seleccionado entre alquilo, alqueno o alquino  $\text{C}_{10}$ - $\text{C}_{50}$  ramificado o no ramificado, arilo, aralquilo, aralqueno o aralquino  $\text{C}_{14}$ - $\text{C}_{50}$ , o un núcleo esteroide. Los ejemplos de restos lípidos incluyen dialquil o dialquenilfosfolípidos, tales como fosfatidilcolinas, fosfatidiletanolaminas y fosfatidilinositales, glicolípidos, tales como cerebrósidos y gangliósidos, diacilglicéridos grasos, glicosilglicéridos, esfingolípidos y esteroides, incluyendo esteroides.

##### 1.1.3 Lipitoide

Un "lipitoide" es un peptoide sustituido con lípido, es decir, un compuesto descrito en la Sección 1.1.1 en el que  $\text{R}^a$  comprende un resto lípido. Un "colesteroides" es un peptoide sustituido con colesterol, es decir, un compuesto descrito en la Sección 1.1.1 en el que  $\text{R}^a$  comprende un resto colesterilo. Aunque se prefieren colesteroles en algunas aplicaciones, se encuentra una descripción adicional de esteroides útiles para incorporar a conjugados esteroide-peptoide en la publicación PCT WO 97/46223 (Fasbender *et al.*) y en la correspondiente Patente de los EE.UU. N° 5.935.936.

# ES 2 316 765 T3

## 1.1.4. Alquilo, alqueniilo, alquinilo

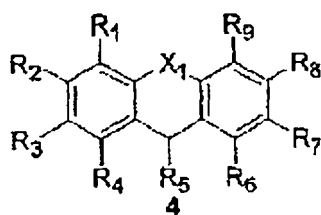
“Alquilo” se refiere a un radical monovalente acíclico totalmente saturado que contiene carbono e hidrógeno que puede ser de cadena ramificada o recta. Son ejemplos de grupos alquilo metilo, etilo, n-butilo, t-butilo, n-heptilo e isopropilo. “Alqueniilo” se refiere a un radical monovalente acíclico que contiene carbono e hidrógeno, que puede ser de cadena ramificada o recta, y que contiene al menos un doble enlace carbono-carbono. El grupo alqueniilo puede ser monoinsaturado o poliinsaturado. De modo similar, “alquinilo” se refiere a un radical tal que tiene al menos un triple enlace carbono-carbono. Alquilo (alqueniilo, alquinilo, alcoxi, etc.) “inferior” se refiere a un grupo que tiene de 1 a 6 carbonos, preferiblemente de 1 a 4 carbonos. Un grupo alquilo, alqueniilo o alquinilo puede estar sustituido opcionalmente; en algunas realizaciones, el sustituyente se selecciona del grupo constituido por halógeno, alquilo inferior, alcoxi inferior, nitro, amida, amino terciario, hidroxilo y halo(alquilo inferior).

## 1.1.5. Arilo

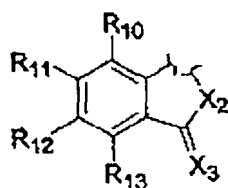
“Arilo” se refiere a un radical aromático monovalente sustituido o no sustituido que tiene un anillo simple (por ejemplo, benceno) o dos o tres anillos condensados (por ejemplo, naftilo o fenantrilo). Se prefieren generalmente grupos que tienen un anillo simple (monocíclicos) o dos anillos condensados (bicíclicos), siendo particularmente preferidos grupos monocíclicos. El término incluye grupos heteroarilo, que son grupos anillos aromáticos que tienen uno o más átomos de nitrógeno, oxígeno o azufre en el anillo, tales como furano, pirrol, piridina, imidazol e indol. Por “sustituido” se quiere decir que uno o más átomos de hidrógeno del anillo en el grupo arilo están sustituidos con un grupo no hidrógeno, seleccionado preferiblemente entre halógeno, alquilo inferior, alcoxi inferior, nitro, amida, amino terciario, hidroxilo y halo(alquilo inferior).

## Compuestos fluorógenos

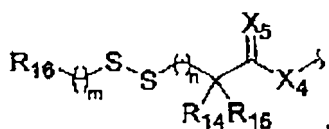
En un aspecto, la presente invención proporciona nuevos compuestos fluorógenos que tienen la estructura mostrada a continuación (4):



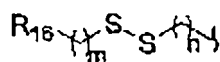
El sustituyente R<sub>5</sub> es un resto espirocíclico que tiene la fórmula:



en la que el anillo fenilo de R<sub>5</sub> puede orientarse hacia arriba o hacia abajo de la cara del plano definido por el sistema de anillos condensados del compuesto 4. R<sub>2</sub> y R<sub>4</sub> tienen independientemente la estructura:



o



en las que los índices m y n son independientemente números enteros entre 0 y 5 inclusive, de tal modo que la suma m + n es igual o menor que diez. R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub> y R<sub>9-16</sub> se seleccionan independientemente del grupo constituido por hidrógeno, halo, ciano, amino, azido, aldehído, mercapto, hidroxilo, nitro y, opcionalmente sustituidos, alquilo,

## ES 2 316 765 T3

cicloalquilo, alqueno, alquino, arilo, acilo, mono o di o trialquilamónio, guanidino, carboxamido, carboxi, metilamino, haloacetamido, hidrazido, maleimido, ceto, oxima, (mono, di, tri)halometilo, ácido hidroxámico, hidroxilamino, alcoxi, sulfato, sulfonato, fosfato, fosfonato, sulfonilo, sulfonamida, isotiocianato, halosulfonilo, carboxiazido, semicarbazido, tiosemicarbazido, sulfonilhidrazido, carbodimida.  $X_1-X_5$  pueden ser independientemente oxígeno, azufre o  $NR_{17}$ , en el que  $R_{17}$  es hidrógeno o alquilo inferior opcionalmente sustituido.

En algunas realizaciones,  $X_1$  es oxígeno. En realizaciones más particulares,  $X_1-X_3$  son oxígeno. En realizaciones todavía más particulares,  $X_1-X_5$  son oxígeno. Entre estas realizaciones en las que  $X_1-X_5$  son oxígeno, realizaciones más específicas incluyen aquellas en las que  $m$  es 2 y  $n$  es 3. La invención incluye además realizaciones en las que  $X_1-X_5$  son oxígeno,  $m$  es 2,  $n$  es 3 y  $R_{16}$  es trialquilamónio. En realizaciones más específicas,  $X_1-X_5$  son oxígeno,  $m$  es 2,  $n$  es 3,  $R_{16}$  es trialquilamónio y  $R_{14}$  y  $R_{15}$  son alquilo inferior opcionalmente sustituido. Son realizaciones aún más específicas aquellas en las que  $X_1-X_5$  son oxígeno,  $m$  es 2,  $n$  es 3,  $R_{16}$  es trialquilamónio y  $R_{14}$  y  $R_{15}$  son independientemente metilo o etilo. Otras realizaciones más específicas incluyen aquellas en las que  $X_1-X_5$  son oxígeno,  $m$  es 2,  $n$  es 3,  $R_{16}$  es trialquilamónio,  $R_{14}$  y  $R_{15}$  son independientemente metilo o etilo y  $R_3, R_4, R_6, R_7$  y  $R_{10}-R_{13}$  son hidrógeno. Entre estas últimas realizaciones, la invención proporciona una realización específica en la que  $X_1-X_5$  son oxígeno,  $m$  es 2,  $n$  es 3,  $R_{16}$  es trimetilamónio,  $R_{14}$  y  $R_{15}$  son independientemente metilo o etilo y  $R_3, R_4, R_6, R_7$  y  $R_{10}-R_{13}$  son hidrógeno. También se proporcionan realizaciones en las que  $X_1-X_5$  son oxígeno,  $m$  es 2,  $n$  es 3,  $R_{16}$  es trimetilamónio,  $R_{14}$  y  $R_{15}$  son independientemente metilo o etilo y  $R_3, R_4, R_6, R_7$  y  $R_{10}-R_{13}$  son hidrógeno o carboxilo; y, aún más específicamente,  $X_1-X_5$  son oxígeno,  $m$  es 2,  $n$  es 3,  $R_{16}$  es trimetilamónio,  $R_{14}$  y  $R_{15}$  son independientemente metilo o etilo y  $R_3, R_4, R_6, R_7$  y  $R_{10}-R_{13}$  son hidrógeno o carboxilo, y al menos uno de los  $R_{10}-R_{13}$  es carboxilo.

En otras realizaciones todavía en las que  $X_1-X_5$  son oxígeno,  $m$  es 2 y  $n$  es 3,  $R_{16}$  es dialquilamino. En realizaciones más específicas,  $X_1-X_5$  son oxígeno,  $m$  es 2,  $n$  es 3,  $R_{16}$  es dialquilamino y  $R_{14}$  y  $R_{15}$  son alquilo inferior opcionalmente sustituido. Son realizaciones más específicas todavía aquellas en las que  $X_1-X_5$  son oxígeno,  $m$  es 2,  $n$  es 3,  $R_{16}$  es dialquilamino y  $R_{14}$  y  $R_{15}$  son independientemente metilo o etilo. Otras realizaciones más específicas incluyen aquellas en las que  $X_1-X_5$  son oxígeno,  $m$  es 2,  $n$  es 3,  $R_{16}$  es dialquilamino,  $R_{14}$  y  $R_{15}$  son independientemente metilo o etilo, y  $R_3, R_4, R_6, R_7$  y  $R_{10}-R_{13}$  son hidrógeno. Entre estas últimas realizaciones, la invención proporciona una realización específica en la que  $X_1-X_5$  son oxígeno,  $m$  es 2,  $n$  es 3,  $R_{16}$  es dimetilamino,  $R_{14}$  y  $R_{15}$  son independientemente metilo o etilo, y  $R_3, R_4, R_6, R_7$  y  $R_{10}-R_{13}$  son hidrógeno. También se proporcionan realizaciones en las que  $X_1-X_5$  son oxígeno,  $m$  es 2,  $n$  es 3,  $R_{16}$  es dimetilamino,  $R_{14}$  y  $R_{15}$  son independientemente metilo o etilo, y  $R_3, R_4, R_6, R_7$  y  $R_{10}-R_{13}$  son hidrógeno o carboxilo; y, aún más específicamente,  $X_1-X_5$  son oxígeno,  $m$  es 2,  $n$  es 3,  $R_{16}$  es dimetilamino,  $R_{14}$  y  $R_{15}$  son independientemente metilo o etilo, y  $R_3, R_4, R_6, R_7$  y  $R_{10}-R_{13}$  son hidrógeno o carboxilo, y al menos uno de los  $R_{10}-R_{13}$  es carboxilo.

En otras realizaciones,  $X_1-X_5$  son oxígeno,  $m$  es 2 y  $n$  es 0. La invención incluye además realizaciones en las que  $X_1-X_5$  son oxígeno,  $m$  es 2,  $n$  es 3 y  $R_{16}$  es trialquilamónio. En realizaciones más específicas,  $X_1-X_5$  son oxígeno,  $m$  es 2,  $n$  es 0,  $R_{16}$  es trialquilamónio y  $R_{14}$  y  $R_{15}$  son alquilo inferior opcionalmente sustituido. Son realizaciones aún más específicas aquellas en las que  $X_1-X_5$  son oxígeno,  $m$  es 2,  $n$  es 0,  $R_{16}$  es trialquilamónio y  $R_{14}$  y  $R_{15}$  son independientemente metilo o etilo. Otras realizaciones más específicas incluyen aquellas en las que  $X_1-X_5$  son oxígeno,  $m$  es 2,  $n$  es 0,  $R_{16}$  es trialquilamónio,  $R_{14}$  y  $R_{15}$  son independientemente metilo o etilo y  $R_3, R_4, R_6, R_7$  y  $R_{10}-R_{13}$  son hidrógeno. Entre estas últimas realizaciones, la invención proporciona una realización específica en la que  $X_1-X_5$  son oxígeno,  $m$  es 2,  $n$  es 0,  $R_{16}$  es trimetilamónio,  $R_{14}$  y  $R_{15}$  son independientemente metilo o etilo y  $R_3, R_4, R_6, R_7$  y  $R_{10}-R_{13}$  son hidrógeno. También se proporcionan realizaciones en las que  $X_1-X_5$  son oxígeno,  $m$  es 2,  $n$  es 0,  $R_{16}$  es trimetilamónio,  $R_{14}$  y  $R_{15}$  son independientemente metilo o etilo y  $R_3, R_4, R_6, R_7$  y  $R_{10}-R_{13}$  son hidrógeno o carboxilo; y, aún más específicamente,  $X_1-X_5$  son oxígeno,  $m$  es 2,  $n$  es 0,  $R_{16}$  es trimetilamónio,  $R_{14}$  y  $R_{15}$  son independientemente metilo o etilo y  $R_3, R_4, R_6, R_7$  y  $R_{10}-R_{13}$  son hidrógeno o carboxilo, y al menos uno de los  $R_{10}-R_{13}$  es carboxilo.

En otras realizaciones todavía en las que  $X_1-X_5$  son oxígeno,  $m$  es 2,  $n$  es 0, y  $R_{16}$  es dialquilamino. En realizaciones más específicas,  $X_1-X_5$  son oxígeno,  $m$  es 2,  $n$  es 0,  $R_{16}$  es dialquilamino y  $R_{14}$  y  $R_{15}$  son alquilo inferior opcionalmente sustituido. Son realizaciones aún más específicas aquellas en las que  $X_1-X_5$  son oxígeno,  $m$  es 2,  $n$  es 0,  $R_{16}$  es dialquilamino y  $R_{14}$  y  $R_{15}$  son independientemente metilo o etilo. Otras realizaciones más específicas incluyen aquellas en las que  $X_1-X_5$  son oxígeno,  $m$  es 2,  $n$  es 0,  $R_{16}$  es dialquilamino,  $R_{14}$  y  $R_{15}$  son independientemente metilo o etilo y  $R_3, R_4, R_6, R_7$  y  $R_{10}-R_{13}$  son hidrógeno. Entre estas últimas realizaciones, la invención proporciona una realización específica en la que  $X_1-X_5$  son oxígeno,  $m$  es 2,  $n$  es 0,  $R_{16}$  es dimetilamino,  $R_{14}$  y  $R_{15}$  son independientemente metilo o etilo y  $R_3, R_4, R_6, R_7$  y  $R_{10}-R_{13}$  son hidrógeno. También se proporcionan realizaciones en las que  $X_1-X_5$  son oxígeno,  $m$  es 2,  $n$  es 0,  $R_{16}$  es dimetilamino,  $R_{14}$  y  $R_{15}$  son independientemente metilo o etilo y  $R_3, R_4, R_6, R_7$  y  $R_{10}-R_{13}$  son hidrógeno o carboxilo; y, aún más específicamente,  $X_1-X_5$  son oxígeno,  $m$  es 2,  $n$  es 0,  $R_{16}$  es dimetilamino,  $R_{14}$  y  $R_{15}$  son independientemente metilo o etilo y  $R_3, R_4, R_6, R_7$  y  $R_{10}-R_{13}$  son hidrógeno o carboxilo, y al menos uno de los  $R_{10}-R_{13}$  es carboxilo.

En otras realizaciones,  $X_1-X_3$  y  $X_5$  son oxígeno y  $X_4$  es  $NR_{17}$ . Entre estas realizaciones, realizaciones más específicas incluyen aquellas en las que  $m$  es 2 y  $n$  es 3. La invención incluye además realizaciones en las que  $X_1-X_3$  y  $X_5$  son oxígeno y  $X_4$  es  $NR_{17}$ ,  $m$  es 2,  $n$  es 3 y  $R_{16}$  es trialquilamónio. En realizaciones más específicas  $X_1-X_3$  y  $X_5$  son oxígeno y  $X_4$  es  $NR_{17}$ ,  $m$  es 2,  $n$  es 3,  $R_{16}$  es trialquilamónio y  $R_{14}$  y  $R_{15}$  son alquilo inferior opcionalmente sustituido. Son realizaciones aún más específicas aquellas en las que  $X_1-X_3$  y  $X_5$  son oxígeno y  $X_4$  es  $NR_{17}$ ,  $m$  es 2,  $n$  es 3,  $R_{16}$  es trialquilamónio y  $R_{14}$  y  $R_{15}$  son independientemente metilo o etilo. Otras realizaciones más específicas incluyen aquellas en las que  $X_1-X_3$  y  $X_5$  son oxígeno y  $X_4$  es  $NR_{17}$ ,  $m$  es 2,  $n$  es 3,  $R_{16}$  es trialquilamónio,  $R_{14}$  y  $R_{15}$  son independientemente metilo o etilo y  $R_3, R_4, R_6, R_7$  y  $R_{10}-R_{13}$  son hidrógeno. Entre estas últimas realizaciones, la

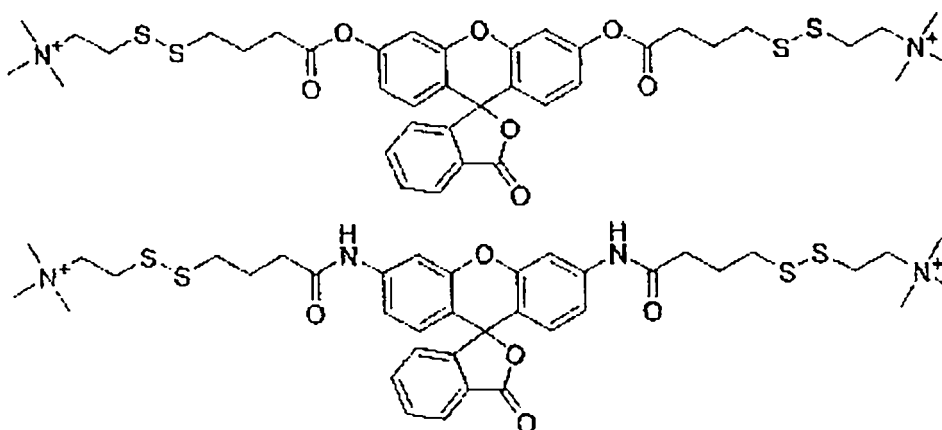
invención proporciona una realización específica en la que  $X_1-X_3$  y  $X_5$  son oxígeno y  $X_4$  es  $NR_{17}$ , m es 2, n es 3,  $R_{16}$  es trimetilamonio,  $R_{14}$  y  $R_{15}$  son independientemente metilo o etilo y  $R_3, R_4, R_6, R_7$  y  $R_{10}-R_{13}$  son hidrógeno. También se proporcionan realizaciones en las que  $X_1-X_3$  y  $X_5$  son oxígeno y  $X_4$  es  $NR_{17}$ , m es 2, n es 3,  $R_{16}$  es trimetilamonio,  $R_{14}$  y  $R_{15}$  son independientemente metilo o etilo y  $R_3, R_4, R_6, R_7$  y  $R_{10}-R_{13}$  son hidrógeno o carboxilo; y, aún más específicamente,  $X_1-X_3$  y  $X_5$  son oxígeno y  $X_4$  es  $NR_{17}$ , m es 2, n es 3,  $R_{16}$  es trimetilamonio,  $R_{14}$  y  $R_{15}$  son independientemente metilo o etilo y  $R_3, R_4, R_6, R_7$  y  $R_{10}-R_{13}$  son hidrógeno o carboxilo, y al menos uno de los  $R_{10}-R_{13}$  es carboxilo.

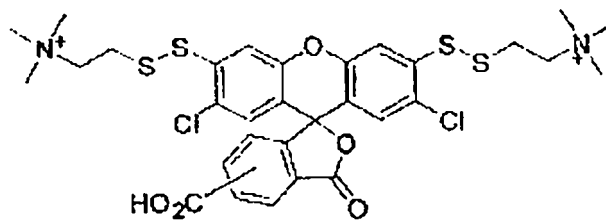
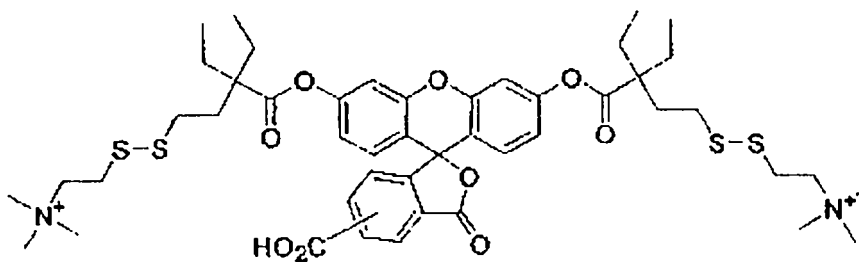
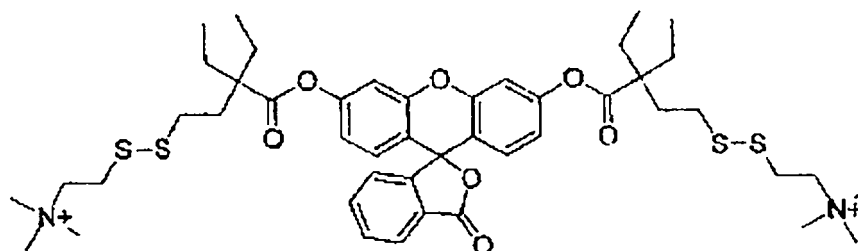
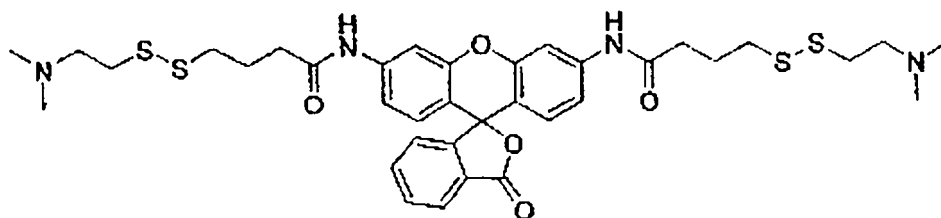
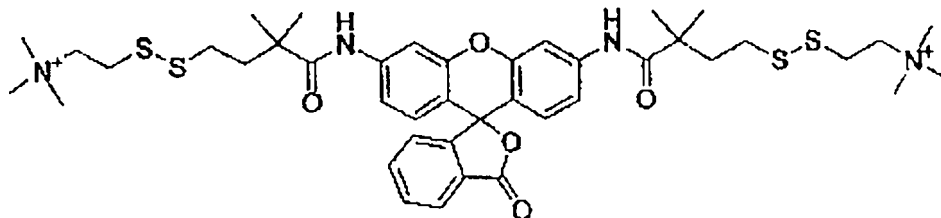
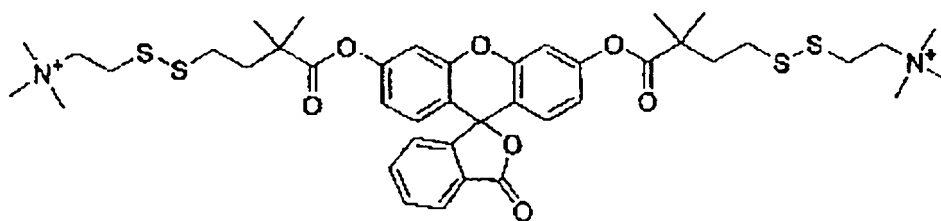
En otras realizaciones todavía en las que  $X_1-X_3$  y  $X_5$  son oxígeno y  $X_4$  es  $NR_{17}$ , m es 2 y n es 3,  $R_{16}$  es dialquilamino. En realizaciones más específicas,  $X_1-X_3$  y  $X_5$  son oxígeno y  $X_4$  es  $NR_{17}$ , m es 2, n es 3,  $R_{16}$  es dialquilamino y  $R_{14}$  y  $R_{15}$  son alquilo inferior opcionalmente sustituido. Son realizaciones aún más específicas aquellas en las que  $X_1-X_3$  y  $X_5$  son oxígeno y  $X_4$  es  $NR_{17}$ , m es 2, n es 3,  $R_{16}$  es dialquilamino y  $R_{14}$  y  $R_{15}$  son independientemente metilo o etilo. Otras realizaciones más específicas incluyen aquellas en las que  $X_1-X_3$  y  $X_5$  son oxígeno y  $X_4$  es  $NR_{17}$ , m es 2, n es 3,  $R_{16}$  es dialquilamino,  $R_{14}$  y  $R_{15}$  son independientemente metilo o etilo y  $R_3, R_4, R_6, R_7$  y  $R_{10}-R_{13}$  son hidrógeno. Entre estas últimas realizaciones, la invención proporciona una realización específica en la que  $X_1-X_3$  y  $X_5$  son oxígeno y  $X_4$  es  $NR_{17}$ , m es 2, n es 3,  $R_{16}$  es dimetilamino,  $R_{14}$  y  $R_{15}$  son independientemente metilo o etilo y  $R_3, R_4, R_6, R_7$  y  $R_{10}-R_{13}$  son hidrógeno. También se proporcionan realizaciones en las que  $X_1-X_3$  y  $X_5$  son oxígeno y  $X_4$  es  $NR_{17}$ , m es 2, n es 3,  $R_{16}$  es dimetilamino,  $R_{14}$  y  $R_{15}$  son independientemente metilo o etilo y  $R_3, R_4, R_6, R_7$  y  $R_{10}-R_{13}$  son hidrógeno o carboxilo; y, aún más específicamente,  $X_1-X_3$  y  $X_5$  son oxígeno y  $X_4$  es  $NR_{17}$ , m es 2, n es 3,  $R_{16}$  es dimetilamino,  $R_{14}$  y  $R_{15}$  son independientemente metilo o etilo y  $R_3, R_4, R_6, R_7$  y  $R_{10}-R_{13}$  son hidrógeno o carboxilo, y al menos uno de los  $R_{10}-R_{13}$  es carboxilo.

En otras realizaciones,  $X_1-X_3$  y  $X_5$  son oxígeno y  $X_4$  es  $NR_{17}$ , m es 2 y n es 0. La invención incluye además realizaciones en las que  $X_1-X_3$  y  $X_5$  son oxígeno y  $X_4$  es  $NR_{17}$ , m es 2, n es 3 y  $R_{16}$  es trialquilamonio. En realizaciones más específicas,  $X_1-X_3$  y  $X_5$  son oxígeno y  $X_4$  es  $NR_{17}$ , m es 2, n es 0,  $R_{16}$  es trialquilamonio y  $R_{14}$  y  $R_{15}$  son alquilo inferior opcionalmente sustituido. Son realizaciones todavía más específicas aquellas en las que  $X_1-X_3$  y  $X_5$  son oxígeno y  $X_4$  es  $NR_{17}$ , m es 2, n es 0,  $R_{16}$  es trialquilamonio y  $R_{14}$  y  $R_{15}$  son independientemente metilo o etilo. Otras realizaciones más específicas incluyen aquellas en las que  $X_1-X_3$  y  $X_5$  son oxígeno y  $X_4$  es  $NR_{17}$ , m es 2, n es 0,  $R_{16}$  es trialquilamonio,  $R_{14}$  y  $R_{15}$  son independientemente metilo o etilo y  $R_3, R_4, R_6, R_7$  y  $R_{10}-R_{13}$  son hidrógeno. Entre estas últimas realizaciones, la invención proporciona una realización específica en la que  $X_1-X_3$  y  $X_5$  son oxígeno y  $X_4$  es  $NR_{17}$ , m es 2, n es 0,  $R_{16}$  es trimetilamonio,  $R_{14}$  y  $R_{15}$  son independientemente metilo o etilo y  $R_3, R_4, R_6, R_7$  y  $R_{10}-R_{13}$  son hidrógeno. También se proporcionan realizaciones en las que  $X_1-X_3$  y  $X_5$  son oxígeno y  $X_4$  es  $NR_{17}$ , m es 2, n es 0,  $R_{16}$  es trimetilamonio,  $R_{14}$  y  $R_{15}$  son independientemente metilo o etilo y  $R_3, R_4, R_6, R_7$  y  $R_{10}-R_{13}$  son hidrógeno o carboxilo; y, aún más específicamente,  $X_1-X_3$  y  $X_5$  son oxígeno y  $X_4$  es  $NR_{17}$ , m es 2, n es 0,  $R_{16}$  es trimetilamonio,  $R_{14}$  y  $R_{15}$  son independientemente metilo o etilo y  $R_3, R_4, R_6, R_7$  y  $R_{10}-R_{13}$  son hidrógeno o carboxilo, y al menos uno de los  $R_{10}-R_{13}$  es carboxilo.

En otras realizaciones todavía en las que  $X_1-X_3$  y  $X_5$  son oxígeno y  $X_4$  es  $NR_{17}$ , m es 2, n es 0 y  $R_{16}$  es dialquilamino. En realizaciones más específicas,  $X_1-X_3$  y  $X_5$  son oxígeno y  $X_4$  es  $NR_{17}$ , m es 2, n es 0,  $R_{16}$  es dialquilamino y  $R_{14}$  y  $R_{15}$  son alquilo inferior opcionalmente sustituido. Son realizaciones aún más específicas aquellas en las que  $X_1-X_3$  y  $X_5$  son oxígeno y  $X_4$  es  $NR_{17}$ , m es 2, n es 0,  $R_{16}$  es dialquilamino y  $R_{14}$  y  $R_{15}$  son independientemente metilo o etilo. Otras realizaciones más específicas incluyen aquellas en las que  $X_1-X_3$  y  $X_5$  son oxígeno y  $X_4$  es  $NR_{17}$ , m es 2, n es 0,  $R_{16}$  es dialquilamino,  $R_{14}$  y  $R_{15}$  son independientemente metilo o etilo y  $R_3, R_4, R_6, R_7$  y  $R_{10}-R_{13}$  son hidrógeno. Entre estas últimas realizaciones, la invención proporciona una realización específica en la que  $X_1-X_3$  y  $X_5$  son oxígeno y  $X_4$  es  $NR_{17}$ , m es 2, n es 0,  $R_{16}$  es dimetilamino,  $R_{14}$  y  $R_{15}$  son independientemente metilo o etilo y  $R_3, R_4, R_6, R_7$  y  $R_{10}-R_{13}$  son hidrógeno. También se proporcionan realizaciones en las que  $X_1-X_3$  y  $X_5$  son oxígeno y  $X_4$  es  $NR_{17}$ , m es 2, n es 0,  $R_{16}$  es dimetilamino,  $R_{14}$  y  $R_{15}$  son independientemente metilo o etilo y  $R_3, R_4, R_6, R_7$  y  $R_{10}-R_{13}$  son hidrógeno o carboxilo; y, aún más específicamente,  $X_1-X_3$  y  $X_5$  son oxígeno y  $X_4$  es  $NR_{17}$ , m es 2, n es 0,  $R_{16}$  es dimetilamino,  $R_{14}$  y  $R_{15}$  son independientemente metilo o etilo y  $R_3, R_4, R_6, R_7$  y  $R_{10}-R_{13}$  son hidrógeno o carboxilo, y al menos uno de los  $R_{10}-R_{13}$  es carboxilo.

Los ejemplos particulares de las realizaciones descritas antes incluyen los siguientes compuestos:





5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

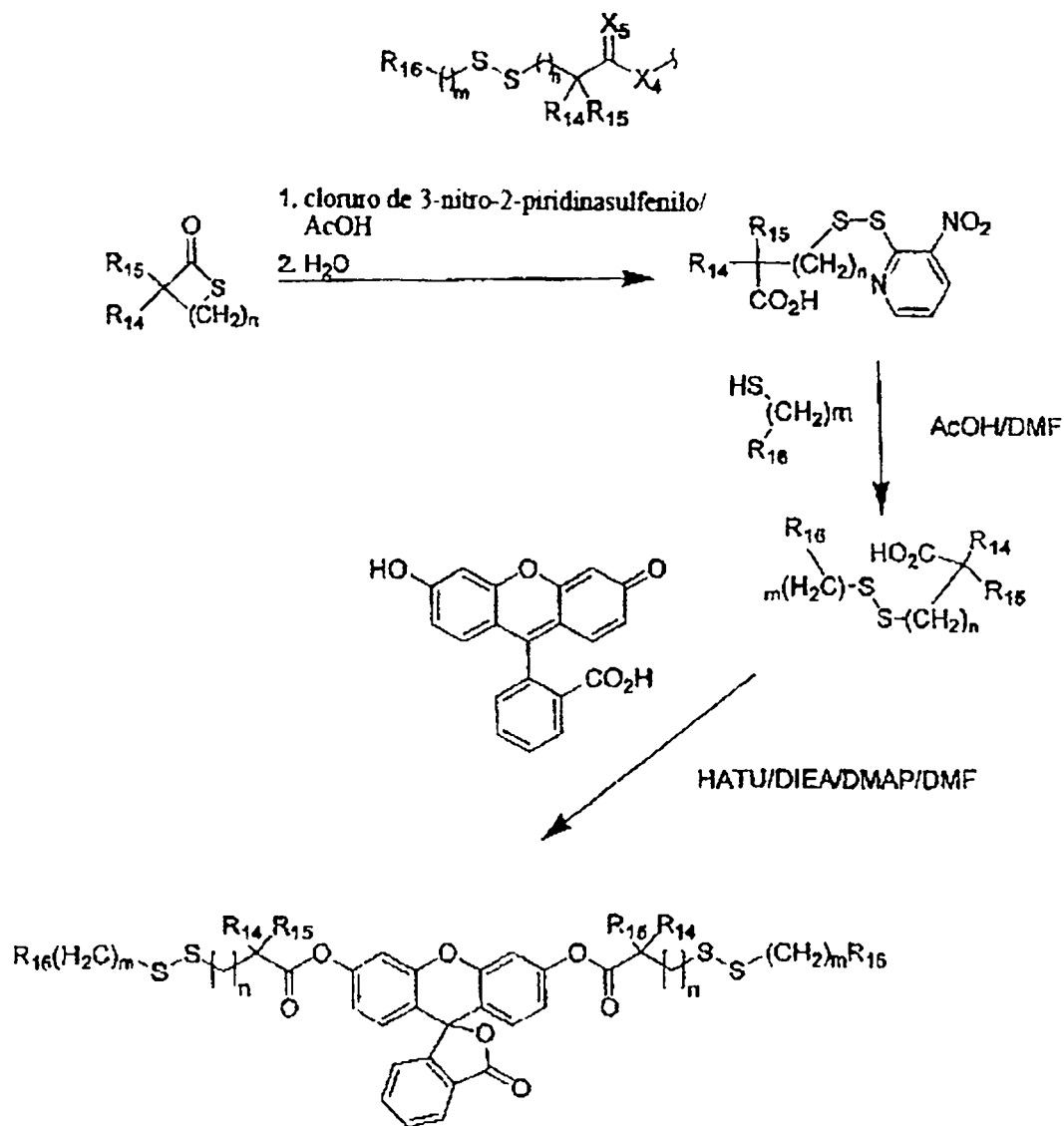
60

65

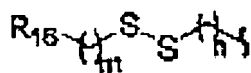
# ES 2 316 765 T3

Los compuestos de la invención pueden sintetizarse usando procedimientos y materiales conocidos por los que tienen experiencia en las técnicas de síntesis de química orgánica, como se muestran en general en los siguientes Esquemas y se ilustran en los Ejemplos. El siguiente Esquema 1 ilustra la metodología de síntesis general para compuestos en los que  $R_2$  y  $R_8$  son:

Esquema 1

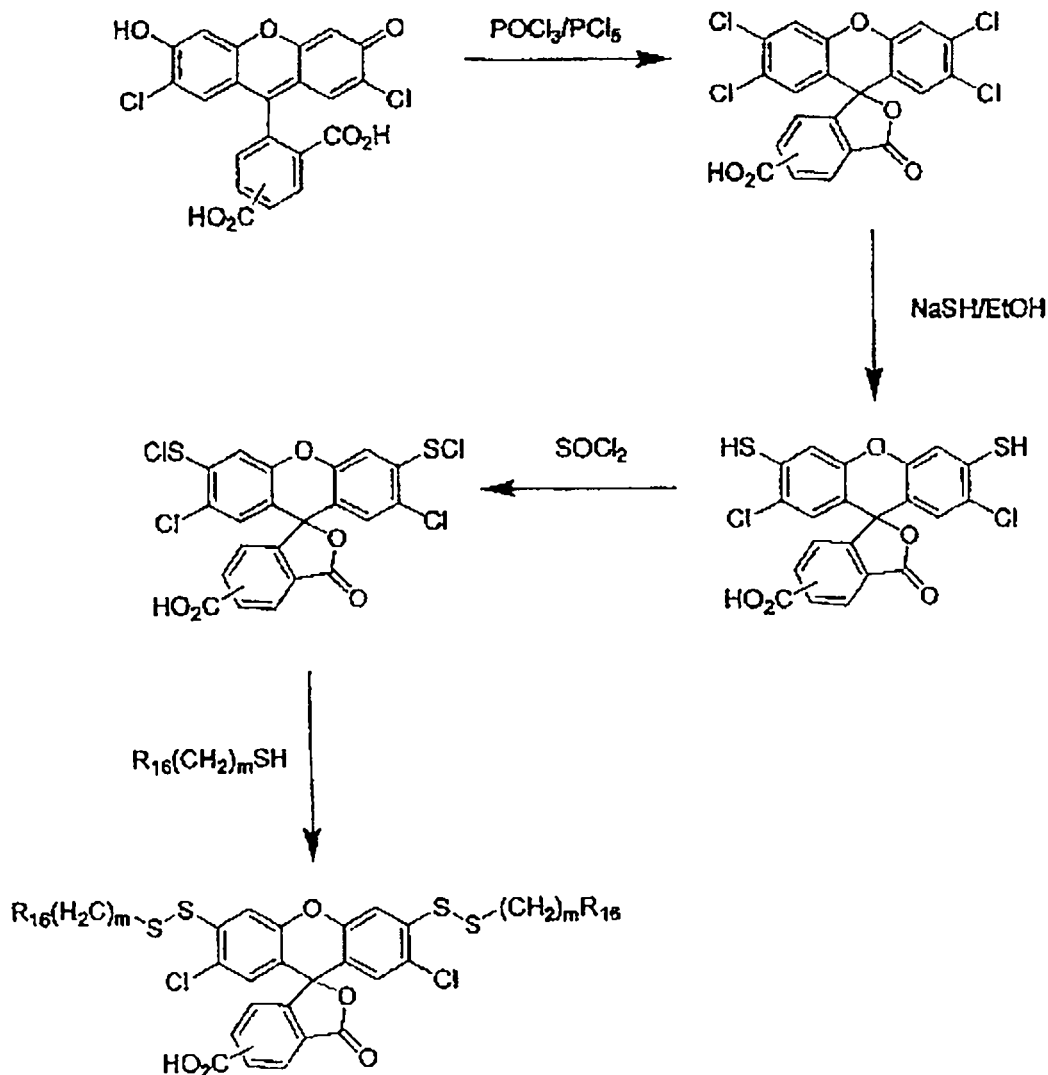


Se proporciona seguidamente una metodología de síntesis general (Esquema 2) para realizaciones de la invención en las que  $R_2$  y  $R_8$  son:



# ES 2 316 765 T3

Esquema 2



## 45 *Detección y cuantificación de absorción de células*

En otro aspecto, los compuestos de la invención son útiles como informadores para detectar la entrada en células por compuestos específicos. Más específicamente, la incorporación de un compuesto de la invención a otra molécula permite la detección y cuantificación del transporte de la molécula a través de una membrana celular. En una realización, el compuesto de la invención se incorpora a una molécula a ensayar usando un grupo funcional contenido en el compuesto fluorógeno de la invención, tal como, aunque sin limitarse a él, un grupo ácido carboxílico situado en el anillo aromático inferior del compuesto fluoróforo. Otros grupos funcionales apropiados que pueden usarse en lugar de un ácido carboxílico incluyen a modo de ejemplo amino, aminometilo, halometilo, haloacetamido, mercapto, maleimido, hidrazido, oxima, aldehído y ceto. La elección del grupo funcional será familiar para los que tengan experiencia en las técnicas de síntesis orgánica y bioquímica. Los compuestos a examinar por su capacidad para facilitar la entrada en células por el informador fluorógeno de la invención incluirán un grupo funcional que sea reactivo adecuadamente con el grupo funcional del informador fluorógeno. Los ejemplos de compuestos que pueden examinarse para entrada en células con un fluoróforo según la invención incluyen, aunque sin limitarse a ellos, péptidos, peptoides, proteínas, hidratos de carbono, ácidos nucleicos, hidratos de carbono, pequeñas moléculas y bibliotecas que contengan tales compuestos, bibliotecas aleatorias y no aleatorias.

Pueden usarse también elementos enlazadores para facilitar la incorporación a la molécula de ensayo. En algunos casos puede ser beneficioso incorporar también un enlazador divisible, por ejemplo, un enlace disulfuro o éster entre la molécula informadora y el grupo transportador para permitir al colorante fluorescente resultante salir de la célula al medio circundante. La fluorescencia se detecta por fluorimetría u otros métodos, según sea apropiado. La elección del enlazador será familiar para los que tengan experiencia en las técnicas de síntesis orgánica y bioquímica.

## ES 2 316 765 T3

En una realización, el informador sujeto se usa para examinar bibliotecas de peptoides combinatorias que contienen moléculas transportadoras a células potenciales. Tales bibliotecas y métodos para su síntesis se han discutido antes con detalle. En realizaciones más específicas, las moléculas informadoras fluorógenas de la invención se usan para examinar bibliotecas por metodologías de examen de alta capacidad para identificar moléculas de transporte que faciliten la entrada en células de moléculas activas biológicamente, por ejemplo, agonistas o antagonistas de enzimas, antibióticos, agonistas o antagonistas de hormonas, moduladores de la expresión de genes y similares. La molécula de transporte puede incluir además una molécula de “carga” que ha de transportarse por el peptoide al medio intracelular.

En una realización, se sintetizan diversas bibliotecas combinatorias de peptoides en una resina en fase sólida, por ejemplo, una perla de resina, de tal modo que se incorpore un compuesto a cada perla. El informador de la invención se conjuga después con el compuesto peptoide en cada perla. En algunas realizaciones, los peptoides incluirán además una molécula de “carga” que ha de transportarse por el peptoide al medio intracelular. Los ejemplos de moléculas de carga incluyen, aunque sin limitarse a ellas, antibióticos, agonistas o antagonistas de enzimas, análogos de hormonas, agentes promotores del crecimiento de células, agentes inhibidores del crecimiento de células, agentes anti-tumores y agentes inductores de apoptosis. Después de la incorporación, el informador putativo-molécula de transporte se divide de la perla de resina y se examina en un ensayo basado en células para determinar si se ha conseguido la entrada en células (en base a la generación de fluorescencia por el compuesto de la invención). Alternativamente, el informador fluorógeno de la invención puede incorporarse a la molécula de transporte putativa (por ejemplo, el peptoide) en solución después de la división de la perla de resina.

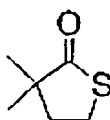
El sistema informador proporcionado por la presente invención es susceptible a cualquier célula en la que haya de examinarse la entrada por compuestos deseados. Los ejemplos de tales células incluyen, a modo de ejemplo no limitativo, células procariotas, células eucariotas, células de mamífero y células de plantas. Los ejemplos más específicos de tipos de células incluyen: fibroblastos, células epiteliales, células neurales, células intestinales, células estaminales embrionarias y de adulto, células de ovario, células de hígado, células de próstata, células de riñón, células de vejiga, células de sangre, células de levadura, células de bacterias y células inmunes. Los ejemplos de linajes celulares de mamífero humano y no humano incluye, aunque sin limitarse a ellos: HeLa, COS, CHO, BHK, Vero, SP2/0, DG44, HT1080, NIH3T3, THP-1 y NR833.

El conjugado de informador-molécula transportadora según la invención puede añadirse a un cultivo de células, por ejemplo, un cultivo de células HeLa, y medirse los niveles de fluorescencia del cultivo de células para identificar si el compuesto transportador putativo facilita la entrada en células (en base a un aumento de fluorescencia). Esto puede conseguirse por adición a cultivos de células de micropocillos, por ejemplo, un formato de 96 o 384 pocillos o en platinas. La fluorescencia se observará sólo en cultivos de células cuando el compuesto de transporte putativo haya entrado en las células.

### Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar ciertos aspectos de la presente invención y para ayudar a los expertos en la técnica a poner en práctica la invención.

#### *Síntesis de $\alpha,\alpha$ -dimetil- $\gamma$ -tiobutirrolactona*



5

Se añadió potasio bis(trimetilsilil)amida (4,62 g, 22 mmoles) a 100 ml de THF anhidro bajo argón (“Ar”) con agitación. La mezcla de reacción se enfrió a  $-78^{\circ}\text{C}$  y se añadió gota a gota  $\gamma$ -tiobutirrolactona (10 mmoles, 0,87 ml) seguida por yoduro de metilo (40 mmoles, 2,49 ml), y se dejó calentarse gradualmente la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente mientras se agitaba durante la noche. El disolvente se separó por evaporación con una corriente de  $\text{N}_2$  y el residuo se sacudió con  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  acuoso al 5% y EtOAc. La capa acuosa se separó y extrajo con EtOAc (2x). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con  $\text{NaHSO}_4$  1 N y la capa acuosa se separó y extrajo con EtOAc (2x). Las capas orgánicas se recombinaron, se secaron sobre  $\text{MgSO}_4$ , se filtraron y se concentraron. La purificación por cromatografía en gel de sílice (2,5% de EtOAc en hexanos) dio la tiobutirrolactona dimetilada (370 mg, rendimiento 28%).  $\text{MH}^+ = 131,2$ .

## ES 2 316 765 T3

### Cloruro de 3-nitro-2-piridinasulfenilo

5



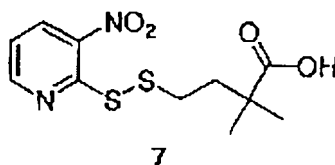
10

Este compuesto se preparó según un procedimiento de la bibliografía: Pugh *et al.*, *Int. J. Peptide Prot. Res.* 1993, 42, 159. El rendimiento global fue 71%.

15

### Ácido 4-(3'-nitro-2'-piridinaditio)-2,2-dimetilbutírico

20



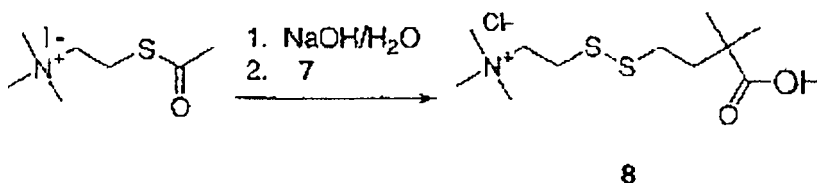
25

Se añadieron 12 ml de ácido acético ("HOAc") a la tiobutirrolactona 5 (349 mg, 2,68 mmoles) bajo Ar, seguido por adición gota a gota (16 ml/h) de una solución de HOAc (55 ml) que contenía el cloruro de sulfenilo 6 (664 mg, 3,48 mmoles). La solución se agitó durante la noche seguido por adición de agua en exceso y agitación durante 1 h. La mezcla de reacción se concentró, se co-evaporó con MeOH (3x), se resuspendió en MeOH y se filtró (enjuague con MeOH). Los filtrados de MeOH se concentraron y purificaron por cromatografía en gel de sílice (1% de MeOH/0,2% de HOAc en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). Las fracciones deseadas se agruparon, el disolvente se separó bajo vacío y el residuo se co-evaporó con MeOH/MePh (3x) para proporcionar el producto deseado 7 como un sólido amarillo (345 mg, rendimiento 43%). MH<sup>+</sup> = 303,4.

35

### Ácido 4-(2'-(trimetilamino)etanoditio)-2,2-dimetilbutírico

40



45

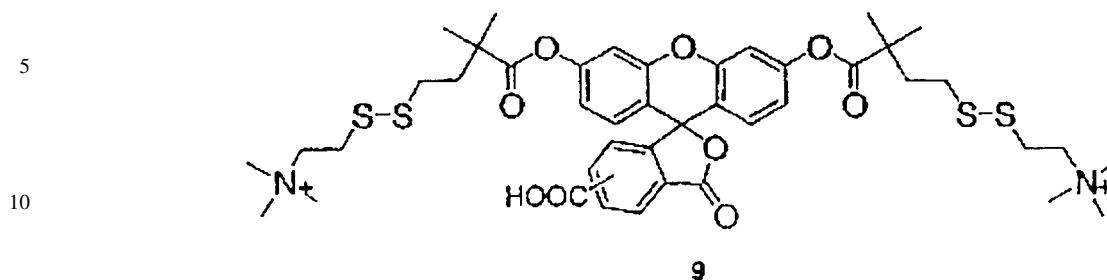
Se añadió yoduro de S-acetilcolina (100,5 g, 0,348 moles) a NaOH 1 N (600 ml) que se había burbujeado con Ar. Se añadió NaOH 6 N (102 ml) adicional para ajustar el pH en ~ 14. Después de agitar durante la noche, se enfrió la reacción en un baño de hielo y se apagó por adición cuidadosa de HCl concentrado (100 ml) bajo Ar. La solución se concentró, se co-evaporó con MeOH (3x) y se secó bajo alto vacío durante varios días para dar el producto tiol (152,4 g que contenían 2,28 mmoles/g de tiocolina suponiendo rendimiento 100%). A una solución en AcOH (10 ml) de 7 (333 mg, 1,1 mmoles) se añadió una solución en AcOH (10 ml) de la tiocolina cruda (1 g, 2,28 mmoles) seguido por un enjuague con 20 ml de DMF para completar la transferencia. Después de agitar durante la noche, se concentró la reacción y se co-evaporó inicialmente con MeCN (precaución: ebullición intermitente) y después con MeOH. El residuo se redisolvió en MeCN/H<sub>2</sub>O (20 ml), se filtró y se purificó por HPLC de escala preparativa (columna C18 de fase inversa; fases móviles: 0,1% de TFA/H<sub>2</sub>O y 0,1% de TFA/MeCN). Las fracciones deseadas se liofilizaron, y se liofilizaron después 2x de HCl 1,2 N y 1x de H<sub>2</sub>O para dar el producto 8 deseado (79 mg, rendimiento 24%). M<sup>+</sup> = 266,5.

60

65

ES 2 316 765 T3

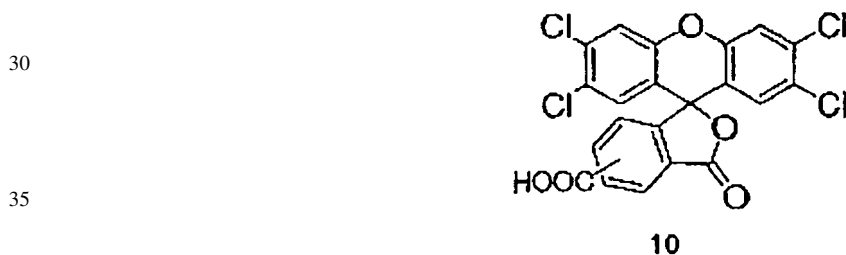
*Bis(4-(2'-(trimetilamino)etanoditio)-2,2-dimetilbutiril) carboxifluoresceína*



15 Se añadió DMF (0,1 ml) a un matraz secado en horno que contenía el ácido 8 (4,5 mg, 15  $\mu$ moles, 3 eq) y HATU (11,4 mg, 30  $\mu$ moles, 6 eq) seguido por adición de diisopropiletilamina (5,2  $\mu$ l, 30  $\mu$ moles, 6 eq). Después de agitar durante 0,5 h, se añadió fluoresceína (1,7 mg, 5  $\mu$ moles, 1 eq) seguida por 4-(dimetilamino)piridina (1,8 mg, 15  $\mu$ moles, 3 eq). Se añadió DMF adicional (0,2 ml) después de 1 h y se agitó la reacción durante la noche. Se realizó una

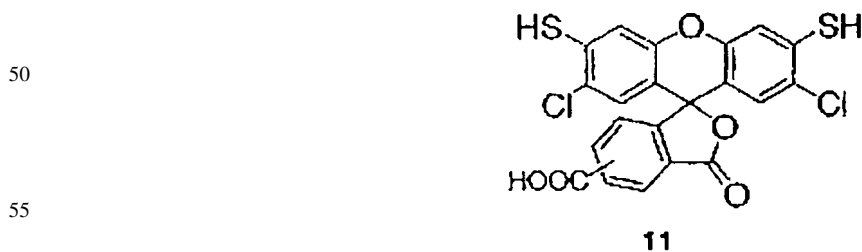
20 segunda reacción a la misma escala que la primera, pero en la que se sustituyó la DMF con dimetilacetamida como disolvente. Se permitió transcurrir ambas reacciones durante unos pocos días (con adición continua de disolvente) y se trataron después secuencialmente con 0,1% de TFA (0,5 ml) seguido por TFA puro (0,02 ml). Las mezclas crudas se combinaron, solubilizaron en DMF, filtraron y purificaron por HPLC preparativa (columna C18 de fase inversa; fases móviles 0,1% de TFA/H<sub>2</sub>O y 0,1% de TFA/MeCN) para dar el producto deseado 9 (2,4 mg, rendimiento 23%). (M/2)<sup>2+</sup> = 414,5.

25 *5(6)-Carboxi-2',3',6',7'-tetraclorofluoresceína*



40 Se añadieron POCl<sub>3</sub> (5 ml) y PCl<sub>5</sub> (500 mg) con agitación a 5(6)-carboxi-2',7'-diclorofluoresceína (50 mg, 112  $\mu$ moles). La mezcla de reacción se calentó a 115°C durante 1 h, y se dejó después enfriarse a temperatura ambiente. El disolvente se separó bajo vacío y el residuo se co-evaporó tres veces con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Se añadió al residuo agua con agitación a 0°C. Se filtró la mezcla y se lavó después el sólido con agua y se secó al aire. El sólido se co-evaporó dos veces en cianonitrilo (CH<sub>3</sub>CN) para producir 52 mg (96%) del compuesto del título como un sólido blanco. La identidad del producto se verificó por MS de electropulverización (MH<sup>+</sup> = 483).

45 *5(6)-Carboxi-2',7'-dicloro-3',6'-ditiofluoresceína*

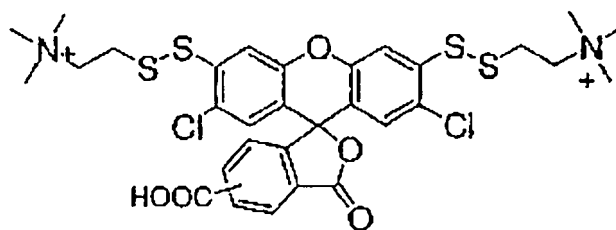


60 Se añadieron al compuesto 10 (52 mg, 108  $\mu$ moles) 5 ml de EtOH y NaSH•xH<sub>2</sub>O (235 mg, 1,08 mmoles) con agitación, y la mezcla se calentó a reflujo durante 90 min. Se dejó enfriarse la mezcla de reacción a temperatura ambiente y se evaporó el disolvente con una corriente de nitrógeno. Se añadió al residuo ácido clorhídrico (HCl) 0,1 N que contenía 5% de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> con agitación, y se filtró la mezcla. El sólido se lavó con HCl 0,1 N y se secó al aire para proporcionar el compuesto del título como un sólido beige. La identidad del producto se verificó por MS de electropulverización (MH<sup>+</sup> = 477/479).

65

## ES 2 316 765 T3

5(6)-Carboxi-2',7'-dicloro-3',6'-bis(2''-trimetilamonio(etanoditio))fluoresceína



12

El compuesto 11 se disolvió en  $\text{SO}_2\text{Cl}_2$  (4 ml) y  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (4 ml) con agitación y se calentó a reflujo durante 1 h. La reacción se enfrió a temperatura ambiente, el disolvente se separó bajo vacío y el residuo se co-evaporó tres veces con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . El residuo se disolvió en 5 ml de AcOH, se añadió con agitación tiocolina (sal de ácido trifluoroacético, 111 mg, 477  $\mu\text{moles}$ ) y la mezcla se calentó a reflujo durante 2 h. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se purificó después por HPLC de fase inversa para proporcionar el compuesto del título. La identidad del producto se verificó por MS de electropulverización ( $M/2^{2+} = 357$ ).

*Demostración de que el informador según la invención es fluorescente selectivamente en condiciones reductoras*

Se realizó un experimento para determinar el efecto de condiciones reductoras frente a condiciones no reductoras en un compuesto informador según la invención (compuesto 9). Se realizaron dos incubaciones con el compuesto 9 en una concentración de 50 mM. Se realizó una incubación testigo que comparaba la misma concentración molar del compuesto 9 en fosfato de Na 10 mM a pH 7,5. Se hizo una composición de reacción reductora que comprendía el mismo tampón y ditioneol (DTT) 10 mM. Después de un minuto de incubación a temperatura ambiente, se midió una fuerte fluorescencia verde. En consecuencia con estos resultados de fluorescencia, el análisis de espectrometría de masas reveló que la reacción testigo contenía sólo compuesto 9, y que la composición de reacción que contenía DTT contenía sólo fluoresceína. Para este ejemplo, se realizó la síntesis del compuesto como se ha descrito previamente.

*Fluorescencia de 9 a lo largo del tiempo, pH 7,5, 37°C*

La Figura 1 contiene la fluorescencia (excitación 485 nm, emisión 535 nm) del compuesto 9 a lo largo del tiempo en diversas condiciones. Para las condiciones marcadas "optimem" (círculo rojo completo), se incubó 9 en Optimem (Gibco BRL), un medio de cultivo de células de suero reducido. Para las condiciones marcadas "lisado de células" (cuadrado verde completo), se incubó 9 en un lisado de células HeLa preparado a partir de  $2 \times 10^6$  células lisadas por congelación/descongelación en un tampón que contenía Tris-HCl 20 mM, NaCl 137 mM, 1% de Triton y 15% de glicerol en un volumen de 100  $\mu\text{l}$ . Para las condiciones marcadas "tampón + sal" (triángulo marrón completo), se incubó 9 en fosfato de Na 10 mM que contenía NaCl 154 mM, y para las condiciones marcadas " $\beta$ -ME 10 mM" (diamante naranja completo), se incubó 9 en fosfato de Na 10 mM que contenía NaCl 154 mM y  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM. La concentración de 9 fue 50  $\mu\text{M}$  en cada caso, diluido desde una solución madre 2 mM en DMF. Todos los experimentos se realizaron a 37°C, y a un pH de 7,5, excepto "lisado de células" para el que el pH fue aproximadamente 7,8. El volumen total de cada incubación fue 100  $\mu\text{l}$ . Los resultados se expresan como porcentaje de la fluorescencia de un testigo de fluoresceína en la misma concentración y en las mismas condiciones.

*Fluorescencia de 9 y análogo no sustituido a lo largo del tiempo, pH 7,5, 37°C*

La Figura 2 muestra la fluorescencia (excitación 485 nm, emisión 535 nm) a lo largo del tiempo del compuesto 9 y un análogo en el que los sustituyentes  $\alpha,\alpha$ -dimetilo en los grupos acilo se han reemplazado por sustituyentes  $\alpha,\alpha$ -dihidrógeno. Cada compuesto se incubó con una concentración de 50  $\mu\text{M}$  (diluido desde una solución madre 2 mM en DMF) en fosfato de Na 10 mM, pH 7,5, que contenía NaCl 154 mM, a 37°C. El volumen de cada incubación fue 100  $\mu\text{l}$ . Los resultados se expresan como porcentaje de la fluorescencia de un testigo de fluoresceína en la misma concentración y en las mismas condiciones.

*Fluorescencia de 9 en 60 minutos frente a [ $\beta$ -ME] (pH 7,5, 37°C)*

La Figura 3 muestra la fluorescencia (excitación 485 nm, emisión 535 nm) del compuesto 9 después de una incubación de 60 minutos en fosfato de Na 10 mM, pH 7,5, que contenía NaCl 154 mM y  $\beta$ -mercaptoetanol con concentraciones de 0,1, 1, 10 y 100 mM. El volumen de cada incubación fue 100  $\mu\text{l}$  y la temperatura fue 37°C. Los resultados se expresan como porcentaje de la fluorescencia de un testigo de fluoresceína en la misma concentración y en las mismas condiciones.

## ES 2 316 765 T3

### *Fluorescencia de 12*

Se realizó un experimento para ensayar la capacidad del compuesto 12 para responder a condiciones reductoras. Se efectuaron dos incubaciones: en la primera, una incubación testigo, se añadió una muestra de compuesto 12 a tampón de pH 7,5. En una segunda incubación (+DTT), se añadió la misma cantidad de compuesto 12 a tampón de pH 7,5 y se añadió después DTT hasta una concentración final de 10 mM. En un minuto tras la adición de DTT a la segunda incubación, la solución se volvió azul clara, indicando la formación del colorante de dicloroditiofluoresceína libre. La incubación testigo permaneció incolora.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

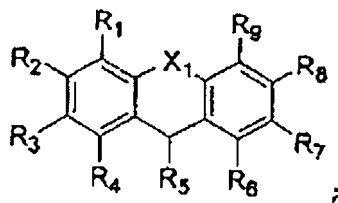
60

65

REIVINDICACIONES

1. Un colorante fluorógeno que tiene la estructura

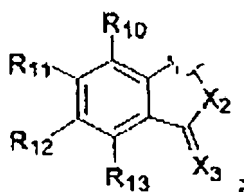
5



10

15 en la que R<sub>5</sub> es un resto espirocíclico que tiene la fórmula:

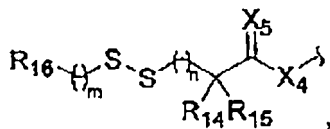
20



25 en la que el anillo fenilo de R<sub>5</sub> está orientado por encima o por debajo de la cara del plano definido por el sistema de anillos condensados del compuesto;

en la que R<sub>2</sub> y R<sub>8</sub> tienen independientemente la estructura:

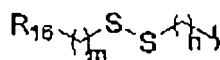
30



35

o

40



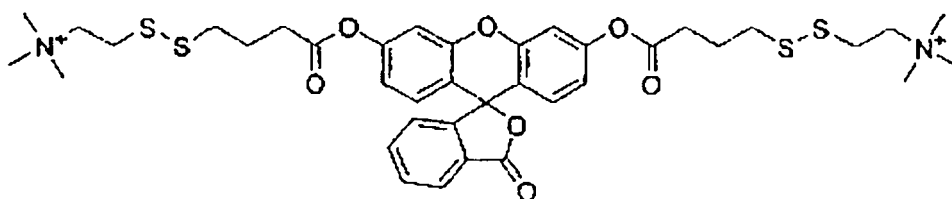
45 en la que los índices m y n son independientemente números enteros entre 0 y 5 inclusive, de tal modo que la suma m + n es igual o menor que diez;

50 en la que R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub> y R<sub>9-16</sub> se seleccionan independientemente del grupo constituido por hidrógeno, halo, ciano, amino, azido, aldehído, mercapto, hidroxilo, nitro y, opcionalmente sustituidos, alquilo, cicloalquilo, alquenoilo, alquinilo, arilo, acilo, mono o di o trialquilamonio, guanidino, carboxamido, carboxi, metilamino, haloacetamido, hidrazido, maleimido, ceto, oxima, (mono, di, tri)halometilo, ácido hidroxámico, hidroxilamino, alcoxi, sulfato, sulfonato, fosfato, fosfonato, sulfonilo, sulfonamida, isotiocianato, halosulfonilo, carboxiazido, semicarbazido, tiosemicarbazido, sulfonilhidrazido, carbodimida; y

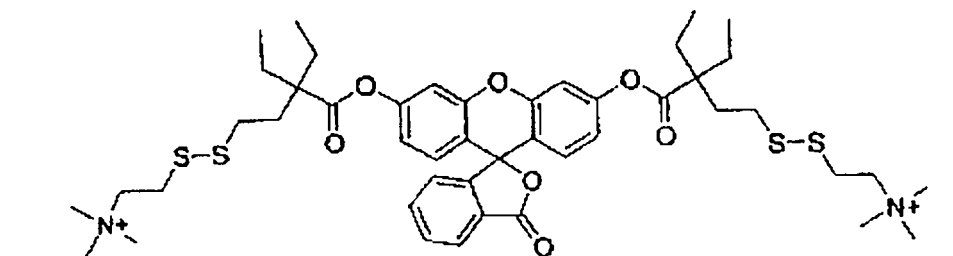
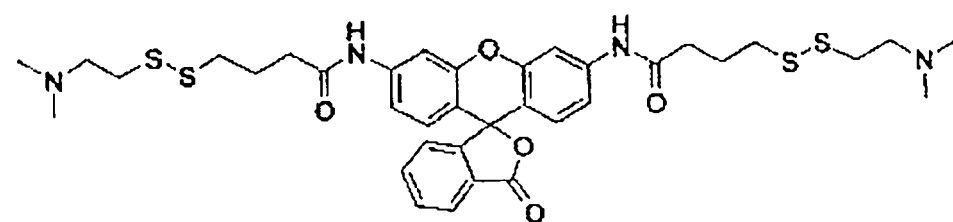
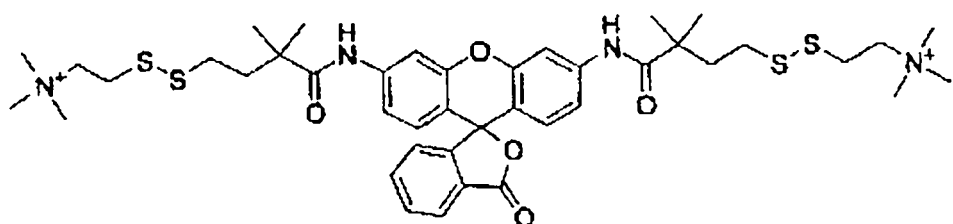
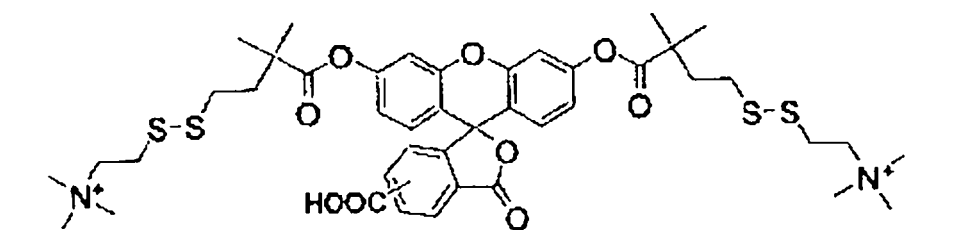
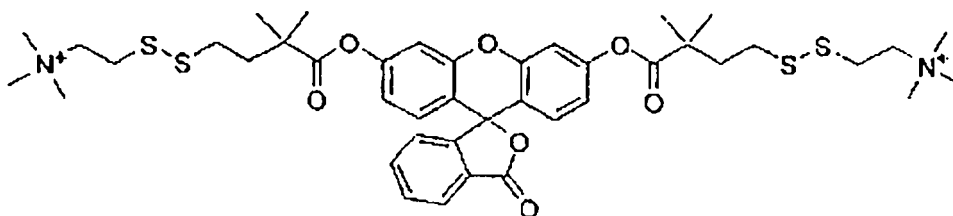
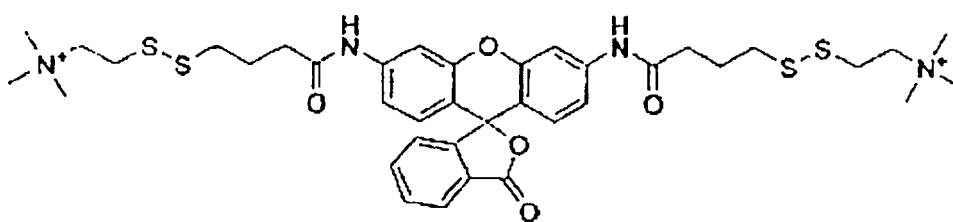
55 en la que X<sub>1</sub>-X<sub>5</sub> se seleccionan independientemente del grupo constituido por oxígeno, azufre y NR<sub>17</sub>, en el que R<sub>17</sub> es hidrógeno o alquilo inferior opcionalmente sustituido.

2. El colorante fluorógeno de la reivindicación 1<sup>a</sup>, en el que la estructura se selecciona del grupo constituido por.

60

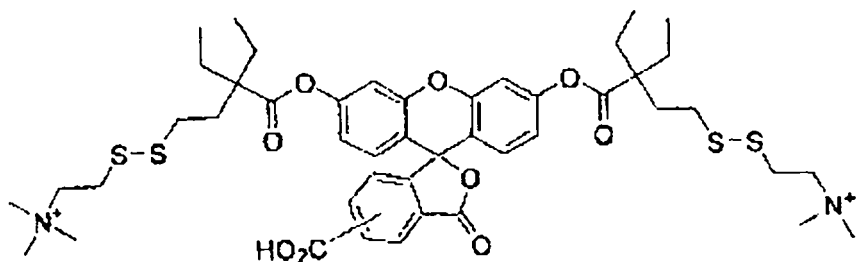


65



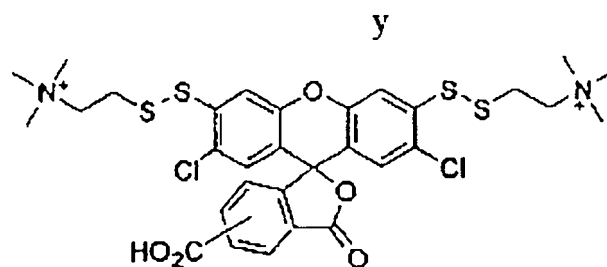
65

5



10

15

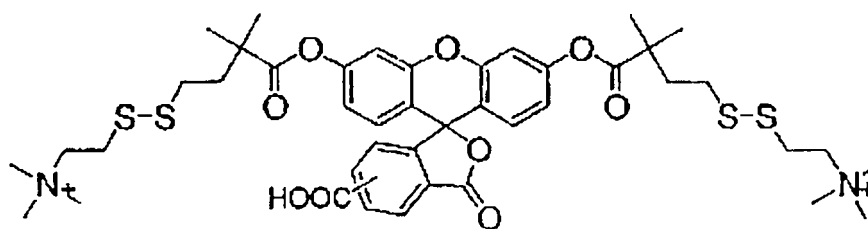


20

25

3. El colorante de la reivindicación 1ª, en el que la estructura es:

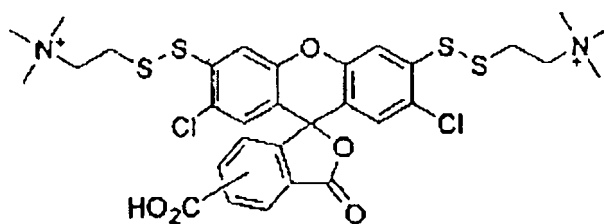
30



35

4. El colorante la la reivindicación 1ª, en el que la estructura es:

40



45

50

5. Un método de examen de alta capacidad para identificar compuestos en una biblioteca de compuestos que son compuestos de transporte, en el que un compuesto de transporte se refiere a un compuesto que es internalizado por una célula, que comprende:

55

a) incorporar los compuestos individuales de una biblioteca de compuestos a una fase sólida mediante un enlace divisible, en el que cada uno de dichos compuestos individuales se incorpora directa o indirectamente a un informador fluorógeno que se hace fluorescente tras entrar en la célula, en el que el informador fluorógeno es un colorante fluorógeno según una de las reivindicaciones 1ª-4ª;

60

b) liberar de la fase sólida el conjugado informador-compuesto;

c) poner en contacto con una célula los conjugados informador-compuesto liberados; y

65

d) determinar si dicho compuesto es una molécula transportadora en base a si hay un cambio de fluorescencia detectable.

6. El método de la reivindicación 5ª, en el que la fase sólida es una perla.

## ES 2 316 765 T3

7. El método de la reivindicación 5<sup>a</sup>, en el que la biblioteca combinatoria es una biblioteca de peptoides.
8. El método de la reivindicación 5<sup>a</sup>, en el que la biblioteca combinatoria se selecciona entre una biblioteca de péptidos, peptoides, ácidos nucleicos, hidratos de carbono o moléculas pequeñas.
9. El método de la reivindicación 5<sup>a</sup>, en el que la molécula de transporte incluye además una molécula de carga.
10. El método de la reivindicación 9<sup>a</sup>, en el que la molécula de carga es un agente activo.
11. El método de la reivindicación 10<sup>a</sup>, en el que dicho agente activo es un antibiótico, inhibidor de enzimas, agonista o antagonista de hormonas o modulador del crecimiento de células.
12. El método de la reivindicación 11<sup>a</sup>, en el que el agente activo es un antibiótico.
13. Un método para determinar si un compuesto es una molécula de transporte que se internaliza por una célula, que comprende:
- poner en contacto una célula con un conjugado que comprende un compuesto informador que sólo genera fluorescencia después de la entrada en la célula, cuyo informador está unido covalentemente a un compuesto de transporte potencial del que ha de examinarse su capacidad para ser internalizado por la célula contactada, y en el que el informador fluorógeno es un colorante fluorógeno según una de las reivindicaciones 1<sup>a</sup>-4<sup>a</sup>;
  - detectar si se genera fluorescencia después de dicha etapa de puesta en contacto; y
  - correlacionar la generación de fluorescencia con la internalización del compuesto de transporte por la célula.
14. El método de la reivindicación 13<sup>a</sup>, en el que el compuesto de transporte potencial se incorpora a una fase sólida por un enlace divisible y se libera de ella antes de poner en contacto con la célula.
15. El método de la reivindicación 14<sup>a</sup>, en el que la fase sólida es una perla resinosa.
16. El método de la reivindicación 13<sup>a</sup>, en el que el compuesto de transporte potencial se selecciona del grupo constituido por un péptido, proteína, ácido nucleico, peptoide, hidrato de carbono y un esteroide.
17. El método de la reivindicación 13<sup>a</sup>, en el que el compuesto de transporte potencial está contenido en una biblioteca química combinatoria.
18. El método de la reivindicación 17<sup>a</sup>, en el que la biblioteca química combinatoria es una biblioteca de peptoides.
19. El método de la reivindicación 13<sup>a</sup>, en el que el informador es incorporado químicamente al compuesto de transporte potencial a examinar por su capacidad para ser internalizado por una célula mientras está en solución.
20. El método de la reivindicación 13<sup>a</sup>, en el que el informador es incorporado químicamente al compuesto de transporte potencial del que examinar si es internalizado por una célula mientras tal compuesto está incorporado a una fase sólida.
21. Una biblioteca de compuestos de la que ha de examinarse la capacidad de los compuestos para ser internalizados por una célula, comprendiendo la biblioteca una pluralidad de diferentes compuestos, en la que los diferentes compuestos de la biblioteca se incorporan covalentemente a una molécula informadora fluorógena que se hace fluorescente después de internalizarse en una célula, en la que la molécula informadora fluorógena es un colorante fluorógeno según una de las reivindicaciones 1<sup>a</sup>-4<sup>a</sup>.
22. La biblioteca de la reivindicación 21<sup>a</sup>, en la que el informador fluorógeno es un colorante fluorógeno según la reivindicación 2<sup>a</sup>.
23. La biblioteca de la reivindicación 21<sup>a</sup>, en la que cada uno de dichos conjugados de compuesto diferentes se incorpora a una fase sólida.
24. La biblioteca de la reivindicación 23<sup>a</sup>, en la que cada uno de dichos conjugados de compuesto diferentes está comprendido en micropocillos diferentes.
25. La biblioteca de la reivindicación 23<sup>a</sup>, en la que dichos conjugados diferentes están comprendidos en platinas o discos o pociones discretas de dichas platinas o discos diferentes.
26. Un método para determinar si una biblioteca contiene compuestos que se transportan a una célula que comprende:
- proporcionar una biblioteca de conjugados informador-compuesto según la reivindicación 21<sup>a</sup>;

## ES 2 316 765 T3

b) poner en contacto los conjugados informador-compuesto diferentes con un cultivo de células; y

c) determinar si dicho cultivo de células fluoresce cuando se pone en contacto con el conjugado informador-compuesto y correlacionar la generación de fluorescencia con la internalización del compuesto por la célula.

5

27. El método de la reivindicación 26<sup>a</sup>, en el que el cultivo de células está comprendido en un micropocillo.

28. El método de la reivindicación 26<sup>a</sup>, en el que el cultivo de células está en una platina cubierta.

10

29. El método de la reivindicación 26<sup>a</sup>, en el que la fluorescencia se detecta por formación de imagen directa.

30. El método de la reivindicación 26<sup>a</sup>, en el que la fluorescencia se detecta por citometría de flujo.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

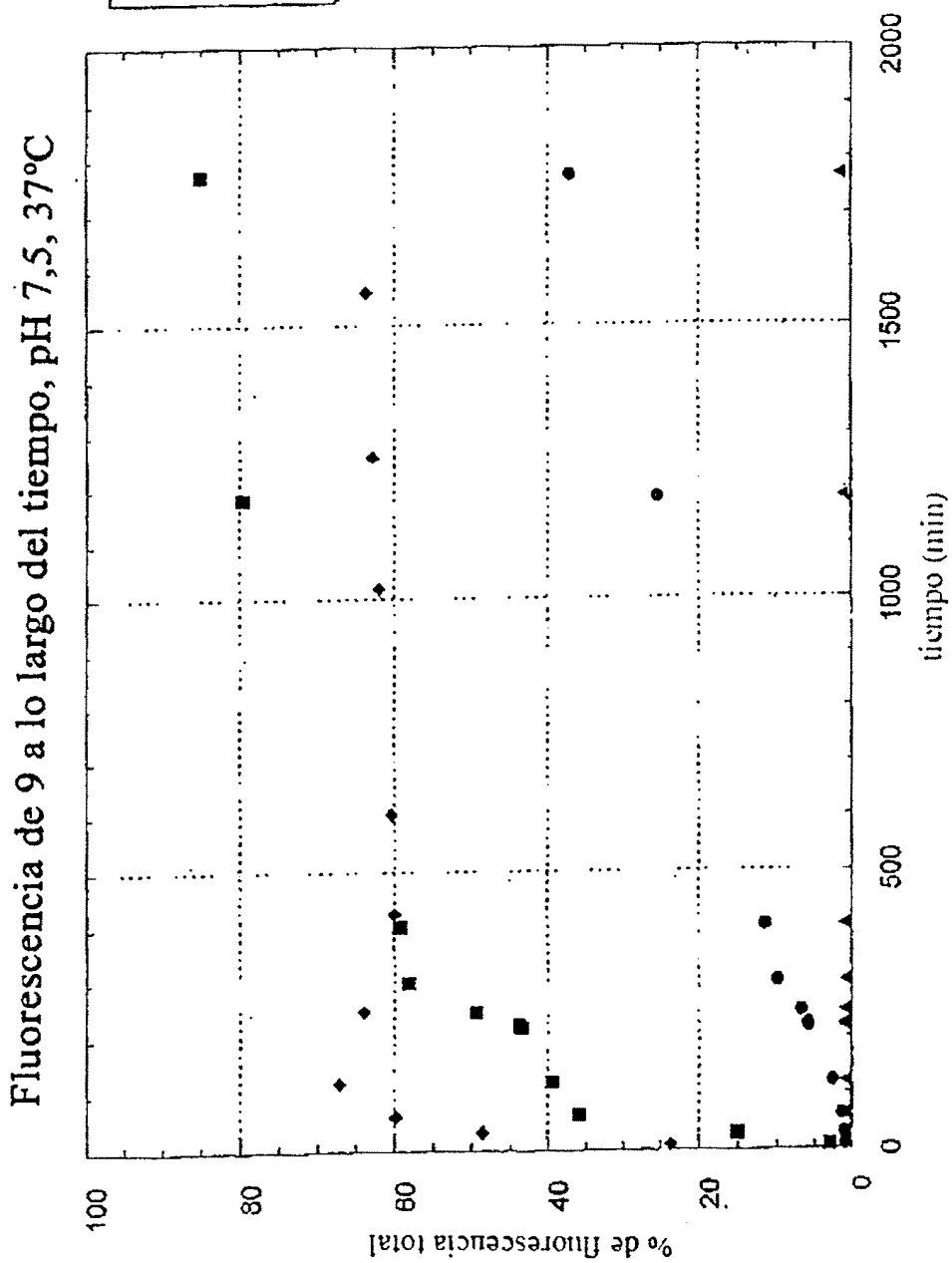


Figura 1

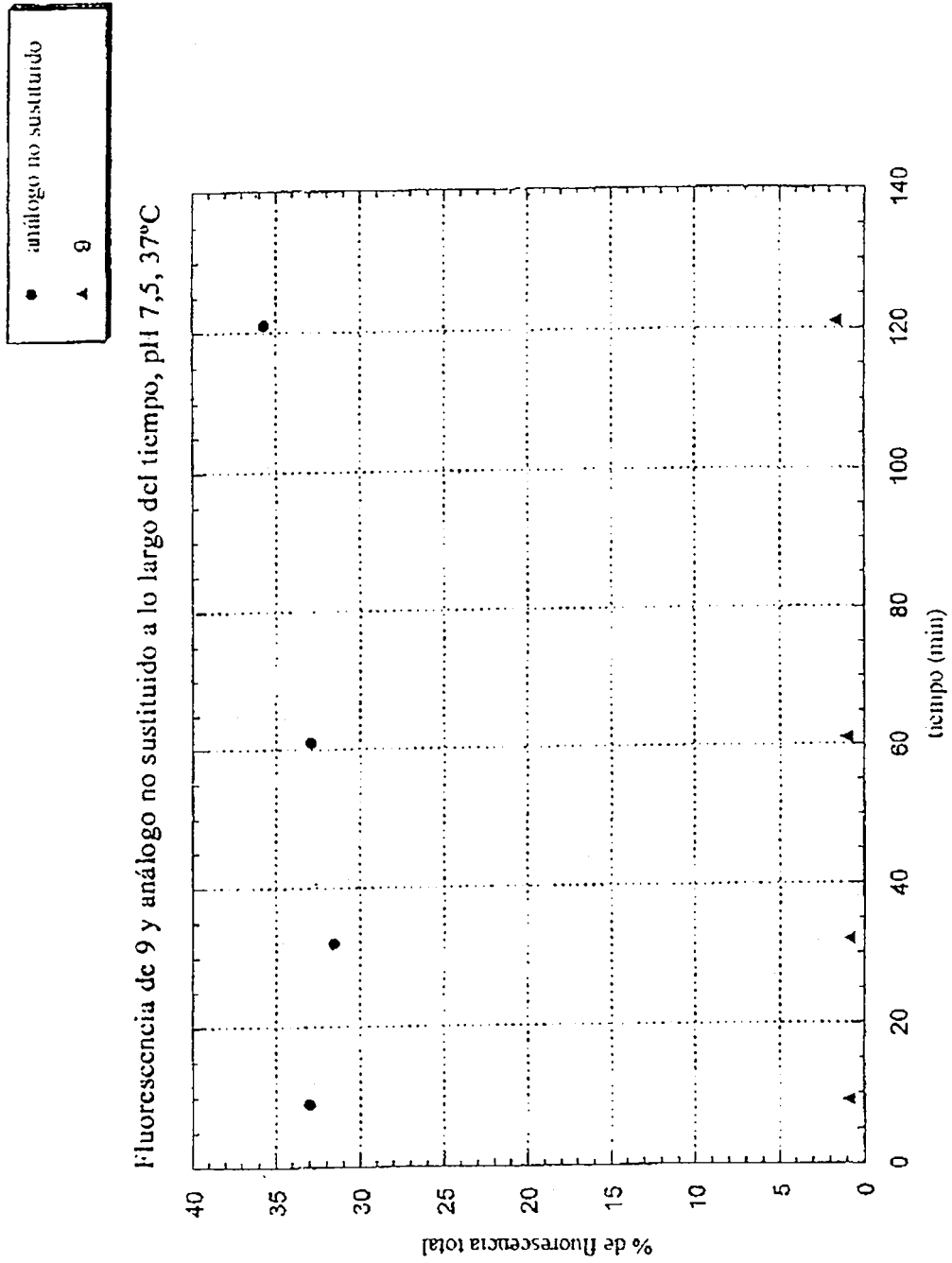


Figura 2

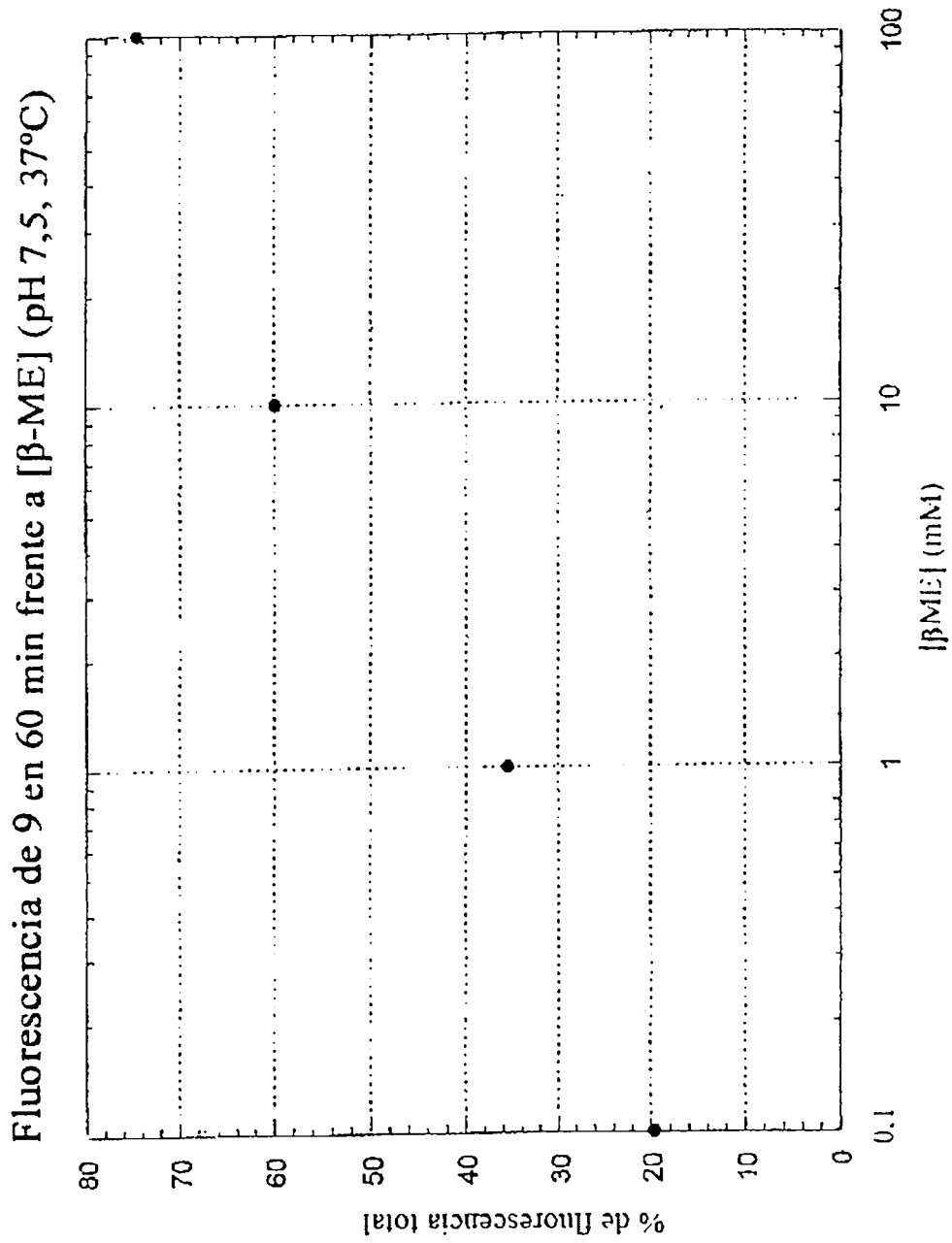


Figura 3