

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 972 588**

51 Int. Cl.:

C07H 15/20 (2006.01)

C07H 17/02 (2006.01)

C12Q 1/34 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

A61K 49/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.12.2017 PCT/EP2017/083518**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.06.2018 WO18114933**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.12.2017 E 17821597 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.12.2023 EP 3555112**

54 Título: **Sustrato de glicosidasa fluorogénica y método de detección asociado**

30 Prioridad:

19.12.2016 FR 1662787

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

13.06.2024

73 Titular/es:

**ECOLE NORMALE SUPÉRIEURE DE LYON
(33.3%)**

15 parvis René Descartes

69007 Lyon, FR;

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD LYON 1 (33.3%) y

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (33.3%)**

72 Inventor/es:

HASSERODT, JENS;

GONDRAND, CORENTIN;

PROST, MAXIME;

YVERT, GAËL y

TRIQUENEAUX, GÉRARD

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 972 588 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

Sustrato de glicosidasa fluorogénica y método de detección asociado

La presente invención se refiere a sondas para detectar la actividad enzimática de tipo glicosidasa. En concreto, la invención se refiere a nuevos sustratos fluorogénicos para detectar la presencia de una glicosidasa catalíticamente activa y a un método de detección que utiliza dichos sustratos.

En el análisis de una muestra biológica o química, la detección de la actividad glicosidasa puede resultar de gran utilidad (Boonacker E. y Van Noorden C. J. F. (2001). Enzyme cytochemical techniques for metabolic mapping in living cells, with special reference to proteolysis. *J. Histochem. Cytochem.* 49, 1473-1486; Perry, J. D., James, A. L., Morris, K. A., Oliver, M., Chilvers, K. F., Reed, R. H. y Gould, F. K. (2006). Evaluation of novel fluorogenic substrates for the detection of glycosidases in *Escherichia coli* and enterococci. *Journal of Applied Microbiology*, 101(5), 977-985; Orega, S., James, A. L., Manafi, M., Perry, J. D. y Pincus, D. H. (2009). Enzymatic substrates in microbiology. *Journal of Microbiological Methods*, 79 (2), 139-155). Los organismos completos, las células o los extractos celulares, los líquidos biológicos o las mezclas químicas son ejemplos de muestras biológicas o químicas en donde se puede detectar la actividad glicosidasa. Las glicosidasas son una gran familia de enzimas que incluyen numerosos biomarcadores de diversas enfermedades. También participan en numerosos procesos celulares benignos y, por tanto, son objeto de innumerables estudios por parte de los biólogos celulares. Así, su detección puede proporcionar información sobre un estado metabólico o mórbido en concreto, por ejemplo. Una detección eficaz también permitiría establecer cribados de alto rendimiento, ofreciendo la posibilidad de detectar nuevas glicosidasas naturales, o de desarrollar nuevas glicosidasas mediante la evolución dirigida de enzimas conocidas, o de mejorar el rendimiento glicolítico de determinados microorganismos mediante la mutagénesis o la evolución experimental de su genoma.

Por tanto, es muy útil una sonda capaz de detectar la actividad glicosidasa.

La detección de esta actividad mediante la captura de la luz fluorescente emitida por una sonda es un procedimiento mucho más sensible que la recogida de lo que queda de luz blanca tras la simple absorción por la sonda, es decir, que el umbral de detección es mucho menor. La detección de la emisión de fluorescencia es muy fácil de implantar, por lo que las sondas fluorescentes son herramientas muy atractivas para las ciencias de la vida. Por ejemplo, la clase de fluoróforos que conducen a la transferencia intramolecular de protones en estado excitado, denominada ES IPT (ES IPT del inglés "Excited State Intramolecular Proton Transfer"), está descrita, en particular, en a) Ormson, S. M, et al. *Progress in Reaction Kinetics* (1994) 19, 45-91; b) Legourriec, D., et al. *Progress in Reaction Kinetics* (1994), 19, 211-275; y c) Zhao, J., Ji, S., Chen, Y., Guo, H. y Yang, P. (2012). Excited state intramolecular proton transfer (ES IPT): from principal photophysics to the development of new chromophores and applications in fluorescent molecular probes and luminescent materials. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 14 (25), 8803. La primera interpretación de la alta fluorescencia encontrada en algunos compuestos fenólicos como un fenómeno ES IPT se puede atribuir a Weller (para el salicilato de metilo: Weller, A. (1961). Fast Reactions of Excited Molecules. *Progress in Reaction Kinetics and Mechanism* 1, 187), y a Heller y Williams (para los hidroxifenilbenzoxazoles: Heller A. y Williams, D. L., *J. Phys. Chem.* (1970) 74, 4473-4480).

La clase de fluoróforos ES IPT es particularmente atractiva para los investigadores de las ciencias biológicas debido a sus propiedades excepcionales en comparación con los fluoróforos convencionales. Las propiedades excepcionales de los fluoróforos ES IPT son:

(a) un gran desplazamiento de Stokes que a menudo supera los 130 nm y es capaz de alcanzar valores de 250 nm, lo que permite elegir instrumentos que aumenten al máximo la sensibilidad de la detección;

(b) una excelente resistencia al fotoblanqueo con tasas que pueden ser varios órdenes de magnitud superiores a las de los fluoróforos modelo como la fluoresceína;

(c) la posibilidad de diseñar fluoróforos que emitan una fluorescencia brillante en estado sólido, una propiedad poco frecuente entre todos los fluoróforos conocidos. Este último comportamiento permite la producción de una señal de alta intensidad en el sitio de activación, con una dilución mínima causada por la difusión;

(d) la posibilidad de diseñar fluoróforos ES IPT que emitan en el rojo o el infrarrojo cercano (600 a 850 nm), donde la transparencia del tejido es mayor; una sonda que utilice tales fluoróforos sería entonces particularmente adecuada para obtener imágenes en animales vivos; y finalmente

(e) la posibilidad de diseñar un sustrato que no emita fluorescencia al reemplazar el átomo de hidrógeno transportado por el hidroxilo de un fluoróforo ES IPT por un sustituyente que tenga reactividad específica frente a un analito químico o bioquímico, conduciendo la escisión de este sustituyente a la aparición de la fluorescencia.

El nivel de sensibilidad de un método para detectar la actividad enzimática, mediante el uso un sustrato que da lugar a la producción de fluorescencia, está estrechamente relacionado con (i) la velocidad de fotoblanqueo, (ii) el grado de acumulación de la señal fluorescente en su sitio de producción (y por lo tanto la tasa de difusión desde este sitio, y si el fluoróforo precipita o no) (iii) el modo apagado/encendido real en donde opera el sustrato (ausencia de señal de

ruido de fondo que se debería a la fluorescencia del sustrato no transformado), y (iv) el grado de superposición del espectro de excitación y el espectro de emisión (siendo su separación en la línea de base la configuración más favorable; véase el punto (a) anterior). El punto (iv) reviste de una particular importancia, porque la separación completa en la línea de base brinda la oportunidad de una elección muy amplia de filtros para la fuente de luz (para excitar el fluoróforo en todas las longitudes de onda posibles), pero aún más importante, para el detector (para recoger los fotones de todas las longitudes de onda emitidas por el fluoróforo). El punto (iv) también hace disminuir al mínimo la perturbación del procedimiento de detección debida a la autofluorescencia tisular (caracterizada por un desplazamiento de Stokes pequeño de los fluoróforos naturales), un problema recurrente que se encuentra con los fluoróforos consolidados, que también exhiben un cambio de Stokes pequeño.

Entre la clase importante de fluoróforos ESIPT, la dicloro-HPQ (6-cloro-2-(5-cloro-2-hidroxifenil)-4(3H)-quinazolinona; número CAS: 28683-92-3) es particularmente interesante, dado que es perfectamente insoluble en los medios acuosos/fisiológicos, siendo fuertemente fluorescente en estado sólido y sólo en estado sólido. Sin embargo, es muy difícil utilizar la dicloro-HPQ en el diseño de una sonda molecular que proporcione información sobre la actividad de una glicosidasa. Además, las principales actividades para las que ya se ha diseñado (y comercializado) una sonda basada en la HPQ son las de las fosfatasa, debido a la imposibilidad de crear una sonda estable basada en la HPQ con un hidroxilo fenólico glicosilado, porque el producto resultante es propenso a una hidrólisis espontánea que, por supuesto, libera la dicloro-HPQ insoluble libre y produce así una señal fluorescente espuria ("señal de fondo"). También cabe señalar que se interrumpió en 2008 la comercialización por parte de Molecular Probes de dichos compuestos glicosilados (sustrato de la glucuronidasa ELF 97 (n.º E6587) y el sustrato de la quitinasa/N-acetilglucosaminidasa ELF 97 (n.º E22011) debido a la inestabilidad por culpa de la hidrólisis intrínseca de los glucósidos fenólicos, y en concreto, los que se construyen a partir de fenoles empobrecidos en electrones, como la dicloro-HPQ. De hecho, se sabe que cualquier glucósido basado en un nitrofenol (que es un fenol tan empobrecido en electrones como la dicloro-HPQ) se hidroliza espontáneamente a pH fisiológico. También se sabe que este problema de estabilidad empeora seriamente a pH más ácidos (por ejemplo, a un pH de 6,5), en comparación con el pH fisiológico (pH 7,4).

En los últimos años, ha habido un interés creciente en el diseño de sustratos de enzimas con varios componentes desencadenantes/espaciadores/fluoróforos utilizando espaciadores autoescindibles como agente de unión. Podemos citar en particular el trabajo de uno de los inventores de la presente solicitud de patente correspondiente a las solicitudes de patente internacional WO 2013/045854, WO 2014/020285 y WO 2015/197981 que utilizan un espaciador autoescindible que conecta un sustrato de peptidasa y/o glicosidasa a un grupo arilo y da como resultado, después de la escisión del sustrato, a la ciclación del espaciador y la liberación de un fluoróforo ESIPT.

La patente europea EP2033663 describe sustratos fluorescentes de tipo sacáridos que comprenden un brazo espaciador autoescindible funcionalizado por un fluoróforo F y por un inhibidor de la fluorescencia de F. Estos sustratos pueden usarse para la detección de actividades enzimáticas *in vivo*.

Sin embargo, con las tecnologías existentes, la detección de las glicosidasas no es suficientemente fiable (las sondas son inestables y producen fluorescencia en ausencia de la enzima diana), requiere demasiado tiempo (la respuesta enzimática es demasiado lenta) y/o no es suficientemente preciso (el fluoróforo liberado no precipita en un punto sino que se difunde en el medio).

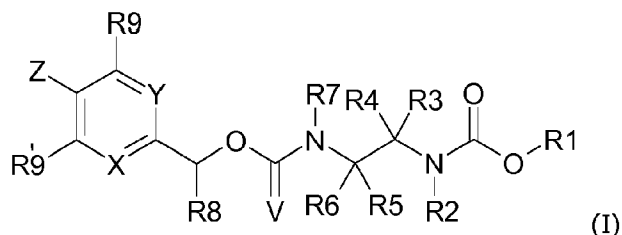
En este contexto, los solicitantes proponen nuevos sustratos de enzima glicosidasa que ofrecen una cinética de respuesta enzimática particularmente rápida. La invención propone utilizar un nuevo espaciador que permite crear una sonda estable, adaptada a la incorporación de un fluoróforo ESIPT, lo que así disminuye al mínimo la fluorescencia de fondo de la sonda no transformada, y que permite un aumento significativo de la sensibilidad, y, como resultado, podría conducir a una reducción en la cantidad a utilizar y, por lo tanto, podría, en particular, hacer posible una aplicación en la obtención de imágenes *in vivo*, al mismo tiempo que reduce los problemas de toxicidad.

El objeto de la invención es proponer nuevos sustratos de glicosidasas que sean estables en medio acuoso y que permanezcan no fluorescentes o débilmente fluorescentes a una longitud de onda muy diferente de aquella a la que el fluoróforo liberado es fluorescente, pero que reaccionan rápidamente con las glicosidasas para producir una pequeña molécula fluorescente correspondiente a un fluoróforo ESIPT. Según la invención, se da a conocer un sustrato de glicosidasa que tiene las siguientes propiedades:

- una alta especificidad por una glicosidasa concreta, en función de la elección del grupo glicosilo presente en la sonda;
- una ausencia de fluorescencia de fondo gracias a una alta estabilidad de la sonda en ausencia de la enzima diana, a la precipitación del fluoróforo en el lugar de la enzima y a una ausencia de difusión del fluoróforo en el medio; y
- una cinética de transformación rápida por la acción de la glicosidasa diana.

El sustrato de glicosidasa según la invención permite así conservar las ventajas de los sustratos de glicosidasa de la técnica anterior (es decir, alta especificidad por una glicosidasa concreta y ausencia de fluorescencia de fondo), al tiempo que tiene una cinética de transformación rápida por la acción de la glicosidasa diana.

Más precisamente, la invención se refiere a compuestos de fórmula (I):



en donde:

- 5 • R1 es tal que HOR1, obtenido después de la escisión del enlace -C(O)-OR1 presente en la fórmula (I), pertenece a la clase de fluoróforos que conducen a una transferencia intramolecular de protones en estado excitado, denominada ES IPT, en donde R1 es un grupo aromático en el que -OR1 corresponde a la fórmula (A1) tal como se define en la reivindicación 1 y tal como se detalla a continuación,
- R2, R3 y R4 se definen como sigue:
 - 10 ◦ R2 es un alquilo (C1-C4), R3 es un alquilo (C1-C4) o un átomo de hidrógeno, y R4 es un alquilo (C1-C4), o bien
 - R3 es un alquilo (C1-C4) o un átomo de hidrógeno y R2 y R4 están unidos entre sí y forman con los átomos de carbono y nitrógeno a los que están unidos un heterociclo alifático, en donde este heterociclo puede estar sustituido por un grupo hidrosolubilizante, o bien
 - 15 ◦ R2 es un alquilo (C1-C4) y R3 y R4 están unidos entre sí y forman con el átomo de carbono al que están unidos un carbociclo alifático,
- R5 y R6 son idénticos o diferentes y representan independientemente un átomo de hidrógeno, un alquilo (C1-C4) o un arilo (C5-C10),
- R7 es un átomo de hidrógeno, o un grupo elegido entre alquilo (C1-C4) y alcoxi (C1-C4),
- 20 • R8 representa un átomo de hidrógeno, o un grupo alquilo (C1-C10), sustituido o no sustituido, o un grupo -D1-D2-D3 en donde:
 - D1 representa un grupo triazolilo o -CH₂-triazolilo,
 - D2 representa un grupo alquilenilo (C1-C10), alquilenilo (C1-C10) o alquinileno (C1-C10), en donde dichos grupos están optativamente interrumpidos por uno o más heteroátomos seleccionados entre O o N, un grupo glicosilo divalente, un grupo -O-(CHR-CHR'-O)_n- o -N-(CHR-CHR'-O)_n-, en donde n es un número entero que varía de 1 a 20, R y R', iguales o diferentes, representan H o CH₃ siempre que R y R' no sean simultáneamente CH₃, un aminoácido o un péptido, o una combinación de estos grupos,
 - 25 ◦ D3 representa una unidad de maleimidocaproilo, aminoácido, péptido, ácido fólico, anticuerpo o fragmento de anticuerpo unido a D2, por la función de tipo ácido carboxílico comprendida en ella, formando un enlace éster o amida,
- 30 • R9 y R'9, idénticos o diferentes, representan un átomo de hidrógeno, o un grupo aceptor de electrones, tal como un átomo de halógeno, o un grupo elegido entre -NO₂, -CN o -NH-C(O)-CH₂-Ab, en donde Ab representa un anticuerpo,
- V representa un átomo de oxígeno o un átomo de azufre,
- X, Y y Z son tales que:
 - 35 ◦ X representa CR₁₀, Y representa CR'₁₀ y Z representa OR₀, o bien
 - X representa CR₁₀, Y representa COR₀ y Z representa R'₁₀, o bien
 - X representa CR₁₀, Y representa un átomo de nitrógeno y Z representa OR₀, o bien
 - X representa un átomo de nitrógeno, Y representa COR₀ y Z representa R₁₀

en donde:

◦ R0 representa un grupo glicosilo unido por su carbono anomérico al resto de la molécula de fórmula (I), y

5 ◦ R10 y R'10, idénticos o diferentes, representan un átomo de hidrógeno o un grupo donador de electrones, tal como un alquilo (C1-C20), un arilo (C5-C24) o un alcoxi (C1-C20),

en forma de una mezcla de isómeros ópticos en cualquier proporción, o en forma enriquecida en un isómero óptico.

10 Los compuestos (I) según la invención, en función del grupo glicosilo seleccionado, actúan como una sonda molecular capaz de revelar la presencia de una actividad enzimática glicosidasa específica mediante la detección de fluorescencia. El enlace R0-O presente en los compuestos de fórmula (I) se puede escindir, mediante hidrólisis, en presencia de una enzima glicosidasa que actúa como catalizador para la reacción de escisión.

15 Más específicamente, la sonda es invisible antes de encontrarse con la enzima glicosidasa diana (es decir, "sonda furtiva"), pero cuando dicha enzima la modifica químicamente, se fragmenta a través de una reacción en cascada para producir una intensa fluorescencia. La sonda está compuesta por 4 componentes moleculares: i) un tándem de espaciadores autoescindibles que lleva, en un extremo, ii) un grupo glicosilo que actúa como sustrato para la enzima diana y, en el otro, iii) un grupo OR1 que, cuando se libera en su forma HOR1 hidroxilada por dicha fragmentación, en medios acuosos, pertenece a la clase de fluoróforos ESIPT.

20 El tándem de espaciadores incluye un espaciador de tipo retirable y un espaciador de tipo ciclante preordenados para ciclación. Esta elección particular del tándem de espaciadores permite obtener dos propiedades fundamentales para la sonda molecular correspondiente: (a) la hace insensible a la degradación espontánea y, por tanto, a la producción de una señal fluorescente falsamente positiva, y (b) garantiza una rápida cinética de fragmentación durante la transformación por la enzima diana para un rendimiento adecuado para las aplicaciones en el campo de las ciencias de la vida. El grupo R0 es capaz de escindirse del resto de la molécula por la acción de la glicosidasa diana, lo que conduce a un intermedio inestable que se inmola mediante reacciones de eliminación y ciclación/escisión, de forma espontánea y rápida, para liberar un precipitado fluorescente y así producir una señal fluorescente. Esta arquitectura molecular única permite una respuesta enzimática particularmente rápida y, en particular, mucho más rápida que la obtenida utilizando la sonda descrita en la solicitud de patente internacional WO 2014/020285.

25 Por lo tanto, la presente invención se refiere a los compuestos de fórmula (I), para la implantación de un método de detección *in vivo*, en los humanos, de una glicosidasa. Los compuestos de fórmula (I) según la invención también pueden usarse para detectar una glicosidasa, *in vivo* en los animales.

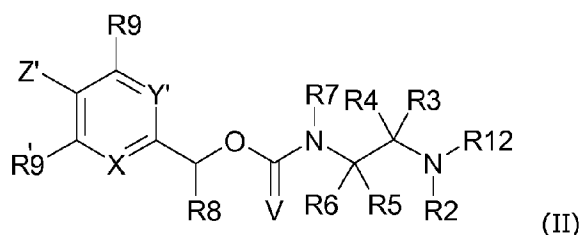
30 Según otro aspecto, la invención se refiere a un método para detectar *in vitro* o *ex vivo* la presencia de una glicosidasa utilizando el compuesto (I) según la invención. Más específicamente, la invención se refiere a un método para detectar *in vitro* o *ex vivo* la presencia de una glicosidasa que comprende las etapas de:

- poner en contacto una muestra sospechosa de contener dicha glicosidasa con un compuesto (I) según la invención,
- 35 • aplicar las condiciones apropiadas para permitir la formación de un compuesto fluorescente, en particular en forma de precipitado, por escisión del enlace covalente entre O y R0, seguida de la escisión del enlace -C(O)-OR1, tras las reacciones de eliminación y de ciclación del tándem de espaciadores que conducen a la liberación de HOR1, y
- hacer el análisis cuantitativo o cualitativo de dicho precipitado fluorescente.

40 El precipitado que puede obtenerse a partir de los compuestos de fórmula (I) según la invención, mediante la escisión del enlace covalente entre O y R0, seguida de una escisión del enlace -C(O)-OR1 tras una eliminación y una ciclación del tándem de espaciadores, es fuertemente fluorescente, mientras que el compuesto correspondiente de fórmula (I) es poco fluorescente o no es fluorescente en absoluto. Los compuestos según la invención, que son sustratos de la enzima glicosidasa, se comportan como sondas que funcionan según el modo apagado/encendido.

45 En particular, el método de detección según la invención se puede implantar en condiciones fisiológicas, en particular en un medio acuoso tamponado a un pH de aproximadamente 7,4.

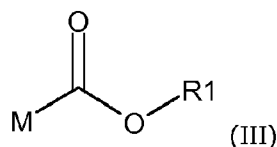
La invención también se refiere a los compuestos de fórmula (II), intermedios en la síntesis de los compuestos de fórmula (I):



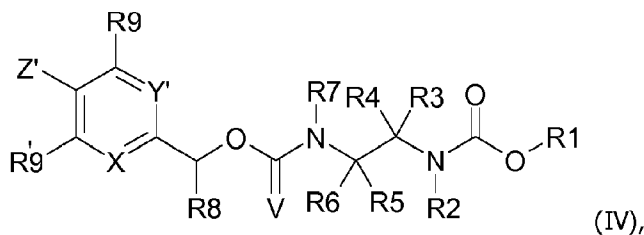
en donde:

- 5
- R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R'9 y V son tal como se define para los compuestos de fórmula (I),
 - R12 representa un átomo de hidrógeno o un grupo protector de las funciones amina,
 - X, Y' y Z' son tales que:
 - X representa CR¹⁰, Y' representa CR'¹⁰ y Z' representa OR'⁰, o bien
 - X representa CR¹⁰, Y' representa COR'⁰ y Z' representa R'¹⁰, o bien
- 10
- X representa CR¹⁰, Y' representa un átomo de nitrógeno y Z' representa OR'⁰, o bien
 - X representa un átomo de nitrógeno, Y' representa COR'⁰ y Z' representa R'¹⁰,
- en donde R'⁰ represente un grupo R⁰ del cual todas las funciones de tipo alcohol están protegidas por un grupo protector, y en donde R⁰, R¹⁰ y R'¹⁰ son tal como se define para los compuestos de fórmula (I), en forma de mezcla de isómeros ópticos en cualquier proporción, o en forma enriquecida en un isómero óptico.
- 15 La invención también se refiere a un procedimiento para preparar un compuesto (I) que comprende las siguientes etapas:

- tener un compuesto (II) tal como se define en el contexto de la invención,
- tener un compuesto (III) de fórmula:



- 20
- en donde R1 es como se define para los compuestos de fórmula (I) y M representa un grupo saliente, en particular un átomo de halógeno, y en particular un átomo de cloro, un grupo imidazolilo o un paranitrofenoxi, y preferiblemente M representa un átomo de cloro,
- obtener el compuesto (IV) mediante la reacción de adición de dicho compuesto (II) a dicho compuesto (III), teniendo dicho compuesto (IV) la fórmula:



- 25
- en donde R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R'9, V, X, Y' y Z' son como se definen para los compuestos de fórmula (I) y (II), y
- desproteger las funciones de tipo alcohol presentes en el grupo R'⁰ de dichos compuestos (IV) para obtener dicho compuesto (I).

Los diferentes compuestos según la invención se pueden encontrar en todas las formas posibles de isómeros ópticos, posiblemente mezclados en todas las proporciones, a menos que se especifique otra cosa. Según una realización en concreto, los compuestos según la invención que comprenden un carbono asimétrico se encuentran en forma racémica, en donde las formas *R* y *S* están en aproximadamente en la misma proporción. Según otra realización, los compuestos de fórmula (I) de la invención se pueden encontrar en forma enriquecida en un diastereómero o enantiómero, con un exceso diastereomérico o enantiomérico superior al 80 %, o incluso superior al 95 %, o incluso en un forma isomérica pura, es decir con un exceso diastereomérico o enantiomérico superior al 99 %.

Los compuestos (I) se aíslan en forma enriquecida en un diastereómero o enantiómero mediante las técnicas de separación convencionales: se pueden utilizar, por ejemplo, recristalizaciones fraccionadas de una sal del racémico con un ácido o una base ópticamente activa cuyo principio es bien conocido o, más a menudo, las técnicas clásicas de cromatografía en fase quiral o no quiral.

Si fuera necesario, cuando los compuestos según la invención comprenden una función salificable, pueden presentarse en forma de sal, en particular de clorhidrato o de trifluoroacetato. La invención se va a describir con más detalle. Previamente se definirán ciertos términos utilizados.

15 **Definiciones**

Por "heterociclo alifático" se entiende a los efectos de la presente invención un anillo saturado, sustituido o no sustituido, que comprende de 3 a 20 miembros, preferiblemente de 5 a 10 miembros, y mejor aún 5, 6, 7 u 8 miembros, y que comprende al menos un heteroátomo, tal como O, N o S.

Por "carbociclo alifático" se entiende a los efectos de la presente invención un anillo saturado, sustituido o no sustituido, que comprende de 3 a 20 miembros, preferiblemente de 5 a 10 miembros, y mejor aún 5, 6, 7 u 8 miembros, que consta exclusivamente de átomos de carbono.

Por "alquilo" se entiende una cadena de hidrocarburo saturada que puede ser lineal o ramificada. Preferiblemente, el término alquilo designa, a menos que se especifique otra cosa, un grupo alquilo que comprende de 1 a 12 átomos de carbono y preferiblemente de 1 a 6 átomos de carbono, y en particular un grupo alquilo (C1-C4). Metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, isobutilo y terc-butilo son ejemplos de grupos alquilo (C1-C4) (alquilo con 1 a 4 átomos de carbono).

Por "alquileo" se entiende un grupo alquilo divalente.

Por "arilo" se entiende un anillo de hidrocarburo insaturado mono-, bi- o policíclico que comprende, a menos que se especifique otra cosa, de 5 a 24 miembros, de 5 a 20 miembros, preferiblemente de 5 a 15 miembros, y que comprende al menos un anillo aromático en el que se alternan enlaces simples y dobles. Como ejemplo de grupo arilo, se pueden citar los grupos fenilo, naftilo, antraceno, fenantreno y cinamilo. El término arilo también incluye anillos de hidrocarburos insaturados mono-, bi- o policíclicos, uno de cuyos carbonos constituyentes está en la forma carboxi -C(O)-, tal como la 1H-fenalén-1-ona (CAS número 548-39-0).

Por "arileño" se entiende un grupo arilo divalente.

Por "heteroarilo" se entiende un carbociclo mono-, bi- o policíclico, que comprende, a menos que se especifique otra cosa, de 5 a 24 miembros, preferiblemente de 6 a 20 miembros, preferiblemente de 6 a 15 miembros, y que comprende al menos un grupo aromático y al menos un heteroátomo, elegido entre los átomos de oxígeno, nitrógeno o azufre, integrado en el carbociclo. Como ejemplo de grupo heteroarilo, se pueden citar 2-, 3- o 4-piridinilo, 2- o 3-furoilo, 2- o 3-tiofenilo, pirrolilo, imidazolilo, pirazolilo, tiazolilo, benzotiazolilo, oxazolilo, benzoxazolilo, isoxazolilo, piridinilo, pirazinilo, pirimidinilo, tetrazolilo, tiadiazolilo, oxadiazolilo, triazolilo, piridazinilo, indolilo, oxanilo, 4(1H)-quinolinonilo, dibenzotiofenilo, dibenzofuranilo y 9H-carbazolilo. El término heteroarilo también incluye dichos grupos de los cuales uno de los carbonos constituyentes está en la forma carboxi -C(O)-, tales como el 4(3H)-pirimidinonilo o el 4(3H)-quinazolinonilo.

Cuando se indica que un grupo está sustituido sin mayor precisión, significa que está sustituido por uno o más sustituyentes, en particular elegidos entre átomos de cloro, bromo, yodo o flúor, grupos ciano, alquilo, trifluoroalquilo, trifluorometilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, arilo, heteroarilo, heterocicloalquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, hidroxilo, alcoxi, ariloxi, alcoxycarbonilo, ariloxycarbonilo, pudiendo dichos grupos ellos mismos estar sustituidos. Los términos utilizados para la definición de estos sustituyentes son los habitualmente reconocidos por los expertos en la técnica.

Por "alcoxi" y "ariloxi" se entiende respectivamente un grupo -O-alquilo y -O-arilo, siendo alquilo y arilo como se definen en el contexto de la presente invención.

Por "haloalquilo" se entiende una cadena de hidrocarburo saturada, lineal o ramificada, en donde al menos un átomo de hidrógeno ha sido reemplazado por un átomo de halógeno.

Por "glicosidasa" se entiende una enzima glucósido hidrolasa que tiene la capacidad de catalizar la hidrólisis de enlaces glicosídicos, para liberar al menos un sacárido.

Por grupo "glicosilo" se entiende cualquier azúcar de tipo mono- o polisacárido unido al resto de la molécula mediante un enlace glicosilo, es decir, a través de su carbono anomérico. El carbono anomérico puede adoptar la configuración alfa o beta. Como ejemplo de grupo glicosilo, se pueden citar los grupos monoglicosilo, es decir, formados por una única unidad de sacárido, y poliglicosilo, es decir formados por varias unidades de sacáridos idénticas o diferentes.

5 Las unidades de sacárido pueden ser en particular de tipo hexosa o pentosa y seleccionadas entre galactosa, glucosa, manosa, gulosa, alosa, altrosa, idosa, talosa, fucosa, fructosa, arabinosa, lixosa, ribosa y xilosa, por ejemplo. Las unidades de sacárido pueden ser de estereoquímica L o D.

Convencionalmente, el término "alqueno" designa una cadena de hidrocarburo lineal o ramificada que comprende al menos un doble enlace carbono-carbono y que tiene, a menos que se especifique otra cosa, de 2 a 20 átomos de carbono, y preferiblemente de 2 a 6 átomos de carbono.

10

En el contexto de la presente invención, el término "alquenoileno" designa un grupo alquenoileno divalente.

El término "alquino" designa una cadena de hidrocarburo, lineal o ramificada, que comprende al menos un triple enlace carbono-carbono y que tiene, a menos que se especifique otra cosa, de 2 a 12 átomos de carbono, y preferiblemente de 2 a 6 átomos de carbono.

15 Por "alquinoileno" se entiende un grupo alquinoileno divalente.

Por "grupo hidrosolubilizante" se entiende un grupo hidrófilo que permite mejorar la solubilidad de la sonda en un medio acuoso, en particular con respecto a una sonda que sólo se diferencia por la sustitución del grupo hidrosolubilizante por un átomo de hidrógeno.

La "fluorescencia" es la propiedad por la cual una molécula que es excitada por luz de una longitud de onda determinada emite luz a una longitud de onda más larga. La fluorescencia es un fenómeno debido a la interacción de un fluoróforo con un fotón incidente. Este proceso se llama excitación. La absorción del fotón hace que un electrón del fluoróforo pase de su estado fundamental a un nivel de energía más alto. Luego, el electrón vuelve a su nivel original emitiendo un fotón. Este proceso se llama emisión de fluorescencia. A continuación, el fluoróforo emite luz de una longitud de onda más larga que la del fotón absorbido. Esto se debe simplemente a que la energía del fotón emitido es menor que la del fotón absorbido, debido a la disipación de energía mientras duró el estado excitado. Esta definición se da en la solicitud de patente internacional WO 2004/058787.

20

25

Los compuestos (I) según la invención se denominan "sustrato de glicosidasa" porque se transforman en otra sustancia durante una reacción química, en concreto una hidrólisis, catalizada por una glicosidasa. Durante tal reacción en medio acuoso, los compuestos (I) (también llamados "sonda") se escinden por la acción de la glicosidasa diana, lo que conduce a la formación de un precipitado fluorescente y un producto no fluorescente.

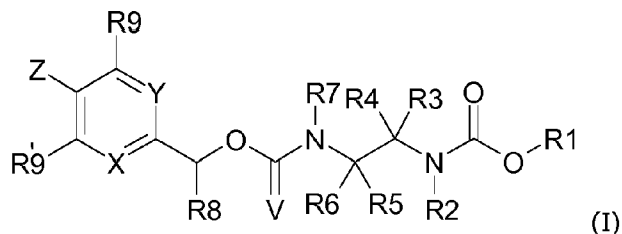
30

El "tándem de espaciadores" en el sentido de la presente invención es el fragmento del compuesto (I) que lleva en un extremo un grupo glicosilo -R0 y en el otro extremo un grupo -OR1 que, una vez liberado por hidrólisis, pertenece a la clase de fluoróforos ESIPT. Este tándem de espaciadores está formado por un primer espaciador de tipo retirable (que sufrirá una reacción de eliminación tras la hidrólisis, liberando R0) y un segundo espaciador de tipo ciclantero (que se ciclará tras la eliminación del espaciador de tipo retirable, y entonces permite generar HOR1). En la figura 1 se representa el mecanismo de degradación, a partir de los compuestos de fórmula (I), utilizando el tándem de espaciadores según la invención.

35

Compuestos de fórmula (I)

La presente invención se refiere a los compuestos de fórmula (I):

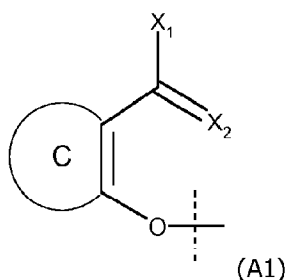


en donde:

- R1 es tal que HOR1, obtenido después de la escisión del enlace -C(O)-OR1 presente en la fórmula (I), pertenece a la clase de fluoróforos que conducen a una transferencia intramolecular de protones en estado excitado, denominado ESIPT, en donde R1 es un grupo aromático en donde -OR1 corresponde a la fórmula (A1) tal como se define en la reivindicación 1 y tal como se detalla a continuación,
- 45

- R2, R3 y R4 se definen como sigue:
 - R2 es un alquilo (C1-C4), R3 es un alquilo (C1-C4) o un átomo de hidrógeno, y R4 es un alquilo (C1-C4), o bien
 - 5 ◦ R3 es un alquilo (C1-C4) o un átomo de hidrógeno, y R2 y R4 están unidos entre sí y forman con los átomos de carbono y nitrógeno a los que están unidos un heterociclo alifático, pudiendo este heterociclo estar sustituido por un grupo hidrosolubilizante, o bien
 - R2 es un alquilo (C1-C4) y R3 y R4 están unidos entre sí y forman con el átomo de carbono al que están unidos un carbociclo alifático,
 - 10 • R5 y R6 son idénticos o diferentes y representan independientemente un átomo de hidrógeno, un alquilo (C1-C4) o un arilo (C5-C10),
 - R7 es un átomo de hidrógeno, o un grupo elegido entre alquilo (C1-C4) y alcoxi (C1-C4),
 - R8 representa un átomo de hidrógeno, o un grupo alquilo (C1-C10), sustituido o no sustituido, o un grupo -D1-D2-D3 en donde:
 - D1 representa un grupo triazolilo o -CH₂-triazolilo,
 - 15 ◦ D2 representa un grupo alquilenilo (C1-C10), alquilenilo (C1-C10) o alquinileno (C1-C10), en donde dichos grupos están posiblemente interrumpidos por uno o más heteroátomos seleccionados entre O o N, un grupo glicosilo divalente, un grupo -O-(CHR-CHR'-O)_n- o -N-(CHR-CHR'-O)_n- en donde n es un número natural que varía de 1 a 20, R y R', iguales o diferentes, representan H o CH₃ siempre que R y R' no sean simultáneamente CH₃, un aminoácido o un péptido, o una combinación de estos grupos,
 - 20 ◦ D3 representa un motivo maleimidocaproílo, aminoácido, péptido, ácido fólico, anticuerpo o fragmento de anticuerpo unido a D2, por una función de tipo ácido carboxílico comprendida en él, formando un enlace éster o amida,
 - 25 • R9 y R'9, idénticos o diferentes, representan un átomo de hidrógeno, o un grupo aceptor de electrones, tal como un átomo de halógeno, o un grupo elegido entre -NO₂, -CN o -NH-C(O)-CH₂-Ab donde Ab representa un anticuerpo,
 - V representa un átomo de oxígeno o un átomo de azufre,
 - X, Y y Z son tales que:
 - X representa CR₁₀, Y representa CR'₁₀ y Z representa OR₀, o bien
 - X representa CR₁₀, Y representa COR₀ y Z representa R'₁₀, o bien
 - 30 ◦ X representa CR₁₀, Y representa un átomo de nitrógeno y Z representa OR₀, o bien
 - X representa un átomo de nitrógeno, Y representa COR₀ y Z representa R₁₀
- en donde:
- R₀ representa un grupo glicosilo unido por su carbono anomérico al resto de la molécula de fórmula (I), y
 - 35 ◦ R₁₀ y R'₁₀, idénticos o diferentes, representan un átomo de hidrógeno o un grupo donador de electrones, tal como un alquilo (C1-C20), un arilo (C5-C24) o un alcoxi (C1-C20),
- en forma de mezcla de isómeros ópticos en cualquier proporción, o en forma enriquecida en un isómero óptico.

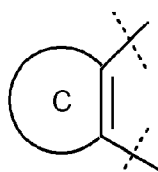
El grupo OR1 se selecciona de manera que el precipitado fluorescente obtenido que corresponde a R1OH, liberado después de la escisión del enlace -C(O)-OR1, sea un fluoróforo ESIPT, cuyo grupo -OR1 corresponde a la fórmula (A1):



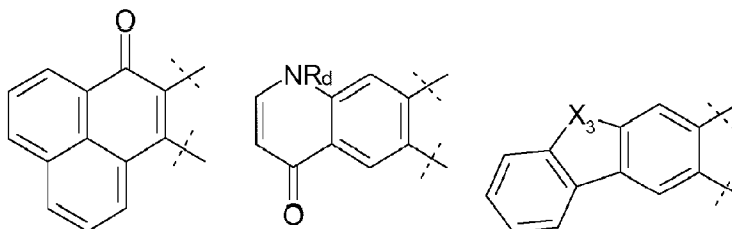
5 en donde:

- X2 es un átomo de oxígeno y X1 es un grupo -NH₂, -OH, -SH, alquilo (C1-C20), arilo (C5-C24), -O-alquilo (C1-C20), -O-fenilo, -NH-alquilo (C1-C20) o -NH-fenilo, -S-alquilo (C1-C20) o -S-arilo (C5-C24), en donde dichos grupos alquilo y fenilo están posiblemente sustituidos o no sustituidos, o bien
- X2 representa un átomo de nitrógeno y está unido a X1 que representa entonces CH, O, S, N o NH para formar un heteroarilo (C5-C24) sustituido o no sustituido,

10



- representa un arilo (C5-C24) o un heteroarilo (C5-C24), sustituido o no sustituido, elegido por ejemplo entre los grupos fenilo, naftilo y:



15 en donde dichos grupos podrían estar sustituidos o no sustituidos,

en donde X3 representa S, O o NR_d, y R_d representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo (C1-C4).

Los fluoróforos ESIPT muestran un desplazamiento de Stokes que supera los 100 nm y a menudo alcanza los 200 nm. Todos los fluoróforos ESIPT pierden esta emisión de fluorescencia correspondiente a un desplazamiento de Stokes superior a 100 nm si su grupo OH de tipo fenólico, que da lugar a la transferencia intramolecular de protones en el estado excitado, está alquilado, acilado o funcionalizado de otro modo. Esta funcionalización impide la transferencia de un átomo de hidrógeno al heteroátomo X2 en la ilustración dada con la fórmula (A1), durante la excitación por irradiación, e impide así la emisión de fluorescencia característica del proceso de transferencia de protones. La incorporación del hidroxilo HOR1 en el grupo carbamato del compuesto de fórmula (I) impide la transferencia de protones. La transferencia intramolecular de protones puede ocurrir por lo tanto gracias al grupo hidroxilo obtenido tras la ruptura del enlace -C(O)-OR1.

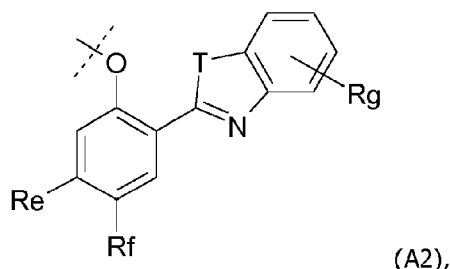
20

25

Muy a menudo, el grupo R1 corresponde a un grupo fenilo que está sustituido o no sustituido y/o que está fusionado con uno o más carbociclos insaturados, y que comprende opcionalmente un heteroátomo, tal como nitrógeno. Este derivado fenoxi OR1, cuando no está unido al sustrato, corresponde en su forma protonada a un derivado fenólico HO-R1 que pertenece a la clase de los fluoróforos ESIPT.

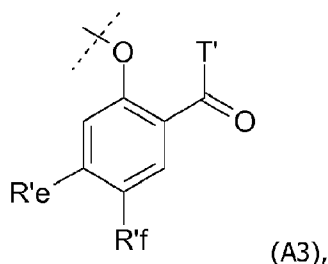
30

Los derivados de -OR1 corresponden, por ejemplo, a una de las siguientes estructuras preferidas (A2) o (A3):



en donde:

- T es -NH-C(O)-, -S-, -O-, -NH-, -N(alquil (C1-C20))- o -N(aril (C5-C24))-,
- 5 ◦ Re es un átomo de hidrógeno o un sustituyente con carbono aceptor de electrones como -CN o -COORh, en donde Rh representa un grupo alquilo (C1-C4), o Re es -CONRiRj, en donde Ri y Rj, idénticos o diferentes, representan un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo (C1-C4), o bien Re es -CF₃, o un grupo 2-oxazolilo, 2-tiazolilo, 2-imidazolilo, 2-benzoimidazolilo, 4-pirimidinon-2-ilo o quinazolinon-2-ilo,
- 10 ◦ Rf es un átomo de hidrógeno, un átomo de cloro, bromo, yodo o flúor, -OH, -NH₂, -NRkRl, -NHRk u -ORk, en donde Rk y Rl son idénticos o diferentes, y cada uno de los cuales representa independientemente un grupo alquilo (C1-C4), o bien
- Re y Rf están unidos entre sí para formar una cadena de hidrocarburo que comprende 4 o 5 miembros, saturados o insaturados, sustituidos o no sustituidos, opcionalmente interrumpidos por uno o más heteroátomos seleccionados entre N, S y O,
- 15 ◦ Rg es un átomo de hidrógeno, Br, Cl, I o F,

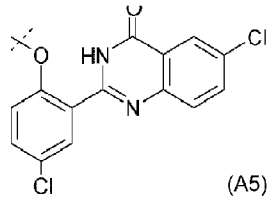


en donde:

- T' es -NH₂, -OH, un grupo arilo (C5-C24), un grupo alquilo (C1-C4), -SH, -NHR'g, -OR'g, -NR'gRh' o -SR'g, R'g y Rh', idénticos o diferentes, representan un grupo alquilo (C1-C4) o arilo,
- 20 ◦ R'e es un átomo de hidrógeno o un sustituyente con carbono aceptor de electrones como -CN o -COOR'i, en donde R'i representa un grupo alquilo (C1-C4), o R'e es -CONR'jR'k, en donde R'j y R'k, idénticos o diferentes, representan un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo (C1-C4), o bien R'e es -CF₃, o un grupo 2-oxazolilo, 2-tiazolilo, 2-imidazolilo, 2-benzoimidazolilo, 4-pirimidinon-2-ilo o quinazolinon-2-ilo,
- 25 ◦ R'f es un átomo de hidrógeno, cloro, bromo, yodo o flúor, -OH, -NH₂, -NR'IR'm u -OR'I, en donde R'I y R'm, iguales o diferentes, representan un grupo alquilo (C1-C4), o bien
- R'e y R'f están unidos entre sí para formar una cadena de hidrocarburo que comprende 4 o 5 miembros, saturados o insaturados, sustituidos o no sustituidos, opcionalmente interrumpidos por uno o más heteroátomos seleccionados entre N, S y O.

Podemos referirnos en particular a las solicitudes de patente internacional WO 2013/045854, WO 2014/020285 y WO 30 2015/197981 que dan a conocer ejemplos de tales fluoróforos ES IPT que pueden usarse en la presente invención.

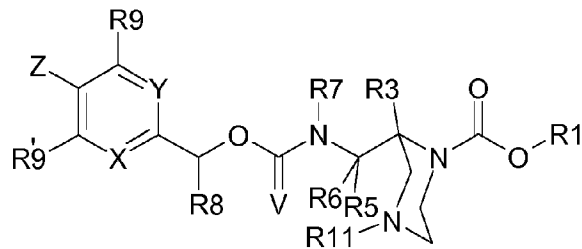
Según una realización en concreto de la invención, R1 es un grupo aromático en donde -OR1 corresponde a la siguiente fórmula (A5):



5 El gran desplazamiento de Stokes de dichos fluoróforos (aproximadamente 170 nm para A5) o cualquier análogo de HPQ contribuirá a la excelente sensibilidad de la sonda y hará que el fluoróforo liberado se distinga fácilmente de la fluorescencia nativa que puede originarse en la muestra biológica sobre la cual se realizará el análisis.

Según una realización de la invención, R2 es un alquilo (C1-C4), R3 es un alquilo (C1-C4) o un átomo de hidrógeno, y R4 es un alquilo (C1-C4). Según una realización en concreto, R2, R3 y R4, idénticos o diferentes, representan un grupo alquilo (C1-C4), por ejemplo, metilo o etilo. Según una realización en concreto, R2 = R3 = R4 = -CH₃.

10 Según otra realización, R3 es un alquilo (C1-C4) o un átomo de hidrógeno, y R2 y R4 están unidos entre sí y forman con los átomos de carbono y de nitrógeno a los que están unidos un heterociclo alifático, pudiendo estar este heterociclo sustituido por un grupo hidrosolubilizante. Según una realización en concreto, R3 es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo (C1-C4), preferiblemente un átomo de hidrógeno, y R2 y R4 están unidos entre sí formando una cadena -(CH₂)_m- en donde m = 3, 4 o 5. Según otra realización en concreto, R3 es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo (C1-C4), preferiblemente un átomo de hidrógeno, y R2 y R4 están unidos entre ellos formando una cadena -CH₂CH₂-NR₁₁-CH₂- en el sentido de R2 a R4, en donde R₁₁ representa un átomo de hidrógeno o -(L)n-GP en donde n es igual a 0 o 1, L es un brazo conector y GP un grupo hidrosolubilizante, es decir, el compuesto (I) por lo tanto tiene la fórmula:



20 Muy a menudo, por razones de síntesis, n = 1 y L es un brazo conector, y en particular un brazo -(L₁)_{m1}-(L₂)_{m2}-(L'₁)_{m'1}- (en la dirección piperazina -> grupo GP), en donde:

- L1 y L'1, iguales o diferentes, se eligen entre -O-, -NH-, -N(alquilo (C1-C6))- , -N(fenil)-, -N(aril)-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)-, -OC(O)-O-, -NHC(O)-O-, -OC(O)-NH-, -NHC(O)-NH-, -S-, -SO₂-, -N=N-, -NHC(O)- y -CONH-;
- L2 se elige entre los siguientes grupos divalentes: alquileno (C1-C20), alquenileno (C1-C20), alquinileno (C1-C20), arileno (C6-C24), alquilarileno (C7-C44), alquenilarileno (C7-C44), alquinilarileno (C7-C44), alquilocicloalquileno (C7-C44), alquenilocicloalquileno (C7-C44), alquinilocicloalquileno (C7-C44), alquilheterocicloalquileno (C7-C44), alquenilheterocicloalquileno (C7-C44), alquinilheterocicloalquileno (C7-C44); pudiendo dichos grupos estar interrumpidos o terminados por un grupo triazol, y pudiendo estar no sustituidos o sustituidos, en particular por uno o más sustituyentes elegidos entre alcoxi (C1-C10), alquilo (C1-C10), arilo (C6-C10), amido, imido, fosfido, nitrido, alquenilo (C1-C10), alquinilo (C1-C10) y -OH; y
- m1, m'1 y m2, iguales o diferentes, son iguales a 0 o 1.

35 El brazo L, cuando esté presente, se elegirá para alejar al grupo GP de la piperazina o por razones sintéticas. Según una realización preferida, L representa -(L₁)_{m1}-(L₂)_{m2}-(L'₁)_{m'1} en donde L1 = -C(O)-, m1 = m2 = 1, m'1 = 1 o 0, y L2 y L'1 tal como se definió anteriormente, y en particular L representa -C(O)-(CH₂)_p-L3- en donde p es igual a 1, 2, 3 o 4 y L3 es un grupo triazol y en particular un grupo 1H-1,2,3-triazol.

40 GP es un grupo hidrosolubilizante. Como ejemplo de grupo hidrosolubilizante, podemos citar grupos capaces de formar una especie cargada en una solución acuosa. Como ejemplo de grupo GP hidrosolubilizante, se pueden citar las funciones F1 elegidas entre amina (primaria, secundaria o terciaria), amidina, guanidina o tetrazol; las funciones F2 catiónicas o aniónicas, y en particular los grupos de tipo amonio, carboxilato, sulfonato o fosfato; grupos que comprenden una o más de estas funciones F1 y/o F2; polietilenglicoles; azúcares o polisacáridos tales como glucosa, galactosa y manosa; grupos peptídicos tales como polilisina, poliarginina, péptidos TAT. Como ejemplo de funciones amina podemos citar -NH₂, -NH-alquilo (C1-C4) y dialquilaminas en donde los grupos alquilo son idénticos o diferentes

y comprenden de 1 a 4 átomos de carbono.

Según otra realización, R2 es un alquilo (C1-C4) y R3 y R4 están unidos entre sí y forman con el átomo de carbono al que están unidos un carbociclo alifático, preferiblemente un ciclohexilo.

- 5 Estas dos formas de preorganizar el espaciador para la ciclación, que consisten en introducir dos sustituyentes alquilo (o formadores de carbociclo) en el carbono alfa del grupo -N-C(V)-O-, o bien en incluir el enlace entre el nitrógeno del grupo -N-C(V)-O- y su carbono alfa en un heterociclo, aceleran el proceso de escisión.

Según una realización, R5 y R6 son idénticos y representan un átomo de hidrógeno.

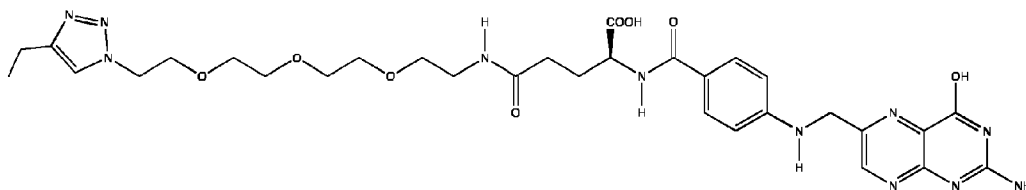
Según una realización, R7 representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo (C1-C4) tal como metilo, y preferiblemente un átomo de hidrógeno.

- 10 Según una realización, R5, R6 y R7 representan cada uno un átomo de hidrógeno.

Según una realización, R8 es un átomo de hidrógeno.

- 15 Según otra realización, R8 es un grupo -D1-D2-D3, en donde D1, D2 y D3 son como se definen en el contexto de la presente invención. Según esta realización, D3 puede representar en particular un motivo de ácido fólico, anticuerpo o péptido, que son grupos dirigidos a un receptor celular, con el fin de mejorar la selectividad de los compuestos de fórmula (I) por determinadas células concretas.

- 20 Según una realización particular de la invención, R8 es un grupo -D1-D2-D3, en donde D1 representa un grupo -CH₂-triazolilo, D2 representa un grupo alquileo (C1-C10), preferiblemente interrumpido por uno o más heteroátomos elegidos entre O o N, preferiblemente O, y D3 representa un motivo maleimidocaproilo, aminoácido, péptido, ácido fólico, anticuerpo o fragmento de anticuerpo, preferiblemente ácido fólico, unido a D2 mediante una función de tipo ácido carboxílico que comprende, para formar un enlace éster o amida, preferiblemente una función amida. Según una realización en concreto, R8 es un grupo -D1-D2-D3 de la siguiente fórmula:



- 25 Según una realización, al menos uno de los grupos R9 o R'9 representa un átomo de halógeno, un grupo -NO₂, o un grupo -CN, preferiblemente un grupo -NO₂. Según una realización preferida, R9 representa un átomo de hidrógeno y R'9 representa un átomo de halógeno, un grupo -NO₂ o un grupo -CN, preferiblemente un grupo -NO₂.

Según un modo de realización, R10, y cuando sea necesario R10', representa(n) un átomo de hidrógeno. Según una realización, V representa un átomo de oxígeno.

- 30 Los grupos R0 tienen la característica de poder ser escindidos del resto de la molécula por la acción de una enzima glicosidasa. La enzima actúa como catalizador para la escisión entre R0 y el átomo de oxígeno al que está unido. Tal corte puede ser consecuencia de una hidrólisis en medio acuoso en donde la enzima glicosidasa desempeñará la función de catalizador. Por este motivo se dice que dicha enzima glicosidasa es catalíticamente activa.

- 35 R0 representa un grupo glicosilo unido por su carbono anomérico al resto de la molécula. R0 se puede escindir del resto del compuesto de fórmula (I) por la acción catalítica de una enzima glicosidasa, en particular en medio acuoso. Como ejemplos de enzima glicosidasa a la que pueden dirigirse las sondas fluorogénicas según la invención, podemos citar N-acetil-β-galactosaminidasa; N-acetil-β-glucosaminidasa; α-amilasa; α-arabinofuranosidasa; α-arabinosidasa; β-celobiosidasa; β-quitobiosidasa; α-galactosidasa; β-galactosidasa; α-glucosidasa; β-glucosidasa; β-glucuronidasa; α-maltosidasa; α-manosidasa; β-manosidasa; β-xilosidasa; β-D-fucosidasa; α-L-fucosidasa; β-L-fucosidasa; L-iduronidasa o celulasa (Orenga, S., James, A. L., Manafi, M., Perry, J. D. y Pincus, D. H. (2009). Enzymatic substrates in microbiology. *Journal of Microbiological Methods*, 79 (2), 139-155).

- 40 El grupo R0 se elegirá preferiblemente de manera que sea específico para una glicosidasa de interés. Por otro lado, determinadas glicosidasas tienen la capacidad de escindir un conjunto de grupos R0 diferentes; entre ellos podemos citar la hexosaminidasa.

- 45 Como R0 se pueden utilizar todos los posibles grupos glicosilo que corresponden a un grupo R0-O escindible en medio acuoso en presencia de una glicosidasa. Las unidades de glicosilo pueden estar funcionalizadas o no, en particular con un grupo acetilo o amino. Las N-acetilhexosaminas son ejemplos de grupo glicosilo. Lo más frecuente es que el grupo glicosilo comprenda de 1 a 50 unidades de sacárido. En el caso de un poliglicosilo, podría ser un homopolímero o un copolímero con una estructura aleatoria, alternada o de bloques.

A continuación se dan ejemplos de tales grupos R0: grupos monoglicosilo elegidos entre galactosilo, glucosilo, manosilo, gulosilo, alosilo, altrosilo, idosilo, talosilo, fucosilo, fructosilo, arabinosilo, lixosilo, ribosilo, xilosilo, glucuronilo y N-acetil-hexosaminilo, y grupos poliglicosilados que consisten en varios de estos grupos monoglicosilados idénticos o diferentes.

5 Según un modo de realización, R0 es un grupo escindible por la acción de una glicosidasa, seleccionada entre N-acetil-β-galactosaminidasa; N-acetil-β-glucosaminidasa; α-amilasa; α-arabinofuranosidasa; α-arabinosidasa; β-celobiosidasa; β-quitobiosidasa; α-galactosidasa; β-galactosidasa; α-glucosidasa; β-glucosidasa; β-glucuronidasa; α-maltosidasa; α-manosidasa; β-manosidasa; β-xilosidasa; β-D-fucosidasa; α-L-fucosidasa; β-L-fucosidasa; L-iduronidasa o celulasa; y R0 es un grupo monoglicosilado unido por su carbono anomérico elegido entre galactosilo, glucosilo, manosilo, gulosilo, alosilo, altrosilo, idosilo, talosilo, fucosilo, fructosilo, arabinosilo, lixosilo, ribosilo, xilosilo, glucuronilo y N-acetil-hexosaminilo, o un grupo poliglicosilado que consta de varios, por ejemplo, de 2 a 20, preferiblemente de 2 a 10, y más particularmente de 2 a 6, de estos grupos monoglicosilados idénticos o diferentes.

15 Según una realización, R0 es un grupo escindible por la acción de una galactosidasa, por ejemplo una β-galactosidasa, una induronidasa, una glucosidasa, una N-acetil-D-glucosaminidasa, una N-acetil-D-galactosaminidasa, una manosidasa, una fucosidasa, una glucuronidasa, en particular una β-glucuronidasa o una celulasa; y R0 es un grupo monoglicosilado, unido por su carbono anomérico, elegido entre D-glucuronilo, L-iduronilo, D-glicopiranosilo, D-galactopiranosilo, N-acetil-D-glicosaminilo, N-acetil-D-galactosaminilo, D-manopiranosilo, L-fucopiranosilo o un grupo poliglicosilado constituido por varios, por ejemplo de 2 a 20, preferiblemente de 2 a 10 y más particularmente de 2 a 6, de estos grupos monoglicosilados idénticos o diferentes.

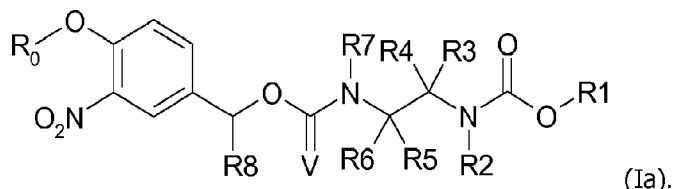
20 Según una realización, X, Y y Z son tales que:

- X representa CR10, Y representa CR'10 y Z representa OR0, o bien
- X representa CR10, Y representa COR0 y Z representa R'10

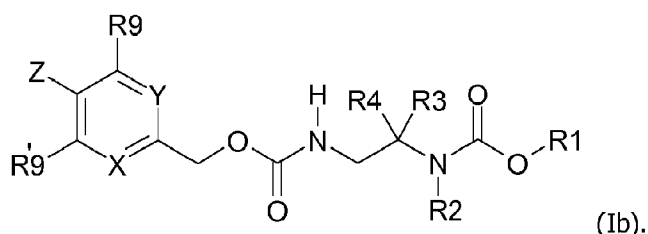
en donde R10, R'10 y R0 son tal como se definen en el contexto de la invención.

25 En el contexto de la presente invención, usaremos, en concreto, las definiciones específicas de los sustituyentes dados en combinación.

Según una primera realización en concreto, el compuesto (I) está representado por la fórmula (Ia) siguiente, en forma de una mezcla de isómeros ópticos en todas las proporciones, o en una forma enriquecida en un isómero óptico, en donde R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R0 y V son tal como se definen en el contexto de la presente invención:

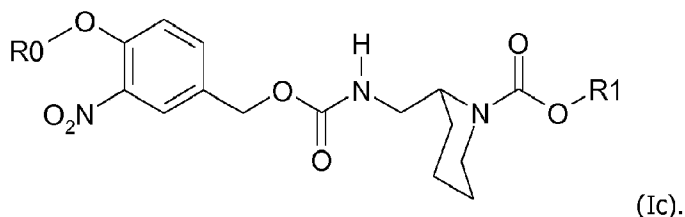


30 Según una segunda realización en concreto de la invención, el compuesto (I) está representado por la fórmula (Ib) siguiente, en forma de una mezcla de isómeros ópticos en todas las proporciones, o en forma enriquecida en un isómero óptico, en donde R1, R2, R3, R4, R9, R'9, X, Y y Z son tal como se definen en el contexto de la presente invención:

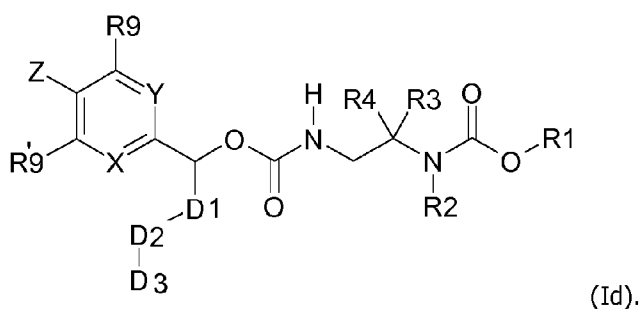


35

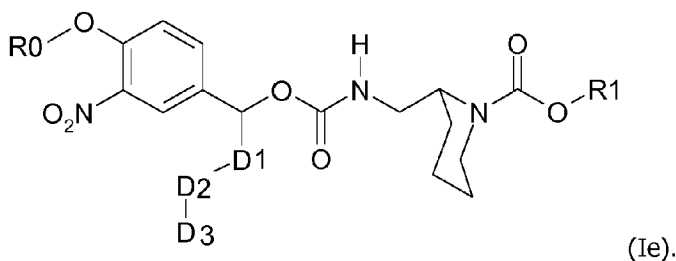
Según una tercera realización, el compuesto (I) está representado por la fórmula (Ic) siguiente, en forma de una mezcla de isómeros ópticos en todas las proporciones, o en forma enriquecida en un isómero óptico, en donde R0 y R1 son tal como se definen en el contexto de la presente invención:



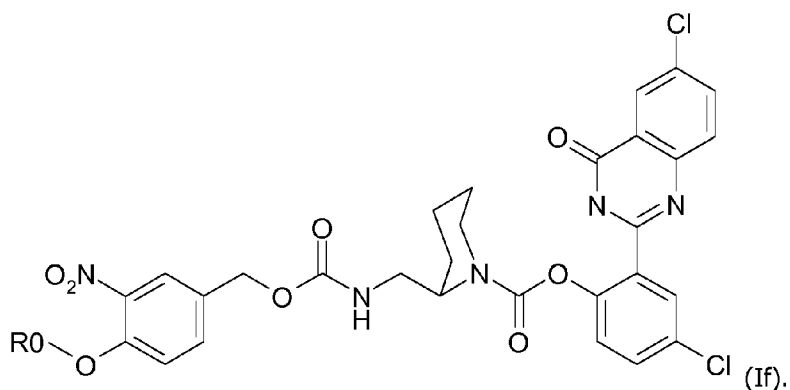
- 5 Según una cuarta realización, el compuesto (I) está representado por la fórmula (Id) siguiente, en forma de una mezcla de isómeros ópticos en todas las proporciones, o en forma enriquecida en un isómero óptico, en donde R1, R2, R3, R4, R9, R'9, D1, D2, D3, X, Y y Z son tal como se definen en el contexto de la invención:



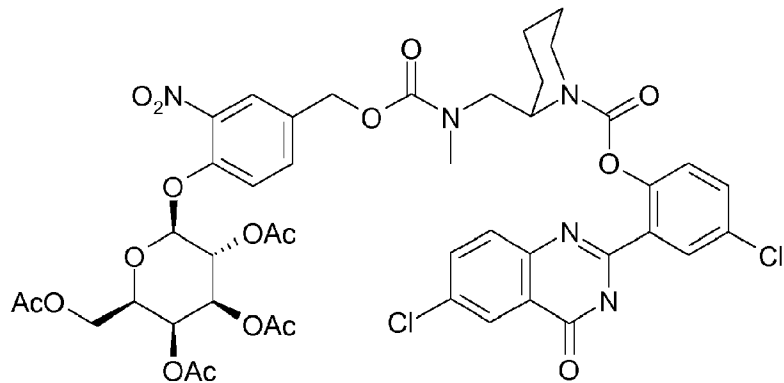
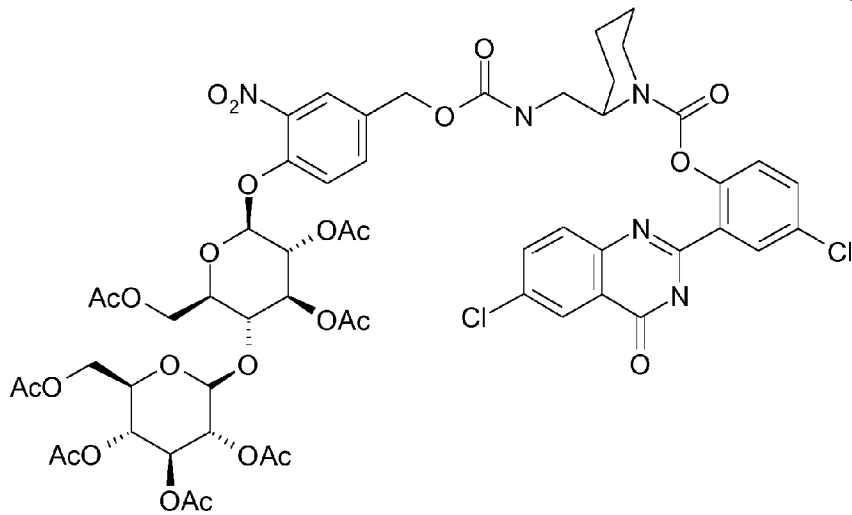
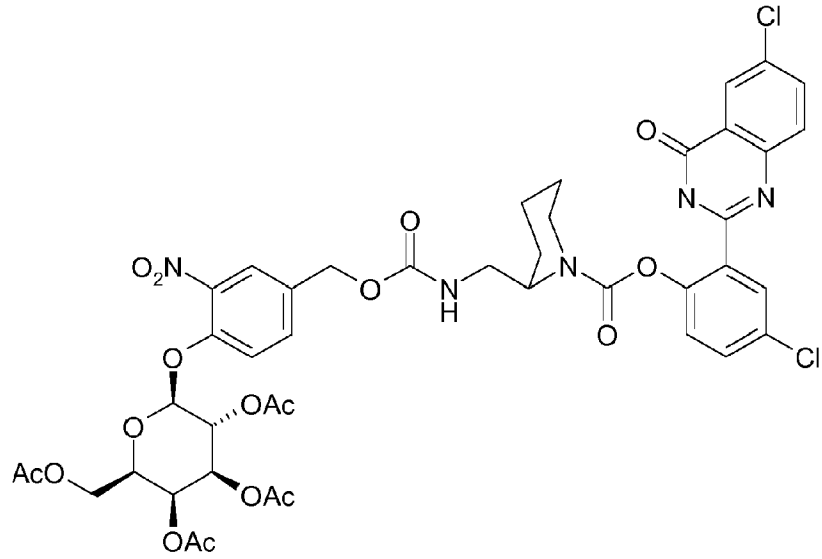
- 10 Según una quinta realización, el compuesto (I) está representado por la fórmula (Ie) siguiente, en forma de una mezcla de isómeros ópticos en todas las proporciones, o en forma enriquecida en un isómero óptico, en donde R0, R1, D1, D2 y D3 son tal como se definen en el contexto de la invención:



- 15 Según una realización particular, los compuestos de fórmula (I) son como los representados por la fórmula (If) siguiente, en forma de una mezcla de isómeros ópticos en todas las proporciones, o en forma enriquecida en un isómero óptico, en donde R0 es tal como se define en el contexto de la invención:



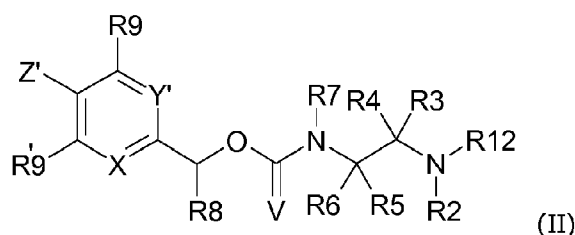
Según un modo de realización particular, la invención se refiere a compuestos, en forma de mezcla de isómeros ópticos en todas las proporciones, o en forma enriquecida en un isómero óptico, elegidos entre:



Y

Compuestos de fórmula (II)

La presente invención también se refiere a los compuestos de fórmula (II):



en donde:

- 5
- R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R'9 y V son como se define para los compuestos de fórmula (I),
 - R12 representa un átomo de hidrógeno, o un grupo protector de función amina,
 - X, Y' y Z' son tales que:
 - X representa CR10, Y' representa CR'10 y Z' representa OR'0, o bien
 - X representa CR10, Y' representa COR'0 y Z' representa R'10, o bien
- 10
- X representa CR10, Y' representa un átomo de nitrógeno y Z' representa OR'0, o bien
 - X representa un átomo de nitrógeno, Y' representa COR'0 y Z' representa R10,
- en donde R0' representa un grupo R0 del cual todas las funciones alcohol están protegidas por un grupo protector, y en donde R0, R10 y R'10 son tal como se define para los compuestos de fórmula (I),

15 en forma de una mezcla de isómeros ópticos en cualquier proporción, o en una forma enriquecida en un isómero óptico.

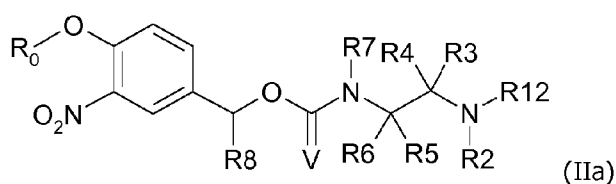
Los compuestos de fórmula (II) son intermedios en la síntesis de los compuestos de fórmula (I). Por grupo protector de las funciones amina se entienden grupos protectores tales como los descritos en *Protective in Organic Synthesis*, Greene T. W. y Wuts P. G. M., ed. John Wiley e hijos, 2006 y en *Protective Groups*, Kocienski P. J., 1994, Georg Thieme Verlag.

20 Según una realización, R12 representa un grupo que protege las funciones amina. A modo de ejemplo, R12 representa un grupo protector de funciones amina elegido entre los grupos alilo o carbamato, tales como un grupo terc-butoxicarbonilo (Boc), -fluorofenilmetoxicarbonilo (Fmoc), aliloxicarbonilo (Alloc) o 2,2,2-tricloroetoxicarbonilo (Troc).

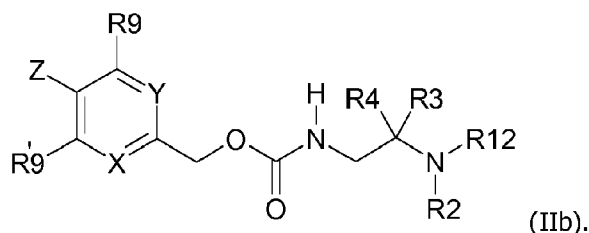
Según otra realización particular, R12 representa un átomo de hidrógeno.

25 Según una realización, R'0 representa un grupo R0 del cual todas las funciones de tipo alcohol están protegidas por un grupo que protege las funciones alcohol, preferiblemente en las condiciones de reacción utilizadas durante la reacción entre los compuestos (II) y (III), y en particular por grupos sililo, tales como grupos trimetilsililo, terc-butildimetilsililo, terc-butildifenilsililo y triisopropilsililo; en forma de acetal y en particular de 1,3-dioxolano; o en forma de éster de ácido graso.

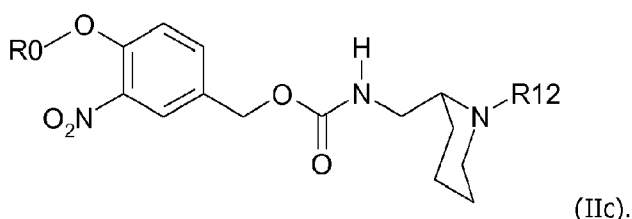
30 Según una realización de la invención, el compuesto (II) está representado por la fórmula (IIa) siguiente, en forma de una mezcla de isómeros ópticos en todas las proporciones, o en una forma enriquecida en un isómero óptico, donde R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R12, R0 y V son tal como se definen en el contexto de la invención:



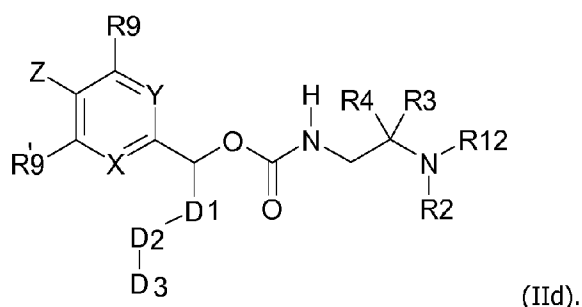
Según una segunda realización particular de la invención, el compuesto (II) está representado por la fórmula (IIb) siguiente, en forma de una mezcla de isómeros ópticos en todas las proporciones, o en forma enriquecida en un isómero óptico, en donde R2, R3, R4, R9, R'9, R12, X, Y y Z son como se define en el contexto de la invención:



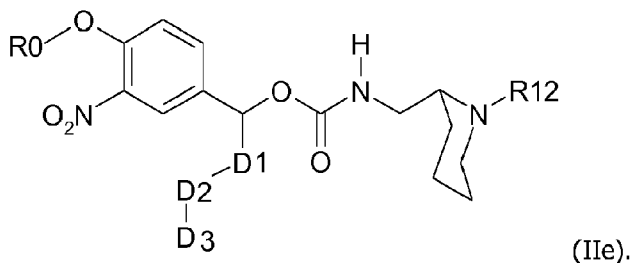
- 5 Según una tercera realización, el compuesto (II) está representado por la fórmula (IIc) siguiente, en forma de una mezcla de isómeros ópticos en todas las proporciones, o en forma enriquecida en un isómero óptico, en donde R0 y R12 son tal como se define en el contexto de la invención:



- 10 Según una cuarta realización particular de la invención, el compuesto (II) está representado por la fórmula (IId) siguiente, en forma de una mezcla de isómeros ópticos en todas las proporciones, o en forma enriquecida en un isómero óptico, en donde R2, R3, R4, R9, R'9, R12, D1, D2, D3, X, Y y Z son como tal se define en el contexto de la invención:



- 15 Según una quinta realización, el compuesto (II) está representado por la fórmula (IIe) siguiente, en forma de una mezcla de isómeros ópticos en todas las proporciones, o en forma enriquecida en un isómero óptico, en donde R0, R12, D1, D2 y D3 son como tal se definen en el contexto de la invención:

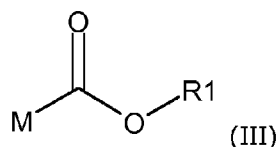


Procedimiento para preparar compuestos de fórmula (I)

- 20 La presente invención también se refiere a un procedimiento para preparar un compuesto (I), tal como se describe en el contexto de la presente invención, que comprende las siguientes etapas:

- tener un compuesto (II) tal como se describe en el contexto de la invención,

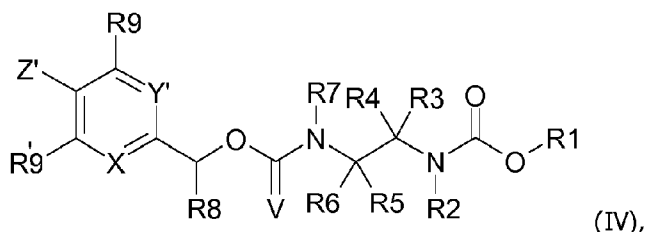
- tener un compuesto (III) de fórmula:



5

en donde R1 es tal como se define para los compuestos de fórmula (I), y M representa un grupo saliente, en concreto un átomo de halógeno, y en concreto cloro, un grupo imidazolilo o un paranitrofenoxi, y preferiblemente M representa un átomo de cloro,

- obtener el compuesto (IV) mediante una reacción de adición de dicho compuesto (II) con dicho compuesto (III), en donde dicho compuesto (IV) tiene por fórmula:



10

en donde R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R'9, V, X, Y' y Z' son tal como se define para los compuestos de fórmula (I) y (II), y

- desproteger las funciones de tipo alcohol presentes en el grupo R'0 de dichos compuestos (IV) para obtener dicho compuesto (I).

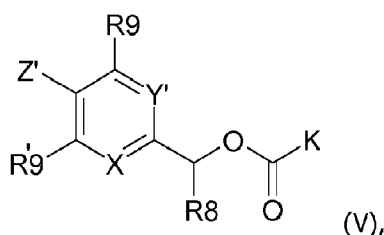
Según una realización, la reacción de adición del compuesto (II) al compuesto (III) se lleva a cabo con un compuesto (II) en donde R12 es un átomo de hidrógeno.

15

Según otra realización, está disponible un compuesto (II) en donde R12 no es un átomo de hidrógeno, y se lleva a cabo una etapa de desprotección de la función amina del compuesto (II) antes de la reacción de adición del compuesto (II) al compuesto (III), para obtener un compuesto (II) tal que R12 = H.

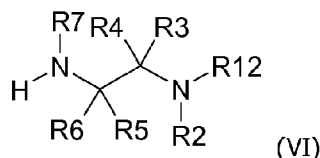
Cuando V = O, el compuesto (II) se puede obtener ventajosamente según las siguientes etapas:

- tener un compuesto (V) de la siguiente fórmula:



20

- tener un compuesto (VI) de la siguiente fórmula:



- y obtener el compuesto (II) mediante la reacción de adición de dicho compuesto (VI) al compuesto (V),

25

en donde R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R'9, R12 X, Y' y Z' son tal como se define en el contexto de la invención, y K representa un grupo saliente, en concreto un halógeno, y en concreto cloro, o un grupo imidazolilo o paranitrofenoxi.

Cuando R8 = D1-D2-D3, R8 se puede introducir mediante química de tipo clic. La formación de un grupo triazol se puede llevar a cabo mediante la reacción entre funciones -N₃ y alquínilo, según las técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica.

Más particularmente, cuando R8 = D1-D2-D3, en donde D1 representa un grupo -CH₂-triazolilo, D2 representa un grupo alquileo (C1-C10), preferiblemente interrumpido por uno o más heteroátomos seleccionados entre O o N, preferiblemente O, y D3 representa una unidad de ácido fólico, unida a D2 por una función ácido carboxílico comprendida en él para formar un enlace amida, R8 puede introducirse mediante reacción entre un alquino, transportado por el precursor del compuesto de fórmula (I) y una azida según una reacción de cicloadición de Huisgens. La azida se forma previamente por reacción entre la función ácida del ácido fólico y la función amina de un compuesto de fórmula H₂N-D2-N₃.

También es posible, preferiblemente, utilizar los métodos ilustrados en los ejemplos.

Detección de la presencia de glicosidas.

Los compuestos de fórmula (I) según la invención se pueden utilizar para detectar una glicosidasa *in vivo* en los animales o en los humanos.

El compuesto de fórmula (I) se puede administrar mediante inyección intravenosa o intraperitoneal, o por vía cutánea, al rociar con un pulverizador que contiene la molécula en solución, por ejemplo.

El análisis de la fluorescencia del compuesto de fórmula (I) puede realizarse con una cámara de imágenes utilizando las técnicas tales como la tomografía de fluorescencia o la epifluorescencia.

La invención también se refiere a un método para detectar *in vitro* o *ex vivo* la presencia de una glicosidasa mediante un compuesto (I) según la invención. Más específicamente, la invención se refiere a un método para detectar *in vitro* o *ex vivo* la presencia de una glicosidasa que comprende las etapas de:

- poner en contacto una muestra sospechosa de contener dicha glicosidasa con un compuesto (I) según la invención,
- aplicar las condiciones apropiadas para permitir la formación de un compuesto fluorescente, en particular en forma de precipitado, por escisión del enlace covalente entre O y R0, seguida de la escisión del enlace -C(O)-OR1, que conduce a la liberación de HOR1 y
- hacer el análisis cuantitativo o cualitativo de dicho precipitado fluorescente.

La muestra puede ser cualquier muestra biológica apropiada procedente de un hombre, de un animal, de una planta o de un microorganismo. En el caso de una muestra procedente de un hombre o de un animal, se puede tratar en particular de una muestra de líquido biológico, en particular de una muestra de sangre completa, de suero, de plasma, de orina, de una muestra de tejido o de células aisladas, y en particular de un medio celular. En el caso de una muestra procedente de una planta, puede tratarse de un extracto de planta, de hongo o de alga, de células vivas y, en particular, de un medio celular. También es posible que la muestra incluya directamente la planta. En el caso de una muestra procedente de un microorganismo, el microorganismo puede ser una bacteria, un virus, un hongo o una levadura, y también puede tratarse de una microbiota. La muestra puede incluir el microorganismo directamente, o un extracto del mismo, o incluso el medio de cultivo en donde se incubó el microorganismo. En todos los casos, la muestra puede utilizarse tal cual, o bien someterse, antes de colocarla en presencia de la sonda, a una preparación de tipo enriquecimiento o cultivo, bien conocida por el experto en la técnica.

En el caso de una muestra procedente de un animal, de una planta o de un microorganismo, la invención se refiere a un método para detectar la presencia de una glicosidasa catalíticamente activa que comprende las etapas de:

- poner en contacto una muestra sospechosa de contener dicha glicosidasa con un compuesto (I) según la invención, el susodicho,
- aplicar las condiciones apropiadas para permitir la formación de un compuesto fluorescente, en particular en forma de precipitado, por escisión del enlace covalente entre O y R0, seguida de la escisión del enlace -C(O)OR1, seguida de reacciones de eliminación y de ciclación del tándem de espaciadores, y
- hacer el análisis cuantitativo o cualitativo de dicho precipitado fluorescente.

El análisis del compuesto fluorescente o precipitado puede comprender:

- una etapa de exposición del precipitado fluorescente a una fuente de luz capaz de producir luz a una longitud de onda de absorción del precipitado fluorescente, y
- una etapa de detección de la fluorescencia resultante del precipitado.

El análisis puede comprender además una etapa, posterior a la etapa de detección de la fluorescencia, de clasificar las muestras analizadas en función de la señal proporcionada por dicho precipitado fluorescente. Las muestras clasificadas pueden ser colonias de microorganismos separados en el espacio, como por ejemplo en placas de cultivo microbiológico. Las muestras clasificadas también pueden ser objetos pequeños, líquidos, sólidos, gelatinosos o de composición heterogénea, que contienen biomoléculas o colonias de microorganismos. Cuando la detección se realiza en paralelo sobre varias muestras, la clasificación se puede realizar, por ejemplo, por la desviación de un flujo de muestras puesto en movimiento en un dispositivo que permite clasificarlas según una señal óptica, representativa de la fluorescencia emitida, como un citómetro de flujo o un dispositivo de mili- o microfluidica digital.

La presente invención hace accesible la actividad glicosidasa mediante imágenes de fluorescencia utilizando fluoróforos ES IPT. Ventajosamente, no se observa ningún ruido de fondo debido a una degradación espontánea (es decir, en ausencia de glicosidasa diana, en un entorno fisiológico). La propia sonda emite poca o ninguna fluorescencia, particularmente en la longitud de onda de emisión del fluoróforo ES IPT libre al que está sintonizado el instrumento de detección/imagen. La sonda funciona así en modo apagado/encendido y puede utilizarse para el desarrollo del análisis con la máxima sensibilidad. Esta invención hace posible, dependiendo del grupo R0 seleccionado, detectar las glicosidasas con alta selectividad por determinados grupos glicosilo.

Las sondas según la invención son atractivas para varias aplicaciones de alta sensibilidad en las ciencias biológicas y, en particular: (1) la detección de alto rendimiento de la actividad glicosidasa expresada por colonias bacterianas en una placa de agar (análisis de colonias); (2) la detección *in vitro* de la glicosidasa en líquidos biológicos (hematología y otros); (3) la visualización de la actividad de la glicosidasa a nivel de una sola célula mediante citometría de flujo; (4) la detección de las glicosidasas subcelulares en células cultivadas (microscopía de fluorescencia confocal); (5) la detección histoquímica de la glicosidasa (a escala de tejido); y finalmente (6) la toma de imágenes *in vivo* de un animal entero.

Por tanto, los compuestos de la fórmula (I), como sustratos de glicosidasas según la presente invención, tienen un gran número de aplicaciones potenciales. Los ejemplos de tales aplicaciones incluyen el diseño de ensayos sobre colonias bacterianas. Actualmente, estos análisis se llevan a cabo en una placa de agar (placa de Petri) donde se pueden distinguir hasta 3.000 colonias sin tener que separarlas activamente en compartimentos independientes, como los pocillos contenidos en una placa multipocillo. De este modo, es posible (1) diseñar pruebas con muestras clínicas que permitan identificar, entre un conjunto de líneas bacterianas, un linaje patógeno de interés y (2) realizar pruebas paralelas masivas de un banco de proteínas de su propia producción expresadas por un hospedador bacteriano clásico (a menudo comercial). Por supuesto, esta colección de proteínas puede contener una proteína de particular interés, por ejemplo, una glicosidasa que tiene selectividad por un grupo glicosilo específico, o una glicosidasa que hidroliza un enlace glicosídico no natural. En el campo de la evolución dirigida de las glicosidasas en general o de las enzimas en particular, existe una fuerte demanda de análisis eficientes y sensibles para detectar selectivamente un gran número de variantes de proteínas que superan fácilmente las 10^6 . La aplicación de la sonda según la invención se puede considerar que es más fácil si se disuelve en la solución de agar antes de verterla en la placa donde se gelificará. Como alternativa, los sustratos se incuban con las colonias sumergiendo un filtro antes de presionarlo sobre las colonias. La principal ventaja a la que contribuye la sonda según la invención para dicho análisis en colonias es la precipitación *in situ* del fluoróforo; por lo tanto, se reduce mucho la dilución de la señal fluorescente por difusión, lo que permite unos tiempos de incubación más prolongados y, por tanto, una mayor sensibilidad para el análisis. El gran desplazamiento de Stokes de la dicloro-HPQ (aproximadamente 140 nm) o cualquier análogo de HPQ no debe subestimarse; también contribuye a la excelente sensibilidad. y la fluorescencia emitida se distingue fácilmente de la fluorescencia nativa que podría provenir de la muestra biológica.

Las sondas según la invención también se pueden utilizar para la obtención de imágenes de fluorescencia macroscópica, es decir, a nivel de todo el organismo. En este caso, la sonda atravesará la pared celular para alcanzar la actividad de interés.

Los ejemplos, en relación con las figuras adjuntas, permiten ilustrar la invención, pero no tienen carácter limitativo.

La figura 1 es un diagrama que muestra el mecanismo de degradación de los compuestos de fórmula (I) y se basa en el tándem de espaciadores.

La figura 2 es una curva de la evolución de la fluorescencia en estado sólido de las sondas **13** y **27** de los ejemplos 1 y 3, y para la sonda **28** de la técnica anterior a 37 °C (concentración: 10 μM).

En la figura 3 se representan las curvas de evolución de la fluorescencia en estado sólido para la sonda **21** del ejemplo 2 a 37 °C (concentraciones: 0 μM, 5 μM, 10 μM, 25 μM y 50 μM).

En la figura 4 se representa la señal luminosa que testimonia la actividad celulasa producida por el microorganismo.

La figura 5 es un gráfico en el que se representa la cinética de detección de la actividad celulasa en un medio de cultivo de microorganismos.

Ejemplos**Consideraciones generales**

La cromatografía en columna se llevó a cabo sobre gel de sílice de malla 60 (40-63 μm). Los espectros de la RMN de ^1H y de ^{13}C se registraron a 300 MHz y a 75 o 125 MHz, respectivamente, en cloroformo deuterado, DMSO deuterado o metanol deuterado. Los desplazamientos químicos (δ) se indican en ppm y se anotan con respecto al tetrametilsilano o en función de las señales residuales del solvente; se utilizan las abreviaturas s = singulete, d = doblete, t = triplete, m = multiplete, b = grande. Las constantes de acoplamiento de la RMN (J) se indican en hercios (Hz). Los análisis de fluorescencia se llevaron a cabo en placas de polipropileno negro de 96 pocillos (Corning Costar, Corning Inc.) y se registraron en un fluorímetro de microplacas (lector de placas EnSpire de Perkin Elmer). Salvo que se indique otra cosa, los productos químicos se compraron con calidad de reactivo analítico y se utilizaron sin ninguna purificación adicional.

El DCM anhidro comercial se secó y se purificó pasándolo a través de una columna de alúmina activada en argón (sistema de estación de solvente GT S100). El TEA se destiló a partir de hidruro de calcio y se conservó en gránulos de KOH. Los demás reactivos marcados como anhidros se secaron sobre tamices moleculares. A menos que se indique otra cosa, todas las reacciones se llevaron a cabo en una atmósfera de aire con solventes y reactivos comerciales, sin secado ni purificación adicionales. En todos los experimentos se utilizó agua Millipore obtenida de un sistema de purificación Elga Purelab.

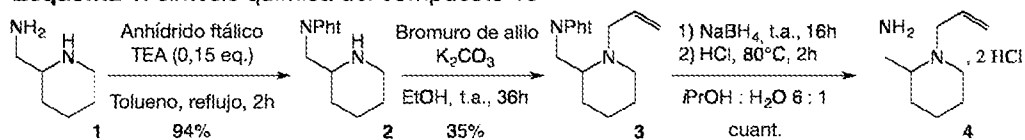
Se utilizan las siguientes abreviaturas:

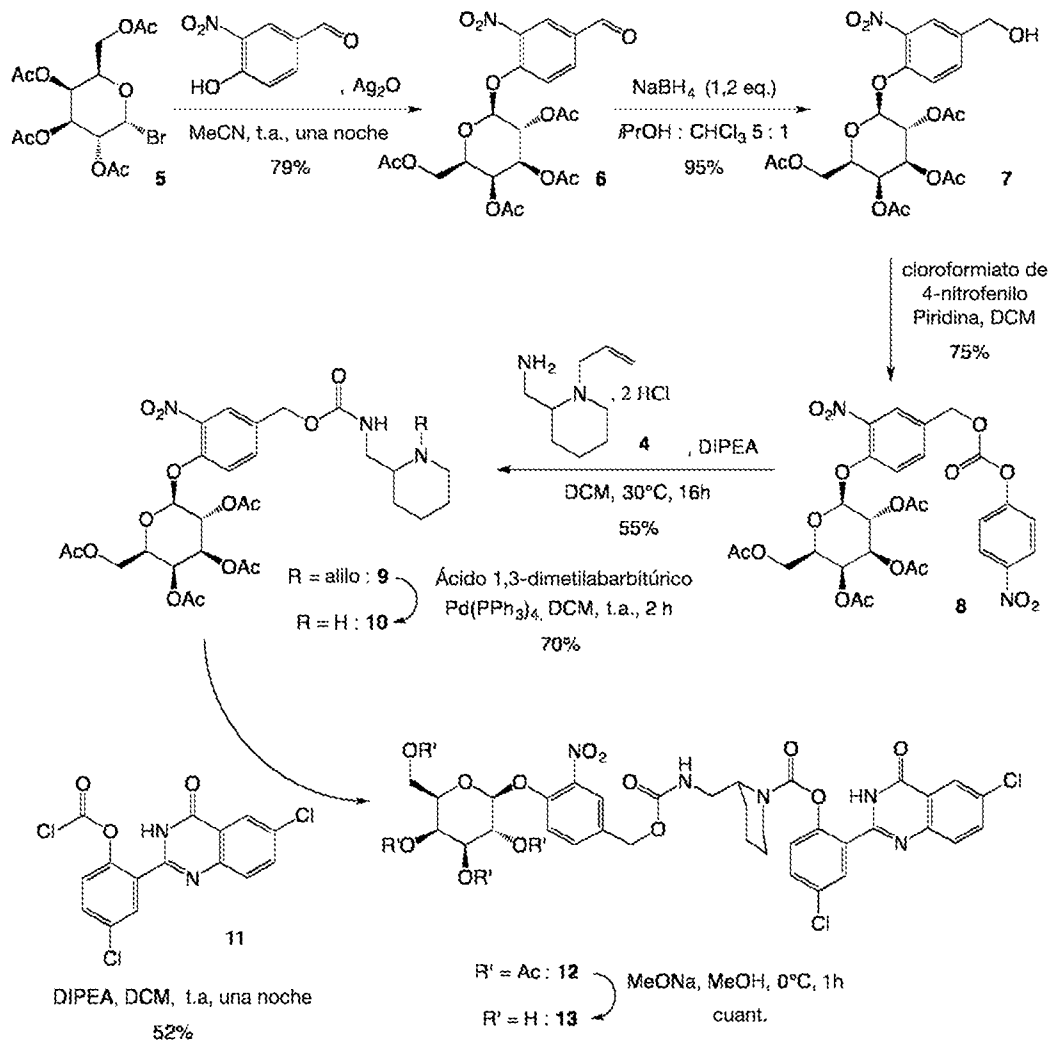
- DIPEA = diisopropiletilamina
- TEA = trietilamina
- py = piridina
- DCM = diclorometano
- Rdt = rendimiento
- DMSO = dimetilsulfóxido
- TFA = ácido trifluoroacético
- t.a. = temperatura ambiente

Ejemplo 1

El compuesto **13** se prepara como se describe en el **esquema 1** siguiente.

Esquema 1: síntesis química del compuesto 13





Preparación del compuesto 2:

A una solución de 2-aminometilpiperidina **1** (3,0 g, 26,3 mmol, 1,0 eq.) en 100 ml de tolueno se le añadió poco a poco anhídrido ftálico (3,89 g, 26,3 mmol, 1,0 eq.) y gota a gota trietilamina (550 μ l, 3,95 mmol, 0,15 eq.). Luego la mezcla se calentó a reflujo durante 2 h con un aparato Dean-Stark. A continuación, la mezcla se filtró y el solvente se evaporó a presión reducida. El compuesto **2** (6,605 g, 24,7 mmol, rendimiento: 94 %) se obtuvo en forma de un sólido amarillo pálido y se usó sin purificación.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 7,89-7,82 (m, 2H), 7,75-7,68 (m, 2H), 3,68 (d, j = 4 Hz, 2H), 3,13-3,05 (m, 1H), 2,98-2,88 (m, 1H), 2,64-2,54 (m, 1H), 1,87-1,78 (m, 1H), 1,76-1,68 (m, 1H), 1,63-1,54 (m, 1H), 1,45-1,34 (m, 2H), 1,30-1,15 (m, 1H).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 168,4, 133,7, 131,9, 123,0, 55,5, 46,4, 43,4, 30,6, 26,1, 24,1.

HRMS: ESI: $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z encontrado 245,1290, calc. 245,1290

Preparación del compuesto 3:

A una solución del compuesto **2** (6,605 g, 24,7 mmol, 1,0 eq.) en 80 ml de etanol enfriado en un baño de hielo, se le añadieron carbonato de potasio (4,36 g, 31,6 mmol, 1,3 eq.), yoduro de tetra-*n*-butilamonio (912 mg, 2,47 mmol, 0,10 eq.) y bromuro de alilo (2,73 ml, 31,6 mmol, 1,3 eq.). Se retiró el baño de hielo y la mezcla se agitó durante 36 h. Al final de la reacción, la mezcla se filtró a través de Celite y se evaporó a presión reducida. El aceite residual se disolvió en EtOAc y se le añadió una solución acuosa saturada de NH_4Cl . Se separaron las dos fases, y la fase orgánica se lavó dos veces con una solución acuosa saturada de NH_4Cl . Las fases acuosas combinadas se extrajeron 3 veces con EtOAc. Las fases orgánicas combinadas se secaron con Na_2SO_4 , se filtraron y se concentraron a presión reducida. El producto bruto se purificó mediante una columna cromatográfica sobre gel de sílice (DCM puro, luego DCM:MeOH:Et $_3\text{N}$ / 99:0,5:0,5 / v:v:v) para obtener el compuesto **3** en forma de un aceite amarillo que cristaliza (2,24 g, 7,89 mmol, rendimiento: 35 %).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7,84-7,78 (m, 2H), 7,72-7,65 (m, 2H), 5,95-5,81 (m, 1H), 5,22-5,08 (m, 2H), 3,93 (dd, 1H, *j* = 13 Hz, *j* = 5 Hz), 3,73 (dd, 1H, *j* = 13 Hz, *j* = 8 Hz), 3,42 (dd, 1H, *j* = 14 Hz, *j* = 6 Hz), 3,21 (dd, 1H, *j* = 14 Hz, *j* = 6 Hz), 2,88-2,76 (m, 2H), 2,37-2,28 (m, 2H), 1,74-1,47 (m, 4H), 1,40-1,25 (m, 2H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 168,3, 135,5, 133,8, 132,0, 123,0, 117,2, 57,6, 57,3, 50,3, 38,4, 28,1, 24,7, 22,0.

5 HRMS: ESI: [M+H]⁺ m/z encontrado 285,1595, calc. 285,1603

Preparación del compuesto 4:

10 A una solución de **3** (1,312 g, 4,6 mmol, 1,0 eq.) en *i*PrOH:H₂O / 6:1 / v:v (50 ml) enfriado en hielo se le añadió poco a poco borohidruro de sodio (874 mg, 23 mmol, 5,0 eq.). Después de agitar a temperatura ambiente durante la noche, se acidificó el pH a pH = 1 con una solución acuosa de HCl al 37 %. La mezcla se filtró y luego se calentó a 80 °C durante 2 h. Se evaporó el *i*PrOH a presión reducida y la solución acuosa resultante se lavó 5 veces con éter dietílico y luego se liofilizó. El compuesto **4** se obtuvo en forma de un polvo blanco (1,045 g, 4,6 mmol, rendimiento cuantitativo).

RMN del producto básico (1-alil-2-(aminometil)piperidina): RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 5,99-5,86 (m, 1H), 5,24-5,13 (m, 2H), 3,41 (ddt, 1H, *j* = 14 Hz, *j* = 5,7 Hz, *j* = 1,5 Hz), 3,04-2,90 (m, 3H), 2,74 (dd, 1H, *j* = 13 Hz, *j* = 3,3 Hz), 2,21 (tt, 2H, *j* = 9,6 Hz, *j* = 3,3 Hz), 1,80-1,71 (m, 1H), 1,68-1,43 (m, 2H), 1,39-1,25 (m, 3H).

15 RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 134,93, 116,87, 61,47, 56,23, 51,93, 42,97, 28,28, 24,95, 23,66.

HRMS: ESI: [M+H]⁺ m/z encontrado 155,1543, calc. 155,1548

Preparación del compuesto 6:

20 Se disolvieron acetobromogalactosa **5** (700 mg, 1,70 mmol, 1,0 eq.), 4-hidroxi-3-nitrobenzaldehído (313 mg, 1,87 mmol, 1,1 eq.) y Ag₂O (1,300 g, 5,61 mmol, 3,3 eq.) en acetonitrilo y se agitó durante la noche a temperatura ambiente. Luego se filtró la mezcla de reacción a través de Celite y se concentró a presión reducida. El aceite resultante se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (éter de petróleo:acetato de etilo / 4:6 / v:v) para obtener el compuesto **6** en forma de un sólido amarillo pálido (669 mg, 1,34 mmol, rendimiento: 79 %).

25 RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 9,98 (s, 1H), 8,45 (d, *j* = 2 Hz, 1H), 8,26 (dd, *j* = 9 Hz, *j* = 2 Hz, 1H), 7,60 (d, *j* = 9 Hz, 1H), 5,80 (d, *j* = 8 Hz, 1H), 5,40 (bs, 1H), 5,30-5,27 (m, 2H), 4,55 (td, *j* = 6 Hz, *j* = 1 Hz, 1H), 4,15 (d, *j* = 6 Hz, 2H), 2,16 (s, 3H), 2,05 (s, 3H), 2,04 (s, 3H), 1,96 (s, 3H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 188,55, 170,24, 170,07, 169,16, 153,45, 141,25, 133,96, 131,48, 126,84, 118,80, 100,09, 71,82, 70,35, 67,59, 66,58, 61,36, 20,66, 20,61, 20,59, 20,55.

HRMS: ESI: [M+Na]⁺ m/z encontrado 520,1052, calc. 520,1067

Preparación del compuesto 7:

30 A una solución del compuesto **6** (636 mg, 1,28 mmol, 1,0 eq.) en CHCl₃:*i*PrOH 5:1 v:v (12 ml) en un baño de hielo se le añadió borohidruro de sodio (53 mg, 1,41 mmol, 1,1 eq.). La reacción se agitó durante 1 hora y se detuvo añadiendo una solución acuosa saturada de NH₄Cl. Después de 5 min de agitación, se separaron las fases y la fase acuosa se extrajo dos veces con diclorometano. Las fases orgánicas combinadas se secaron con Na₂SO₄, se filtraron y se evaporaron a presión reducida para dar el compuesto **7** en forma de polvo blanco (605 mg, 1,22 mmol, rendimiento: 95 %) que se usó en el siguiente paso sin purificación.

35 RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 7,80 (d, *j* = 2 Hz, 1H), 7,63 (dd, *j* = 9 Hz, *j* = 2 Hz, 1H), 7,37 (d, *j* = 9 Hz, 1H), 5,56 (d, *j* = 7 Hz, 1H), 5,43 (t, *j* = 6 Hz, 1H), 5,37 (d, *j* = 3 Hz, 1H), 5,31-5,19 (m, 2H), 4,53-4,45 (m, 3H), 4,19-4,08 (m, 2H), 2,16 (s, 3H), 2,04 (s, 6H), 1,95 (s, 3H).

40 RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 170,54, 170,46, 170,13, 169,47, 147,70, 140,84, 138,90, 132,41, 122,80, 118,30, 99,34, 71,35, 70,54, 68,34, 67,72, 61,94, 61,87, 21,10, 20,98, 20,92.

HRMS: ESI: [M+Na]⁺ m/z encontrado 522,1209, calc. 522,1224

Preparación del compuesto 8:

45 A una solución del compuesto **7** (120 mg, 0,240 mmol, 1,0 eq.) en DCM anhidro (5 ml) enfriado en hielo, se le añadieron sucesivamente cloroformiato de 4-nitrofenilo (107 mg, 0,53 mmol, 2,2 eq.) y piridina (48 μl, 0,60 mmol, 2,5 eq.) gota a gota. La mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 30 min y a temperatura ambiente durante 2 h. Al final de la reacción, se detuvo la reacción usando una solución acuosa de HCl a 1 M y se separaron las fases. La fase orgánica se lavó con una solución de HCl a 1 M y las fases acuosas combinadas se extrajeron con DCM. Las fases orgánicas se secaron con Na₂SO₄, se filtraron y se evaporaron a presión reducida. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (gradiente de éter de petróleo:acetato de etilo / 85:15 a 50:50 / v:v) para obtener el compuesto **8** en forma de un sólido blanco (111 mg, 0,18 mmol, rendimiento: 75 %).

50

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 8,32 (d, *j* = 9 Hz, 2H), 7,94 (d, *j* = 2 Hz, 1H), 7,64 (dd, *j* = 9 Hz, *j* = 2 Hz, 1H), 7,44-7,39 (m, 3H), 5,59 (dd, *j* = 10 Hz, *j* = 8 Hz, 1H), 5,52 (d, *j* = 3 Hz, 1H), 5,33 (s, 2H), 5,17-5,14 (m, 2H), 4,30 (dd, *j* = 11 Hz, *j* = 7 Hz, 1H), 4,23-4,14 (m, 2H), 2,23 (s, 3H), 2,17 (s, 3H), 2,11 (s, 3H), 2,06 (s, 3H).

5 RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ = 171,0, 137,8, 135,1, 129,4, 128,9, 128,9, 128,8, 128,4, 127,3, 127,2, 80,1, 62,8, 54,2, 53,0, 49,7, 43,9, 41,0, 40,1, 28,5 ppm.

EM: ESI: [M+Na]⁺ m/z encontrado 687,1263, calc. 687,1286

Preparación del compuesto 9:

10 A una suspensión de compuesto **4** (44 mg, 0,20 mmol, 1,3 eq.) en DCM (3 ml) se le añadió el compuesto **8** (100 mg, 0,150 mmol, 1,0 eq.). La mezcla de reacción se enfría en un baño de hielo y se le añade DIPEA (81 μl, 0,47 mmol, 3,1 eq.). Al cabo de 5 min, se retira el baño de hielo y la mezcla de reacción se calienta a 30 °C durante la noche. A continuación, la mezcla se lavó con soluciones acuosas saturadas de Na₂CO₃ y NaHCO₃, se secó con Na₂SO₄, se filtró y se evaporó a presión reducida. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice para obtener el compuesto **9** en forma de sólido blanco (56 mg, 0,083 mmol, rendimiento: 55 %).

15 RMN: RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7,82 (d, *j* = 2 Hz, 1H), 7,53 (dd, *j* = 9 Hz, *j* = 2 Hz, 1H), 7,35 (d, *j* = 9 Hz, 1H), 5,93-5,75 (m, 1H), 5,56 (dd, *j* = 10 Hz, *j* = 8 Hz, 1H), 5,48 (d, *j* = 3 Hz, 1H), 5,32 (bs, 1H), 5,22-5,06 (m, 6H), 4,29-4,14 (m, 2H), 4,11-4,06 (m, 1H), 3,43-3,22 (m, 3H), 2,99-2,88 (m, 2H), 2,43-2,36 (m, 1H), 2,21 (s, 3H), 2,14 (s, 3H), 2,09 (s, 3H), 2,03 (s, 3H), 1,76-1,25 (m, 6H).

20 RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 170,31, 170,19, 170,13, 169,40, 156,26, 148,92, 141,30, 134,68, 133,19, 133,14, 124,59, 119,83, 117,75, 100,82, 71,47, 70,57, 67,85, 66,75, 64,74, 61,37, 58,30, 56,36, 51,99, 42,51, 28,97, 25,00, 23,73, 20,70, 20,67, 20,59.

HRMS: ESI: [M+H]⁺ m/z encontrado 680,2683, calc. 680,2667

Preparación del compuesto 10:

25 Una solución del compuesto **9** (20 mg, 0,029 mmol, 1,0 eq.) y ácido 1,3-dimetilbarbitúrico (37 mg, 0,24 mmol, 8,0 eq.) en DCM anhidro (3 ml) se desgasificó con un flujo de argón. Luego, se le añadió tetrakis(trifenilfosfina) de paladio(0) (0,6 mg, 0,0005 mmol, 2 mol %). Al final de la reacción, la mezcla de reacción se evaporó hasta la sequedad y se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice para obtener el compuesto **10** en forma de un sólido blanco (13 mg, 0,020 mmol, rendimiento: 70 %).

30 RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7,82 (d, *j* = 2 Hz, 1H), 7,52 (dd, *j* = 9 Hz, *j* = 2 Hz, 1H), 7,35 (d, *j* = 9 Hz, 1H), 5,56 (dd, *j* = 10 Hz, *j* = 8 Hz, 1H), 5,48 (d, *j* = 3 Hz, 1H), 5,32-5,26 (m, 1H), 5,14-5,06 (m, 4H), 4,30-4,15 (m, 2H), 4,11-4,06 (m, 1H), 3,29-3,20 (m, 1H), 3,11-3,00 (m, 2H), 2,72-2,58 (m, 2H), 2,20 (s, 3H), 2,14 (s, 3H), 2,09 (s, 3H), 2,03 (s, 3H), 1,87-1,77 (m, 1H), 1,68-1,59 (m, 2H), 1,42-1,34 (m, 2H), 1,31-1,26 (m, 1H).

35 RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 170,32, 170,19, 170,14, 169,40, 156,15, 148,92, 141,30, 133,14, 133,10, 124,59, 119,84, 100,82, 71,48, 70,57, 67,85, 66,73, 64,73, 61,36, 56,03, 46,88, 46,68, 30,26, 26,47, 24,26, 20,70, 20,67, 20,59.

HRMS: ESI: [M+H]⁺ m/z encontrado 640,2337, calc. 640,2354

Preparación del compuesto 12:

40 A una suspensión del compuesto **10** (13 mg, 0,020 mmol, 1,0 eq.) en DCM anhidro (2 ml) en una atmósfera de argón y enfriado en hielo, se le añadió gota a gota una solución del compuesto **11** (8 mg, 0,021 mmol, 1,05 eq.) y DIPEA (10 μl, 0,060 mmol, 3,0 eq.). Después de la adición, la mezcla de reacción se mezcló a 0 °C durante 30 min y luego a temperatura ambiente durante la noche. Luego se lavó la mezcla de reacción 3 veces con una solución acuosa saturada de NaHCO₃ y la fase orgánica se secó con Na₂SO₄, se filtró y se evaporó a presión reducida. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice para obtener el compuesto **12** en forma de polvo blanco (10 mg, 0,010 mmol, rendimiento: 52 %).

45 RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 10,41-10,29 (m, 1H), 8,24 (bs, 1H), 8,16-8,05 (m, 1H), 7,85-7,63 (m, 2,5H), 7,57-7,46 (m, 2H), 7,45-7,37 (m, 0,5H), 7,25-7,08 (m, 2H), 6,23-6,10 (m, 0,5H), 5,83-5,75 (m, 0,5H), 5,57 (dd, *j* = 10 Hz, *j* = 8 Hz, 1H), 5,49 (d, *j* = 3 Hz, 1H), 5,17-4,96 (m, 2H), 4,94-4,69 (m, 1H), 4,58 (bs, 1H), 4,33-3,99 (m, 4H), 3,79-3,63 (m, 1H), 3,39-3,01 (m, 2H), 2,21 (s, 3H), 2,16 (s, 3H), 2,09 (s, 3H), 2,04 (s, 3H), 1,82-1,24 (m, 6H).

50 RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 170,36, 170,20, 170,14, 169,39, 161,09, 156,42, 152,66, 149,05, 147,37, 140,98, 139,32, 135,29, 133,30, 132,64, 132,37, 130,70, 129,72, 127,87, 125,88, 125,39, 125,04, 124,39, 124,03, 122,30, 119,77, 114,09, 100,76, 71,43, 70,62, 67,84, 66,73, 64,44, 61,31, 40,84, 29,72, 29,40, 25,38, 22,72, 20,69, 20,60, 18,89.

HRMS: ESI: [M+H]⁺ m/z encontrado 972,2077, calc. 972,2109

Preparación del compuesto 13:

A una solución del compuesto **12** (10 mg, 0,010 mmol, 1,0 eq.) en metanol anhidro (2 ml) en un baño de hielo se le añadió metóxido de sodio (1,1 mg, 0,020 mmol, 2,0 eq.). La mezcla de reacción se agitó durante 1 h a 0 °C. Luego se detuvo la reacción con resina Dowex® 50X8-100, después se filtró y se concentró a presión reducida. El producto **13** se obtuvo en forma de resina blanca (8 mg, 0,010 mmol, rendimiento cuantitativo). Se logró una alta pureza con la HPLC preparativa de fase inversa (isocrática, agua:acetonitrilo 1:1 v:v con 0,1 % de TFA) para producir el compuesto **13** en forma de polvo blanco.

5 RMN ¹H (300 MHz, CD₃OD): δ (ppm) = 8,07 (m, 1H), 7,73-7,69 (m, 2H), 7,67-7,60 (m, 2H), 7,50-7,31 (m, 2H), 7,31-7,23 (m, 1H), 7,13-7,05 (m, 1H), 5,02-4,93 (m, 1H), 4,93-4,82 (m, 2H), 4,51-4,40 (m, 1H), 4,13-4,03 (m, 1H), 3,83-3,78 (m, 1H), 3,77-3,71 (m, 1H), 3,68-3,58 (m, 3H), 3,53-3,44 (m, 2H), 3,12-3,01 (m, 1H), 2,94-2,83 (m, 1H), 1,59-1,25 (m, 6H).

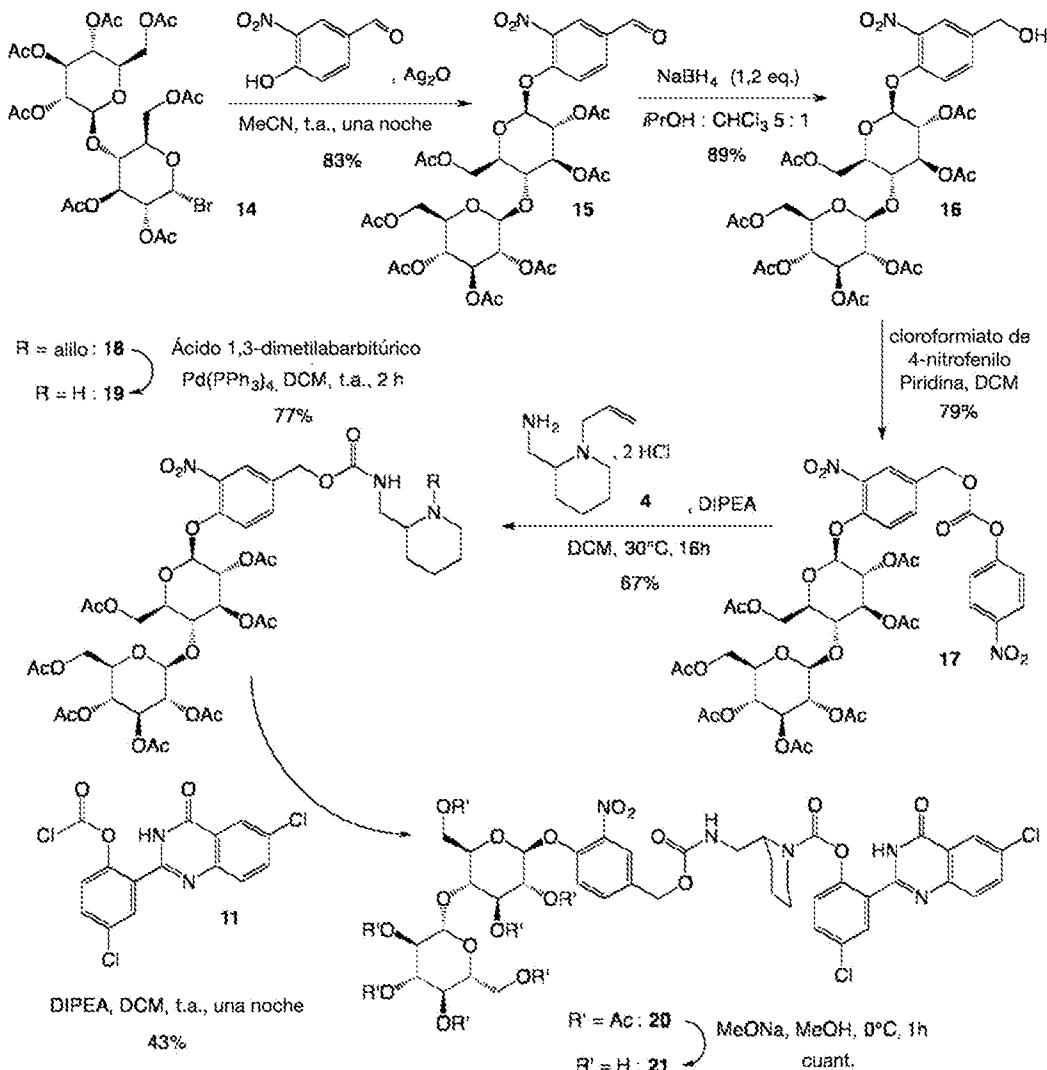
10 RMN ¹³C (125 MHz, CD₃OD): δ (ppm) = 163,06, 158,56, 154,58, 152,42, 151,11, 149,16, 148,62, 141,78, 136,22, 134,26, 134,07, 132,97, 132,68, 132,09, 131,01, 130,43, 129,97, 126,45, 126,12, 125,42, 125,22, 123,48, 118,91, 103,10, 96,37, 77,36, 74,86, 71,96, 70,10, 65,76, 62,32, 53,19, 52,68, 41,16, 27,00, 26,27, 19,86.

15 HRMS: ESI: m/z [M+H]⁺ encontrado: 804,1671 cálculo: 804,1687

Ejemplo 2

El compuesto **21** se prepara como se describe en el **esquema 2** siguiente.

Esquema 2: síntesis química del compuesto 21



Preparación del compuesto 15

Se utilizó un procedimiento similar al utilizado para la preparación del compuesto **6** a partir de acetobromo-D-celobiosa **14** (2 g, 2,86 mmol, 1,0 eq.), 4-hidroxi-3-nitrobenzaldehído (478 mg, 2,86 mmol, 1,0 eq.) y Ag₂O (729 mg, 3,15 mmol, 1,1 eq.) para obtener el compuesto **15** en forma de un sólido amarillo pálido (1,864 g, 2,37 mmol, rendimiento: 83 %).

5 RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 9,98 (s, 1H), 8,30 (d, *j* = 2 Hz, 1H), 8,07 (dd, *j* = 9 Hz, *j* = 2 Hz, 1H), 7,43 (d, *j* = 9 Hz, 1H), 5,35-5,05 (m, 5H), 4,95 (t, *j* = 8 Hz, 1H), 4,64-4,57 (m, 2H), 4,38 (dd, *j* = 13 Hz, *j* = 4 Hz, 1H), 4,16-3,98 (m, 3H), 3,94-3,87 (m, 1H), 3,74-3,67 (m, 1H), 2,12 (s, 3H), 2,11 (s, 3H), 2,08 (s, 3H), 2,04 (s, 3H), 2,03 (s, 3H), 2,02 (s, 3H), 2,00 (s, 3H).

10 RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 189,23, 170,88, 170,54, 170,46, 170,11, 169,71, 169,68, 169,47, 153,68, 141,40, 134,58, 131,65, 127,10, 118,64, 101,22, 98,98, 76,24, 73,60, 73,19, 72,39, 71,93, 70,97, 68,11, 61,91, 21,02, 20,88, 20,86.

HRMS: ESI: [M+Na]⁺ m/z encontrado 808,1874, calc. 808,1912

Preparación del compuesto 16:

15 Se utilizó un procedimiento similar al utilizado para la preparación del compuesto **7** a partir del compuesto **15** (650 mg, 0,83 mmol, 1,0 eq.) y NaBH₄ (34 mg, 0,91 mmol, 1,1 eq.) para obtener el compuesto **16** en forma de un polvo blanco (580 mg, 0,74 mmol, rendimiento: 89 %), que se usó sin purificación en la siguiente reacción.

20 RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7,82 (días, *j* = 2 Hz, 1H), 7,54 (dd, *j* = 9 Hz, *j* = 2 Hz, 1H), 7,32 (d, *j* = 9 Hz, 1H), 5,31-5,06 (m, 5H), 4,97 (t, *j* = 8 Hz, 1H), 4,74 (d, *j* = 6 Hz, 1H), 4,64-4,57 (m, 2H), 4,40 (dd, *j* = 13 Hz, *j* = 4 Hz, 1H), 4,15-4,07 (m, 2H), 4,01-3,95 (m, 1H), 3,84-3,78 (m, 1H), 3,74-3,68 (m, 1H), 2,14 (s, 3H), 2,12 (s, 3H), 2,09 (s, 3H), 2,08 (s, 3H), 2,06 (s, 3H), 2,04 (s, 3H), 2,01 (s, 3H), 1,87 (t, *j* = 6 Hz, 1H).

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 170,48, 170,20, 170,12, 169,79, 169,54, 169,32, 169,11, 148,15, 141,10, 137,49, 131,78, 123,00, 119,23, 100,71, 99,61, 76,01, 73,04, 72,86, 72,23, 71,95, 71,60, 70,85, 67,83, 63,04, 61,63, 61,57, 20,60, 20,54, 20,41.

HRMS: ESI: [M+Na]⁺ m/z encontrado 810,2022, calc. 810,2069

Preparación del compuesto 17:

25 Se utilizó un procedimiento similar al utilizado para la preparación del compuesto **8** a partir del compuesto **16** (400 mg, 0,51 mmol, 1,0 eq.), cloroformiato de 4-nitrofenilo (225 mg, 1,07 mmol, 2,2 eq.) y piridina (102 μl, 1,27 mmol, 2,5 eq.) para obtener el compuesto **17** en forma de un polvo blanco (380 mg, 0,40 mmol, rendimiento: 79 %).

30 RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 8,32 (d, *j* = 9 Hz, 2H), 7,92 (d, *j* = 2 Hz, 1H), 7,63 (dd, *j* = 9 Hz, *j* = 2 Hz, 1H), 7,41 (d, *j* = 9 Hz, 2H), 7,35 (d, *j* = 9 Hz, 2H), 5,32-5,07 (m, 5H), 4,97 (t, *j* = 8 Hz, 1H), 4,67-4,58 (m, 2H), 4,64-4,57 (m, 2H), 4,40 (dd, *j* = 13 Hz, *j* = 4 Hz, 1H), 4,15-4,06 (m, 2H), 4,03-3,97 (m, 1H), 3,87-3,81 (m, 1H), 3,74-3,68 (m, 1H), 2,14 (s, 3H), 2,12 (s, 3H), 2,09 (s, 3H), 2,08 (s, 3H), 2,06 (s, 3H), 2,04 (s, 3H), 2,01 (s, 3H).

35 RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 170,51, 170,07, 170,05, 169,68, 169,33, 169,28, 169,03, 155,27, 152,18, 149,47, 145,42, 140,92, 133,94, 130,03, 125,35, 125,29, 121,71, 119,05, 100,75, 99,22, 75,98, 73,09, 72,80, 72,09, 71,91, 71,54, 70,70, 68,81, 67,74, 61,56, 61,53, 20,60, 20,55, 20,42.

HRMS: ESI: [M+Na]⁺ m/z encontrado 975,2103, calc. 975,2131

Preparación del compuesto 18:

40 Se utilizó un procedimiento similar al utilizado para la preparación del compuesto **9** a partir de los compuestos **17** (100 mg, 0,11 mmol, 1,0 eq.), **4** (30 mg, 0,20 mmol, 1,3 eq.) y DIPEA (40 μl, 0,23 mmol, 2,1 eq.) para obtener el compuesto **18** en forma de un sólido blanco (68 mg, 0,070 mmol, rendimiento: 67 %).

45 RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7,82 (d, *j* = 2 Hz, 1H), 7,53 (dd, *j* = 9 Hz, *j* = 2 Hz, 1H), 7,28 (d, *j* = 9 Hz, 1H), 5,94-5,80 (m, 1H), 5,44-5,06 (m, 9H), 4,96 (t, *j* = 8 Hz, 1H), 4,64-4,56 (m, 2H), 4,40 (dd, *j* = 13 Hz, *j* = 4 Hz, 1H), 4,15-4,06 (m, 2H), 4,01-3,95 (m, 1H), 3,84-3,78 (m, 1H), 3,73-3,67 (m, 1H), 3,44-3,24 (m, 3H), 3,05-2,91 (m, 2H), 2,42 (bs, 1H), 2,22 (t, *j* = 11 Hz, 1H), 2,13 (s, 3H), 2,12 (s, 3H), 2,08 (s, 6H), 2,05 (s, 3H), 2,03 (s, 3H), 2,01 (s, 3H), 1,77-1,26 (m, 6H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 170,49, 170,18, 170,12, 169,72, 169,47, 169,29, 169,02, 156,20, 148,73, 141,14, 134,66, 133,19, 132,93, 124,56, 119,18, 117,69, 100,80, 99,37, 75,94, 73,01, 72,86, 72,18, 72,06, 71,59, 70,84, 67,74, 64,64, 61,51, 61,48, 58,28, 56,31, 51,93, 42,47, 28,93, 24,94, 23,67, 20,69, 20,64, 20,54, 20,52.

HRMS: ESI: [M+H]⁺ m/z encontrado 968,3545, calc. 968,3512

Preparación del compuesto 19:

5 Se utilizó un procedimiento similar al utilizado para la preparación del compuesto **10** a partir del compuesto **18** (68 mg, 0,070 mmol, 1,0 eq.), ácido 1,3-dimetilbarbitúrico (86 mg, 0,56 mmol, 8,0 eq.) y tetrakis(trifenilfosfina) de paladio(0) (1,6 mg, 0,0014 mmol, 2 % en moles) para obtener el compuesto **19** en forma de un sólido blanco (49 mg, 0,053 mmol, rendimiento: 77 %).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7,79 (d, *j* = 2 Hz, 1H), 7,51 (dd, *j* = 9 Hz, *j* = 2 Hz, 1H), 7,27 (d, *j* = 9 Hz, 1H), 5,49-5,42 (m, 1H), 5,29-5,04 (m, 7H), 4,95 (t, *j* = 8 Hz, 1H), 4,63-4,55 (m, 2H), 4,39 (dd, *j* = 13 Hz, *j* = 4 Hz, 1H), 4,14-4,04 (m, 2H), 4,00-3,93 (m, 1H), 3,84-3,78 (m, 1H), 3,73-3,67 (m, 1H), 3,30-3,21 (m, 1H), 3,12-3,02 (m, 2H), 2,70-2,62 (m, 2H), 2,13 (s, 3H), 2,12 (s, 3H), 2,08 (s, 6H), 2,05 (s, 3H), 2,03 (s, 3H), 2,01 (s, 3H), 1,85-1,12 (m, 6H).

10 RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 170,50, 170,20, 170,12, 169,72, 169,48, 169,30, 169,02, 156,10, 148,74, 141,15, 133,18, 132,84, 124,56, 119,20, 100,82, 99,36, 75,93, 73,02, 72,87, 72,19, 72,08, 71,60, 70,85, 67,75, 64,68, 61,53, 61,47, 56,00, 46,83, 46,63, 30,22, 26,42, 24,22, 20,70, 20,66, 20,55, 20,53.

HRMS: ESI: [M+H]⁺ m/z encontrado 928,3230, calc. 928,3199

Preparación del compuesto 20:

15 Se utilizó un procedimiento similar al utilizado para la preparación del compuesto **12** a partir de los compuestos **19** (49 mg, 0,053 mmol, 1,0 eq.), **11** (21 mg, 0,054 mmol, 1,05 eq.) y DIPEA (28 μl, 0,16 mmol, 3,0 eq.) para obtener el compuesto **20** en forma de un polvo blanco (29 mg, 0,023 mmol, rendimiento: 43 %).

20 RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 10,52 (bs, 1H), 8,21 (bs, 1H), 8,10-7,97 (m, 1H), 7,76-7,64 (m, 2,5H), 7,56 (m, 0,5H), 7,50-7,43 (m, 2H), 7,18-7,09 (m, 2H), 6,17-6,07 (m, 0,5H), 5,76 (bs, 0,5H), 5,30-5,04 (m, 5H), 4,95 (t, *j* = 8 Hz, 1H), 4,91-4,72 (m, 2H), 4,63-4,48 (m, 3H), 4,40 (dd, *j* = 13 Hz, *j* = 4 Hz, 1H), 4,19-4,04 (m, 3H), 4,00-3,93 (m, 1H), 3,83-3,57 (m, 3H), 3,37-3,18 (m, 1,5H), 3,11-2,98 (m, 0,5H), 2,12 (s, 3H), 2,11 (s, 3H), 2,08 (s, 3H), 2,06 (s, 6H), 2,03 (s, 3H), 2,01 (s, 3H), 1,81-1,44 (m, 6H).

25 RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 170,52, 170,21, 170,18, 169,74, 169,50, 169,31, 169,04, 161,13, 156,33, 154,23, 152,63, 149,11, 147,57, 147,34, 140,89, 135,28, 133,22, 132,80, 132,24, 130,59, 129,54, 127,82, 126,91, 125,85, 125,24, 124,84, 124,17, 122,22, 119,11, 100,85, 99,30, 75,97, 72,98, 72,90, 72,24, 72,20, 72,08, 71,61, 70,85, 67,76, 64,47, 61,53, 61,48, 51,46, 40,79, 26,03, 25,27, 20,70, 20,67, 20,54, 18,84.

HRMS: ESI: [M+H]⁺ m/z encontrado 1260,2914, calc. 1260,2954

Preparación del compuesto 21:

30 Un procedimiento similar al utilizado para la preparación del compuesto **13** se utilizó a partir del compuesto **20** (23 g, 0,018 mmol, 1,0 eq.) y metóxido de sodio (1,0 mg, 0,036 mmol, 2,0 eq.) para obtener el compuesto **21** en forma de un polvo blanco (17 mg, 0,017 mmol, rendimiento: 97 %).

35 RMN ¹H (300 MHz, CD₃OD): δ (ppm) = 8,19 (bs, 1H), 7,85-7,81 (m, 2H), 7,79-7,72 (m, 2H), 7,62-7,43 (m, 2H), 7,40-7,33 (m, 1H), 7,27-7,17 (m, 2H), 5,14-5,04 (m, 1,5H), 4,99-4,94 (m, 1H), 4,62-4,52 (m, 0,5H), 4,47 (d, *j* = 8 Hz, 2H), 4,26-4,16 (m, 1H), 3,97-3,82 (m, 3H), 3,74-3,56 (m, 5H), 3,44-3,35 (m, 3,5H), 3,30-2,95 (m, 3H), 3,11-2,98 (m, 0,5H), 1,72-1,15 (m, 6H).

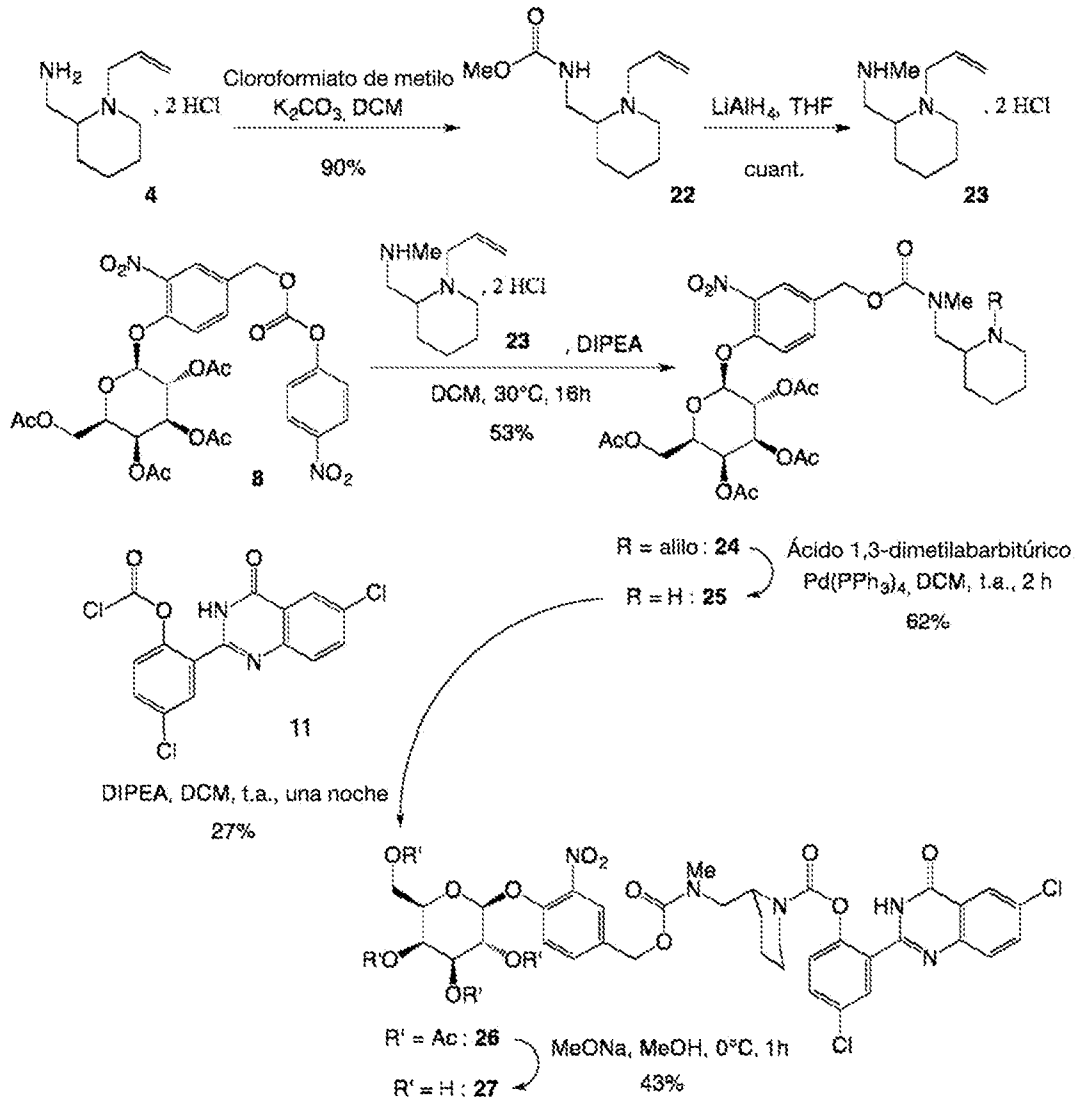
RMN ¹³C (75 MHz, CD₃OD): δ (ppm) = 161,65, 157,10, 153,33, 153,05, 150,98, 149,35, 148,93, 147,75, 147,23, 140,47, 134,82, 132,84, 132,67, 131,57, 130,77, 129,62, 129,05, 128,55, 125,05, 123,86, 122,08, 117,46, 103,16, 100,77, 78,53, 76,75, 76,50, 75,55, 74,94, 73,51, 73,00, 72,99, 69,98, 64,34, 61,05, 60,19, 51,29, 39,52, 25,73, 24,79, 18,46.

40 HRMS: ESI: [M+H]⁺ m/z encontrado: 966,2201, calc. 966,2215

Ejemplo 3

El compuesto **27** se prepara como se describe en el **esquema 3** siguiente.

Esquema 3: síntesis química del compuesto 27



Preparación del compuesto 22:

- 5 A una solución de **3** (335 mg, 1,48 mmol, 1,0 eq.) en 5 ml de diclorometano se le añadieron carbonato de potasio (636 mg, 4,6 mmol, 3,1 eq.) y cloroformiato de metilo gota a gota (115 μ l, 1,48 mmol, 1,0 eq.). Después de 10 min de agitación a temperatura ambiente, el solvente se evaporó a presión reducida. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice para obtener el compuesto **22** en forma de un aceite de color amarillo claro (282 mg, 1,33 mmol, rendimiento: 90 %).
- 10 RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 5,96-5,82 (m, 1H), 5,24-5,16 (m, 3H), 3,69 (s, 3H), 3,41-3,30 (m, 3H), 3,01-2,91 (m, 2H), 2,40 (m, 1H), 2,23-2,17 (m, 1H), 1,75-1,70 (m, 1H), 1,60-1,56 (m, 2H), 1,54-1,40 (m, 2H), 1,37-1,24 (m, 1H).
- RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 157,34, 134,50, 117,71, 58,62, 56,29, 51,90, 42,31, 28,85, 24,92, 23,58.
- HRMS: ESI: $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z encontrado 213,1601, calc. 213,1603

Preparación del compuesto 23:

A una solución de tetrahidruroaluminato de litio (2,64 mmol, 2,0 eq.) en 5 ml de tetrahidrofurano, se le ha añadido 22 (280 mg, 1,32 mmol, 1,0 eq.) gota a gota y el medio se ha agitado a 40 °C durante una noche. Se evaporó el solvente y el producto **23** se utilizó sin purificación.

- 5 RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 5,97-5,82 (m, 1H), 5,24-5,08 (m, 2H), 3,43-3,33 (m, 1H), 2,98-2,84 (m, 2H), 2,71-2,53 (m, 3H), 2,46-2,30 (m, 3H), 2,23-2,12 (m, 2H), 1,83-1,23 (m, 8H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 127,43, 124,84, 61,65, 58,05, 55,71, 52,99, 52,19, 50,49, 48,26, 45,28, 34,14, 27,96, 26,19, 21,68, 21,43, 20,96, 20,02.

Preparación del compuesto 24:

- 10 Un procedimiento similar al utilizado para la preparación del compuesto **9** se usó a partir de los compuestos **8** (150 mg, 0,23 mmol, 1,0 eq.), **23** (100 mg, 0,42 mmol, 1,8 eq.) y DIPEA (300 μl, 1,72 mmol, 7,6 eq.) para obtener el compuesto **24** en forma de un sólido blanco (84 mg, 0,12 mmol, rendimiento: 53 %).

- 15 RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7,75 (s, 1H), 7,48 (dd, *j* = 9 Hz, *j* = 2 Hz, 1H), 7,30 (d, *j* = 9 Hz, 1H), 5,90-5,72 (m, 1H), 5,50 (dd, *j* = 10 Hz, *j* = 8 Hz, 1H), 5,42 (d, *j* = 3 Hz, 1H), 5,14 (d, *j* = 6 Hz, 1H), 5,12-4,99 (m, 6H), 4,25-4,11 (m, 2H), 4,11-4,01 (m, 1H), 3,58-3,47 (m, 1H), 3,35-3,19 (m, 2H), 3,09-2,96 (m, 1H), 2,88 (d, *j* = 3 Hz, 3H), 2,81-2,71 (m, 1H), 2,68-2,58 (m, 1H), 2,14 (s, 3H), 2,08 (s, 3H), 2,02 (s, 3H), 1,97 (s, 3H), 1,70-1,36 (m, 6H).

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 170,29, 170,18, 170,11, 169,38, 156,04, 148,92, 141,16, 135,08, 133,27, 133,23, 124,60, 119,66, 117,51, 100,69, 71,41, 70,53, 67,81, 66,74, 65,25, 61,36, 57,46, 57,10, 51,26, 49,88, 35,68, 30,92, 29,67, 28,20, 24,90, 22,60, 20,64.

- 20 LRMS: ESI: [M+H]⁺ m/z encontrado 694,2, calc. 694,2823.

Preparación del compuesto 25:

- 25 Un procedimiento similar al utilizado para la preparación del compuesto **10** se utilizó a partir del compuesto **24** (84 mg, 0,12 mmol, 1,0 eq.), ácido 1,3-dimetilbarbitúrico (95 mg, 0,61 mmol, 5,0 eq.) y tetrakis(trifenilfosfina) de paladio(0) (1 mg, 0,0012 mmol, 1 mol %) para obtener el compuesto **25** en forma de un sólido blanco (49 mg, 0,07 mmol, rendimiento: 62 %).

- 30 RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7,78 (d, *j* = 9 Hz, 1H), 7,49 (d, *j* = 8 Hz, 1H), 7,30 (d, *j* = 9 Hz, 1H), 5,51 (dd, *j* = 10 Hz, *j* = 8 Hz, 1H), 5,43 (d, *j* = 3 Hz, 1H), 5,32-5,26 (m, 1H), 5,13-4,98 (m, 4H), 4,24-4,19 (m, 1H), 4,16-4,10 (m, 1H), 4,08-4,03 (m, 1H), 3,26-3,19 (m, 1H), 3,18-3,12 (m, 1H), 3,06-3,01 (m, 1H), 2,93 (d, *j* = 7 Hz, 3H), 2,82-2,68 (m, 1H), 2,61-2,51 (m, 1H), 2,15 (s, 3H), 2,09 (s, 3H), 2,04 (s, 3H), 1,98 (s, 3H), 1,79-1,75 (m, 1H), 1,61-1,50 (m, 2H), 1,42-1,20 (m, 3H).

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 170,34, 170,22, 170,16, 169,42, 156,23, 148,93, 141,26, 133,30, 133,20, 124,59, 119,74, 100,77, 71,47, 70,57, 67,86, 66,77, 65,28, 61,39, 55,55, 55,12, 46,80, 36,00, 30,56, 26,30, 24,35, 20,72, 20,70, 20,62.

HRMS: ESI: [M+H]⁺ m/z encontrado 654,2484, calc. 654,2504

- 35 **Preparación del compuesto 26:**

Un procedimiento similar al utilizado para la preparación del compuesto **12** se utilizó a partir de los compuestos **25** (25 mg, 0,04 mmol, 1,0 eq.), **11** (21 mg, 0,04 mmol, 1,0 eq.) y DIPEA (33 μl, 0,19 mmol, 5,0 eq.) para obtener el compuesto **26** en forma de un polvo blanco (10 mg, 0,01 mmol, rendimiento: 27 %).

- 40 RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 10,65-10,32 (m, 1H), 8,27-8,14 (m, 1H), 8,06-7,90 (m, 1H), 7,86-7,67 (m, 3H), 7,57-7,46 (m, 1H), 7,46-7,34 (m, 1H), 7,34-7,21 (m, 1H), 7,11-7,03 (m, 1H), 5,56-5,49 (m, 1H), 5,46 (br s, 1H), 5,13-4,98 (m, 2H), 4,98-4,67 (m, 1H), 4,55 (br s, 1H), 4,31-3,97 (m, 4H), 3,93-3,78 (m, 1H), 3,28-3,03 (m, 2H), 3,01-2,88 (m, 3H), 2,19 (s, 3H), 2,12 (s, 3H), 2,04 (s, 3H), 2,01 (s, 3H), 1,78-1,23 (m, 6H).

- 45 RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 170,41, 170,30, 170,25, 169,52, 160,53, 156,49, 153,10, 149,15, 147,52, 141,32, 139,29, 135,29, 133,31, 132,92, 132,28, 130,79, 129,79, 127,87, 126,09, 125,49, 125,13, 124,45, 124,38, 122,55, 119,83, 114,28, 100,84, 71,54, 70,67, 67,94, 66,82, 65,99, 61,42, 40,78, 29,83, 29,46, 26,68, 25,40, 20,78, 20,70, 20,54, 19,04.

HRMS: ESI: [M+H]⁺ m/z encontrado 986,2219, calc. 986,2260

Preparación del compuesto 27:

Un procedimiento similar al utilizado para la preparación del compuesto **13** se utilizó a partir del compuesto **26** (10 g, 0,01 mmol, 1,0 eq.) y metóxido de sodio (2,0 mg, 0,04 mmol, 3,5 eq.) para obtener el compuesto **27** en forma de un polvo blanco (3,57 mg, 0,004 mmol, rendimiento: 43 %).

5 Los espectros de RMN están demasiado mal resueltos para poder asignarlos.

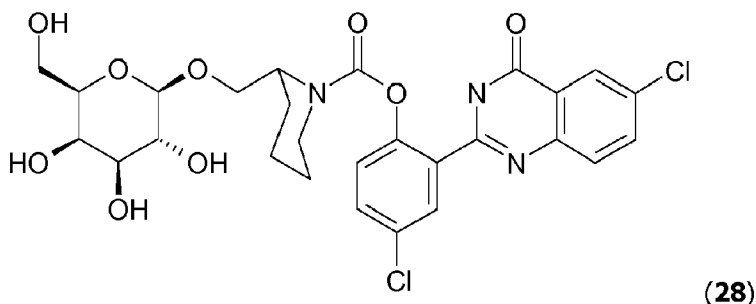
HRMS: ESI: [M+H]⁺ m/z encontrado: 818,1838, calc. 818,1838

Ejemplo 4

10 Las sondas **13**, **21** y **27** según la invención se evaluaron mediante incubación con la enzima diana, β-galactosidasa (EC 3.2.1.23; "β-gal"; comercial) en un medio *in vitro* en microplacas multipocillo diseñadas para los lectores de fluorescencia. Las sondas se evaluaron según los siguientes criterios:

- demostración de la alta intensidad de fluorescencia generada por la presencia de actividad enzimática ("encendida"),
- demostración de la ausencia total ("apagada") de fluorescencia en las muestras que no contienen la enzima diana (sin fluorescencia intrínseca),
- 15 • demostración de la ausencia de degradación hidrolítica de la sonda a lo largo del tiempo que demuestre la robustez de la sonda a pH 7 en un medio acuoso (sin señal de falso positivo),
- demostración de la velocidad de respuesta a la presencia de la actividad enzimática que permite alcanzar rápidamente una señal máxima,
- demostración de la cinética mejorada de la sonda con dos espaciadores,
- 20 • demostración de la fuerte fotoestabilidad del fluoróforo sólido generado con una irradiación prolongada por el lector de fluorescencia.

Estos resultados se compararon con los obtenidos con una sonda de la técnica anterior (compuesto I.1 de la solicitud de patente internacional WO 2014/020285) que comprende un espaciador de tipo ciclanter (**28**):

**Protocolo de detección de la fluorescencia:**

25 Se diluyeron las soluciones madre de sondas a 10 mM en MeOH con PBS (solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco, Invitrogen Corp.) para obtener las soluciones con márgenes de concentración de 50 μM a 1 mM. Se agregaron 10 μl de cada una de estas soluciones a 80 μl de PBS en una placa negra de 96 pocillos y se calentaron a 37 °C antes de la adición de la enzima purificada. Las concentraciones finales de la sonda estuvieron en el margen de 5 μM a 100 μM. Luego se incubó la placa a 37 °C (o 25 °C) y se midió la fluorescencia a lo largo del tiempo mediante un lector de fluorescencia (EnSpire, Perkin Elmer; longitudes de onda de adquisición: λ_{ex} = 355 nm, λ_{em} = 530 nm). Las curvas resultantes son el promedio de duplicados.

Resultados:

Los resultados obtenidos se presentan en las figuras 2 y 3.

35 Comparada con la sonda **28**, la sonda **13** según la invención que comprende un tándem de espaciadores retirable/ciclanter permite beneficiarse de una mayor velocidad de respuesta manteniendo al mismo tiempo una alta estabilidad de la sonda en ausencia de la enzima diana (ausencia de señal de falso positivo). Así, en las mismas condiciones de temperatura, pH y concentración, la sonda **13**, basada en un tándem de espaciadores, tiene una respuesta enzimática 5 veces más rápida que la de la sonda **28** que solo tiene un espaciador. Además, en ausencia de enzima, la sonda **13** es estable durante más de 15 h y no genera ninguna fluorescencia mensurable.

Las sondas **21** y **27** según la invención permiten beneficiarse de una mayor velocidad de respuesta manteniendo al mismo tiempo una elevada estabilidad de la sonda en ausencia de la enzima diana (ausencia de señal de falso positivo).

5 La sonda **21** se comprobó en diferentes concentraciones: 5 μM , 10 μM , 25 μM y 50 μM . La fluorescencia medida es proporcional a la concentración de la sonda. La fluorescencia se puede detectar a partir de un contenido de 5 μM de la sonda **21**.

Ejemplo 5

10 Se añadió a la sonda **21** según la invención, que responde la actividad enzimática β -glucosidasa, un sobrenadante de cultivo de una cepa de levadura que no secreta (A) o sí secreta (B) una β -glucosidasa. Para ello, las células de levadura portadoras de un plásmido que confiere resistencia a la higromicina y portadoras o no de un casete de expresión de una β -glucosidasa secretada se cultivaron durante 86 h a 30 °C en 5 ml del medio rico YPD (10 g de peptona Bacto de Difco, 10 g de extracto de levadura Bacto de Difco, 20 g de glucosa, 20 g de agar Bacto, csp 1 litro de agua destilada) que contiene 200 $\mu\text{g/ml}$ de higromicina. Luego se centrifugó el cultivo a 4000 rpm en una centrífuga Allegra 25R (Beckman/Coulter), en un rotor oscilante (TS-5.1-500) a 20 °C y se tomaron 20 μl del sobrenadante y se añadieron 15 a 180 μl de una solución de PBS1X que contenía la sonda de sustrato a 50 μM . A continuación, la mezcla se homogeneizó y se incubó durante 30 min a 37 °C. Luego, se depositaron 10 μl de esta mezcla entre el portaobjetos y el cubreobjetos y se observaron mediante microscopía de fluorescencia con un filtro de excitación a 340 nm y un filtro de emisión a 525 nm.

20 Las fotografías, representadas en la figura 4, se obtienen con un aumento de inmersión de 100 \times en un microscopio Zeiss, AX10.

Los precipitados fluorescentes (puntos blancos) aparecen claramente, lo que permite considerar el uso de imágenes de alto rendimiento (segmentación y cuantificación automatizada).

Ejemplo 6

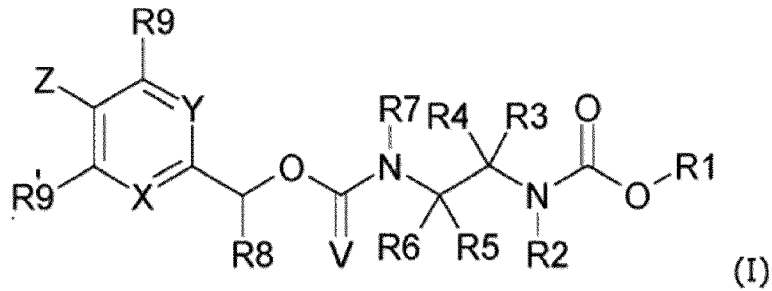
25 La cinética de detección de la actividad celulasa en un medio de cultivo de microorganismos se evaluó mediante el aparato MITHRAS LB 940 por la lectura óptica de la actividad enzimática de un sobrenadante de cultivo de células de levadura que secretaban ('Sobrenadante') o que no secretaban ('Control') la β -glucosidasa.

30 Los cultivos de levadura se realizan como en el protocolo descrito en el ejemplo 5 hasta obtener 20 μl de sobrenadante. Luego, este sobrenadante se agrega a 180 μl de una solución de PBS1X que contiene la sonda **21** según la invención a 50 μM en un pocillo de microplacas con el fondo opaco. La señal se lee a lo largo del tiempo en un dispositivo MITHRAS LB 940, después de excitar la sonda a 340 nm y recoger la emisión a 535 nm.

Los resultados, representados en la figura 5, demuestran que la invención permite detectar la actividad glicosidasa secretada en el sobrenadante a partir de 45 min de incubación, que la señal es máxima después de 3 h y 45 min de incubación, y que la relación señal/ruido es aproximadamente de 55.

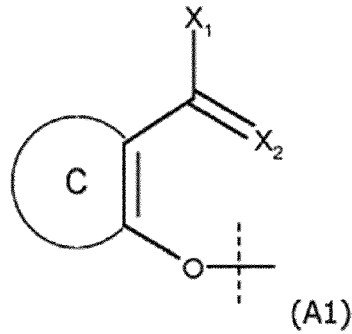
REIVINDICACIONES

1. Compuestos de fórmula (I):



en donde:

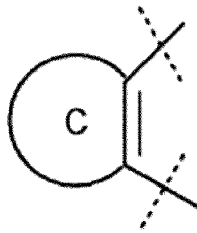
- 5 - R1 es tal que HOR1, obtenido después de escindir el enlace -C(O)-OR1 presente en la fórmula (I), pertenece a la clase de fluoróforos que conducen a una transferencia intramolecular de protones en estado excitado, denominada ESIPT, en donde R1 es un grupo aromático en donde -OR1 tiene la fórmula (A1):



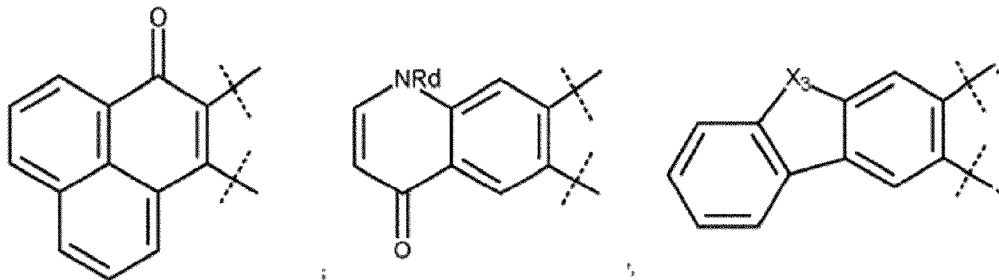
en donde:

- 10 - X2 es un átomo de oxígeno y X1 es un grupo -NH₂, -OH, -SH, alquilo (C1-C20), arilo (C5-C24), -O-alquilo (C1-C20), -O-fenilo, -NH-alquilo (C1-C20) o -NH-fenilo, -S-alquilo (C1-C20) o -S-arilo (C5-C24), en donde dichos grupos alquilo y fenilo pueden estar sustituidos o no sustituidos, o bien X2 representa un átomo de nitrógeno y está unido a X1 que representa entonces CH, O, S, N o NH para formar un heteroarilo (C5-C24) sustituido o no sustituido,

15



- representa un arilo (C5-C24) o un heteroarilo (C5-C24), sustituido o no sustituido, elegido por ejemplo entre los grupos fenilo y naftilo, y:



pudiendo dichos grupos estar sustituidos o no sustituidos,

- en donde X3 representa S, O o NRd, y Rd representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo (C1-C4),

- R2, R3 y R4 se definen de la siguiente manera:

• R2 es un alquilo (C1-C4), R3 es un alquilo (C1-C4) o un átomo de hidrógeno, y R4 es un alquilo (C1-C4), o bien

5 • R3 es un alquilo (C1-C4) o un átomo de hidrógeno, y R2 y R4 están unidos entre sí y forman con los átomos de carbono y de nitrógeno a los que están unidos un heterociclo alifático, pudiendo este heterociclo estar sustituido por un grupo que confiere solubilidad en agua, o bien

• R2 es un alquilo (C1-C4) y R3 y R4 están unidos entre sí y forman un carbociclo alifático con el átomo de carbono al que están unidos,

10 - R5 y R6 son idénticos o diferentes y representan, independientemente el uno del otro, un átomo de hidrógeno, un alquilo (C1-C4) o un arilo (C5-C10),

- R7 es un átomo de hidrógeno, o un grupo elegido entre alquilo (C1-C4) y alcoxi (C1-C4),

- R8 representa un átomo de hidrógeno, o un grupo alquilo (C1-C10) sustituido o no sustituido, o un grupo -D1-D2-D3 en donde:

15 • D1 representa un grupo triazolilo o -CH₂-triazolilo,

20 • D2 representa un grupo alquilenilo (C1-C10), alquilenilo (C1-C10) o alquinileno (C1-C10), estando dichos grupos opcionalmente interrumpidos por uno o más heteroátomos seleccionados entre O o N, un grupo glicosilo divalente, un grupo -O-(CHR-CHR'-O)_n- o -N-(CHR-CHR'-O)_n-, en donde n es un número entero comprendido entre 1 y 20, R y R', iguales o diferentes, representan H o CH₃ siempre que R y R' no sean simultáneamente CH₃, un aminoácido o un péptido, o una combinación de estos grupos,

• D3 representa una unidad de maleimidocaproilo, un aminoácido, un péptido, un ácido fólico, un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo unido a D2, mediante una función de ácido carboxílico en él, de modo que forme un enlace éster o amida,

25 - R9 y R'9, idénticos o diferentes, representan un átomo de hidrógeno, o un grupo aceptor de electrones, tal como por ejemplo un átomo de halógeno, o un grupo elegido entre -NO₂, -CN, o un grupo elegido entre -NH-C(O)-CH₂-Ab, en donde Ab representa un anticuerpo

- V representa un átomo de oxígeno o un átomo de azufre,

- X, Y y Z son tales que:

• X representa CR₁₀, Y representa CR'₁₀ y Z representa OR₀, o bien

30 • X representa CR₁₀, Y representa COR₀ y Z representa R'₁₀, o bien

• X representa CR₁₀, Y representa un átomo de nitrógeno y Z representa OR₀, o bien

• X representa un átomo de nitrógeno, Y representa COR₀ y Z representa R₁₀

en donde:

• R₀ representa un grupo glicosilo unido por su carbono anomérico al resto de la molécula de fórmula (I), y

35 • R₁₀ y R'₁₀, idénticos o diferentes, representan un átomo de hidrógeno o un grupo donador de electrones, tal como un alquilo (C1-C20), un arilo (C5-C24) o un alcoxi (C1-C20),

en forma de una mezcla de isómeros ópticos en cualquier proporción, o en forma enriquecida en un isómero óptico.

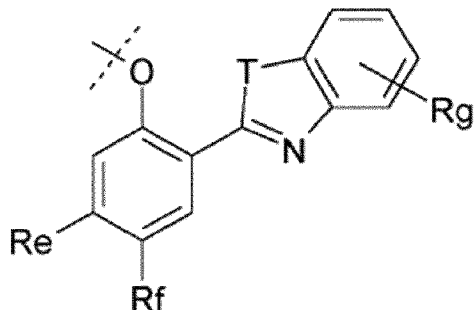
2. Compuestos (I) según la reivindicación 1, caracterizados por que R3 es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo (C1-C4), preferiblemente un átomo de hidrógeno, y R2 y R4 están unidos entre sí y forman una secuencia -(CH₂)_m- en donde m = 3, 4 o 5.

3. Compuestos (I) según la reivindicación 1, caracterizados por que R3 es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo (C1-C4), preferiblemente un átomo de hidrógeno, y R2 y R4 están unidos entre sí y forman una secuencia -CH₂CH₂-NR₁₁-CH₂- en la dirección de R2 a R4, en donde R₁₁ representa un átomo de hidrógeno o -(L)_n-GP en donde n es igual a 0 o 1, L es un brazo conector y GP es un grupo que confiere solubilidad en agua.

45

4. Compuestos (I) según la reivindicación 1, caracterizados por que R2, R3 y R4, idénticos o diferentes, representan un grupo alquilo (C1-C4), por ejemplo, metilo o etilo.

5. Compuestos (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizados por que -OR1 es del tipo fenoxi y corresponde a una de las siguientes estructuras (A2) o (A3):



5 - (A2), en donde:

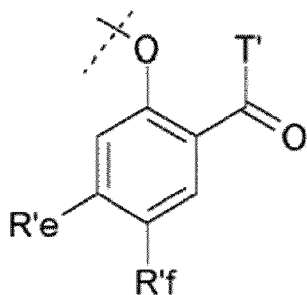
◦ T es -NH-C(O)-, -S-, -O-, -NH-, -N(alquilo (C1-C20))- o -N(arilo (C5-C24))-

◦ Re es un átomo de hidrógeno o un sustituyente de carbono aceptor de electrones como -CN o -COORh, en donde Rh representa un grupo alquilo (C1-C4), o bien Re es -CONRiRj, en donde Ri y Rj, idénticos o diferentes, representan un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo (C1-C4), o bien Re es -CF3, o un grupo 2-oxazolilo, 2-tiazolilo, 2-imidazolilo, 2-benzoimidazolilo, 4-pirimidinon-2-ilo o quinazolinon-2-ilo,

◦ Rf es un átomo de hidrógeno, un átomo de cloro, bromo, yodo o flúor, -OH, -NH2, -NRkRl, -NHRk u -ORk, en donde Rk y Rl son idénticos o diferentes, cada uno de los cuales representa independientemente un grupo alquilo (C1-C4),

◦ o bien Re y Rf están unidos entre sí para formar una cadena de hidrocarburo saturada o insaturada, sustituida o no sustituida, que comprende 4 o 5 miembros, opcionalmente interrumpidas por uno o más heteroátomos seleccionados entre N, S y O,

◦ Rg es un átomo de hidrógeno, Br, Cl, I o F



- (A3), en donde:

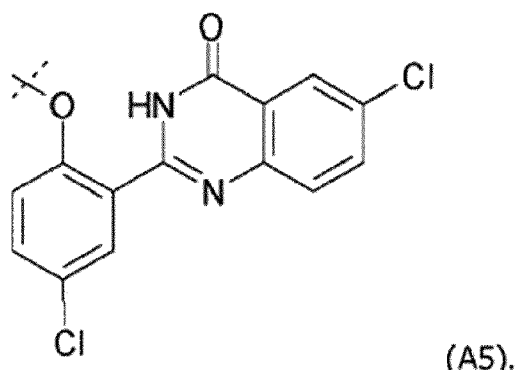
◦ T' es -NH2, -OH, un grupo arilo (C5-C24), un grupo alquilo (C1-C4), -SH, -NHR'g, -OR'g, -NR'gRh' o -SR'g, R'g y Rh', idénticos o diferentes, representan un grupo alquilo (C1-C4) o arilo,

◦ R'e es un átomo de hidrógeno o un sustituyente de carbono aceptor de electrones tal como -CN, o -COOR'i, en donde R'i representa un grupo alquilo (C1-C4), o R'e es -CONR'jR'k, en donde R'j y R'k, iguales o diferentes, representan un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo (C1-C4), o bien R'e es -CF3, o un grupo 2-oxazolilo, 2-tiazolilo, 2-imidazolilo, 2-benzoimidazolilo, 4-pirimidinon-2-ilo o quinazolinon-2-ilo,

◦ R'f es un átomo de hidrógeno, cloro, bromo, yodo o flúor, -OH, -NH2, -NR'IR'm u -OR'I, en donde R'1 y R'm, iguales o diferentes, representan un grupo alquilo (C1-C4),

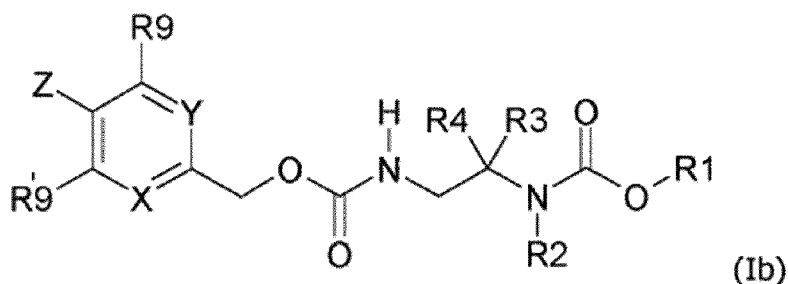
◦ o bien R'e y R'f están unidos entre sí para formar una cadena de hidrocarburo saturada o insaturada, sustituida o no sustituida, que comprende 4 o 5 miembros, opcionalmente interrumpida por uno o más heteroátomos seleccionados entre N, S y O.

6. Compuestos (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizados por que R1 es un grupo aromático en donde -OR1 tiene la siguiente fórmula (A5):



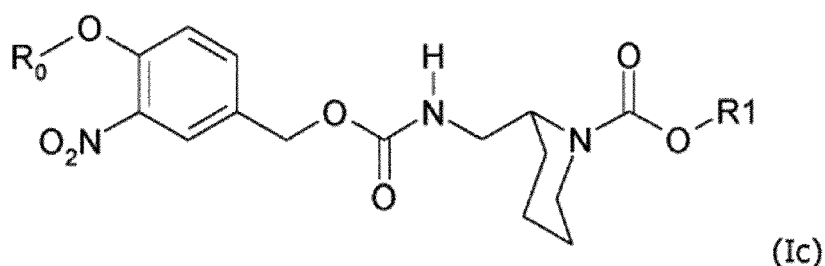
7. Compuestos (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizados por que R0 es un grupo monoglicosilado unido por su carbono anomérico elegido entre los grupos galactosilo, glucosilo, manosilo, gulosilo, alosilo, altrosilo, idosilo, talosilo, fucosilo, fructosilo, arabinosilo, lixosilo, ribosilo, xilosilo, glucuronilo y N-acetilhexosaminilo o un grupo poliglicosilado que comprende una pluralidad de estos grupos monoglicosilados, idénticos o diferentes.

8. Compuestos (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 de fórmula (Ib):



en donde R1, R2, R3, R4, R9, R'9, X, Y y Z son tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 y 5 a 7, en forma de una mezcla de isómeros ópticos en cualquier proporción, o en una forma enriquecida en un isómero óptico.

9. Compuestos (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 y 5 a 7 de fórmula (Ic):



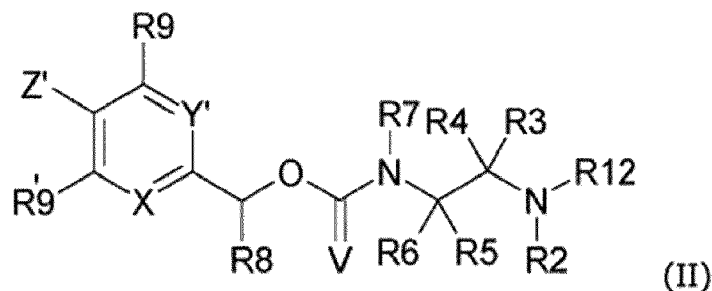
en donde R0 y R1 son como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 y 5 a 7, en forma de una mezcla de isómeros ópticos en cualquier proporción, o en una forma enriquecida en un isómero óptico.

10. Compuestos (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para implementar un método para detectar *in vivo* una glicosidasa en los humanos.

11. Procedimiento para detectar *in vitro* o *ex vivo* la presencia de una glicosidasa, que comprende las etapas de:

- 20 - poner en contacto una muestra que se sospecha que contiene dicha glicosidasa con un compuesto (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9,
- aplicar las condiciones apropiadas para permitir la formación de un precipitado fluorescente mediante la escisión del enlace covalente entre O y R0, seguidas de la escisión del enlace -C(O)-OR1 que conduce a la liberación de HOR1, y
- 25 - hacer e lanálisis cuantitativo o cualitativo de dicho precipitado fluorescente.

12. Compuestos de fórmula (II):



en donde:

- R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R'9 y V son tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4,

5 - R12 representa un átomo de hidrógeno, o un grupo protector de funciones amina,

- X, Y' y Z' son tales que:

• X representa CR¹⁰, Y' representa CR¹⁰ y Z' representa OR⁰, o bien

• X representa CR¹⁰, Y' representa COR⁰ y Z' representa R¹⁰, o bien

• X representa CR¹⁰, Y' representa un átomo de nitrógeno y Z' representa OR⁰, o bien

10 • X representa un átomo de nitrógeno, Y' representa COR⁰ y Z' representa R¹⁰,

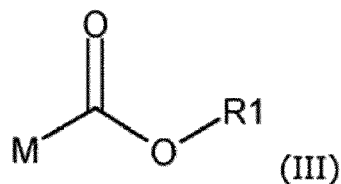
en donde R⁰ representa un grupo R0 para el cual todas las funciones alcohólicas están protegidas por un grupo protector, y en donde R0, R10 y R¹⁰ son tal como se define en la reivindicación 1,

en forma de isómero óptico en cualquier proporción, o en forma enriquecida en un isómero óptico.

15 13. Procedimiento para preparar un compuesto de fórmula (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende las siguientes etapas:

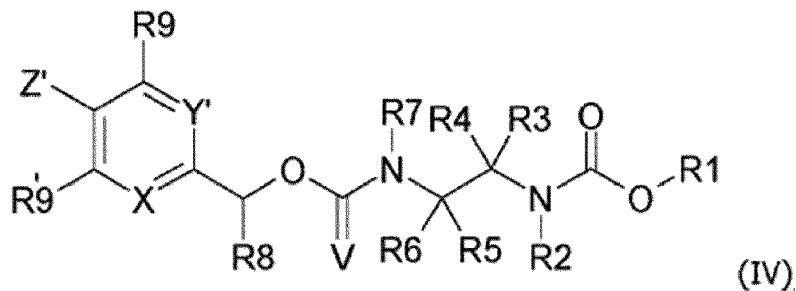
- contar con un compuesto (II) según la reivindicación 12,

- contar con un compuesto (III) de fórmula:



20 en donde R1 es tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 y 5 a 6, y M representa un grupo saliente, en particular un átomo de halógeno, y en particular un átomo de cloro, un imidazolilo o un grupo para-nitrofenoxi, y en donde M representa preferiblemente un para-nitrofenoxilo,

- obtener el compuesto (IV) mediante la reacción de adición de dicho compuesto (II) sobre dicho compuesto (III), en donde dicho compuesto (IV) tiene la fórmula:



en donde R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R'9, V, X, Y' y Z' son tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y 12, y

- desproteger las funciones alcohólicas presentes en el grupo R'0 de dichos compuestos (IV) para obtener dicho compuesto (I).

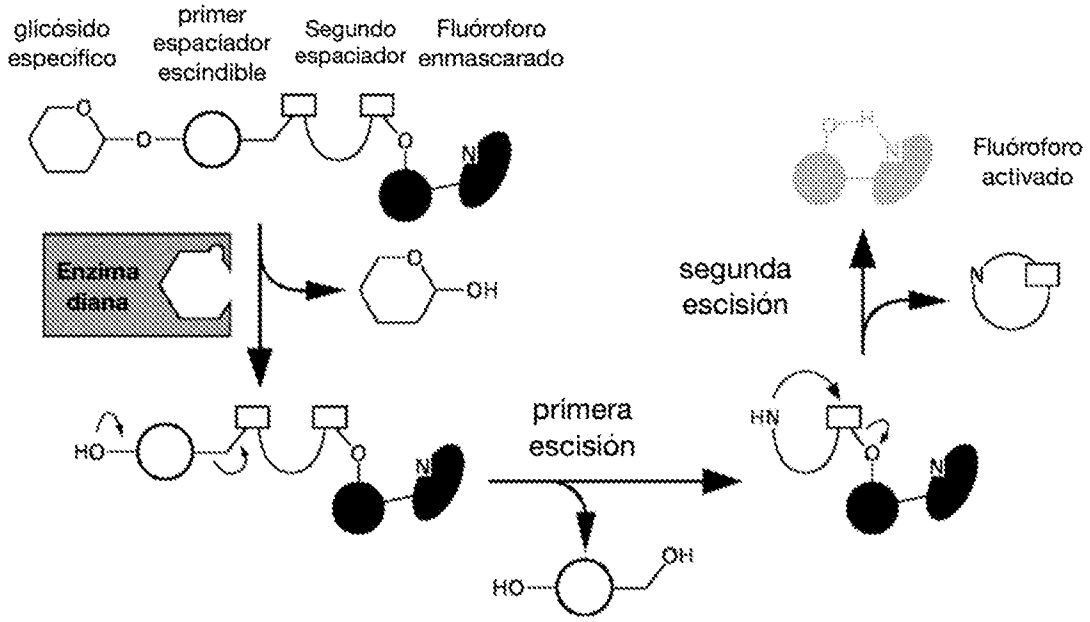


FIG.1

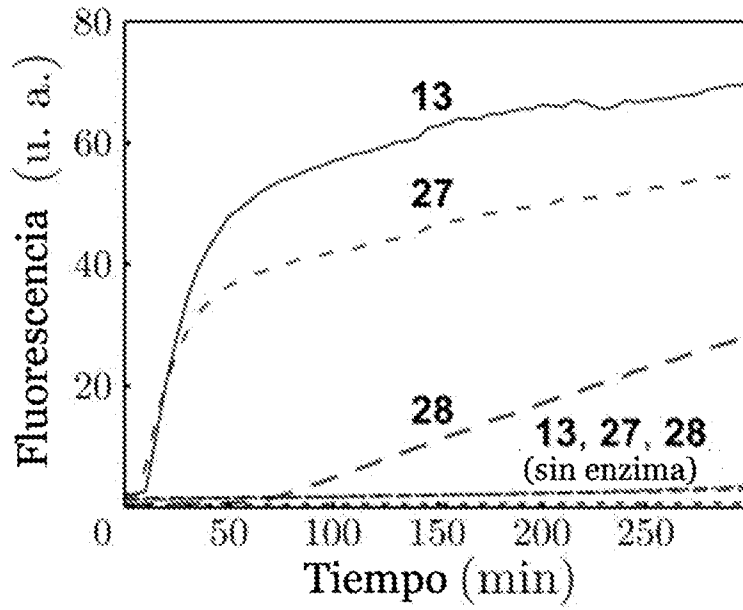


FIG.2

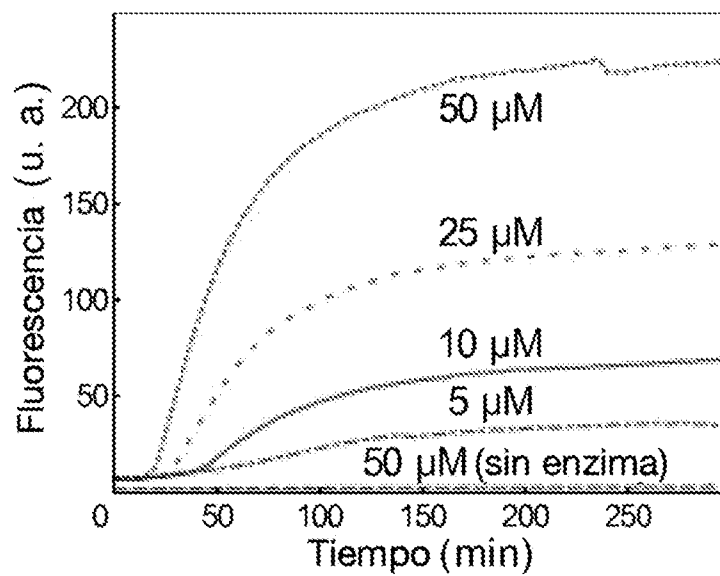


FIG.3

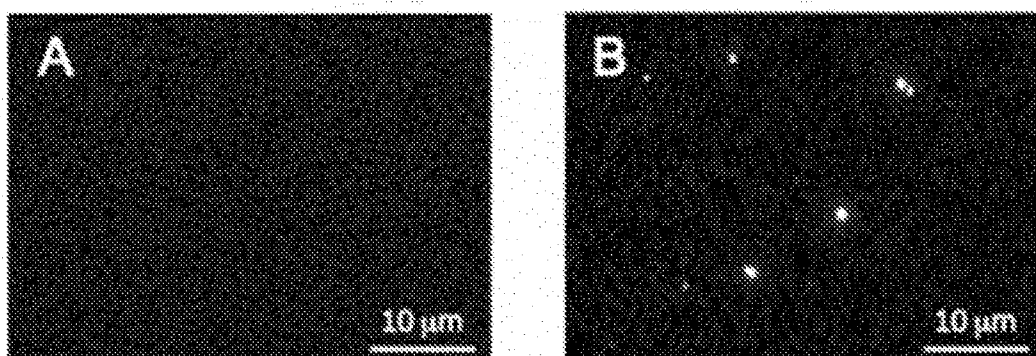


FIG.4

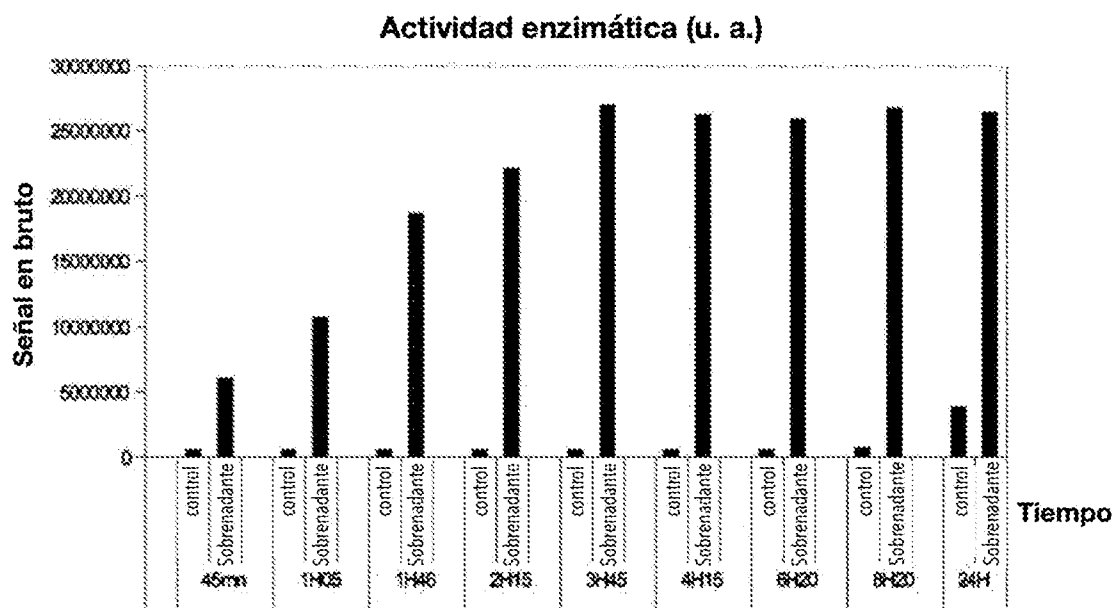


FIG.5