

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 847 276**

21 Número de solicitud: 202030075

51 Int. Cl.:

C07D 215/58 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

G01N 33/52 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

31.01.2020

43 Fecha de publicación de la solicitud:

02.08.2021

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (60.0%)
C/ Serrano, 117
28006 Madrid (Madrid) ES y
UNIVERSIDAD DE GRANADA (40.0%)**

72 Inventor/es:

**HERRANZ HERRANZ, M^a Del Rosario;
FUEYO GONZÁLEZ, Francisco José;
GUTIÉRREZ RODRÍGUEZ, Marta;
IZQUIERDO GARCÍA, Carolina;
GONZÁLEZ VERA, Juan Antonio;
ORTE GUTIÉRREZ, Ángel;
GARCÍA FERNÁNDEZ, Emilio y
CANO CORTÉS, Maria Victoria**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **DERIVADOS DE 8-METOXI-2-OXO-1,2-DIHIROCICLOPENTA[de]QUINOLINA Y SU
APLICACIÓN COMO REACTIVOS DE MARCAJE DE LA LUMINISCENCIA DE LANTÁNIDOS**

57 Resumen:

Derivados de 8-metoxi-2-oxo-1,2-dihidrociclopenta[de]quinolina y su aplicación como reactivos de marcaje de la luminiscencia de lantánidos.

La presente invención se refiere al diseño y síntesis de nuevos fluoróforos con aplicación en el desarrollo de biosensores de fluorescencia, y particularmente, a derivados de 8-metoxi-2-oxo-1,2-dihidrociclopenta(de)quinolina y su aplicación como reactivos de marcaje de la luminiscencia de lantánidos.

ES 2 847 276 A1

DESCRIPCIÓN**DERIVADOS DE 8-METOXI-2-OXO-1,2-DIHIROCICLOPENTA[de]QUINOLINA Y SU APLICACIÓN COMO REACTIVOS DE MARCAJE DE LA LUMINISCENCIA DE LANTÁNIDOS**

5

La presente invención se refiere al diseño y síntesis de nuevos fluoróforos con aplicación en el desarrollo de biosensores de fluorescencia, y particularmente, a derivados de 8-metoxi-2-oxo-1,2-dihidrociclopenta[de]quinolina y su aplicación como reactivos de marcate de la luminiscencia de lantánidos.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El conocimiento de la estructura y funciones de células, órganos y organismos vivos constituye un reto constante en la biología y la medicina modernas, que requiere el desarrollo de técnicas analíticas y de visualización ingeniosas e innovadoras y de biosensores apropiados. Entre estos, los biosensores ópticos ocupan un lugar destacado por su rapidez de respuesta, su sensibilidad y la posibilidad de detección simultánea de varios analitos. Dentro de este grupo, en los últimos años, los biosensores luminiscentes se encuentran entre los más utilizados, por su alta selectividad, sensibilidad y versatilidad, pudiéndose utilizar incluso en aplicaciones *in vivo* con alta resolución espacial y temporal (Velasco-García, M. N. *Semin. Cell. Dev. Biol.* **2009**, *20*, 27; Kobayashi, H. et al. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 83). Esta técnica implica la excitación de las biomoléculas, mediante irradiación con luz UV/visible, seguida de relajación a su estado fundamental, mediante emisión de gran parte de la energía absorbida en forma de luz.

20

25

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

30

35

simultaneo de sondas de diferentes lantánidos para detectar cuantitativamente distintos analitos sin interferencia cruzada (detección multicanal); c) grandes desplazamientos de Stokes entre las longitudes de onda de excitación y las de emisión, evitando los problemas de auto-absorción dependiente de la concentración (Werts, M. H. V. *Sci. Prog.* **2005**, *88*, 101; Eliseeva, S. V. Et al. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 189; Heffern, M. C. et al. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 4496). Las bandas de absorción y emisión de los cationes lantánidos corresponden a transiciones electrónicas entre los orbitales 4f que son prohibidas. Por ello, presentan bajos coeficientes de absorbancia, lo que dificulta su excitación. Este problema se evita aprovechando la posibilidad de excitación indirecta mediante transferencia de energía desde cromóforos orgánicos con alto coeficiente de absorción molar. Este proceso se conoce como sensibilización o efecto antena y al cromóforo se le denomina “antena” (Heffern, M.C. et al. *Chem. Rev.* 2014, 114, 4496)

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

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

35

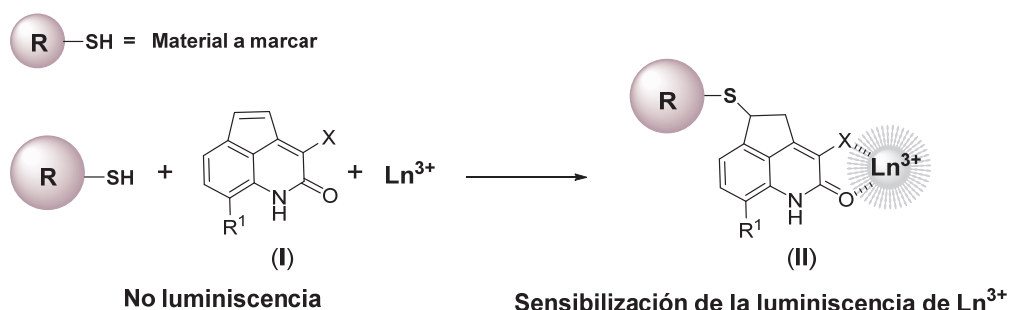
La presente invención se refiere a compuestos derivados de 8-metoxi-2-oxo-1,2-

dihidrociclopenta[de]quinolina de fórmula (I) que se comportan como aceptores de Michael muy reactivos frente a tioles (RSH), transformándose por reacción con éstos en estructuras que, a su vez, se comportan como antenas de la luminiscencia de cationes lantánidos (Ln^{3+}).

5

Esta característica hace que los compuestos de fórmula (I) tengan aplicación como reactivos muy eficaces para el marcaje luminiscente de muestras biológicas, entre las que se incluyen péptidos y proteínas, y de nanopartículas, con utilidad en el desarrollo de biosensores luminiscentes, tal y como se representa en el siguiente esquema de reacción, donde R^1 y X se definen más adelante.

10



Entre las ventajas que presenta la presente invención destacar que:

15

a) Los compuestos de fórmula (I) no emiten fluorescencia y no sensibilizan la luminiscencia de cationes lantánidos, mientras que, los productos de su reacción con las especies a marcar, de fórmula (II), sensibilizan la emisión de diversos lantánidos, preferentemente la luminiscencia roja de Eu^{3+} . Por lo cual, estos reactivos no interfieren en la emisión de las especies marcadas a analizar y, por ello, no es necesario lavar las muestras para eliminar el exceso de reactivo. Esta característica simplificaría los análisis y aportaría alta sensibilidad.

20

b) A diferencia de otras sondas luminiscentes, los compuestos de fórmula (I) no requieren la incorporación de grupo reactivo para el anclaje al material a marcar, ya que, en este caso, el anclaje se realiza por adición al doble enlace, que forma parte del propio cromoforo, contribuyendo con ello a un pequeño tamaño y, por tanto, a una menor perturbación de la estructura de la diana a marcar.

25

c) Las 2-oxo-1,2,4,5-tetrahidrociclopenta[de]quinolinas (II), que se forman en la reacción de los compuestos de la invención (I) con tioles, sensibilizan diversos cationes lantánidos, por lo que estos compuestos constituyen herramientas de marcaje que permitirían la detección multicanal de diferentes lantánidos.

5

d) Los grandes desplazamientos de Stokes entre la longitud de onda de absorción de la antena (≈ 300 nm) y las longitudes de onda de emisión de los lantánidos evitan problemas de autoabsorción.

10

e) Largos tiempos de vida de luminiscencia (μs - ms), que posibilitan la fluorimetría en tiempo resuelto, donde se aplica un retraso entre el pulso de excitación y la ventana de detección, eliminando las interferencias por la autofluorescencia de los medios biológicos y aumentando sensiblemente la relación señal-ruido y, por tanto, la sensibilidad.

15

f) Bandas de emisión de los lantánidos muy finas que no solapan, permitiendo el uso simultaneo de sondas de diferentes lantánidos para detectar cuantitativamente distintos analitos sin interferencia cruzada (detección multicanal).

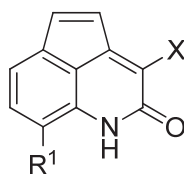
20

g) Los compuestos de fórmula (I) constituyen herramientas de marcaje luminiscente para estudios tanto *in vitro* como *in cellulo*.

h) Esta forma de marcaje luminiscente es novedosa y no ha sido descrita en los reactivos de marcaje conocidos hasta la fecha.

25

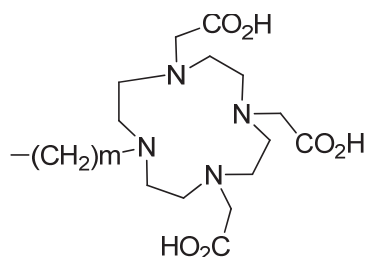
Por tanto, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula (I):



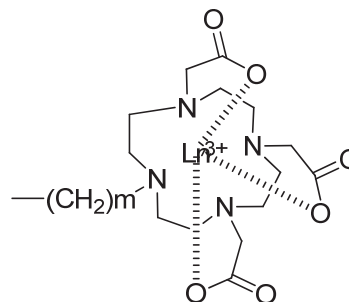
(I)

o cualquiera de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables, donde R^1 se selecciona de entre H, $-\text{OR}^2$, y $-\text{NR}^3\text{R}^4$, siendo R^2 , R^3 y R^4 seleccionados independientemente de entre H, y alquilo(C_1 - C_6) opcionalmente sustituido; y X se selecciona de entre los grupos $-\text{CO}_2\text{R}^5$, $-\text{PO}(\text{OH})_2$, $-\text{PO}_3\text{HR}^5$, $-\text{SO}_3\text{R}^5$, $-\text{SO}_2\text{NHR}^5$,

-CONHR⁵, -PO(OH)NHR⁵, y -PO(NHR⁵)₂, donde R⁵ se selecciona de entre H, alquilo(C₁-C₆), la estructura **(A)** y la estructura **(A')**:



(A)



(A')

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

En una realización preferida, R¹ es -OR² y R² es un alquilo(C₁-C₆), más preferiblemente R² es metilo.

10

En otra realización preferida X es -CO₂R⁵; y más preferiblemente -CO₂H.

En otra realización preferida X es -PO(OH)₂.

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

20 En otra realización preferida X es -CONHR⁵ siendo R⁵ un grupo de estructura **(A')**, donde m se selecciona de entre 2, 3 y 4 y Ln³⁺ se selecciona de entre La³⁺, Ce³⁺, Eu³⁺, y Tb³⁺; más preferiblemente m es 2 y Ln³⁺ es La³⁺, Eu³⁺, o Tb³⁺.

En otra realización preferida X es -PO(OH)NHR⁵ siendo R⁵ un grupo de estructura **(A)**, donde m se selecciona de entre 2, 3 y 4; y más preferiblemente m es 2.

25 En otra realización preferida X es -PO(OH)NHR⁵ siendo R⁵ un grupo de estructura **(A')**, donde m se selecciona de entre 2, 3 y 4 y Ln³⁺ se selecciona de entre La³⁺, Ce³⁺, Eu³⁺, y Tb³⁺; más preferiblemente m es 2 y Ln³⁺ es La³⁺, Eu³⁺, o Tb³⁺.

Asimismo, hay que entender que la presente invención abarca todos los isómeros de los compuestos de fórmula (I), es decir, todas las formas geométricas, tautoméricas y ópticas, y sus mezclas (por ejemplo, mezclas racémicas). Cuando hay más centros quirales en los compuestos de fórmula (I), la presente invención incluye dentro de su
5 alcance todos los posibles diastereómeros, incluidas sus mezclas. Las diferentes formas isómeras pueden separarse o resolverse entre sí por métodos convencionales, o cualquier isómero dado puede obtenerse por métodos sintéticos convencionales o por síntesis estereoespecífica, estereoselectiva o asimétrica.

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

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

25 En este sentido, dentro del alcance de la presente invención se encuentran las sales farmacéuticamente aceptables de dichos compuestos que contienen los isótopos mencionados anteriormente y/u otros isótopos de otros átomos. Los compuestos marcados con isótopos de la presente invención, por ejemplo aquéllos en que se
30 incorporan isótopos radioactivos tales como ^3H o ^{14}C , son útiles en ensayos de distribución de fármacos y/o sustratos en tejidos. Se prefieren particularmente los isótopos tritio, es decir ^3H , y carbono-14, es decir, ^{14}C , por su facilidad de preparación y detectabilidad. Los isótopos ^{11}C y ^{18}F son particularmente útiles en PET (tomografía de emisión de positrones), y los isótopos ^{125}I son particularmente útiles en SPECT
35 (tomografía computerizada de emisión de un solo fotón), todos útiles en la formación de imágenes del cerebro. Además, la sustitución con isótopos más pesados tales como

deuterio, es decir, ^2H , puede proporcionar algunas ventajas terapéuticas que resultan de la mayor estabilidad metabólica, por ejemplo, mayor vida media *in vivo* o menores requisitos de dosificación, y por lo tanto en algunos casos pueden ser preferidos. Los compuestos isotópicamente marcados de fórmula (I) se pueden preparar generalmente
5 llevando a cabo los procedimientos descritos en los siguientes ejemplos, sustituyendo un reactivo no marcado isotópicamente por un reactivo isotópicamente marcado fácilmente disponible.

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

Los ejemplos preferidos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales de amonio, calcio, magnesio, potasio y sodio, y las formadas a partir de ácidos maleico,
35 fumárico, benzoico, ascórbico, pamoico, succínico, clorhídrico, sulfúrico, bismetilensalicílico, metanosulfónico, etanodisulfónico, propiónico, tartárico, salicílico,

cítrico, glucónico, aspártico, esteárico, palmítico, itacónico, glicólico, p-aminobenzoico, glutámico, bencenosulfónico, ciclohexilsulfámico, fosfórico y nítrico.

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

10

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

15

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

20

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

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

25

En una realización preferida, el material a marcar luminiscentemente con el reactivo (I) se selecciona de entre nanopartículas de poliestireno funcionalizadas con grupos tiol.

30

En una realización más preferida, la coordinación de las nanopartículas de poliestireno con lantánidos y sensibilización de su luminiscencia se realiza *"in vitro"*.

35

Otro aspecto de la invención se refiere a biosensores luminiscentes que comprenden al

menos un compuesto de fórmula (I) tal y como se ha definido anteriormente.

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

En la presente invención el término “alquilo” se refiere a radicales de cadenas hidrocarbonadas, lineales o ramificadas, que tienen de 1 a 6 átomos de carbono, preferiblemente de 1 a 4, y que se unen al resto de la molécula mediante un enlace sencillo, por ejemplo, metilo, etilo, *n*-propilo, *i*-propilo, *n*-butilo, *terc*-butilo, *sec*-butilo, *n*-pentilo, *n*-hexilo etc. Opcionalmente puede estar sustituido por al menos un sustituyente, donde los sustituyentes se seleccionan de entre OR', =O, SR', SOR', SO₂R', NO₂, NHR', N(R')₂, =N-R', NHCOR', N(COR')₂, NHSO₂R', NR'C(=NR')NHR', CN, halógeno, C(O)R', COOR', OC(O)R', CONHR', CON(R')₂, alquilo (C₁-C₁₀) sustituido o no sustituido, alqueno (C₂-C₁₀) sustituido o no sustituido, alquino (C₂-C₁₀) sustituido o no sustituido, arilo (C₆-C₁₈) sustituido o no sustituido y heterociclo (C₅-C₁₈) sustituido o no sustituido, donde cada grupo R' es seleccionado independientemente entre H, OH, NO₂, NH₂, SH, CN, halógeno, O, C(O)H, C(O)alquilo, COOH, alquilo (C₁-C₅) sustituido o no sustituido, alqueno (C₂-C₅) sustituido o no sustituido, alquino (C₂-C₅) sustituido o no sustituido.

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

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

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

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

5

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

10

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

15 **FIG. 1.** Esquema del marcaje luminiscente de péptidos en fase sólida con el reactivo de marcaje **(3)**

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

20 **FIG. 3.** Esquema del marcaje luminiscente de nanopartículas de poliestireno con **NP-6(Ln³⁺)**

FIG. 4. Visualización de células A549 con nanopartículas marcadas con el fluoróforo **(6)** y coordinadas con cationes Ln^{3+} [**NP-6(Ln³⁺)**]

EJEMPLOS

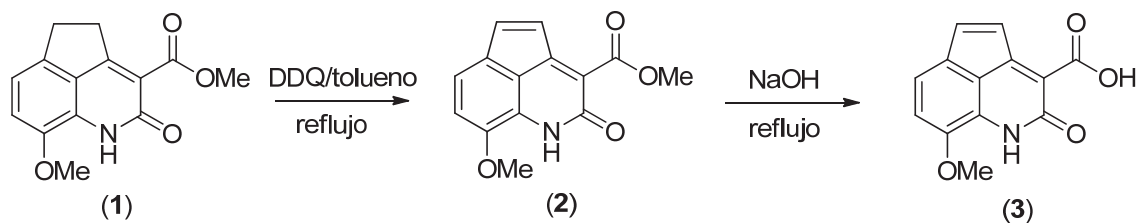
25

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

30 **Ejemplo 1: Síntesis del ácido 8-metoxi-2-oxo-1,2-dihidrociclopenta[de]quinolina-3-carboxílico (3)**

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

35



Síntesis de 8-metoxi-2-oxo-1,2-dihidrociclopenta[de]quinolina-3-carboxilato de metilo

5 (2)

A una disolución de 8-metoxi-2-oxo-1,2,4,5-tetrahidrociclopenta[de]quinolina-3-carboxilato de metilo (**1**) (810 mg, 3,30 mmol) en tolueno (25 ml), se le añadió 2,3-dicloro-5,6-diaciano-*p*-benzoquinona (900 mg, 3,95 mmol) y la mezcla se agitó a reflujo durante 4 horas. A continuación, el crudo de reacción se evaporó a sequedad y se purificó mediante cromatografía flash, utilizando gradiente 0-5% de MeOH en CH₂Cl₂ como eluyente, para obtener el derivado deseado **2** (350 mg, 42%) como un sólido rojizo. Pf: 203 °C HPLC-MS (gradiente 30-95% de disolución 0,1 % de ácido fórmico en acetonitrilo en disolución 0,1 % de fórmico en H₂O, 10 min) $t_R = 2.32$ min. ¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ : 3,89 (s, 3H), 3,91 (s, 3H), 6,62 (d, 1H, $J = 7,5$ Hz), 6,82 (d, 1H, $J = 5,5$ Hz), 6,96 (d, 1H, $J = 7,5$ Hz), 7,05 (d, 1H, $J = 5,5$ Hz), 9,79 (s, 1H). ¹³C-RMN (CDCl₃, 100 MHz) δ : 52,5, 56,4, 110,8, 118,3, 119,86, 120,1, 125,4, 126,3, 131,5, 141,05, 147,6, 152,7, 161,6, 164,7. HRMS (ESI) m/z : Calcd. para C₁₄H₁₁ClNO₄ ([M+H]⁺): 258,0760, Encd: 258,0756.

20 Síntesis del ácido 8-metoxi-2-oxo-1,2-dihidrociclopenta[de]quinolina-3-carboxílico (3)

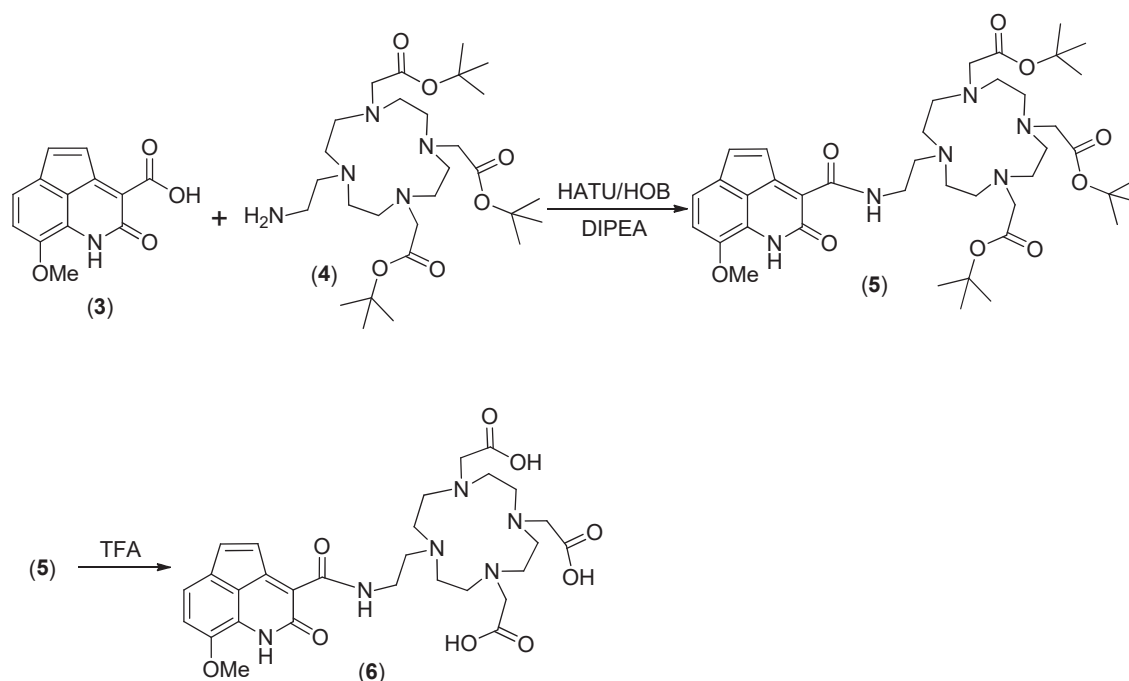
Al éster metílico **2** (200 mg, 0.77 mmol), se le añadió una disolución de NaOH 2N (5 ml) y la mezcla se calentó a reflujo durante 30 minutos. A continuación, se liofilizó y el residuo se purificó mediante cromatografía flash en fase reversa, usando gradiente 0-10% de CH₃CN en H₂O como eluyente, obteniendo el ácido carboxílico deseado **3** (150 mg, 80 %) como un sólido naranja-rojizo. Pf: 274 °C. HPLC-MS (gradiente 5-95% de disolución 0,1 % de ácido fórmico en acetonitrilo en disolución 0,1 % de fórmico en H₂O, 10 min) $t_R = 7.93$ min. ¹H-RMN (D₂O, 400 MHz) δ : 3,76 (s, 3H), 6,59 (d, 1H, $J = 5,5$ Hz), 6,62 (d, 1H, $J = 7,5$ Hz), 6,96 (d, 1H, $J = 5,5$ Hz), 6,98 (d, 1H, $J = 7,5$ Hz). ¹³C-RMN (D₂O, 100 MHz) δ : 55,8, 109,5, 119,0, 119,1, 120,0, 124,4, 128,0, 130,7, 137,0, 144,1, 150,0, 166,2, 174,0. HRMS (ESI) m/z : Calcd. para C₁₃H₉NO₄ ([M+H]⁺): 244,0604, Encd: 244,0604.

Ejemplo 2: Síntesis del ácido 2,2',2''-(10-(2-(8-metoxi-2-oxo-1,2-dihidro-ciclopenta[de]quinolina-3-carboxamido)etil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-triil)-triacético (6)

5

El ácido 2,2',2''-(10-(2-(8-metoxi-2-oxo-1,2-dihidro-ciclopenta[de]quinolina-3-carboxamido)etil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-triil)-triacético (**6**) se sintetizó a partir del derivado de DO3A 2,2',2''-(10-(2-aminoetil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-triil)triacetato de tri-*tert*-butilo (**4**) (de la Reberdière, A. *et al. Tetrahedron Letters* **2012**, 53, 6115) y del ácido **3** tal como se indica en el siguiente esquema de reacción:

10



15

Síntesis de 2,2',2''-(10-(2-(8-metoxi-2-oxo-1,2-dihidrociclopenta[de]-quinolina-3-carboxa-mido)etil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-triil)triacetato de tri-*tert*-butilo (5)

20

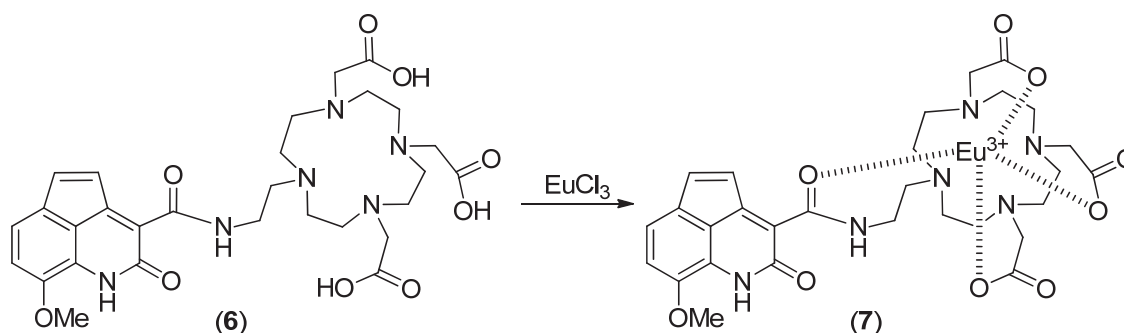
A una disolución de la ciclopentaquinolinona (**3**) (70 mg, 0,29 mmol) y del derivado de DO3A (**4**) (176 mg, 0,31 mmol) en DMF (10 ml), se le añadió HBTU (130 mg, 0,35 mmol), HOBt (53 mg, 0,35 mmol) y DIPEA (60 μ L, 0,35 mmol). La mezcla se agitó en atmósfera de argón durante 16 horas. Transcurrido este tiempo, la mezcla se evaporó a sequedad y el residuo se purificó mediante cromatografía flash, usando gradiente 0-5 % de MeOH en CH_2Cl_2 como eluyente, obteniendo el derivado deseado (**5**) (120 mg, 53 %) como sirope naranja. HPLC-MS (gradiente 5-95% de disolución 0,1 % de ácido fórmico en

acetonitrilo en disolución 0,1 % de fórmico en H₂O, 10 min) $t_R = 7,32$ min. ¹H-RMN [(CD₃)₂CO, 400 MHz] δ : 1,31 (s, 27H), 1,32 – 1,39 y 1,87 – 1,95 (2m, 20H), 2,41 (s, 2H), 3,22 – 3,28 (m, 2H), 3,43 – 3,53 (m, 2H), 3,86 (s, 3H), 6,82 (d, 1H, $J = 7,5$ Hz), 7,07 (d, 1H, $J = 7,5$ Hz), 7,11 (d, 1H, $J = 5,5$ Hz), 7,55 (d, 1H, $J = 5,5$ Hz), 10,03 (t, 1H, $J = 6$ Hz). ¹³C-RMN [(CD₃)₂CO, 125 MHz] δ : 28,2, 29,4, 30,2, 36,6, 43,4, 55,4, 56,8, 82,7, 82,7, 112,1, 119,6, 119,8, 121,2, 125,6, 129,3, 132,3, 141,4, 148,7, 154,4, 164,8, 164,9, 165,0 y 174,0.

10 Síntesis del ácido 2,2',2''-(10-(2-(8-metoxi-2-oxo-1,2-dihidro-ciclopenta[de]quinolina-3-carboxamido)etil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-triil)triacético (6)

Una disolución del éster *terc*-butílico (5) (40 mg, 0.05 mmol) en TFA (2 ml), se agitó a temperatura ambiente bajo atmosfera de argón durante 1,5 horas. A continuación, se evaporó el TFA y el residuo se purificó por HPLC-semipreparativa en una columna SunFire Prep C18 OBD de 5 μ m (19x150 mm), obteniendo el compuesto deseado (6) (8 mg, 25 %) como un sólido naranja claro. HPLC-MS (gradiente 2-30% de disolución 0,1 % de ácido fórmico en acetonitrilo en disolución 0,1 % de fórmico en H₂O, 10 min) $t_R = 8,80$ min. ¹H-NMR (D₂O, 500 MHz) δ : 2,89 – 3,37 (m, 16H), 3,39 – 3,46 (m, 4H), 3,48 (s, 2H), 3,63 (s, 3H), 3,65 – 3,71 (m, 4H), 6,33 (d, 1H, $J = 7,5$ Hz), 6,60 (d, 1H, $J = 5$ Hz), 6,64 (d, 1H, $J = 7,5$ Hz), 6,73 (d, 1H, $J = 5$ Hz). ¹³C-RMN [(CD₃)₂CO, 125 MHz] δ : 35,2, 45,6, 47,7, 48,3, 50,4, 51,1, 54,2, 55,9, 56,3, 111,0, 115,8, 117,5, 121,6, 123,0, 126,0, 130,1, 141,3, 147,5, 153,0, 163,3, 165,5, 169,7. HRMS (ESI): Calcd. para C₄₁H₆₃N₆O₉ ([M+H]⁺): 783,4651, Encd: 783,4664.

25 Ejemplo 3: Síntesis de 2,2',2''-(10-(2-(8-metoxi-2-oxo-1,2-dihidrociclopenta[de]quinolina-3-carboxamido)etil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-triil)triacetato de europio (III) (7)



30 A una disolución del ácido (6) en H₂O (310 μ l, 10 mmol), se le añadió una disolución de

EuCl₃ en H₂O (310 µl, 50 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas, obteniendo una disolución 5 mM de la sal de Eu(III) deseada (**7**), que fue utilizada tal cual para el marcaje de muestras de interés con la luminiscencia de este catión. HPLC-MS (gradiente 5-95% de disolución 0,1 % de ácido fórmico en acetonitrilo en disolución 0,1 % de fórmico en H₂O, 10 min) $t_R = 5,38$ min. HRMS (ESI): Calcd. para C₄₁H₆₃N₆O₉ ([M+H]⁺): 783,4651, Encd: 783,4660.

Ejemplo 4: Marcaje luminiscente en disolución de péptidos con el compuesto (3)

Los péptidos utilizados en este estudio fueron derivados de la proteína Tau (Wada, Y. *et al. J. Biochem.* **1998**, 124, 738), que incorporan un único residuo de cisteína. Se sintetizaron mediante síntesis en fase sólida y después de aislarlos y purificarlos, se disolvieron en tampón Hepes a pH 7,4 y se marcaron en residuo de cisteína por reacción con el compuesto (**3**) en exceso (de 5-10 veces), durante 16h a 4 °C. Posteriormente, el exceso de antena se eliminó por purificación en columnas NAP-5 (GE Healthcare; rendimiento 100% por HPLC-MS analítico) y los péptidos marcados resultantes se coordinaron con el correspondiente lantánido tras adición *in situ* de la respectiva sal de lantánido (TbCl₃, EuCl₃, Sc(OTf)₃, Y(OTf)₃ o La(OTf)₃) en exceso (de 5-100 veces) a 25 °C en buffer Hepes a pH 7,4.

20

Ejemplo 5: Marcaje luminiscente en fase sólida de péptidos con el compuesto (3)

Al igual que en el Ejemplo 4, los péptidos utilizados en este estudio fueron derivados de la proteína Tau (Wada, Y. *et al. J. Biochem.* **1998**, 124, 738), incorporan un único residuo de cisteína y se sintetizaron en fase sólida. Tal como se muestra de forma simplificada en la Figura 1, estos péptidos unidos a la resina (PAL-PEG, 50 mg, 0,0095 mmol, 1 equiv.), que incorporaba el residuo de cisteína protegido como Cys(Mmt), lábil en medio ácido, se hincharon con CH₂Cl₂ (5 min) y DMF (5 min). El grupo protector Mmt se eliminó por tratamiento con TFA al 1%, triisopropilsilano (TIS) al 5% en CH₂Cl₂ bajo atmósfera de N₂ (4 x 20 min o hasta que la mayor parte del color amarillo debido al catión Mmt desapareció). A continuación, la resina se sometió a un lavado riguroso con CH₂Cl₂ (5 x) y DMF (5 x), se le añadió DIEA (0,0475 mmol, 5 equiv.) en DMF anhidra (200 µL) y la mezcla resultante se agitó durante 2-3 min a 25 °C. Seguidamente se añadió el compuesto (**3**) (17 mg, 0,0285 mmol, 3 equiv.) a la resina en DMF anhidra (150 µL) y tras 12 horas agitando a temperatura ambiente, la resina se filtró para eliminar los reactivos en exceso y se lavó con DMF, CH₂Cl₂, MeOH, CH₂Cl₂ (5 x cada uno). El

35

desanclaje del péptido de la resina y eliminación de los grupos protectores se llevó a cabo por tratamiento de los péptidos unidos a la resina con TFA/EDT/H₂O/TIS (94:2,5:2,5:1% v/v). La disolución resultante se concentró bajo una corriente de N₂ y se precipitó mediante la adición de Et₂O frío. El sedimento se trituró con Et₂O frío (3 x), se
5 redisolvió en agua, se filtró y se liofilizó. Los péptidos se purificaron mediante HPLC-MS de fase reversa semipreparativa. Los péptidos marcados resultantes se coordinaron con el correspondiente lantánido tras adición *in situ* de la respectiva sal (TbCl₃, EuCl₃, Sc(OTf)₃, Y(OTf)₃ o La(OTf)₃) en exceso (de 5-100 veces) a 25 °C en buffer Hepes a pH 7,4. La coordinación con TbCl₃ dio lugar a un incremento de luminiscencia de 12.100
10 veces, mientras que la coordinación con EuCl₃ dio lugar a un incremento de luminiscencia de 68.000 veces (Figura 2).

Ejemplo 6: Coordinación del compuesto (6) con diversos lantánidos

15 A una disolución del compuesto (6) (2,3 mg, 0,003 mmol) en 300 µL de buffer Hepes 50 mM, pH 7,4, NaCl 500 mM, se le añadieron 300 µL de la correspondiente sal del lantánido (TbCl₃, EuCl₃, Sc(OTf)₃, Y(OTf)₃ o La(OTf)₃ (disolución 40 mM en HCl 1 mM), la disolución resultante se diluyó hasta 1 mL en H₂O y, posteriormente, la mezcla se agitó durante 16h a 4 °C. El complejo resultante [6-(Ln³⁺)] (rendimiento 100% por HPLC-
20 MS analítico) se usó en la siguiente etapa de marcaje sin purificación adicional (Figura 3).

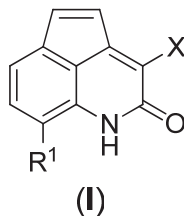
Ejemplo 7: Marcaje de nanopartículas con los complejos [6-(Ln³⁺)]

25 Tal como se muestra en la Figura 6, nanopartículas de poliestireno funcionalizadas con grupos tiol se marcaron por reacción con complejos [6-(Ln³⁺)] en exceso (5-10 equivalentes) durante toda la noche a 4-37 °C en buffer Hepes a pH 7.4. Los reactivos en exceso se eliminaron mediante diversos ciclos de centrifugación y la eficacia del marcaje se evaluó por citometría de flujo acoplada a espectrometría de masas CyTOF.
30 Como control negativo se emplearon nanopartículas marcadas con (6) y sin lantánido. Finalmente, las nanopartículas luminiscentes resultantes (NP-6-(Ln³⁺)) se usaron para su visualización en células tumorales de pulmón A549 (ca. 5000 NPs por célula, Figura 4).

35

REIVINDICACIONES

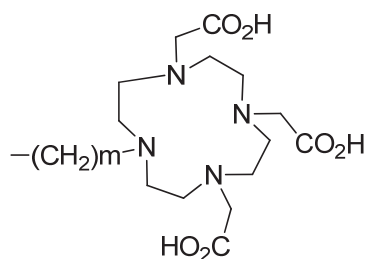
1. Compuesto de fórmula (I):



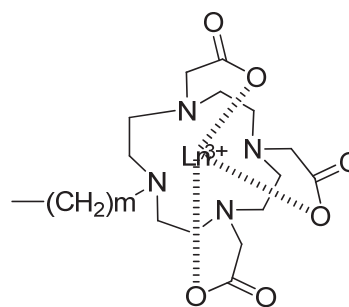
5 o cualquiera de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables, donde R^1 se selecciona de entre H, $-OR^2$, y $-NR^3R^4$, siendo R^2 , R^3 y R^4 seleccionados independientemente de entre H, y alquilo(C_1 - C_6) opcionalmente sustituido;

y

10 X se selecciona de entre los grupos $-CO_2R^5$, $-PO(OH)_2$, $-PO_3HR^5$, $-SO_3R^5$, $-SO_2NHR^5$, $-CONHR^5$, $-PO(OH)NHR^5$, y $-PO(NHR^5)_2$, donde R^5 se selecciona de entre H, alquilo(C_1 - C_6), la estructura (A) y la estructura (A'):



(A)



(A')

15 donde m se selecciona de entre 2, 3 y 4; y Ln^{3+} es un lantano, que preferiblemente se selecciona de entre La^{3+} , Ce^{3+} , Pr^{3+} , Nd^{3+} , Pm^{3+} , Sm^{3+} , Eu^{3+} , Gd^{3+} , Tb^{3+} , Dy^{3+} , Ho^{3+} , Er^{3+} , Tm^{3+} , Yb^{3+} , y Lu^{3+} .

2. Compuesto según la reivindicación 1, donde R^1 es $-OR^2$ y R^2 es un alquilo(C_1 - C_6).

3. Compuesto según la reivindicación anterior donde R^1 es $-OMe$.

20

4. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde X es $-CO_2R^5$, $-PO(OH)_2$, o $-SO_3H$.

5. Compuesto según la reivindicación anterior donde X es $-\text{CO}_2\text{H}$.
6. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde X es $-\text{CONHR}^5$ siendo R^5 un grupo de estructura (A) o (A'), donde m se selecciona de entre 2, 3 y 4.
7. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde X es $-\text{PO}(\text{OH})\text{NHR}^5$ siendo R^5 un grupo de estructura (A) o (A'), donde m se selecciona de entre 2, 3 y 4.
8. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 7 donde m es 2.
9. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 7 donde Ln^{3+} es La^{3+} , Eu^{3+} , o Tb^{3+} .
10. Compuesto según la reivindicación 1 donde el compuesto de fórmula (I) es:
 - ácido 8-metoxi-2-oxo-1,2-dihidrociclopenta[de]quinolina-3-carboxílico; o
 - ácido 2,2',2''-(10-(2-(8-metoxi-2-oxo-1,2-dihidro-ciclopenta[de]quinolina-3-carboxamido)etil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-triil)-triacético.
11. Uso de los compuestos de fórmula (I) según las reivindicaciones 1 a 10 como reactivos para el marcaje luminiscente de muestras biológicas.
12. Uso según la reivindicación 11 donde las muestras biológicas contienen péptidos, proteínas, y/o nanopartículas.
13. Uso según la reivindicación anterior donde el péptido se selecciona de entre secuencias peptídicas de sustratos de quinasas y/o péptidos de 15 aminoácidos derivados de la proteína tau.
14. Uso según la reivindicación anterior donde la secuencia peptídica se selecciona de entre las que poseen una única cisteína.
15. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14 donde el marcaje se realiza en disolución o en fase sólida.

16. Biosensores luminiscentes que comprenden al menos un compuesto de fórmula (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.

5 17. Procedimiento de marcaje luminiscente de muestras biológicas aisladas que comprende poner en contacto dicha muestra biológica con al menos un compuesto de fórmula (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.

10 18. Procedimiento de marcaje según la reivindicación anterior donde el lantánido se añade *in situ* a través de su sal correspondiente.

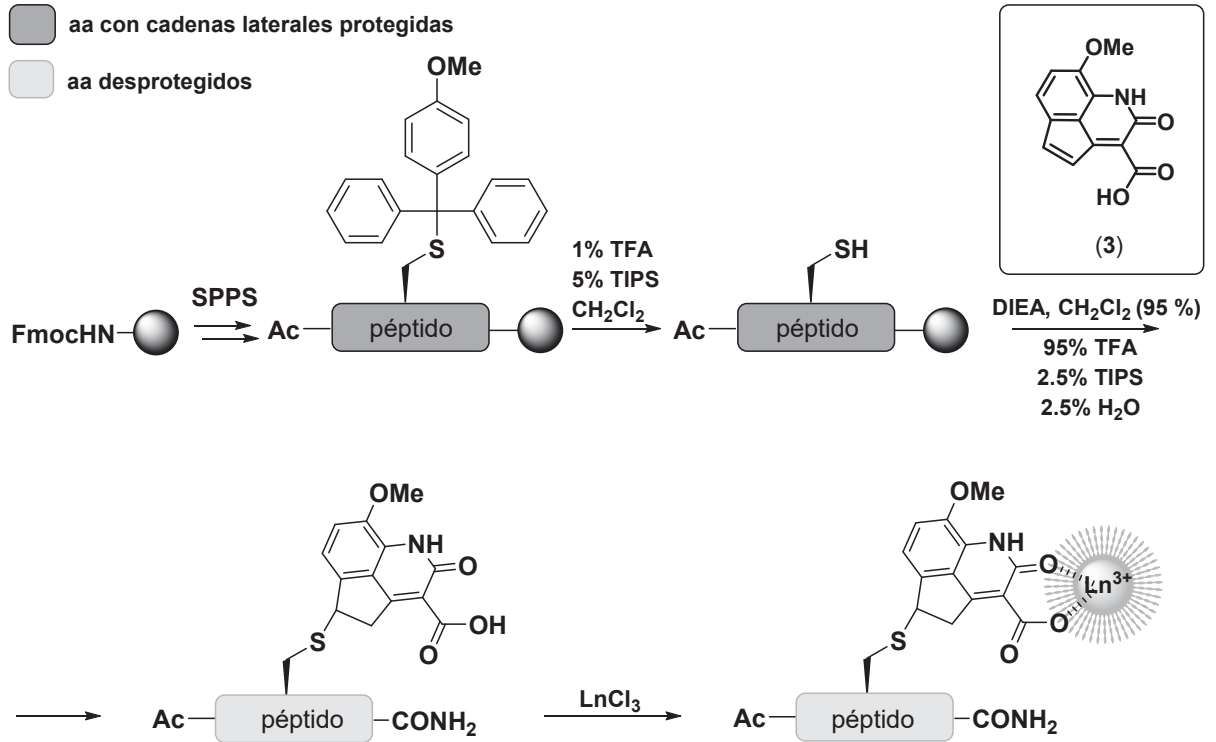


FIG. 1

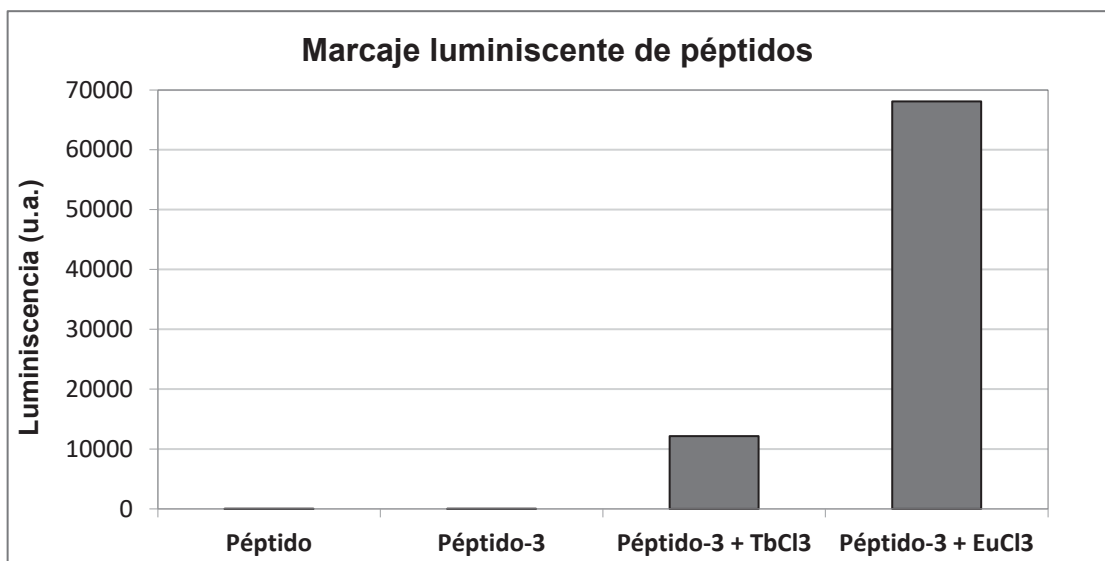


FIG. 2

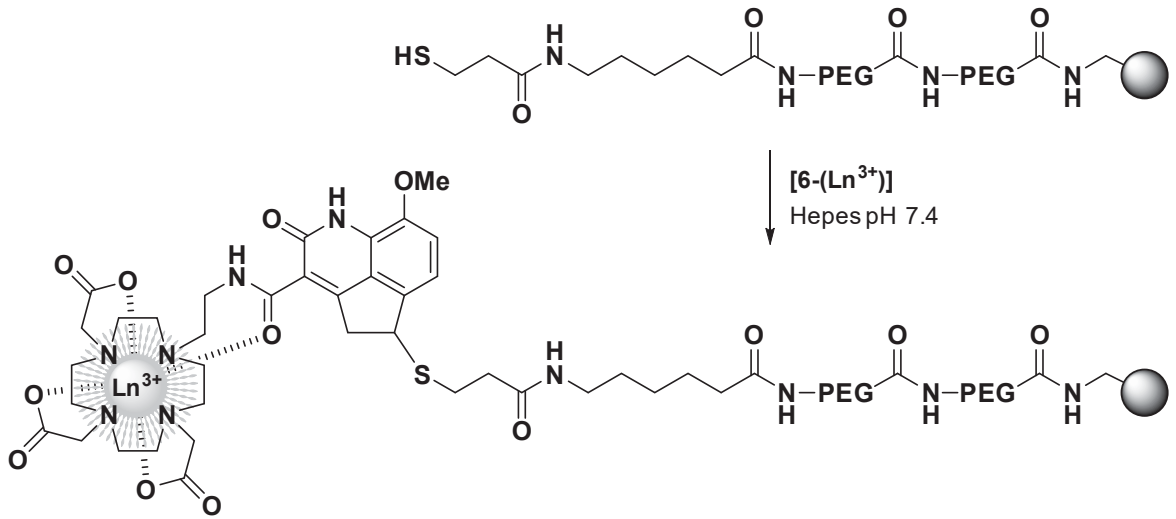


FIG. 3

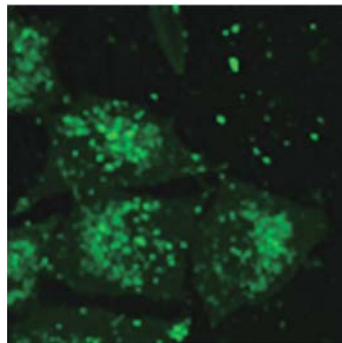


FIG. 4



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 202030075

②② Fecha de presentación de la solicitud: 31.01.2020

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	GE PINGHUA et al. "Carbostyryl derivatives as antenna molecules for luminescent lanthanide chelates". Bioconjugate Chemistry September, 31/08/2004, Vol. 15, Páginas 1088-1094, ISSN 1043-1802 (ISSN print). Ver resumen; métodos experimentales; figura 3; tabla 2.	1-18
A	SY MOHAMADOU et al. "Lanthanide-based luminescence biolabelling". Chemical Communications (Cambridge, England) England, 14/04/2016, Vol. 52, Páginas 5080 - 5095, ISSN 1364-548X (Electronic), <DOI: doi: 10.1039/c6cc00922k pubmed:26911318>. Ver resumen; esquemas 1 y 2; apartado 3.	1-18
A	JUAN A GONZÁLEZ-VERA et al. "Highly solvatochromic and tunable fluorophores based on a 4,5-quinolimide scaffold: novel CDK5 probes". Chemical Communications, 20160101 Royal Society of Chemistry, 01/01/2016, Vol. 52, Páginas 9652 - 9655, ISSN 1359-7345, <DOI: doi: 10.1039/C6CC04566A>. Ver páginas 9652-9653; figura 2; esquema 2.	1-18
A	QUICI et al. "Luminescence properties and solution dynamics of lanthanide complexes composed by a macrocycle hosting site and naphthalene or quinoline appended chromophore". INORGANICA CHIMICA ACTA, 20070429 Elsevier BV, NL. Lippert Bernhard; Miller Jens, 29/04/2007, Vol. 360, Páginas 2549 - 2557, ISSN 0020-1693, <DOI: doi:10.1016/j.ica.2006.12.040>. Ver resumen; esquema 1.	1-18

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
16.07.2020

Examinador
N. Martín Laso

Página
1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C07D215/58 (2006.01)

G01N21/64 (2006.01)

G01N33/52 (2006.01)

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

C07D, G01N

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

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