

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 371 801**

51 Int. Cl.:  
**C07D 239/62** (2006.01)  
**G01N 33/94** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08839884 .7**  
96 Fecha de presentación: **16.10.2008**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2205571**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.07.2010**

54 Título: **USO DE DERIVADOS DE FENOBARBITAL EN INMUNOENSAYOS.**

30 Prioridad:  
**19.10.2007 US 981202 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**10.01.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**10.01.2012**

73 Titular/es:  
**F. Hoffmann-La Roche AG**  
**Grenzacherstrasse 124**  
**4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:  
**HUI, Raymond**

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

**ES 2 371 801 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

Uso de derivados de fenobarbital en inmunoensayos

5 **Ámbito de la presente invención**

La presente invención se refiere al campo del control terapéutico de los fármacos y en particular a derivados de fenobarbital y a métodos de ensayo en los que dichos derivados se usan para determinar fenobarbital en muestras de pacientes.

10

**Antecedentes de la presente invención**

El problema superado por la presente invención es el desarrollo de un inmunoensayo mejorado de aglutinación de micropartículas, no isotópico y homogéneo, específico para el control terapéutico del fármaco fenobarbital, sin reactividad cruzada con otras sustancias de la misma clase de fármacos (barbitúricos), que se basa en la interacción cinética de micropartículas (KIMS).

15

En otros inmunoensayos no isotópicos específicos del fenobarbital se han usado distintas tecnologías, tales como el inmunoensayo de fluorescencia polarizada (FPIA), p.ej. Kirkemo y otros, US 4,614,823; inmunoensayos con señal generada mediante enzimas, p.ej. Bogulaski y otros, US 4,279,992 (EIA); Flentge y otros, US 4,543,412 (EIA); Carrico y otros, US 4,255,566 (derivados de flavina-fenobarbital para EIA); Greenquist, US 4,363,874 (EIA sobre una membrana); Scholz y otros, Recent Dev. Ther. Drug Monit. Clin. Toxicol., 1992, 375-381 (CEDIA); y el inmunoensayo quimioluminiscente, p.ej. Adamczyk y otros, Bio-conjugate Chem., 2000, 11, 714-724 (derivados C6-OCNH-R en posición 5), aunque también se han empleado otros métodos más esotéricos.

20

25

Existen ensayos para barbituratos, como grupo, en que el fenobarbital tiene reactividad cruzada. (Adamczyk y otros, US Pat. 6,472,227 [usando derivados sec-butílicos y ciclopentílicos de barbituratos]; Grote & Hu, US Pats. 5,099,020 y 5,096,838 [FPIA con derivados 5,5-dialquilicos de barbiturato, aunque en la descripción y en las reivindicaciones se incluye un derivado de fenobarbital].

30

También hay un ensayo de aglutinación de micropartículas para la clase de los barbituratos (US 5,618,926), pero con un conjugado de secobarbital-BSA inmovilizado sobre micropartícula (a distinción del conjugado análogo de fenobarbital-aminodextrano en formato disuelto de la presente invención). El fenobarbital es uno de los muchos que tienen reactividad cruzada en el ensayo.

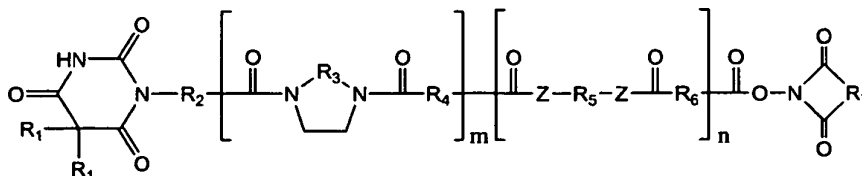
35

Buechler (US 5,414,085) describe compuestos barbitúricos, incluyendo sustancias sustituidas en "5-arilo", también sintetizadas a partir de la posición 5 con un extremo terminado en tiolactona, aunque en la práctica se refiere a derivados de secobarbital.

40

En las patentes US 5,284,948, US 5,298,403, EP 517327 y US 5,601,994 se revelan derivados de fenobarbital con una cadena a partir del N1 del núcleo de barbiturato, es decir, a partir del nitrógeno en posición 1 y no a partir del carbono en posición 5, como es el caso de los compuestos de la presente invención. Ver el diagrama siguiente. La patente citada en último lugar también describe un inmunoensayo enzimático para barbituratos, pero ejemplificando solo el fenobarbital y sus derivados, sin indicación de reactividades cruzadas de otros barbituratos en el ensayo.

45



Las patentes US 5,284,948 y US 5,298,403 también se refieren a la unión de derivados de fenobarbital marcados con enzima, que se establece a partir de las sustancias derivadas del N1, arriba representadas, con anticuerpos inmovilizados sobre perlas extruidas/peletizadas en una etapa aparte, mientras que la patente EP 517327 revela un inmunoensayo enzimático con el empleo de anticuerpos inmovilizados sobre una membrana.

50

**Resumen de la presente invención**

Respecto a dichos antecedentes, la presente invención aporta ciertas ventajas y avances no aparentes sobre el estado técnico precedente. En concreto, los inventores han reconocido la necesidad de mejorar los derivados de fenobarbital utilizables en inmunoensayos.

55

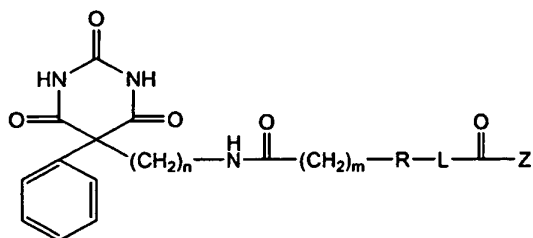
Los inventores han encontrado que los derivados de fenobarbital sintetizados a partir de la cadena alquílica en la posición 5 - en particular con propiedades hidrófilas y un éster activo en el extremo - permiten la formación de unos

60

conjugados con aminodextrano que dan curvas dentro del intervalo deseado en el ensayo ONLINE TDM (Roche Diagnostics Operations, Inc.) con formato de micropartículas, al compararlo con el ensayo FPIA (inmunoensayo de fluorescencia polarizada) de anticuerpo específico del fenobarbital (“anticuerpo específico para el fenobarbital”), de Roche.

5

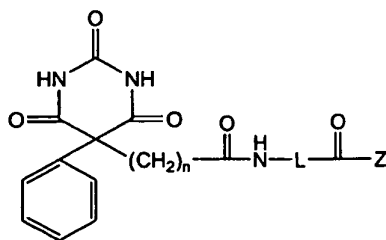
Una forma de ejecución de la presente invención se refiere a un compuesto que tiene la estructura



10 donde n es 4-6, m es 1-4, R es -NHCO- o -CONH-, L es un grupo conector que lleva 2-18 átomos de carbono y 1-6 heteroátomos dispuestos en una cadena lineal o ramificada y que contiene hasta 1 estructura cíclica, a condición de que el primer átomo unido a R sea de carbono, y Z es un grupo saliente o un polisacárido.

15

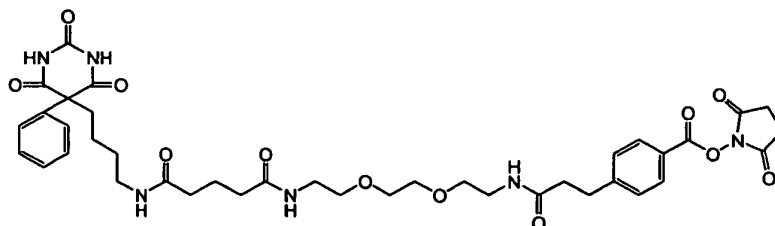
Otra forma de ejecución de la presente invención se refiere a un compuesto que tiene la estructura



20

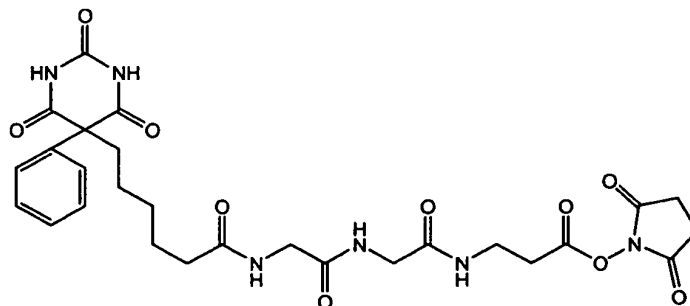
donde n es 4-6, L es un grupo conector que lleva 2-18 átomos de carbono y 1-6 heteroátomos dispuestos en una cadena lineal o ramificada y que contiene hasta 1 estructura cíclica, con la condición de que el primer átomo unido a -CONH- sea de carbono, y Z es un grupo saliente o un polisacárido.

Otra forma de ejecución de la presente invención es un análogo de fenobarbital que tiene la estructura



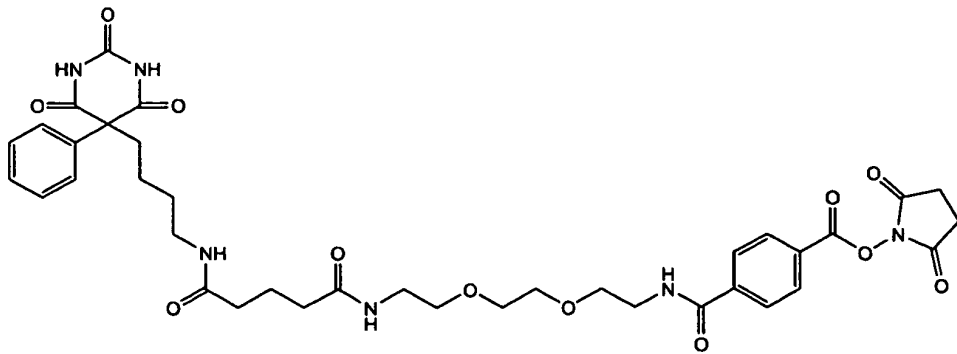
25

Otra forma de ejecución de la presente invención es un análogo de fenobarbital que tiene la estructura

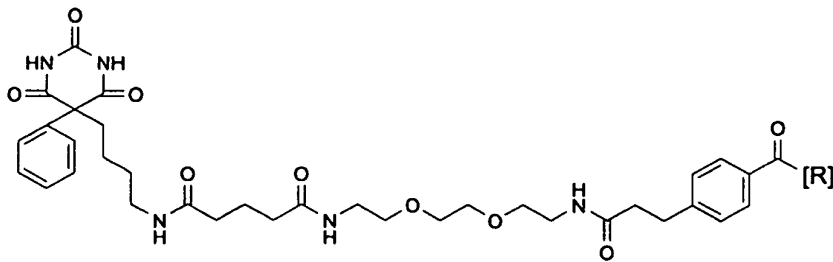


30

Otra forma de ejecución de la presente invención es un análogo de fenobarbital que tiene la estructura



Otra forma de ejecución de la presente invención es un análogo de fenobarbital conjugado que tiene la estructura

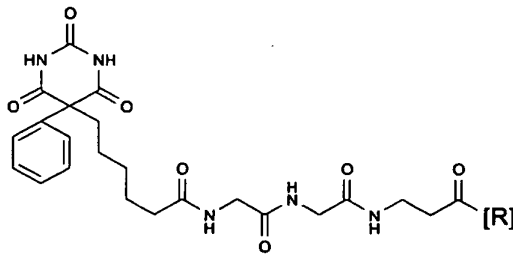


5

donde R es aminodextrano.

Otra forma de ejecución de la presente invención es un análogo de fenobarbital conjugado que tiene la estructura

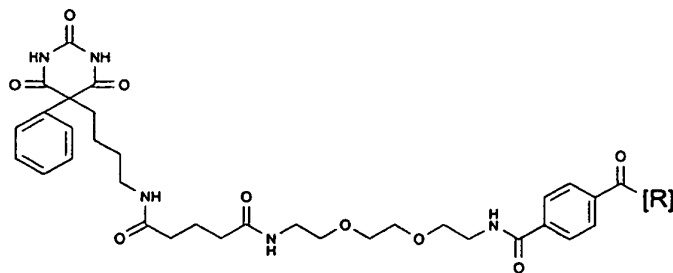
10



donde R es aminodextrano.

15

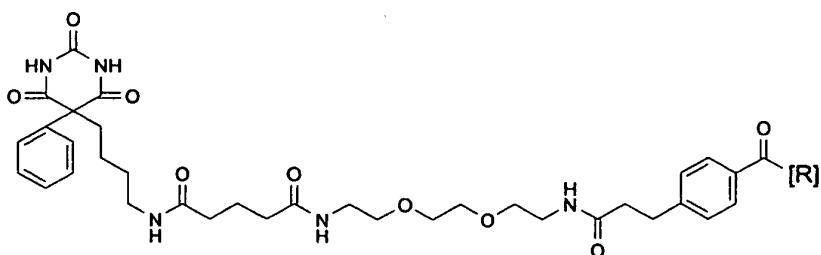
Otra forma de ejecución de la presente invención es un análogo de fenobarbital conjugado que tiene la estructura



donde R es aminodextrano.

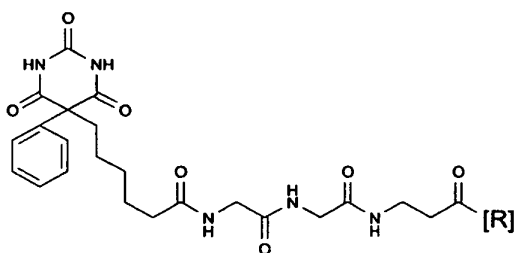
20

Otra forma de ejecución de la presente invención es un kit de ensayo, para determinar fenobarbital en una muestra, que contiene en un paquete combinado micropartículas recubiertas con un anticuerpo específico del fenobarbital, instrucciones para efectuar la determinación y un análogo de fenobarbital conjugado según la fórmula:



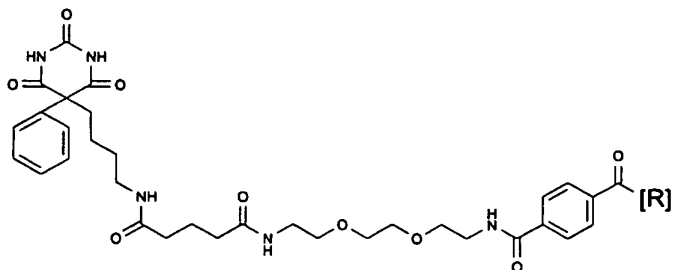
donde R es aminodextrano.

- 5 Otra forma de ejecución de la presente invención es un kit de ensayo, para determinar fenobarbital en una muestra, que contiene en un paquete combinado micropartículas recubiertas con un anticuerpo específico del fenobarbital, instrucciones para efectuar la determinación y un análogo de fenobarbital conjugado según la fórmula:



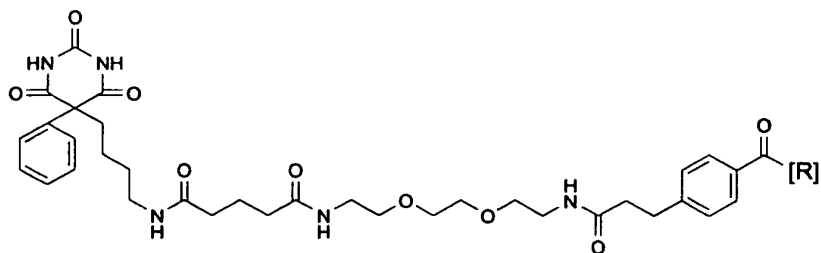
10 donde R es aminodextrano.

- 15 Otra forma de ejecución de la presente invención es un kit de ensayo, para determinar fenobarbital en una muestra, que contiene en un paquete combinado micropartículas recubiertas con un anticuerpo específico del fenobarbital, instrucciones para efectuar la determinación y un análogo de fenobarbital conjugado según la fórmula:



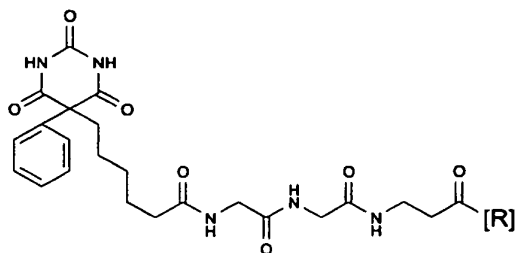
20 donde R es aminodextrano.

- 25 Otra forma de ejecución de la presente invención es un método de inmunoensayo, para determinar la presencia o la cantidad de fenobarbital en una muestra, que comprende las etapas de: combinar una muestra susceptible de contener fenobarbital con un anticuerpo específico del fenobarbital y con un análogo de fenobarbital conjugado - de modo que el anticuerpo está unido a micropartículas y el fenobarbital de la muestra compite con el análogo de fenobarbital conjugado para unirse al anticuerpo, y de modo que la unión del análogo de fenobarbital conjugado al anticuerpo fijado a las micropartículas inhibe la aglutinación de éstas - y determinar el grado de inhibición de la aglutinación como medida de la presencia o de la cantidad de fenobarbital en la muestra, en el cual el análogo de fenobarbital conjugado tiene la estructura



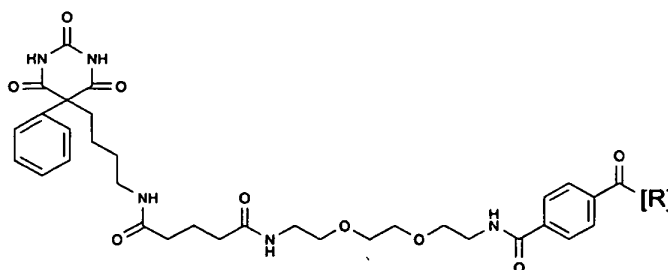
30 donde R es aminodextrano.

Otra forma de ejecución de la presente invención es un método de inmunoensayo, para determinar la presencia o la cantidad de fenobarbital en una muestra, que comprende las etapas de: combinar una muestra susceptible de contener fenobarbital con un anticuerpo específico del fenobarbital y con un análogo de fenobarbital conjugado - de modo que el anticuerpo está unido a micropartículas y el fenobarbital de la muestra compite con el análogo de fenobarbital conjugado para unirse al anticuerpo, y de modo que la unión del análogo de fenobarbital conjugado al anticuerpo fijado a las micropartículas inhibe la aglutinación de éstas - y determinar el grado de inhibición de la aglutinación como medida de la presencia o de la cantidad de fenobarbital en la muestra, en el cual el análogo de fenobarbital conjugado tiene la estructura



donde R es aminodextrano.

Otra forma de ejecución de la presente invención es un método de inmunoensayo, para determinar la presencia o la cantidad de fenobarbital en una muestra, que comprende las etapas de: combinar una muestra susceptible de contener fenobarbital con un anticuerpo específico del fenobarbital y con un análogo de fenobarbital conjugado - de modo que el anticuerpo está unido a micropartículas y el fenobarbital de la muestra compite con el análogo de fenobarbital conjugado para unirse al anticuerpo, y de modo que la unión del análogo de fenobarbital conjugado al anticuerpo fijado a las micropartículas inhibe la aglutinación de éstas - y determinar el grado de inhibición de la aglutinación como medida de la presencia o de la cantidad de fenobarbital en la muestra, en el cual el análogo de fenobarbital conjugado tiene la estructura



donde R es aminodextrano.

### Descripción breve de las figuras

La siguiente descripción detallada de las formas de ejecución de la presente invención puede entenderse mejor si se lee en relación con las siguientes figuras, en cuales los compuestos específicos están señalados con números de referencia en negrita y donde:

La figura 1 indica la síntesis del 4-(2-[2-[2-(2-[4-(2,4,6-trioxo-5-fenil-hexahidro-pirimidin-5-il)-butilcarbamoil]-butirilamino)-etoxi]-etoxi]-etilcarbamoil]-etil)-benzoato de 2,5-dioxo-pirrolidin-1-ilo, compuesto **(6)**.

La figura 2 indica la síntesis del 6-(2,4,6-trioxo-5-fenil-hexahidro-pirimidin-5-il)-hexanoato de 2,5-dioxo-pirrolidin-1-ilo, compuesto **(12)**.

La figura 3 indica la síntesis del 3-(2-[2-[6-(2,4,6-trioxo-5-fenil-hexahidro-pirimidin-5-il)-hexanoilamino]-acetil-amino]-acetil-amino)-propionato de 2,5-dioxo-pirrolidin-1-ilo, compuesto **(14)**.

La figura 4 indica la síntesis del 4-[[6-(2,4,6-trioxo-5-fenil-hexahidro-pirimidin-5-il)-hexanoilamino]-metil]-benzoato de 2,5-dioxo-pirrolidin-1-ilo, compuesto **(17)**.

La figura 5 indica la síntesis del N-[2-(2-[2-[6-(2,4,6-trioxo-5-fenil-hexahidro-pirimidin-5-il)-hexanoilamino]-etoxi]-etoxi)-etil]-tereftalato de 2,5-dioxo-pirrolidin-1-ilo, compuesto **(20)**.

La figura 6 indica la síntesis del N-{2-[2-(2-[4-(2,4,6-trioxo-5-fenil-hexahidro-pirimidin-5-il)-butilcarbamoil]-butiril-amino)-etoxi]-etoxi]-etil}-tereftalato de 2,5-dioxo-pirrolidin-1-ilo, compuesto **(21)**.

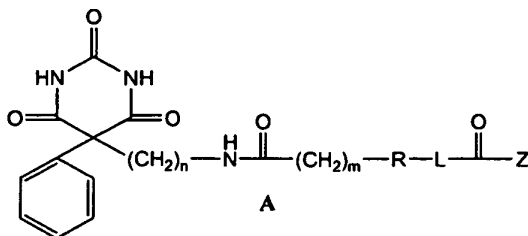
La figura 7 indica la síntesis de los respectivos conjugados de aminodextrano **(22)**, **(23)**, **(24)**, **(25)** y **(26)** a partir de los correspondientes ésteres de NHS **(6)**, **(14)**, **(17)**, **(20)** y **(21)**.

La figura 8 muestra las curvas estándar generadas con el uso de los conjugados de aminodextrano **(22)**, **(23)**, **(24)**, **(25)** y **(26)** según el ejemplo 21.

**Descripción detallada de la presente invención**

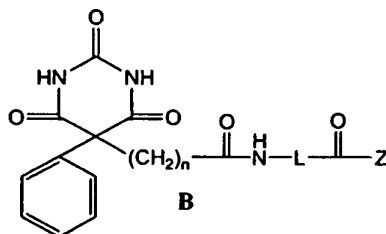
En los ejemplos siguientes los números en negrita se refieren a la correspondiente estructura en las figuras.

5 Algunos compuestos de la presente invención tienen la estructura de la fórmula A:



10 donde n es 4-6, m es 1-4, R es -NHCO- o -CONH-, L es un grupo conector que lleva 2-18 átomos de carbono y 1-6 heteroátomos dispuestos en una cadena lineal o ramificada y que contiene hasta 1 estructura cíclica, a condición de que el primer átomo unido a R sea de carbono, y Z es un grupo saliente o un polisacárido.

Otros compuestos de la presente invención tienen la estructura de la fórmula B:



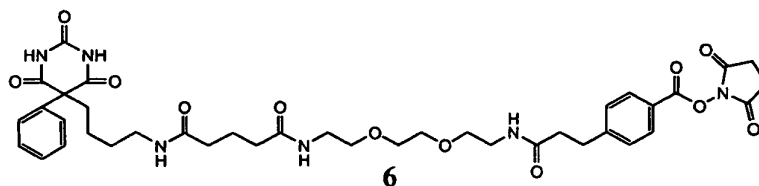
15 donde n es 4-6, L es un grupo conector que lleva 2-18 átomos de carbono y 1-6 heteroátomos dispuestos en una cadena lineal o ramificada y que contiene hasta 1 estructura cíclica, con la condición de que el primer átomo unido a -CONH- sea de carbono, y Z es un grupo saliente o un polisacárido.

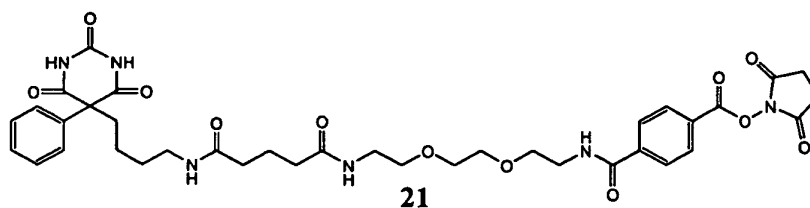
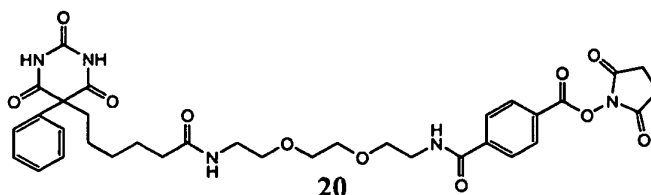
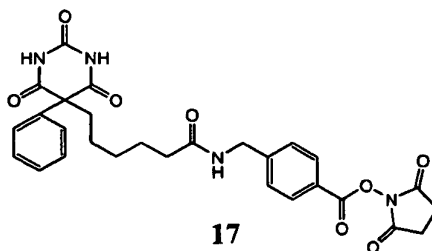
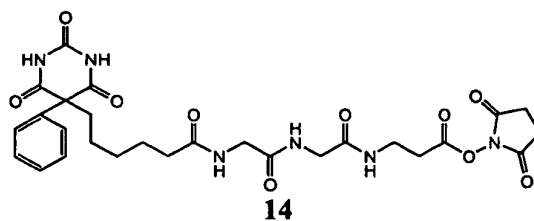
20 Hay compuestos conocidos con el núcleo central más el fragmento (C2-C6)NH a partir de la posición 5, así como compuestos conocidos con el núcleo central más el fragmento (C2 o C4)CO a partir de la posición 5. Sin embargo ninguno de ellos lleva un grupo activado en el extremo ni tiene la distribución de los grupos como en los compuestos de la presente invención, con especial preferencia como en los compuestos **6** y **21** de la fórmula A y también en el

25 compuesto **14** de la fórmula B, que presentan grupos de enlace hidrófilos. Estos compuestos se emplearon para preparar los correspondientes conjugados de aminodextrano preferidos **22** y **26**, así como el conjugado **23** (figura 7), de los cuales el **22** es especialmente preferido. Todos los compuestos **22-26** dieron curvas estándar muy similares en el formato de ensayo ONLINE TDM de Roche, pero las sustancias de fórmula general A mostraron normalmente

30 menos tendencia a dar falsos positivos para las muestras negativas, en comparación con las de fórmula general B, en particular con la sustancia **20/25**, de la que cabía esperar unas propiedades físicas muy parecidas a las de la sustancia **14/23**, pero que fue menos preferida a causa del distinto sesgo en la muestra negativa, lo cual supuso un hallazgo inesperado. Además, al contemplar globalmente las sustancias de ambas fórmulas generales, también

35 cabría esperar que la sustancia **20/25** tuviera propiedades físicas muy parecidas a las de la sustancia **21/26**, pues ambas poseen la estructura parcial DADOO-ftalato de manera predominante en la toda cadena de enlace, pero la sustancia **20/25** (la menos preferida) tuvo un sesgo apreciablemente mayor en la muestra negativa, en comparación con la sustancia **21/26** (la segunda más preferida). Esto también fue parte del hallazgo inesperado.





5

10 Estas y otras características y ventajas de la presente invención se entenderán más completamente, partiendo de la descripción detallada de la presente invención junto con las reivindicaciones adjuntas. Hay que señalar que el alcance de las reivindicaciones está definido por su contenido y no por la relación de las características y ventajas divulgadas en la presente descripción.

15 Hay que señalar que aquí los términos “preferiblemente”, “comúnmente” y “típicamente” no se usan para limitar el alcance de la invención reivindicada o para insinuar que ciertas características son críticas, esenciales o incluso importantes para la estructura o función de la invención reivindicada. Estos términos más bien pretenden resaltar meramente características alternativas o adicionales que pueden ser o no ser empleadas en una forma de ejecución particular de la presente invención.

20 Con fines descriptivos y definitorios de la presente invención debe señalarse que el término “sustancialmente” se utiliza aquí para significar el grado inherente de incertidumbre atribuible a cualquier comparación, valor, medición u otra representación cuantitativa. El término “sustancialmente” también se usa aquí para significar en qué medida una representación cuantitativa puede apartarse de una referencia establecida, sin producir un cambio en la función básica de objeto tratado.

25 Los esquemas de las figuras 1 hasta 7 muestran la síntesis de los cinco artículos cuyo uso se ha evaluado en el inmunoensayo ONLINE TDM de Roche para la determinación de fenobarbital. Los artículos preferidos fueron los compuestos **6**, **14** y **21**, y los conjugados de aminodextrano preferidos los correspondientes compuestos **22**, **23** y **26**. La figura 8 muestra las curvas estándar generadas en un aparato Roche-Hitachi 917 (Roche Diagnostics GmbH) al usar los cinco conjugados de aminodextrano (véase figura 7) y la proximidad de ajuste entre ellas. En el ejemplo 22 de la tabla figura la concentración aparente de fenobarbital encontrada en muestras de suero negativas (es decir, que no contienen realmente fenobarbital) al usar cada uno de los diferentes conjugados de aminodextrano y extraer el resultado de la respectiva curva estándar.

35 Los conjugados de aminodextrano se forman a partir de los derivados de fenobarbital de la presente invención y contienen múltiples fragmentos de fármaco por molécula de aminodextrano. En el formato de ensayo de aglutinación de micropartículas KIMS estos conjugados, disueltos en tampón, se unen a anticuerpos específicos del fenobarbital que están inmovilizados sobre micropartículas suspendidas en un tampón. Los conjugados de aminodextrano pasan a través de las micropartículas y éstas se aglutinan en cierta proporción. El índice de aglutinación se mide mediante



los cambios en la luz transmitida por la muestra. El fenobarbital libre compite con la unión de los conjugados a los anticuerpos fijados sobre las micropartículas e inhibe la aglutinación (cae el índice de aglutinación) de manera dosis-respuesta, lo cual disminuye la tasa de aumento de absorbancia de la muestra proporcionalmente a la concentración de fenobarbital libre. Entonces se usan representaciones gráficas de las diferencias de tasa cinética para medir los niveles de fenobarbital en las muestras de suero. El empleo del conjugado **22**, el más preferido, dio el mínimo sesgo en un ensayo con muestras negativas.

Un inmunoensayo anterior en formato de micropartículas (patente US 5,618,926) tiene por objeto la detección de barbituratos como clase y no es específico para el fenobarbital, el cual tiene en este ensayo un 29% de reactividad cruzada. En este formato el derivado es uno de secobarbital conjugado con BSA e inmovilizado en la micropartícula y el anticuerpo está en solución.

En el estado técnico precedente se han sintetizado derivados a partir de la posición 5 del núcleo del fenobarbital, pero sin los conectores específicos o los grupos activados en el extremo, que son en general características de la presente invención. En particular no se ha señalado que el empleo de conectores hidrófilos aportara ventajas ni que hubiera diferencias inusuales debido a las ligeras variaciones entre dichos conectores hidrófilos. P.ej., los presentes inventores han encontrado que sutiles diferencias, concretamente entre las subestructuras  $\text{-NHCO-(CH}_2\text{)}_m\text{-R-L-CO-Z}$  y  $\text{-CONH-L-CO-Z}$ , podían producir un sesgo no deseado en las muestras negativas.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a kits que sirven para llevar a cabo adecuadamente métodos de ensayo, usando conjugados de la presente invención para determinar fenobarbital. Como ejemplo de la versatilidad de la presente invención, los reactivos que son útiles para los métodos de presente invención se pueden suministrar en paquetes combinados, en el mismo envase o en recipientes separados, en forma líquida o liofilizada, de modo que la proporción de reactivos facilite la optimización sustancial del método y del ensayo. Cada reactivo puede ir en envases separados o varios de ellos se pueden combinar en uno o más recipientes, dependiendo de la reactividad cruzada y de la estabilidad de los componentes.

El kit de la presente invención comprende un anticuerpo específico del fenobarbital, un conjugado según la presente invención, p.ej. un conjugado de aminodextrano (**22**), (**23**), (**24**), (**25**) o (**26**), y opcionalmente reactivos auxiliares. Los reactivos pueden permanecer en forma líquida o se pueden liofilizar. Para realizar un ensayo de aglutinación de micropartículas según la presente invención, el anticuerpo está conjugado con una micropartícula. En el paquete combinado el kit puede incluir una serie de instrucciones u orientaciones para la realización y calibración del ensayo y materiales de control.

El ensayo de la presente invención está basado en la interacción cinética de micropartículas en una solución (KIMS). El anticuerpo del fenobarbital está unido covalentemente a micropartículas y el derivado del fármaco está unido a una macromolécula, p.ej. aminodextrano. La interacción cinética de las micropartículas en las soluciones es inducida por la fijación del conjugado del fármaco al anticuerpo unido a las micropartículas y es inhibida por la presencia de fenobarbital en la muestra. En la muestra de suero tiene lugar una reacción competitiva entre el conjugado del fármaco y el fenobarbital por la fijación al anticuerpo de fenobarbital sobre las micropartículas. La interacción cinética resultante de las micropartículas es inversamente proporcional a la cantidad de fármaco presente en la muestra.

Para comprender más fácilmente la presente invención se hace referencia a los siguientes ejemplos.

#### Formas específicas de ejecución

En los ejemplos siguientes los números en negrita se refieren a la correspondiente estructura en las figuras.

Los reactivos se adquirieron de Aldrich Chemical Company, a no ser que se indique otra cosa. Todos los disolventes se obtuvieron de J.T. Baker y fueron de calidad A.C.S. o HPLC o superior, a no ser que se indique otra cosa. La trietilamina se obtuvo de Fluka Chemical Co. (nº de cat. 90340; purísima,  $\geq 99,5\%$ ); la diisopropilamina (DIEA), el dimetilsulfóxido seco (DMSO) y la dimetilformamida seca (DMF) se obtuvieron de Aldrich Chemical Company. Todas las adiciones/extracciones y manipulaciones de los disolventes anhidros se llevaron a cabo con jeringa/aguja. El tetrahidrofurano (THF) secó por ebullición y destilación a partir de sodio/benzofenona, bajo atmósfera de argón. El cloruro de metileno se secó por ebullición y destilación a partir de hidruro cálcico, bajo atmósfera de argón. La cromatografía de columna se efectuó empleando gel de sílice de calidad para cromatografía flash de E.M. Science (nº de catálogo 9385-9; gel de sílice 60; malla 230-400 ASTM), bajo presión positiva de nitrógeno. La cromatografía de capa fina (TLC) se realizó utilizando placas de gel de sílice obtenidas de E.M. Science (nº de catálogo 5715-7; espesor 0,025 cm). Las mezclas de disolventes se expresan como porcentajes volumétricos (p.ej. 10%  $\text{MeOHCHCl}_3$  es cloroformo que contiene 10% en volumen de metanol. Los análisis HPLC se efectuaron en un sistema Agilent 1100 LC/MS configurado con un detector de haz de diodos y una bomba cuaternaria. Los análisis de LC se llevaron a cabo en una columna Vydac 218TP54 (RP-C18; 300 Å, 5  $\mu$ ) equipada con un módulo de precolumna Phenomenex (Phenomenex KJO-4282/C 18 ODS 5  $\mu$ ), con el flujo cromatográfico postcolumna acoplado al detector MS. El MSD utilizado se hizo funcionar en modo ES (+) (electrospray, modo positivo). La RP-HPLC preparativa se realizó en un sistema Varian Dynamax (Rainin), empleando dos bombas de cabezal de titanio SD 1 de 2000 psi, con un detector de longitud de onda variable Varian Dynamax UV-C. Las separaciones se efectuaron en columnas de compresión

radial Varian Dynamax – bien en la columna I (R00083221C; Microsorb 60-8, C 18, 250 x 21,4 mm) equipada con un módulo protector (R00083221G; C 18, 8  $\mu$ ) o en la columna II (R00083241C; Microsorb 60-8, C 18, 250 x 41,4 mm) equipada con un módulo protector (R00083241G; C 18, 8  $\mu$ ). Los espectros de RMN- $H^1$  se obtuvieron a 200 MHz en un espectrómetro Varian Gemini 2000 o a 400 MHz en un espectrómetro Varian XL-400, ambos dotados de una estación Sun/Sparc.

### Ejemplo 1. Síntesis de compuesto (1)

A una disolución agitada de 101 mg (0,259 mmoles) del compuesto (1) [a) Krausz, L.M.; Hitz, J.B.; Buckler, R.T. y Burd, J.F. *Therapeutic Drug Monitoring*, 1980, 2, 261-272; b) Castro, A.; Chung, A. y Monji, N. *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology*, 1980, 28, 309-317.] en 15 ml de THF seco a la temperatura ambiente, que llevaba 76  $\mu$ l (0,55 mmoles; 2,1 eq.) de trietilamina, se le añadieron 47 mg (0,41 mmoles; 1,6 eq.) de anhídrido glutárico. Después de agitar brevemente a temperatura ambiente, la mezcla reactiva se hirvió a reflujo (baño de aceite a 90°C) bajo atmósfera de argón. El análisis por RP-HPLC después de 1 hora indicó que la reacción era completa, con un solo pico de producto principal. La mezcla reactiva se evaporó a presión reducida hasta sequedad (rotavapor). El residuo se redisolvió en 2,5 ml de MeCN/agua 1:1, se filtró (0,45  $\mu$ ) y se purificó por RP-HPLC preparativa [columna I], eluyendo con un gradiente de 5% (0 min.)  $\rightarrow$  100% (20 min.)  $\rightarrow$  100% (22 min.)  $\rightarrow$  5% (27 min.) de 0,1%TFA/MeCN en 0,1%TFA/agua; 20 ml/min. Se reunieron las fracciones que contenían producto, el MeCN se eliminó a presión reducida, el residuo acuoso se congeló (hielo seco/acetona) y se liofilizó durante la noche para dar el compuesto (2) en forma de un sólido blanco pulverulento (99 mg, 98% de rendimiento). LC/MS:  $t_R$  ~ 8,8 min. [5% (0 min.)  $\rightarrow$  88% (17,5 min.) de 0,1 %TFA/MeCN en 0,1%TFA/agua]; observado M+H 390,1. RMN- $H^1$ : compatible.

### Ejemplo 2. Síntesis de compuesto (3)

A una disolución agitada de 54,1 mg (0,139 mmoles) del compuesto (2) en 4 ml de DMF seca en atmósfera de argón se le añadieron 16,1 mg (0,140 mmoles) de N-hidroxisuccinimida (NHS) y 38,1 mg (0,199 mmoles) de hidrocloruro de 3-etil-1-dimetilaminopropilcarbodiimida (EDC·HCl) y la solución se agitó a temperatura ambiente en atmósfera de argón durante ~3 h. La LC/MS indicó la formación parcial del éster de NHS. Se agregaron 32,3 mg (0,281 mmoles; total añadido = 0,421 mmoles, 3 eq.) más de NHS y 55,3 mg (0,288 mmoles; total añadido = 0,487 mmoles, 3,5 eq.) de EDC·HCl y la reacción se agitó por la noche a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón. La LC/MS indicó la conversión prácticamente total al éster de NHS deseado (3). LC/MS:  $t_R$  ~ 10,0 min. [5% (0 min.)  $\rightarrow$  88% (17,5 min.) de 0,1%TFA/MeCN en 0,1%TFA/agua]; observado M+H 487,1. La mezcla/solución íntegra de producto se usó en la siguiente etapa [véase ejemplo 3] sin purificación adicional.

### Ejemplo 3. Síntesis de compuesto (4)

A una disolución de 81,2  $\mu$ l (~ 0,554 mmoles; ~ 4 eq.) [pipeteada] de 2,2'-(etilendioxi)-dietilamina [Fluka 03739] (DADOO) en 4 ml de THF seco y 2 ml de DMF seca a temperatura ambiente, en atmósfera de argón, se le añadió toda la mezcla de reacción/producto (~ 4 ml) que contenía (3) (del ejemplo 2, transferida con jeringa a un pequeño embudo de dosificación) gota a gota durante 20 min., manteniendo una agitación eficaz. El matraz del ejemplo 2 y el embudo de dosificación se lavaron con 4 ml de THF seco y los lavados se agregaron gota a gota a la mezcla de reacción durante ~ 15 min. El análisis de la reacción al cabo de ~ 0,5 h indicó la desaparición del éster de NHS (3) y la formación del producto deseado (4) ( $t_R$  ~ 8,25 min.), con una pequeña cantidad de una sustancia dímera. La mezcla de reacción se evaporó a presión reducida para eliminar THF y luego a vacío elevado (en rotavapor de alto vacío) para eliminar la DMF. El residuo se redisolvió en MeCN/agua 1:1, se filtró (0,45  $\mu$ ) y se purificó por RP-HPLC preparativa, eluyendo con un gradiente de 5% (0 min.)  $\rightarrow$  100% (20 min.)  $\rightarrow$  100% (22 min.)  $\rightarrow$  5% (27 min.) de 0,1% TFA/MeCN en 0,1%TFA/agua; 40 ml/min. La fracción de producto se evaporó a presión reducida para eliminar el MeCN, el residuo acuoso se congeló (hielo seco/acetona) y se liofilizó durante la noche para dar el compuesto (4) (designado como la monosal de TFA) en forma de un sólido blanco (55 mg, 60% de rendimiento en dos etapas). LC/MS:  $t_R$  ~ 8,26 min. [5% (0 min.)  $\rightarrow$  88% (17,5 min.) de 0,1%TFA/MeCN en 0,1%TFA/agua]; observado M+H 520,2, M+Na 542,2. RMN- $H^1$ : compatible.

### Ejemplo 4. Síntesis de compuesto (5)

A una solución de 49,7 mg (0,078 mmoles) de compuesto (5) y 23,9 mg (0,082 mmoles, 1,05 eq.) de compuesto (7) [véase ejemplo 6] en 2 ml de DMF seca a temperatura ambiente, en atmósfera de argón, se le añadieron 43,8  $\mu$ l de diisopropiletilamina (DIEA) y la disolución transparente se agitó rápidamente. El análisis por LC/MS al cabo de ~ 3 h indicó la formación de producto más una pequeña cantidad de un subproducto eluido tras el producto, más un resto de material inicial. Se agregaron 5,0 mg (0,017 mmoles; total añadido = 0,099 mmoles, 1,27 eq.) de (7) y se siguió agitando a temperatura ambiente. El análisis por LC/MS después de 1 h indicó que quedaban trazas de material inicial. La reacción se evaporó a vacío elevado (en rotavapor de alto vacío). El residuo se redisolvió en MeCN/agua 1:1, se filtró (0,45  $\mu$ ) y se purificó por RP-HPLC preparativa, eluyendo con 15% (0 min.)  $\rightarrow$  60% (20 min.)  $\rightarrow$  100% (22 min.)  $\rightarrow$  15% (27 min.) de 0,1%TFA/MeCN en 0,1%TFA/agua; 20 ml/min. Se juntaron las fracciones de producto, el MeCN se evaporó a presión reducida, el residuo acuoso se congeló (hielo seco/acetona) y se liofilizó durante la

noche para dar el compuesto **(5)** en forma de un sólido blanco (29,7 mg, 55% de rendimiento). LC/MS:  $t_R \sim 10,1$  min. [15% (0 min.)  $\rightarrow$  60% (20 min.)  $\rightarrow$  100% (25 min.)  $\rightarrow$  15% (30 min.) de 0,1%TFA/MeCN en 0,1%TFA/agua]; observado M+H 696,2, M+Na 718,2. RMN- $H^1$  compatible.

#### 5 **Ejemplo 5. Síntesis de compuesto (6)**

A una solución agitada de 20,4 mg (0,029 mmoles) del compuesto **(5)** en 3 ml de DMF seca a temperatura ambiente, en atmósfera de argón, se le añadieron 6,4 mg (0,056 mmoles, 1,9 eq.) de NHS y 10,5 mg (0,055 mmoles, 1,9 eq.) de EDC·HCl, seguido de 11,5  $\mu$ l de trietilamina y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. El análisis por LC/MS indicó reacción incompleta. Se agregaron 12,8 mg (0,111 mmoles, 3,8 eq.) de NHS y 20,7 mg (0,108 mmoles, 3,7 eq.) de EDC·HCl y se continuó agitando a temperatura ambiente por la noche. Un nuevo análisis por LC/MS indicó ahora que la reacción se había completado. La mezcla de reacción se evaporó a sequedad (en rotavapor de alto vacío) y el residuo se purificó directamente por cromatografía en columna de gel de sílice [columna de  $\sim 10$  mm de longitud  $\times \sim 1$  mm de D.I.], se preempaquetó y eluyó con 10% MeOH en  $CH_2Cl_2$ . Las fracciones que contenían producto se juntaron, se evaporaron a presión reducida, se removieron con  $CH_2Cl_2$  seco y se volvieron a evaporar, repitiendo varias veces el proceso. El residuo se secó a vacío elevado para dar el compuesto **(6)** en forma de un sólido blanco (18,1 mg, 79% de rendimiento). LC/MS:  $t_R \sim 10,55$  min. [5% (0 min.)  $\rightarrow$  88% (17,5 min.) de 0,1%TFA/MeCN en 0,1%TFA/agua]; observado M+H 793, M+Na 815,2. RMN- $H^1$ : compatible.

#### 20 **Ejemplo 6. Síntesis de compuesto (7)**

Una suspensión agitada de ácido 3-(4-carboxifenil)propiónico (Lancaster Chemical Company) y 1 eq. de N-hidroxi-succinimida (Aldrich Chemical Company) en THF a la temperatura ambiente se trató y se hizo reaccionar con 1 eq. de isocianuro de t-butilo (Aldrich Chemical Company) durante varios días, y luego por simple filtración del producto se obtuvo el compuesto **(7)** (en forma de sólido fino), lavándolo con THF y secándolo al vacío.

#### **Ejemplo 7. Síntesis de compuesto (21)**

A una disolución vigorosamente agitada de 17,9 mg (0,05 mmoles) del compuesto **(19)** [véase el ejemplo 52 de la patente U.S. 6,811,998] en 1 ml de DMF seca y 4 ml de THF seco a temperatura ambiente se le añadió gota a gota (por el embudo dosificador) una solución de 26,0 mg (0,04 mmoles) del compuesto **(4)** en 2 ml de DMF seca y 5 ml de THF seco que contenía 22  $\mu$ l de diisopropiletilamina (DIEA). El análisis por LC/MS después de unas 2 h indicó que se había completado prácticamente la reacción, con la formación producto **(21)**. El disolvente se separó de la reacción (rotavapor, luego rotavapor a vacío elevado) y el residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice [preempaquetada en acetonitrilo (MeCN)-THF (7:3); eluida con MeCN-THF (7:3) y después con MeCN-THF (3:7)]. Las fracciones que contenían producto se recogieron, se reunieron y se evaporaron. El residuo se redisolvió/removió con  $CH_2Cl_2$  seco y se reevaporó (repetido una vez), luego se secó a vacío elevado durante la noche para dar el compuesto **(21)** ligeramente impuro. El material se redisolvió en MeCN/agua 1:1, se filtró (0,45  $\mu$ ) y se volvió a purificar por RP-HPLC preparativa, eluyendo con un gradiente de 15% (0 min.)  $\rightarrow$  100% (20 min.)  $\rightarrow$  100% (23 min.)  $\rightarrow$  15% (28 min.) de 0,1%TFA/MeCN en 0,1%TFA/agua; 20ml/min. La fracción de producto se congeló enseguida (hielo seco/acetona), se sublimó el MeCN (rotavapor a alto vacío, condensador con hielo seco/acetona insertado) y el residuo todavía congelado se liofilizó durante la noche para dar el compuesto **(21)** (9,8 mg,  $\sim$  30% global). LC/MS:  $t_R \sim 9,64$  min. [15% (0 min.)  $\rightarrow$  100% (20 min.) de 0,1%TFA/MeCN en 0,1%TFA/agua]; observado M+H 765,2, M+Na 787,2. RMN- $H^1$ : compatible.

#### 45 **Ejemplo 8. Síntesis de compuesto (9)**

En un matraz de fondo redondo provisto de una barra agitadora, 2,54 g de una suspensión de hidruro sódico en aceite mineral (equivalentes a 1,524 g de sustancia real, 0,0635 moles) (Aldrich Chemical Company) se lavaron con hexanos secos (3x10 ml), extrayendo cada vez los hexanos con pipeta. El hidruro sódico lavado se secó brevemente al vacío, luego se suspendió en 30 ml de DMF seca bajo atmósfera de argón. Se añadieron a la suspensión agitada 9,12 ml (10,0 g, 0,0423 mol) de 2-fenilmalonato de dietilo (Aldrich Chemical Company) con una jeringa a lo largo de unos 15 min., moderando la reacción exotérmica con un baño de agua en caso necesario, y la reacción se agitó durante 10 min. A la mezcla resultante se le agregaron 8,42 ml (11,18 g, 0,0635 moles) de 6-bromohexanonitrilo (Aldrich Chemical Company) gota a gota con jeringa durante unos 5 min. y la reacción de color marrón se agitó por la noche. El análisis por LC/MS indicó la formación del producto **(9)**. La reacción se paró con 200 ml de fosfato potásico 100 mM a pH 7 y se extrajo con  $CH_2Cl_2$ . El pH de la capa acuosa se reajustó aproximadamente a 7 con HCl diluido y se extrajo de nuevo con  $CH_2Cl_2$  (x2). Las fases orgánicas reunidas se lavaron con fosfato potásico 100 mM a pH 7 y después con NaCl acuoso saturado, se secaron ( $Na_2SO_4$ ) y se evaporaron para dar un aceite viscoso. La purificación por cromatografía en columna de gel de sílice (preempaquetada en 20% EtOAc-hexanos y eluyendo con lo mismo) dio luego el producto **(9)** en dos cortes de grupos de fracción, en forma de líquido viscoso (rendimiento conjunto 8,28 g, 59%). LC/MS:  $t_R \sim 16,28$  min. [5% (0 min.)  $\rightarrow$  88% (17,5 min.) de 0,1%TFA/MeCN en 0,1%TFA/agua]; observado M+H 332,2, M+Na 354,2. RMN- $H^1$ : compatible.

**Ejemplo 9. Síntesis de compuesto (10)**

Se preparó una solución de metóxido magnésico disolviendo 440 mg (18,1 mmoles) de virutas de magnesio (Aldrich Chemical Company) en 10 ml de metanol anhidro y calentando cuidadosamente (inicio de la reacción) e hirviendo cuidadosamente durante 1 h bajo atmósfera de argón. A esta solución se le añadieron 905 mg (15,09 mmoles) de urea (Aldrich Chemical Company) presecada a 70°C y la ebullición prosiguió unos 15 minutos más. La reacción se enfrió ligeramente y a la solución caliente se le agregaron 2,0 g (6,035 mmoles) de compuesto (9). La reacción se hirvió unas 20 h, luego se analizó por LC/MS y se enfrió a temperatura ambiente. Se eliminó el metanol de la mezcla heterogénea (en el rotavapor), el residuo se trató con agua, la mezcla se acidificó con HCl 6 N a un pH entre 3 y 4, y se extrajo dos veces con EtOAc. Las fases orgánicas combinadas se lavaron con dos tercios de NaCl saturado, con NaCl saturado, se secaron (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), se evaporaron (rotavapor) y se secaron a vacío elevado, para dar el producto crudo en forma de una goma semicristalina que se trituró con aproximadamente 10 ml de 50%EtOAc-hexanos. Los sólidos resultantes se separaron por filtración, se lavaron con un poco de 50%EtOAc-hexanos y se secaron para recoger unos primeros 639 mg del compuesto (10). Las aguas madres se concentraron hasta sequedad y el residuo se trituró con 50%EtOAc-hexanos. Los sólidos resultantes se separaron por filtración, se lavaron con un poco de 50%EtOAc-hexanos y se secaron para recoger unos segundos 99 mg del compuesto (10). Rendimiento conjunto: 738 mg, 41%. LC/MS: t<sub>R</sub> ~ 10,93 min. [5% (0 min.) → 100% (20 min.) de 0,1%TFA/MeCN en 0,1%TFA/agua]; observado M+H 300,1, M+Na 322,1. RMN-H<sup>1</sup>: compatible.

**Ejemplo 10. Síntesis de compuesto (11)**

Una suspensión de 408 mg (1,363 mmoles) del compuesto (10) en 6 ml de HCl 8 N se hirvió durante la noche (baño de aceite a 120°C) bajo atmósfera de argón y con un condensador de reflujo. La reacción se enfrió a temperatura ambiente. Los sólidos blancos se separaron por filtración, se lavaron a fondo con agua, se secaron al aire con ayuda de vacío y después con vacío elevado, para dar el compuesto (11) en forma de un sólido blanco de buena pureza (376 mg, 87%). LC/MS: t<sub>R</sub> ~ 9,94 min. [5% (0 min.) → 100% (20 min.) de 0,1%TFA/MeCN en 0,1%TFA/agua]; observado M-OH 301,1, M+H 319,1, M+Na 354,2. RMN-H<sup>1</sup>: compatible.

**Ejemplo 11. Síntesis de compuesto (12)**

A una semisolución de 200 mg (0,63 mmoles) del compuesto (11) y 80 mg (0,695 mmoles) de N-hidroxisuccinimida (Aldrich Chemical Company) en 10 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco se le añadieron 133 mg (0,695 mmoles) de EDC·HCl (Sigma Chemical Company), seguido de 0,5 ml de DMF seca para ayudar a disolver las sustancias. Después de agitar por la noche a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón, el análisis de la solución transparente por LC/MS indicó que la reacción estaba prácticamente completa. La reacción se diluyó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (en exceso) y la fase orgánica se lavó sucesivamente con HCl 0,1 N diluido con NaCl saturado, con NaCl semisaturado, con NaCl saturado, se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se evaporó (rotavapor), para dar 329 mg del producto (12), éster de NHS, con una pureza aceptable. LC/MS: t<sub>R</sub> ~ 11,43 min. [5% (0 min.) → 100% (20 min.) de 0,1%TFA/MeCN en 0,1%TFA/agua]; observado M+H 416,1, M+Na 438,1. RMN-H<sup>1</sup>: compatible, más DMF y trazas de impurezas (producto secundario [N-(dimetilamino)propil]-N'-etilurea] de la reacción de activación). El material se usó sin posterior purificación.

**Ejemplo 12. Síntesis de compuesto (13)**

A una disolución agitada de 159 mg del compuesto (12) crudo [del ejemplo 11] en 5 ml de THF seco, en atmósfera de argón, se le agregó una disolución de 100 mg (0,492 mmoles) de glicil-glicil-β-alanina (Gly-Gly-βAla) (Bachem Americas, n° de cat. H-3295) en un total de 5 ml de agua. La reacción se enturbió y luego precipitó un sólido fino. El pH se ajustó añadiendo gota a gota NaOH 1 N hasta llegar a un pH aproximado de 9 a 10, a lo largo de unos 20 min. (la reacción se aclaró). El análisis por LC/MS indicó que la reacción era completa. El disolvente (THF) se eliminó por evaporación (rotavapor) y el residuo acuoso se diluyó con un poco de MeCN, se filtró, se rediluyó con un poco de MeCN y agua para mantener la solución transparente y se purificó en varias operaciones de RP-HPLC preparativa, eluyendo con un gradiente de 5% (0 min.) → 100% (20 min.) → 100% (22 min.) → 5% (27 min.) de 0,1 %TFA/MeCN en 0,1%TFA/agua; 40 ml/min. Las fracciones del producto principal se reunieron y se evaporaron a presión reducida para eliminar MeCN, el residuo acuoso se congeló (hielo seco/acetona) y se liofilizó durante la noche para dar el compuesto (13) en forma de un sólido blanco (97 mg, 61% de rendimiento en dos etapas). LC/MS: t<sub>R</sub> ~ 8,37 min. [5% (0 min.) → 88% (17,5 min.) de 0,1 %TFA/MeCN en 0,1%TFA/agua]; observado M+H 504,1, M+Na 526. RMN-H<sup>1</sup>: compatible.

**Ejemplo 13. Síntesis de compuesto (14)**

A una semisolución agitada de 50 mg (0,099 mmoles) del compuesto (13) y 13 mg (0,109 mmoles) de N-hidroxisuccinimida (NHS) (Aldrich Chemical Company) en 5 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco se le añadieron, bajo atmósfera de argón, 21 mg (0,109 mmoles) de EDC·HCl (Sigma Chemical Company), seguido de 1 ml de DMF seca. Después de agitar por la noche a temperatura ambiente se agregaron otros 27 mg de NHS y 30 mg de EDC·HCl y se siguió agitando durante un segundo periodo nocturno. El análisis por LC/MS indicó la formación de producto con unas pequeñas cantidades de material inicial e impurezas. La reacción se diluyó con EtOAc, se lavó con [HCl 0,1 N + NaCl saturado (1:1)], NaCl semisaturado, NaCl saturado, se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se evaporó (rotavapor). El residuo se redisolvió en

MeCN/agua 1:1, se filtró (0,45  $\mu$ ) y se purificó por RP-HPLC preparativa, eluyendo con un gradiente de 5% (0 min.)  $\rightarrow$  100% (20 min.)  $\rightarrow$  100% (22 min.)  $\rightarrow$  5% (27 min.) de 0,1%TFA/MeCN en 0,1%TFA/agua; 40 ml/min. La fracción de producto se congeló inmediatamente (hielo seco/acetona), el MeCN se separó por sublimación (rotavapor a vacío elevado, condensador insertado con hielo seco/acetona) y el residuo aún congelado se liofilizó durante la noche para obtener el compuesto (14) (18 mg,  $\sim$  31% global). LC/MS:  $t_R \sim$  9,18 min. [5% (0 min.)  $\rightarrow$  88% (17,5 min.) de 0,1%TFA/MeCN en 0,1%TFA/agua]; observado M+H 601,2, M+Na 623,2. RMN- $H^1$ : compatible.

#### Ejemplo 14. Síntesis de compuesto (16)

A una solución agitada de 84 mg del compuesto (12) crudo [véase ejemplo 11] en 4 ml de THF seco, bajo atmósfera de argón, se le añadieron 32 mg (0,212 mmoles) de ácido 4-(aminometil)benzoico (Aldrich Chemical Company), seguido de 2 ml de agua. El pH de la mezcla reactiva heterogénea se ajustó hasta 9 a 10 con NaOH, primero 0,1N y luego 1 N, a lo largo de unos 15 min., para dar una solución reactiva casi transparente. Después de 0,5 h el análisis por LC/MS indicó que la reacción era completa. El pH se ajustó hasta 4 a 5 con HCl 1 N y el disolvente se eliminó por destilación (rotavapor, luego rotavapor con vacío elevado) y el residuo se secó a vacío elevado. El material se redisolvió en MeCN/agua 1:1, se filtró (0,45  $\mu$ ) y se purificó por RP-HPLC preparativa, eluyendo con un gradiente de 5% (0 min.)  $\rightarrow$  100% (20 min.)  $\rightarrow$  100% (22 min.)  $\rightarrow$  5% (27 min.) de 0,1%TFA/MeCN en 0,1%TFA/agua; 20 ml/min. Se reunieron las fracciones de producto, se evaporó la mayor parte de MeCN (rotavapor) y el residuo acuoso se congeló (hielo seco/acetona) y se liofilizó durante la noche para dar el compuesto (16) (76mg, 89% de rendimiento). LC/MS:  $t_R \sim$  10,37 min. [5% (0 min.)  $\rightarrow$  88% (17,5 min.) de 0,1%TFA/MeCN en 0,1%TFA/agua]; observado M+H 452,1, M+Na 474,2. RMN- $H^1$ : compatible.

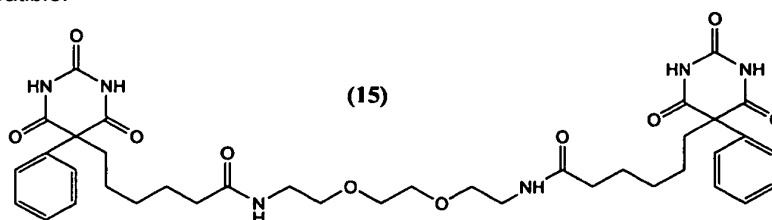
#### Ejemplo 15. Síntesis de compuesto (17)

A una semisolución agitada de 18 mg (0,04 mmoles) del compuesto (16) y 23 mg (0,199 mmoles) de N-hidroxi-succinimida (NHS) (Aldrich Chemical Company) en 4 ml de  $CH_2Cl_2$  seco, bajo atmósfera de argón, se le añadieron 23 mg (0,12 mmoles) de EDC·HCl (Sigma Chemical Company) y se siguió agitando durante la noche. La reacción transparente se diluyó con EtOAc y se lavó sucesivamente con HCl 0,1 N diluido con NaCl saturado, con NaCl saturado y NaCl saturado, se secó ( $Na_2SO_4$ ) y se evaporó (rotavapor). El material resultante se redisolvió en MeCN/agua 1:1, se filtró (0,45  $\mu$ ) y se purificó por RP-HPLC preparativa, eluyendo con un gradiente de 5% (0 min.)  $\rightarrow$  100% (20 min.)  $\rightarrow$  100% (22 min.)  $\rightarrow$  5% (27 min.) de 0,1%TFA/MeCN en 0,1%TFA/agua; 20 ml/min. Las fracciones de producto se combinaron, se congelaron inmediatamente (hielo seco/acetona), el MeCN se eliminó por sublimación (rotavapor a vacío elevado, condensador insertado con hielo seco/acetona) y el residuo aún congelado se liofilizó durante la noche para dar el compuesto (17) (16 mg, 73%) LC/MS:  $t_R \sim$  11,48 min. [5% (0 min.)  $\rightarrow$  88% (17,5 min.) de 0,1%TFA/MeCN en 0,1%TFA/agua]; observado M+H 549,2, 2M+Na 1097,3. RMN- $H^1$ : compatible.

#### Ejemplo 16. Síntesis de compuesto (18)

Una solución de una mezcla de 100 mg (0,314 mmoles) del compuesto ácido (11), 40 mg (0,348 mmoles) de NHS y 65 mg (0,339 mmoles) de EDC·HCl en 5 ml de THF seco y 5 ml de  $CH_2Cl_2$  seco se agitó a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón durante la noche. El análisis LC/MS indicó una transformación bastante limpia en el éster de NHS (12). Toda esta solución se transfirió a un embudo dosificador y se añadió durante 15 min. a una solución rápidamente agitada de 93 mg (0,628 mmoles) de 2,2'-(etilendioxi)-dietilamina [Fluka 03739] (DADOO) en 10 ml de  $CH_2Cl_2$  seco. La solución inicialmente transparente se volvió turbia, con finas gotitas de aceite dispersadas en la mezcla reactiva. El análisis por LC/MS de la reacción (alícuota de sobrenadante + aceite) indicó que la reacción era completa. El material volátil se eliminó por evaporación (rotavapor), el residuo se redisolvió en MeCN/agua 1:1, se acidificó con ácido trifluoroacético (TFA) aproximadamente a pH 3 a 4, se filtró (0,45  $\mu$ ) y se purificó por RP-HPLC preparativa, eluyendo con un gradiente de 5% (0 min.)  $\rightarrow$  100% (20 min.)  $\rightarrow$  100% (22 min.)  $\rightarrow$  5% (27 min.) de 0,1%TFA/MeCN en 0,1%TFA/agua; 40 ml/min. Las fracciones del producto principal se combinaron, la mayor parte del MeCN se eliminó por evaporación (rotavapor) y el residuo acuoso se congeló (hielo seco/acetona) se liofilizó por noche para dar el compuesto (18) (120 mg, 68% de rendimiento), designado como sal de TFA. LC/MS:  $t_R \sim$  8,49 min. [5% (0 min.)  $\rightarrow$  88% (17,5 min.) de 0,1%TFA/MeCN en 0,1%TFA/agua]; observado M+H 449,1. RMN- $H^1$ : compatible.

También se aisló una pequeña cantidad del compuesto "dímero" (15) abajo representado (15.5 mg, 6.6%) LC/MS:  $t_R \sim$  11,07 min. [5% (0 min.)  $\rightarrow$  88% (17,5 min.) de 0,1%TFA/MeCN en 0,1%TFA/agua]; observado M+H 749,3, M+Na 771,3. RMN- $H^1$ : compatible.



**Ejemplo 17. Síntesis de compuesto (20)**

Una solución de 102 mg (~ 0,181 mmoles) del compuesto (18) en 5 ml de THF seco se añadió gota a gota durante unos 10 min. a una solución rápidamente agitada de 98 mg (0,272 mmoles) del diéster tereftálico, compuesto (19), y 95 µl (~ 70 mg, ~ 0,543 mmoles) de diisopropiletilamina en 5 ml de THF seco y 5 ml de DMF seca, en atmósfera de argón. El embudo dosificador se enjuagó con un poco de THF seco, que se agregó a la reacción. El análisis por LC/MS después de 0,5 h indicó que la reacción era completa. La mezcla reactiva se destiló a sequedad (rotavapor, luego rotavapor con alto vacío) y después se secó a vacío elevado. El residuo se redisolvió en THF-MeCN 1:1, se filtró para separar algún material insoluble y el filtrado se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (preempaquetada en THF-MeCN 1:1, lavada a fondo con lo mismo antes de cargar la mezcla del producto y eluida con lo mismo. Las fracciones que contenían producto se combinaron y se evaporaron (rotavapor), el residuo se recogió en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco y se volvió a evaporar (rotavapor) (repetido x2) y se secó con vacío elevado. Los sólidos resultantes se recogieron otra vez en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco, se reevaporaron y luego se secaron a vacío elevado durante la noche, para dar el compuesto (20) en forma de una espuma/vidrio blanco (68 mg, 54%). LC/MS: t<sub>R</sub> ~ 10,87 min. [5% (0 min) → 88% (17,5 min) de 0,1%TFA/MeCN en 0,1%TFA/agua]; observado M+H 694,2, M+Na 716,2. RMN-H<sup>1</sup>: compatible.

**Ejemplo 18. Preparación del conjugado de aminodextrano (22)**

A una solución de 87,5 mg de aminodextrano (AMD; molecular peso nominal = 40.000, aprox. 6 grupos amino por mol de aminodextrano; véase patente U.S. 6,653,456) en 3,5 ml de DMSO seco (agitada 30 min. para disolución completa; concentración = 25 mg/ml) a temperatura ambiente se le añadieron 13,9 mg de compuesto (6) [relación de presencia derivado : AMD = 8:1] disuelto en DMSO seco y la reacción se agitó por la noche a temperatura ambiente en un recipiente sellado con ámbar. La mezcla reactiva se transfirió a un cartucho de diálisis (Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL; SLIDE-A-LYZER Dialysis Cassette; 3,500 MWCO) y se dializó sucesivamente contra DMSO-agua durante varios días con cantidades decrecientes de DMSO y varios cambios para cada concentración de DMSO, terminando con una diálisis contra varios cambios de solo agua. La fracción retenida se extrajo de los cartuchos, se congeló y se liofilizó, para dar el conjugado de AMD (22) en forma de un sólido amorfo que se conservó a -20°C hasta su empleo.

**Ejemplo 19. Preparación de los conjugados de aminodextrano (23), (24), (25) y (26)**

Estos conjugados se prepararon de modo análogo al descrito en el ejemplo 18, usando una relación de presencia derivado : AMD = 8:1. La diálisis y liofilización del conjugado final, realizadas del modo anteriormente descrito, dio los conjugados de AMD (23), (24), (25) y (26) en forma de sólidos amorfos.

**Ejemplo 20. Preparación de micropartículas con anticuerpos de fenobarbital**

Un diez por ciento (p/v) de micropartículas de látex (número de grupos carboxilo aprox. 0,21 mmoles/g de látex, diámetro medio de partícula 0,2 µm, Seradyne Inc., Indianapolis, IN) se diluyó hasta una concentración del uno por ciento con ácido 2-morfolino-etanosulfónico (MES), pH 5,3 que contenía 0,09% (p/v) de ascorbato sódico. Se midió el volumen deseado de 1% de micropartículas y éstas se activaron añadiendo N-hidroxisulfosuccinimida (sulfo-NHS) y después hidrocloreuro de N-etil-N'-(3-dimetil-aminopropil)carbodiimida (EDC-HCl). Tanto la sulfo-NHS como la EDC se añadieron en una proporción de 10 moles de cada reactivo por mol de carboxilatos presentes en la superficie de las micropartículas. Después de agitar durante aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente las micropartículas se lavaron, se concentraron y se resuspendieron a una concentración del 2%, intercambiando el tampón a ácido 3-morfolino-propanosulfónico (MOPS) 50 mM, pH 5,7, que contenía 0,09% (p/v) de ascorbato sódico, en un sistema de fibra hueca. Se añadió una solución de anticuerpos monoclonales de fenobarbital (MAK<Pheba>M-29D4-IgG) en tampón MOPS 50 mM, pH 5,7, que también contenía 0,09% (p/v) de ascorbato sódico y 10 g/l de BSA, con lo cual había 0,2 mg de anticuerpo/ml de solución de micropartículas. La mezcla de anticuerpo-látex se agitó a 23-27°C durante 1 hora aproximadamente. Luego se agregó a la mezcla de látex una solución de 90 mg/ml de BSA en MOPS 50 mM, pH 5,7, que contenía 0,09% (p/v) de ascorbato sódico (1,125 mg de BSA/mg de látex). Después de agitar durante 0,5-1,5 horas at 23-27°C se añadió a la mezcla de látex una solución de 2-(2-amino-etoxi)-etanol (AEO) al 11% (p/p) en agua, ajustada a pH 9 con HCl. Tras agitar durante la noche a 40-45°C las micropartículas se lavaron e intercambiaron con tampón de almacenamiento (MOPS 50 mM, pH 7,4, 0,1% (p/v) de BSA, 0,09% de azida sódica) a una concentración final de 1% de micropartículas de látex (p/v) y se conservaron a 2-8°C hasta su empleo.

**Ejemplo 21. Ensayo ONLINE tipo 2 (KIMS) con conjugados de la presente invención y anticuerpo, empleando el analizador de química clínica HITACHI, y construcción de las curvas de calibración**

Los ensayos se realizaron en analizadores de química clínica Roche/Hitachi 917 (Roche Diagnostics GmbH) a 37°C. Las mezclas reactivas (283 µl) contenían 3 µl de un calibrador tal como se describe más abajo o muestra, 27,41 g/l de sal disódica de PIPES, 2,99 g/l de ácido PIPES libre, 14,612 g/l de cloruro sódico, 0,49 g/l de PLURONIC F-127, 0,0124 g/l de anticuerpo anti-HAMA (POLYMAK33; Roche Diagnostics GmbH), 0,90 g/l de azida sódica, 4,81 g/l de tiocianato potásico, 1,0 g/l de albúmina de suero bovino, 0,0001 g/l de fenobarbital libre, 3,81 g/l de sal sódica de

MOPS, 1,73 g/l de MOPS, 0,9% (p/v) de ácido poliacrílico (PAA), 0,04% (p/v) de micropartículas como las descritas en el ejemplo 20 y uno de los conjugados de fenobarbital-aminodextrano indicados a continuación:

(a) Conjugado de fenobarbital-aminodextrano	(b) Concentración (g/l)
(22)	0,00025
(23)	0,00025
(24)	0,00025
(25)	0,0003
(26)	0,00015

5 Las curvas de calibración se construyeron empleando los juegos de calibración comerciales TDM Multi-cal de Roche (Roche PRECISET TDM I calibrators, Part# 03375790 190), que contenían 0,0, 5,0, 10,0, 20,0, 40,0 y 60,0 mg/ml de fenobarbital.

10 Los ensayos se controlaron espectrofotométricamente siguiendo la aglutinación de las micropartículas a una longitud de onda de 600 nm. Las curvas de calibración obtenidas al emplear cada uno de los conjugados de fenobarbital-aminodextrano están representadas en la figura 8, que muestra la gran similitud y proximidad de sus trazados, casi superponibles.

15 **Ejemplo 22. Estudio del inmunoensayo de fenobarbital con micropartículas, utilizando muestras de suero negativas**

20 Se probaron mediante el ensayo descrito en el ejemplo 21 cinco muestras de suero negativas, de las cuales se sabía que no contenían fenobarbital. Las muestras se colocaron en los recipientes de muestra del analizador y se usaron como tales. Cada una se ensayó por duplicado frente a la curva de calibración obtenida al usar los distintos conjugados de fenobarbital-aminodextrano **(22)**, **(23)**, **(24)**, **(25)** y **(26)**. Se obtuvieron los resultados indicados en la tabla siguiente.

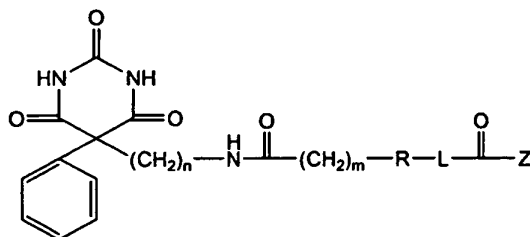
Conjugado de aminodextrano	Muestras propias				
	#16	#17	#19	#22	#23
<b>(22)</b>	0,0	0,0	0,2	2,9	0,0
	0,0	0,0	0,2	2,8	0,0
<b>(23)</b>	0,0	0,0	0,1	2,8	0,0
	0,0	0,0	0,0	2,8	0,1
<b>(24)</b>	0,0	0,0	0,4	3,2	0,2
	0,0	0,0	0,5	3,1	0,3
<b>(26)</b>	0,0	0,0	0,3	2,8	0,2
	0,0	0,0	0,4	2,8	0,3
<b>(25)</b>	0,0	0,1	0,5	3,4	0,1
	0,0	0,3	0,4	3,4	0,2

25 Los resultados indicaron si había un sesgo positivo al usar en la prueba los reactivos del ensayo, teniendo en cuenta que la cantidad de fenobarbital observada o buscada debería ser teóricamente cero. Las concentraciones aparentes de fenobarbital obtenidas en el ensayo indicaron que los conjugados **(22)** dieron los mejores resultados globales, con valores de cero o próximos a cero, los conjugados **(23)** y **(26)** fueron aceptables, mientras que los conjugados **(24)** y **(25)** dieron valores ligeramente altos, indeseables. En particular, los resultados obtenidos con el conjugado **(25)** fueron inesperados, ya que su estructura era similar a la del conjugado **(26)** y como éste también poseía el fragmento hidrófilo DADDOO.

30

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que posee una estructura

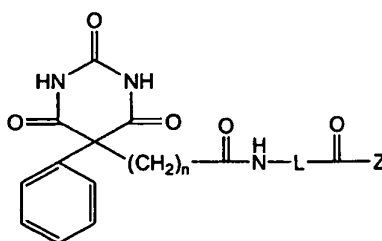


5

donde n es 4-6, m es 1-4, R es -NHCO- o -CONH-, L es un grupo conector que lleva 2-18 átomos de carbono y 1-6 heteroátomos dispuestos en una cadena lineal o ramificada y que contiene hasta 1 estructura cíclica, a condición de que el primer átomo unido a R sea de carbono, y Z es un grupo saliente o un polisacárido.

10

2. Un compuesto que posee una estructura

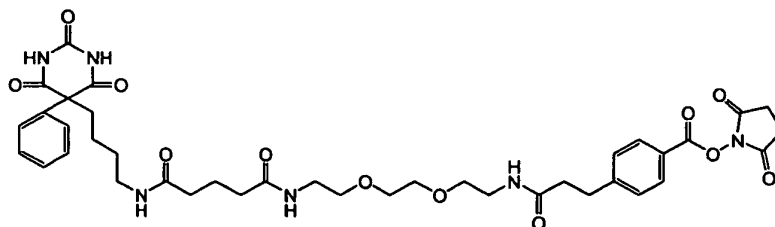


15

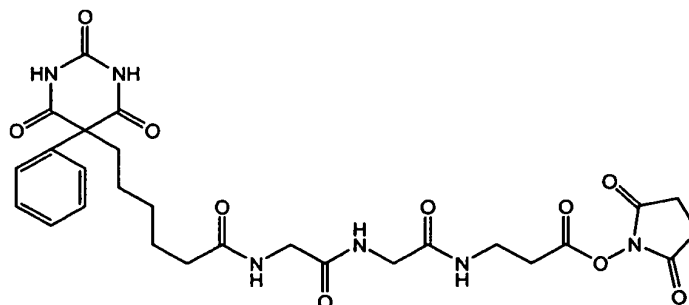
donde n es 4-6, L es un grupo conector que lleva 2-18 átomos de carbono y 1-6 heteroátomos dispuestos en una cadena lineal o ramificada y que contiene hasta 1 estructura cíclica, con la condición de que el primer átomo unido a -CONH- sea de carbono, y Z es un grupo saliente o un polisacárido.

20

3. Un análogo de fenobarbital según la reivindicación 1 que posee una estructura



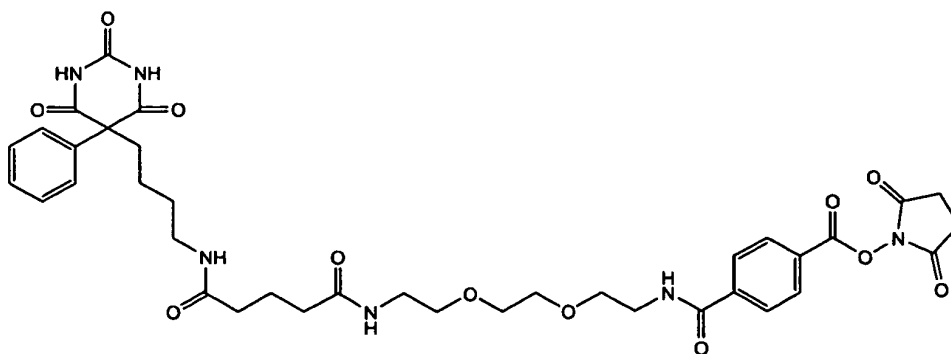
4. Un análogo de fenobarbital según la reivindicación 2 que posee una estructura



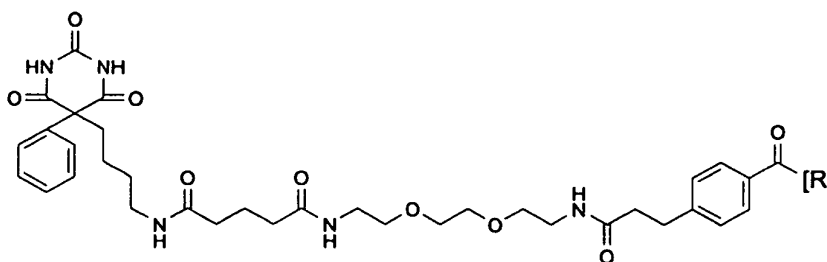
25

5. Un análogo de fenobarbital según la reivindicación 1 que posee una estructura





6. Un análogo de fenobarbital conjugado según la reivindicación 1 que posee una estructura

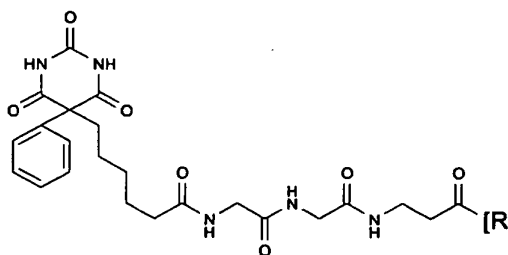


5

donde R es aminodextrano.

7. Un análogo de fenobarbital conjugado según la reivindicación 2 que posee una estructura

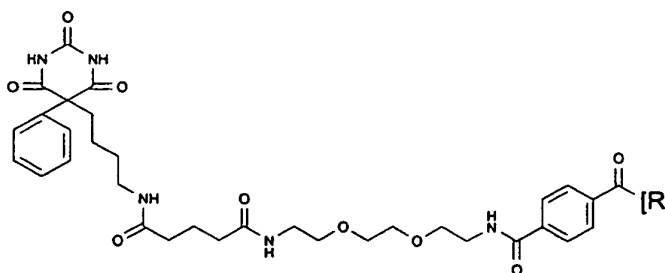
10



donde R es aminodextrano.

8. Un análogo de fenobarbital conjugado según la reivindicación 1 que posee una estructura

15



20

donde R es aminodextrano.

9. Un kit de ensayo para determinar fenobarbital en una muestra, que contiene en un paquete combinado micropartículas recubiertas con un anticuerpo específico del fenobarbital, el análogo de fenobarbital conjugado según la reivindicación 6 e instrucciones para efectuar la determinación.

25

10. Un kit de ensayo para determinar fenobarbital en una muestra, que contiene en un paquete combinado micropartículas recubiertas con un anticuerpo específico del fenobarbital, el análogo de fenobarbital conjugado según la reivindicación 7 e instrucciones para efectuar la determinación.

11. Un kit de ensayo para determinar fenobarbital en una muestra, que contiene en un paquete combinado

micropartículas recubiertas con un anticuerpo específico del fenobarbital, el análogo de fenobarbital conjugado según la reivindicación 8 e instrucciones para efectuar la determinación.

5       **12.**     Un método de inmunoensayo, para determinar la presencia o la cantidad de fenobarbital en una muestra, que comprende las etapas de: combinar una muestra susceptible de contener fenobarbital con un anticuerpo específico del fenobarbital y con un análogo de fenobarbital conjugado según la reivindicación 6 - de modo que el anticuerpo está unido a micropartículas y el fenobarbital de la muestra compite con el análogo de fenobarbital conjugado para unirse al anticuerpo, y de modo que la unión del análogo de fenobarbital conjugado al anticuerpo fijado a las micropartículas inhibe la aglutinación de éstas – y determinar el grado de inhibición de la aglutinación como medida de la presencia o de la cantidad de fenobarbital en la muestra

10       **13.**     Un método de inmunoensayo, para determinar la presencia o la cantidad de fenobarbital en una muestra, que comprende las etapas de: combinar una muestra susceptible de contener fenobarbital con un anticuerpo específico del fenobarbital y con un análogo de fenobarbital conjugado según la reivindicación 7 - de modo que el anticuerpo está unido a micropartículas y el fenobarbital de la muestra compite con el análogo de fenobarbital conjugado para unirse al anticuerpo, y de modo que la unión del análogo de fenobarbital conjugado al anticuerpo fijado a las micropartículas inhibe la aglutinación de éstas – y determinar el grado de inhibición de la aglutinación como medida de la presencia o de la cantidad de fenobarbital en la muestra

15       **14.**     Un método de inmunoensayo, para determinar la presencia o la cantidad de fenobarbital en una muestra, que comprende las etapas de: combinar una muestra susceptible de contener fenobarbital con un anticuerpo específico del fenobarbital y con un análogo de fenobarbital conjugado según la reivindicación 8 - de modo que el anticuerpo está unido a micropartículas y el fenobarbital de la muestra compite con el análogo de fenobarbital conjugado para unirse al anticuerpo, y de modo que la unión del análogo de fenobarbital conjugado al anticuerpo fijado a las micropartículas inhibe la aglutinación de éstas – y determinar el grado de inhibición de la aglutinación como medida de la presencia o de la cantidad de fenobarbital en la muestra

Figura 1

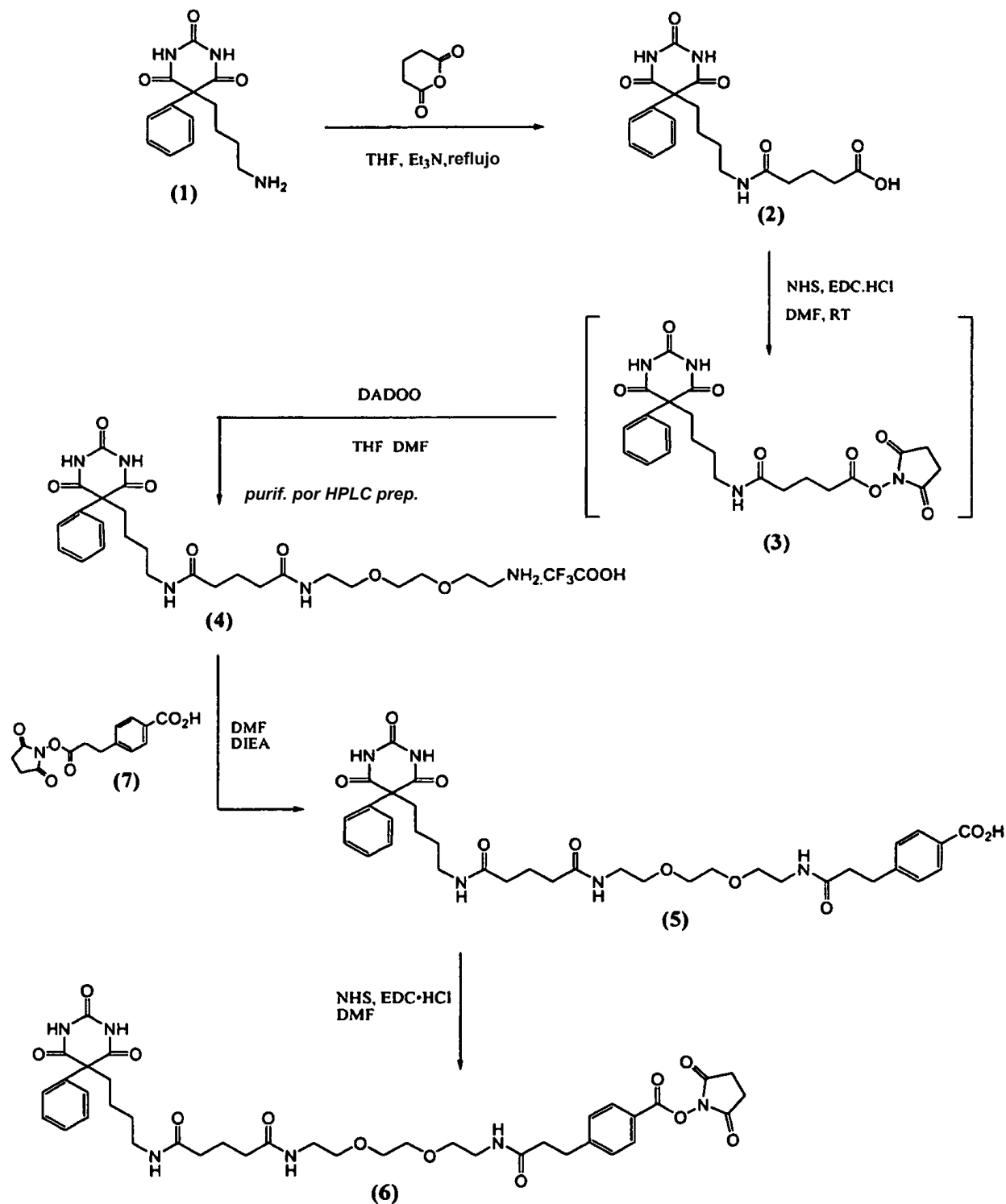


Figura 2

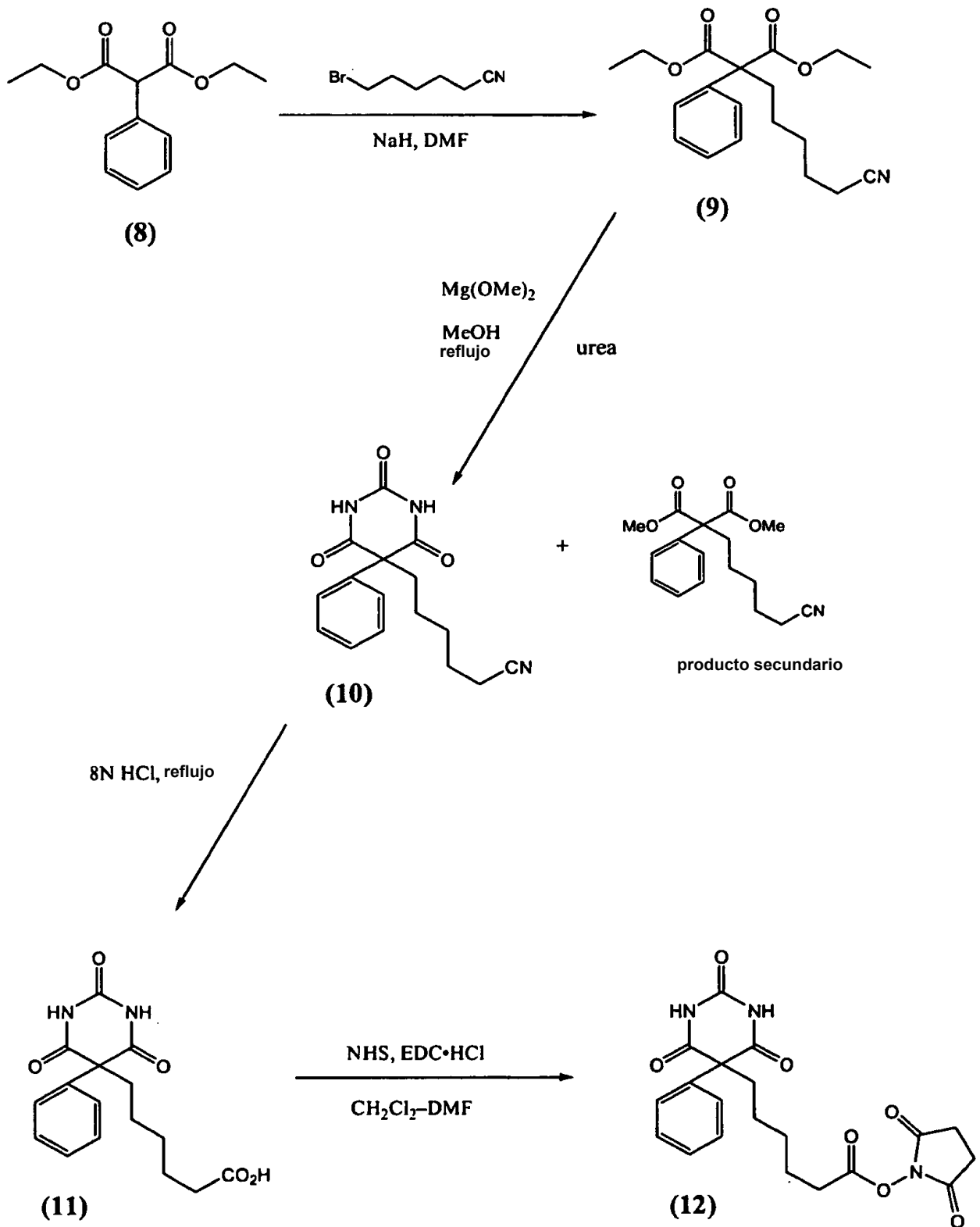


Figura 3

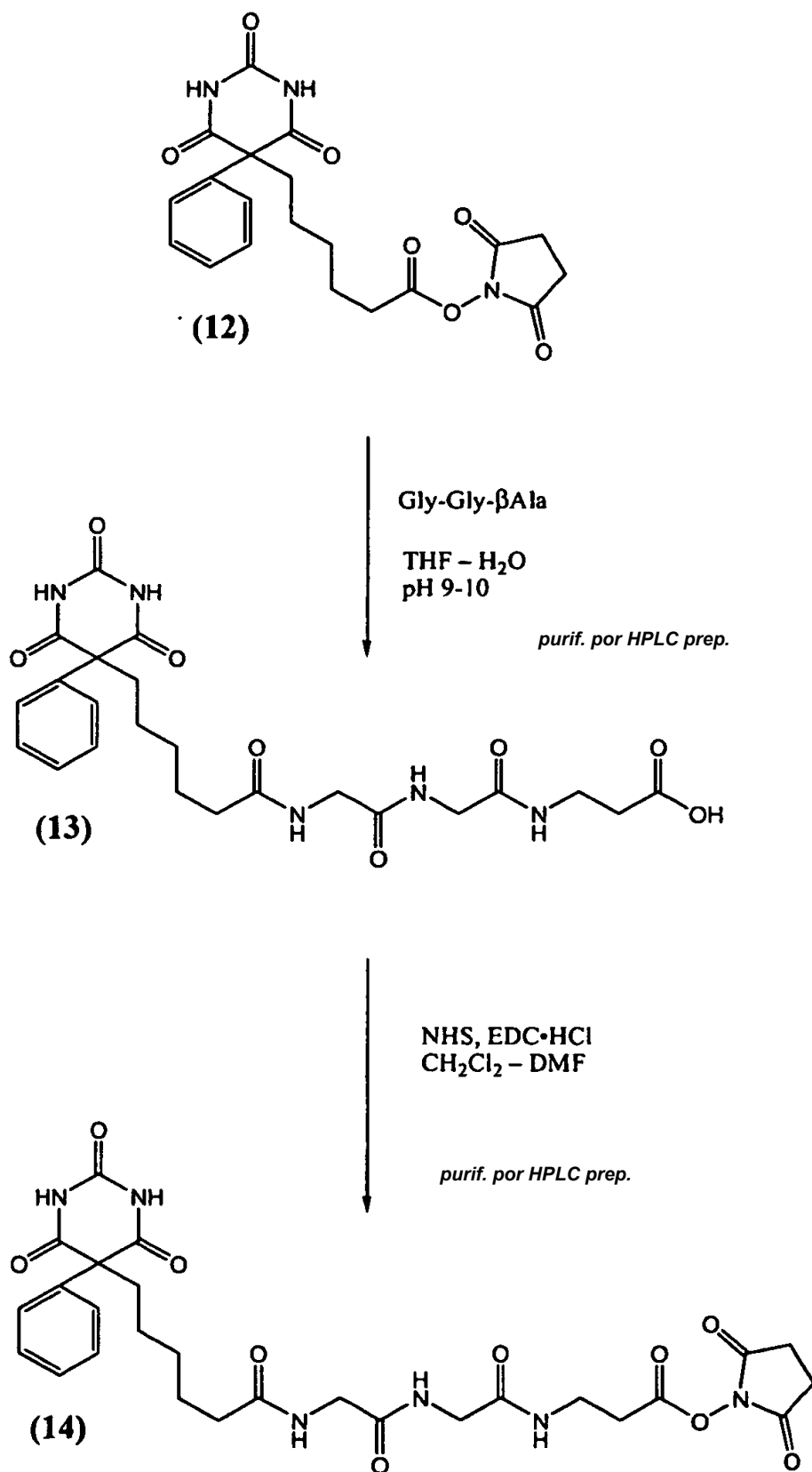


Figura 4

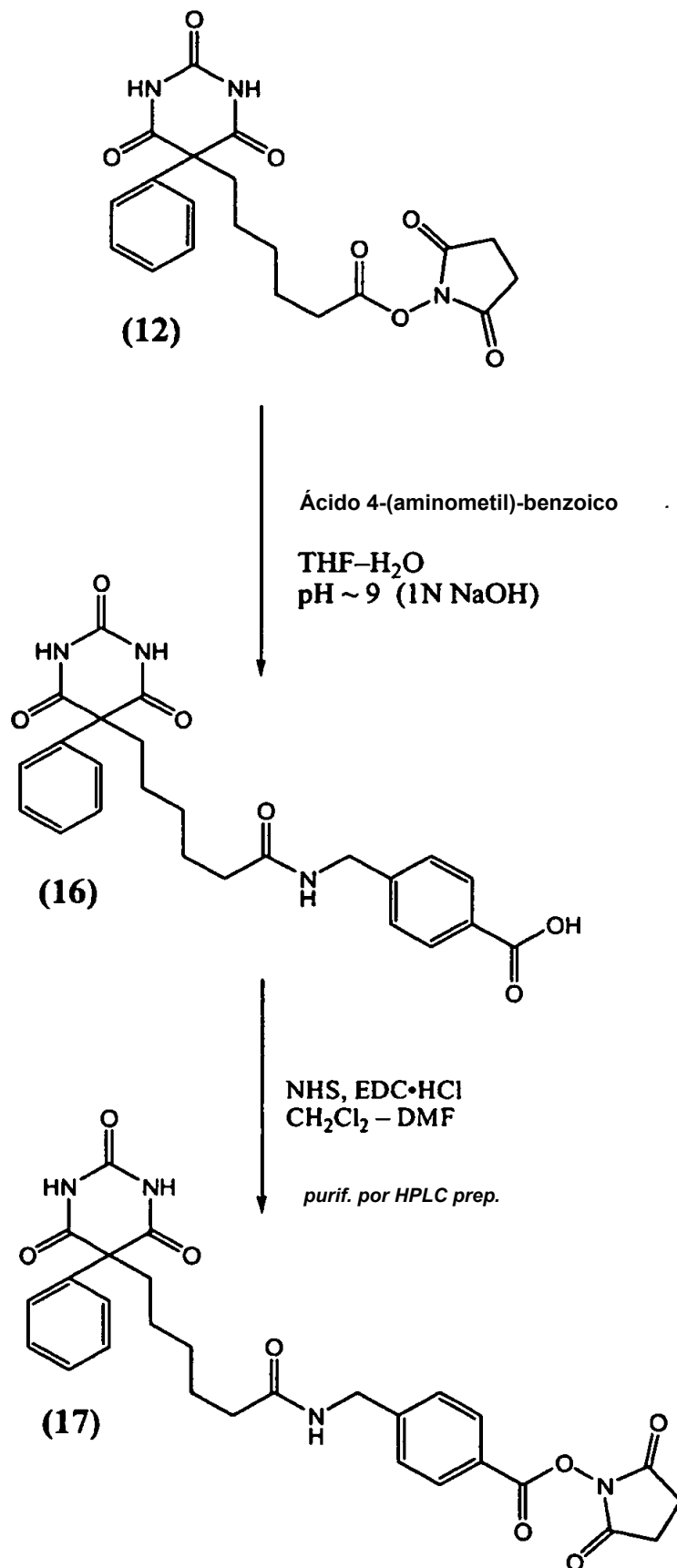


Figura 5

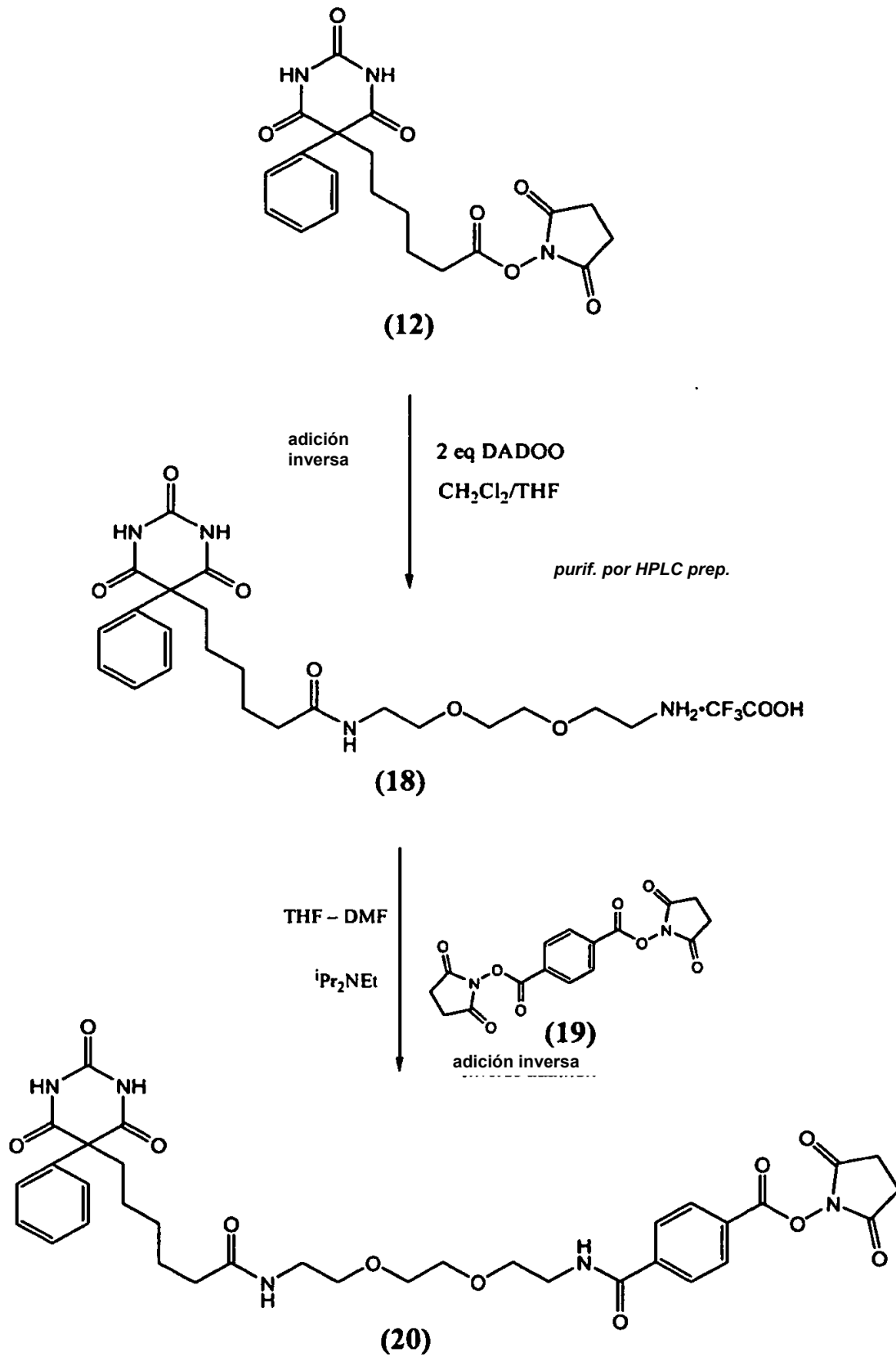


Figura 6

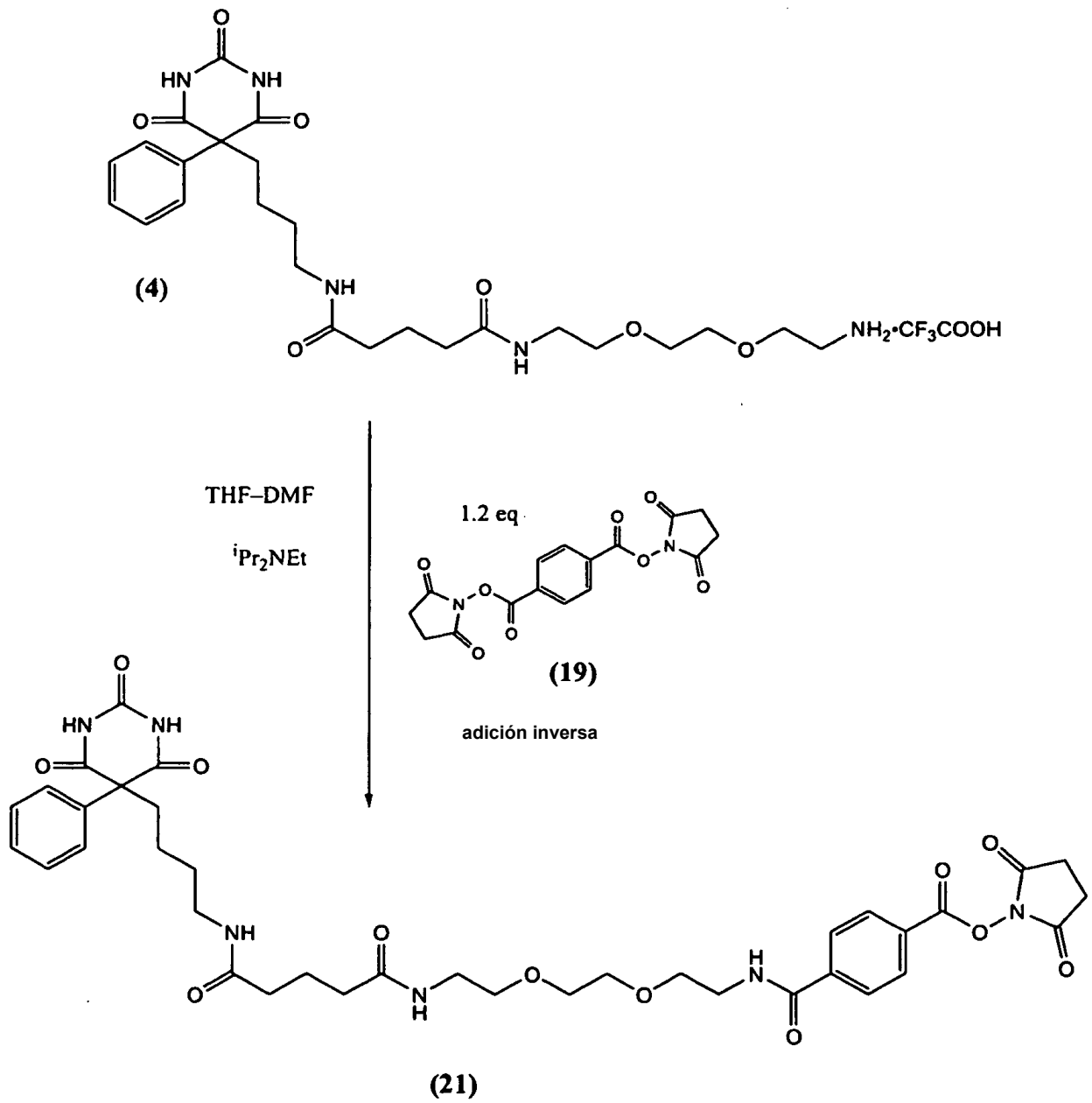




Figura 7

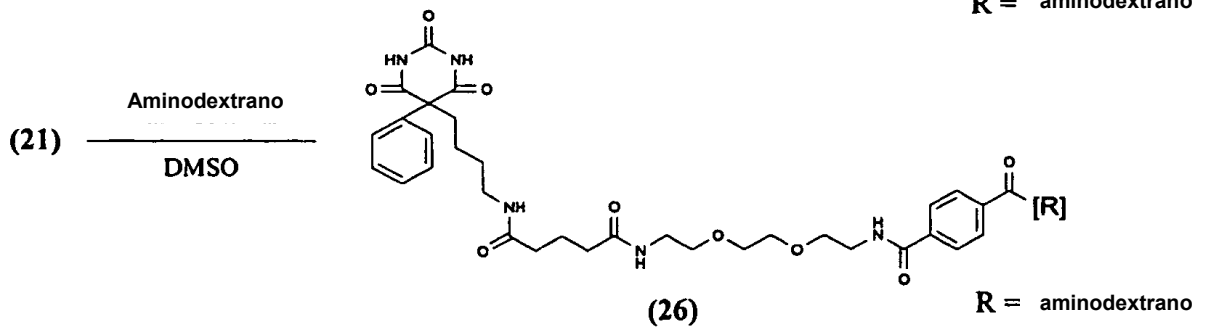
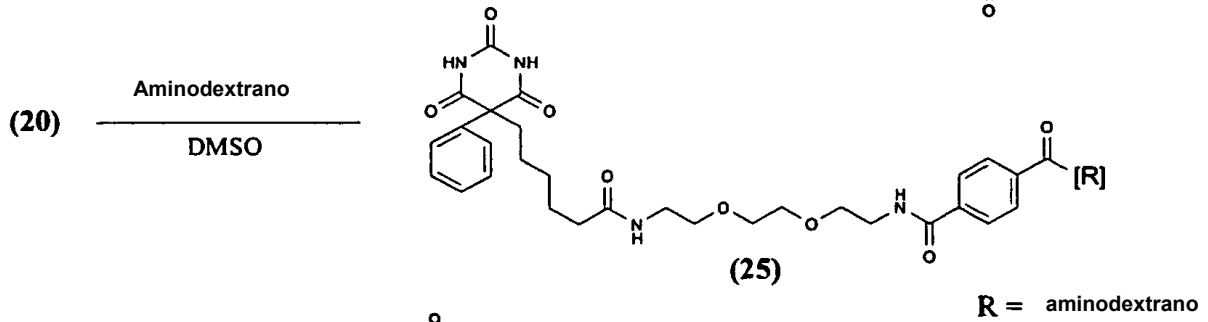
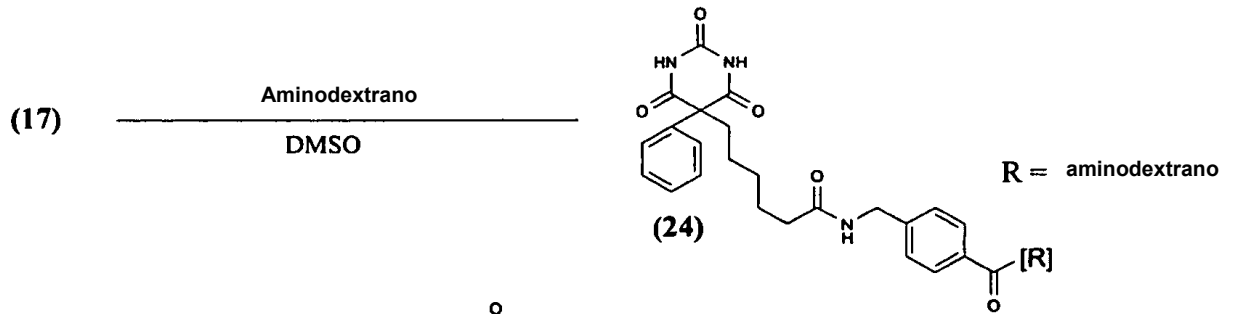
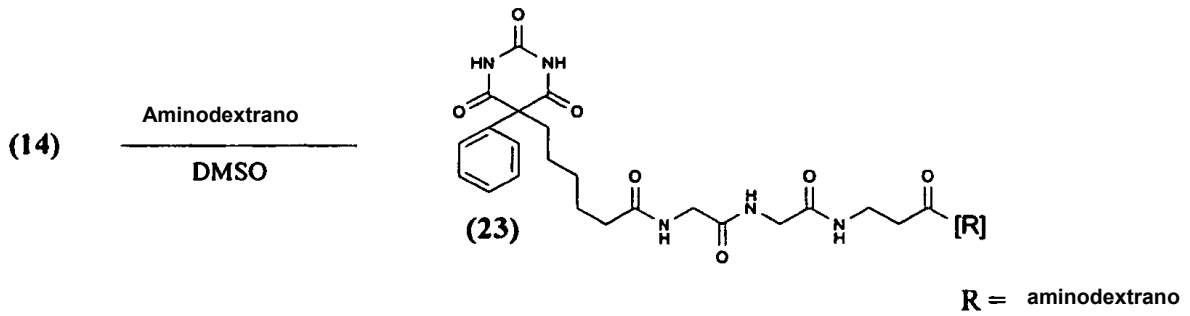
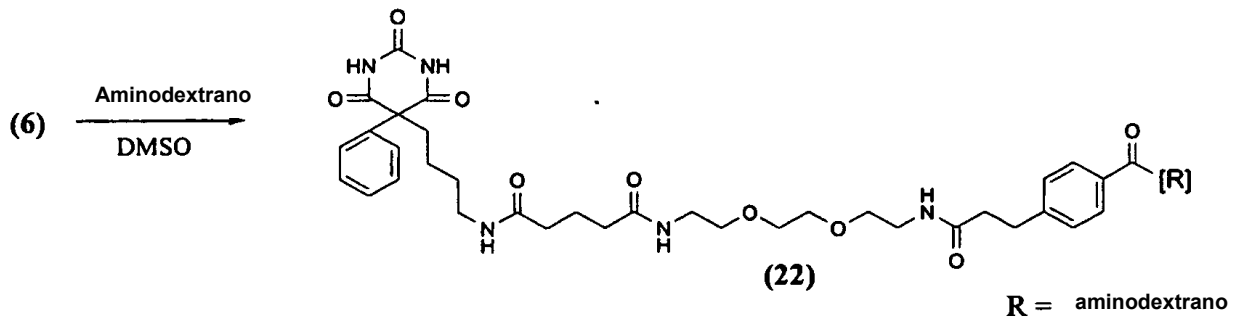


Figura 8

