

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 371 931**

51 Int. Cl.:  
**C07H 17/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06755941 .9**  
96 Fecha de presentación: **13.01.2006**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1836212**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.09.2007**

54 Título: **COMPUESTOS MACRÓLIDOS QUE CONTIENEN BIOTINA Y GRUPO CON FOTO-AFINIDAD PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LA DIANA DEL MACRÓLIDO.**

30 Prioridad:  
**14.01.2005 US 644333 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**11.01.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**11.01.2012**

73 Titular/es:  
**Glaxo Group Limited  
Glaxo Wellcome House Berkeley Avenue  
Greenford Middlesex UB6 0NN, GB**

72 Inventor/es:  
**CULIC, Ognjen;  
BOSNAR, Martina;  
MARJANOVIC, Nikola;  
MILDNER, Boris;  
TOMASKOVIC, Linda y  
ALIHODZIC, Sulejman**

74 Agente: **de Elzaburu Márquez, Alberto**

**ES 2 371 931 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

Compuestos macrólidos que contienen biotina y grupo con foto-afinidad para la identificación de la diana del macrólido.

## Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a nuevos compuestos macrólidos representados por la estructura general I, a sus sales y solvatos farmacéuticamente aceptables, a procedimientos e intermedios para su preparación y al uso de estos compuestos para la identificación de la diana del macrólido.

## Antecedentes de la invención

- 10 Los antibióticos macrólidos se acumulan de forma preferente en diferentes células de sujetos, especialmente dentro de las células fagocitos tales como las células mononucleares de la sangre periférica, y los macrófagos peritoneales y alveolares. (Gladue, R. P. *et al.*, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1989**, *33*, 277-282; Olsen, K. M. *et al.*, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1996**, *40*, 2582-2585). Los efectos inflamatorios de algunos macrólidos han sido descritos en las publicaciones científicas. Por ejemplo, ha sido descrito el efecto anti-inflamatorio de los derivados de eritromicina (*J. Antimicrob. Chemother.* **1998**, *41*, 37-46; Solicitud de patente No. WO 00/42055) y el de los derivados de azitromicina (documento EP 0283055). Los efectos anti- inflamatorios de algunos macrólidos son conocidos también a partir de estudios *in vitro* e *in vivo* en modelos animales experimentales tales como en la peritonitis inducida por zimosán en ratones (*J. Antimicrob. Chemother.* **1992**, *30*, 339-348) y la acumulación de neutrófilos inducida por endotoxina en la tráquea de rata (*J. Immunol.* **1997**, *159*, 3395-4005). Asimismo es conocido el efecto de modulación de los macrólidos sobre citocinas tales como la interleucina 8 (IL-8) (*Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* **1997**, *156*, 266-271) y la interleucina 5 (IL-5) (documentos EP 0775489 y EP 171564).

- 20 Los macrólidos tienen la propiedad de acumularse dentro de las células del sistema inmunitario concentradas en el sitio de inflamación, especialmente las células fagocíticas: Pascual A. *et al.* *Clin. Microbiol. Infect.* **2001**, *7*, 65-69. (Uptake and intracellular activity of ketolide HMR 3647 in human phagocytic and non-phagocytic cells); Hand W. L. *et al.* *Int. J. Antimicrob. Agents*, **2001**, *18*, 419-425. (Characteristics and mechanisms of azithromycin accumulation and efflux in human polymorphonuclear leukocytes); Amsden G. W. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **2001**, *18*, 11-15. (Advanced-generation macrolides: tissue-directed antibiotics); Johnson J. D. *et al.* *J. Lab. S Clin. Med.* **1980**, *95*, 429-439. (Antibiotic uptake by alveolar macrophages); Wildfeuer A. *et al.* *Antimicrob. Agents Chemother.* **1996**, *40*, 75-79. (Uptake of azithromycin by various cells and its intracellular activity under *in vivo* conditions); Scoreneaux B. *et al. Poult. Sci.* **1998**, *77*, 1510-1521. (Intracellular accumulation, subcellular distribution, and efflux of tilmicosin in chicken phagocytes); Mtairag E. M. *et al.* *J. Antimicrob. Chemother.* **1994**, *33*, 523-536. (Investigation of dirithromycin and erythromycylamine uptake by human neutrophils *in vitro*); Anderson R. *et al.* *J. Antimicrob. Chemother.* **1988**, *22*, 923-933. (An *in-vitro* evaluation of the cellular uptake and intraphagocytic bioactivity of clarithromycin (A-56268, TE-031, a new macrolide antimicrobial agent); Tasaka Y. *et al.* *Jpn. J. Antibiot.* **1988**, *41*, 836-840. (Rokitamycin uptake by alveolar macrophages); Harf R. *et al.* *J. Antimicrob. Chemother.* **1988**, *22*, 135-140 (Spiramycin uptake by alveolar macrophages).

- 35 Los antibióticos macrólidos parecen tener un papel prometedor en el control de las enfermedades de inflamación crónica de las vías respiratorias, claramente separado de su actividad bactericida. En los últimos quince años, sus resultados satisfactorios en ensayos clínicos humanos, en particular en enfermedades tales como la panbronquiolitis difusa y la fibrosis quística, ha dado lugar a investigaciones tanto *in vitro* como *in vivo* para determinar los mecanismos por los que esta familia de antibióticos modulan la respuesta inmunitaria. Un gran número de pruebas dan a entender que los macrólidos se dirigen directamente a múltiples componentes de la cascada inflamatoria independientemente de los efectos bactericidas/bacteriostáticos. (W. C.Tsai, *Current Pharmaceutical Design.* **2004**, *10*, 3081-3093).

- 40 Hay una gran necesidad de entender los mecanismos que controlan la inflamación dentro de los pulmones. Esta necesidad coincide con una revolución en la biología celular y molecular que proporcionaría los dispositivos necesarios para que los biólogos especialistas de pulmón clarifiquen los mecanismos por los que los macrólidos ejercen efectos inmunomoduladores en el caso de la inflamación pulmonar, y establezcan estrategias terapéuticas potenciales basadas en el mecanismo o mecanismos elucidados. Por ejemplo, se ha demostrado que la azitromicina se une específicamente a la  $\alpha_1$ -glicoproteína ácida del suero utilizando la diálisis en combinación con métodos de HPLC (Castearena *et al.*, *J Chemother.* **1995**, *7* Suppl 4: 26-8).

- 50 El marcado por foto-afinidad es una técnica en la que una entidad molecular fotoquímicamente reactiva, asociada específicamente con una biomolécula, es fotoexcitada con el fin de unir covalentemente una marca a la biomolécula, usualmente a través de intermedios (IUPAC Compendium of Chemical Terminology, 2nd Edition, 1997). El marcado por foto-afinidad es una importante metodología de la ciencia biológica ampliamente utilizada para el análisis de aspectos estructurales que están relacionados con funciones específicas de los sistemas macromoleculares biológicos objetivos. El método requiere grupos fotorreactivos que generan intermedios altamente reactivos,

usualmente nitreno y carbeno como la estructura clave de sondas de foto-afinidad (Hatanaka Y. *et al.*, *Heterocycles*, **1993**, 35, 997-1004).

5 El uso de análogos de foto-afinidad de macrólidos permite el estudio de las interacciones proteína-macrólido a nivel molecular. La técnica de marcado por foto-afinidad se puede utilizar para determinar qué proteínas específicas de unión a macrólidos son las dianas de los fármacos.

### Breves descripciones de los dibujos

Figura 1. Detección de  $\alpha_1$ -glicoproteína ácida. La Figura 1A presenta una mancha de plata. La Figura 1B presenta una transferencia Western.

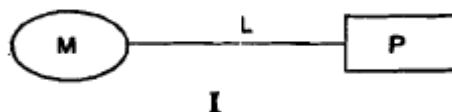
### Sumario de la invención

10 Según los conocimientos actuales de la técnica conocida y establecida, los compuestos representados por la fórmula I, que son el objeto de la presente invención, sus sales farmacológicamente aceptables y el método de su uso para identificación de proteínas no han sido descritos hasta la fecha.

15 La presente invención proporciona, mediante el uso de un simple reactivo, conjugados macrólidos con capacidad para ser reticulados por foto-afinidad a otras moléculas, para ser receptores, y para introducir simultáneamente la biotina en el complejo covalente. Esto permite el aislamiento y/o la identificación del complejo intacto o subsiguientemente fragmentado utilizando derivados de avidina adecuados.

Ninguno de los compuestos que son el objeto de la presente invención ha sido descrito para uso en el estudio de interacciones proteína-macrólido a nivel molecular.

20 En un aspecto de la presente invención, los conjugados de la fórmula I, o sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables, se representan como se indica a continuación:



donde M representa una subunidad de macrólido que tiene la propiedad de acumulación en las células inflamatorias, P representa una subunidad que contiene biotina y un grupo de foto-afinidad o iminobiotina y un grupo de foto-afinidad y L representa un enlazador que une covalentemente M y P.

25 Las subunidades de macrólido adecuadas para los compuestos híbridos de la presente invención se pueden seleccionar de los macrólidos de anillo lactónico de 14 y 15 miembros, siendo los más preferidos la azitromicina y sus derivados y la eritromicina y sus derivados.

30 Los ejemplos más específicos no limitantes de moléculas de las que se puede seleccionar la subunidad del macrólido son los siguientes antibióticos macrólidos, incluyendo las azalidas, por ejemplo eritromicina, diritromicina, azitromicina, 9-dihidro-9-desoxo-9a-aza-9a-homoeritromicina, eritromicilamina, fluritromicina, claritromicina, oleandomicina, roxitromicina, y sus derivados, tales como los cetólidos (por ejemplo, 3-cetona), las lactamas (por ejemplo, 8a-lactamas o 9a-lactamas) y los derivados que carecen de uno o más restos de azúcar.

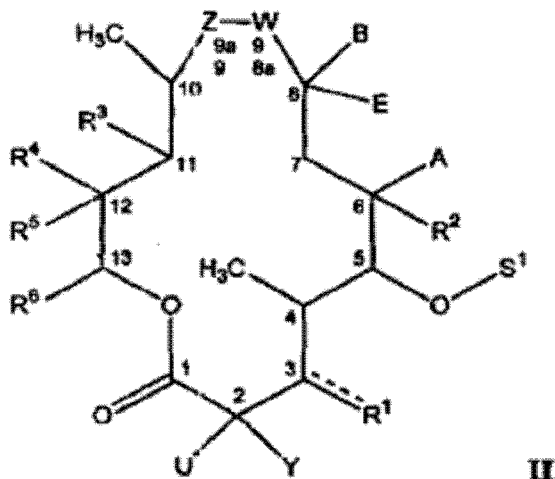
### Descripción detallada de la invención

35 Las metodologías para la síntesis de los macrólidos anteriores no disponibles comercialmente y la manipulación sintética de los macrólidos en general son conocidas por las personas con experiencia normal en la técnica, o se pueden encontrar en: Denis A. *et al.* *Bioorg. & Med Chem. Lett* **1999**, 9, 3075-3080; Agouridas C. *et al.* *J. Med Chem.* **1998**, 41,4080-4100; y el documento EP0680967; Sun Or Y. *et al.* *J. Med Chem.* **2000**; 43, 1045-1049; documento US5747467; McFarland J. W. *et al.* *J. Med Chem.* **1997**, 40, 1041-1045; Denis A. *et al.* *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* **1998**, 8, 2427-2432; documento W09951616; Lartey *et al.* *J Med Chem.* **1995**, 38, 1793-1798; documento EP0984019; y documento W098/56801.

45 Se conocen macrólidos adicionales adecuados, algunos descritos en Bryskier, A. J. *et al.* *Macrolides, Chemistry, Pharmacology and Clinical Use*; Arnette Blackwell: Paris, 1993, pp 485-491. 14(R)-hidroxiclartromicina, eritromicina-11,12-carbonato, tri-O-acetiloleandomicina; en Ma, Z. *et al.* *Current Medicinal Chemistry-Anti-Infective Agents*, **2002**, 1, 15-34; y en Romo, D. *et al.* *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120; 12237-12254. Véase, en particular las estructuras y derivados para macrólidos de anillo de 14 miembros en las páginas 487-491 de Bryskier, *et al.*, y los diferentes derivados y síntesis de cetólidos en Ma *et al.*, particularmente en todas las tablas de estructuras y todos los sistemas

de reacción. Todos estos macrólidos después de haber sido conjugados con la subunidad P están dentro del alcance de la presente invención. Los compuestos macrólidos específicamente nombrados o referenciados antes, están comercialmente disponibles o los métodos para su síntesis son conocidos.

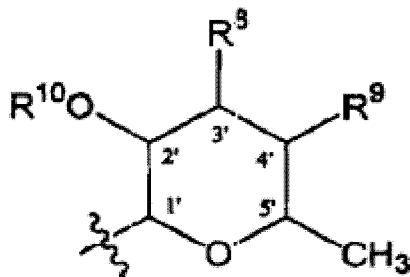
- 5 En las realizaciones preferidas, esta invención se refiere al uso de compuestos, representados por la fórmula I, o sales o solvatos de los mismos, donde M representa específicamente un macrólido de anillo lactónico de 14 o 15 miembros representado por la fórmula II:



II

en la que

- (i) Z y W son independientemente  $>C=O$ ,  $>CH_2$ ,  $>CH-NR_tR_s$ ,  $>NR_N$ ,  $>C=NR_M$ , o un enlace, donde
- 10  $R_t$  y  $R_s$  son independientemente H o alquilo (preferiblemente metilo o H);
- $R_M$  es OH,  $OR^P$ , alcoxi o alcoxi sustituido (en configuraciones Syn o Anti o mezclas de las mismas)
- $R_N$  es H,  $R^P$ , alquilo, alquenilo, alquinilo, alcoxi, alcoxialquilo, o  $-C(=X)-NR_tR_s$ ; y
- X es O o S;
- 15 con la condición de que Z y W no pueden ser ambos simultáneamente  $>C=O$ ,  $>CH-NR_tR_s$ ,  $>CH_2$ ,  $>NR_N$ ,  $>C=NR_M$ , ni un enlace,
- (ii) U e Y son independientemente H, halógeno, alquilo, o hidroxialquilo (preferiblemente H, metilo, o hidroximetilo);
- (iii)  $R^1$  es hidroxilo,  $OR^P$ ,  $-O-S^2$ , o  $=O$ ;
- (iv)  $S^1$  es H o un resto de azúcar en la posición C/5 (por ejemplo, un grupo desosamina) de la fórmula:



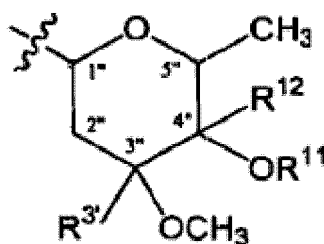
20 en la que

$R^8$  y  $R^9$  son ambos hidrógeno o forman juntos un enlace, o  $R^9$  es hidrógeno y  $R^8$  es  $-N(CH_3)R^Y$ , en la que

$R^y$  es  $R^p$ ,  $R^z$  o  $-C(O)R^z$ , donde  $R^z$  es hidrógeno, cicloalquilo (preferiblemente ciclohexilo), alquilo (preferiblemente un alquilo  $C_1-C_7$ ), alqueno (preferiblemente alqueno  $C_2-C_7$ ), alquino (preferiblemente alquino  $C_2-C_7$ ), arilo o heteroarilo, o alquilo sustituido con alquilo  $C_2-C_7$ , alqueno  $C_2-C_7$ , alquino  $C_2-C_7$ , arilo o heteroarilo ( $R^y$  es preferiblemente hidrógeno, metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo,  $-C(O)CH_3$ ,  $-CH_2$ -fenilo, o ciclohexilo);

5  $R^{10}$  es hidrógeno o  $R^p$ ;

(v)  $S^2$  es un resto de azúcar (por ejemplo, es un grupo cladinilo) de la fórmula



10 en la que  $R^{3'}$  es H o metilo y  $R^{11}$  es hidrógeno o  $R^p$ ,  $-C(O)(CH_2)_qNR^4R^6$ , o  $O-R^{11}$  es un grupo que con  $R^{12}$  y con el átomo de carbono  $C/4''$  forma un grupo  $>C=O$  o epoxi;  $R^{12}$  es hidrógeno o un grupo que con  $O-R^{11}$  y con el átomo de carbono  $C/4''$  forma un grupo  $>C=O$  o epoxi,

donde q es un número entero de 1 a 6;

(vi)  $R^2$  es H, hidroxilo, grupo  $OR^p$ , alcoxi (preferiblemente alcoxi  $C_1-C_4$ , lo más preferiblemente metoxi) o alcoxi sustituido;

(vii) A es H o metilo;

15 (viii) B es metilo o epoxi;

(ix) E es H o halógeno (preferiblemente flúor);

20 (x)  $R^3$  es hidroxilo, grupo  $OR^p$  o alcoxi (preferiblemente alcoxi  $C_1-C_4$ , lo más preferiblemente metoxi), alcoxi sustituido o  $R^3$  es un grupo que se puede combinar con  $R^5$  para formar un "puente" (por ejemplo, un carbonato o carbamato cíclico) o si W o Z es  $>NR_N$ ,  $R^3$  es un grupo que se puede combinar con W o Z para formar un "puente" (por ejemplo, un carbamato cíclico);

(xi)  $R^4$  es alquilo  $C_1-C_4$  (preferiblemente metilo);

(xii)  $R^5$  es H, hidroxilo, grupo  $OR^p$ , alcoxi  $C_1-C_4$ , alcoxi sustituido o un grupo se puede combinar con  $R^3$  para formar un puente (por ejemplo, un carbonato o carbamato cíclico);

(xiii)  $R^6$  es H o alquilo  $C_1-C_4$  (preferiblemente metilo o etilo);

25 (xiv)  $R^p$  representa un grupo protector seleccionado de alquilo (preferiblemente metilo), alcanilo (preferiblemente acetilo), alcoxicarbonilo (preferiblemente metoxicarbonilo o *tert*-butoxicarbonilo), arilmoxicarbonilo (preferiblemente benciloxicarbonilo), aroilo (preferiblemente benzoilo), arilalquilo (preferiblemente bencilo), alquilsililo (preferiblemente trimetilsililo) y alquilsililalcoxialquilo (preferiblemente trimetilsililetoximetilo);

30 donde la subunidad M tiene un sitio de unión a través del cual se une a la subunidad P mediante el grupo de enlace L, la unión de L al resto macrolido es a través de cualquiera de:

a. el átomo de nitrógeno del anillo en la posición 9a,

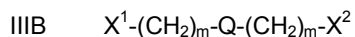
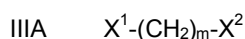
b. el grupo hidroxilo en la posición 11 o en la posición 6,

c. el grupo 2' hidroxilo o el grupo 3' amino del resto de azúcar desosamina,

d. el grupo 4'' hidroxilo del azúcar cladinosa, o

35 e. si el resto M es aglicona o falta uno de los de grupos azúcar desosamina y cladinosa, a través del grupo OH creado en la posición 5 o 3 del anillo del macrolido;

L es una molécula de enlace representada por la fórmula IIIA o IIIB:



en las que

$X^1$  se selecciona de:  $-CH_2$ ,  $-CH_2-NH-$ ,  $-C(O)-$ ,  $-OC(O)-$ ,  $=N-O-$ ,  $-OC(O)NH-$  o  $-C(O)NH-$ ;

5  $X^2$  se selecciona de:  $-NH-$ ,  $-CH_2-$ ,  $-NHC(O)-$ ,  $-C(=O)-$ ,  $-O-$  o  $-OC(O)-$ ;

Q es  $-NH-$ ,  $-CH_2-$  o  $-S-S-$ ;

donde cada grupo  $-CH_2-$  o  $-NH-$  está opcionalmente sustituido con alquilo  $C_1-C_7$ , alqueno  $C_2-C_7$ , alquino  $C_2-C_7$ ,  $C(O)R^x$ ,  $C(O)OR^x$ ,  $C(O)NHR^x$  donde  $R^x$  puede ser alquilo  $C_1-C_7$ , arilo o heteroarilo;

los símbolos m y n son independientemente un número entero de 0 a 8

10 con la condición de que si  $Q=NH$ , n no puede ser cero;

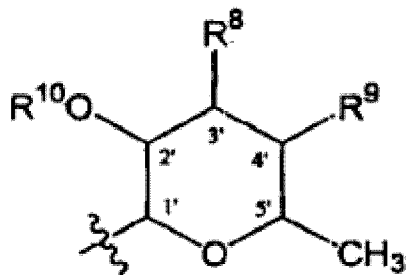
P representa una subunidad que contiene biotina y un grupo de foto-afinidad o iminobiotina y un grupo de foto-afinidad;

donde

15 el grupo de foto-afinidad. es arilazida, fenilazida, fluorofenilazida, nitrofluorofenilazida, para-azidoanilina, para-azidobenzoilo, arildiazirina, diazocetona o benzofenona.

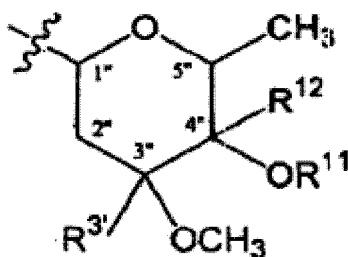
Uno o más grupos  $R^P$  pueden estar presentes independientemente en la subunidad de macrólido de la fórmula II.

También son preferidos los compuestos de semiglicona según la fórmula II en los que  $R^1$  es hidroxilo y  $S^1$  es un resto de azúcar de la fórmula:



20 en la que  $R^{10}$ ,  $R^8$  y  $R^9$  son como se han definido previamente.

También son preferidos los compuestos de semiglicona según la fórmula II en los que  $S^1$  es H y  $R^1$  es  $O-S^2$  donde  $S^2$  es un resto de azúcar de la fórmula:

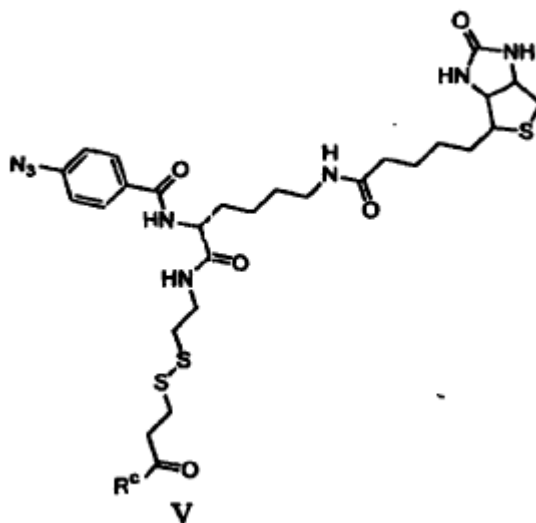


en la que  $R^{3'}$ ,  $R^{11}$  y  $R^{12}$  son como se han definido previamente.

25 También son preferidos los compuestos de aglicona según la fórmula II en los que  $S^1$  es hidrógeno y  $R^1$  es hidroxilo.

También se contemplan en la presente invención, derivados conocidos de biotina o iminobiotina contenidos en una subunidad de foto-afinidad.

En una realización preferida, P representa una subunidad que contiene biotina y un grupo de foto-afinidad que puede ser representado por la subestructura V:



en la que

- 5  $R^c$  es un enlace covalente con la cadena L, por ejemplo, en  $X^2$ .

Otros grupos fotorreactivos adecuados están descritos, por ejemplo, en S.A. Fleming, *Tetrahedron*, **1995**, 51, 12479-12520 (Chemical Reagents in Photoaffinity Labeling).

- 10 Los enlaces en negrita de las fórmulas contenidas en esta memoria indican enlaces que están por encima del nivel del papel, los enlaces de líneas de trazos indican enlaces por debajo del nivel del papel, mientras que las líneas cortadas representan un enlace que puede estar por encima o por debajo del nivel del papel. Las líneas paralelas completas y cortadas representan un enlace sencillo o un enlace doble. A menos que se indique explícitamente en otro sitio de esta memoria, los siguientes términos tienen los significados que se les da a continuación:

- 15 "Alquilo" significa un radical hidrocarburo monovalente, saturado, lineal o ramificado, de uno a diez átomos de carbono, más preferiblemente de uno a seis átomos de carbono. Los alquilos de cadena lineal o de cadena ramificada preferidos incluyen metilo, etilo, propilo, *iso*-propilo, butilo, *sec*-butilo y *terc*-butilo. El más preferido es el metilo. Los grupos alquilo pueden estar sustituidos con uno hasta cinco sustituyentes que incluyen halógeno (preferiblemente flúor o cloro), hidroxilo, alcoxi (preferiblemente metoxi o etoxi), acilo, acilamino, ciano, amino, N-(alquil  $C_1$ - $C_4$ )amino (preferiblemente N-metilamino o N-etilamino), N,N-di(alquil  $C_1$ - $C_4$ )amino (preferiblemente dimetilamino o dietilamino), arilo (preferiblemente fenilo) o heteroarilo, tiocarbonilamino, aciloxi, amino, amidino, alquilamidino, tioamidino, aminoacilo, aminocarbonilamino, aminotio-carbonilamino, aminocarboniloxi, arilo, heteroarilo, ariloxi, ariloxiarilo, nitro, carboxilo, carboxilalquilo, carboxil-alquilo sustituido, carboxil-cicloalquilo, carboxil-cicloalquilo sustituido, carboxilarilo, carboxil-arilo sustituido, carboxilheteroarilo, carboxil-heteroarilo sustituido, carboxilheterocíclico, carboxil-heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalcoxi, heteroariloxi, heterocicliloxi, y oxicarbonilamino. Tales grupos alquilo sustituidos están dentro de la presente definición de "alquilo". La presente
- 20
- 25 definición de alquilo se aplica también a otros grupos que tienen un resto alquilo tal como alcoxi.

"Alquenilo" significa un radical hidrocarburo monovalente lineal o ramificado de dos a diez y preferiblemente de dos a seis átomos de carbono que tiene al menos un doble enlace carbono-carbono. Los grupos alquenilo pueden estar sustituidos con los mismos grupos que los alquilo y tales grupos alquenilo opcionalmente sustituidos están incluidos dentro del término "alquenilo". Son preferidos etenilo, propenilo, butenilo y ciclohexenilo.

- 30 "Alquinilo" significa un radical hidrocarburo monovalente lineal o ramificado, que tiene una cadena lineal o una cadena ramificada de dos a diez, y preferiblemente de dos a seis átomos de carbono y que contiene uno y preferiblemente no más de tres triples enlaces carbono-carbono. Los grupos alquinilo pueden estar sustituidos con los mismos grupos que los alquilo, y los grupos sustituidos están dentro de la presente definición de alquinilo. Son preferidos los grupos etinilo, propinilo y butinilo.

- 35 "Cicloalquilo" significa un grupo cíclico que tiene 3-8 átomos de carbono que tiene un único anillo opcionalmente condensado con un grupo arilo o heteroarilo. Los cicloalquilos pueden estar opcionalmente condensados con un

anillo saturado. Los grupos cicloalquilo pueden estar sustituidos como se especifica para "arilo" más adelante, y los grupos cicloalquilo sustituidos están dentro de la presente definición de "cicloalquilo". Los cicloalquilos preferidos son ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo y cicloheptilo. También están incluidos los alquil-cicloalquilos en los que el cicloalquilo está unido mediante una cadena de alquilo que tiene 1-6 carbonos.

- 5 "Arilo" significa un grupo carbocíclico aromático insaturado que tiene 6-14 átomos de carbono que tiene un único anillo tal como fenilo o múltiples anillos condensados tal como naftilo. El arilo puede estar además opcionalmente condensado con un grupo alifático o arilo o puede estar sustituido con uno o más sustituyentes tales como halógeno (flúor, cloro y/o bromo), hidroxilo, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub> o ariloxi, alquil C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>-tio, ariltio, alquilsulfonilo, ciano, amino primario o no primario, haloalquilo, o alquilamino.
- 10 "Heteroarilo" significa un anillo hidrocarburo aromático monocíclico o bicíclico que tiene de 2 a 10 átomos de carbono y de 1 a 4 heteroátomos, tales como O, S o N. El anillo heteroarilo puede estar opcionalmente condensado con otro heteroarilo, arilo o grupo cíclico alifático. Ejemplos de este tipo son furano, tiofeno, pirrol, imidazol, indol, piridina, oxazol, tiazol, pirrol, pirazol, tetrazol, pirimidina, pirazina y triazina, siendo preferidos furano, pirrol, piridina e indol. El término incluye grupos que están sustituidos con los mismos sustituyentes especificados anteriormente para arilo.
- 15 "Heterocíclico" significa un grupo saturado o insaturado que tiene un único anillo o múltiples anillos y de 1 a 10 átomos de carbono y de 1-4 heteroátomos seleccionados de nitrógeno, azufre u oxígeno, en el que en un sistema de anillos condensados el otro anillo o anillos pueden ser arilo o heteroarilo. Los grupos heterocíclicos pueden estar sustituidos como se ha especificado para los grupos alquilo y los grupos heterocíclicos sustituidos de este modo están dentro de la presente definición.
- 20 "Radiación electromagnética" como se usa en esta memoria, se refiere a las ondas energéticas del espectro electromagnético que incluyen, pero sin limitarse a ellos, los rayos X, ultravioleta, visible, infrarrojo, infrarrojo lejano, microondas, radio-frecuencia, ondas de sonido y ultrasonido. Preferiblemente, la radiación electromagnética comprenderá la luz visible (esto es, que tiene una longitud de onda de al menos aproximadamente 4,0 x 10<sup>-5</sup> cm hasta aproximadamente 7,0 x 10<sup>-5</sup> cm) o la luz ultravioleta (esto es, que tiene una longitud de onda de al menos aproximadamente 1,0 x 10<sup>-6</sup> cm pero menor de 4,0 x 10<sup>-5</sup> cm). La presente invención engloba también las sales farmacéuticamente aceptables de los presentes compuestos. Las sales farmacéuticamente adecuadas de los compuestos de la presente invención incluyen las sales con ácidos inorgánicos (por ejemplo ácido clorhídrico, bromhídrico, fosfórico, metafosfórico, nítrico o sulfúrico) o con ácidos orgánicos (por ejemplo ácidos tartárico, acético, metano-sulfónico, trifluoroacético, cítrico, maleico, láctico, fumárico, benzoico, succínico, metanosulfónico, oxálico y p-toluenosulfónico).
- 25  
30

La presente invención engloba también los solvatos (preferiblemente los hidratos) de los compuestos de la fórmula I o de sus sales.

- Los compuestos de la fórmula I tienen uno o más centros de quiralidad y, dependiendo de la naturaleza de los sustituyentes individuales, pueden tener también isómeros geométricos. Los isómeros que difieren en la ordenación de sus átomos en el espacio se denominan "estereoisómeros". Los estereoisómeros que no son imagen en el espejo uno de otro se denominan "diastereoisómeros" y los que son imagen en el espejo uno de otro no superponibles se denominan "enantiómeros". Cuando un compuesto tiene un centro quiral, es posible un par de enantiómeros. Un enantiómero se puede caracterizar por la configuración absoluta de su centro asimétrico y se describe por las reglas de secuenciación R y S de Cahn y Prelog, o por la manera en que la molécula hace rotar el plano de la luz polarizada y se denomina como dextrorrotatorio o levorrotatorio (esto es, como isómero (+) o (-) respectivamente). Un compuesto quiral puede existir como un enantiómero individual o como una mezcla de enantiómeros. Una mezcla que contiene proporciones iguales de los enantiómeros se denomina una "mezcla racémica". La presente invención engloba todos los isómeros individuales de los compuestos de la fórmula I. La descripción o denominación de un compuesto particular en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, se pretende que incluya tanto los enantiómeros individuales como las mezclas de los mismos, racémicas o de otro tipo. Los métodos para la determinación de la estereoquímica y la resolución de los estereoisómeros son bien conocidos en la técnica.
- 35  
40  
45

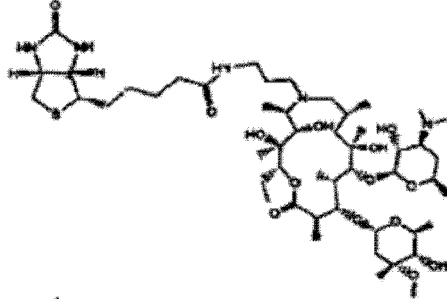
- La presente invención engloba también los estereoisómeros del tipo syn-anti, y las mezclas de los mismos, encontrados cuando está presente una oxima o grupo similar. El grupo de mayor prioridad según Cahn Ingold Prelog unido a uno de los átomos terminales de la oxima con doble enlace, se compara con el grupo hidroxilo de la oxima. El estereoisómero se denomina Z (*zusammen*=junto) o *Syn* si el hidroxilo de la oxima cae en el mismo lado de un plano de referencia que pasa a través del doble enlace C=N como el grupo de mayor prioridad, el otro estereoisómero se denomina E (*entgegen* =opuesto) o *Anti*.
- 50

- En una realización, cuando Z o W de la fórmula I es >C=NR<sup>M</sup> y R<sup>M</sup> es OH, OR<sup>P</sup>, alcoxi o un alcoxi sustituido, el compuesto es predominantemente el isómero syn. En otra realización, el compuesto es predominantemente el isómero anti. En otra realización más, el compuesto es una mezcla 50/50 de los dos isómeros, o alternativamente una mezcla tal como 60/40, 70/30, 80/20, o 90/10 syn a anti o alternativamente anti a syn.
- 55

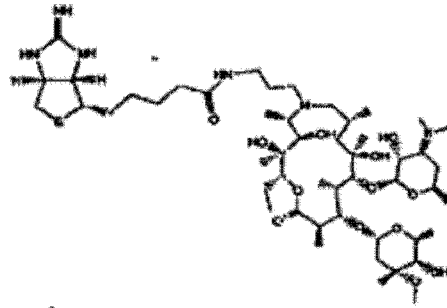


Los conjugados específicos de la fórmula I que se pueden usar según la presente invención son:

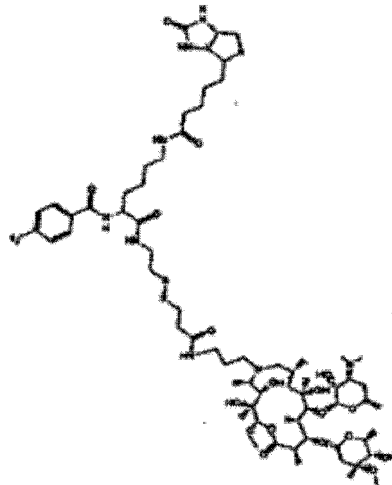
Compuesto de referencia 1



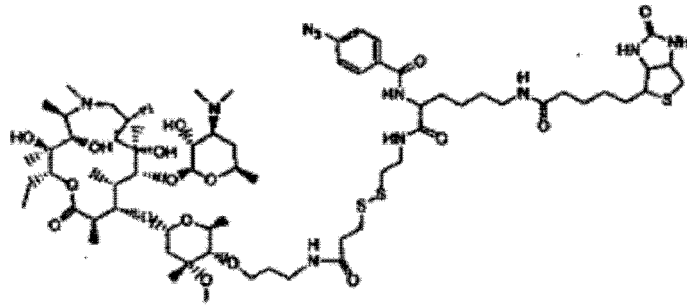
Compuesto de referencia 2



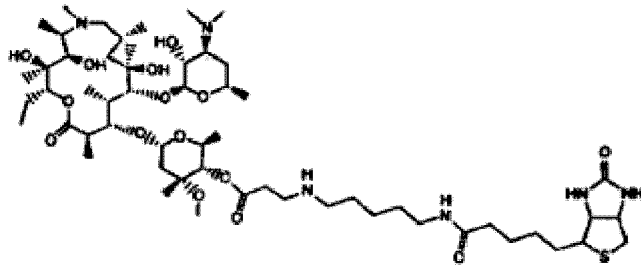
Compuesto 3



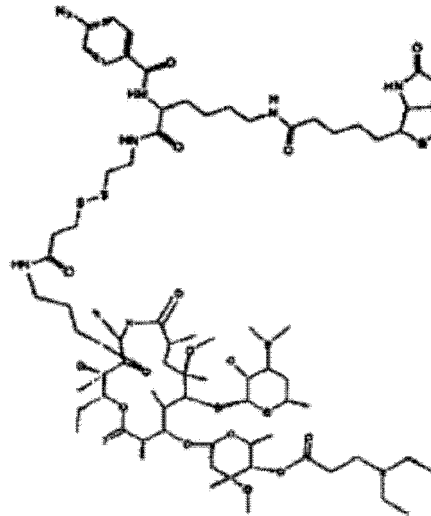
Compuesto 4



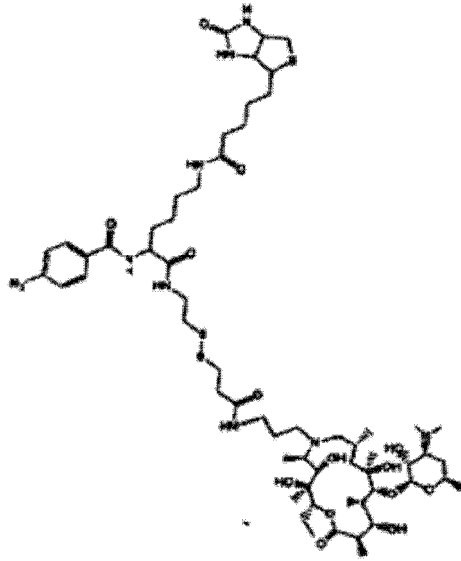
Compuesto de referencia 5



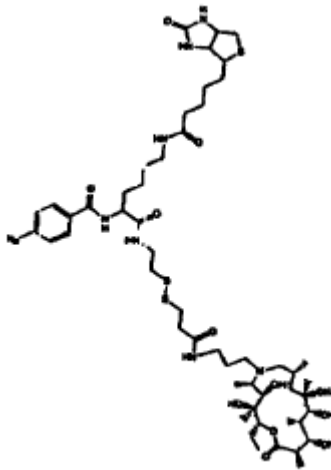
Compuesto 6



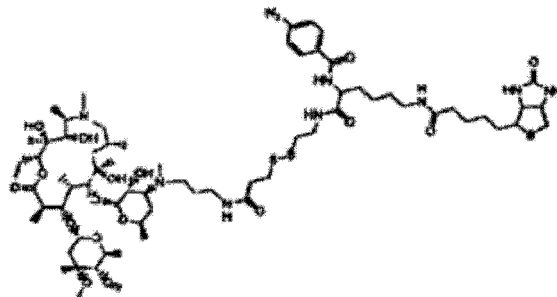
Compuesto 7



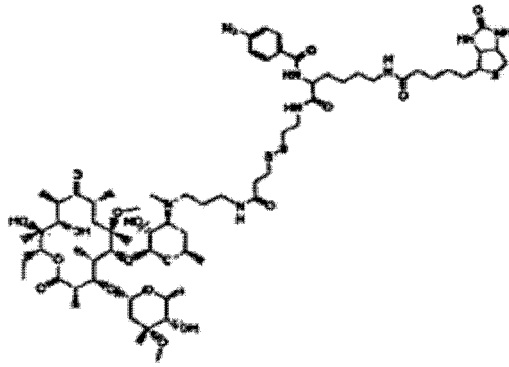
Compuesto 8



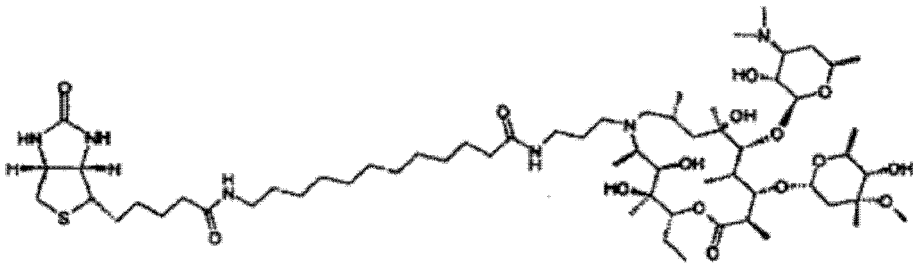
Compuesto 9



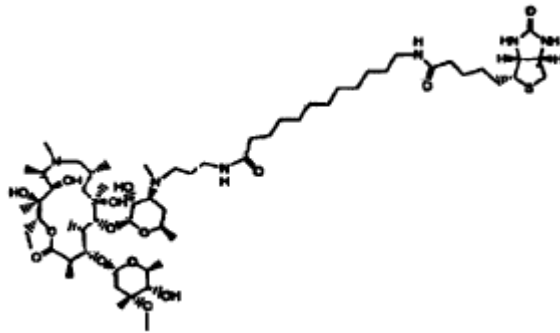
Compuesto 10



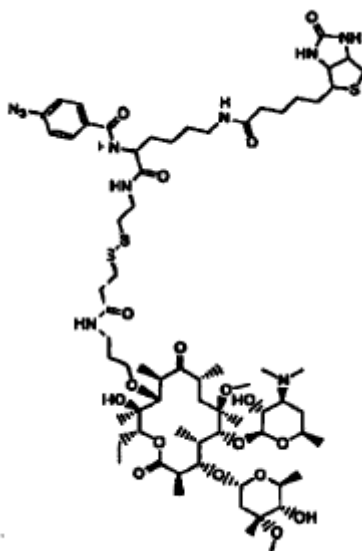
Compuesto de referencia 11



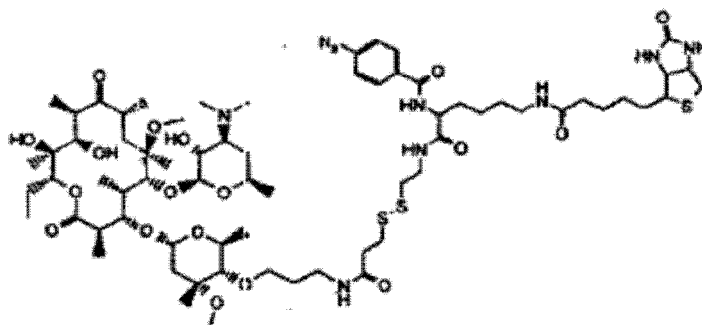
Compuesto de referencia 12



Compuesto 13



Compuesto 14



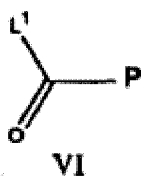
- 5 El sitio de unión está preferiblemente en la posición C/3, o es mediante el grupo amino en la posición C/3' del azúcar S<sup>1</sup> o en la posición C/11 o en W o Z, o a través de la posición C/4" del azúcar S<sup>2</sup>.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a los procedimientos para la preparación de los compuestos representados por la fórmula I. Generalmente, los compuestos de la fórmula I se pueden obtener de la siguiente manera: un extremo de la cadena se une en primer lugar al macrólido, y después el otro extremo de la cadena se une al P, o un extremo de la cadena se une en primer lugar al P y después el otro extremo de la cadena se une al macrólido, o finalmente, un resto de la cadena se une al macrólido, mientras que el otro resto de la cadena se une al P, estando entonces los extremos libres de las partes de la cadena unidos químicamente para formar la cadena L.

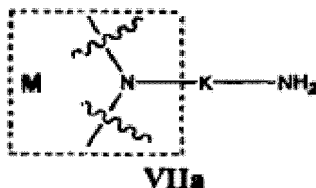
Los expertos en la técnica podrán apreciar que puede ser deseable utilizar derivados protegidos de los intermedios usados en la preparación de los compuestos de la fórmula I. La protección y desprotección de los grupos funcionales se puede realizar por métodos conocidos en la técnica. Los grupos hidroxilo o amino se pueden proteger con cualquier grupo protector de hidroxilo o amino, por ejemplo, como se describe en Green, T. W. Wuts, P. G. M., *Protective Groups in Organic Synthesis*: John Wiley and Sons, New York, 1999. Véase también la exposición de grupos protectores en conexión con la fórmula I anterior. Los grupos protectores de amino se pueden separar por técnicas convencionales. Por ejemplo, los grupos acilo, tales como grupos alcanilo, alcoxicarbonilo y aroilo, se pueden separar por solvolisis, por ejemplo, por hidrólisis en condiciones ácidas o básicas. Los grupos arilmetoxicarbonilo (por ejemplo, benciloxicarbonilo) se pueden separar por hidrogenólisis en presencia de un catalizador tal como paladio sobre carbón activo.

Más específicamente, los compuestos de la fórmula I se pueden preparar por los siguientes procedimientos:

- 25 a) Los compuestos de la fórmula I, cuando X<sup>2</sup> es -NHC(O)-, se pueden formar haciendo reaccionar un compuesto de la fórmula VI:



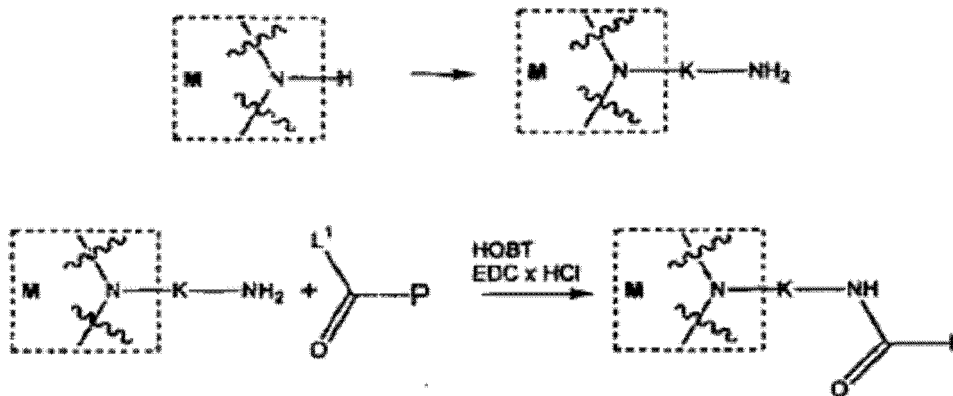
en la que L<sup>1</sup> representa un grupo saliente (tal como hidroxilo o N-hidroxisuccinimida sulfonada: sulfo-NHS), y un grupo amino libre de un macróido representado por la fórmula VIIa:



5 en la que K es la porción de la molécula de unión L unida a la subunidad del macróido.

10 La reacción se lleva a cabo generalmente con derivados ácidos que tienen la capacidad de activar el grupo de ácido carboxílico tal como los halogenuros, anhídridos mixtos y especialmente carbodiimidas tales como 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etil-carbodiimida (EDC) y los benzotriazoles. La reacción se lleva a cabo en presencia de una base, tal como una base orgánica (por ejemplo, trietilamina), a temperatura ambiente en una atmósfera inerte, tal como argón o nitrógeno. La reacción puede requerir de varias horas a varios días para llegar a completarse.

Por ejemplo, cuando L es -K-NH<sub>2</sub> el compuesto de la fórmula I se puede formar derivando un grupo >NH del anillo macróido hasta un grupo >N-K-NH<sub>2</sub> y haciendo reaccionar el macróido derivado con un compuesto de la fórmula VI como se muestra a continuación.

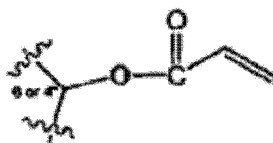


15 Por ejemplo este procedimiento se puede llevar a cabo cuando el grupo >NH en la subunidad de macróido de la fórmula II está unido en la posición C/3' o N/9a.

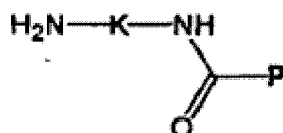
Los compuestos representados por la fórmula VI están comercialmente disponibles o se pueden derivar de la subunidad P por métodos conocidos en la técnica para las reacciones de adición.

20 La preparación del macróido de partida de la fórmula VIIa ha sido descrita en el documento WO 02/055531. Véase también el documento US 4.474.768 y Bright, G. M, *et al*, *J. Antibiot.* **1988**,41,1029-1047.

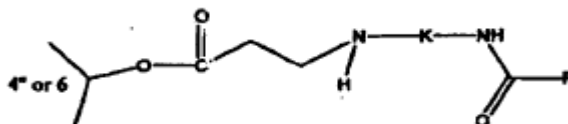
b) Los compuestos representados por la fórmula I, en la que X<sup>1</sup> es -OC(O)-, Q es -CH<sub>2</sub>- o NH, y X<sup>2</sup> es -NH-, se pueden preparar haciendo reaccionar una subunidad de macróido representada por la fórmula



en la que 4" es la posición 4 sobre un azúcar S<sup>2</sup>, tal como un azúcar cladinosa, y teniendo la subunidad P un grupo amino libre representado por la fórmula:

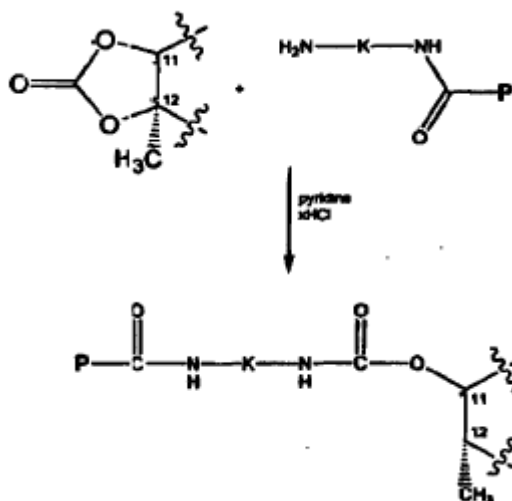


5 en un disolvente, tal como acetonitrilo, para dar

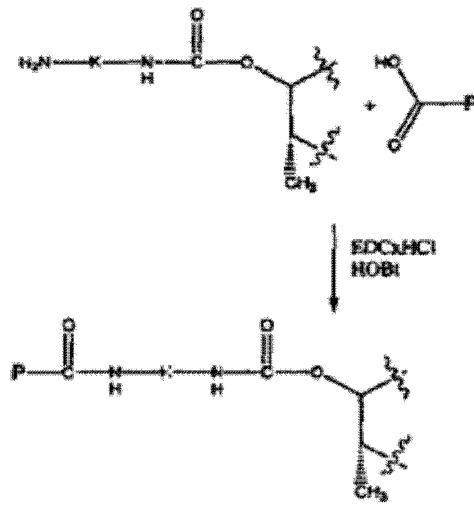


La subunidad P derivada (esto es, P-C(O)-NH-K-NH<sub>2</sub>) se puede formar haciendo reaccionar una amina apropiada (que tiene el grupo de enlace -K-NH<sub>2</sub>) con un grupo de ácido carboxílico de una subunidad P.

10 c) Los compuestos representados por la fórmula I, en la que X<sup>1</sup> es -OC(O)NH- y X<sup>2</sup> es -NH-, se pueden preparar haciendo reaccionar una subunidad de macrólido y una subunidad P derivada que tiene un grupo amino libre como se muestra a continuación.

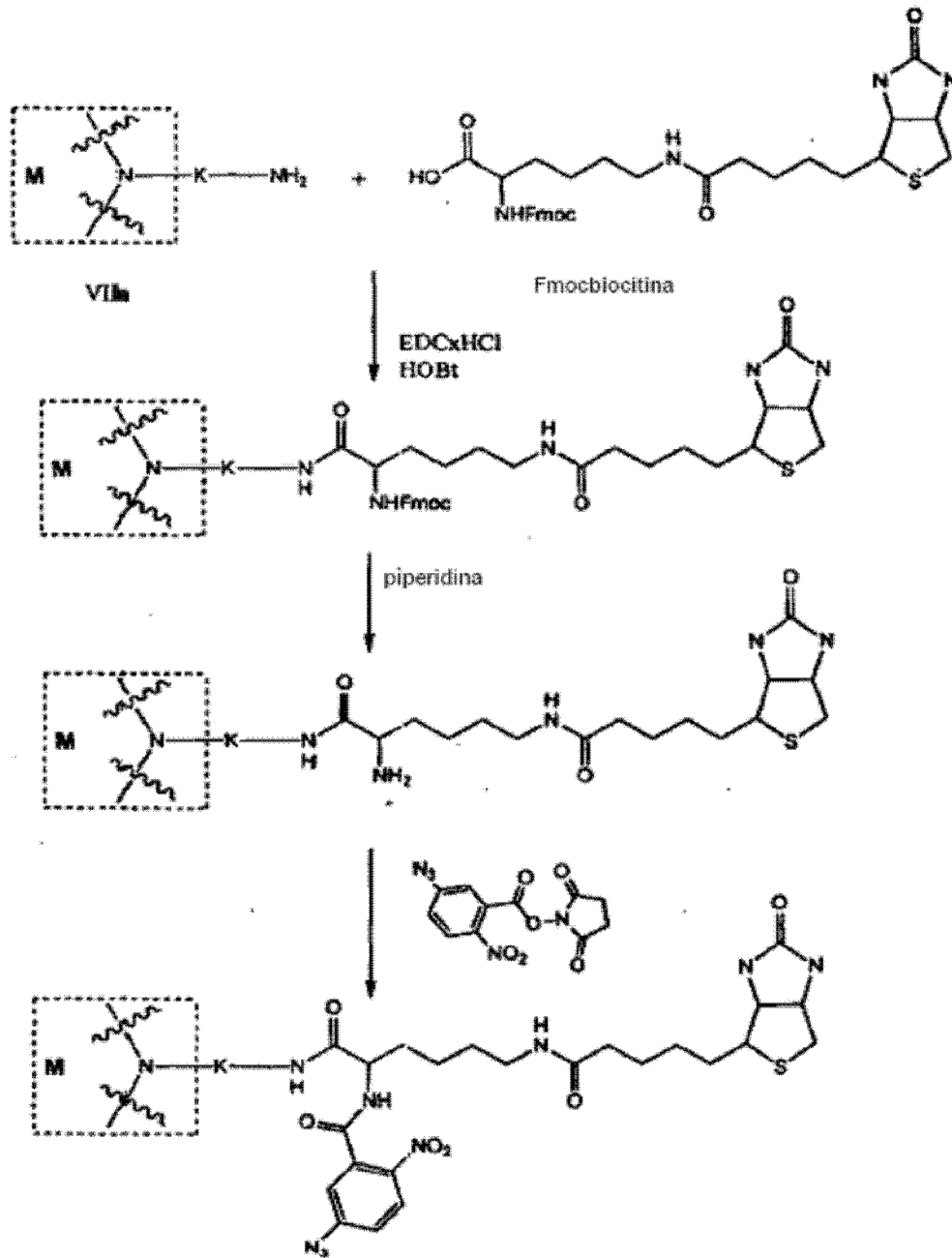


15 d) Los compuestos representados por la fórmula I, en la que X<sup>1</sup> es -OC(O)NH- y X<sup>2</sup> es -NH-, se pueden preparar haciendo reaccionar una subunidad de macrólido y una subunidad P derivada que tiene un grupo amino libre como se muestra a continuación.



Los compuestos representados por la fórmula I (grupo M-biotin- foto-afinidad) se pueden preparar también haciendo reaccionar una subunidad de macrólido VIIa y Fmocbiotina como se muestra a continuación.





La Fmocbiocitina (N $\alpha$ -Fmoc-N $\epsilon$ -biotinil-L-lisina) y el éster de ácido 5-azido-2-nitrobenzoico y N-hidroxisuccinimida están comercialmente disponibles (Fluka).

- 5 Adicionalmente, la cetona en la posición 9 se puede modificar por hidrocloreuro de hidroxilamina para obtener la oxima y después se puede reducir a amina.

#### Objetivos

Los compuestos de esta invención se usan para la identificación de proteínas diana, esto es proteínas, péptidos o polipéptidos que interactúan con estos compuestos. Es sabido que la identificación de la diana se puede llevar a cabo utilizando los siguientes métodos.

- 10 Uno de los métodos es la presentación en superficie de fagos (*phage display*). En este método, se incuban los polipéptidos aleatorios, los bancos de cDNA o de fragmentos génicos que expresan las partículas de fagos en su

superficie con un compuesto inmovilizado o soluble. Se rescatan los fagos individuales mediante la interacción de la proteína o polipéptido con el compuesto y se identifican las proteínas mediante las secuencias de DNA que las codifican. Se utiliza una marca de biotina o iminobiotina en este método para la inmovilización de los compuestos sobre un soporte sólido por ejemplo placas de 96 pocillos recubiertas por estreptavidina o perlas magnéticas, o para la captura en solución del complejo formado fago-compuesto sobre el soporte sólido recubierto con estreptavidina.

Otro método utiliza los métodos basados en afinidad. Se deja que los compuestos marcados con biotina o iminobiotina se unan a sus proteínas dianas procedentes de varias fuentes, por ejemplo de lisados de células, plasma, orina etc. Esto se puede hacer en solución, (esto es, mezclando los compuestos marcados con biotina o iminobiotina con el lisado, el plasma, la orina, etc.) o mezclando una matriz sólida que contiene estreptavidina que tiene el compuesto marcado con biotina o iminobiotina inmovilizado sobre la superficie con la solución, el plasma, la orina etc.

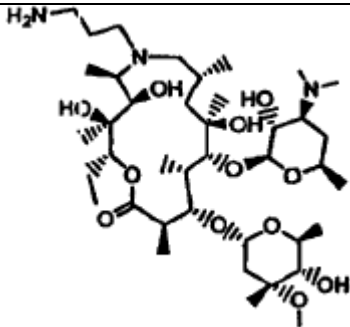
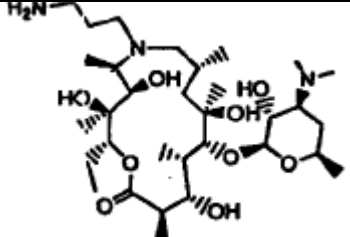
La especificidad de unión a la diana se mejora por derivación de los compuestos con un grupo fotorreactivo, por ejemplo una aril-azida. En este método, en adición a la unión por afinidad, el compuesto se une covalentemente a la proteína diana mediante la estimulación del grupo foto-activado con radiación electromagnética. Para los complejos formados en solución, se añade entonces la matriz, que contiene estreptavidina, al complejo unido covalentemente.

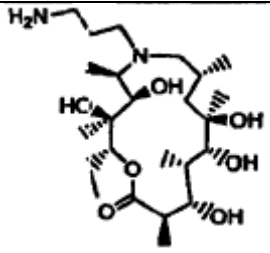
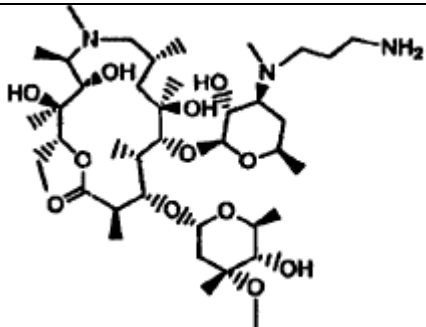
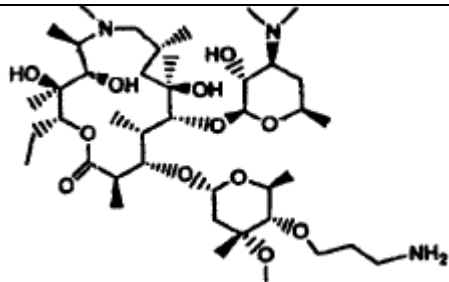
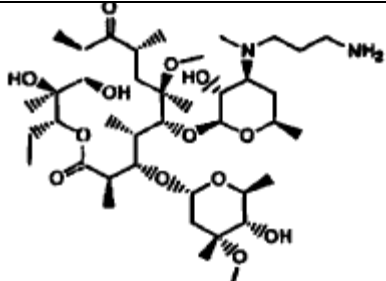
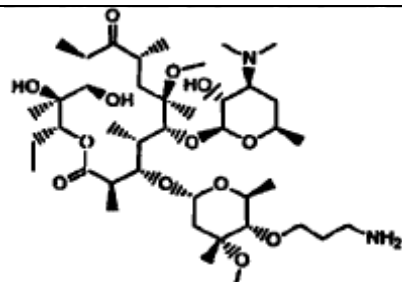
Los complejos compuesto-proteína se aíslan entonces usando la marca de biotina o iminobiotina unida a la matriz sólida que contiene estreptavidina. Las proteínas aisladas se identifican, por ejemplo, por espectrometría de masas.

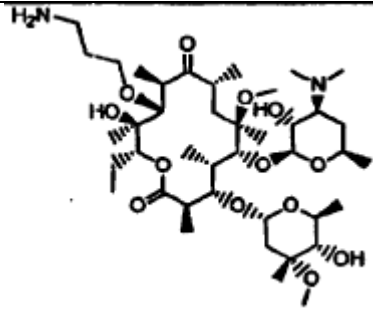
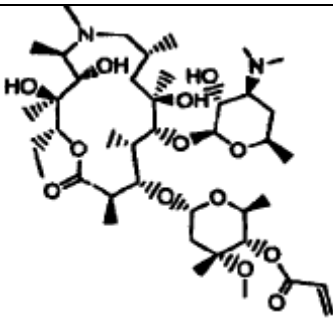
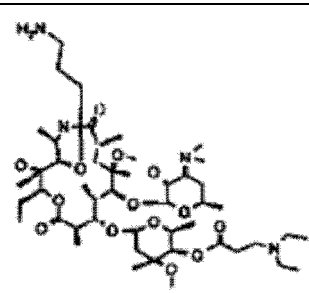
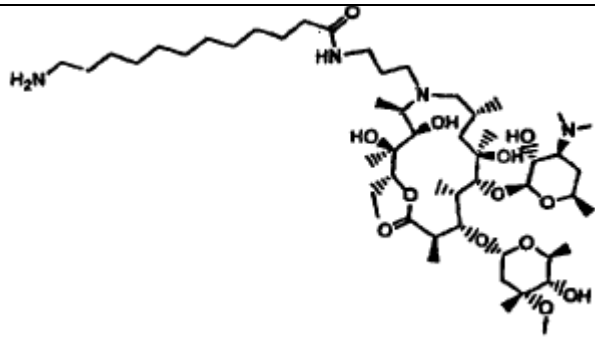
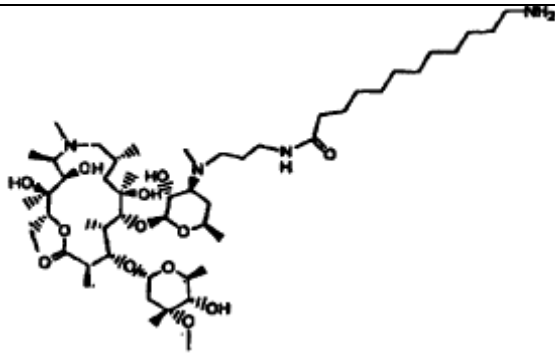
La presente invención es particularmente útil puesto que las proteínas aglutinantes no se disociarán del resto macrólido durante la etapa de lavado, incluso cuando las interacciones macrólido-proteína sean relativamente débiles. Esta ventaja es debida al enlace covalente entre el grupo de foto-afinidad y las moléculas de macrólido (sondas) que evita la disociación de las dianas (proteínas) durante la etapa de lavado. Este método presenta una base para la identificación de todas las dianas, independientemente de su afinidad de unión (constante).

Los compuestos, procedimiento y método de la presente invención se entenderán mejor en conexión con los siguientes ejemplos, que se pretende sirvan solamente de ilustración y que no sean limitantes del alcance de la invención. Diferentes cambios y modificaciones de las realizaciones descritas quedarán claros para los expertos en la técnica y tales cambios y modificaciones incluyendo, sin limitación, los relativos a las estructuras químicas, sustituyentes, formulaciones derivadas y/o métodos de la invención, se pueden llevar a cabo sin separarse del espíritu de la invención ni del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

PARTE EXPERIMENTAL

Macrólido	Estructura
M1	 <p>The chemical structure of macrolide M1 is a 14-membered ring lactone with a 3-aminopropyl group attached to the ring. It features several hydroxyl groups and a methyl group on the ring, and is linked to a 2,6-dideoxy-3,4-dihydroxy-5-O-methyl-beta-D-ribofuranose sugar moiety.</p>
M2	 <p>The chemical structure of macrolide M2 is identical to M1, showing a 14-membered ring lactone with a 3-aminopropyl group, multiple hydroxyl groups, a methyl group, and a 2,6-dideoxy-3,4-dihydroxy-5-O-methyl-beta-D-ribofuranose sugar moiety.</p>

<p>M3</p>	
<p>M4</p>	
<p>M5</p>	
<p>M6</p>	
<p>M7</p>	

<p>M8</p>	
<p>M9</p>	
<p>M10</p>	
<p>M11</p>	
<p>M12</p>	

Las aminas de azitromicina M1 y M2 se pueden preparar por el procedimiento descrito en la solicitud de patente internacional WO 02/055531 A1. La amina M3 se puede preparar por el procedimiento descrito en la solicitud de patente internacional WO 2004/09449 A1. Las aminas M4 y M6 se pueden preparar por el procedimiento descrito en la solicitud de patente internacional WO 2004/005310 A2.

5 Las aminas M5, M7 y M10 se pueden preparar por el mismo procedimiento por el que fueron preparadas en la solicitud provisional de Estados Unidos 60/643.841. Más particularmente, la M5 se puede preparar agitando una solución de 2'-O-acetil-11-O-metil-azitromicina en acrilonitrilo con t-BuOH y NaH bajo nitrógeno a 0 °C durante 1 hora. Se evapora el acrilonitrilo y el residuo se disuelve en DCM y se extrae con agua. La capa orgánica se filtra, se seca, y se disuelve en HOAc glacial con PtO<sub>2</sub>. La mezcla de reacción se hidrogena en un aparato de Parr, se eliminan el disolvente y el catalizador, y el compuesto se extrae, se seca, y se disuelve en MeOH. Se obtiene el producto después de agitar la mezcla a 50 °C durante 18 horas y evaporar el MeOH.

10 Para obtener la M7, se hace reaccionar una solución que contiene 9-O-(1-isopropoxiciclohexil)oxima de 11,12-carbonato-11,12-didesoxi-2'-O-acetil-6-O-metileritromicina A en condiciones similares a las descritas para M5, excepto que (a) el residuo se disuelve en acetato de etilo en lugar de DCM, y (b) el producto obtenido se mezcla con CHOOH y Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, y se disuelve en EtOH/H<sub>2</sub>O. La mezcla de reacción se calienta hasta 80 °C y se agita. Después de evaporación del disolvente, dilución, ajuste de pH, extracción de la capa orgánica, secado, y purificación, se obtiene el compuesto M7.

15 Para obtener el macrólido M10, se añade dietilamina a una solución del compuesto 2'-O-acetil-4"-O-propenil-6-O-metil-9a-aza-9a-homoeritromicina A (preparado según el documento WO 03/042228) en metanol seco. Se agita la mezcla de reacción durante la noche a 40 °C. Se mezcla el producto en acrilonitrilo y se mantiene a reflujo durante la noche. Después de desprotección del grupo 2'-O-acetilo se disuelve el intermedio en ácido acético glacial en presencia de PtO<sub>2</sub> y se agita en atmósfera de hidrógeno durante la noche. Por filtración, evaporación, y purificación se obtiene el producto M10.

20 El compuesto M9 se puede preparar según el procedimiento descrito en la solicitud de patente internacional WO 03/042228 A1.

**Ejemplo 1: Compuesto de referencia 1:**

30 A una suspensión de biotina (70 mg, 0,29 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco (5 mL) bajo argón, se añadieron trietilamina (0,380 mL, 2,73 mmol), 1-hidroxibenzotriazol (80 mg, 0,59 mmol), amina M1 (230 mg, 0,29 mmol) e hidrocloreuro de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etil-carbodiimida (235 mg, 1,23 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente en corriente de argón durante 24 horas y después se evaporó hasta un volumen más pequeño y se purificó en una columna de gel de sílice (eluyente: CHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>OH:NH<sub>4</sub>OH=6:1:0,1) obteniéndose el compuesto de referencia 1 (166 mg).

MS (m/z): 1018,40 [MH]<sup>+</sup>.

**Ejemplo 2: Compuesto de referencia 2:**

35 El compuesto de referencia 2 se prepara partiendo de la amina M1 y 2-iminobiotina según el procedimiento descrito en el Ejemplo 1.

**Ejemplo 3: Compuesto 3:**

40 A una solución de Sulfo-SBED (sulfosuccinimidil-2-[6-(biotinamido)-2-(p-azidobenzamido)hexanoamido]etil-1,3'-ditiopropionato (10 mg, 0,011 mmol), obtenido de PIERCE, Rockford, IL, USA) en DMF seca (500 µL) se añadió la amina M1 (9 mg, 0,011 mmol) y se agitó en la oscuridad a temperatura ambiente durante dos horas. Se concentró entonces la mezcla a presión reducida. Se purificó el residuo por cromatografía en columna (eluyente: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH:NH<sub>4</sub>OH = 6/1/0,1), obteniéndose el compuesto 3 (12 mg). MS (m/z): 1454,60 [MH]<sup>+</sup>.

**Ejemplo 4: Compuesto 4:**

45 El compuesto 4 (12,84 mg) se preparó partiendo de la amina M5 (9,7 mg, 0,011 mmol) según el procedimiento descrito en el Ejemplo 3.

MS (m/z): 1468,34 [MH]<sup>+</sup>.

**Ejemplo 5: Compuesto de referencia 5:**

El compuesto de referencia 5 se prepara partiendo del macrólido M9. Se mezcla el macrólido con 5-(biotinamido)pentilamina en metanol y se deja reaccionar a 55 °C durante la noche. Se concentra entonces la mezcla

a presión reducida. Se purifica el residuo por cromatografía en columna (eluyente: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH:NH<sub>4</sub>OH = 6/1/0,1) obteniéndose el compuesto de referencia 5.

**Ejemplo 6: Compuesto 6:**

El compuesto 6 se prepara partiendo de la amina M10 según el procedimiento descrito en el Ejemplo 3.

5 **Ejemplo 7: Compuesto 7:**

El compuesto 7 se prepara partiendo de la amina M2 según el procedimiento descrito en el Ejemplo 3.

**Ejemplo 8: Compuesto 8:**

El compuesto 8 se prepara partiendo de la amina M3 según el procedimiento descrito en el Ejemplo 3.

**Ejemplo 9: Compuesto 9:**

10 El compuesto 9 (9,55 mg) se preparó partiendo de la amina M4 (9 mg, 0,011 mol) según el procedimiento descrito en el Ejemplo 3.

MS (m/z): 1455,32 [MH]<sup>+</sup>.

**Ejemplo 10: Compuesto 10:**

15 El compuesto 10 (7,19 mg) se preparó partiendo de la amina M6 (9 mg, 0,011 mmol) según el procedimiento descrito en el Ejemplo 3.

MS (m/z): 1455,37 [MH]<sup>+</sup>.

**Ejemplo 11: Compuesto de referencia 11:**

Amina M11

20 A una suspensión de ácido 12-(Fmoc-amino)dodecanoico (254 mg, 0,058 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco (5 mL) bajo argón, se añadieron trietilamina (0,760 mL), 1-hidroxibenzotriazol (160 mg), M1 (460 mg, 0,058 mmol) e hidrocloreto de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etil-carbodiimida (470 mg). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 24 horas y después se evaporó hasta un volumen más pequeño y se purificó sobre una columna de gel de sílice (eluyente: CHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>OH:NH<sub>4</sub>OH=6:1:0,1). Se disolvió el compuesto protegido con Fmoc (137 mg) en acetato de etilo (5 mL), se añadió piperidina (2 mL) y la mezcla de reacción resultante se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas y después se concentró a presión reducida obteniéndose la amina M11 (140 mg).

Compuesto de referencia 11

El compuesto de referencia 11 (23 mg) se preparó partiendo de la amina M11 (100 mg) según el procedimiento descrito en el Ejemplo de referencia 1.

MS (m/z): 1215,42 [MH]<sup>+</sup>.

30 **Ejemplo 12: Compuesto de referencia 12:**

Amina M12

La amina M12 (299 mg) se preparó partiendo de la amina M4 según el procedimiento seguido para la amina M11 del Ejemplo de referencia 11.

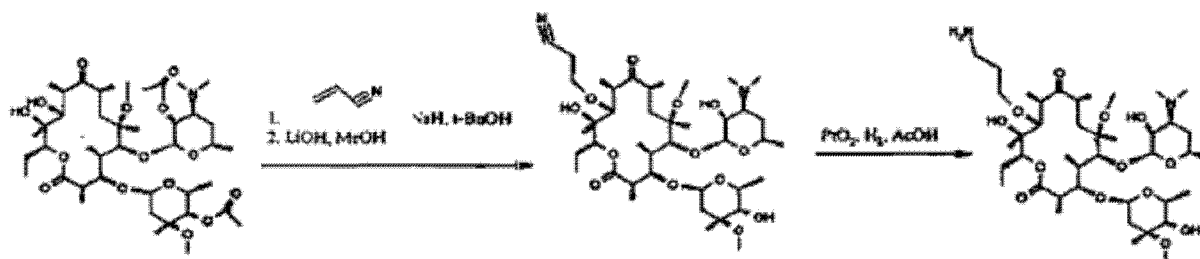
Compuesto de referencia 12

35 El compuesto de referencia 12 (36 mg) se preparó partiendo de la amina M12 (150 mg) según el procedimiento descrito en el Ejemplo de referencia 1.

MS (m/z): 1215,87 [MH]<sup>+</sup>.

**Ejemplo 13: Compuesto 13:**

Amina M8



## Etapa 1: 11-cianoetoxi-claritromicina

Se disolvió 2',4''-O-di-acetil-claritromicina (1,24 g, 1,49 mmol) en acrilonitrilo (29,5 ml) y se agitó a temperatura ambiente. Se añadió *tert*-butanol (0,14 ml), se enfrió la solución a 0 °C, después se añadió NaH (0,06 g, 2,50 mmol) y se agitó la reacción durante 24 horas a temperatura ambiente. Una vez que se hubo completado la reacción se evaporó el acrilonitrilo a presión reducida. Se añadieron agua (20 ml) y diclorometano (20 ml) y se separaron las capas. Se extrajo la capa orgánica con solución acuosa saturada de NaHCO<sub>3</sub>, agua y salmuera. Se secó la capa orgánica sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y se evaporó el disolvente a presión reducida para dar la ciano-claritromicina protegida con di-acetilo (1,85 g) que después de desprotección en metanol con LiOH dio la 11-cianoetoxi-claritromicina (1,04 g).

MS: m/z = 801,4 [M+H]<sup>+</sup>.

## Etapa 2: Amina M8

El compuesto obtenido en la etapa 1 (0,26 g, 0,32 mmol) se disolvió en ácido acético glacial (15 ml) a temperatura ambiente y se añadió óxido de platino (IV) (0,1 g, 0,44 mmol). La mezcla de reacción se hidrogenó a una presión de 4,5 bares durante 5 horas, se separó el catalizador por filtración y se concentró el filtrado a vacío para dar el producto crudo. Después se añadieron diclorometano y agua al producto crudo. Se realizó un gradiente de extracción a 7,6 y 9,5, y después de evaporación de la capa orgánica obtenida a pH 9,5, se obtuvo la amina M8 (0,62 g).

MS: m/z = 805,7 [M+H]<sup>+</sup>.

## 20 Compuesto 13

El compuesto 13 (8,16 mg) se preparó partiendo de la amina M8 (9 mg, 0,011 mmol) según el procedimiento descrito en el Ejemplo 3.

MS (m/z): 1467,80 [MH]<sup>+</sup>.

## Ejemplo 14: Compuesto 14:

25 El compuesto 14 (5,65 mg) se preparó partiendo de la amina M7 (9 mg, 0,011 mmol) según el procedimiento descrito en el Ejemplo 3.

MS (m/z): 1467,60 [MH]<sup>+</sup>.

## Ejemplo 15

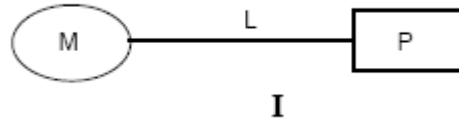
30 El compuesto del Ejemplo 9 (1 mM) se disolvió en dimetilsulfóxido (20 μL) (Kemika, Croatia) y se incubó con suero humano (obtenido de la sangre venosa de un voluntario sano) durante 60 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Después, se irradió la mezcla con luz ultravioleta (365 nm) durante 15 minutos en una cabina de análisis ultravioleta Spectroline CX-20 (Spectronics, USA) y se incubó después durante la noche con la matriz de estreptavidina-sefarosa (Amersham Biosciences, Sweden) a 4 °C. Se lavó la matriz con tampón de fosfato, pH 7,5 (20 mM), que contenía NaCl (150 mM) y se centrifugó brevemente para separar la fracción de proteína no unida. Se repitió el procedimiento tres veces. Se eluyó de la matriz el compuesto 9 unido covalentemente a las proteínas con hidrocloreuro de guanidina, pH 1,5 (8 M). Después, se precipitaron las proteínas usando el kit de precipitación de proteínas ProteoExtract (Calbiochem, USA) y se separaron por electroforesis sobre gel de poli-acrilamida-SDS. Se detectó la α<sub>1</sub>-glicoproteína ácida por transferencia Western usando anticuerpos monoclonales (Sigma, USA) (Véase la Figura 1).

Esto confirma que la  $\alpha_1$ -glicoproteína ácida del suero humano es una de las proteínas que se unen al compuesto 9. Similarmente, este método se puede utilizar para identificar las proteínas que interactúan con los compuestos de la presente invención.



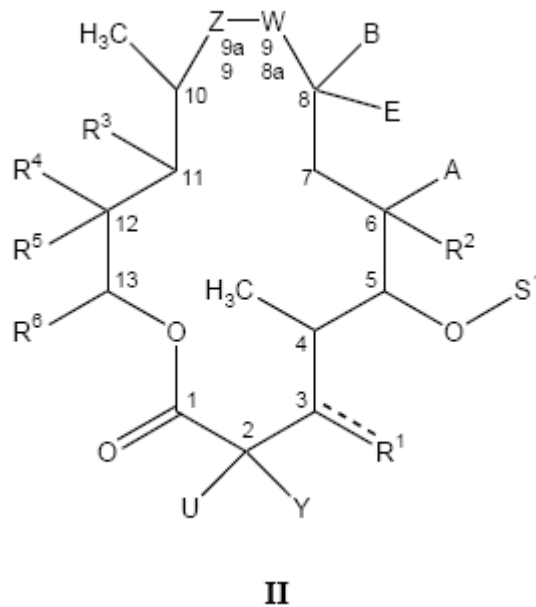
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto según la fórmula I:



en la que

5 M representa una subunidad de macrólido de la subestructura II:



en la que

(i) Z y W son independientemente  $>C=O$ ,  $>CH_2$ ,  $>CH-NR_tR_s$ ,  $>NR_N$ ,  $>C=NR_M$ , o un enlace, donde  $R_t$  y  $R_s$  son independientemente H o alquilo;

10  $R_M$  es OH,  $OR^P$ , alcoxi o alcoxi sustituido;

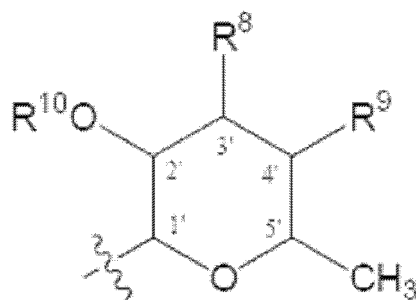
$R_N$  es H,  $R^P$ , alquilo, alqueno, alquino, alcoxi, alcoxialquilo, o  $-C(=X)-NR_tR_s$ ; y X es O o S;

con la condición de que Z y W no pueden ser ambos simultáneamente  $>C=O$ ,  $>CH-NR_tR_s$ ,  $>CH_2$ ,  $>NR_N$ ,  $>C=NR_M$ , ni un enlace,

15 (ii) U e Y son independientemente H, halógeno, alquilo, o hidroxialquilo;

(iii)  $R^1$  es hidroxilo,  $OR^P$ ,  $-O-S^2$ , o  $=O$ ;

(iv)  $S^1$  es H o un resto de azúcar en la posición C/5 de la fórmula:



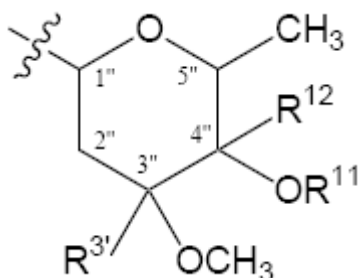
en la que

$R^8$  y  $R^9$  son ambos hidrógeno o forman juntos un enlace, o  $R^9$  es hidrógeno y  $R^8$  es  $-N(CH_3)R^y$ , en la que

5  $R^y$  es  $R^p$ ,  $R^z$  o  $-C(O)R^z$ , donde  $R^z$  es hidrógeno, cicloalquilo, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo o heteroarilo, o un alquilo sustituido con alquilo  $C_2-C_7$ , alquenilo  $C_2-C_7$ , alquinilo  $C_2-C_7$ , arilo o heteroarilo;

$R^{10}$  es hidrógeno o  $R^p$ ;

(v)  $S^2$  es un resto de azúcar de la fórmula



10 en la que  $R^{3'}$  es H o metilo y  $R^{11}$  es hidrógeno,  $R^p$ ,  $-C(O)(CH_2)_qNR^4R^6$ , o  $O-R^{11}$  es un grupo que con  $R^{12}$  y con el átomo de carbono C/4'' forma un grupo  $>C=O$  o epoxi;  $R^{12}$  es hidrógeno o un grupo que con  $O-R^{11}$  y con el átomo de carbono C/4'' forma un grupo  $>C=O$  o epoxi,

donde q es un número entero de 1 a 6;

(vi)  $R^2$  es H, hidroxilo, grupo  $OR^p$ , alcoxi o alcoxi sustituido;

(vii) A es H o metilo;

15 (viii) B es metilo o epoxi;

(ix) E es H o halógeno;

(x)  $R^3$  es hidroxilo, grupo  $OR^p$ , alcoxi o alcoxi sustituido o  $R^3$  es un grupo que se puede combinar con  $R^5$  para formar un "puente" o si W o Z es  $>NR_N$ ,  $R^3$  es un grupo que se puede combinar con W o Z para formar un "puente";

(xi)  $R^4$  es alquilo  $C_1-C_4$ ;

20 (xii)  $R^5$  es H, hidroxilo, grupo  $OR^p$ , alcoxi  $C_1-C_4$ , alcoxi sustituido o un grupo que se puede combinar con  $R^3$  para formar un puente;

(xiii)  $R^6$  es H o alquilo  $C_1-C_4$ ;

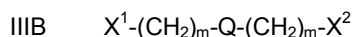
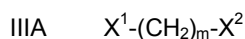
(xiv)  $R^p$  es un grupo protector seleccionado de alquilo, alcanilo, alcoxicarbonilo, arilmetoxicarbonilo, aroilo, arilalquilo, alquilsililo y alquilsililalcoxi alquilo;

25 donde la subunidad M tiene un sitio de unión a través del cual se une a la subunidad P mediante el grupo de enlace L, la unión de L al resto macrolido es a través de cualquiera de:

a. el átomo de nitrógeno del anillo en la posición 9a,

- b. el grupo hidroxilo en la posición 11 o en la posición 6,
- c. el grupo 2' hidroxilo o el grupo 3' amino del resto de azúcar desosamina,
- d. el grupo 4" hidroxilo del azúcar cladinosa, o
- e. si el resto M es aglicona o falta uno de los grupos de azúcar desosamina y cladinosa, a través del grupo OH creado en la posición 5 o 3 del anillo del macrólido;

L es una molécula de enlace representada por la fórmula IIIA o IIIB:



en las que

10  $\text{X}^1$  se selecciona de:  $-\text{CH}_2$ ,  $-\text{CH}_2\text{-NH-}$ ,  $-\text{C(O)-}$ ,  $-\text{OC(O)-}$ ,  $=\text{N-O-}$ ,  $-\text{OC(O)NH-}$  o  $-\text{C(O)NH-}$ ;

$\text{X}^2$  se selecciona de:  $-\text{NH-}$ ,  $-\text{CH}_2$ ,  $-\text{NHC(O)-}$ ,  $-\text{C(=O)-}$ ,  $-\text{O-}$  o  $-\text{OC(O)-}$ ;

Q es  $-\text{NH-}$ ,  $-\text{CH}_2$  o  $-\text{S-S-}$ ;

donde cada grupo  $-\text{CH}_2$  o  $-\text{NH-}$  está opcionalmente sustituido con alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_7$ , alqueno  $\text{C}_2\text{-C}_7$ , alquino  $\text{C}_2\text{-C}_7$ ,  $\text{C(O)R}^x$ ,  $\text{C(O)OR}^x$ ,  $\text{C(O)NHR}^x$  donde  $\text{R}^x$  puede ser alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_7$ , arilo o heteroarilo;

15 los símbolos m y n son independientemente un número entero de 0 a 8

con la condición de que si  $\text{Q}=\text{NH}$ , n no puede ser cero;

P representa una subunidad que contiene biotina y un grupo de foto-afinidad o iminobiotina y un grupo de foto-afinidad;

donde

20 el grupo de foto-afinidad. es arilazida, fenilazida, fluorofenilazida, nitrofluorofenilazida, para-azidoanilina, para-azidobenzoino, arildiazirina, diazocetona o benzofenona;

o una de sus sales o solvatos;

25 alquilo representa un radical hidrocarburo monovalente, saturado, lineal o ramificado, de uno a diez átomos de carbono, insustituido o sustituido con uno hasta cinco sustituyentes seleccionados de halógeno, hidroxilo, alcoxi, acilo, acilamino, ciano, amino, N-(alquil  $\text{C}_1\text{-C}_4$ )amino, N,N-di(alquil  $\text{C}_1\text{-C}_4$ )amino, arilo, heteroarilo, tiocarbonilamino, aciloxi, amidino, alquilamidino, tioamidino, aminoacilo, aminocarbonilamino, aminotiocarbonilamino, aminocarboniloxi, ariloxi, ariloxiarilo, nitro, carboxilo, carboxilalquilo, carboxil-alquilo sustituido, carboxil-cicloalquilo, carboxil-cicloalquilo sustituido, carboxilarilo, carboxil-arilo sustituido, carboxilheteroarilo, carboxil-heteroarilo sustituido, carboxilheterocíclico, carboxil-heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalcoxi, heteroariloxi, heterocicloxi, y oxicarbonilamino, donde el término alquilo tiene el significado definido anteriormente en todos los otros grupos sustituyentes;

30 alqueno representa un radical hidrocarburo monovalente lineal o ramificado de dos a diez átomos de carbono que tiene al menos un doble enlace carbono-carbono, insustituido o sustituido con los mismos grupos que se han definido antes para el grupo alquilo;

35 alquino representa un radical hidrocarburo monovalente lineal o ramificado, que tiene una cadena lineal o una cadena ramificada de dos a diez átomos de carbono y que contiene de uno a tres triples enlaces carbono-carbono, insustituido o sustituido con los mismos grupos que se han definido antes para el grupo alquilo;

40 cicloalquilo representa un grupo cíclico que tiene tres a ocho átomos de carbono que tiene un único anillo opcionalmente condensado con un grupo arilo o heteroarilo, u opcionalmente condensado con un anillo saturado, el cicloalquilo está insustituido o sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados de halógeno, hidroxilo, alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_7$ , alcoxi  $\text{C}_1\text{-C}_7$ , ariloxi  $\text{C}_1\text{-C}_7$ , alquil  $\text{C}_1\text{-C}_7$ -tio, ariltio, alquilsulfonilo, ciano, amino primario, amino no primario, haloalquilo y alquilamino;

45 arilo representa un grupo carbocíclico aromático insaturado que tiene 6-14 átomos de carbono que tiene un único anillo o múltiples anillos condensados, opcionalmente condensado además con un grupo alifático o arilo, el arilo está insustituido o sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados de halógeno, hidroxilo, alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_7$ , alcoxi  $\text{C}_1\text{-C}_7$ ,

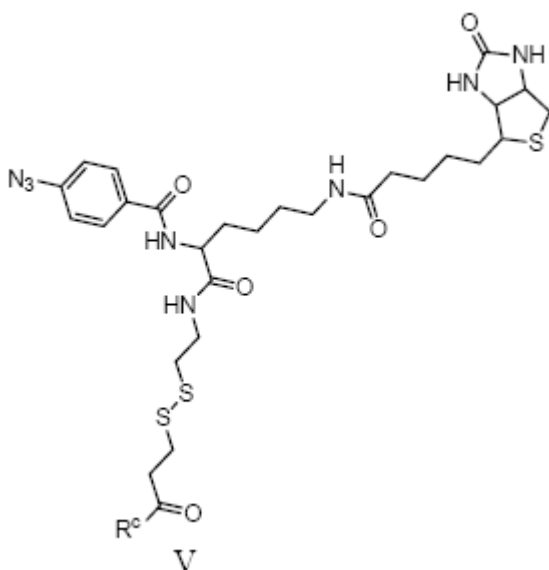
ariloxi C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>, alquil C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>-tio, ariltio, alquilsulfonilo, ciano, amino primario, amino no primario, haloalquilo y alquilamino;

5 heteroarilo representa un anillo hidrocarburo aromático monocíclico o bicíclico que tiene de 2 a 10 átomos de carbono y de 1 a 4 heteroátomos seleccionados de O, S o N, opcionalmente condensado con otro heteroarilo, arilo o grupo cíclico alifático, el heteroarilo está insustituido o sustituido con los mismos sustituyentes definidos antes para el grupo arilo; y

10 heterocíclico representa un grupo saturado o insaturado que tiene un único anillo o múltiples anillos y de 1 a 10 átomos de carbono y de 1 a 4 heteroátomos seleccionados de N, S y O, en el que en un sistema de anillos condensados el otro anillo o anillos pueden ser arilo o heteroarilo, el grupo heterocíclico está insustituido o sustituido como se ha especificado antes para el grupo arilo.

2. Un compuesto según la reivindicación 1, en el que el grupo de foto-afinidad es arilazida.

3. Un compuesto según la reivindicación 1, en el que P se representa por la subestructura V:



en la que

15 R<sup>C</sup> es el enlace covalente con X<sup>2</sup> de la cadena L.

4. Un compuesto según la reivindicación 1, que tiene las siguientes características de (i) a (x):

(i) Z y W son independientemente >C=O; >CH<sub>2</sub>; >CH-NR<sub>t</sub>R<sub>s</sub> donde R<sub>t</sub> y R<sub>s</sub> son independientemente H o metilo; >NR<sub>N</sub> donde R<sub>N</sub> es H, R<sup>P</sup> o alquilo; >C=NR<sub>M</sub>; o un enlace;

(ii) U e Y son independientemente H, metilo o hidroximetilo;

20 (iii) R<sup>9</sup> es hidrógeno y R<sup>8</sup> es -N(CH<sub>3</sub>)R<sup>y</sup>, donde R<sup>y</sup> es R<sup>P</sup>, R<sup>Z</sup> o -C(O)R<sup>Z</sup>, donde R<sup>Z</sup> es hidrógeno o ciclohexilo, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>7</sub>, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>7</sub>, arilo o heteroarilo o alquilo sustituido con alquilo C<sub>2</sub>-C<sub>7</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>7</sub>, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>7</sub>, arilo o heteroarilo;

(iv) R<sup>2</sup> es alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>;

(v) E es H o flúor;

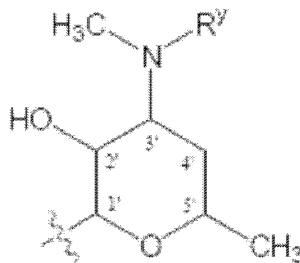
25 (vi) R<sup>3</sup> es hidroxilo, grupo OR<sup>P</sup>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>;

(vii) R<sup>4</sup> es un metilo;

(viii) R<sup>5</sup> es metilo o etilo;

(ix) al menos un  $R^P$  está presente y  $R^P$  representa un grupo protector seleccionado de metilo, acetilo, metoxicarbonilo o *tert*-butoxicarbonilo, benciloxicarbonilo, benzoilo, bencilo, trimetilsililo, o trimetilsililetoximetilo;

(x)  $R^1$  es hidroxilo y  $S^1$  es un resto azúcar de la fórmula:



5 en la que  $R^y$  es como se ha definido previamente.

5. Un compuesto según la reivindicación 1, que tiene las siguientes características de (i) a (x):

(i) Z y W son independientemente  $>C=O$ ;  $>CH_2$ ;  $>CH-NR_tR_s$  donde  $R_t$  y  $R_s$  son independientemente H o metilo;  $>NR_N$  donde  $R_N$  es H,  $R^P$  o alquilo;  $>C=NR_M$ ; o un enlace;

(ii) U e Y son independientemente H, metilo o hidroximetilo;

10 (iii)  $R^9$  es hidrógeno y  $R^8$  es  $-N(CH_3)R^y$ , donde  $R^y$  es  $R^P$ ,  $R^Z$  o  $-C(O)R^Z$ , donde  $R^Z$  es hidrógeno o ciclohexilo, alquilo  $C_1-C_7$ , alquenilo  $C_2-C_7$ , alquinilo  $C_2-C_7$ , arilo o heteroarilo o alquilo sustituido con alquilo  $C_2-C_7$ , alquenilo  $C_2-C_7$ , alquinilo  $C_2-C_7$ , arilo o heteroarilo;

(iv)  $R^2$  es alcoxi  $C_1-C_4$ ;

(v) E es H o flúor;

15 (vi)  $R^3$  es hidroxilo, grupo  $OR^P$ , alcoxi  $C_1-C_4$ ;

(vii)  $R^4$  es un metilo;

(viii)  $R^5$  es metilo o etilo;

(ix) al menos un  $R^P$  está presente y  $R^P$  representa un grupo protector seleccionado de metilo, acetilo, metoxicarbonilo o *tert*-butoxicarbonilo, benciloxicarbonilo, benzoilo, bencilo, trimetilsililo, o trimetilsililetoximetilo;

20 (x)  $S^1$  es hidrógeno y  $R^1$  es hidroxilo.

6. Un método para identificar una sustancia seleccionada del grupo de proteínas, péptidos o polipéptidos que tienen afinidad de unión para los macrólidos, que comprende:

poner en contacto una muestra que potencialmente contiene dicha sustancia con un compuesto según la reivindicación 1, en condiciones que permitan que dicho compuesto se una a dicha sustancia;

25 activar el grupo de foto-afinidad; y

determinar si dicho compuesto se une con dicha sustancia mediante la evaluación de la fuerza de la señal por comparación con el umbral o con un estándar pre-establecido.

Figura 1A

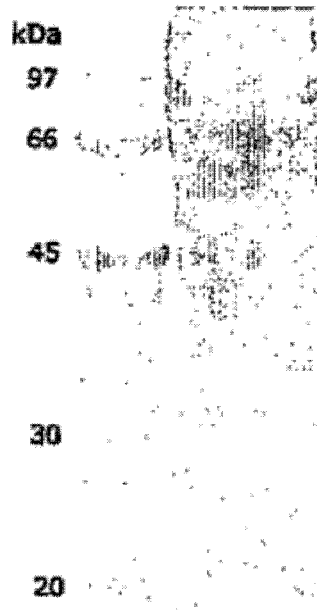


Figura 1B

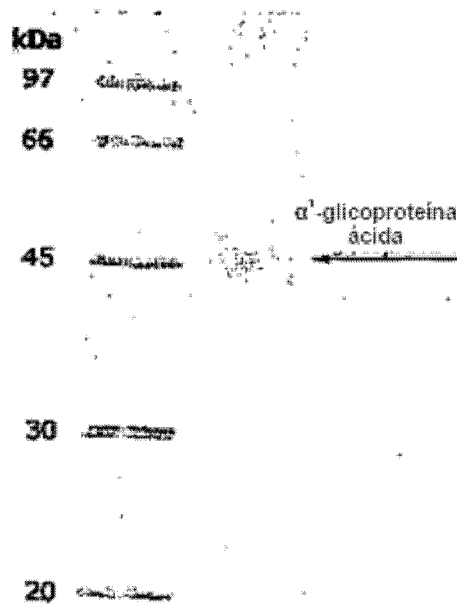


Figura 1