

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 584 381**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)

C07D 487/04 (2006.01)

C07D 491/22 (2006.01)

A61K 9/08 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.05.2011 E 11778384 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.06.2016 EP 2566335**

54 Título: **Liberación controlada de compuestos activos desde conjugados macromoleculares**

30 Prioridad:

05.05.2010 US 331738 P

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

27.09.2016

73 Titular/es:

**PROLYNX LLC (100.0%)
3912 Trust Way
Hayward, CA 94545, US**

72 Inventor/es:

**ASHLEY, GARY y
SANTI, DANIEL, V.**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Nuria

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 584 381 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

Liberación controlada de compuestos activos desde conjugados macromoleculares

5 Esta solicitud reivindica beneficio de prioridad de la solicitud provisional de Estados Unidos n.º de serie 61/331.738, presenta el 5 de mayo de 2010.

Campo técnico

10 La invención se refiere a conjugados macromoleculares entre vehículos macromoleculares y fármacos, que comprenden enlazadores que liberan el fármaco a través de reacciones controladas de eliminación beta.

Antecedentes

15 Las moléculas de fármaco se unen covalentemente a vehículos macromoleculares para potenciar las propiedades farmacéuticas, tales como vida media, estabilidad, solubilidad, tolerabilidad y seguridad. En un método, los restos de fármaco se acoplan a macromoléculas a través de un enlazador permanentes, pero este enfoque está limitado por al menos dos factores: 1) el enlazador debe fijarse al resto de fármaco en un sitio que no impida la actividad biológica y 2) los conjugados permanentes generalmente no pueden cruzar la membrana celular, de modo que el enfoque pues ser factible solamente dianas extracelulares de los fármacos.

25 En un segundo enfoque, los conjugados de fármaco-macromolécula unidos covalentemente emplean liberación controlada de fármacos o factores de crecimiento útiles en medicina. Por ejemplo, se han descrito composiciones y métodos para la liberación controlada de fármacos acoplados covalentemente a polietilenglicol (PEG). Este enfoque no requiere una diana extracelular de los fármacos, y el sitio de unión es preferiblemente uno que impide la actividad del fármaco, de modo que está algo enmascarado hasta que se libera del vehículo. Típicamente, para fármacos que contienen alcohol o fenol, el fármaco se fija al vehículo mediante un enlace éster o carbonato que puede hidrolizarse, habitualmente por una esterasa sérica. Ejemplos son PEG-camptotecina, PEG-SN38, PEG-irinotecán y PEG-docetaxel. Se han hecho adaptaciones para acomodar fármacos que contienen amina, mediante lo cual se conecta un resto de PEG mediante un éster escindible a un carbamato auto-inmolador. Esta tecnología se ha aplicado a péptidos y proteínas, así como a daunorrubicina, anfotericina, Ara-C y otras moléculas pequeñas. Sin embargo, las tasas de liberación de fármacos en estos casos son impredecibles y difíciles de ajustar, porque la actividad esterasa varía entre especies e individuos, y ciertos compartimentos son deficientes en esterasa (por ejemplo, áreas tópica, intraocular, intersticial).

35 En este documento, se describe un sistema de conjugado de fármaco que permite la liberación de fármacos a través de un mecanismo de eliminación beta, de tasa controlada.

40 El Weizmann Institute desarrolló un sistema en que se fija un vehículo proteico o polimérico a enlazadores tales como fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc) o su derivado 2-sulfo (Fms). Estos se describen en la patente de Estados Unidos 7.585.837. Estos enlazadores liberan fármacos mediante un mecanismo de eliminación beta no enzimático; sin embargo, el control ajustable sobre la tasa de liberación sigue siendo un problema con este sistema.

45 La publicación PCT WO2009/158668 describe conjugados de fármaco liberable a macromoléculas, donde la tasa de eliminación beta está controlada por un activador independiente de la propia macromolécula. Esto resuelve un problema que quedó sin resolver en la técnica anterior. La publicación PCT '668 proporciona enlazadores que son más directamente aplicables a fármacos que contienen amina básica, ya que los enlazadores se fijan a los fármacos mediante enlaces carbamato o tiocarbamato. Por tanto, existe una necesidad insatisfecha de nuevos enlazadores escindibles que permita la conjugación de fármacos que contienen alcohol, fenol, tiol, tiofenol y ciertos fármacos que contienen nitrógeno a vehículos macromoleculares, y que permitan la posterior liberación de estos fármacos a tasas controladas en condiciones fisiológicas. De forma notable, más del 50 % de los fármacos aprobados por la FDA por debajo de un peso molecular de 1200 tienen un grupo primario o secundario alifático hidroxilo, fenol o tiol, y aproximadamente el 8 % contiene un nitrógeno de sulfonamida, pirrol, o indol (véase DrugBank). La presente invención cumple esta necesidad proporcionando conjugados de fármaco-macromolécula unidos mediante N-oximetil, N-(amino heterocíclico)metil y N-tiometilcarbamatos que se pueden escindir por eliminación beta a tasas controladas para proporcionar los fármacos libres. Además, los enlazadores descritos en este documento liberan las moléculas de fármaco libre sin depender de la actividad o presencia de enzimas fisiológicas.

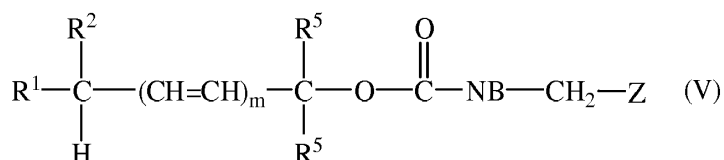
60 Bosslet K. et al., Cancer Research (1994) 54: 2151-2159 describe el profármaco, N-(4-β-glucuronil-3-nitrobenciloxicarbonil)-doxorubicina, a partir del cual se libera doxorubicina mediante fragmentación inducida por enzima. Farquhar D. et al., Cancer Chemother. Pharmacol. (2002) 50: 65-70 describe el profármaco antitumoral, N-[4"-β-D-galactopiranosil)-3"-nitrobenciloxicarbonil]daunorrubicina que se activa por la enzima β-galactosidasa. Rachel Madec-Lougerstay et al., J. Chem. Soc., Perkin Trans. (1999) 1: 1369-1375 describe la síntesis de espaciadores de glucurónido auto-inmolador basados en aminometilcarbamato y su aplicación a profármacos de 5-fluorouracilo (5-FU) para terapia de profármacos enzimáticos dirigidos por anticuerpos.

Aunque los N-alcoximetil, N-aciloximetil y N-tiometilcarbamatos simples se han presentado previamente como profármacos [véase, por ejemplo, N-aciloximetilcarbamatos descritos por Majumdar y Sloan, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (2007) 17: 1447-1450] o como modificadores para textiles [véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos 4.539.008; 4.200.564; y 3.758.554], dichos compuestos no tienen la capacidad de liberar las moléculas de fármaco libre por eliminación beta de tasa controlada. Asimismo, Majumdar S. et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (2006) 16: 3590-3594 informa de la síntesis e hidrólisis de derivados *N*-alquil-*N*-alquiloxicarbonilaminometilo (NANAOCAM) de fármacos que contienen fenol, imida y tiol. Se indicó que el mecanismo de hidrólisis funcionaba mediante un mecanismo de tipo S_N1 , basándose en investigaciones emprendidas con derivados *N*-aril-*N*-alquiloxicarbonilaminometilo (NArNAOCAM) de fenoles.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a conjugados de fármacos con vehículos macromoleculares que comprenden enlazadores escindibles que permiten la posterior liberación de los fármacos a tasas controladas en condiciones fisiológicas, así como los enlazadores escindibles, moléculas de enlazador-fármaco que comprenden los enlazadores escindibles, vehículos macromoleculares que comprenden los enlazadores escindibles y métodos para la preparación y uso del conjugado anterior de macromolécula-enlazador-fármaco.

En general, la invención se refiere a un compuesto de la fórmula



en la que m es 0 o 1;

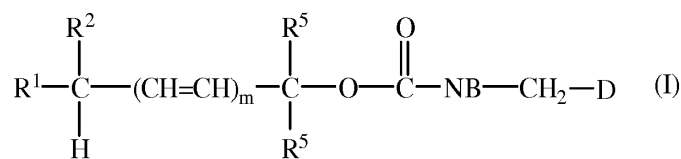
en la que al menos uno, o ambos R^1 y R^2 son independientemente CN; NO_2 ;

un arilo opcionalmente sustituido;
un heteroarilo opcionalmente sustituido;
un alquenilo opcionalmente sustituido;
un alquinilo opcionalmente sustituido;
 COR^3 o SOR^3 o SO_2R^3 en la que

R^3 es H o un alquilo opcionalmente sustituido;
arilo o arilalquilo, cada uno opcionalmente sustituido;
heteroarilo o heteroarilalquilo, cada uno opcionalmente sustituido; o
 OR^9 o $N(R^9)_2$ en la que cada R^9 es independientemente H o un alquilo opcionalmente sustituido, o ambos grupos R^9 tomados junto con el nitrógeno al que están unidos forman un anillo heterocíclico;

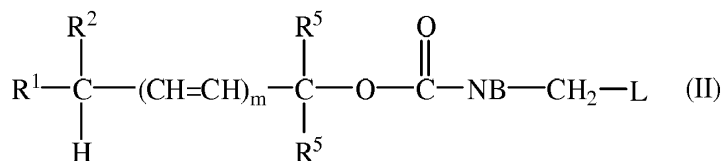
en la que R^1 y R^2 pueden unirse para formar un anillo de 3-8 miembros; y
en la que uno y sólo uno de R^1 y R^2 puede ser H o alquilo, arilalquilo o heteroarilalquilo, cada uno opcionalmente sustituido;
cada R^5 es independientemente H o es alquilo, alquenilalquilo, alquinilalquilo, arilo, arilalquilo, heteroarilo o heteroarilalquilo, cada uno opcionalmente sustituido;
 Z es un residuo de un fármaco o profármaco acoplado a través de O, S o N no básico, o es un nucleófilo que media dicho acoplamiento; y
 B es alquilo, arilo, arilalquilo, heteroarilo, o heteroarilalquilo, cada uno opcionalmente sustituido; y
en la que uno de R^1 , R^2 , R^5 y B se acopla a una macromolécula o uno de R^1 , R^2 y R^5 comprende un grupo funcional para mediar dicho acoplamiento;
en la que los sustituyentes para cualquier grupo opcionalmente sustituido que se ha definido anteriormente se seleccionan entre halo, nitro, ciano, OR, SR, NR_2 , OCOR, NRCOR, COOR, CONR₂, SOR, SO_2R SONR₂, SO_2NR_2 , en la que cada R es independientemente alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo o heteroarilo, o dos grupos R tomados junto con los átomos a los que están unidos forman un anillo; y en la que la sustitución en cualquier sistema anular también puede seleccionarse entre alquilo, alquenilo, alquinilo, o un anillo adicional, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido.

Por lo tanto, una realización de la invención se refiere a conjugados de fármacos con vehículos macromoleculares que comprenden enlazadores escindibles que tienen la fórmula (I)



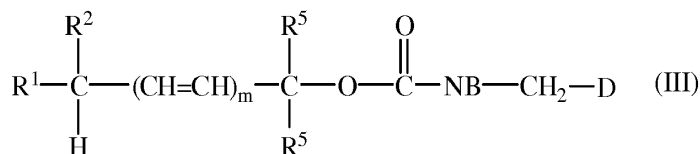
en la que R^1 , R^2 , R^5 , m y B se definen como anteriormente, y en la que D es el residuo de un fármaco o profármaco acoplado a través de O , S o N no básico y en la que uno de R^1 , R^2 , R^5 y B se acopla a una macromolécula.

5 Otra realización de la presente invención proporciona compuestos de reactivo de enlazador escindible que son precursores a los compuestos de fórmula (I) que tienen la fórmula (II),



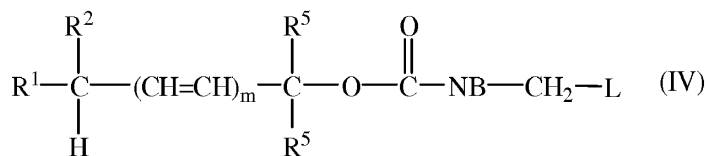
10 en la que R^1 , R^2 , R^5 , m y B son como se han definido anteriormente; y L es un nucleófilo que media el acoplamiento de un fármaco o profármaco acoplado a través de O , S o N no básico. En la fórmula (II), en lugar de acoplarse a una macromolécula, uno de los grupos R^1 , R^2 y R^5 comprende un grupo funcional para mediar el acoplamiento a una macromolécula.

15 Otra realización más de la presente invención proporciona compuestos enlazador-fármaco que tienen la fórmula (III)



20 en la que los grupos R^1 , R^2 , R^5 , m y B son como se han definido anteriormente; D es el residuo de un fármaco o profármaco acoplado a través de O , S o N no básico; y en la que uno de los grupos R^1 , R^2 y R^5 comprende un grupo funcional para mediar el acoplamiento a una macromolécula como se ha descrito anteriormente.

25 Aún una realización adicional de la presente invención proporciona vehículos macromoleculares que comprenden enlazadores escindibles que tienen la fórmula (IV),



30 en la que los grupos R^1 , R^2 , R^5 , m y B son como se han definido anteriormente; L es un nucleófilo que media el acoplamiento de un fármaco o profármaco a través de O , S o N no básico; y en la que, como en la fórmula (I), uno de R^1 , R^2 , R^5 y B se acopla a una macromolécula.

La presente invención también proporciona métodos para la preparación de los compuestos de fórmula (I).

35 Breve descripción de los dibujos

La figura 1 ilustra las relaciones entre las moléculas de la invención. La reacción de una molécula de reactivo de enlazador escindible de fórmula (II) con un fármaco a través de O , S o N no básico produce un compuesto enlazador-fármaco de fórmula (III). De forma análoga, la reacción de un conjugado de reactivo de macromolécula-enlazador de fórmula (IV) con un fármaco a través de O , S o N no básico produce un conjugado de macromolécula-enlazador-fármaco de fórmula (I). La conjugación de una molécula de reactivo de enlazador de fórmula (II) con una macromolécula proporciona un conjugado de reactivo de macromolécula-enlazador de fórmula (IV). De forma análoga, la conjugación de un compuesto enlazador-fármaco de fórmula (III) con una macromolécula proporciona un conjugado de macromolécula-enlazador-fármaco de fórmula (I).

45 Figura 2. El panel A ilustra el esquema general de la liberación activada por la β -eliminación de fármacos de compuestos de la invención. La escisión por β -eliminación proporciona un ácido carbámico inestable, que se descompone por la pérdida de CO_2 para proporcionar un hemiaminal inestable, que se descompone adicionalmente para producir B-NH_2 , H_2CO , y ZH libre de fármaco. La tasa de liberación de ZH libre depende de

la tasa de la β -eliminación, que, a su vez, depende principalmente de los grupos de activación R^1 y R^2 . El panel B ilustra la descomposición de compuestos de la invención a través de E1-eliminación. La escisión del enlace C-Z usando el par solitario del carbamato nitrógeno proporciona ZH libre y un ión de iminio inestable, que hidroliza para proporcionar el carbamato y el formaldehído. La tasa de liberación de ZH libre depende de la actividad del par solitario carbamato N, que a su vez, depende del grupo B. En general, la aceptación de electrones y la conjugación de los grupos B favorecerán la β -eliminación sobre la E1-eliminación.

La figura 3 muestra la cinética de la liberación de N-(2,4-dinitrofenil)-cisteína de S-(N-(9-fluorenilmetoxicarbonil-N-fenil)aminometil) N-(2,4-dinitrofenil)-cisteína (Ejemplo 11C) (rombos; $T_{1/2} = 100$ horas) y S-(N-(etoxicarbonil-N-fenil)aminometil) N-(2,4-dinitrofenil)-cisteína (cuadrados; $T_{1/2} = 850$ horas) en tampón HEPES 0,1 M, NaCl 15 mM, pH 7,40, 37 °C.

La figura 4 muestra la cinética de liberación de N-(6-(2,4-dinitrofenil)amino)hexanoil-serina de O-(N-(9-fluorenilmetoxicarbonil-N-fenil)aminometil)-serina (Ejemplo 11B) (rombos; $T_{1/2} = 400$ horas) y O-(N-(etoxicarbonil-N-fenil)aminometil)-serina (cuadrados; $T_{1/2} = 8.000$ horas) en tampón HEPES 0,1 M, NaCl 15 mM, pH 7,40, 37°C.

La figura 5 muestra métodos generales para la conversión de alcoholes en intermedios y compuestos de fórmula (II), como se describe en la Memoria descriptiva.

La figura 6 muestra un método para la preparación de compuestos de fórmula (II), en la que R^1 es arilsulfonilo, R^2 es H, R^5 es H y 3-(5-hexinoilamido)fenilo, B es fenilo, y L es Cl.

La figura 7 muestra un método para preparar un compuesto de fórmula (III) en la que D está conectado a través de N (DH es 5-fluorouracilo). Esta figura también ilustra un método para preparar un compuesto de fórmula (II) en la que L es I.

La figura 8 muestra los resultados del Ejemplo 36 para la concentración de conjugados PEG-SN-38 de 4 brazos (Ejemplo 34, en el que $R^1 = 4$ -N,N-dietilcarboxamido y R = fenilsulfonilo, metanosulfonilo o morfolinossulfonil) en función del tiempo en suero de ratón. Leyenda: Línea continua, R = fenilsulfonilo; línea de puntos, R = morfolinossulfonilo; línea discontinua, R = metanosulfonilo.

La Figura 9 muestra los resultados del experimento de farmacocinética de conjugado PEG-SN38 de 4 brazos descrito en el Ejemplo 50. El Panel A muestra la concentración de diversos conjugados PEG-SN38 de 4 brazos después de administración i.v. a ratas. Los conjugados donde uno de R^1 y R^2 es H y el otro es fenilsulfonilo (cuadrados), metanosulfonilo (rombos) o morfolinossulfonilo (triángulos), o R^1 y R^2 son ambos H como control (círculos) se administraron a las ratas i.v., y se analizaron muestras de plasma para el conjugado restante como se describe en los ejemplos de trabajo. El Panel B muestra un recorte de los datos para determinar la tasa de escisión de SN38 de los conjugados *in vivo*. Un diagrama logarítmico de la relación de los conjugados liberables (es decir, uno de R^1 y R^2 es H y el otro es fenilsulfonilo (cuadrados), metanosulfonilo (rombos) o morfolinossulfonilo (triángulos)) al conjugado "estable" no liberable (círculos; es decir, R^1 y R^2 son ambos H como control) a diversos tiempos produce trazos cuyas pendientes son iguales a la tasa de liberación de SN38 de los conjugados. Se observó que las tasas de liberación de SN38 *in vivo* eran iguales a las determinadas para los conjugados *in vitro*, con las siguientes vidas medias (modulador, $T_{1/2}$ *in vitro*, $T_{1/2}$ *in vivo*): fenilsulfonilo, 9,3 h, 10,4 h; metanosulfonilo, 44 h, 54 h; morfolinossulfonilo, 123 h, 137 h.

La Figura 10 muestra una comparación de las tasas de liberación *in vivo* e *in vitro* de fármacos como una función de las constantes de Hammett asociadas con el activador.

Descripción de la invención

La presente invención representa una mejora sobre las prácticas convencionales de conjugados, y tiene ventajas adicionales sobre las composiciones de fármacos liberables PEGilados tales como las descritas en la publicación PCT WO2009/158668 mencionada anteriormente. Las ventajas incluyen retención de un fármaco o profármaco en forma inactiva hasta liberarse del vehículo macromolecular, una multiplicidad de sitios de unión para el fármaco de modo que pueda aumentarse la dosificación del fármaco, permitiendo, por tanto, el suministro de fármacos menos potentes, y la provisión de protección contra enzimas degradantes u otras condiciones inactivadoras.

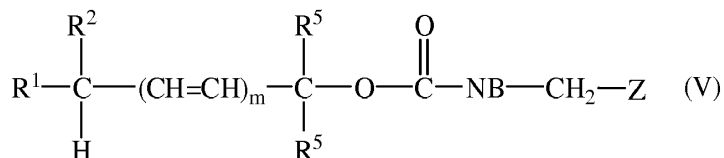
Otra ventaja de los compuestos de la invención es que producen suministro eficaz de fármacos al sistema linfático. Como los compuestos de la invención tienen pesos moleculares que son significativamente mayores que el peso molecular del fármaco, son capaces de mantener el fármaco en el sistema linfático cuando los compuestos se administran por vía subcutánea. Los compuestos con pesos moleculares de 40.000 o más se mantienen de forma eficaz en el sistema linfático. Además, como el sistema linfático carece de esterases presentes en el plasma que podrían liberar los fármacos de los enlaces esterificados, el pH favorable del sistema linfático (que es idéntico al del plasma) permite la liberación del fármaco activo del conjugado. Por tanto, los compuestos de la invención liberan de forma eficaz el fármaco en el sistema linfático cuando se desea el suministro al sistema linfático, como sería el caso, por ejemplo, con respecto a linfomas.

La presente invención proporciona compuestos definidos en la reivindicación adjunta 1. Los compuestos son conjugados de fármacos con vehículos macromoleculares, que comprenden enlazadores escindibles que permiten la posterior liberación de los fármacos a tasas controladas en condiciones fisiológicas, así como los reactivos de enlazadores escindibles, compuestos de enlazador-fármaco que comprenden los enlazadores escindibles, y vehículos macromoleculares que comprenden los reactivos de enlazadores escindibles.

Los compuestos de la invención tienen la fórmula (V) que incluye el conjugado de fármaco y sus precursores y que puede usarse adicionalmente para explicar la invención.

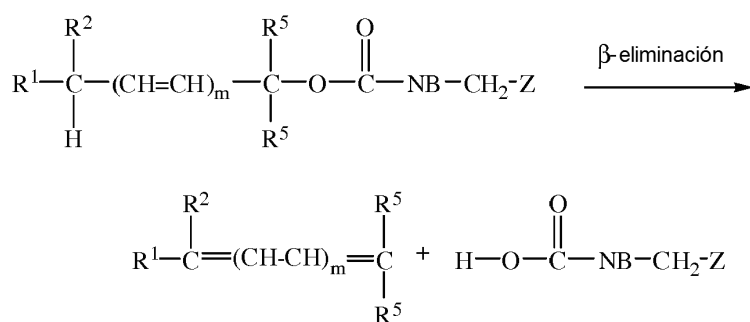
En la fórmula (V):

5



10

los grupos R^1 y/o R^2 activan el C-H adyacente para la beta-eliminación en condiciones fisiológicas. Como se usa en el presente documento, el término "beta-eliminación en condiciones fisiológicas" se refiere a una transformación química en la que una molécula de la invención se transforma en un resto alqueno y un ácido carbámico de acuerdo con el esquema ilustrativo



15

que tiene lugar en condiciones típicas de aquellas de los sistemas biológicos, por ejemplo, un pH de entre 6 y 8 y una temperatura de entre 25 y 40 °C, a tal velocidad que la semivida de la reacción está entre 1 y 10.000 horas, o entre 1 y 5.000 horas, o entre 1 y 1.000 horas o entre 1 y 100 horas o entre 1 y 10 horas. Los ácidos carbámicos de producto son típicamente altamente inestables, y se descomponen adicionalmente para liberar CO_2 , B-NH_2 , $\text{H}_2\text{C}=\text{O}$ y Z-H . Una posible ruta para esta descomposición se ilustra en la figura 2A y se muestra en más detalle como se indica a continuación:

20

(1) $\text{HO}-(\text{C}=\text{O})-\text{N}(\text{B})-\text{CH}_2-\text{Z} \rightarrow \text{CO}_2 + \text{B-NH-CH}_2-\text{Z}$ (un formaldehído aminorado inestable)

(2) $\text{B-NH-CH}_2-\text{Z} \rightarrow \text{B-N}=\text{CH} + \text{ZH}$ (formación de imina)

(3) $\text{B-N}=\text{CH} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{B-NH-CH}_2-\text{OH}$ (adición de agua a la imina para formar hemiaminal)

25

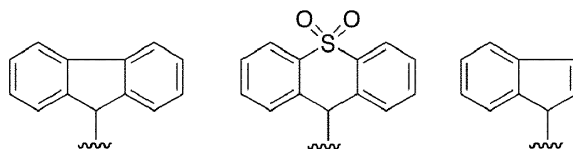
(4) $\text{B-NH}_2 + \text{O}=\text{CH}_2$ (ruptura de hemiaminal para dar formaldehído + amina). Un experto en la técnica reconocerá que los diversos intermedios de la beta-eliminación y las reacciones de descomposición posteriores (1)-(4) que se han mostrado anteriormente pueden ser transitorias y, por lo tanto, pueden no ser detectables en condiciones de reacción fisiológicas u otras condiciones de reacción químicas.

30

La naturaleza de los grupos de activación R^1 y/o R^2 se ha expuesto anteriormente y controla sustancialmente la velocidad de la reacción de eliminación. Por lo tanto, los grupos R^1 y/o R^2 actúan como uno o más grupos de activación determinando la acidez del C-H adyacente. La selección de grupos de activación R^1 y/o R^2 adecuados proporciona un medio para controlar la velocidad de liberación del fármaco de los compuestos de la invención. El grado en el que los grupos R^1 y/o R^2 activan el enlace C-H adyacente puede expresarse por la acidez resultante del enlace C-H; esta acidez puede expresarse a su vez como la pK_a del enlace C-H, en la que una pK_a inferior representa un enlace C-H más ácido, ionizado más fácilmente. Las listas de valores pK_a aproximados para diversos grupos son comunes en la técnica, por ejemplo en Bordwell, F.G., "Equilibrium acidities in dimethyl sulfoxide solution", Accounts of Chemical Research 21(12): 456-463 (2002). Los ejemplos de grupos de activación adecuados incluyen, pero sin limitación, arilos opcionalmente sustituidos, heteroarilos opcionalmente sustituidos, alquenos opcionalmente sustituidos, alquinos opcionalmente sustituidos, sulfonas, sulfóxidos, nitrilos, cetonas, ésteres, amidas y grupos nitro. Cuando los grupos R^1 y/o R^2 se unen para formar un anillo de 3-8 miembros, el anillo puede formar parte de una estructura cíclica mayor, opcionalmente sustituida, por ejemplo

35

40



45

y formas sustituidas de las mismas.

Los sustituyentes en los grupos R¹ y/o R² pueden añadirse opcionalmente para proporcionar control adicional sobre la acidez del C-H adyacente y, por lo tanto, la velocidad de la reacción de beta-eliminación. En general, los sustituyentes aceptores de electrones aumentarán la velocidad de la reacción de beta-eliminación, mientras que los sustituyentes donadores de electrones disminuirán la velocidad de la reacción de beta-eliminación. El efecto electrónico de diversos sustituyentes se conoce bien en la técnica, y puede expresarse, por ejemplo, como relaciones lineales sin energía (Hammett). Para los sistemas aromáticos, por ejemplo grupos arilo, heteroarilo, arilcetona, heteroarilcetona, arilsulfona, heteroarilsulfona, arilsulfóxido y heteroarilsulfóxido sustituidos, los efectos electrónicos de los sustituyentes se describen por los parámetros sigma de Hammett, con un valor sigma positivo que representa los efectos de la aceptación de electrones (aceleración de la velocidad con respecto a un C-H adyacente) y un valor sigma negativo que representa los efectos de la donación de electrones (retraso de la velocidad con respecto al C-H). La Tabla 1 proporciona una lista de constantes sigma de Hammett para diversos sustituyentes.

A modo de ejemplo, cuando un anillo arilo R¹ está sustituido con un "grupo donador de electrones", el sustituyente dará como resultado un descenso de la acidez del enlace C-H de tipo bencílico adyacente. Los ejemplos de sustituyentes donadores de electrones adecuados incluyen, pero sin limitación, alquilo, alcoxi, alquiltio, silil amino, alquilamino y dialquilamino. La sustitución de un anillo arilo con uno o más "grupos aceptores de electrones" da como resultado un aumento de la acidez del enlace C-H de tipo bencílico adyacente. Los ejemplos de sustituyentes aceptores de electrones adecuados incluyen, pero sin limitación, halógeno, difluorometilo, trifluorometilo, nitro, fenilo, alquenilo, ciano, C(=O)-R, en la que R es H, alquilo, alcoxi, o amino, o SOR o SO₂R, donde R es alquilo, arilo o heteroarilo. Los sustituyentes donadores de electrones o aceptores de electrones distintos de hidrógeno pueden estar presentes en múltiples posiciones en los anillos a los que están unidos. Aunque, por comodidad, en la mayor parte de los ejemplos, únicamente se muestra una única aparición de un sustituyente distinto de hidrógeno en un anillo sencillo, también pueden estar presentes múltiples sustituyentes y están dentro del alcance de la invención. Los sustituyentes pueden ser iguales o diferentes.

Lo anterior es una simplificación, ya que en algunos casos, que un sustituyente sea aceptor de electrones o donador de electrones depende de su posición en un anillo aromático. Esto se refleja en la siguiente tabla de relaciones lineales sin energía (Hammett), donde un valor sigma positivo representa un efecto aceptor de electrones y un valor sigma negativo indica un efecto donador de electrones. Como se muestra en la tabla, por ejemplo, OMe es aceptor de electrones cuando está presente en la posición meta de un anillo fenilo, pero donador de electrones en la posición para (u orto).

Constantes sigma de Hammett seleccionadas para sustituyentes aromáticos

Sustituyente	$\sigma(\text{meta})$	$\sigma(\text{para})$	Sustituyente	$\sigma(\text{meta})$	$\sigma(\text{para})$
H	0	0	F	+0,34	+0,06
CH ₃	-0,07	-0,17	Cl	+0,37	+0,23
CH ₃ CH ₂	-0,07	-0,15	Br	+0,39	+0,23
Me ₂ CH	-0,05	-0,15	I	+0,35	+0,18
Me ₃ C	-0,1	-0,2	SH	+0,25	+0,15
Me ₃ Si	-0,04	-0,07	MeS	+0,15	0
NH ₂	-0,16	-0,66	ClCH ₂	+0,11	+0,12
Me ₂ N	-0,15	-0,83	CF ₃	+0,43	+0,54
OH	+0,12	-0,37	CN	+0,56	+0,66
OMe	+0,12	-0,27	CHO	+0,35	+0,42
OCH ₂ CH ₃	+0,10	-0,24	CH ₃ C=O	+0,38	+0,50
AcNH	+0,07	-0,15	CO ₂ H	+0,37	+0,45
Ph	+0,06	-0,01	NO	+0,62	+0,91
CH ₂ =CH	+0,05	-0,02	NO ₂	+0,71	+0,78
HC(=O)NH	+0,19	0	Me ₃ N ⁺	+0,88	+0,82

Los sustituyentes restantes R⁵ y B tienen un menor efecto sobre la velocidad de la beta-eliminación, pero la naturaleza de B en particular afecta a la velocidad de una reacción de E1 eliminación competente. La naturaleza del grupo B afecta a la estabilidad del N-metileno-carbamato hacia la descomposición a través de reacciones de eliminación de tipo E1, que se ilustra en la figura 2B. Los grupos B que reducen la reactividad del par solitario carbamato N, por ejemplo a través de una conjugación extendida y/o la capacidad aceptor de electrones, reducen la velocidad de la descomposición competente por la ruta de la E1-eliminación.

Las macromoléculas pueden acoplarse a la Fórmula V a través de "conectores" adicionales. Los conectores adicionales son compuestos orgánicos bifuncionales. Muchos de estos conectores están disponibles en el mercado, por ejemplo en Pierce Chemical Co, Rockford, IL. Se conocen bien en la técnica diversos conectores bifuncionales, incluyendo ácidos o anhídridos dicarboxílicos, diaminas, o conectores heterobifuncionales. Los ejemplos de conectores heterobifuncionales incluyen, por ejemplo, aquellos que tienen un succinimidil éster ("NHS") y un alquino o cicloalquino (por ejemplo, DBCO-NHS), una maleimida y un NHS, o moléculas similares. La selección del conector

dependerá, por supuesto, de la naturaleza de los grupos funcionales en los sustituyentes en la macromolécula, el fármaco, y de los intermedios correspondientes a las Fórmulas (I)-(V).

5 El término "alquilo" incluye grupos hidrocarburo lineales, ramificados o cíclicos saturados de 1-8 carbonos, o en algunas realizaciones, 1-6 o 1-4 átomos de carbono.

El término "alcoxi" incluye grupos alquilo unidos a oxígeno, incluyendo metoxi, etoxi, isopropoxi, ciclopropoxi, ciclobutoxi, y similares.

10 El término "alqueno" incluye hidrocarburos insaturados no aromáticos con dobles enlaces carbono-carbono. Por el término "alqueno (C_2)" se refiere a un doble enlace carbono-carbono mono-, di-, tri-, o tetra-sustituido de cualquier configuración geométrica.

15 El término "alquino" incluye hidrocarburos insaturados no aromáticos con triples enlaces carbono-carbono. Por el término "alquino (C_2)" se refiere a un triple enlace carbono-carbono mono- o di-sustituido.

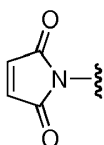
20 El término "arilo" incluye grupos hidrocarburo aromáticos de 6-18 carbonos, preferiblemente 6-10 carbonos, incluyendo grupos tales como fenilo, naftilo, y antraceno. El término "heteroarilo" incluye anillos aromáticos que comprenden 3-15 carbonos que contienen al menos un átomo N, O o S, preferiblemente 3-7 carbonos que contienen al menos un átomo N, O o S, incluyendo grupos tales como pirrolilo, piridilo, pirimidinilo, imidazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, tiazolilo, isotiazolilo, quinolilo, indolilo, indenilo y similares.

25 En algunos aspectos, los restos alqueno, alquino, arilo o heteroarilo pueden acoplarse al resto de la molécula a través de un enlace alquilo. Bajo estas circunstancias, el sustituyente se denominará como alquenilalquilo, alquinilalquilo, arilalquilo o heteroarilalquilo, que indica que hay un resto alqueno entre el resto alqueno, alquino, arilo o heteroarilo y la molécula a la que se acopla el alqueno, alquino, arilo o heteroarilo.

El término "halógeno" incluye bromo, flúor, cloro y yodo.

30 La expresión "anillo heterocíclico" se refiere a un anillo aromático o no aromático de 4-8 miembros que comprende 3-7 átomos de carbono y al menos un átomo N, O o S. Los ejemplos incluyen piperidinilo, piperazinilo, tetrahidropiridinilo, pirrolidina y tetrahidrofuranilo, así como los grupos ejemplares proporcionados para el término "heteroarilo" anterior.

35 "Maleimido" se refiere a la fórmula



40 La expresión "N no básico" se refiere a un nitrógeno que es parte de un grupo NH en una molécula de fármaco libre DH, en el que NH está caracterizado por tener una pKa menor de o igual a aproximadamente 20. En ciertas realizaciones de la invención, el N no básico es un miembro de un sistema anular heteroarilo tal como pirrol, indol, pirimidina o purina, una sulfonamida primaria o secundaria ($R-SO_2NHR'$), una amida primaria o secundaria ($R-CONHR'$), o una imida ($R-CO-NH-CO-R'$).

45 Un "nucleóforo" es un grupo saliente lleva consigo el par electrónico por el que está unido. Los nucleóforos ejemplares son halógeno, OH, alcoxi, arilsulfonato, alquilsulfonato o R_2S^+ , en la que cada R es independientemente alquilo, arilo o heteroarilo.

50 Por el término "macromolécula" se entiende una molécula o resto de una molécula que tiene un peso molecular entre 5.000 y 1.000.000 Dalton, preferiblemente entre 10.000 y 500.000 Dalton, y más preferiblemente entre 10.000 y 250.000 Dalton. Ejemplos de macromoléculas incluyen, aunque sin limitación, proteínas incluyendo anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y enzimas; polipéptidos incluyendo poli(aminoácidos) tales como poli(lisina) y poli(valina) y polipéptidos de secuencia mixta; polímeros sintéticos incluyendo poli(etilenglicol) (PEG), poli(óxido de etileno) (PEO), poli(etilenimina) (PEI) y copolímeros de los mismos; y polisacáridos tales como dextranos. Las macromoléculas comprenderán al menos un grupo funcional adecuado para la conjugación, de forma nativa o después de transformación química, tal como un grupo amina, ácido carboxílico, alcohol, tiol, alquino, azida o maleimida como se ha descrito anteriormente. En ciertas realizaciones de la invención, la macromolécula es un polietilenglicol. El polietilenglicol puede ser lineal o ramificado, con un extremo terminado con un grupo funcional adecuado para conjugación y el otro extremo o extremos terminados por un grupo de recubrimiento (por ejemplo, metilo), o puede comprender múltiples brazos, terminando cada brazo en un grupo funcional adecuado para la conjugación. En realizaciones preferidas de la invención, el polietilenglicol es un polímero lineal, ramificado o de

múltiples brazos que tiene un peso molecular promedio entre 20.000 y 200.000 Dalton, preferiblemente entre 20.000 y 100.000 Dalton, y mucho más preferiblemente de aproximadamente 40.000 Dalton. Ejemplos de dichos polietilenglicoles son conocidos en la técnica y están disponibles en el mercado, por ejemplo, en NOF Corporation (Tokio, Japón).

5 Los términos "proteína" y "péptido" se usan de forma intercambiable independientemente de la longitud de cadena, y estos términos incluyen adicionalmente pseudopéptidos que comprenden enlaces diferentes a enlaces amida, tales como enlaces CH_2NH_2 , así como peptidomiméticos.

10 Las expresiones "ácidos nucleicos" y "oligonucleótidos" también se usan de forma intercambiable independientemente de la longitud de cadena. Los ácidos nucleicos u oligonucleótidos pueden ser monocatenarios o dúplex o pueden ser ADN, ARN o formas modificadas de los mismos con enlaces alterados, tales como fosfodiésteres, fosforamidatos y similares. Tanto para las proteínas como para los ácidos nucleicos útiles como fármacos en la invención, estas expresiones también incluyen aquellos con cadenas laterales no encontradas en la naturaleza en el caso de proteínas, así como enlaces pseudopeptídicos y bases no encontradas en la naturaleza en el caso de ácidos nucleicos, así como variantes de la estructura tales como ácidos peptidonucleicos.

15 La expresión "molécula pequeña" en el contexto de fármacos, es un término comprendido en la técnica, y se entiende que incluye compuestos diferentes a las proteínas y ácidos nucleicos que se sintetizan o se aíslan de la naturaleza y, en general, no se parecen a proteínas o ácidos nucleicos. Típicamente, tienen pesos moleculares <1.000 , aunque no hay punto de corte específico reconocido. No obstante, la expresión es bien comprendida en los campos de farmacología y medicina.

20 Puede incluirse una amplia diversidad de fármacos como realización de D. Cada uno de estos fármacos se acoplará a través de un nitrógeno no básico, oxígeno o azufre a la parte metilcarbamato de los compuestos de la invención. Por tanto, los fármacos adecuados serán aquellos que poseen un hidroxilo, tiol o amina no básica para permitir el acoplamiento al enlazador. Ejemplos de fármacos adecuados incluyen aquellos para uso en seres humanos o veterinario incluyendo, aunque sin limitación, fármacos antidiabéticos; promotores del crecimiento; antibacterianos incluyendo aminoglucósidos, penicilinas, cefalosporinas, macrólidos y péptidos, trimetoprima, ácido piromídico y sulfametazina; fármacos analgésicos y antiinflamatorios, fármacos antialérgicos y antiasmáticos, fármacos antihipercolesterolemicos, bloqueantes beta-adrenérgicos y fármacos antihipertensivos, fármacos antineoplásicos y fármacos antiviricos.

25 Ejemplos adicionales de dichos fármacos incluyen alcoholes tales como paclitaxel y análogos, epitolonas y análogos, camptotecina y análogos tales como irinotecán, y nucleósidos tales como 5-fluorouracilo y capecitabina. En otra realización, el fármaco es un péptido que comprende un resto de serina. En otra realización, el fármaco es una molécula pequeña que comprende un grupo arilo; ejemplos de dichos fármacos incluyen SN-38, etilefrina, prenalterol y estradiol. En otra realización, el fármaco es un péptido que comprende un resto de tirosina. So el acoplamiento es a través de S, el fármaco puede ser una molécula pequeña que comprende un grupo tiol. Ejemplos de dichos fármacos incluyen penicilamina, captopril y enalapril. El fármaco puede ser una molécula pequeña que comprende un grupo tioarilo o tioheteroarilo; ejemplos de dichos fármacos incluyen 6-mercaptopurina. Si el acoplamiento es a través de un N no básico, el fármaco puede ser una molécula pequeña o péptido que comprende una amida primaria o secundaria (tal como un resto piroglutamato u otra amida) o sulfonamida, o un grupo heteroarilo tal como un indol (por ejemplo, triptófano) o purina. Ejemplos incluyen hormona liberadora de tirotrópina, bombesina, hormona liberadora de hormona luteinizante, hormona liberadora foliculoestimulante, octreótido, 5-fluorouracilo y alopurinol.

30 Ejemplos de fármacos basados en ácido nucleico incluyen la hebra con sentido y la hebra antisentido de cualquier gen de un animal, y particularmente de un mamífero. Dichos genes pueden ser aquellos que ya son objeto de ADN o ARN antisentido, o ARN interferentes pequeños que se han proporcionado con el fin de tratar diversas enfermedades, por ejemplo, genes de la proteína quinasa C-alfa, BCL-2, ICAM-1, factor de necrosis tumoral alfa y similares.

35 En realizaciones particulares, el fármaco es SN-38 (7-etil-10-hidroxicamptotecina).

40 El término "precursor" se refiere a un compuesto similar a la fórmula (I), pero donde en lugar de la macromolécula, el sustituyente relevante R^1 , R^2 o R^5 se provee con un grupo funcional o un enlazador que puede proporcionar acoplamiento, y/o donde D se reemplaza por un nucleófilo. Por tanto, esta categoría de compuestos tiene las fórmulas (II), (III) y (IV).

45 Aunque normalmente la forma activa del fármaco se libera directamente de los conjugados de la invención, en algunos casos es posible liberar el fármaco activo en forma de un profármaco del mismo.

50 Para evitar malentendidos, los "conjugados de fármacos" descritos en este documento incluyen conjugados tanto de fármacos como de profármacos.

Como se ha apreciado anteriormente, en la fórmula (V), Z es el residuo de un fármaco o profármaco acoplado a través de O, S o N no básico, o comprende un nucleóforo que permite la conexión a un fármaco a través de O, S o N no básico. Cuando Z es un nucleóforo que permite una conexión a un fármaco a través de O, S o N no básico, Z puede ser halógeno, OH, alcoxi, arilsulfonato, alquilsulfonato, o R_2S^+ , en la que cada R es independientemente alquilo, arilo, o heteroarilo. En una realización específica, Z es halógeno o R_2S^+ . En otra realización, Z es cloro o metoxi. De forma análoga, L en la fórmula (II) y fórmula (IV) puede ser halógeno, OH, alcoxi, arilsulfonato, alquilsulfonato, o R_2S^+ , en la que cada R es independientemente alquilo, arilo o heteroarilo, y en realizaciones específicas, L es cloro o metoxi.

10 Sustituyentes ejemplares

Dado que los grupos R^1 , R^2 , R^5 y B se comparten por todos los compuestos de la invención que definen estos grupos, las diversas realizaciones de estos grupos como se presentan en la alternativa expuesta a continuación son comunes para todos ellos. Cuando cualquier grupo puede estar opcionalmente sustituido, la sustitución en cualquier sistema anular puede ser alquilo, alquenilo, alquinilo, o un anillo adicional, cada uno opcionalmente sustituido. Los sustituyentes opcionales en cualquier grupo, incluyendo los anteriores, incluyen halo, nitro, ciano, OR, SR, NR_2 , OCOR, NRCOR, COOR, $CONR_2$, SOR, SO_2R SONAR₂, SO_2NR_2 en los que cada R es independientemente alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo o heteroarilo, o dos grupos R tomados junto con los átomos a los que están unidos forman un anillo.

Los compuestos de la invención contienen un enlace a una macromolécula a través de uno de R^1 , R^2 , R^5 y B (fórmula (V), (I) y (IV)), o uno de R^1 , R^2 y R^5 comprende un grupo funcional que permite la conexión a una macromolécula (fórmulas (V), (II) y (III)). Los grupos funcionales adecuados que permiten la conexión a una macromolécula incluyen grupos amino, azido, hidroxilo, ácido carboxílico, alquinilo, tiol, maleimido, furano, ciclopentadieno, 1,3-dieno, o 1,3-dicarbonilo, o variantes protegidas de los mismos. Los sustituyentes que comprenden un grupo funcional reactivo incluyen un grupo alquilo, arilo, arilalquilo, heteroarilo, heteroalquilo o heteroarilalquilo, sustituido con un resto químico reactivo. Por lo tanto, uno de los grupos R^1 , R^2 , R^5 y B se acopla a una macromolécula o uno de R^1 , R^2 y R^5 comprende un grupo amino, azido, hidroxilo, ácido carboxílico, alquinilo, tiol, maleimido, furano, ciclopentadieno, 1,3-dieno, o 1,3-dicarbonilo, o variantes protegidas de los mismos. En algunas realizaciones, R^1 se acopla a una macromolécula o comprende un grupo funcional que permite la conexión a una macromolécula. En algunas realizaciones, R^5 se acopla a una macromolécula o comprende un grupo funcional que permite la conexión a una macromolécula.

Como se ha indicado anteriormente, en los compuestos de la invención, R^1 y R^2 ejercen juntos el mayor control sobre la velocidad de liberación para el fármaco, aunque R^5 y m también tienen algo de impacto. En algunos aspectos, uno de R^1 y R^2 es hidrógeno o es alquilo, arilalquilo o heteroarilalquilo y el otro comprende una de las realizaciones restantes que se han expuesto anteriormente en el presente documento. En otros aspectos, ninguno de R^1 y R^2 es hidrógeno ni es alquilo, arilalquilo o heteroarilalquilo.

Por ejemplo, R^1 puede ser H y R^2 un fenilo opcionalmente sustituido o ambos R^1 y R^2 pueden ser un fenilo opcionalmente sustituido. Las sustituciones en los anillos fenilo pueden estar en las posiciones 1-5 pero preferiblemente 3 o menos. Si tanto R^1 como R^2 son un fenilo opcionalmente sustituido, no necesitan sustituirse de forma idéntica, o pueden ser sustituyentes de forma idéntica. Los sustituyentes adecuados incluyen alcoxi, halo, nitro, ciano y similares, por ejemplo, como se ha proporcionado anteriormente en la Tabla 1.

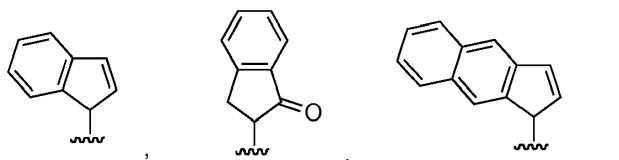
En otras realizaciones, uno o ambos de R^1 y R^2 son $R^6S(O)-$, o $R^6S(O)_2-$, en los que R^6 es alquilo, alquilo sustituido, dialquilamino, alquilarilamino, diarilamino, un anillo heterocíclico unido a N, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, o heteroarilo sustituido. El miembro restante de R^1 y R^2 puede ser entonces H, por ejemplo, o cualquiera de las realizaciones alternativas que se han expuesto anteriormente. En realizaciones particulares, uno de R^1 y R^2 es $R^6S(O)_2-$, en el que R^6 es metilo, morfolino, fenilo sin sustituir, o fenilo sustituido con uno o más grupos halo, metilo, metoxi o trifluorometilo, y el otro de R^1 y R^2 es H. En otras realizaciones, uno de R^1 y R^2 es fenilsulfonilo, 4-(trifluorometil)fenilsulfonilo, 4-clorofenilsulfonilo, 4-metilfenilsulfonilo, 4-metoxifenilsulfonilo, 2,4,6-tumetilfenilsulfonilo, morfolinosulfonilo, o metanosulfonilo, y el otro de R^1 y R^2 es H.

En otros aspectos, uno o ambos de R^1 y R^2 pueden ser ciano y el otro opcionalmente seleccionado entre H y los sustituyentes permisibles que se han expuesto anteriormente, en particular fenilo opcionalmente sustituido en una o más posiciones, por ejemplo, con halo, CN, NO_2 , metoxi y similares, y que opcionalmente comprende adicionalmente un grupo funcional que permite la conexión a una macromolécula. En otras realizaciones, uno de R^1 y R^2 es ciano y el otro es H.

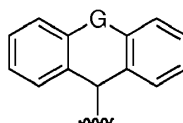
En otro conjunto de aspectos, uno o ambos de R^1 y R^2 son un benzoílo opcionalmente sustituido y el otro es hidrógeno o cualquier de las otras elecciones adecuadas, tal como un fenilo opcionalmente sustituido. En otras realizaciones, uno de R^1 y R^2 es aminocarbonilo, tal como N,N-dialquilaminocarbonilo, o morfolinocarbonilo, y el otro es H.

En realizaciones adicionales, uno de R¹ y R² es una cualquiera de las realizaciones particulares que se han descrito anteriormente, que comprende adicionalmente una macromolécula o un grupo funcional que permite una conexión a una macromolécula, y el otro de R¹ y R² es H.

- 5 Cuando R¹ y R² están unidos para formar estructura cíclicas, esto incluye grupos en los que el resto R¹-CH-R² forma una subestructura, tal como, por ejemplo,



y



- 10 y formas de las mismas opcionalmente sustituidas con grupos aceptores de electrones y/o donadores de electrones como se ha descrito anteriormente, en las que G es un enlace (por ejemplo, 9-fluorenilo), C=O, SO, SO₂, CA₂, o CA₂CA₂ en los que cada A es independientemente H o Cl.

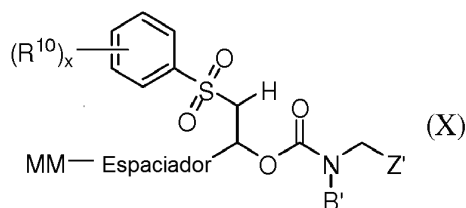
- 15 En otras realizaciones, R¹ y R² tomados junto con el CH al que están unidos forman fluorenilo sin sustituir o fluorenilo que comprende adicionalmente una macromolécula o un grupo funcional que permite la conexión a una macromolécula. En ciertas realizaciones, R¹ y R² tomados junto con el CH al que están unidos forman fluorenilo o fluorenilo sustituido con una alquil azida, en particular (azido-N-metil(CH₂)₃₋₆alquil-amido)metilo.

- 20 Cada R⁵ es independientemente H, o es alquilo, alquenalquilo, alquinalquilo, arilo, arilalquilo, heteroarilo o heteroarilalquilo, cada uno opcionalmente sustituido. En ciertas realizaciones, cada R⁵ es H. En otras realizaciones, uno de R⁵ es H y el otro es alquilo sustituido o fenilo sustituido. Aún en otras realizaciones, uno de R⁵ es H y el otro comprende un grupo azidoalquilo. Aún en otras realizaciones, uno de R⁵ es H y el otro es azido-(CH₂)₃₋₆alquilo, monoalquilamino-(CH₂)₃₋₆alquilo, N₃(CH₂)₃₋₆N(Me)CO(CH₂)₃₋₆, o -(CH₂)₃₋₆-CO₂H, o una variante protegida de los mismos. En realizaciones adicionales, uno de R⁵ es una cualquiera de las realizaciones particulares que se han descrito anteriormente, que comprende adicionalmente una macromolécula o un grupo funcional que permite la conexión a una macromolécula, y el otro R⁵ es H.

- 30 El grupo B puede ser alquilo, arilo, arilalquilo, heteroarilo, o heteroarilalquilo, cada uno opcionalmente sustituido. En realizaciones preferidas de la invención, B es un arilo opcionalmente sustituido, o un heteroarilo opcionalmente sustituido. En ciertas realizaciones de la invención, B es arilo o heteroarilo, cada uno sustituido con al menos un grupo que tiene una constante sigma de Hammett positiva (Tabla 1). En una realización particular de la invención, B es fenilo o fenilo sustituido con alcoxicarbonilo, carboxamido, sulfonamido, CN, NO₂ o Br. En otras realizaciones, B es fenilo sin sustituir. Aún en realizaciones adicionales, B es fenilo sin sustituir o fenilo sustituido con dietilaminocarbonilo, morfolinocarbonilo o morfolinosulfonilo. Aún en realizaciones adicionales, B es fenilo, propargilo, 4-bromofenilo, 4-etoxicarbonilfenilo, propilo, 4-(N,N-dietilcarboxamido)fenilo, 4-morfolinocarbonilfenilo, o 4-morfolinosulfonilfenilo. Aún en realizaciones adicionales, B es fenilo, 4-(N,N-dietilcarboxamido)fenilo, 4-morfolinocarbonilfenilo, o 4-morfolinosulfonilfenilo. En realizaciones adicionales, B es una cualquiera de las realizaciones particulares que se han descrito anteriormente, acopla adicionalmente a una macromolécula.

- 40 En ciertas realizaciones, m es 0.

En otras realizaciones, la presente invención contempla compuestos de Fórmula (X):



- 45 en la que

x es 0, 1, 2 o 3;

cada R¹⁰ es independientemente metilo, trifluorometilo, metoxi o halo;

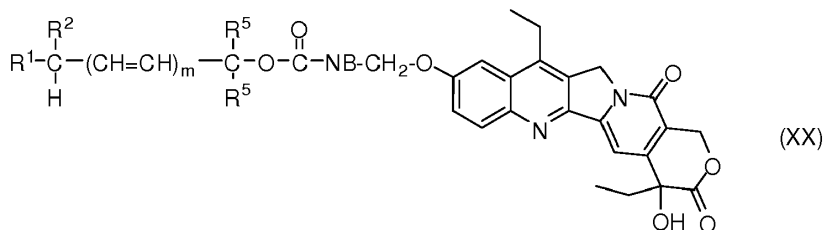
B' es fenilo, opcionalmente sustituido con alcoxicarbonilo, carboxamido, sulfonamido, CN, NO₂ o halo;

5 Z' es un residuo de un fármaco o profármaco acoplado a través de O, S o N no básico, o es un nucleófilo que permite tal acoplamiento;

el espaciador es un enlazador que comprende un grupo alquilo, heteroalquilo, arilo o aralquilo, cada uno opcionalmente sustituido; y

MM es una macromolécula o es un grupo funcional que permite una conexión a una macromolécula.

10 En otras realizaciones, la presente invención contempla compuestos de Fórmula (XX):



15 en la que R¹, R², R⁵, m y B son como se han definido anteriormente para la fórmula (V). En otras realizaciones de fórmula (XX), m es 0. Aún en realizaciones adicionales de fórmula (XX), m es 0; R¹ es fenilsulfonilo, fenilsulfonilo sustituido, metanosulfonilo, (R⁹)₂N-SO₂, en la que R⁹ se define según la fórmula (V), o CN; R² es H; un R⁵ es N₃(CH₂)₅ y el otro R⁵ es H; y B es fenilo o fenilo sustituido. En otras realizaciones, m es 0; R¹ es fenilsulfonilo, fenilsulfonilo sustituido, metanosulfonilo, (R⁹)₂N-SO₂, o CN; R² es H; un R⁵ es alquilo opcionalmente sustituido y el otro R⁵ es H; y B es fenilo o fenilo sustituido, y en la que uno de R¹, R⁵ y B comprende adicionalmente una conexión a una macromolécula. Aún en realizaciones adicionales de fórmula (XX), la macromolécula es un polietilenglicol lineal, ramificado o multi-brazo. Aún en realizaciones adicionales de fórmula (XX), m es 0; R¹ es fenilsulfonilo, fenilsulfonilo sustituido, metanosulfonilo, (R⁹)₂N-SO₂, o CN; R² es H; un R⁵ es alquilo sustituido adicionalmente conectado a un polietilenglicol, y el otro R⁵ es H; y B es fenilo sustituido.

25 Preparación

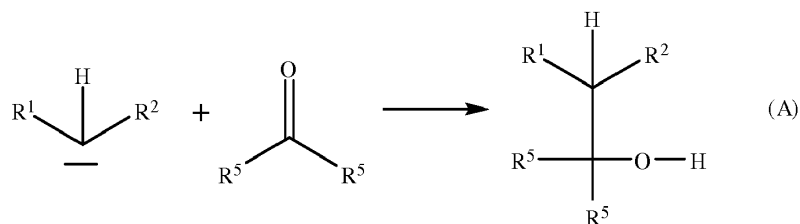
En el presente documento se describen métodos para preparar compuestos de fórmula (V). Un experto en la técnica reconocerá que los compuestos de fórmulas (I), (II), (III), (IV) y (X) son subconjuntos de los compuestos de fórmula (V).

30 Preparación de compuestos de Fórmula (II)

Los métodos para preparar compuestos de enlazador de fórmula (II) son análogos a los métodos conocidos en la técnica para la preparación de N-hidroximetil-, N-alcoximetil-, y N-halometil-amidas, o para la preparación de N-halometil-, N-alcoximetil-, o N-tiometil-carbamatos sencillos (Majumdar & Sloan, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters (2007) 17: 1447-1450, y se ilustran en la figura 5.

Los compuestos de fórmula (II) se preparan a partir de alcoholes R¹R²C-(C=C)_mC(R⁵)₂OH (figura 5 y fórmula (A), a continuación), y análogos donde m = 1. La síntesis de dichos alcoholes se describe, por ejemplo, en la solicitud de patente PCT/US2009/048943, publicada como el documento WO2009/158668 A1. Se dan ejemplos en la figura 6 y en los ejemplos de trabajo proporcionados a continuación.

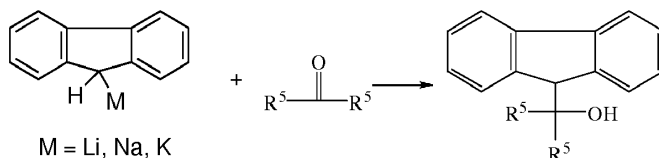
Pueden prepararse alcoholes R¹R²C-(C=C)_mC(R⁵)₂OH en los que m es 0 (fórmula (A)) mediante la adición de un carbanión R¹R²CH⁻ formado haciendo reaccionar R¹R²CH₂ con una base fuerte, por ejemplo butil litio, NaH, diisopropilamida de litio, bis(trimetilsililamida) de litio, o similar, con una molécula para producir un compuesto de fórmula (A)



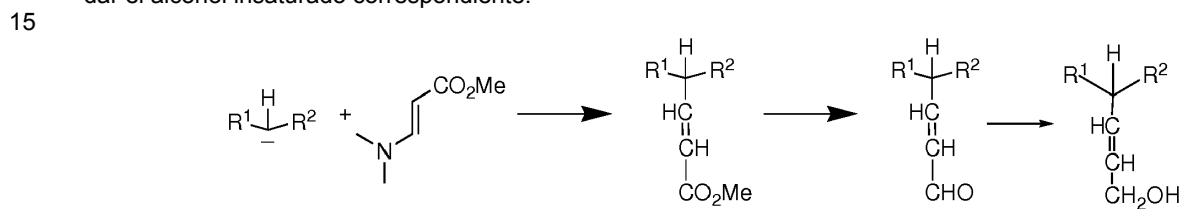
50 Como alternativa, los compuestos de fórmula (A) en la que m es 0 y un R⁵ es H pueden prepararse mediante un proceso de dos etapas. En la primera etapa, la adición de un carbanión R¹R²CH⁻ formado haciendo reaccionar

$R^1R^2CH_2$ con una base fuerte, con un éster $R^5-C(=O)OR^*$, en la que R^* es alquilo inferior, produce una cetona intermedia $R^1R^2CH-CR^5=O$, que puede hacerse reaccionar en la segunda etapa con un agente reductor adecuado, por ejemplo $NaBH_4$ o $NaBH_3CN$, para proporcionar el compuesto de fórmula (A), en la que un R^5 es H.

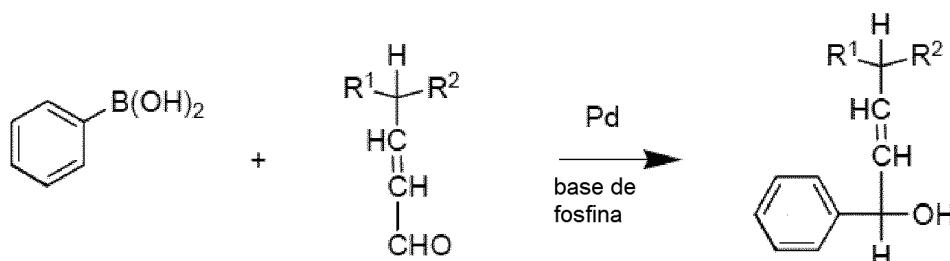
- 5 Por ejemplo, cuando $R^1R^2CH_2$ es fluoreno, éste se hace reaccionar con una base fuerte, por ejemplo, para formar un carbanión fluorenilo, que después se hace reaccionar con R^5_2CO , la reacción es como se indica a continuación:



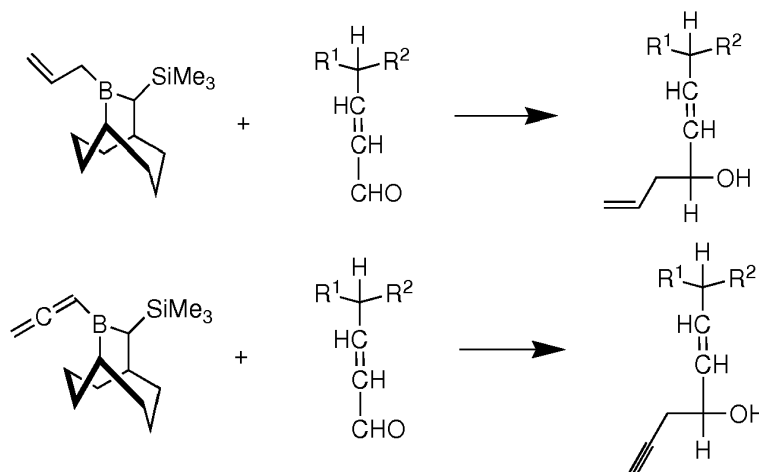
- 10 Pueden prepararse los alcoholes $R^1R^2C-(C=C)_mC(R^5)_2OH$ en la que m es 1 y ambos R^5 son H, mediante la adición del carbanión obtenido por litiación de $R^1R^2CH_2$, por ejemplo usando una base fuerte tal como NaH , butil litio, bis(trimetil-sililamida) de litio, o similar, a un compuesto insaturado, tal como 3-(dimetilamino)-acrilato de metilo para proporcionar un éster intermedio, que puede reducirse, a través de una etapa o a través de múltiples etapas, para dar el alcohol insaturado correspondiente:



- 20 La reacción del aldehído insaturado que se ha mostrado anteriormente con un ácido arilborónico sustituido o sin sustituir, aril- $B(OH)_2$, en presencia de un catalizador de paladio, por ejemplo como se describe en Org. Lett. (2005) 7: 4153-5, proporciona un compuesto en el que m es 1, un R^5 es arilo sustituido, y un R^5 es H.



- 25 Como alternativa, la reacción del aldehído insaturado que se ha mostrado anteriormente con un alquilborano de acuerdo con el método de Soderquist proporciona compuestos en los que un R^5 es H y el otro es $-CH_2CH=CH_2$ o $-CH_2C\equiv C$. Véase Burgos, C. H., et al., J. Am. Chem. Soc. (2005) 127: 8044.



Después, los alcoholes $R^1R^2C-(C=C)_mC(R^5)_2OH$ se convierten en carbamatos, $R^1R^2C-(C=C)_mC(R^5)_2OC(O)NHB$, mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante: 1) la activación del alcohol para dar un cloroformiato (con fosgeno un equivalente de fosgeno tal como trifosgeno y piridina), y haciendo reaccionar el cloroformiato con $B-NH_2$ en presencia de una base suave tal como piridina o $NaHCO_3$; o 2) reacción de un alcohol con un isocianato (figura 5). Después, se hace reaccionar un carbamato, $R^1R^2C-(C=C)_mC(R^5)_2OC(O)NHB$, con paraformaldehído en presencia de un donante nucleófilo L^* para dar un compuesto de fórmula (II). En una realización específica, L^* es un donante de cloruro tal como Me_3SiCl o HCl , que produce un compuesto de fórmula (II) en la que L es Cl .

En otro caso, un compuesto enlazador de fórmula (II) en la que L es Cl se prepara por reacción de un cloroformiato con un derivado de hexahidrotiazina ($B-N-CH_2$)₃ (figura 5). Las reacciones pueden ser puras o realizarse en presencia de un disolvente inerte tal como tetrahidrofurano, diclorometano, acetato de etilo, o dioxano, a temperaturas entre 0 °C y 100 °C, típicamente a o casi el punto de ebullición del disolvente.

15 Acoplamiento de macromoléculas a Compuestos de Fórmula (II) o (III)

El grupo R^1 , R^2 o R^5 en las fórmulas (II) y (III) proporciona un medio de unión a una macromolécula. Se conocen generalmente en la técnica métodos para la conjugación en macromoléculas.

En casos en los que el grupo funcional en el grupo R^1 , R^2 o R^5 que permite una conexión a la macromolécula está presente de forma protegida, el compuesto enlazador-fármaco de fórmula (II) o (III) se somete en primer lugar a condiciones en las que el grupo protector se elimina. Por lo tanto, cuando es grupo protector es escindible en ácido, tal como para ésteres, éteres o tioéteres ^tbutílicos, o para ^tBOC carbamatos, el enlazador-fármaco de fórmula (II) o (III) se trata en primer lugar con ácido trifluoroacético durante el tiempo suficiente para eliminar el grupo protector. Cuando el grupo protector puede eliminarse por reducción, tal como alil éteres o ésteres, o Alloc carbamatos, el enlazador-fármaco de fórmula (II) o (III) se trata en primer lugar con un agente reductor suave tal como fenilsilano en presencia de un catalizador de paladio (0), por ejemplo tetraquis(trifenilfosfina)paladio. Cuando el grupo protector es un grupo protector sililo, la eliminación para revelar un grupo hidroxilo libre puede conseguirse por tratamiento con ácido suave o con ión fluorita. Después, la conjugación se realiza usando métodos conocidos en la técnica.

En un método ejemplar, se forma un enlace amida entre un grupo amino y un grupo de ácido carboxílico; por lo tanto, un enlazador que comprende un grupo amino puede conjugarse a una macromolécula que comprende un grupo de ácido carboxílico, o un enlazador que comprende un grupo de ácido carboxílico puede conjugarse con una macromolécula que comprende un grupo amino. La conjugación puede realizarse haciendo reaccionar el enlazador y la macromolécula en presencia de un agente de condensación, por ejemplo una carbodiimida tal como dicitlohexilcarbodiimida (DCC) o 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDCI), un reactivo de uronio tal como hexafluorofosfato de O-benzotriazol-N,N,N',N'-tetrametiluronio (HBTU), o un reactivo de fosfonio tal como hexafluorofosfato de benzotiazol-1-il-oxi-tris-(dimetilamino)fosfonio (BOP). Como alternativa, el grupo de ácido carboxílico puede activarse para su conjugación en una etapa previa, por ejemplo, por conversión en un cloruro de ácido usando cloruro de tionilo o cloruro de oxalilo, o en un éster activo, tal como un pentafluorofenil éster usando una carbodiimida y pentafluorofenol o un N-hidroxisuccinimidil éster usando una carbodiimida y N-hidroxisuccinimida, y el carboxilato activado resultante puede hacerse reaccionar entonces con la amina en una segunda etapa. Los grupos amina y ácido carboxílico pueden estar presentes inicialmente de forma protegida, como se requiere para la estabilidad y/o compatibilidad con transformaciones químicas adicionales, y desprotegidos antes de la etapa de conjugación. Los grupos amina pueden protegerse como carbamatos, preferiblemente *terc*-butoxicarbonilo (^tBOC), aliloxycarbonilo (Alloc), u otros grupos carbamato que pueden eliminarse en condiciones de neutras a ácidas. Los ácidos carboxílicos pueden protegerse como ésteres que pueden eliminarse en condiciones de neutras a ácidas, tales como *terc*-butilo (^tBu), tritilo (Ph_3C), alilo (All), o metoximetilo (MOM).

En un segundo método ejemplar, se forma un enlace tioéter entre un grupo tiol y un grupo maleimida; por lo tanto, un enlazador que comprende un grupo tiol puede conjugarse con una macromolécula que comprende un grupo maleimida, o un enlazador que comprende un grupo maleimida puede conjugarse con una macromolécula que comprende un grupo tiol. El grupo tiol puede estar presente inicialmente de forma protegida como se requiere para la estabilidad y/o compatibilidad con transformaciones químicas adicionales, y desprotegido antes de la etapa de conjugación. Los grupos protectores adecuados incluyen aquellos que pueden eliminarse en condiciones de neutras a ácidas, por ejemplo *terc*-butil tioéteres (^tBu) o tritil tioéteres.

En un tercer método ejemplar, se forma un enlace 1,2,3-triazol entre un grupo alquino y un grupo azida; por lo tanto, un enlazador que comprende un grupo alquino puede conjugarse con una macromolécula que comprende un grupo azida, o un enlazador que comprende un grupo azida puede conjugarse con una macromolécula que comprende un grupo alquino. Las reacciones de conjugación pueden realizarse en catálisis metálica, típicamente usando cobre o rutenio, o pueden realizarse en ausencia de catalizador usando un alquino activado, tal como un ciclo-octino. También pueden usarse otras reacciones de cicloadición, por ejemplo la reacción Diels-Alder entre un 1,3-dieno (por ejemplo, un ciclopentadieno) y un dienófilo (por ejemplo, maleimida).

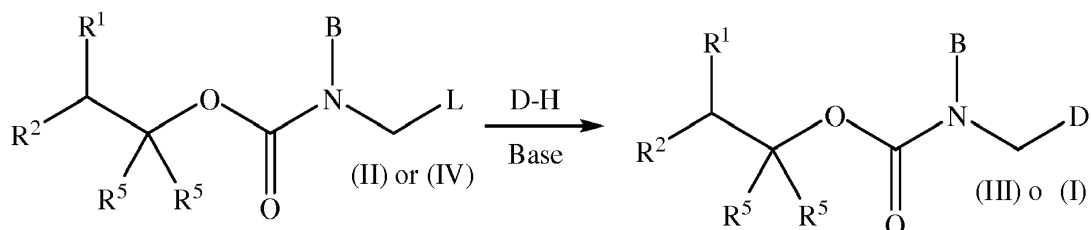
65

En un cuarto método ejemplar, se forma un enlace enamino-cetona entre un grupo amino y un grupo 1,3-dicarbonilo; por lo tanto, un enlazador que comprende un grupo amino puede conjugarse con una macromolécula que comprende un grupo 1,3-dicarbonilo, o un enlazador que comprende un grupo 1,3-dicarbonilo puede conjugarse con una macromolécula que comprende un grupo amina. En una realización, un enlazador que comprende un grupo 1,3-dicarbonilo se hace reaccionar con un anticuerpo, tal como m38C2 que comprende un grupo lisina ϵ -amino adecuadamente reactivo (Doppalapudi, y col., Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters (2007) 17: 501-506.

Por lo tanto, el grupo R^1 , R^2 o R^5 puede comprender grupos amina opcionalmente protegida, ácido carboxílico opcionalmente protegido, tiol opcionalmente protegido, maleimida, alquino o azida para permitir la conjugación con macromoléculas. Una vez conjugados, estos grupos pueden sustituirse opcionalmente por macromoléculas conectadas a través de grupos amida carboxílica, tioéter o 1,2,3-triazol.

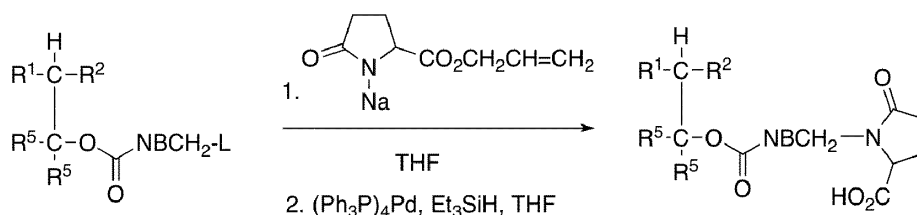
Unión de Compuestos de Fórmula (II) o Fórmula (IV) a Fármaco/Profármaco

Los compuestos de fórmula (III) o (I) se preparan por la reacción de compuestos de fórmula (II) o (IV), respectivamente, en las que L es un grupo saliente adecuado tal como tosilato, alquilsulfonato, halógeno o $R^6R^7S^+$, con un fármaco DH que comprende un grupo OH, SH o NH no básico, en condiciones anhidras en presencia de una base suave:



Las bases adecuadas incluyen aminas terciarias, tales como trietilamina y N,N-diisopropiltilamina, piridina o 4-(dimetilamino)piridina. La mezcla de reacción puede incluir opcionalmente NaI o un yoduro de tetraalquilamonio para acelerar la reacción. Los disolventes adecuados incluyen cualquier disolvente inerte anhidro, incluyendo tetrahidrofurano, acetonitrilo, dimetilformamida, acetato de etilo, diclorometano, acetona y cloroformo. En algunos casos, por ejemplo cuando el fármaco comprende un fenol o NH no básico, puede ser ventajoso preformar una sal del fármaco por reacción con una base fuerte, por ejemplo NaH, bis(trimetilsililamida) de litio, diisopropilamida de litio, o similar.

Cuando el fármaco es un péptido, el aminoácido terminal del péptido puede ser un residuo de piroglutamilo conectado a un enlazador de la invención. Dichos péptidos pueden prepararse por síntesis química del péptido, en la que la etapa de acoplamiento final usa un residuo de enlazador-piroglutamato. Dichos residuos de enlazador-piroglutamato pueden prepararse por alquilación de una sal de un éster del ácido piroglutámico adecuado, por ejemplo piroglutamato de alilo, con un compuesto (II) o (IV) de la invención.



Después de la eliminación del grupo protector éster, por ejemplo usando un catalizador de paladio en presencia de un agente reductor tal como un silano, el residuo de enlazador-piroglutamato puede usarse en la síntesis peptídica usando métodos convencionales.

Administración y uso

Los conjugados de la invención que están diseñados para liberar fármacos a tasas controlables se administran a los sujetos de un modo similar a los medicamentos en general. Los sujetos pueden ser sistemas modelo tales como ratones, ratas o conejos o pueden ser pacientes humanos o pueden ser sujetos de veterinaria tales como animales de compañía, ganado bovino y sujetos aviares. Los conjugados de la invención se administran normalmente por inyección, en general por inyección intravenosa, pero también son posibles otros mecanismos de dosificación, tales como administración oral, administración por supositorio, administración transdérmica o transmucosa y similares. Los niveles de dosificación dependerán de la naturaleza del fármaco, la afección a tratarse, la naturaleza del sujeto y el criterio del profesional a cargo. La selección de las tasas apropiadas de liberación para un fármaco o protocolo

particular también depende de estos factores. Por tanto, el uso y administración de los compuestos de la invención pertenece a las habilidades del facultativo. Además, como se ha indicado anteriormente, los conjugados de la invención son particularmente útiles y ventajosos en el tratamiento de enfermedades del sistema linfático donde se prefiere la inyección subcutánea.

5

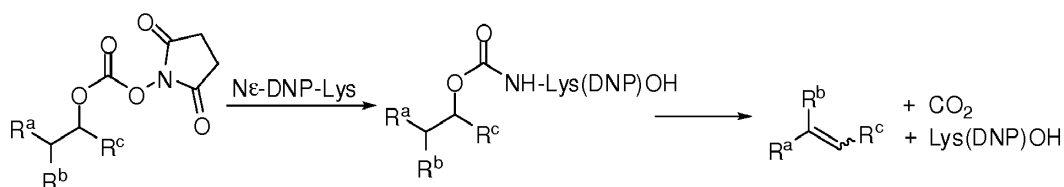
Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar, pero no limitar, la invención.

Ejemplo 1

10 Grupos escindibles por β-eliminación

Se diseñó una serie de estructuras de enlazador modelo que tienen una gama de grupos funcionales como moduladores de pK_a potenciales (aromáticos sustituidos, cetonas, nitrilos, sulfonas), preparadas y unidas a través de enlaces carbamato a N_ε-2,4-dinitrofenil-L-lisina (N_ε-DNP-Lys) para la evaluación de las velocidades de liberación. Se escogió DNP-Lys como el resto liberado ya que es soluble en agua y es un cromóforo fuerte para permitir el análisis por HPLC-UV. Este experimento demuestra que la velocidad de escisión de carbamato puede controlarse a través de la elección de sustituyentes particulares en el grupo accionador.

15



20

Los derivados de DNP-lisina modelo se prepararon como se describe en el documento WO2011/140392.

Las velocidades de liberación de N_ε-2,4-dinitrofenil-L-lisina de estos compuestos se determinaron a pH 7,4 o pH 8,3, 37 °C, mediante análisis por HPLC. Los análisis cinéticos de las reacciones de liberación se realizaron por HPLC (C18; gradiente lineal de metanol/agua + HOAc al 0,5 %) usando un monitor UV/vis a 350 nm. Las áreas bajo los picos de Lys(DNP) ("P") y el material de partida ("S") se integraron para determinar la extensión de la reacción ("R") como R = P/(S+P). Las velocidades de reacción se calcularon a partir de la pendiente de la línea obtenida por el análisis de regresión lineal de un gráfico de ln(1-R) frente al tiempo. Los valores t_{1/2} de la escisión β-eliminativa de carbamatos de DNP-Lys a pH 7,4 y/o 8,3 se muestran en la Tabla 2.

30

Tabla 2: Datos cinéticos para la liberación de N_ε-2,4-dinitrofenil-L-lisina a 37 °C.

R ¹	R ²	R ⁵	t _{1/2} pH 7,4	t _{1/2} pH 8,3
4-MePhSO ₂	H	H, H	56 h	-
PhSO ₂	H	H, H	30 h	-
3-NO ₂ PhSO ₂	H	H, H	2 h	-
PhSO ₂	H	H, Me	72 h	-
4-CIPhSO ₂	H	H, Me	46 h	-
4-CIPhSO ₂	H	H, 4-OMePh	18 h	-
4-CIPhSO ₂	H	H, 4-BrPh	17 h	-
4-CIPhSO ₂	H	H, 4-NO ₂ Ph	2 h	-
4-OMePhSO ₂	H	H, 3-NO ₂ Ph	13 h	-
4-OMePhSO ₂	H	H, 4-NO ₂ Ph	10 h	-
CN	H	H, H	-	160 h
CN	H	H, Me	-	320 h
CN	H	H, Ph	-	98 h
CN	H	H, 4-BrPh	270 h	-
CN	H	H, 4-OMePh	22 h	-
CN	4-OMePh	H, Me	125 h	-
CN	4-NO ₂ Ph	H, Me	~80 h	-
9-fluorenilo		H, H	~1650 h	200 h
9-fluorenilo		H, Me	-	~1800 h
9-fluorenilo		H, 4-BrPh	-	285 h

Como se muestra en la Tabla 2, las semividas para la eliminación del carbamato y la liberación de N_ε-2,4-dinitrofenil-L-lisina variaron de 2 a >1650 horas a pH 7,4. Esa escisión que se generó por reacciones de β-eliminación fue evidente por las diferentes semividas, y la observación de que O-bencil-N-(N_ε-2,4-dinitrofenil-L-lisina)-carbamato (que no puede experimentar escisión O-alkilo) no mostró ninguna liberación observable de N_ε-2,4-dinitrofenil-L-lisina (menos que el límite de detección estimado de escisión al 0,25 %) después de 5 días a 37 °C y pH 7,4 ($t_{1/2}$ >3 años).

El O--Bencil-N-(N_ε-2,4-DNP-Lys) carbamato no experimenta ninguna hidrólisis detectable en suero humano al 50 % después de 1 semana a 37 °C. Esto demuestra la estabilidad de los carbamatos a las hidrolasas séricas. En general, en el comparación con C-H, a) los grupos aceptores de electrones en la posición beta aumentan la velocidad; b) los grupos alquilo en la posición alfa aumentan la velocidad; y c) los restos arilo en la posición alfa disminuyen la velocidad.

Se observó una buena relación de energía libre lineal para los enlazadores (fenilsulfonil)etilo sustituidos, permitiendo una estimación de velocidades de liberación para otros enlazadores sustituidos en esta serie en base a SAR usando parámetros sigma de Hammett. Por lo tanto, los sustituyentes pueden seleccionarse para proporcionar velocidades de liberación más lentas (por ejemplo, 4-OMe, $\sigma_p = -0,27$; 4-OH, $\sigma_p = -0,37$; 4-Me₂N, $\sigma_p = -0,83$) o intermedias (por ejemplo, 4-F, $\sigma_p = +0,06$; 4-Cl, $\sigma_p = +0,23$; 3-Br, ($\sigma_m = +0,39$; 4-CF₃, $\sigma_p = +0,54$).

Ejemplo 2

Preparación General de Cloroformatos y Carbonatos de N-Hidroxisuccinimida

Se añade gota a gota piridina (0,33 equivalentes) a una solución agitada vigorosamente del alcohol R¹R²C-(C=C)_mC(R⁵)₂OH (1 equivalente) y trifosgeno (0,33 equivalentes) en tetrahidrofurano anhidro (2 ml/mmol) enfriado sobre hielo. Después de 1 h, la mezcla se deja calentar a temperatura ambiente y se mantiene durante una noche. Después, la mezcla se filtra y se concentra al vacío en un evaporador rotatorio. El cloroformiato en bruto resultante R¹R²C-(C=C)_mC(R⁵)₂OC(O)Cl se usa sin purificación adicional.

Para preparar carbonatos de N-hidroxisuccinimida, el cloroformiato en bruto se disuelve en tetrahidrofurano anhidro (2 ml/mmol) y se trata con piridina (2 equivalentes) y N-hidroxisuccinimida (4 equivalentes) a temperatura ambiente durante 30 minutos. La mezcla se diluye con acetato de etilo, se lava sucesivamente con HCl 0,1 N, agua y salmuera, después se seca sobre MgSO₄, se filtra y se evapora. Los carbonatos en bruto R¹R²C-(C=C)_mC(R⁵)₂OC(O)Su se purifican por cromatografía sobre gel de sílice (acetato de etilo/hexanos).

Ejemplo 3

Preparación General de Carbamatos

Se añade gota a gota una solución del cloroformiato del Ejemplo 2 (1 equivalente) en acetona (2 ml/mmol) a una mezcla agitada vigorosamente de la amina BNH₂ (1 equivalente) y NaHCO₃ (2 equivalentes) en agua (2 ml/mmol). Después de 30 minutos, los carbamatos que precipitan como sólidos se recogen por filtración al vacío, se lavan con agua y se secan; los carbamatos que se separan en forma de aceites se extraen con acetato de etilo. El extracto se seca sobre MgSO₄, se filtra y se evapora para proporcionar el carbamato en bruto. En cualquier caso, el carbamato en bruto R¹R²C-(C=C)_mC(R⁵)₂OC(O)NHB se purifica adicionalmente por cromatografía en columna (SiO₂) o por cristalización.

Como alternativa, se añade trietilamina (1 equivalente) a una mezcla de la amina BNH₂ (1 equivalente) y el cloroformiato (1 equivalente) en un disolvente anhidro inerte, por ejemplo diclorometano, tetrahidrofurano o acetato de etilo. Después de agitar durante 1 h a temperatura ambiente, la mezcla se evapora a sequedad, y el residuo se disuelve en acetato de etilo y se lava sucesivamente con HCl 1 N, agua, NaHCO₃ ac. sat. y salmuera, después se seca sobre MgSO₄, se filtra y se evapora para proporcionar el carbamato en bruto, que se purifica como se ha descrito anteriormente.

Como alternativa, un alcohol R¹R²C-(C=C)_mC(R⁵)₂OH se convierte en un carbamato sin aislamiento del cloroformiato intermedio. Se añade gota a gota piridina (0,33 equivalentes) a una solución agitada vigorosamente del alcohol (1 equivalente) y trifosgeno (0,33 equivalentes) en tetrahidrofurano anhidro (2 ml/mmol) enfriado sobre hielo. Después de 1 h, la mezcla se deja calentar a temperatura ambiente y se mantiene durante una noche. La mezcla se enfría sobre hielo, y se añade la amina BNH₂ (2 equivalentes). La mezcla se deja calentar a temperatura ambiente y se mantiene durante una noche. Después, la mezcla se evapora a sequedad, y el residuo se disuelve en acetato de etilo, se lava sucesivamente con HCl 1 N, agua, NaHCO₃ ac. sat. y salmuera, después se seca sobre MgSO₄, se filtra y se evapora para proporcionar el carbamato en bruto, que se purifica como se ha descrito anteriormente.

Ejemplo 4N-Clorometilación de Carbamatos

5 Una mezcla del carbamato del Ejemplo 3 (1 equivalente) y paraformaldehído (3 equivalentes de formaldehído) en 1:1 de tetrahidrofurano/clorotrimetilsilano (1 ml/mmol) en un vial cerrado herméticamente con tapón de rosca se calienta a 55 °C hasta que se obtiene una solución transparente. La mezcla se concentra al vacío en un evaporador rotatorio, y el residuo se disuelve en acetato de etilo, se filtra y se concentra de nuevo para proporcionar el carbamato de N-clorometilo en bruto, $R^1R^2C-(C=C)_mC(R^5)_2OC(O)NBCH_2Cl$.

10

Ejemplo 5Carbamatos de N-metoximetilo

15 Una solución de carbamato de N-clorometilo del Ejemplo 4 en metanol se deja en reposo a temperatura ambiente durante 1 h, después se concentra a sequedad para proporcionar el carbamato de N-metoximetilo, $R^1R^2C-(C=C)_mC(R^5)_2OC(O)NBCH_2OMe$.

Ejemplo 6Carbamatos de N-alcoximetilo, Carbamatos de N-Fenoximetilo, Carbamatos de N-Tiometilo, y Carbamatos de N-Tiofenilmetilo

20 Una solución de un alcohol, fenol, tiol o tiofenol que se obtiene a partir de un fármaco DH (1 equivalente) y el carbamato de N-clorometilo del Ejemplo 4 (1 equivalente) en un disolvente anhidro inerte, por ejemplo tetrahidrofurano, diclorometano, o acetato de etilo, se trata gota a gota con trietilamina (1 equivalente). Después de 1 hora, la mezcla se evapora a sequedad. El producto en bruto se purifica por cromatografía sobre gel de sílice.

Ejemplo 7Carbamato de O-(9-Fluorenilmetil)-N-Propargilo

25 Se añadió lentamente una solución de cloruro de 9-fluorenilmetoxicarbonilo (2,6 g) en 20 ml de acetona a una mezcla agitada de clorhidrato de propargilamina (0,91 g) y $NaHCO_3$ (2,5 g) en 20 ml de agua. Después de 1 hora, el precipitado sólido se recogió por filtración al vacío, se lavó con agua y se secó al aire. La cristalización en acetato de etilo/hexano proporcionó el producto.

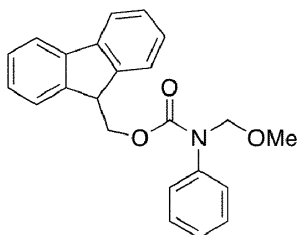
Ejemplo 8Carbamato de O-(9-Fluorenilmetil) N-(4-Bromofenilo)

30 Se añadió trietilamina (0,7 ml) a una mezcla agitada de 4-bromoanilina (0,85 g) y cloruro de 9-fluorenilmetoxicarbonilo (1,3 g) en 25 ml de diclorometano. La mezcla se agitó durante 1 h a temperatura ambiente y después se lavó con HCl 1 N, agua, $NaHCO_3$ ac. sat., y salmuera. La solución orgánica se secó sobre $MgSO_4$, se filtró y se evaporó.

Ejemplo 9Carbamato de O-(9-Fluorenilmetil) N-(4-(Etoxicarbonil)Fenilo)

35 Se añadió trietilamina (0,7 ml) a una mezcla agitada de 4-aminobenzoato de etilo (0,85 g) y cloruro de 9-fluorenilmetoxicarbonilo (1,3 g) en 25 ml de diclorometano. La mezcla se agitó durante 1 h a temperatura ambiente y después se lavó con HCl 1 N, agua, $NaHCO_3$ ac. sat., y salmuera. La solución orgánica se secó sobre $MgSO_4$ se filtró y se evaporó.

55

Ejemplo 10N-Metoximetil Carbamato de O-(9-Fluorenilmetil) N-Fenilo

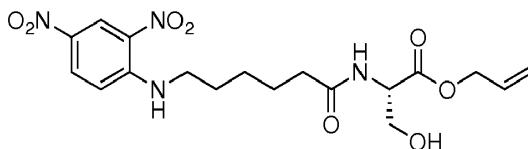
5

Se preparó disolviendo N-clorometil carbamato de O-(9-fluorenilmetil) N-fenilo (Ejemplo 14) en metanol. ^1H RMN (d6-DMSO) δ 7,86 (2H, d, J = 7 Hz), 7,42-7,22 (m, 9H), 7,14 (m, 2H), 4,83 (2H, s a), 4,47 (2H, d, J = 6 Hz), 4,18 (1H, m), 3,11 (3H, s a).

10

Ejemplo 11Conjugación de Restos que Contienen Hidroxi y Tiol con Enlazador

15 Este ejemplo demuestra que las moléculas que contienen hidroxi se conjugan fácilmente con el resto enlazador.

A. N-(6-(2,4-Dinitrofenilamino)Hexanoil-L-Serina Alil Éster.

20

Etapa 1. N-(*terc*-butoxicarbonil)-L-serina alil éster: A una solución agitada de bromuro de alilo (2,3 ml, 26,6 mmol) y cloruro de tricaprimitilamonio (4,00 g, 9,90 mmol) en CH_2Cl_2 (35 ml) se le añadió una solución de N-(*terc*-butoxicarbonil)-L-serina (1,03 g, 5,02 mmol) y NaHCO_3 (0,43 g, 5,12 mmol) en agua (16 ml). La mezcla de reacción bifásica se agitó vigorosamente a temperatura ambiente durante 48 horas. Se diluyó con agua (50 ml) y se extrajo con CH_2Cl_2 (3 x 50 ml). Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre MgSO_4 , se filtraron y se concentraron a presión reducida para producir un aceite incoloro (5,95 g). La purificación usando un cartucho de gel de sílice de 80 g de una única etapa de Thomson Instruments eluyendo con hexanos al 60 %/acetato de etilo al 40 % produjo LR2-1 (1,01 g, 82 %) en forma de un aceite incoloro. ^1H RMN (DMSO-*d*6) δ 1,37 (9H, s), 3,63 (2H, m), 4,00 (2H, m), 4,53 (2H, m), 4,89 (1H, t, J = 6,2 Hz), 5,18 (1H, dd, J = 1,4 Hz, J = 10,6 Hz), 5,30 (1H, dd, J = 1,6 Hz, J = 17,1 Hz), 5,84 (1H, m), 6,98 (1H, d, J = 8,2 Hz).

25

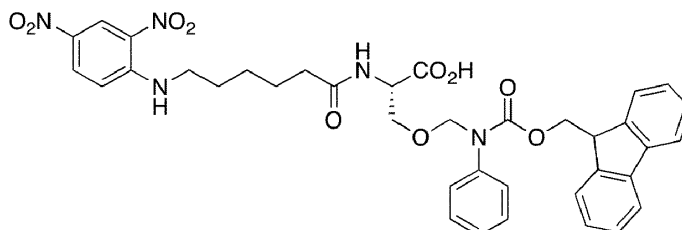
30

Etapa 2. Una solución de N-(*terc*-butoxicarbonil)-L-serina alil éster (0,175 g, 0,731 mmol) en cloruro ácido 4 M/dioxano (2 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 40 minutos. La mezcla de reacción se concentró en un evaporador rotatorio y la sal HCl en bruto se recogió en tetrahidrofurano anhidro (3 ml). A esta solución se le añadieron 6-(2,4-dinitroanilino)hexanoato de N-succinimidilo (0,288 g, 0,791 mmol) y trietilamina (102 ml, 0,731 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos y el disolvente se evaporó. El residuo se repartió entre acetato de etilo y agua y las fases se separaron. La fase orgánica se lavó con NaHCO_3 saturado y NaCl saturado. Se secó sobre MgSO_4 , se filtró y se concentró a presión reducida para producir el producto en bruto (0,293 g) en forma de un aceite de color amarillo. La purificación usando cartucho de gel de sílice de 12 g de una única etapa de Thomson Instruments eluyendo con hexanos al 50 %/acetato de etilo 50 % seguido de acetato de etilo dio el producto (0,222 g, 72 %) en forma de un aceite de color amarillo. ^1H RMN (DMSO-*d*6) δ 1,32 (2H, m), 1,52-1,64 (4H, m), 2,15 (2H, t, J = 7,0 Hz), 3,44 (2H, m), 3,59 (1H, m), 3,66 (1H, m), 4,33 (1H, m), 4,55 (2H, m), 5,02 (1H, t, J = 5,5 Hz), 5,17 (1H, m), 5,28 (1H, m), 5,83 (1H, m), 7,21 (1H, d, J = 9,5 Hz), 8,12 (1H, d, J = 7,9 Hz), 8,23 (1H, dd, J = 2,5 Hz, J = 9,4 Hz), 8,85 (2H, m).

35

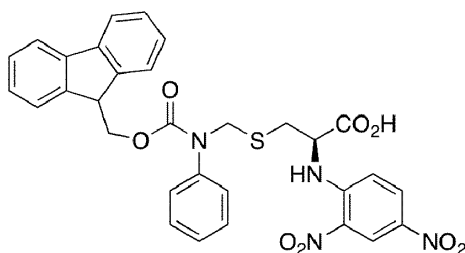
40

45

B. O-(N-(9-Fluorenilmetoxi)Carbonil)-N-Fenil)Aminometil)N-(6-(2,4-Dinitrofenilamino)Hexanoil)-Serina.

5 Etapa 1. Una solución de N-(6-(2,4-dinitrofenilamino)hexanoil-L-serina alil éster (0,050 g, 0,118 mmol), N-clorometil carbamato de O-(9-fluorenilmetil) N-fenilo (0,043 g, 0,118 mmol) y trietilamina (16,1 ml, 0,116 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro (2 ml) se calentó a reflujo durante 1 hora. Se añadieron alícuotas adicionales de N-clorometil carbamato de O-(9-fluorenilmetil) N-fenilo (0,043 g, 0,118 mmol) y trietilamina (16,1 ml, 0,116 mmol) y el reflujo se mantuvo durante 10 La solución se enfrió a temperatura ambiente, se diluyó con CH₂Cl₂, se lavó con una solución saturada de NaCl, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró a presión reducida. El material en bruto (0,145 g) se purificó usando un cartucho de gel de sílice de 12 g de una única etapa de Thomson Instruments eluyendo con hexanos al 50 %/acetato de etilo al 50 % seguido de hexanos al 30 %/acetato de etilo al 70 % para formar el intermedio alil éster (0,030 g, 33 %) en forma de un aceite de color amarillo. ¹H RMN (DMSO-*d*₆) δ 1,31 (2H, m), 1,52-1,63 (4H, m), 2,15 (2H, t, J = 7,3 Hz), 3,41 (2H, m), 3,43-3,70 (2H, m a), 4,15 (1H, a, m), 4,43-4,54 (5H, m a), 4,87 (2H, m a), 5,14 (1H, m), 5,25 (1H, m), 5,79 (1H, m), 7,12-7,38 (12, m), 7,82 (2H, d, J = 7,4 Hz), 8,21 (1H, dd, J = 2,5 Hz), J = 9,5 Hz), 8,25 (1H, d, J = 8,0 Hz), 8,84 (2H, m).

Etapa 2. Se añadió tetraquis(trifenilfosfina)paladio (0) (0,002 g, 1,7 μmol) a una solución agitada del alil éster de la Etapa 1 (0,030 g, 40 μmol) y fenilsilano (9,8 ml, 80 μmol) en tetrahidrofurano anhidro (0,5 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos y después se concentró. Se añadieron gel de sílice y CH₂Cl₂ y la mezcla se concentró de nuevo y se cargó sobre una columna corta de gel de sílice. La columna se eluyó con hexano al 30 %/acetato de etilo al 70 % seguido de acetato de etilo y finalmente acetato de etilo que contenía ácido acético al 0,5 % para generar el ácido carboxílico (0,024 g, 86 %) en forma de un aceite de color amarillo. ¹H RMN (DMSO-*d*₆) δ 1,31 (2H, m), 1,51-1,62 (4H, m), 2,14 (2H, t, J = 7,3 Hz), 3,40 (2H, m), 3,45-3,80 (2H, m a), 4,14 (1H, m a), 4,41 (3H, m a), 4,87 (2H, m a), 7,16-7,30 (12H, m), 7,82 (2H, d, J = 7,6 Hz), 8,08 (1H, d, J = 8,1 Hz), 8,20 (1H, dd, J = 2,7 Hz, J = 9,6 Hz), 8,83 (2H, m). Las cinéticas para la liberación de N-(6-(2,4-dinitrofenil)aminohexanoil)-serina de O-(N-(9-fluorenilmetoxycarbonil-N-fenil)aminometil)-serina en tampón HEPES 1 M, NaCl 15 mM, pH 7,40, 37 °C se muestran en la figura 4.

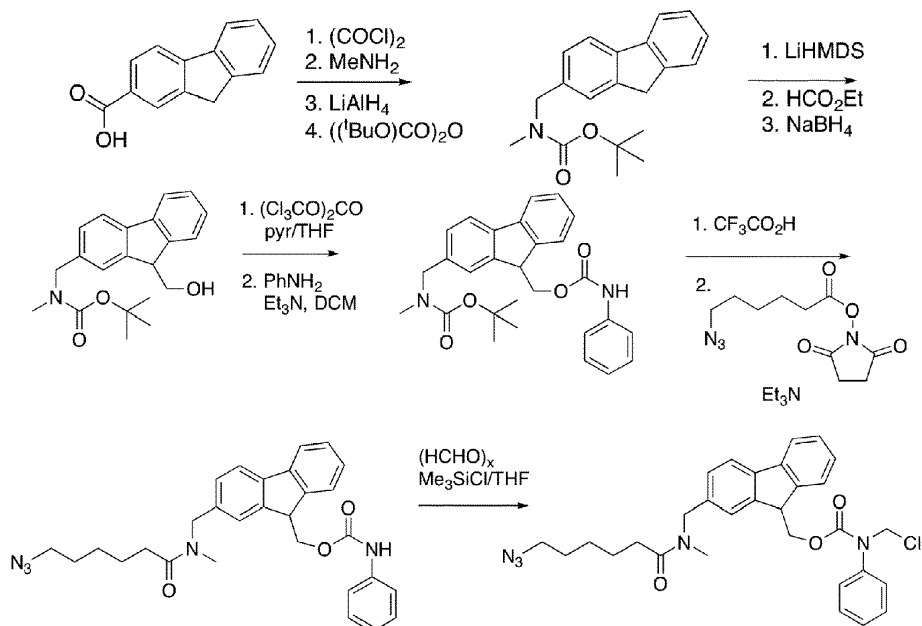
30 C. S-(N-(9-Fluorenilmetoxycarbonil)-N-Fenilamino)Metil) N-(2,4-Dinitrofenil)-Cisteína

Una solución de N-(DNP)-cisteína alil éster (82 mg) y N-clorometil carbamato de O-(9-fluorenilmetil) N-fenilo (91 mg) en diclorometano (1 ml) se trató con trietilamina (35 μl) durante 1 hora, después se filtró a través de gel de sílice usando 1:1 de acetato de etilo/hexano y se concentró a sequedad. El producto se purificó por cromatografía sobre gel de sílice.

Una solución del alil éster, fenilsilano (75 μl), y tetraquis(trifenilfosfina)paladio (15 mg) en THF (2,5 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos y después se evaporó a sequedad. El residuo se disolvió en diclorometano y se cargó sobre una columna de 5 ml de gel de sílice, que se eluyó secuencialmente con 1:4 de acetato de etilo/hexano, acetato de etilo, y ácido acético al 0,5 %/acetato de etilo. Las fracciones que contenían producto se combinaron y se evaporaron. ¹H RMN (d₆-DMSO): δ 13,7 (1H, s a), 9,01 (1H, d, J = 7 Hz), 8,85 (1H, d, J = 3 Hz), 8,25 (1H, dd, J = 3,9 Hz), 7,82 (1H, d, J = 7), 7,40-7,25 (m, 7H), 7,25-7,15 (m, 3H), 7,11 (m, 2H), 4,96 (m, 1H), 4,81 (s, 2H), 4,30 (m, 2H), 4,08 (m, 1H), 3,18 (m, 2H). Las cinéticas de liberación de N-(2,4-dinitrofenil)-cisteína de S-(N-(9-fluorenilmetoxycarbonil-N-fenil)aminometil) N-(2,4-dinitrofenil)-cisteína en tampón HEPES 0,1 M, NaCl 15 mM, pH 7,40, 37 °C se muestran en la figura 3.

Ejemplo 12

N-Clorometil Carbamato de O-((9-(2-(N-(6-Azidohexanoil) N-Metil)Aminometil)Fluorenil)Metil) N-Fenilo



5

10

15

20

25

30

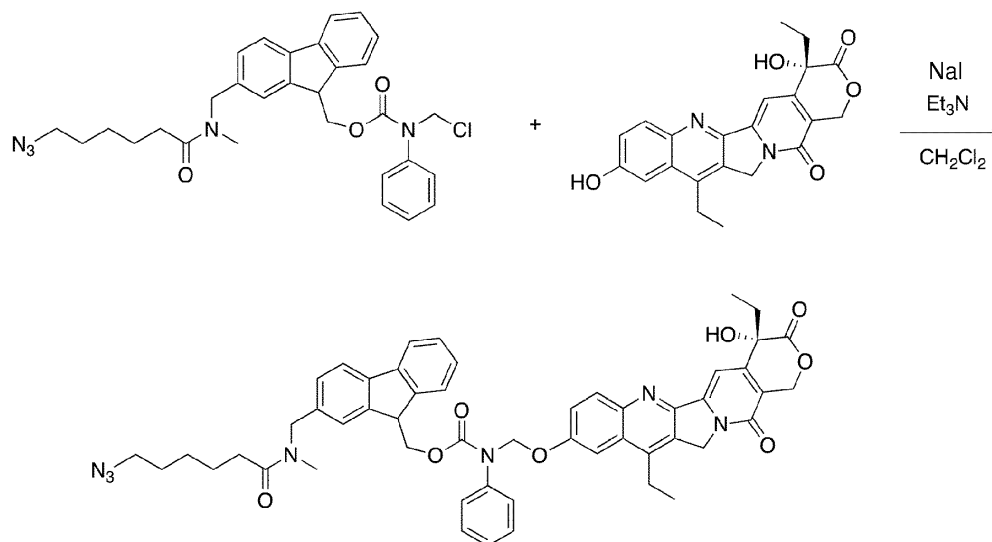
Se añade una solución de cloruro de fluoreno-2-carbonilo (preparada a partir de ácido fluoreno-2-carboxílico y cloruro de oxalilo) en THF a metilamina acuosa (2 equivalentes molares) para preparar N-metil fluoreno-2-carboxamida. La reducción de la amida usando LiAlH_4 en éter proporciona 2-((metilamino)metil)fluoreno. La amina se protege por reacción con dicarbonato de di-terc-butilo para proporcionar 2-((N-^tBOC-N-metilamino)metil)fluoreno.

Una solución del 2-((N-^tBOC-N-metilamino)metil)fluoreno en tetrahidrofurano anhidro (THF) se enfría a -78°C , y después se trata con una solución de bis(trimetilsilil)amida de litio en THF (1,2 equivalentes molares). Después de 1 h, se añade formiato de etilo y la mezcla se deja calentar a temperatura ambiente. La mezcla se diluye con acetato de etilo y se lava sucesivamente con HCl 0,1 N, agua, NaHCO_3 acuoso saturado, y salmuera, después se seca sobre MgSO_4 , se filtra y se evapora para proporcionar el 2-((N-^tBOC-N-metilamino)metil)-fluoreno-9-carboxaldehído. Este compuesto se disuelve en metanol y se trata con NaBH_4 para proporcionar 9-(2-((N-^tBOC-N-metilamino)metil)fluorenil)metanol.

El 9-(2-((N-^tBOC-N-metilamino)metil)fluorenil)metanol se disuelve en THF y se trata con trifosgeno y piridina de acuerdo con el procedimiento general del Ejemplo 2 para proporcionar el cloroformiato. El cloroformiato se hace reaccionar con anilina de acuerdo con el método del Ejemplo 3 para proporcionar N-fenilcarbamato de O-9-(2-((N-^tBOC-N-metilamino)metil)fluorenil)metilo).

El carbamato se disuelve en ácido trifluoroacético para retirar el grupo protector ^tBOC. Después de la evaporación a sequedad, la amina resultante se disuelve en THF y se trata con N-(6-azidohexanoil)succinimida y trietilamina (2 equivalentes) para proporcionar N-fenilcarbamato de O-9-(2-((N-(6-azidohexanoil)-N-metilamino)metil)fluorenil)metilo).

La reacción de N-fenilcarbamato de O-9-(2-((N-(6-azidohexanoil)-N-metilamino)metil)fluorenil)metil con paraformaldehído en 1:1 de THF/clorotrimetilsilano proporciona el producto carbamato de N-clorometilo.

Ejemplo 13Compuesto Enlazador-Fármaco con SN-38

5

Este ejemplo demuestra la unión de una molécula de fármaco con los compuestos de la invención, particularmente a través de un grupo fenol en la molécula de fármaco.

10 Una solución del carbamato de N-clorometilo del Ejemplo 12 (1 equivalente), SN-38 (1 equivalente) e yoduro sódico (10 equivalentes) en acetona anhidra se trata con trietilamina (1 equivalente). El producto se purifica por cromatografía sobre gel de sílice.

Ejemplo 14

15

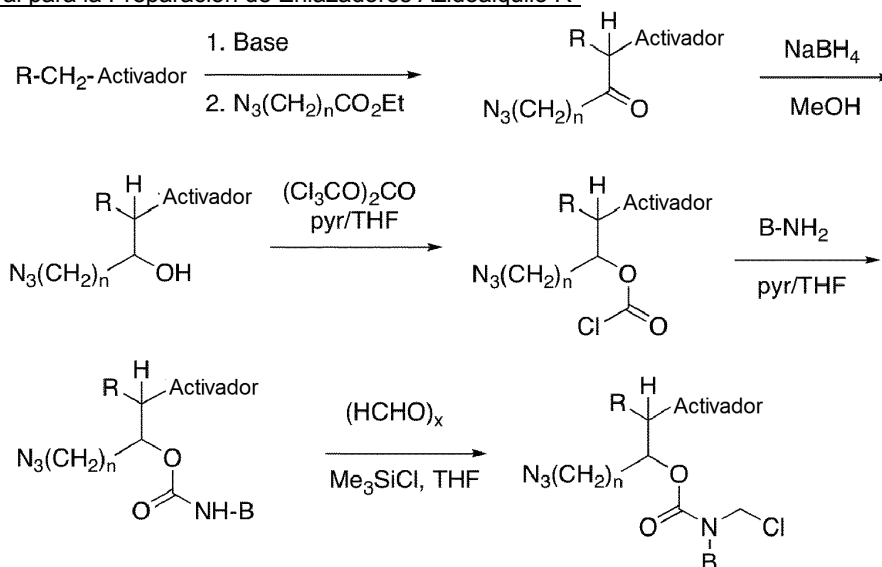
Conjugación con PEG

Una mezcla de PEG-alquino 40 kDa (2,5 μ mol; preparada por reacción de PEG-amina 40 kDa con el N-hidroxisuccinimida éster de ácido 5-hexinoico) y una azida-enlazador (50 μ mol; por ejemplo, la molécula del Ejemplo 12) en THF (3 ml) y agua (1,6 ml) se trata con una mezcla recién preparada de CuSO_4 0,1 M (50 μ l), tris[(1-bencil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil]amina 50 mM (TBTA) en DMSO (50 μ l), y ascorbato sódico 0,1 M (200 μ l). Después de 12 horas a temperatura ambiente, la mezcla se concentra en un evaporador rotatorio para retirar THF, se diluye con agua hasta 2 ml y se filtra con gel en una columna Sephadex G25. Después, el flujo que contiene macromoléculas se liofiliza, y el residuo se disuelve en 2 ml de THF y el producto se precipita mediante la adición de 5 ml de metil terc-butil éter. Si es necesario, la filtración en gel y las etapas posteriores se repiten.

25

Ejemplo 15

Esquema General para la Preparación de Enlazadores Azidoalquilo R⁵

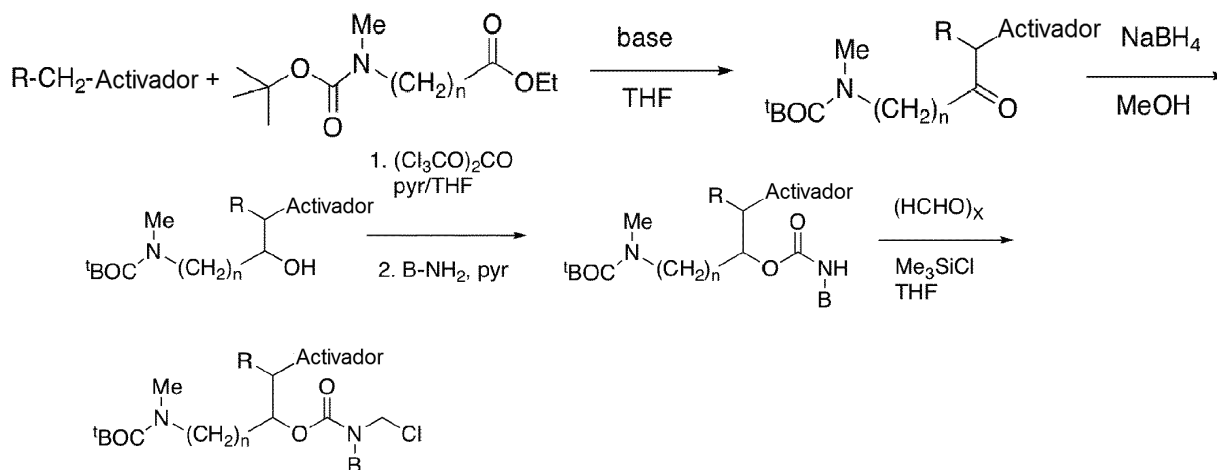


5 La condensación de Claisen de R-CH₂-Activador con un azidoalcanoato éster N₃(CH₂)_nCO₂R' (n = 3-6) en presencia de una base fuerte, por ejemplo NaH, bis(trimetilsilil)amida de litio (LiHMDS) o diisopropilamida de litio (LDA), proporciona una cetona que se reduce al alcohol por reacción con un reductor suave, por ejemplo borohidruro sódico en metanol. Después, el alcohol resultante se convierte en el carbamato a través del cloroformiato, y después en el N-clorometilcarbamato como se ha descrito anteriormente.

10

Ejemplo 16

Esquema General para la Preparación de Enlazadores Amina BOC-protégidos R⁵



20 La condensación de Claisen de R-CH₂-Activador con un ((N-*tert*-butoxicarbonil N-alquil)amino)alcanoato éster (n = 3-6) en presencia de una base fuerte, por ejemplo NaH, bis(trimetilsilil)amida de litio (LiHMDS), o diisopropilamida de litio (LDA), proporciona una cetona que se reduce al alcohol por reacción con un reductor suave, por ejemplo borohidruro sódico en metanol. Después, el alcohol resultante se convierte en el carbamato usando amina B-NH₂ como se ha descrito en el Ejemplo 3. El carbamato se convierte en el carbamato de N-clorometilo como se ha descrito en el Ejemplo 4.

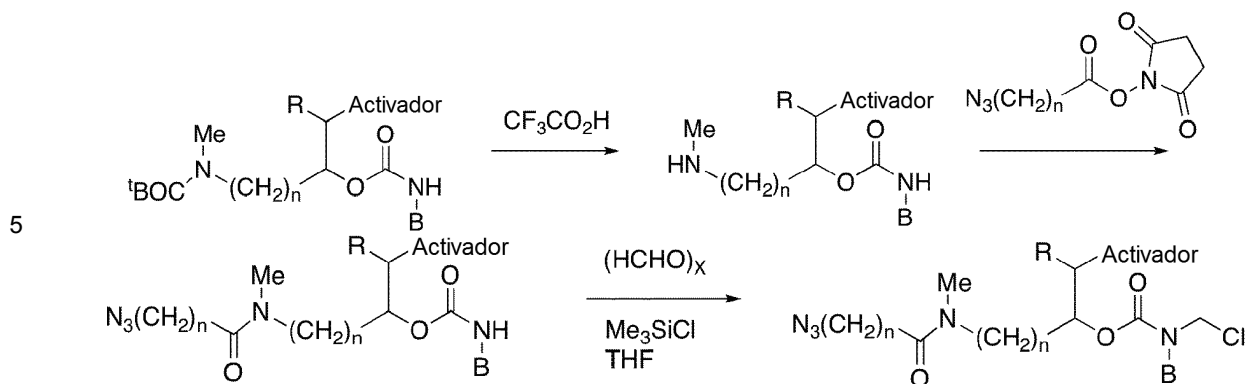
25

Después del acoplamiento con una molécula de fármaco que comprende un grupo alcohol, tiol, fenol o tiofenol, el grupo BOC se retira del carbamato por tratamiento con ácido trifluoroacético. La amina resultante se acopla con una macromolécula que comprende un ácido carboxílico usando un agente de condensación, por ejemplo una carbodiimida tal como EDCI.

30

Ejemplo 17

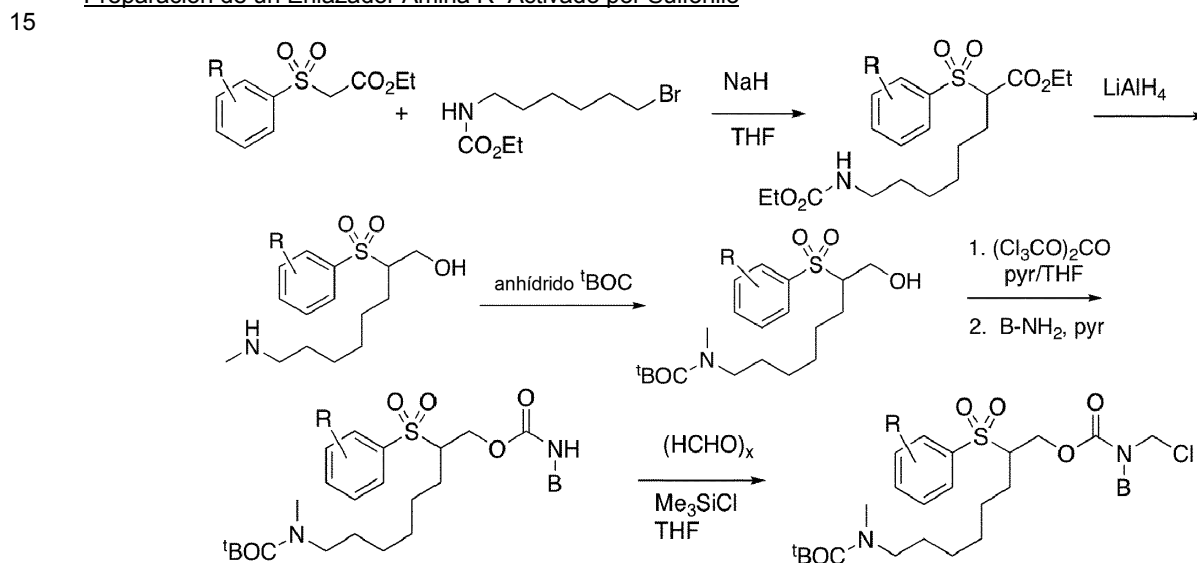
Esquema Alternativo para la Preparación de Enlazadores de Amido-Azidoalquilo R⁵



10 El grupo BOC se retira del intermedio carbamato BOC-protegido del Ejemplo 19 por tratamiento con ácido trifluoroacético, y la reacción de la amina resultante con un azidoalcanoato N-hidroxisuccinimida éster (n = 3-6) proporciona la azidoamida. Esta se convierte en el carbamato de N-clorometilo como se ha descrito en el Ejemplo 4.

Ejemplo 18

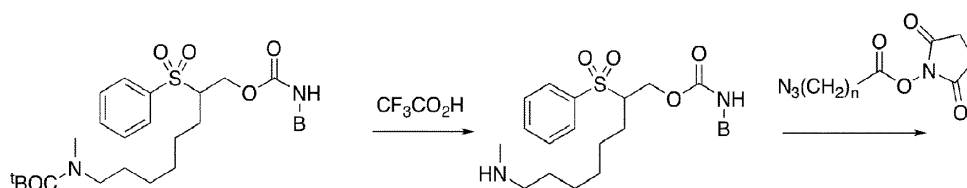
Preparación de un Enlazador Amina R⁵ Activado por Sulfonilo

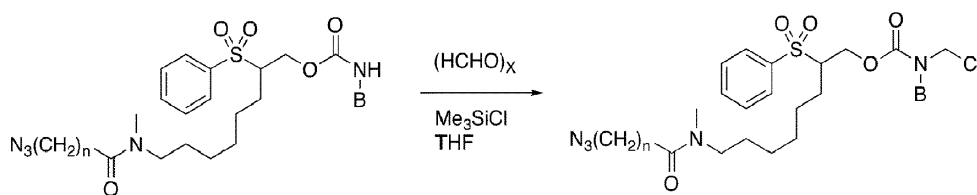


20 Un (2-fenilsulfonyl)acetato de etilo se desprotona usando exceso de NaH en THF y se alquila con carbamato de N-(6-bromohexil)etilo. El producto se reduce usando hidruro de litio y aluminio en éter para proporcionar el alcohol metilamino, que se N-protege como el BOC carbamato. El alcohol se convierte en el cloroformiato y desde éste en el carbamato y el carbamato de N-clorometil de acuerdo con los procedimientos anteriores.

25 Ejemplo 19

Preparación de un Enlazador Amido-Azida R⁵ Sulfonil-Activado

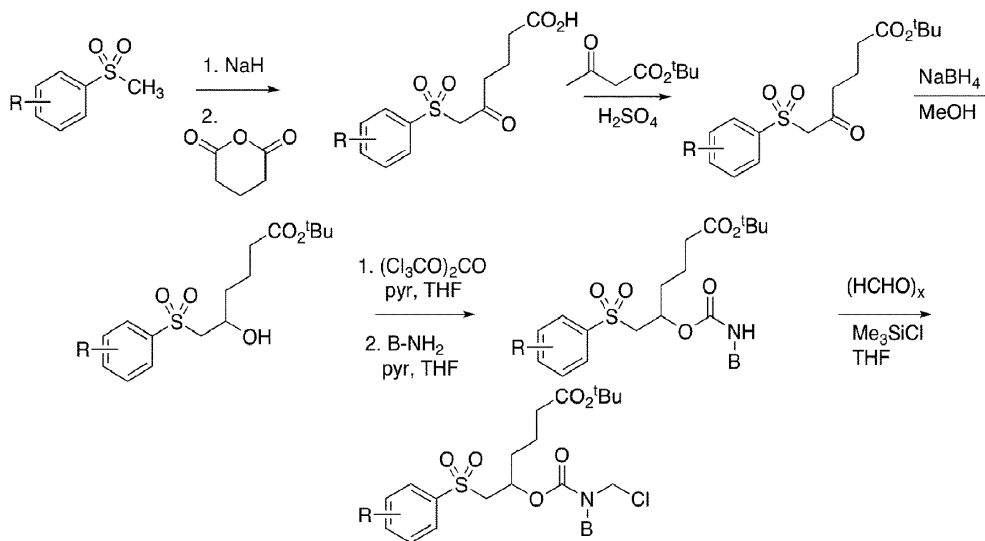




El grupo BOC se retira del intermedio carbamato BOC-protegido del Ejemplo 18 por tratamiento con ácido trifluoroacético, y la reacción de la amina resultante con un azidoalcanoato N-hidroxisuccinimida éster (n = 3-6) proporciona la azidoamida. Ésta se convierte en el carbamato de N-clorometilo como se ha descrito en el Ejemplo 4.

Ejemplo 20

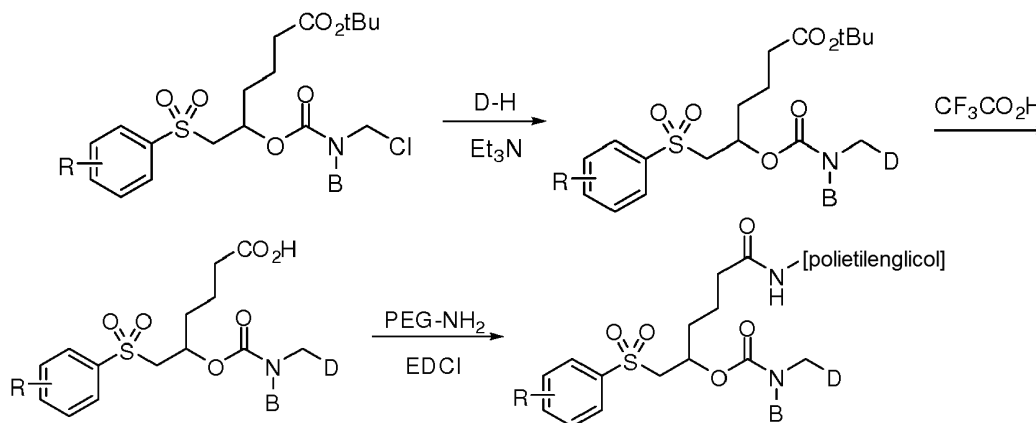
Síntesis de un enlazador de Ácido Sulfonil-Activado R⁵



Una fenil metilsulfona se desprotona con NaH en tetrahidrofurano, cuando se acila con anhídrido glutárico para proporcionar un ceto-ácido. El ácido resultante se protege como el éster terc-butílico, y la cetona se reduce usando NaBH₄. El alcohol resultante se convierte en el carbamato a través del cloroformiato, y desde éste en el carbamato de N-clorometil como se ha descrito anteriormente.

Ejemplo 21

Preparación de un Compuesto Enlazador-Fármaco con un Enlazador de Ácido Sulfonil-Activado y Conjugación con PEG



El enlazador del Ejemplo 20 se hace reaccionar con fármaco DH en presencia de 1 equivalente de trietilamina. El compuesto enlazador-fármaco protegido resultante se trata con ácido trifluoroacético, y el ácido carboxílico libre resultante obtenido se conjuga con amino-polietilenglicol usando EDCI. El conjugado se precipita en acetonitrilo

mediante la adición de metil t-butil éter (MTBE), y después se purifica por cromatografía de exclusión de tamaño.

Ejemplo 22

5 Síntesis de Péptidos Enlazados

Este ejemplo demuestra que la síntesis peptídica se realiza fácilmente usando compuestos de la invención. La síntesis peptídica se realiza usando métodos convencionales para la síntesis peptídica en fase sólida, usando una serina, triptófano, tirosina o cisteína en una forma adecuadamente protegida de tal forma que las cadenas laterales de estos residuos pueden desbloquearse selectivamente sin desprotección de otros residuos. El péptido parcialmente protegido se hace reaccionar con un exceso de un compuesto de fórmula (II) en presencia de una base suave. Después de lavar la resina, el péptido del producto se desbloquea y se escinde de la resina para proporcionar un compuesto de fórmula (III), en la que D es un péptido.

15 Como un ejemplo, CCK8 (Asp-Tyr-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂) se sintetiza sobre soporte sólido usando resina de Rink usando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo como se describe en la Patente de Estados Unidos 4.769.445. La resina amida-MBHA Fmoc-Phe-Rink comercial se hincha previamente en DMF durante 30 min, después se suspende y se agita en piperidina/DMF (1:4 en volumen, 50 ml) durante 30 min a temperatura ambiente para retirar el grupo Fmoc. El producto se aísla por filtración y se lava (3 x 50 ml cada vez) con DCM, N,N-diisopropiletilamina al 5 % (DIEA) en DCM, y DCM para dar la base libre de resina amida-MBHA Phe-Rink. Se disuelven Fmoc-Asp(O^tBu)-OH (1,23 g, 3 mmol), DCC (0,62 g, 3 mmol), y HOBt (0,69 g, 4,5 mmol) en 50 ml de 4:1 en volumen de DCM/DMF con agitación a 0 °C durante 1 hora. La resina amida-MBHA Phe-Rink (1 equiv. molar) se suspende en la mezcla de reacción filtrada (el DCU precipitado se elimina) y se agita durante 2 a 15 horas a temperatura ambiente. El producto de resina amida-MBHA Fmoc-Asp(O^tBu)-Phe-Rink se recoge por filtración y se lava con DCM. La resina amida-MBHA Fmoc-Asp(O^tBu)-Phe-Rink se suspende y se agita en piperidina/DMF (1:4 en volumen, 50 ml) durante 3 min a temperatura ambiente y después una segunda vez durante 7 min para retirar el grupo Fmoc. El producto se aísla por filtración y se lava (3 x 50 ml cada vez) con DMF y DCM para dar la base libre de la resina amida-MBHA Asp(O^tBu)-Phe-Rink. Se disuelven Fmoc-Met-OH (1,12 g, 3 mmol), DCC (0,62 g, 3 mmol) y HOBt (0,69 g, 4,5 mmol) en 50 ml de 4:1 en volumen de DCM/DMF con agitación a 0 °C durante 1 hora. Se suspende la resina amida-MBHA Asp(O^tBu)-Phe-Rink (1 equiv. molar) en la mezcla de reacción filtrada (el DCU precipitado se elimina) y se agita durante 2 a 15 horas a temperatura ambiente. El producto de resina amida-MBHA Fmoc-Met-Asp(O^tBu)-Phe-Rink se recoge por filtración y se lava con DCM y DMF. La resina amida-MBHA Fmoc-Met-Asp(O^tBu)-Phe-Rink se desprotege y se acopla secuencialmente con Fmoc-Trp-OH (1,28 g, 3 mmol), Fmoc-Gly-OH (0,89 g, 3 mmol), Fmoc-Met-OH (1,12 g, 3 mmol), Fmoc-Tyr-OH (1,37 g, 3 mmol), y Boc-Asp(O^tBu)-OH (1,23 g, 3 mmol) para proporcionar la resina amida-MBHA Boc-Asp(O^tBu)-Tyr-Met-Gly-Trp-Met-Asp(O^tBu)-Phe-Rink. La resina amida-MBHA Boc-Asp(O^tBu)-Tyr-Met-Gly-Trp-Met-Asp(O^tBu)-Phe-Rink se lava con DCM (3 x 50 ml), se suspende y se agita en una mezcla de N-clorometilcarbamato de O-(9-fluorenilmetil) N-fenilo (10 equivalentes) y trietilamina (1 equivalente) en DCM. La resina se aísla por filtración y se lava (3 x 50 ml cada vez) con DCM. La resina amida-MBHA Boc-Asp(O^tBu)-Tyr(OX)-Met-Gly-Trp-Met-Asp(O^tBu)-Phe-Rink resultante se escinde de la resina y se desbloquea agitando con una mezcla de fenol al 8 %, tianisol al 5 %, agua al 5 %, y 3,6-dioxa-1,8-octanoditiol al 3 % en ácido trifluoroacético (10 ml/g de resina) durante 4 horas. La resina se retira por filtración, y el péptido se precipita mediante la adición de 10 volúmenes de éter. El péptido en bruto se purifica por HPLC de fase inversa.

45 En otro ejemplo, un péptido que contiene cisteína se prepara por síntesis en fase sólida usando los métodos que se han descrito anteriormente, incorporando un residuo de S-(aliloxicarbonilaminometil)-cisteína [Cys(allocam)] o S-(N-[2,3,5,6-tetrafluoro-4-(N'-piperidino)fenil]-N-aliloxicarbonil-amino)cisteína [Cys(fnam)]. Antes de la escisión de la resina, el residuo de cisteína se desbloquea selectivamente usando (Ph₃P)₄Pd y fenilsilano en DCM, después se hace reaccionar con un compuesto de fórmula (II) como se ha descrito anteriormente. El péptido se desbloquea finalmente, se elimina de la resina y se purifica como se ha descrito anteriormente.

50 Ejemplo 23

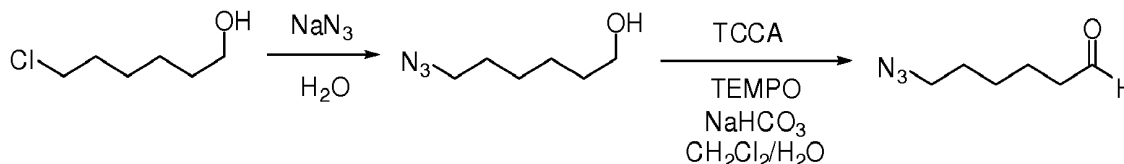
Compuestos Enlazador-Fármaco de 5-Fluorouracilo

55 Como un ejemplo de preparación de compuestos de la invención donde D es el residuo de un fármaco acoplado a través de un N heterocíclico, pueden prepararse compuestos enlazador-fármaco de fórmula (III) a partir de 5-fluorouracilo y un compuesto de fórmula (II) de forma análoga a los procedimientos usados por Taylor y Sloane, "1-Alkylcarbonyloxymethyl Prodrugs of 5-Fluorouracil (5-FU): Synthesis, Physicochemical Properties, and Topical Delivery of 5-FU", J. Pharmaceutical Sci. (1998) 87: 15-20, y por Roberts y Sloane, "Synthesis of 3-Alkylcarbonyloxymethyl Derivatives of 5-Fluorouracil", J. Heterocyclic Chem. 39: 905-910. Por lo tanto, una suspensión de un compuesto de fórmula (II) en la que L es Cl (1 mmol) y NaI (1,3 mmol) en acetonitrilo seco (1 ml) se agita en la oscuridad durante 24 h, después se filtra para proporcionar una solución del compuesto de fórmula (II) en la que L es I. El filtrado se deja reaccionar con una mezcla de 1-(aliloxicarbonil-oximetil)-5-fluorouracilo [Liu, Fullwood, y Rimmer, "Synthesis of Allyloxycarbonylmethyl-5-fluorouracil and copolymerizations with N-vinylpyrrolidinone", J. Materials Chem. (2000) 10: 1771-1777] (0,8 mmol) y 1,8-bis(dimetilamino)naftaleno a temperatura ambiente. Después de 6 h, la mezcla se diluye con éter, se agita durante 1 h y se filtra. El filtrado se concentra para proporcionar el producto

protegido en bruto, que se trata con una mezcla de tetraquis(trifenilfosfina)-paladio (0) y fenilsilano en THF anhidro durante 1 h para retirar el grupo protector aliloxicarbonilmetilo. La mezcla se evapora, y el residuo se purifica por cromatografía sobre gel de sílice para proporcionar el compuesto enlazador-fármaco de fórmula (III).

5 Ejemplo 24

Preparación de 6-azidoheptanal

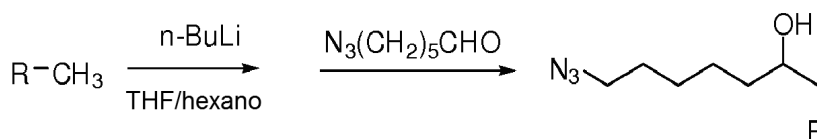


10 (1) 6-Azido-1-hexanol: una mezcla de 6-cloro-1-hexanol (25 g, 183 mmol) y azida sódica (32,5 g, 500 mmol) en 200 ml de agua se calentó a reflujo durante 20 h, después se enfrió a temperatura ambiente y se extrajo 3 veces con acetato de etilo. Los extractos combinados se lavaron con salmuera, se secaron sobre MgSO_4 , se filtraron y se concentraron para producir el producto en forma de un aceite de color amarillo pálido (28,3 g).

15 (2) 6-Azidoheptanal: Se añadió en pequeñas porciones ácido tricloroisocianúrico sólido (TCCA; 4,3 g) a una mezcla agitada vigorosamente de 6-azido-1-hexanol (7,15 g) y bicarbonato sódico (5,0 g) en diclorometano (100 ml) y agua (10 ml). La mezcla se agitó durante 30 minutos más después de la adición, y después se filtró a través de una capa de tierra de diatomeas. La fase orgánica se separó, se lavó sucesivamente con NaHCO_3 ac. sat. y salmuera, después se secó sobre MgSO_4 , se filtró y se concentró para proporcionar el producto (5,8 g), que se usó sin purificación adicional.

Ejemplo 25

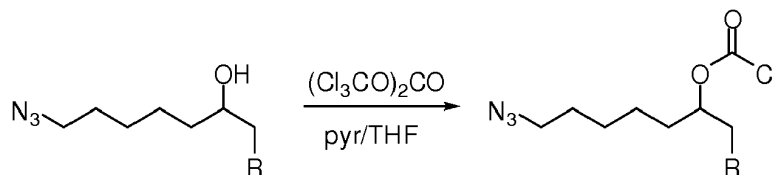
25 Preparación de Azidoalcoholes



30 Se añadió gota a gota una solución 1,6 M de n-butil litio (3,1 ml, 5,0 mmol) en hexano a una solución agitada de R-CH_3 (5,0 mmol) en tetrahidrofurano anhidro (THF) (15 ml) enfriado a -78°C . Después de la adición, el baño de refrigeración se retiró y la mezcla se dejó calentar lentamente a 0°C durante aproximadamente 30 min. Después, la mezcla se enfrió de nuevo a -78°C , y se añadió 6-azidoheptanal (5,5 mmol). Después de agitar durante 15 minutos, el baño de refrigeración se retiró y la mezcla se dejó calentar. En el momento en el que la mezcla se volvió transparente, se añadieron 5 ml de NH_4Cl ac. saturado y la mezcla se dejó continuar en calentamiento a temperatura ambiente. La mezcla se diluyó con acetato de etilo, se lavó sucesivamente con agua y salmuera, y después se secó sobre MgSO_4 , se filtró y se evaporó para proporcionar el producto en bruto en forma de un aceite. La cromatografía sobre gel de sílice usando un gradiente de acetato de etilo en hexano proporcionó los productos purificados.

40 Los compuestos preparados de acuerdo con este método incluyen:

- 45 1-(4-(trifluorometil)fenilsulfonil)-7-azido-2-heptanol ($\text{R-CH}_3 = 4$ -(trifluorometil)fenil metil sulfona);
 1-(4-clorofenilsulfonil)-7-azido-2-heptanol ($\text{R-CH}_3 = 4$ -clorofenil metil sulfona);
 1-(fenilsulfonil)-7-azido-2-heptanol ($\text{R-CH}_3 =$ fenil metil sulfona);
 1-(4-metilfenilsulfonil)-7-azido-2-heptanol ($\text{R-CH}_3 = 4$ -metilfenil metil sulfona);
 45 1-(4-metoxifenilsulfonil)-7-azido-2-heptanol ($\text{R-CH}_3 = 4$ -metoxifenil metil sulfona);
 1-(2,4,6-trimetilfenilsulfonil)-7-azido-2-heptanol ($\text{R-CH}_3 = 2,4,6$ -trimetilfenil metil sulfona);
 1-(morfolinosulfonil)-7-azido-2-heptanol ($\text{R-CH}_3 = 4$ -(metilsulfonil)-morfolina);
 1-(metanosulfonil)-7-azido-2-heptanol ($\text{R-CH}_3 =$ dimetil sulfona);
 1-ciano-7-azido-2-heptanol ($\text{R-CH}_3 =$ acetonitrilo);
 50 1-(morfolinocarbonil)-7-azido-2-heptanol ($\text{R-CH}_3 = 4$ -acetilmorfolina); y
 1-(9-fluorenil)-7-azido-2-heptanol (" $\text{R-CH}_3 =$ fluoreno).

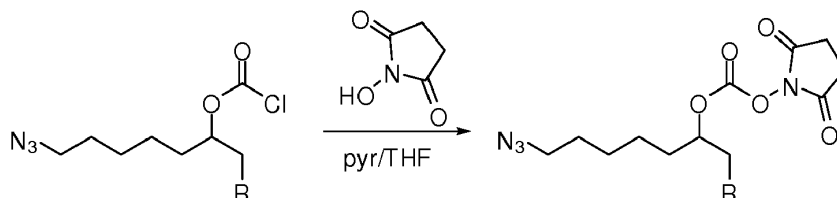
Ejemplo 26Preparación de cloroformatos azido-enlazador

10 Se añadió gota a gota piridina (160 μ l) a una solución agitada del azidoalcohol del Ejemplo 25 (1,0 mmol) y trifosgeno (500 mg) en 15 ml de THF anhidro. La suspensión resultante se agitó durante 10 minutos, después se filtró y se concentró para proporcionar el cloroformiato en bruto en forma de un aceite.

Los compuestos preparados de acuerdo con este método incluyen:

15 cloroformiato de 1-(4-(trifluorometil)fenilsulfonil)-7-azido-2-heptilo;
 cloroformiato de 1-(4-clorofenilsulfonil)-7-azido-2-heptilo;
 cloroformiato de 1-(fenilsulfonil)-7-azido-2-heptilo;
 cloroformiato de 1-(4-metilfenilsulfonil)-7-azido-2-heptilo;
 cloroformiato de 1-(4-metoxifenilsulfonil)-7-azido-2-heptilo;
 cloroformiato de 1-(2,4,6-trimetilfenilsulfonil)-7-azido-2-heptilo;
 cloroformiato de 1-(morfolinosulfonil)-7-azido-2-heptilo;
 cloroformiato de 1-(metanosulfonil)-7-azido-2-heptilo;
 cloroformiato de 1-ciano-7-azido-2-heptilo;
 cloroformiato de 1-(morfolinocarbonil)-7-azido-2-heptilo; y
 cloroformiato de 1-(9-fluorenil)-7-azido-2-heptilo.

25 En la ruta hasta un sistema modelo que carece de la funcionalidad activadora, se preparó cloroformiato de 6-azidohexilo como se ha descrito anteriormente, partiendo de 6-azidohexanol.

Ejemplo 27Preparación de carbonatos azido-enlazador-HSE

35 Una solución del cloroformiato del Ejemplo 26 en 15 ml de THF seco se trató sucesivamente con N-hidroxisuccinimida (350 mg) y piridina (250 μ l) durante 10 minutos. Después, la mezcla se concentró, y el residuo se disolvió de nuevo en acetato de etilo. Después del lavado con HCl 0,1 N, agua, NaHCO₃ sat., agua, y salmuera, la solución se secó sobre MgSO₄ se filtró y se evaporó. En algunos casos, el carbonato HSE cristalizó espontáneamente, y se recrystalizó en acetato de etilo/hexano. En otros casos, el carbonato HSE en bruto se sometió en primer lugar a cromatografía sobre gel de sílice usando un gradiente de acetato de etilo en hexano seguido de cristalización. Todos los compuestos eran cristalinos con la excepción del obtenido de 1-(metanosulfonil)-7-azido-2-heptanol.

Los compuestos preparados de acuerdo con este método incluyen:

45 carbonato de O-[1-(4-(trifluorometil)fenilsulfonil)-7-azido-2-heptil]-O'-succinimidilo;
 carbonato de O-[1-(4-clorofenilsulfonil)-7-azido-2-heptil]-O'-succinimidilo;
 carbonato de O-[1-(fenilsulfonil)-7-azido-2-heptil]-O'-succinimidilo;
 carbonato de O-[1-(4-metilfenilsulfonil)-7-azido-2-heptil]-O'-succinimidilo;
 carbonato de O-[1-(4-metoxifenilsulfonil)-7-azido-2-heptil]-O'-succinimidilo;
 50 carbonato de O-[1-(2,4,6-trimetilfenilsulfonil)-7-azido-2-heptil]-O'-succinimidilo;
 carbonato de O-[1-(morfolinosulfonil)-7-azido-2-heptil]-O'-succinimidilo;
 carbonato de O-[1-(metanosulfonil)-7-azido-2-heptil]-O'-succinimidilo;
 carbonato de O-[1-ciano-7-azido-2-heptil]-O'-succinimidilo;
 carbonato de O-[1-(morfolinocarbonil)-7-azido-2-heptil]-O'-succinimidilo;

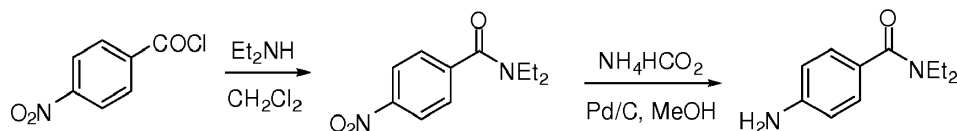
carbonato de O-[1-(9-fluorenil)-7-azido-2-heptil]-O'-succinimidilo;

También se preparó de acuerdo con este método carbonato de O-[6-azidohexil]-O'-succinimidilo, partiendo de cloroformiato de 6-azidohexilo.

5

Ejemplo 28

Preparación de 4-(N,N-dietilcarboxamido)anilina



10

(1) 4-Nitrobenzamida de N,N-dietilo: Se añadió dietilamina (5,6 ml) a una solución enfriada con hielo de cloruro de 4-nitrobenzoilo (5,0 g) en 100 ml de DCM. Después de 1 h, la mezcla se lavó sucesivamente con agua, NaHCO₃ ac. sat., y salmuera, después se secó sobre MgSO₄, se filtró y se evaporó para proporcionar un líquido incoloro que cristalizó después de un periodo de reposo. La recristalización en acetato de etilo/hexano proporcionó el producto en forma de cristales de color amarillo pálido (4,6 g).

15

(2) 4-(N,N-Dietilcarboxamido)anilina: Una mezcla de 4-nitrobenzamida N,N-dietilo (4,44 g) y paladio al 10 % sobre carbono (0,2 g) en 100 ml de metanol se trató con formiato amónico (4,0 g) durante 2 h a temperatura ambiente. La mezcla se filtró a través de tierra de diatomeas y se concentró. El residuo se disolvió de nuevo en DCM, se lavó sucesivamente con Na₂CO₃ 0,5 M, agua, y salmuera, después se secó sobre MgSO₄, se filtró y se evaporó para proporcionar un material cristalino. La recristalización en acetato de etilo/hexano proporcionó el producto anilina.

20

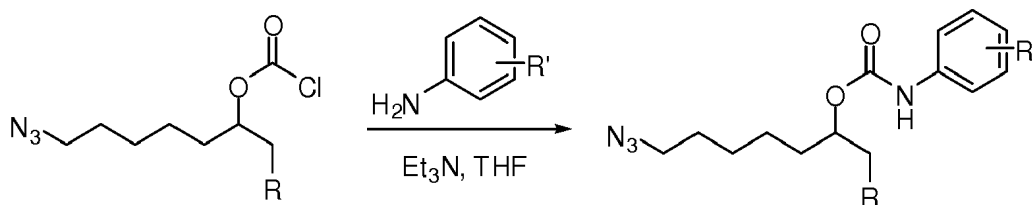
También se preparó de acuerdo con el mismo procedimiento 4-(morfolinocarbonil)anilina reemplazando dietilamina con morfolina.

25

Ejemplo 29

Preparación de Azidocarbamatos

30



El cloroformiato en bruto preparado a partir de 2,5 mmol de azidoalcohol de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 26 se disolvió en 20 ml de THF, y se añadieron la anilina (2,5 mmol) y trietilamina (0,7 ml, 5,0 mmol). Después de 1 h, la mezcla se diluyó con acetato de etilo, se lavó sucesivamente con HCl 1 N, agua, NaHCO₃ sat., y salmuera, después se secó sobre MgSO₄, se filtró y se evaporó. El residuo se sometió a cromatografía sobre gel de sílice usando acetato de etilo/hexano para proporcionar el producto carbamato.

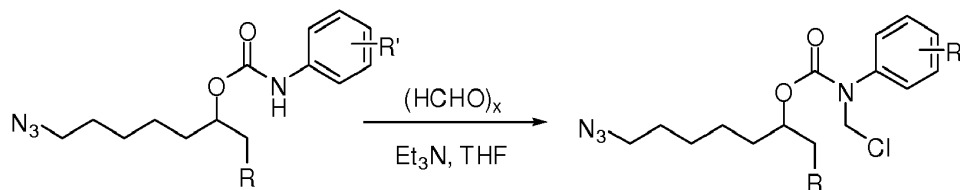
35

Los compuestos preparados de acuerdo con este método incluyen:

40

carbamato de O-[1-(fenilsulfonyl)-7-azido-2-heptil]-N-[4-(dietilcarboxamido)fenilo];
 carbamato de O-[1-(morfolinosulfonyl)-7-azido-2-heptil]-N-[4-(dietilcarboxamido)fenilo];
 carbamato de O-[1-(metanosulfonyl)-7-azido-2-heptil]-N-[4-(dietilcarboxamido)fenilo];
 carbamato de O-[1-(fenilsulfonyl)-7-azido-2-heptil]-N-[4-(morfolinocarboxamido)fenilo]; y
 carbamato de O-[1-(fenilsulfonyl)-7-azido-2-heptil]-N-[4-(morfolinosulfonyl)fenilo].

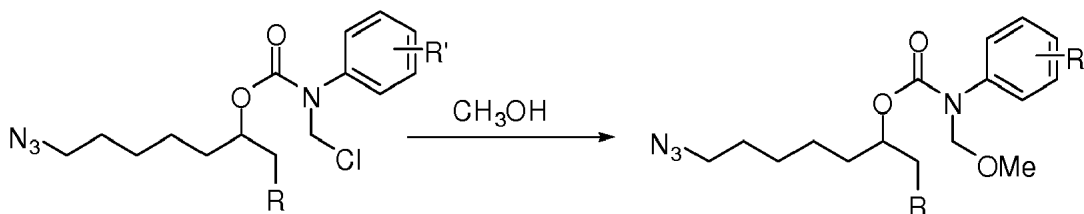
45

Ejemplo 30Preparación de carbamatos de N-clorometilo

10 Una mezcla del azidocarbamato del Ejemplo 29 (1,0 mmol), paraformaldehído (45 mg), clorotrimetilsilano (1 ml), y THF (1 ml) en un vial cerrado herméticamente de 20 ml se calentó en un baño a 55 °C durante 17 h. Después de enfriar a temperatura ambiente, el vial se abrió y la mezcla se concentró en un evaporador rotatorio para dar un aceite pegajoso, que se recogió en acetato de etilo y se concentró de nuevo. El residuo se disolvió en 2:1 de acetato de etilo/hexano, se filtró y se concentró para proporcionar el carbamato de N-clorometilo, que se usó sin purificación adicional.

15 Los compuestos preparados de acuerdo con este método incluyen:

20 carbamato de O-[1-(fenilsulfonil)-7-azido-2-heptil]-N-[4-(dietilcarboxamido)fenil]-N-clorometilo; carbamato de O-[1-(morfolinosulfonil)-7-azido-2-heptil]-N-[4-(dietilcarboxamido)fenil]-N-clorometilo; carbamato de O-[1-(metanosulfonil)-7-azido-2-heptil]-N-[4-(dietilcarboxamido)fenil]-N-clorometilo; y carbamato de O-[1-(morfolinocarbonil)-7-azido-2-heptil]-N-[4-(dietilcarboxamido)fenil]-N-clorometilo, también se preparó carbamato de O-[6-Azidohexil]-N-[4-(dietilcarboxamido)fenil]-N-clorometilo en la ruta hasta un compuesto de control que carecía de un grupo activador.

Ejemplo 31Preparación de carbamatos de N-alcoximetilo

30 El carbamato de N-clorometilo del Ejemplo 30 (0,4 mmol) se disuelve en 5 ml de alcohol seco. Después de 1 h, la mezcla se evapora a sequedad, y el residuo se cromatografía sobre gel de sílice (acetato de etilo/hexanos) para proporcionar el producto.

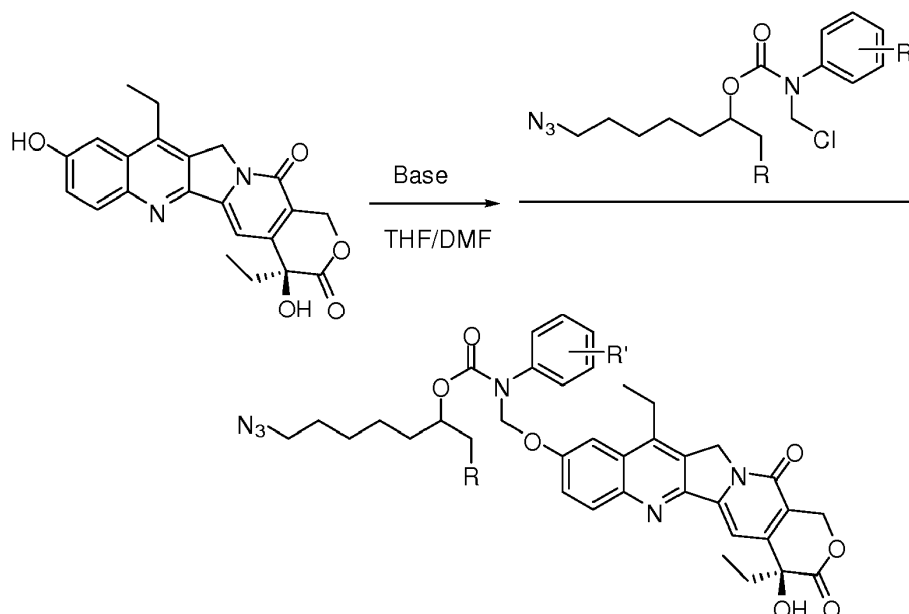
Los compuestos preparados de acuerdo con este método incluyen:

35 carbamato de O-[1-(fenilsulfonil)-7-azido-2-heptil]-N-[4-(dietilcarboxamido)fenil]-N-metoximetilo; carbamato de O-[1-(morfolinosulfonil)-7-azido-2-heptil]-N-[4-(dietilcarboxamido)fenil]-N-metoximetilo; y carbamato de O-[1-(metanosulfonil)-7-azido-2-heptil]-N-[4-(dietilcarboxamido)fenil]-N-metoximetilo. También se preparó carbamato de O-[6-Azidohexil]-N-[4-(dietilcarboxamido)fenil]-N-metoximetilo en la ruta hasta un compuesto de control que carecía de un grupo activador.

40

Ejemplo 32

Preparación de azido-enlazador-SN38



5

Procedimiento 1 (Base = DBU). Una suspensión de SN-38 (7-etil-10-hidroxi-camptotecina) (40 mg, 0,1 mmol) en 5 ml de THF se trató con 16,5 μ l de 1,8-diazabicyclo[5,4,0]undec-7-eno (DBU). Se formó una solución dorada transparente después de 30 minutos. Se añadió una solución del carbamato de N-clorometilo del Ejemplo 30 (0,11 mmol) en 1 ml de THF, dando como resultado la formación de un precipitado pegajoso. Después de 30 minutos, el análisis por HPLC indicó una conversión de ~40 % de SN-38 en el aducto de azida-enlazador-SN38. Se añadió más cantidad de DBU (20 μ l) y carbamato de N-clorometilo (0,04 mmol). Después de 15 minutos, la mezcla se inactivó mediante la adición de ácido cítrico acuoso al 10 % y se extrajo con diclorometano (DCM). El extracto se lavó sucesivamente con ácido cítrico al 10 %, agua, y salmuera, después se secó sobre MgSO₄ se filtró y se evaporó. El residuo se disolvió en DCM, se filtró y se evaporó para proporcionar el producto.

Procedimiento 2 (Base = LiHMDS). Una suspensión de SN-38 (42 mg) en 5 ml de 4:1 de THF/DMF se enfrió en un baño a -78 °C y se trató gota a gota con una solución 1,0 M de bis(trimetilsililamida) de litio en THF (150 μ l). La mezcla se volvió de color verde oscuro tras la adición de base, seguido de la formación de un color dorado oscuro. Después de la finalización de la adición, la mezcla se dejó calentar a temperatura ambiente y se añadió una solución del carbamato de N-clorometilo del Ejemplo 30 (0,2 μ mol) en 1 ml de THF. Después de 10 minutos, la reacción se interrumpió mediante la adición de ácido cítrico acuoso al 10 % y se extrajo con diclorometano (DCM). El extracto se lavó sucesivamente con ácido cítrico al 10 %, agua, y salmuera, después se secó sobre MgSO₄, se filtró y se evaporó para proporcionar un material oleoso de color amarillo. La trituración con agua para retirar el exceso de DMF proporcionó el producto en bruto en forma de un sólido de color amarillo. El residuo se disolvió en DCM y se sometió a cromatografía sobre gel de sílice usando un gradiente de acetona en hexano para proporcionar el producto purificado.

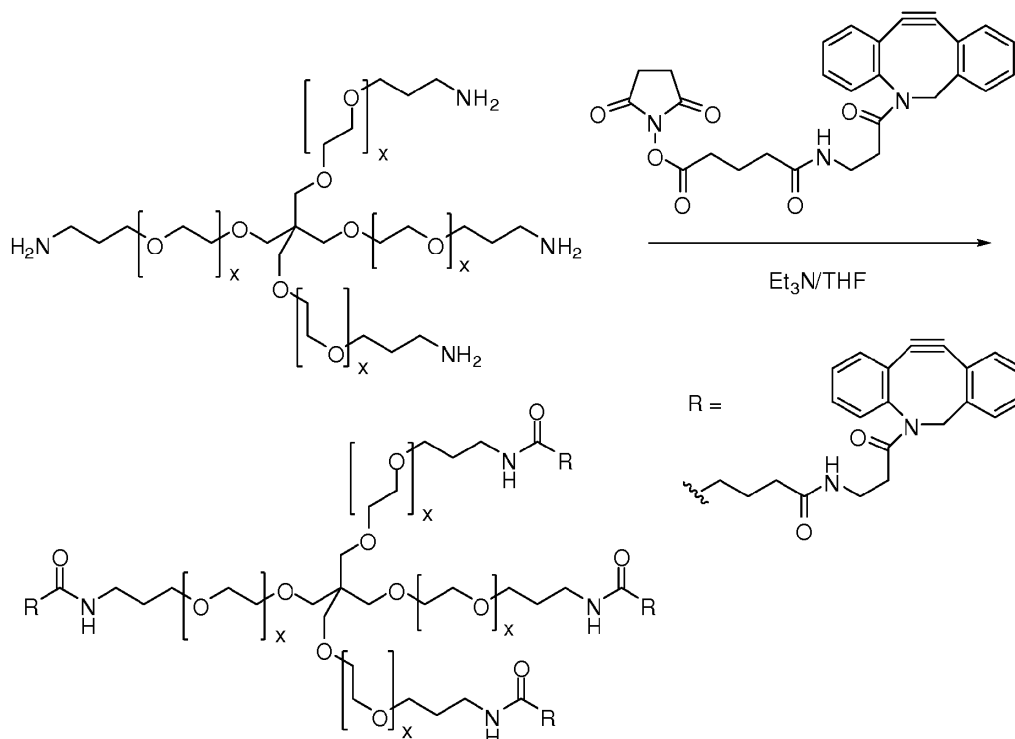
Los productos preparados de acuerdo con este procedimiento incluyen:

30

- R = fenilsulfonilo, R' = 4-(N,N-dietilcarboxamido);
- R = morfolinosulfonilo, R' = 4-(N,N-dietilcarboxamido); y
- R = metanosulfonilo, R' = 4-(N,N-dietilcarboxamido).

35

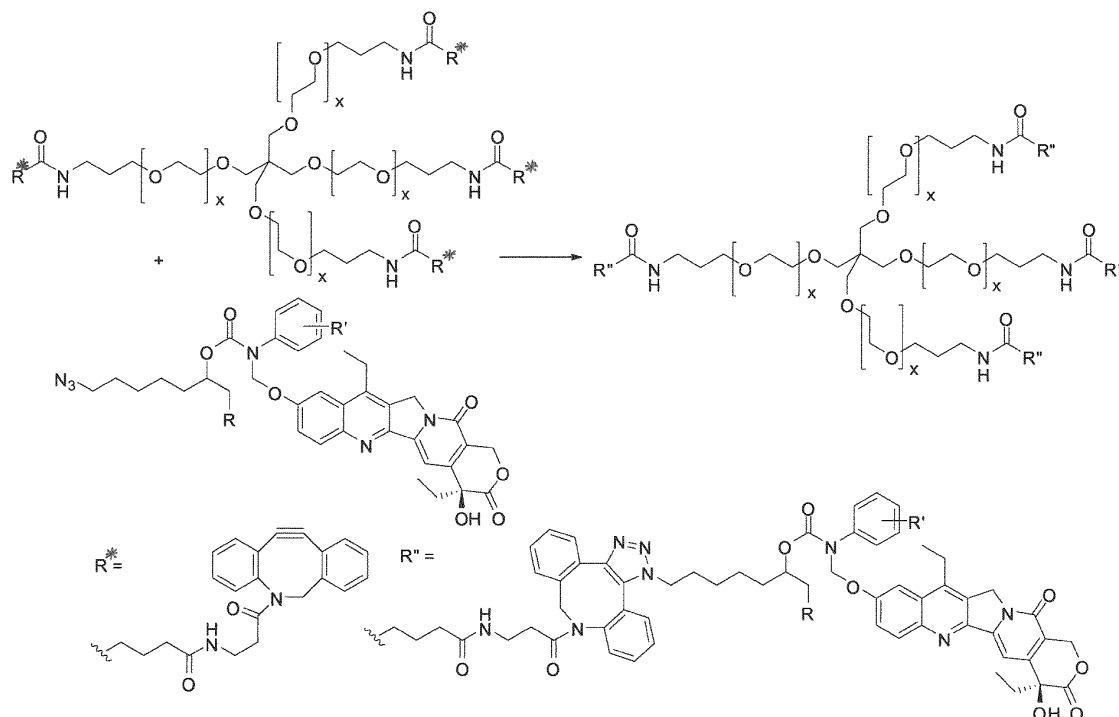
Ejemplo 33

Preparación de PEG-[DBCO]₄ de 4 brazos

5

10

Una solución de polietilenglicol de 4 brazos 40 kDa con grupos terminales aminopropilo que tenía un núcleo de pentaeritritol (NOF America, PTE400PA) (500 mg, 12,5 μ mol), trietilamina (20 μ l), y succinimidil éster del ácido 6-aza-5,9-dioxo-9-(1,2-dideshidrodibenzo[*b,f*]azocin-5(6H)-il)nonanoico ("DBCO-NHS", Click Chemistry Tools, Macon, GA) (36 mg, 75 μ mol) en 5 ml de THF se agitó durante 24 h a temperatura ambiente. El producto se precipitó mediante la adición de la mezcla de reacción a 50 ml de metil terc-butil éter (MTBE). El precipitado se recogió por filtración al vacío y se secó al vacío para proporcionar 510 mg de producto.

Ejemplo 34Preparación de Conjugados de PEG-SN38 de 4 Brazos Liberables

5

Una solución de PEG-[DBCO]₄ de 4 brazos (100 mg, 2,0 μmol DBCO) y el azida-enlazador-SN38 del Ejemplo 32 (10 μmol) en 1,5 ml de THF se mantuvo a temperatura ambiente durante 21 horas. La mezcla se concentró, después se disolvió de nuevo en metanol y se dializó (membrana de corte de 10 kDa) frente a metanol para retirar la azida libre. Después de la concentración en un evaporador rotatorio, el producto se disolvió en 2 ml de THF y se precipitó mediante la adición de 10 ml de MTBE. El precipitado se recogió por filtración al vacío y se secó al vacío para proporcionar el conjugado de producto. El análisis por HPLC (columna 300A C4 Jupiter (Phenomenex), con termostato a 40 °C) usando un gradiente de acetonitrilo al 20-100 % en agua + TFA al 0,1 % no demostró que estuviera presente SN-38 sin conjugar o azida libre. Después, el contenido de SN-38 se determinó midiendo la absorbancia UV de una solución acuosa usando $\epsilon = 22.500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 361 nm.

10

15

Los conjugados liberables preparados de acuerdo con este procedimiento incluyen: R = fenilsulfonilo; R = metanosulfonilo; y R = morfolinosulfonilo, teniendo cada uno R' = 4-(N,N-dietilcarboxamido). Como control, el conjugado que carecía del grupo activador se preparó de acuerdo con el mismo procedimiento.

20

Ejemplo 35Liberación de SN-38 de conjugados PEG-SN38

Se disolvieron muestras de conjugados SN-38 de 4 brazos del Ejemplo 34 donde R' = 4-N,N-dietilcarboxamido y R = fenilsulfonilo o metanosulfonilo en tampón y se mantuvieron a 37 °C. Se inyectaron periódicamente alícuotas de 20 μl en HPLC (columna 300A C4 Jupiter (Phenomenex), termostregulada a 40 °C) y se analizaron usando un gradiente del 20-100 % de acetonitrilo en agua + TFA al 0,1% usando detección de fluorescencia (excitación 380 nm; emisión 515 nm). En estas condiciones, SN-38 libre eluyó a los 5 min y el conjugado eluyó a los 7 min. Se midieron las áreas de pico y se usaron para calcular la velocidad de reacción por ajuste exponencial.

30

El conjugado donde R' = 4-N,N-dietilcarboxamido y R = fenilsulfonilo en bicina 0,1 M, pH 8,5, 37 °C liberó SN-38 con un $T_{1/2} = 1,6 \text{ h}$, mientras que el conjugado donde R' = 4-N,N-dietilcarboxamido y R = metanosulfonilo liberó SN-38 con un $T_{1/2} = 9 \text{ h}$ en las mismas condiciones.

35

Ejemplo 36Farmacocinética de conjugados PEG-SN38 de 4 brazos en ratones

Se prepararon soluciones de dosificación disolviendo conjugados PEG-SN38 de 4 brazos del Ejemplo 34 en acetato sódico 10 mM, pH 5,0, para dar una concentración final de SN-38 de 1 mM determinada por absorbancia UV a 361

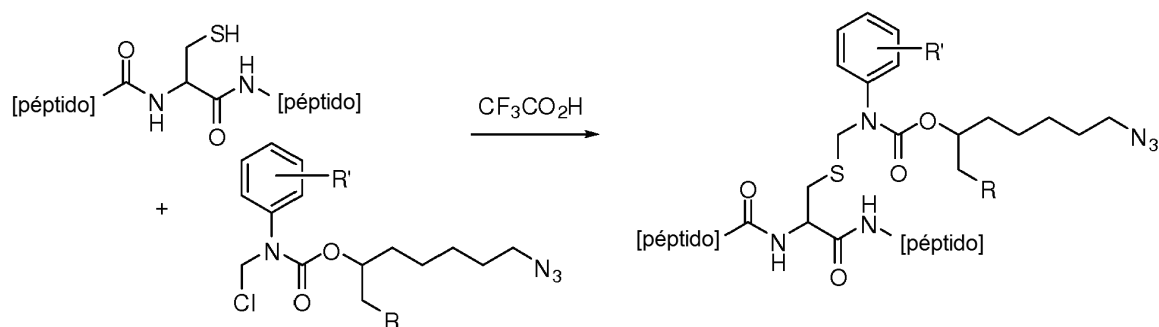
40

nm ($\epsilon = 22.500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Las soluciones de dosificación se filtraron a esterilidad usando un filtro de jeringa de $0,2 \mu\text{m}$ y se congelaron.

5 Las muestras se inyectaron por vía intravenosa en cuatro ratones CD-1 por compuesto a $2 \mu\text{g}$ de peso corporal. Se recogieron muestras de sangre del seno orbital usando el siguiente programa: ratón 1: 1, 16 y 72 h; ratón 2: 2 y 24 h; ratón 3: 4 y 32 h; ratón 4: 8 y 48 h. Las muestras se congelaron inmediatamente a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta analizarse. Se añadió un tercio del volumen de una solución de $0,25 \text{ mg/ml}$ de N_ϵ -(2,4-dinitrofenil)-L-lisina a cada muestra de suero como patrón interno para una concentración final de $0,0625 \text{ mg/ml}$. Se añadió la mitad del volumen de tampón trietilamina $\cdot\text{HCl}$ 200 mM , $\text{pH } 10,75$, a cada muestra de suero y se colocó a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 16 horas. Después de la hidrólisis, se precipitaron las proteínas del suero con tres volúmenes de metanol. Se preparó una curva patrón a partir de una solución madre del conjugado donde $\text{R} = \text{CH}_3\text{SO}_2$ y $\text{R}' = 4$ -(N,N-dietilcarboxamido) diluido en suero de ratón y se hidrolizó usando el mismo procedimiento. Las muestras y los patrones se analizaron para SN38 libre total en una HPLC Shimadzu con una columna Jupiter C4 $300\text{Å } 5\mu$ usando un gradiente del 20-100 % de acetonitrilo en H_2O con ácido trifluoroacético al 0,1%. Se detectó SN38 con un detector de fluorescencia ajustado a $380 \text{ nm}/515 \text{ nm}$ de excitación/emisión. Se usaron las áreas de pico de fluorescencia para calcular la concentración de SN38 a partir de la curva patrón. Se usó el software de farmacocinética PK Solutions para calcular los parámetros farmacocinéticos a partir de los datos. Los resultados se muestran en la Figura 8.

Ejemplo 37

Unión a tioles peptídicos con carbamatos de N-clorometilo

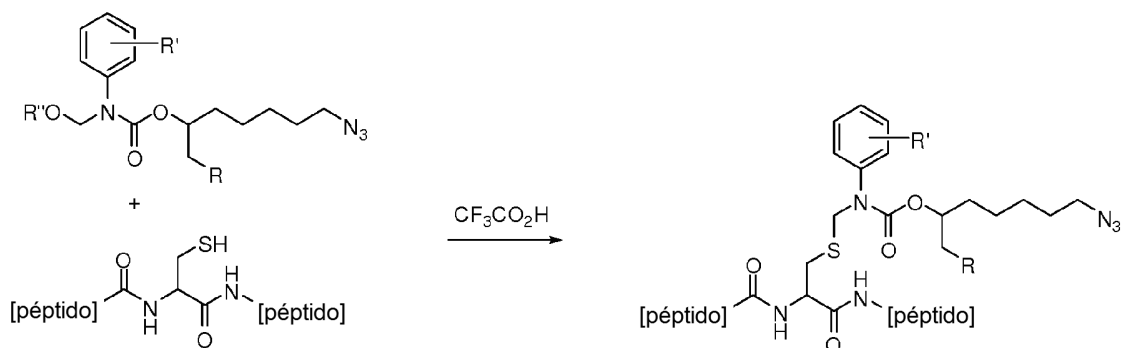


25 El carbamato de N-clorometilo del Ejemplo 30 ($0,1 \mu\text{mol}$) se añade a una solución del péptido que contiene tior ($0,1 \mu\text{mol}$) en $1,0 \text{ ml}$ de ácido trifluoroacético (TFA). Después de 2 h, el producto se precipita mediante la adición de 5 ml de éter etílico y se recoge por centrifugación. El precipitado se lava 3 veces con éter y se seca. Esto se disuelve en tampón acetato, $\text{pH } 5$, y se carga sobre un cartucho de 1 g BondElut C18. El cartucho se lava con un gradiente por etapas de metanol en agua que contiene TFA al 0,1 % para eluir el producto purificado.

30

Ejemplo 38

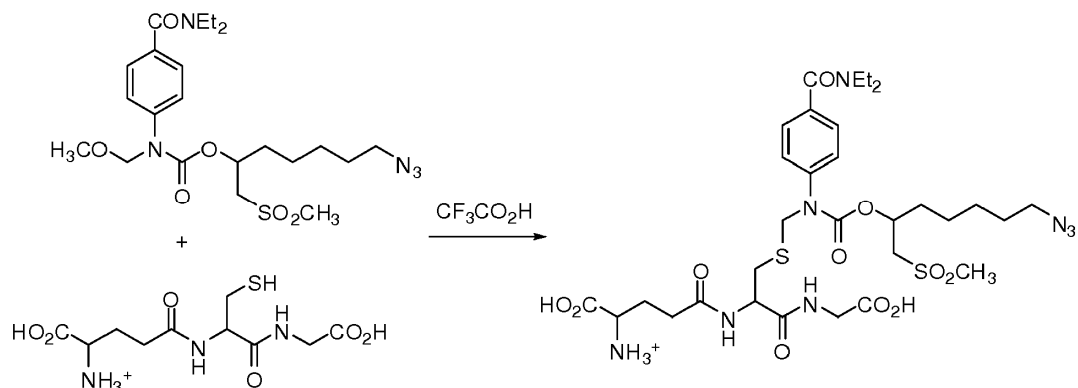
Unión a Tioles Peptídicos con carbamatos de N-alcoximetilo



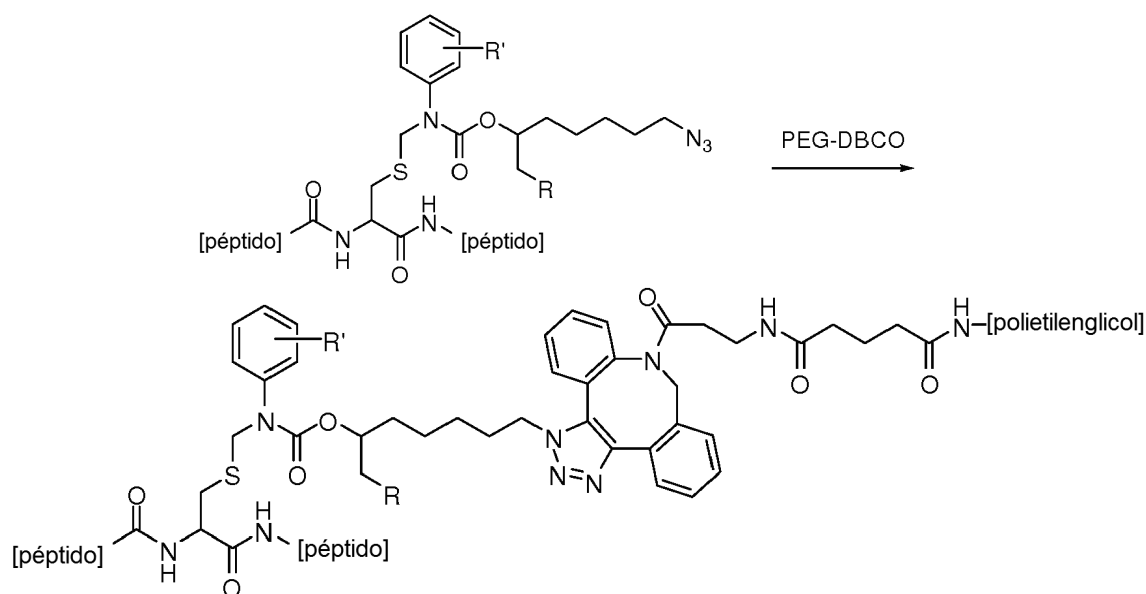
35

El carbamato de N-alcoximetil del Ejemplo 31 ($0,1 \mu\text{mol}$) se añade a una solución del péptido que contiene tior ($0,1 \mu\text{mol}$) en $1,0 \text{ ml}$ de ácido trifluoroacético (TFA). Después de 2 h, el producto se precipita mediante la adición de 5 ml de éter etílico y se recoge por centrifugación. El precipitado se lava 3 veces con éter y se seca. Esto se disuelve en tampón acetato, $\text{pH } 5$, y se carga sobre un cartucho de 1 g de BondElut C18. El cartucho se lava con un gradiente por etapas de metanol en agua que contiene TFA al 0,1 % para eluir el producto purificado.

40

Ejemplo 39Reparación de glutatión azida-enlazador

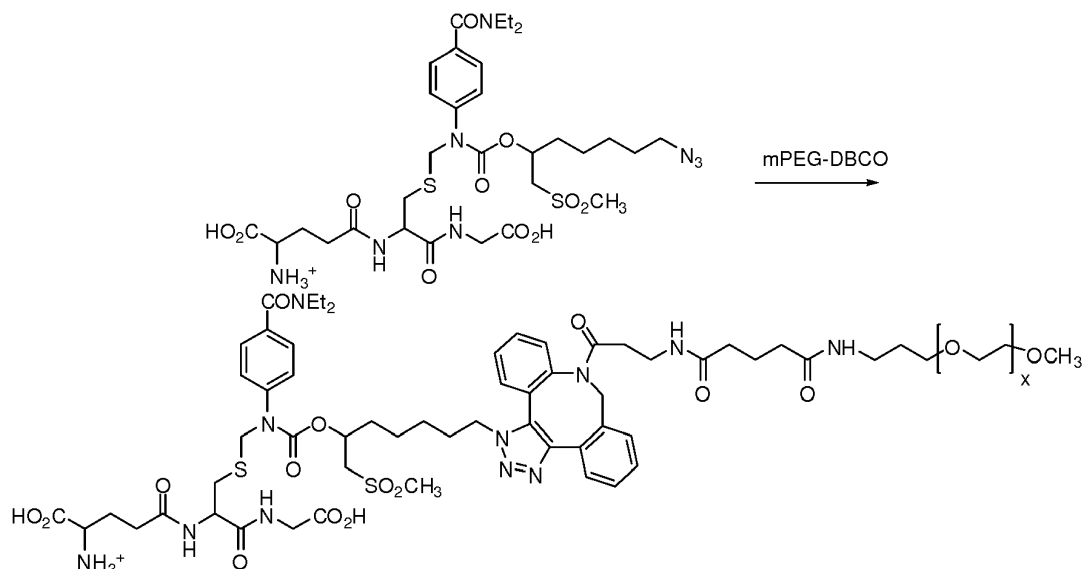
10 Se añadió carbamato de O-[1-(metanosulfonyl)-7-azido-2-heptil]-N-[4-(diethylcarboxamido)fenil]-N-metoximetilo (50 mg) a una solución de glutatión reducido (50 mg) en 1,0 ml de ácido trifluoroacético (TFA). Después de 2 h, el producto se precipitó mediante la adición de 5 ml de éter etílico, se recogió y se secó. El precipitado se disolvió en 5 ml de tampón acetato sódico 10 mM, pH 5, y se cargó sobre un cartucho de 1 g BondElut C18. El cartucho se lavó con 10 ml de agua/TFA al 0,1 % para retirar el exceso de glutatión seguido de 10 ml de 1:1 de metanol/agua/TFA al 0,1 % para eluir el producto. El eluato que contenía el producto se evaporó a sequedad en un evaporador rotatorio.

Ejemplo 40Conjugación de péptidos unidos a tío

25 Una solución de la azida de péptido unido a tío del Ejemplo 37 o 38 (1,5 equivalentes) y el polietilenglicol activado por DBCO (PEG-DBCO) (1 equivalente) en tampón acuoso se controló por espectroscopía UV. Tras la formación de triazol, la absorbancia característica de DBCO en 301 nm se pierde. Después, la mezcla de reacción se dializa (membrana de corte 10 kDa) frente a acetato sódico 10 mM, pH 5,0 para retirar el exceso de azida.

Ejemplo 41Glutación conjugado con PEG

5



10

Se mezcló una solución de mPEG-DBCO lineal 40 kDa (100 mg, 2,5 μmol) en 2,5 ml de tampón acetato sódico 10 mM, pH 5,0, con una solución de S-[N-(4-dietil-carboxamido)fenil N-(6-azido-1-(fenilsulfonyl)metil)hexiloxi-carbonil]aminometil]glutación (65 mg/ml en metanol; 60 μl), se mantuvo a temperatura ambiente durante 16 h, después se pasó a través de una columna PD-10 (GE Health Sciences) equilibrada en agua. El flujo de la columna que contenía macromoléculas se recogió y se evaporó.

15

Ejemplo 42Farmacocinética de conjugados PEG-SN38 de 4 brazos en ratas (experimento 2)

20

Se prepararon soluciones de dosificación disolviendo conjugados PEG-SN38 de 4 brazos del Ejemplo 34 en acetato sódico 10 mM, pH 5,0, para dar una concentración final de SN-38 de 1 mM determinada por absorbancia UV a 361 nm ($\epsilon = 22.500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Las soluciones de dosificación se filtraron a esterilidad usando un filtro de jeringa de 0,2 μm y se congelaron.

25

Las muestras se administraron por inyección i.v. a ratas Sprague Dawley macho canuladas a 100 $\mu\text{l}/100 \text{ g}$ de peso corporal. Se usó una única rata por compuesto para un curso completo de tiempo. Se recogieron muestras de sangre a las 0, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72, y 120 h. El suero se separó y se congeló. Las muestras de suero de rata se descongelaron en hielo. Se añadió una alícuota de 60 μl de una solución de 0,25 mg/ml de N_{ϵ} -(2,4,-dinitrofenil)-L-lisina a 180 μl de cada muestra de suero descongelada. Se añadieron 2,5 μl de ácido acético 2 M a alícuotas de 100 μl de estas muestras, seguido de 300 μl de metanol para precipitar las proteínas del suero. Las muestras se dejaron en hielo durante 1 h y se centrifugaron a 14.000 rpm. A una alícuota diferente de 100 μl de cada muestra, se añadieron 50 μl de Et_3N 200 mM y las alícuotas se colocaron en una incubadora a 37 $^{\circ}\text{C}$ durante una noche ($\sim 16 \text{ h}$) para hidrolizar el SN38 del PEG. Se preparó una curva patrón de partir de una solución madre del conjugado donde R = fenilsulfonyl, diluido en suero de rata (Sigma-Aldrich) hasta 40 μM y se trató siguiendo el mismo procedimiento que anteriormente. Las muestras y los patrones se analizaron para el conjugado SN38 y SN38 libre total en una HPLC Shimadzu con una columna Jupiter C4 400A 5u usando un gradiente del 0-100 % de acetonitrilo en H_2O con TFA al 0,1% durante 10 minutos. Se detectó SN38 con un detector de fluorescencia ajustado a 380 nm/515 nm de excitación/emisión. Las concentraciones de las muestras se determinaron por ajuste a la curva patrón usando Excel (Microsoft). Los parámetros PK se calcularon usando el software PK solutions (Summit PK). Los resultados del experimento se muestran en la Figura 9.

40

Ejemplo 43Cinética de liberación

45

Las tasas de liberación del fármaco de los conjugados de la invención pueden determinarse fácilmente por métodos conocidos en la técnica incluyendo métodos cromatográficos, tales como HPLC. Cuando, por ejemplo, se usa un marcador fluorescente como sistema modelo para el fármaco, la fluorescencia atribuible al compuesto fluorescente liberado se determina fácilmente en comparación con la fluorescencia emitida por el conjugado.

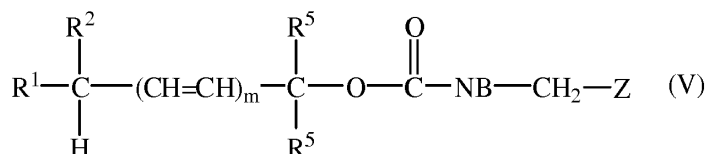
La liberación *in vivo* del fármaco de los conjugados de la invención puede medirse determinando la farmacocinética de los conjugados en comparación con la farmacocinética de un conjugado no liberable del mismo tamaño. Para fármacos de molécula pequeña, el fármaco liberado se elimina casi inmediatamente del plasma de cualquier sistema modelo, de modo que la medición de la concentración de fármaco libre en plasma prácticamente puede ignorarse, y es solamente necesario medir la concentración del propio conjugado para calcular las tasas de liberación cuando se compara la eliminación del conjugado intacto del sistema. Dichos datos se obtienen preferiblemente en ratas en comparación con ratones, ya que muestran tasas de eliminación más favorables para los conjugados de alto peso molecular de la invención.

En más detalle, los conjugados se administran a un sujeto modelo tal como una rata, por ejemplo, por administración intravenosa, y se recogen periódicamente muestras de sangre y se aísla el plasma. Después se determina el nivel de conjugado en el plasma como una función del tiempo. Esto puede hacerse por separación cromatográfica (por ejemplo, análisis de HPLC después de desproteinización acoplada a detección espectrofotométrica de UV, fluorescencia o masas), o en casos apropiados, por un ensayo directo tal como ELISA, bioactividad o fluorescencia. Como se ha indicado anteriormente, los conjugados macromoleculares se adhieren a un modelo de un compartimento, los conjugados de la invención pueden desaparecer del plasma por uno de dos mecanismos: liberación del fármaco del conjugado y eliminación del conjugado intacto (por ejemplo, por filtración renal). La tasa de pérdida de conjugado liberable del plasma es, por tanto, la suma de las tasas de pérdida por liberación del fármaco y por eliminación del conjugado. Por el contrario, la tasa de pérdida de un conjugado no liberable es justo la tasa de eliminación del conjugado del plasma, ya que no se libera fármaco. Por tanto, la tasa de liberación de fármaco desde un conjugado de la invención puede calcularse como la diferencia en las tasas de pérdida del conjugado liberable de la de un conjugado no liberable correspondiente. Esto puede hacerse sustrayendo directamente la diferencia en las tasas o esto puede calcularse a partir de la pendiente de un diagrama de $\ln(R/N)$ frente al tiempo, donde R es la concentración de conjugado liberable y N es la concentración de conjugado no liberable, como se muestra en las Figuras 9a y 9b. Como se muestra en el panel a, los datos sin procesar simplemente muestran el logaritmo (\ln) de la concentración de diversos conjugados y de un conjugado estable como una función del tiempo. El panel b muestra la diferencia en las tasas de liberación de diversos conjugados liberables que se obtienen mediante el cálculo descrito anteriormente. El conjugado estable, por supuesto, muestra tasa de liberación cero mientras que se muestran las tasas de liberación de fármaco de diversas realizaciones del activador para la liberación en los mismos conjugados.

La Figura 10 muestra que la variación de la constante de velocidad como una función de la naturaleza del activador *in vitro* e *in vivo* sigue el mismo patrón.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la fórmula



5

en la que m es 0 o 1;

10

en la que al menos uno, o ambos R^1 y R^2 son independientemente CN; NO_2 ;

15

un arilo opcionalmente sustituido;
un heteroarilo opcionalmente sustituido;
un alqueno opcionalmente sustituido;
un alquino opcionalmente sustituido;
 COR^3 o SOR^3 o SO_2R^3 en la que

20

R^3 es H o un alquilo opcionalmente sustituido;
arilo o arilalquilo, cada uno opcionalmente sustituido;
heteroarilo o heteroarilalquilo, cada uno opcionalmente sustituido; o
 OR^9 o NR_2^9 en la que cada R^9 es independientemente H o un alquilo opcionalmente sustituido o ambos grupos R^9 tomados junto con el nitrógeno al

que están unidos forman un anillo heterocíclico;

25

en la que R^1 y R^2 pueden unirse para formar un anillo de 3-8 miembros; y
en la que uno y sólo uno de R^1 y R^2 puede ser H o alquilo, arilalquilo o heteroarilalquilo, cada uno opcionalmente sustituido;

30

cada R^5 es independientemente H o es alquilo, alquenalquilo, alquinilalquilo, arilo, arilalquilo, heteroarilo o heteroarilalquilo, cada uno opcionalmente sustituido;

35

Z es un residuo de un fármaco o profármaco acoplado a través de O, S o N no básico, o es un nucleófilo que media dicho acoplamiento;

40

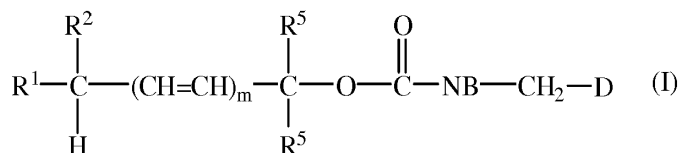
B es alquilo, arilo, arilalquilo, heteroarilo o heteroarilalquilo, cada uno opcionalmente sustituido; y
en la que uno de R^1 , R^2 , R^5 y B se acopla a una macromolécula o uno de R^1 , R^2 y R^5 comprende un grupo funcional para mediar dicho acoplamiento;

en la que los sustituyentes para cualquier grupo opcionalmente sustituido que se ha definido anteriormente se seleccionan entre halo, nitro, ciano, OR, SR, NR_2 , OCOR, NRCOR, COOR, CONR_2 , SOR, SO_2R , SONR_2 , SO_2NR_2 , en la que cada R es independientemente alquilo, alqueno, alquino, arilo o heteroarilo, o dos grupos R tomados junto con los átomos a los que están unidos forman un anillo; y en la que la sustitución en cualquier sistema anular también puede seleccionarse entre alquilo, alqueno, alquino, o un anillo adicional, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido.

2. El compuesto de la reivindicación 1 que es:

45

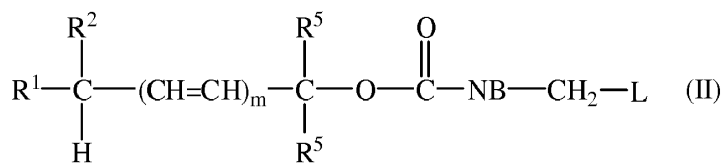
(i) de la fórmula



50

en la que R^1 , R^2 , R^5 , m y B se definen como en la reivindicación 1,
D es el residuo de un fármaco o profármaco acoplado a través de O, S o N no básico; y uno de R^1 , R^2 , R^5 y B se acopla a una macromolécula, o

(ii) de la fórmula

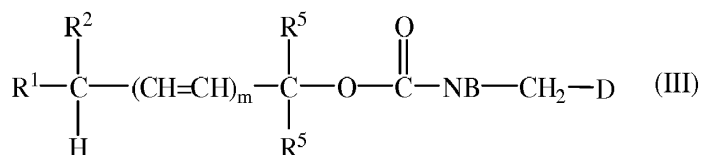


en la que R¹, R², R⁵, m y B son como se han definido en la reivindicación 1;

5 L es un nucleóforo que media el acoplamiento de un fármaco o profármaco acoplado a través de O, S o N no básico; y uno de R¹, R² y R⁵ comprende un grupo funcional para mediar el acoplamiento a una macromolécula, o

(iii) de la fórmula

10

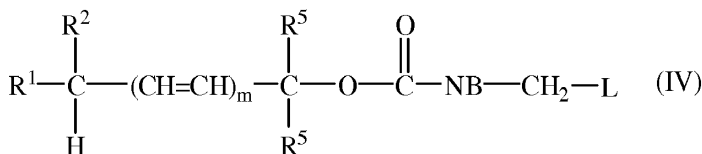


en la que R¹, R², R⁵, m y B son como se han definido en la reivindicación 1;

15 en la que D es el residuo de un fármaco o profármaco acoplado a través de O, S o N no básico; y uno de R¹, R² y R⁵ comprende un grupo funcional para mediar el acoplamiento a una macromolécula, o

(iv) de la fórmula

20



en la que el R¹, R², R⁵, m, y B son como se han definido en la reivindicación 1;

25 L es un nucleóforo que media el acoplamiento de un fármaco o profármaco a través de O, S o N no básico; y uno de R¹, R², R⁵ y B se acopla a una macromolécula.

3. El compuesto de la reivindicación 1 o 2, en el que uno de R¹ y R² es CN.

30

4. El compuesto de la reivindicación 1 o 2, en el que al menos uno de R¹ y R² comprende fenilo o fenileno.

5. El compuesto de la reivindicación 1 o 2, en el que uno de R¹ y R² es SO₂R³ y el otro es H, alquilo o fenilo.

6. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que m es 0.

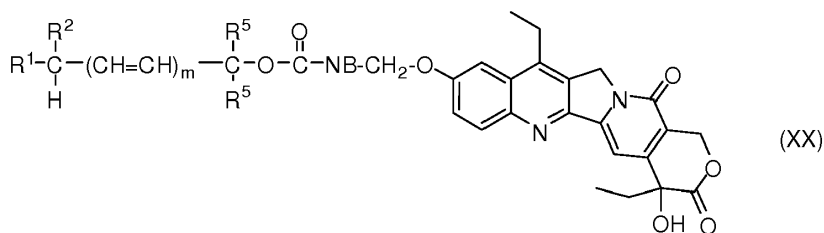
35

7. El compuesto de la reivindicación 1 o 2, en el que la macromolécula es polietilenglicol (PEG).

8. Los compuestos de la reivindicación 1 o 2, en el que el fármaco es un péptido, un ácido nucleico o una molécula pequeña.

40

9. El compuesto de la reivindicación 1 que es de fórmula (XX)



en la que R¹, R², R⁵, m y B son como se han definido en la reivindicación 1.

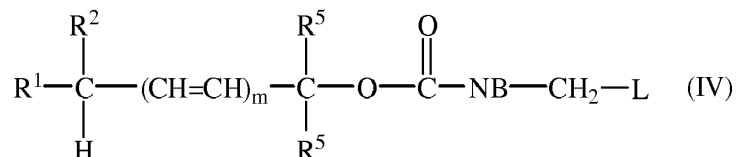
45

10. El compuesto de la reivindicación 9, en el que m es 0.

11. El compuesto de la reivindicación 10, en el que R¹ es fenilsulfonilo, fenilsulfonilo sustituido, metanosulfonilo, (R⁹)₂N-SO₂ o CN; R² es H; un R⁵ es N₃(CH₂)₅ y el otro R⁵ es H; y B es fenilo o fenilo sustituido.

12. El compuesto de la reivindicación 10, en el que R¹ es fenilsulfonilo, fenilsulfonilo sustituido, metanosulfonilo, (R⁹)₂N-SO₂, o CN; R² es H; un R⁵ es un alquilo opcionalmente sustituido y el otro R⁵ es H; y B es fenilo o fenilo sustituido y en el que uno de R¹, R⁵ y B comprende adicionalmente una conexión a una macromolécula.

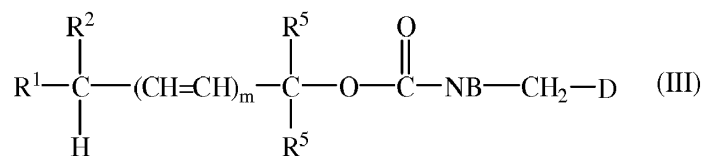
13. Un método para preparar el compuesto de Fórmula (I) como se ha definido en la reivindicación 2, cuyo método comprende hacer reaccionar un compuesto de la fórmula



en la que R¹, R², R⁵, m y B son como se han definido en la reivindicación 1;

L es un nucleóforo que media el acoplamiento de un fármaco o profármaco a través de O, S o N no básico; y en la que uno de R¹, R², R⁵ y B se acopla a una macromolécula; con un fármaco o profármaco en condiciones por las que dicho profármaco se acopla a dicho compuesto de fórmula (IV).

14. Un método para preparar el compuesto de Fórmula (I) como se ha definido en la reivindicación 2, cuyo método comprende hacer reaccionar un compuesto de la fórmula



en la que m, R¹, R², R⁵, m y B son como se han definido en la reivindicación 1;

y D es el residuo de un fármaco o profármaco acoplado a través de O, S o N no básico; y en la que uno de R¹, R², R⁵ y B comprende un grupo funcional que acopla el compuesto de fórmula (III) a una macromolécula; con una macromolécula en condiciones por las que dicha macromolécula se acopla al compuesto de fórmula (III).

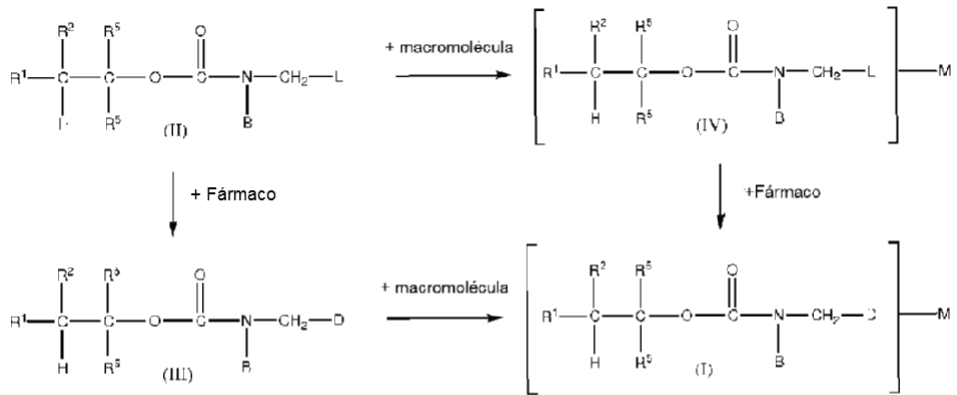


Figura 1

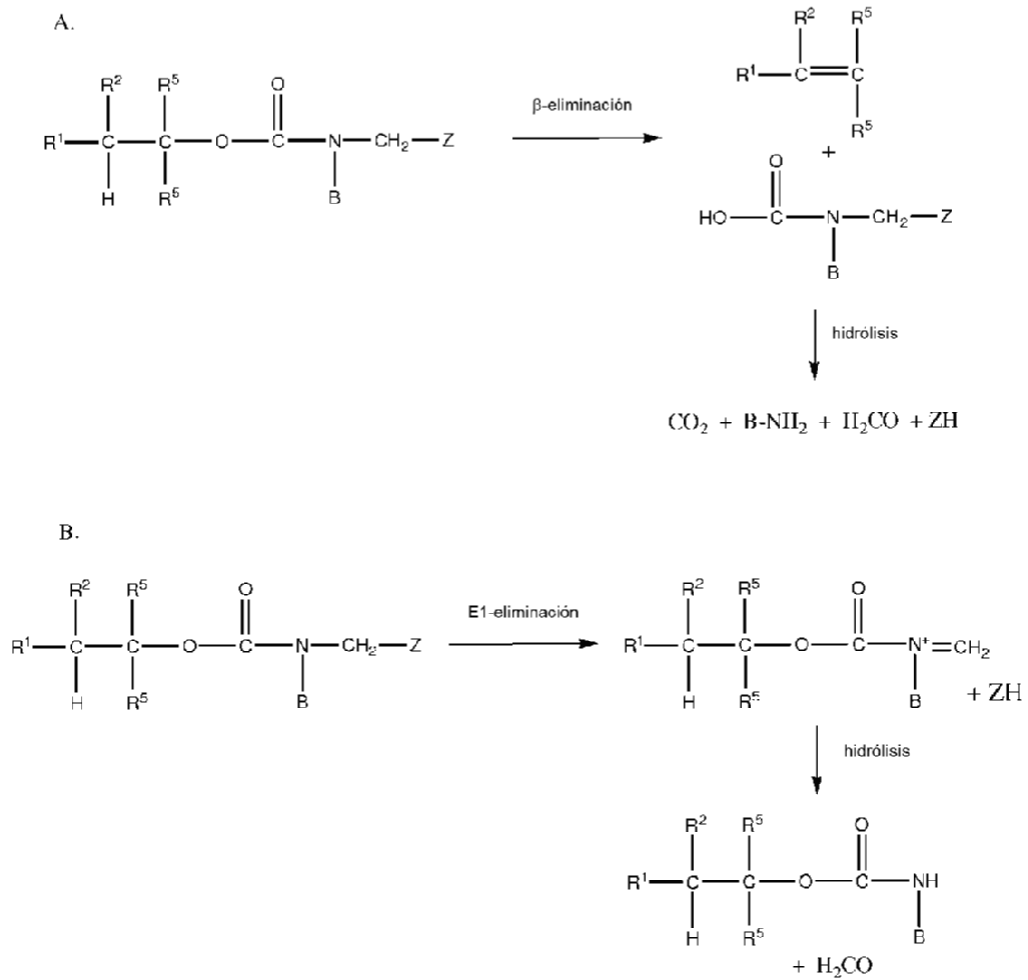


Figura 2

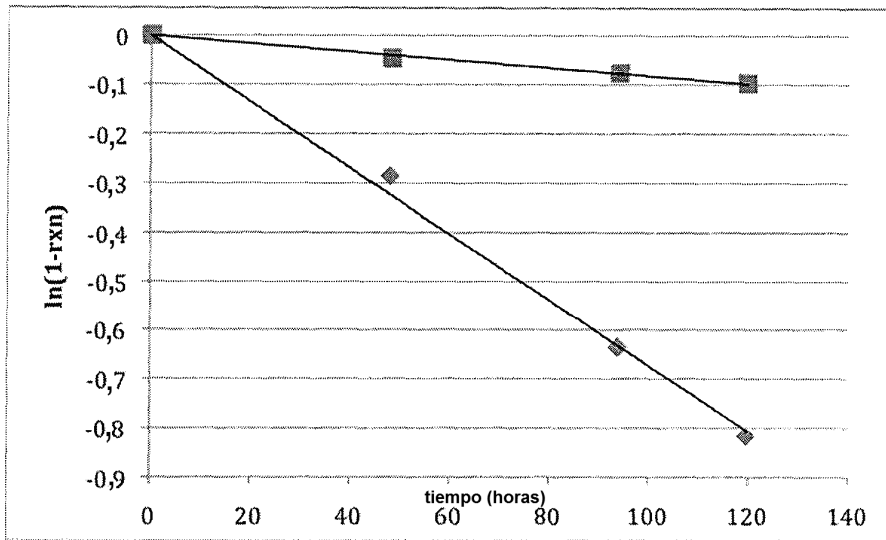


Figura 3

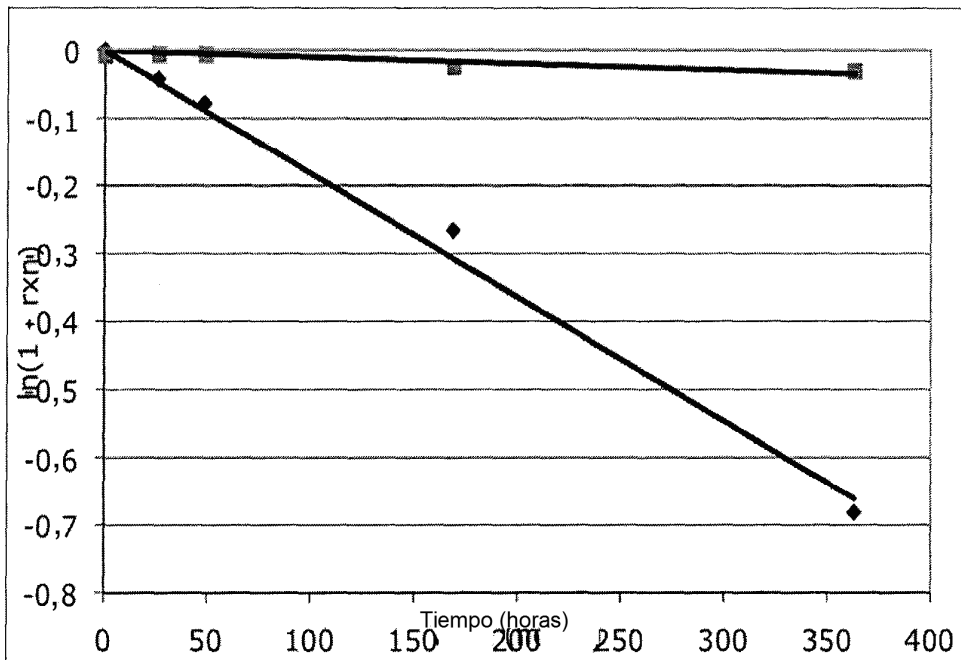


Figura 4

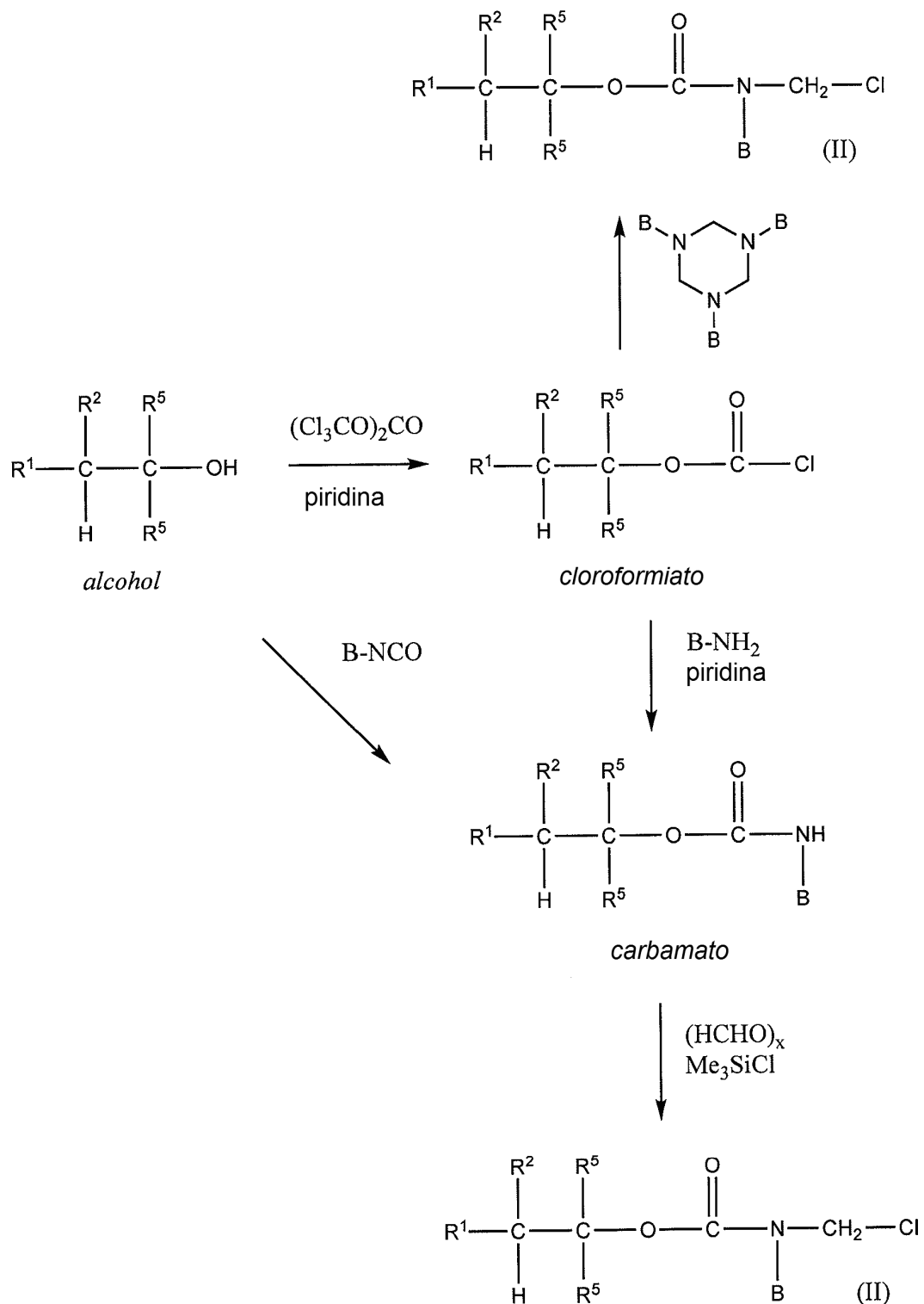


Figura 5

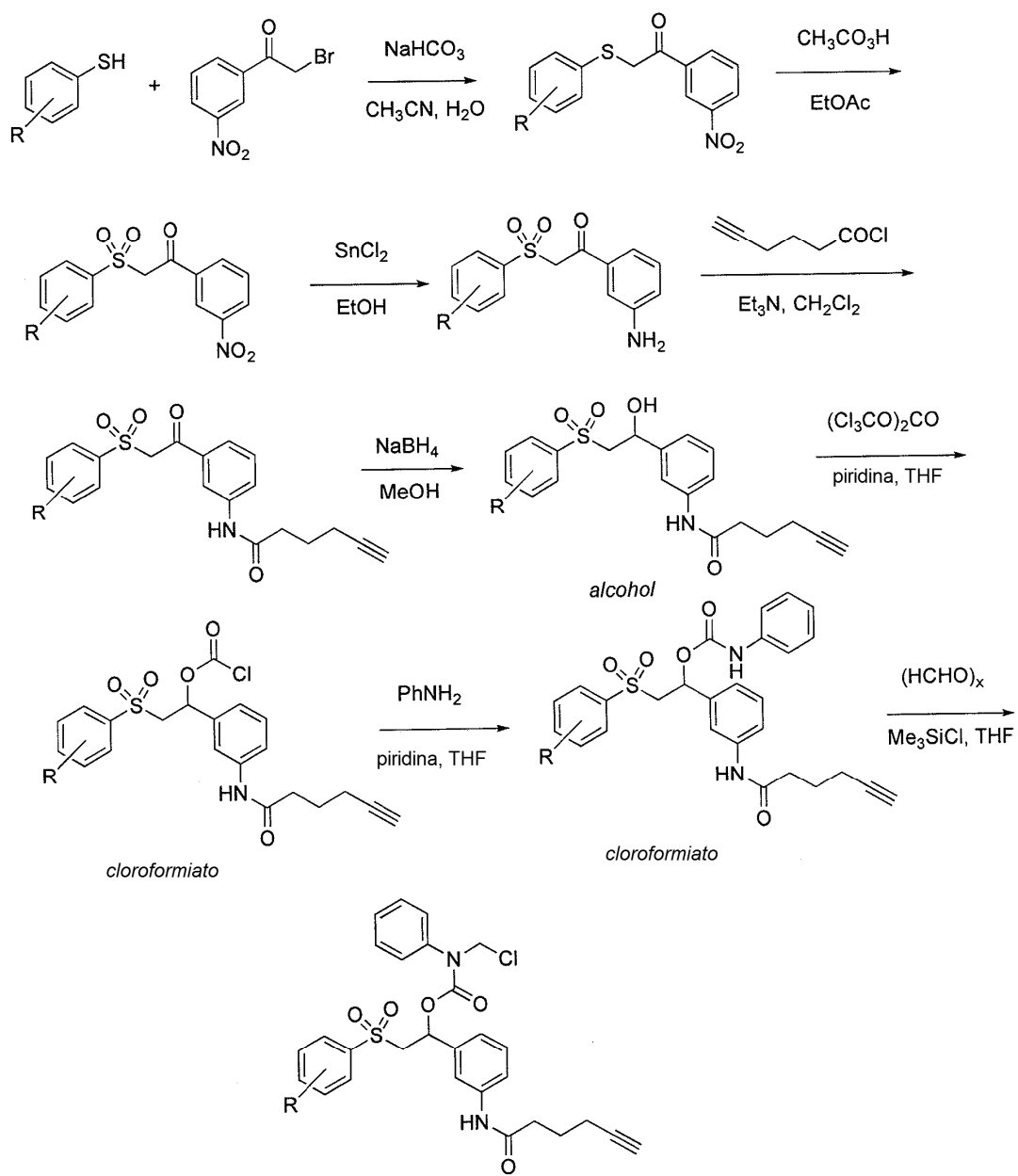


Figura 6

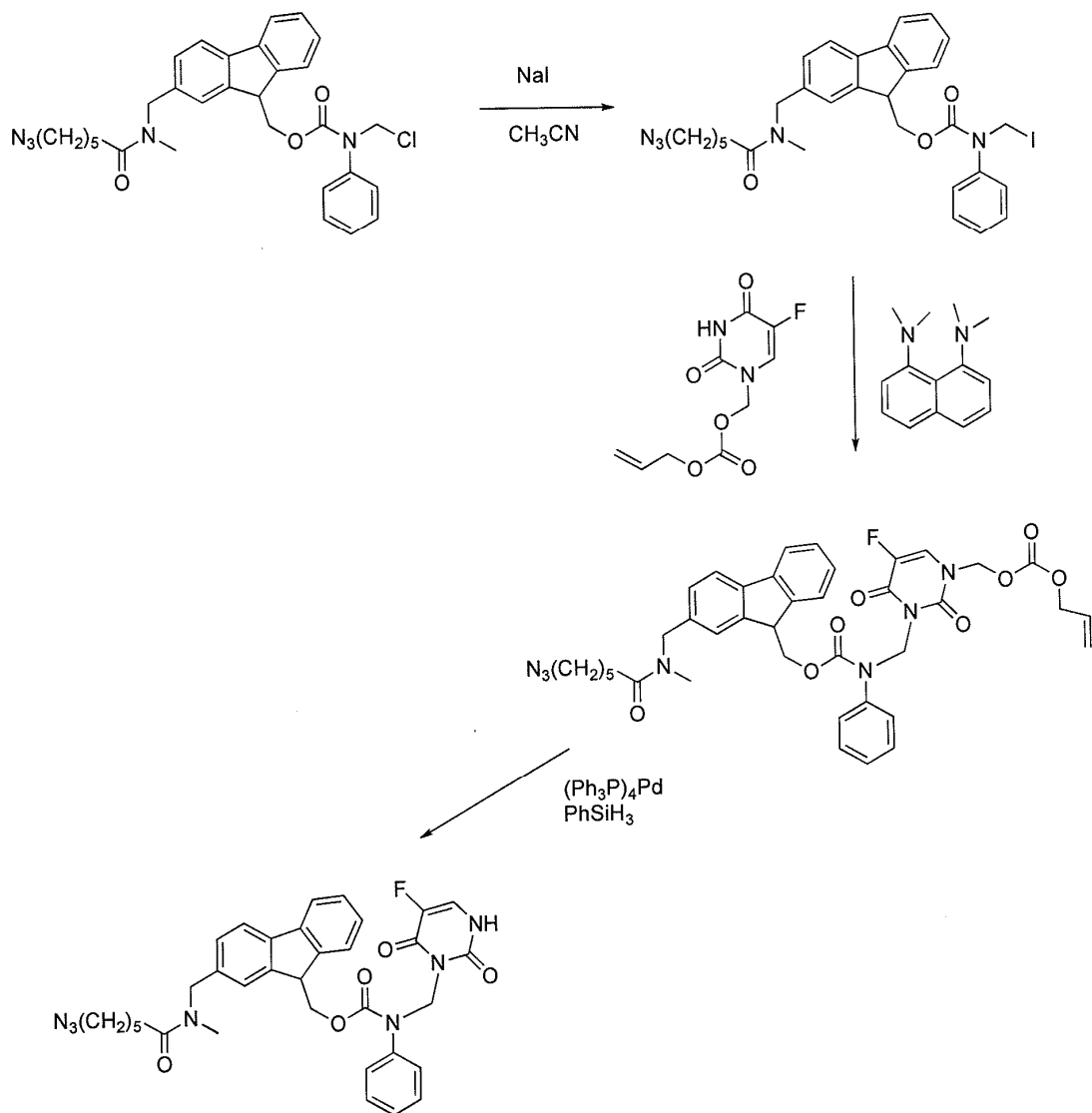


Figura 7

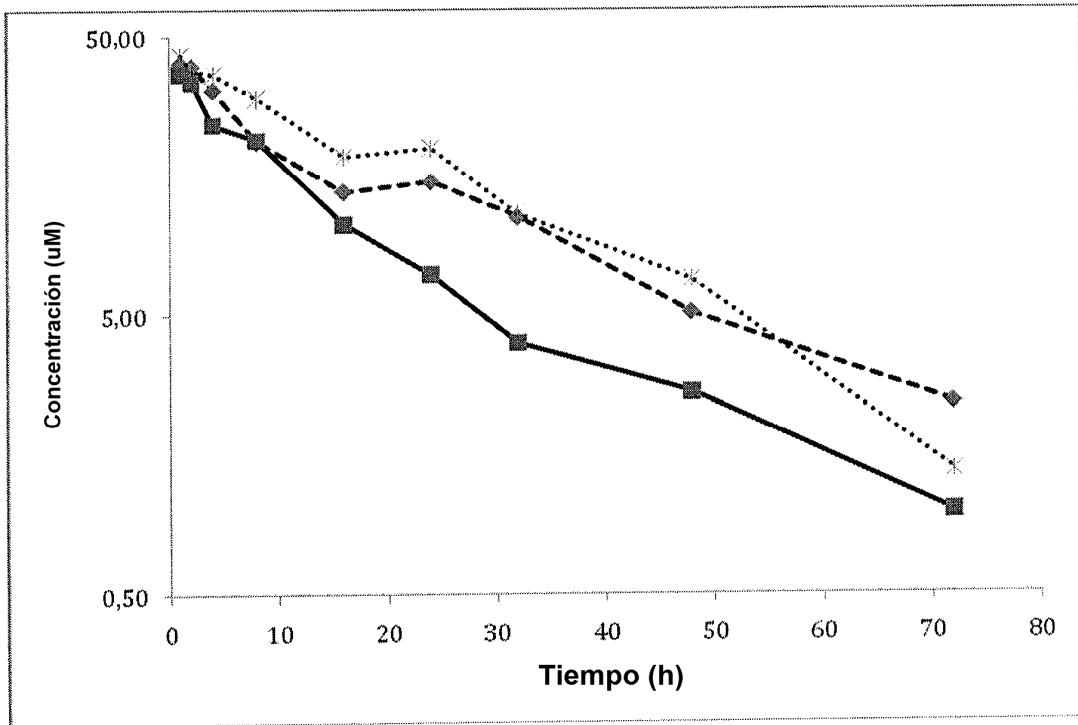
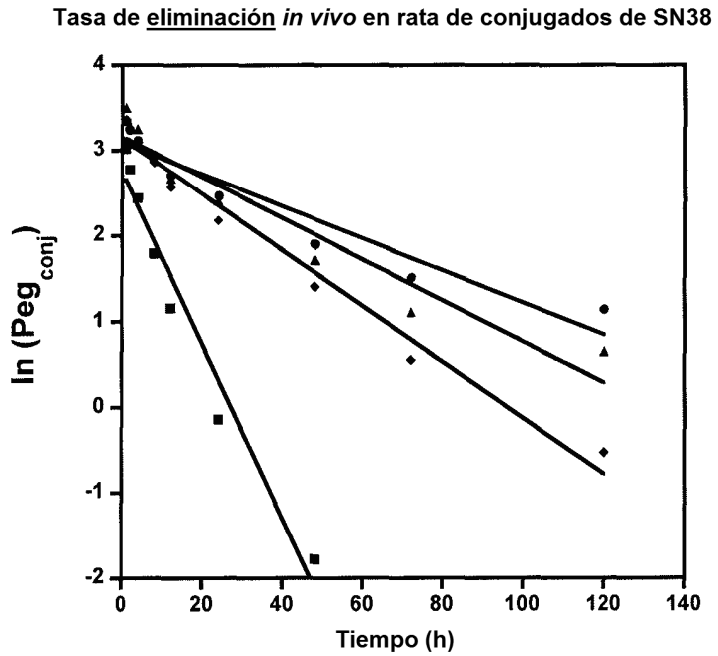


Figura 8

Panel A



Panel B

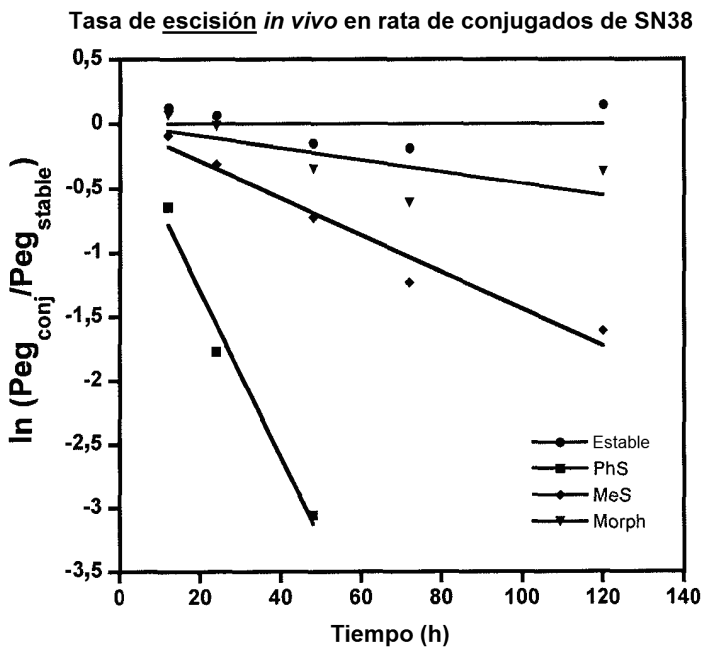


Figura 9

SAR: constante de tasa de escisión *in vitro* e *in vivo*

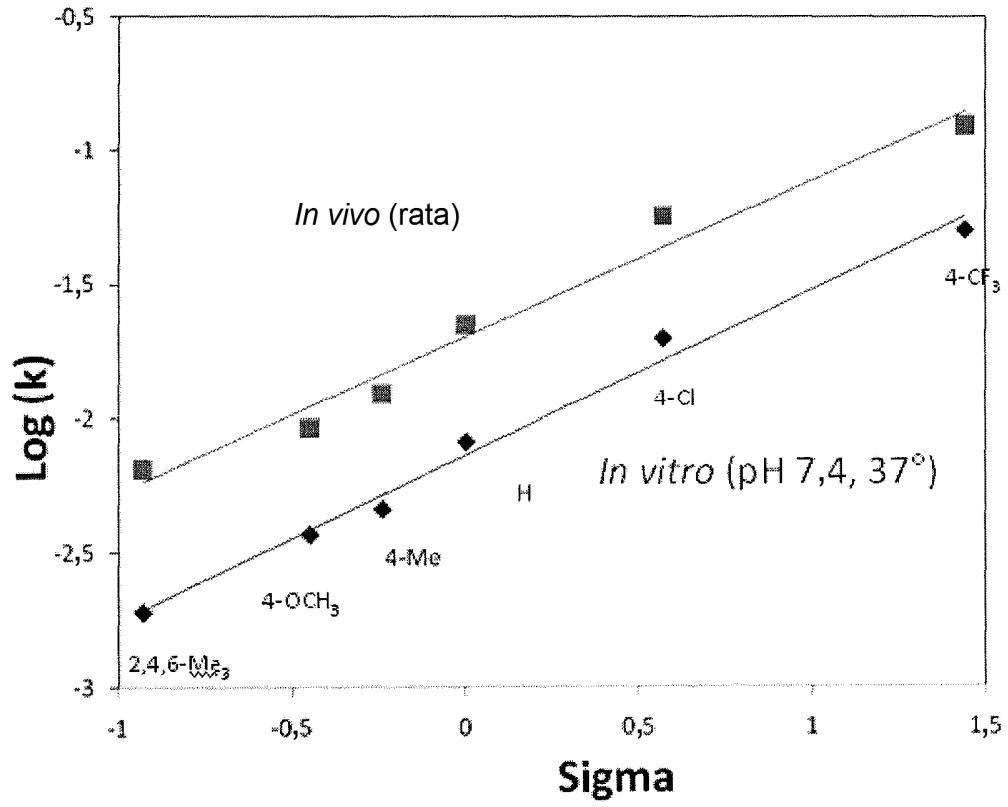


Figura 10