

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 605 939**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
C07D 239/14 (2006.01)
C07D 417/12 (2006.01)
C07D 207/452 (2006.01)
C07D 277/593 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.01.2013 PCT/EP2013/051082**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **01.08.2013 WO13110578**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.01.2013 E 13701748 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.10.2016 EP 2806899**

54 Título: **Conjugados de antagonistas de la integrina para una administración dirigida a células que expresan alfa-V-beta-3**

30 Prioridad:

27.01.2012 US 201261591299 P
02.08.2012 US 201261678669 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.03.2017

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

72 Inventor/es:

GOODNOW JR., ROBERT ALAN;
HAMILTON, MATTHEW MICHAEL;
KOWALCZYK, AGNIESZKA y
SIDDURI, ACHYUTHARAO

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 605 939 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

Conjugados de antagonistas de la integrina para una administración dirigida a células que expresan alfa-V-beta-3

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a la síntesis y la reacción de potentes y selectivos antagonistas de la integrina de molécula pequeña que contienen conectores y grupos funcionales apropiados para su reacción química con otras moléculas que contienen nucleófilos reactivos tales como tioles, de forma que se forme un enlace covalente entre un resto que va a ser conjugada y la entidad de direccionamiento. Los antagonistas de direccionamiento de molécula pequeña se unen a sistemas receptores cognados como antagonistas del receptor de la integrina de tipo alfa-V-beta-3 ($\alpha V\beta 3$) al dímero de $\alpha V\beta 3$. El resto unido covalentemente incluye polímeros, péptidos y oligonucleótidos terapéuticos de molécula pequeña. Están incluidos los oligonucleótidos que contienen un tio en 5' para la formación de derivados 5'-tio-ARNip como un medio para permitir la administración dirigida de dichos ARNip. Dichos ARNip derivatizados, junto con los apropiados agentes de transfección, ayudan en la administración selectiva de los ARNip a las células que expresan dichos receptores de integrina, previniendo así la expresión de los genes objetivo a través de un ARN interferente (ARNi).

20 Antecedentes de la invención

La integrina de tipo $\alpha V\beta 3$ es un receptor de la vitronectina [Hermann, P. et al. "The vitronectin receptor and its associated CD47 molecule mediates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes by interaction with soluble CD23" [The Journal of cell biology 144 (1999): 767-75]. Consiste en dos componentes, la integrina alfa V y la integrina beta 3 (CD61), y es expresado por las plaquetas así como por otros tipos de células. Se ha demostrado que los inhibidores del $\alpha V\beta 3$ como el taracizumab pueden usarse como antiangiogénicos.

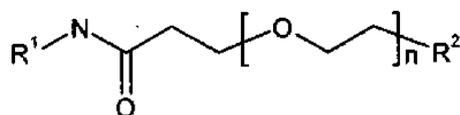
El ARN interferente es un proceso bien conocido en el que la traducción del ARN mensajero (ARNm) en una proteína es interferida por la asociación con la unión de oligonucleótidos complementarios o parcialmente complementarios, tales como ARN interferente pequeño (ARNip), ARN pequeño en horquilla (ARNph), microARN (miARN) u oligonucleótidos antisentido. Los ARNip son moléculas de ARN bicatenarias, habitualmente con una longitud que varía entre 19-25 nucleótidos, que están asociados con un conjunto de proteínas del citoplasma conocidas como RISC (complejo de silenciamiento inducido por ARN). Los RISC finalmente se separan del ARNip bicatenario permitiendo que una hebra se una o se asocie a una porción complementaria o parcialmente complementaria de una molécula de ARNm, tras lo cual el ARNm es destruido por el RISC o de otro modo se impide que sea traducido, con la consecuente supresión de la expresión de la proteína codificada o del producto génico.

Uno de los problemas del uso de ácidos nucleicos tales como un ARNip en aplicaciones terapéuticas (especialmente para su administración sistémica a seres humanos) ha sido la administración de los ácidos nucleicos a: (1) tejidos o tipos de células objetivo en particular, y (2) al citoplasma de esas células (es decir, donde el ARNm está presente y es traducido en una proteína). Parte del problema de la administración se basa en el hecho de que los ácidos nucleicos están cargados negativamente y son fácilmente degradados (especialmente si están sin modificar), son eficazmente filtrados por el riñón y no pueden transportarse fácilmente al citoplasma de las células por sí mismos. Por lo tanto, una cantidad significativa de la investigación se ha centrado en la resolución del problema de la administración con diversos portadores y formulaciones que incluyen liposomas, micelas, péptidos, polímeros, conjugados y aptámeros. Véase Ling et al, *Advances in Systemic ARNip Delivery Drugs Future* 34 (9): 721 (septiembre de 2009). Algunos de los vehículos de administración más prometedores han implicado el uso de sistemas lipídicos, incluyendo nanopartículas lipídicas. Véase Wu et al., *Lipidic Systems for In Vivo siRNA Delivery*, *AAPS J.* 11 (4) 639-652 (diciembre de 2009); la Publicación de Solicitud de Patente Internacional N° WO 2010/042877 de Hope et al ("Improved Amino Lipids And Methods For the Delivery of Nucleic Acids"). El documento US20060030575 desvela antagonistas del receptor $\alpha V\beta 3$ que comprenden un grupo tetrahidropiridinilaminoetiloxibenzofilo en una sulfonanilino-beta-alanina.

Sin embargo, sigue habiendo una necesidad de un direccionamiento adicionalmente mejorado del ARNip; así como de sustancias, tales como moléculas pequeñas, péptidos, otros ácidos nucleicos, fracciones fluorescentes y polímeros, que se dirijan a células objetivo en particular y al citoplasma de dichas células.

Sumario de la invención

La invención se refiere a compuestos de fórmula I:



Fórmula I

60

en la que R^1 , R^2 y n se definen en la descripción detallada y en las reivindicaciones. En particular, la presente invención se refiere a los compuestos de fórmula I para la administración mejorada de fracciones conjugadas tales como moléculas pequeñas, péptidos, ácidos nucleicos, fracciones fluorescentes y polímeros para dirigirse a células que expresan el dímero $\alpha\beta 3$ para diversas aplicaciones terapéuticas y otras. La presente divulgación también se refiere a los métodos para la elaboración y el uso de dichos compuestos.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1a): la Tabla 1 muestra la composición de un ARNip mono y bicatenario en particular derivatizado en 5'.

Figura 1b): la Tabla 2 muestra los datos analíticos de conjugados de ARNip de molécula pequeña.

Figura 1c): la Tabla 3 muestra las potencias de los conjugados de molécula pequeña-ARNip en los ensayos de los antagonistas de la integrina y los datos de la KD del ARNip.

Figura 1d): la Tabla 4 muestra la identidad, la caracterización y las potencias de unión de reactivos marcados con un isómero de FITC.

La Figura 1e) muestra una histografía (en rojo, Dúplex-27 500 nM y Ejemplo 140 10 μ M; en verde, Dúplex -27).

La Figura 2 muestra una imagen representativa de la captación del ARNip (Dúplex-27 (500 nM).

La Figura 3 muestra imágenes de células Jurkat con FITC conjugado con el FITC-5 del Ejemplo (FITC marcado con un antagonista de LFA-1) a 10 μ M.

La Figura 4 muestra imágenes de células Jurkat con FITC conjugado con el FITC-14 del Ejemplo (FITC marcado con un antagonista de VLA-4) a 10 μ M. La histografía indica un cambio en presencia del dúplex de ARNip con un elemento de direccionamiento VLA-4. En presencia del antagonista de VLA-4 del ejemplo 140, este cambio está atenuado.

La Figura 5 muestra la reducción en la expresión de AHA1 en células H1299 cuando se tratan con dúplex de ARNip que han sido derivatizados con la hebra sentido 5' con una molécula pequeña dirigida a la integrina. El eje y indica el nivel de expresión observado de AHA1. La barra inferior indica un mayor grado de inactivación (un mayor grado de transfección del ARNip); una barra superior, un menor grado de inactivación (es decir, un menor grado de transfección del ARNip). Los dúplex de color azul tienen modificaciones en el direccionamiento en el extremo 5' de la hebra sentido; los de color rosa tienen modificaciones en el direccionamiento en el extremo 5' de la hebra antisentido, así como un fluoróforo Nu547 unido al extremo 5' de la hebra antisentido.

La Figura 6 muestra los niveles de expresión del ARNm de GAPDH, un marcador de la muerte celular. La similitud en los niveles de expresión para las células tratadas con el ARNip derivatizado y la de las células simuladas y las células sin tratar es una indicación de la ausencia de toxicidad celular a la concentración y la duración del tratamiento.

Descripción detallada de la invención

Salvo que se indique de otro modo, los siguientes términos y expresiones específicas usados en la descripción y en las reivindicaciones se definen como sigue:

el término "fracción" se refiere a un átomo o un grupo de átomos unidos químicamente que están unidos a otro átomo o molécula por uno o más enlaces químicos, formando así parte de una molécula. Por ejemplo, las variables R^1 y R^2 de la fórmula I se refieren a fracciones que están unidas a la estructura mostrada en la fórmula I mediante un enlace covalente donde se indique.

El término "fracción conjugada" se refiere a una fracción que es un compuesto, un péptido, un polímero, una molécula pequeña, una fracción fluorescente, un oligonucleótido o un ácido nucleico, terapéutico o útil. Algunos ejemplos incluyen fármacos, péptidos terapéuticos, oligonucleótidos antisentido, ARNip e isotiocianato de fluoresceína (FITC).

Salvo que se indique de otro modo, el término "hidrógeno" o "hidro" se refiere al resto de un átomo de hidrógeno (-H) y no al H_2 .

El término "halógeno" se refiere a un resto de flúor, de cloro, de bromo o de yodo.

El término "alquilo" representa un grupo hidrocarbonado saturado monovalente lineal o ramificado de entre 1 y 12 átomos de carbono. En algunas realizaciones en particular, el alquilo tiene entre 1 y 7 átomos de carbono, y en algunas realizaciones más en particular, entre 1 y 4 átomos de carbono. Algunos ejemplos de alquilo incluyen metilo,

etilo, propilo, isopropilo, n-butilo, iso-butilo, sec-butilo o terc-butilo.

El término "TFA" se refiere al ácido trifluoroacético.

5 Salvo que se indique de otro modo, el término "un compuesto de la fórmula" o "un compuesto de fórmula" o "compuestos de la fórmula" o "compuestos de fórmula" significa cualquier compuesto seleccionado entre el género de compuestos según se ha definido por la fórmula, incluyendo cualquier sal o éster farmacéuticamente aceptable de cualquiera de dichos compuestos, si no se indica de otro modo).

10 El término "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a aquellas sales que conservan la eficacia y las propiedades biológicas de las bases libres o de los ácidos libres, que no son biológicamente ni de otro modo indeseables. Las sales pueden formarse con ácidos inorgánicos, tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares, preferentemente con ácido clorhídrico, y con ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido maleico, 15 ácido malónico, ácido salicílico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metansulfónico, ácido etansulfónico, ácido p-toluensulfónico, N-acetilcisteína y similares. Además, las sales pueden prepararse mediante la adición de una base inorgánica o de una base orgánica al ácido libre. Algunas sales derivadas de una base inorgánica incluyen, pero no se limitan a, las sales de sodio, de potasio, de litio, de amonio, de calcio y de magnesio y similares. Algunas sales derivadas de bases inorgánicas 20 incluyen, pero no se limitan a, sales de aminas primarias, secundarias y terciarias, de aminas sustituidas incluyendo aminas sustituidas naturales, de aminas cíclicas y de resinas de intercambio iónico básicas, tales como resinas de isopropilamina, de trimetilamina, de dietilamina, de trietilamina, de tripropilamina, de etanolamina, de lisina, de arginina, de N-etilpiperidina, de piperidina, de poliamina y similares. Dependiendo de los patrones de sustitución, los compuestos de la presente invención también pueden existir en forma de iones bipolares.

25 Los compuestos de la presente invención pueden estar presentes en forma de sales farmacéuticamente aceptables. Los compuestos de la presente invención también pueden estar presentes en forma de ésteres farmacéuticamente aceptables (es decir, los ésteres de metilo y de etilo de los ácidos de fórmula I que se van a usar como profármacos). Los compuestos de la presente invención también pueden estar solvatados, es decir, hidratados. La solvatación puede efectuarse en el transcurso del proceso de elaboración o puede tener lugar, es decir, como consecuencia de las propiedades higroscópicas de un compuesto de fórmula I inicialmente anhidro (hidratación).

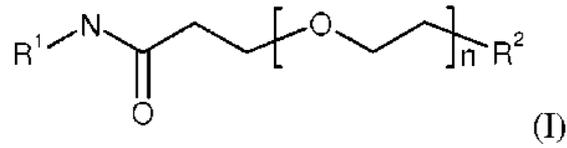
30 Los compuestos que tienen la misma fórmula molecular pero que difieren en la naturaleza o en la secuencia de los enlaces de sus átomos o en la disposición de sus átomos en el espacio se denominan "isómeros." Los isómeros que difieren en la disposición de sus átomos en el espacio se denominan "estereoisómeros." Los diastereómeros son estereoisómeros con una configuración opuesta en uno o más centros quirales que no son enantiómeros. Los estereoisómeros portadores de uno o más centros asimétricos que son imágenes especulares no superponibles entre sí se denominan "enantiómeros." Cuando un compuesto tiene un centro asimétrico, por ejemplo, si un átomo 35 de carbono está unido a cuatro grupos diferentes, es posible un par de enantiómeros. Un enantiómero puede ser caracterizado por la configuración absoluta de su centro o centros asimétricos, y es descrito por las normas de secuencia R y S de Cahn, Ingold y Prelog, o por la forma en la que la molécula rota el plano de la luz polarizada, y se indica como dextrorrotatoria o levorrotatoria (es decir, como isómeros (+) o (-), respectivamente). Un compuesto quiral puede existir en forma de un enantiómero individual o como una mezcla de los mismos. Una mezcla que contiene unas proporciones iguales de los enantiómeros se denomina una "mezcla racémica".

40 El término "una cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad de un compuesto que es eficaz para la prevención, el alivio o la mejora de los síntomas de la enfermedad, o para prolongar la supervivencia del sujeto que se está tratando. La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz está en la pericia de la materia. La cantidad o dosis terapéuticamente eficaz de un compuesto según esta invención puede variar en unos amplios límites, y puede ser determinada de una forma conocida en la materia. Dicha dosis será ajustada según los requisitos individuales en cada caso en particular, incluyendo el (los) compuesto(s) específico(s) que se va(n) a 45 administrar, la vía de administración, la afección que se va a tratar, así como el paciente que se va a tratar. La dosis diaria puede ser administrada en forma de una dosis individual o en dosis divididas, o para una administración parenteral, puede administrarse en forma de una infusión continua.

50 El término "portador farmacéuticamente aceptable" está destinado a incluir cualquiera y todos los materiales compatibles con una administración farmacéutica, incluyendo disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y otros materiales y compuestos compatibles con una administración farmacéutica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla el uso de los mismos en las composiciones de la invención. En las composiciones también pueden incorporarse compuestos activos complementarios.

60 Con detalle, la presente invención se refiere a los compuestos de fórmula I:

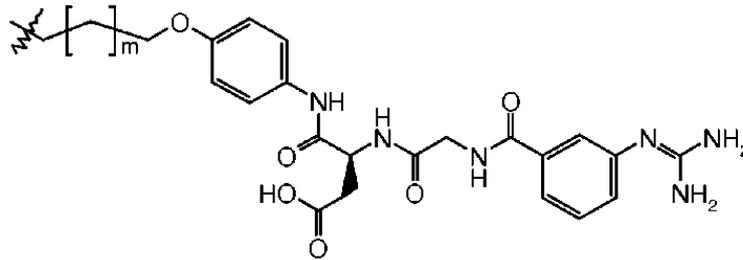
65



o a sales o ésteres farmacéuticamente aceptables del mismo; en la que n es 1-24 y en la que: R¹ se selecciona entre el grupo que consiste en:

5

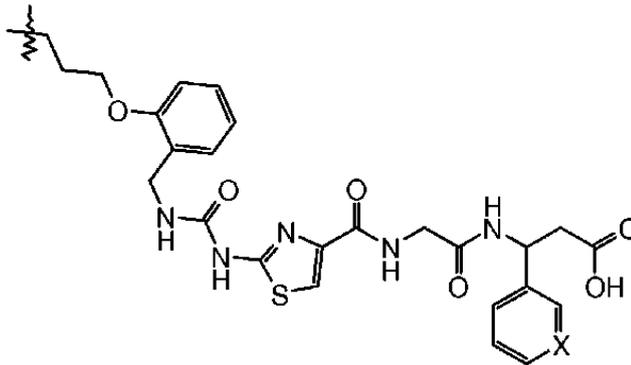
(1) un compuesto de la fórmula:



en la que m es 0 o 1;

10

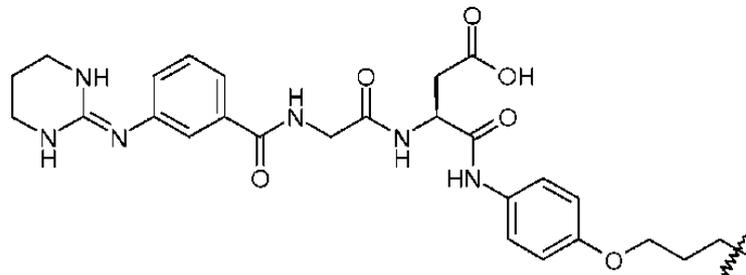
(2) un compuesto de la fórmula:



en la que X es N o CH;

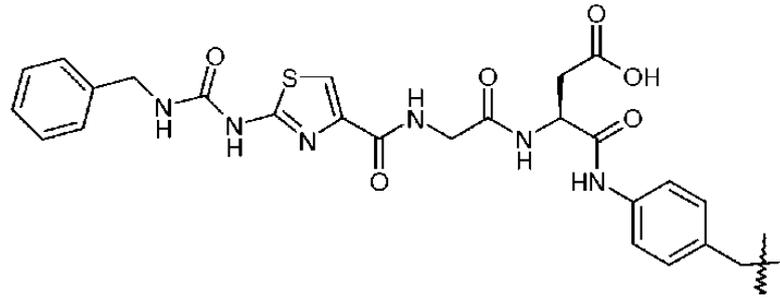
15

(3) un compuesto de la fórmula:

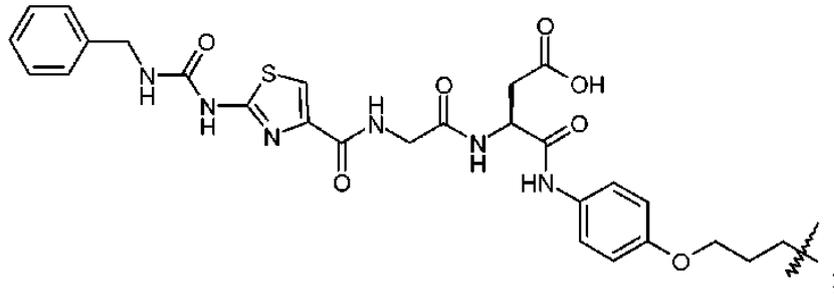


(4) un compuesto de la fórmula:

20

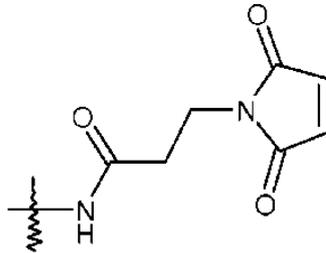


(5) un compuesto de la fórmula:

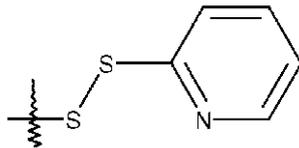


5 R² se selecciona entre el grupo que consiste en:

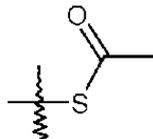
(1) un compuesto de la fórmula:



10 (2) un compuesto de la fórmula:

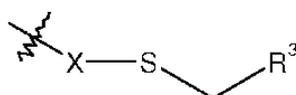


(3) un compuesto de la fórmula:



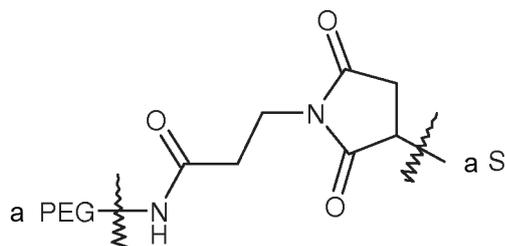
15 y

(4) un compuesto de la fórmula:



20

en la que R³ es un resto conjugado y X representa azufre o un compuesto de la fórmula:



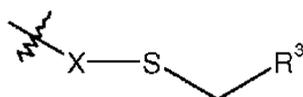
Según se usa en las estructuras anteriores, el símbolo

5

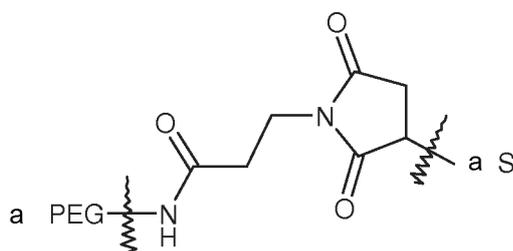


se usa para indicar el lugar en el que la estructura o el resto está unido a la molécula de base por un enlace covalente. Además, la frase "un PEG" o "un S" o un lenguaje similar usado junto con el símbolo anterior, indica dónde o cómo está unida la estructura o el resto a la molécula de base si hay múltiples puntos de unión. Por

10

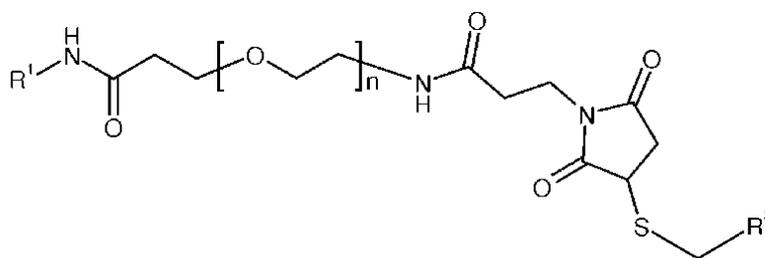


en la que X es un compuesto de la fórmula:



15

entonces la estructura basada en la fórmula I sería:



20

en la que R¹, R³, y n son según se ha definido en la fórmula I.

25

La presente invención también se refiere a métodos para la elaboración y el uso de los compuestos de fórmula I, así como a las composiciones farmacéuticas que contienen dichos compuestos. Los compuestos de fórmula I son útiles para mejorar la administración de moléculas pequeñas, de proteínas, de ácidos nucleicos, de polímeros, de marcadores fluorescentes y de otras sustancias para dirigirse a las células que expresan el receptor αVβ3. En algunas realizaciones en particular, la presente invención se refiere a composiciones y a formulaciones que contienen los compuestos de fórmula I que son útiles en la administración de un ARNip al citoplasma de las células objetivo que expresan el receptor αVβ3 para inhibir la expresión de ciertas proteínas objetivo a través de un ARN interferente.

30

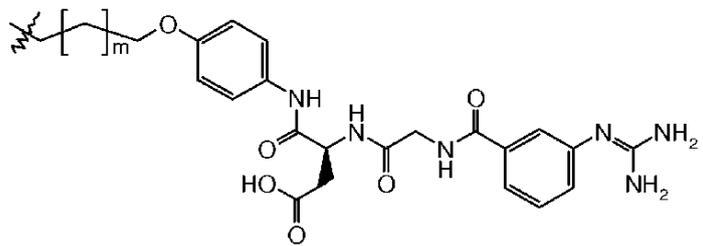
En algunas realizaciones más particulares, la invención se refiere al uso de los compuestos de fórmula I para su formulación para facilitar la administración de ácidos nucleicos tales como un ARNip a células tumorales y a otros

tipos de células que expresan los receptores $\alpha\text{V}\beta3$. Adicionalmente, el uso de los compuestos de fórmula I para sintetizar formulaciones de administración para el tratamiento de la inflamación y de trastornos proliferativos, como cánceres, es parte de la invención.

5 R^1 representa antagonistas de la integrina de molécula pequeña que dirigen los compuestos de Fórmula I a los complejos de receptores de la integrina, facilitando así su administración a las células que expresan dichos receptores.

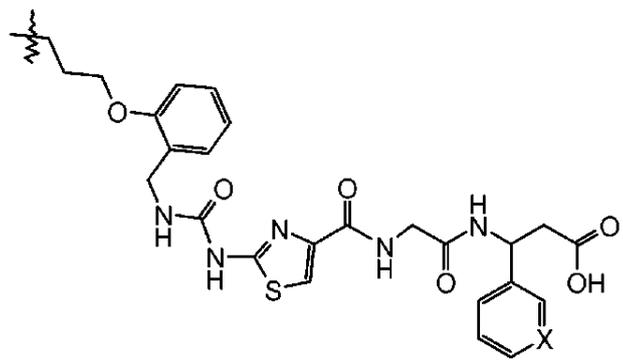
10 En algunas realizaciones en particular, las fracciones de direccionamiento del antagonista de la integrina de molécula pequeña de R^1 están unidas en una posición tal que la afinidad de unión de la molécula pequeña por el receptor de la integrina no está sustancialmente reducida con respecto al antagonista de la integrina de molécula pequeña libre. Las fracciones R^1 de fórmula I se dirigen al dímero de la integrina $\alpha\text{V}\beta3$.

15 En algunas realizaciones en particular, R^1 es un resto de direccionamiento a la integrina $\alpha\text{V}\beta3$ de la fórmula:



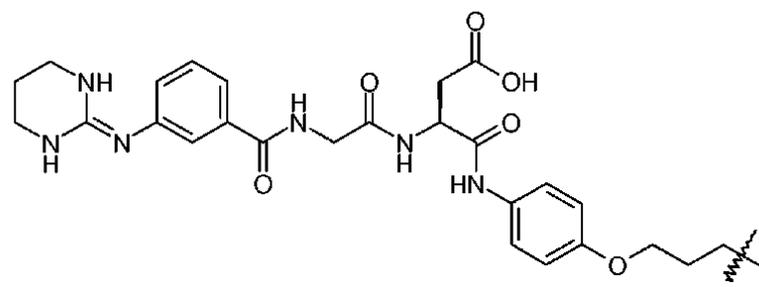
o una sal o un éster farmacéuticamente aceptable de la misma, en la que m es 0 o 1.

20 En otras realizaciones, R^1 es un resto de direccionamiento a la integrina $\alpha\text{V}\beta3$ de la fórmula:



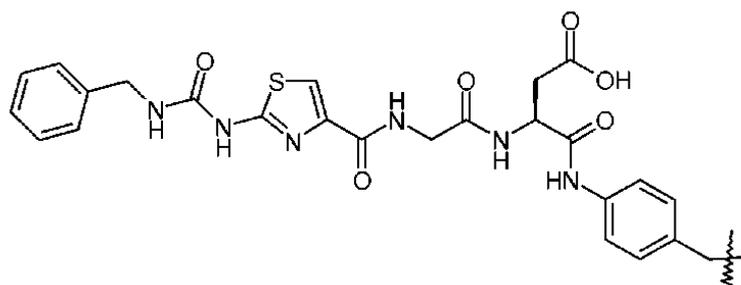
o una sal o un éster farmacéuticamente aceptable de la misma, en la que X es N o CH.

25 En otras realizaciones, R^1 es un resto de direccionamiento a la integrina $\alpha\text{V}\beta3$ de la fórmula:



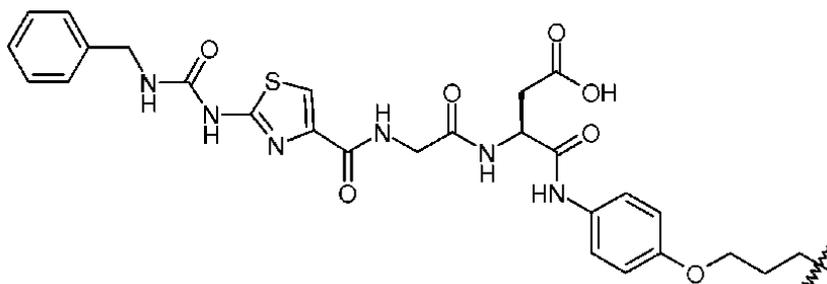
30 o una sal o un éster farmacéuticamente aceptable de la misma.

En otras realizaciones, R^1 es un resto de direccionamiento a la integrina $\alpha\text{V}\beta3$ de la fórmula:



o una sal o un éster farmacéuticamente aceptable de la misma.

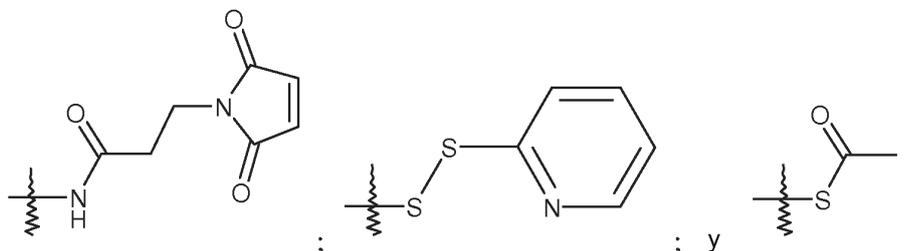
En otras realizaciones, R¹ es un resto de direccionamiento a la integrina αvβ3 de la fórmula:



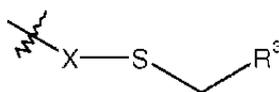
5

o una sal o un éster farmacéuticamente aceptable de la misma.

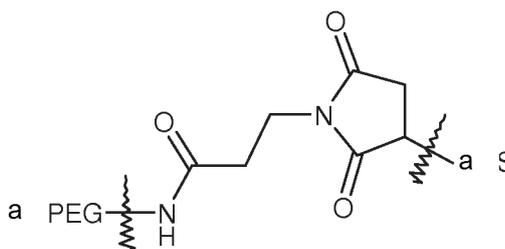
10 R² puede representar fracciones reactivas que pueden formar enlaces covalentes con compuestos terapéuticos o con otros compuestos útiles, o fracciones conjugadas que tienen nucleófilos fuertes tales como moléculas que contienen un tiol. Algunos ejemplos de dichas fracciones reactivas incluyen fracciones seleccionadas entre el grupo que consiste en:



15 Alternativamente, R² puede representar un resto que ya está unido a un resto conjugado, tal como un compuesto terapéutico u otro compuesto útil, una proteína o un oligonucleótido (R³). Más específicamente, R² puede representar un resto de la fórmula:



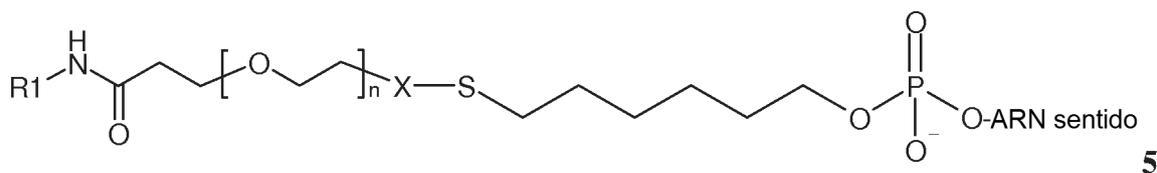
20 en la que R³ es un resto conjugado y X representa azufre o un compuesto de la fórmula:



25 En algunas realizaciones en particular, R³ representa un oligonucleótido. En algunas realizaciones más específicas, R³ representa el extremo 5' de la hebra sentido de una molécula de ARN, que puede existir como una única hebra o

5 en un dúplex, tal como una molécula de ARNip. Dichas moléculas de ARNip, conocidas también como agentes de ARNi, inhiben la expresión de un gen objetivo en una célula. En algunas realizaciones específicas, R³ es una molécula de ARNip que consiste esencialmente en una hebra de un oligorribonucleótido de entre 15 y 30 nucleótidos de longitud, en la que el extremo 5' de la hebra del oligorribonucleótido sentido se acopla con R², según se muestra en las estructuras anteriores, y es complementaria de al menos una porción de un ARNm correspondiente al gen objetivo. En otras realizaciones, R³ es un oligonucleótido de ADN unido por su extremo 5'. Dicho ADN derivatizado puede existir como una única hebra o como una hebra hibridada con una hebra complementaria de otro oligonucleótido. Las hebras del oligonucleótido pueden estar sin modificar o modificadas para una estabilidad metabólica. Dichas modificaciones incluyen, pero no se limitan a, sustituciones en posiciones específicas del fosfato (por ejemplo, fosforotioato) y del 2'-hidroxi (por ejemplo, 2'-O-metilo y 2'-fluoro).

10 En algunas realizaciones en particular, R² de fórmula I representa -X-S-CH₂-R³ en la que R³ incluye una hebra sentido de ARN según se muestra a continuación en la fórmula 5 (basada en la fórmula I):



20 en la que R¹, n, y X son según se ha definido en la fórmula I.

En otras realizaciones en particular, la hebra sentido puede estar unida a una hebra antisentido.

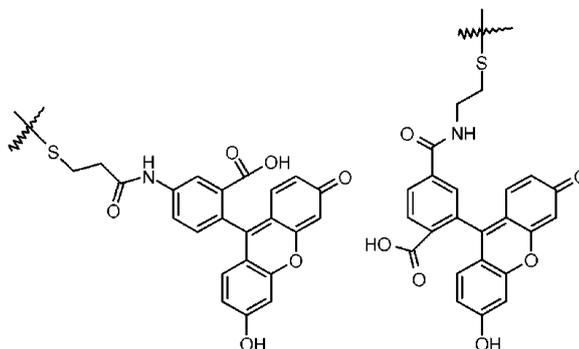
25 En otras realizaciones específicas, R² representa -X-S-CH₂-R³ en la que R³ representa una molécula pequeña o una proteína, formando así una entidad dirigida específicamente unida covalentemente de fórmula I.

En algunas realizaciones más específicas, R² representa -X-S-CH₂-R³ en la que R³ representa una molécula pequeña o una proteína terapéutica.

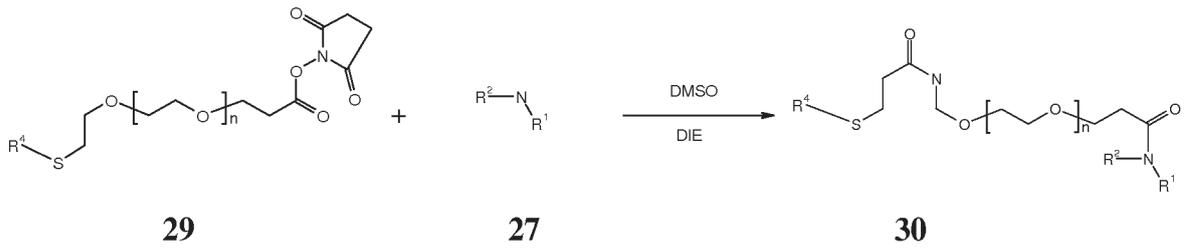
En otras realizaciones específicas, R² representa -X-S-CH₂-R³ en la que R³ representa un resto fluorescente útil para la visualización de estas uniones al receptor de la integrina mediante el uso de técnicas de microscopía celular.

30 En otras realizaciones específicas, R² representa -X-S-CH₂-R³ en la que R³ representa un polímero que tiene sulfuros primarios reactivos. Más específicamente, R³ puede representar un polímero catiónico útil para la complejación y la administración de un ARNip a las superficies celulares y a los dominios citoplasmáticos de las células.

35 En algunas realizaciones más particulares, la presente invención se refiere a compuestos de fórmula I en la que R³ es uno de los isómeros estructurales del isotiocianato de fluoresceína (FITC) mostrado a continuación:

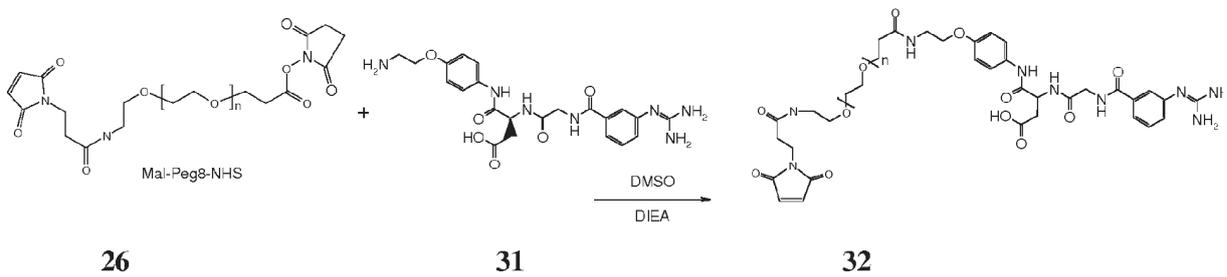


40 En otras realizaciones más particulares, la presente invención se refiere a compuestos de fórmula I en la que R³ es uno de los isómeros estructurales del FITC-14 mostrado a continuación:



Esquema 2

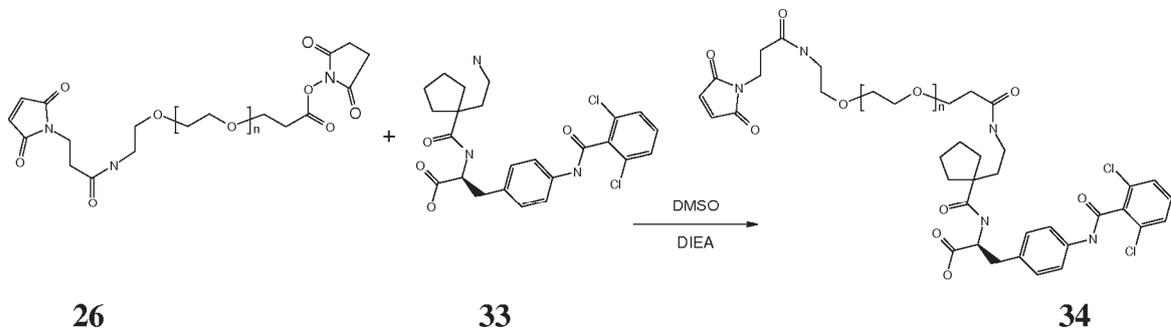
Como un ejemplo específico no limitante de esta invención, el intermedio 26 se hace reaccionar con 31 para producir el intermedio de maleimida de 32 según se muestra en el Esquema 3:



Esquema 3

5

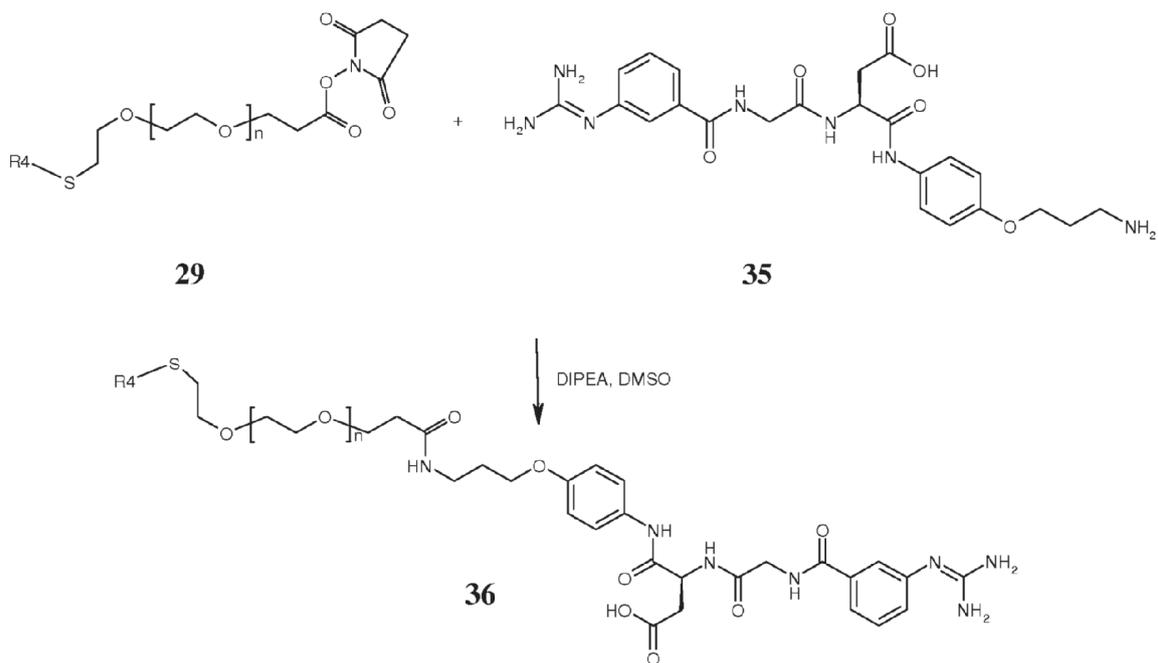
De una forma similar, el intermedio 26 puede hacerse reaccionar con 33 para producir el intermedio de maleimida de 34 según se muestra en el Esquema 4:



Esquema 4

10

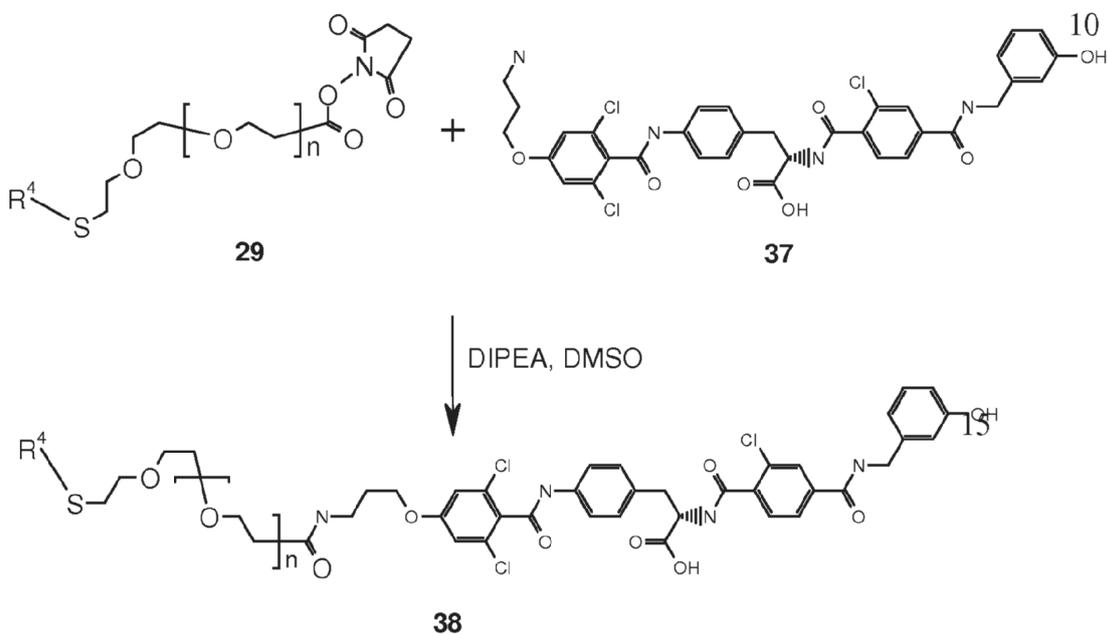
De una forma similar, el intermedio 29 puede hacerse reaccionar con 35 para producir el intermedio de 36 según se muestra en el Esquema 5, en el que R⁴ representa tioacetilo o 2-ditiopiridilo:



Esquema 5

De una forma similar, el intermedio 29 puede hacerse reaccionar con 37 para producir el intermedio de 38 según se muestra en el Esquema 6, en el que R⁴ representa tioacetilo o 2-ditiopiridilo:

5



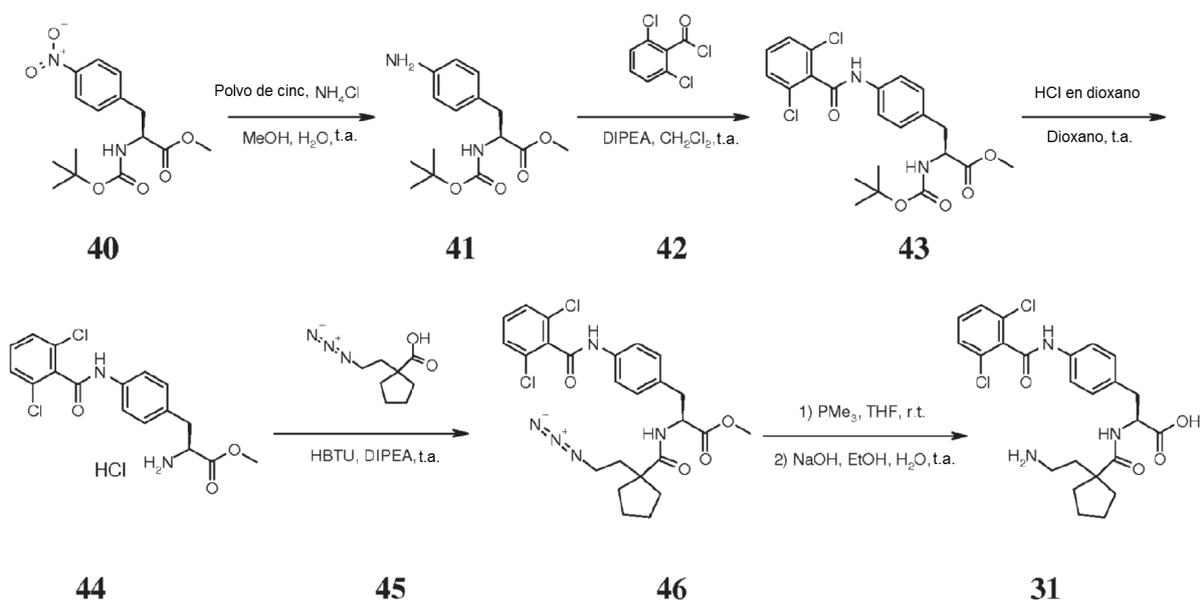
Esquema 6

Para los compuestos con la estructura general 26 o 29, hay disponibles diferentes longitudes de PEG o pueden ser fácilmente elaborados por los expertos en la materia; preferentemente n = 8-24. Este asunto ha sido profundamente notificado y revisado (por ejemplo, Chemistry for peptide and protein PEGylation, Advanced Drug Delivery Reviews Volumen 54, Número 4, 17 de junio de 2002, Páginas 459-476).

10

El intermedio 31 puede ser sintetizado de una forma similar a la que se ha notificado (por ejemplo, Sidduri, A. et al. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2002, 12, 2475-2478) según se muestra en el Esquema 7:

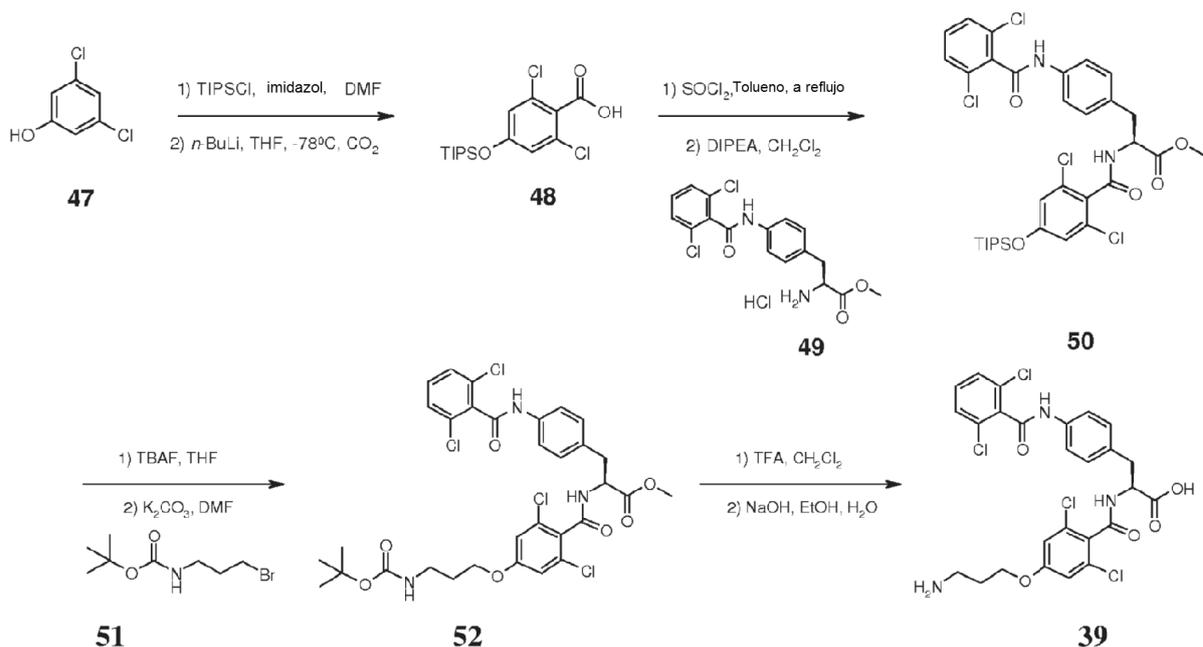
15



Scheme 7

Específicamente, según se muestra en el Esquema 7, el intermedio 41 se creó partir del ácido (S)-3-[4-nitrofenil]-2-*terc*-butoxicarbonilamino-propiónico 40 disponible en el mercado. El grupo nitro del material de partida 40 disponible en el mercado se redujo en una solución de metanol con polvo de cinc en presencia de cloruro de amonio a la temperatura ambiente durante el transcurso de varias horas, dando como resultado la anilina 41. Otros métodos para la reducción del nitro son conocidos por los expertos en la materia. La anilina 41 fue acilada con derivados de un haluro de benzoilo, tales como cloruro de 2,6-diclorobenzoilo 42 en un disolvente aprótico tal como diclorometano en presencia de una base tal como di-isopropil-etil amina a la temperatura ambiente. De esta forma se formó la amida 43. El grupo protector de la amina *t*-butilcarbonilo (Boc) se eliminó según los métodos habituales conocidos por los expertos en la materia, tales como mediante el tratamiento con una solución de HCl en dioxano a la temperatura ambiente; esto dio como resultado el clorhidrato 44. El clorhidrato 44 se trató en unas condiciones de formación de enlaces amida (también bien conocidas por los expertos en la materia) en presencia del conocido ácido 1-(2-azido-etil)-ciclopentanocarboxílico 45, dando como resultado la producción de la diamida 46. El grupo azida del intermedio 46 se redujo mediante un tratamiento con tri-alkilfosfina en un disolvente aprótico tal como tetrahidrofurano a la temperatura ambiente. Además, el éster de metilo fue saponificado mediante un tratamiento con hidróxido de sodio en una mezcla disolvente tal como etanol y tetrahidrofurano a una temperatura elevada tal como 50 °C y durante 15 horas. Este proceso dio como resultado la formación del intermedio 31, que también puede presentarse en forma de un ión bipolar.

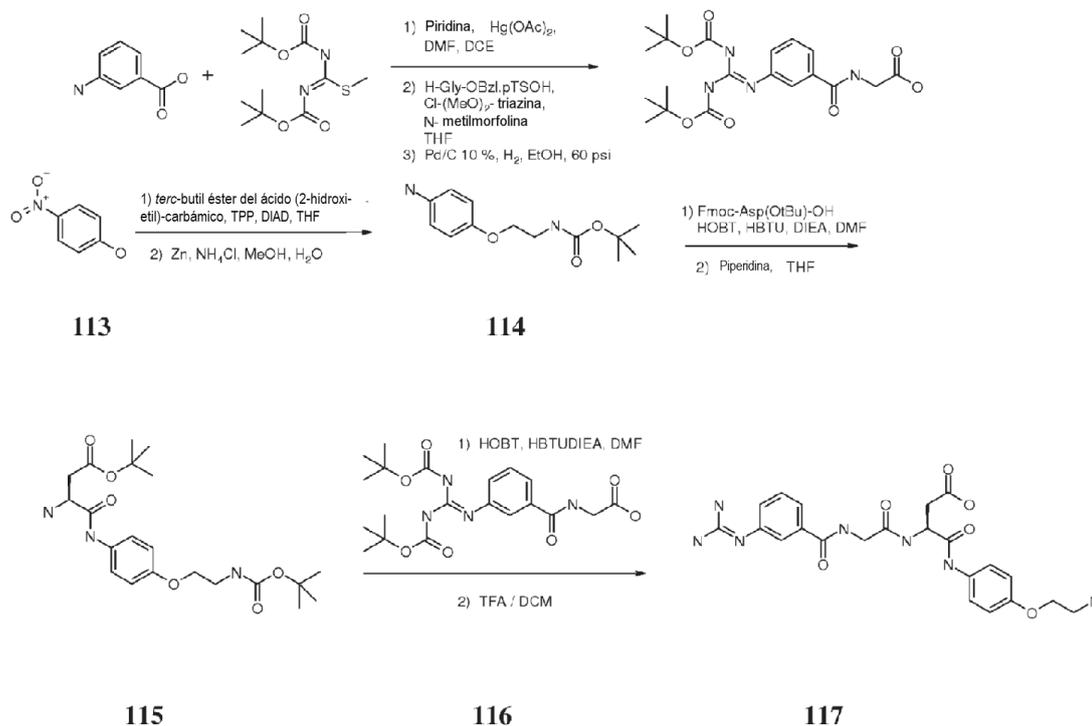
La unión del resto de PEG también es posible con el intermedio 39, que es sintetizado según se muestra en el Esquema 8. Específicamente, el 3,5-diclorofenol 47 se protege con cloruro de tri-isopropilsililo en presencia de una base tal como imidazol en un disolvente aprótico polar tal como DMF antes de la reacción con una base fuerte tal como butil-litio en tetrahidrofurano anhidro a baja temperaturas, tal como a -78 grados C. El complejo de litio resultante se inactiva con dióxido de carbono añadido en forma de hielo seco, dando como resultado el intermedio 48, un derivado del ácido benzoico. Después, el intermedio 48 se clora para formar el cloruro de acilo mediante un tratamiento con cloruro de sulfonilo (SOCl₂) en un disolvente aprótico tal como tolueno. En este momento, el cloruro de acilo se hace reaccionar después con clorhidrato de amina 49 en presencia de una base tal como di-isopropil-etil amina (DIPEA) en un disolvente aprótico tal como diclorometano (DCM), formando así el intermedio 50. El grupo protector de sililo del intermedio 50 se elimina mediante un tratamiento con fluoruro de tetrabutil amonio (TBAF) en un disolvente prótico tal como tetrahidrofurano a la temperatura ambiente. Este intermedio de fenol se hace reaccionar en presencia de una base tal como carbonato de potasio (K₂CO₃) en un disolvente aprótico tal como dimetilformamida (DMF) con 3-N-*t*-butil-carbomato-1-bromopropano. De esta manera se forma el intermedio 52, que tras la desprotección con ácido trifluoroacético (TFA) y la posterior hidrólisis con una base tal como hidróxido de sodio en un disolvente prótico tal como etanol, forma el intermedio 39:



Esquema 8

Síntesis de agentes de derivatización de los antagonistas del $\alpha\beta_3$

- 5 El intermedio 117, un módulo de direccionamiento al $\alpha\beta_3$, puede ser sintetizado según se muestra en el siguiente Esquema 15. En resumen, se hace reaccionar ácido meta-aminobenzoico 110 con N,N-di-Boc-metilurea 111 en DMF, diclorometano y piridina en presencia de acetato mercúrico. En este punto, la glicina protegida por el éster de bencilo se acopla al ácido carboxílico del producto de la reacción anterior en unas condiciones formadoras de péptido estándar. El éster de bencilo se elimina en unas condiciones de hidrogenolisis, proporcionando así el ácido libre 112. En una secuencia de reacción individual, se acopla para-nitrofenol 113 con el *tert*-butil éster del ácido (2-hidroxi-etil) carbámico en presencia de trifetil fosfina y azodicarboxilato de diisopropilo en un disolvente aprótico tal como tetrahidrofurano. El grupo nitro de este producto se reduce a la correspondiente anilina 114, la cual se acopla en unas condiciones de formación de un enlace amida al β - *tert* - butil éster del ácido N - α - Fmoc - L - aspártico. Después de la eliminación del grupo protector de amino Fmoc mediante un tratamiento con piperidina, el amino terminal se acopla al intermedio 115 de nuevo en unas condiciones de formación de un enlace amida estándar, para formar el intermedio 116. Después del tratamiento con un ácido fuerte, tal como ácido trifluoroacético, se forma el intermedio 117 y se aísla mediante métodos de purificación bien conocidos por los expertos en la materia (por ejemplo, una HPLC preparativa).
- 10
- 15

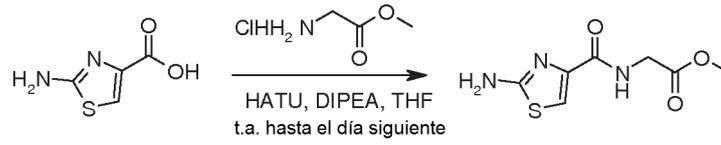


Esquema 15

El análogo de amina con una cadena de 3 carbonos de 117 puede ser preparado de una manera similar según se muestra en el Esquema 15 mediante el uso del *tert*-butil éster del ácido (3-bromopropil) carbámico en lugar del *tert*-butil éster del ácido (2-hidroxi-etil) carbámico.

Otros módulos de direccionamiento al $\alpha\beta 3$ pueden ser sintetizados según se muestra en el siguiente Esquema 16. Se ha notificado el metil éster del ácido [(2-amino-tiazol-4-carboxílico) 120 (Amide derivatives and their preparation and use as pesticides, de Kobayashi, Yumi; Daido, Hidenori; Katsuta, Hiroyuki; Nomura, Michikazu; Tsukada, Hidetaka; Hirabayashi, Atsushi; Takahashi, Yusuke; Aoki, Yoji; Kawahara, Atsuko; Fukazawa, Yasuaki; et al., Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. (2011), documento US 20110201687 A1 20110818). El Intermedio 120 se hace reaccionar en unas condiciones de formación de un enlace amida estándar con clorhidrato del metil éster de alanina 121, creando así el intermedio éster 122. Por separado, se produce 3-(2-(aminometil)fenoxi) propilcarbarnato de *tert*-butilo 129 mediante la reacción de N-(2-hidroxibencil) acetamida 127 en un disolvente aprótico tal como DMF con 3-bromopropilcarbarnato de *tert*-butilo 124 en presencia de una base tal como carbonato de potasio. El grupo amino del intermedio 129 es revelado mediante un tratamiento con hidrato de hidrazina. La amina libre resultante 130 se trata con trifosgeno para crear el isocianato 131, que se combina con el metil éster del ácido [(2-amino-tiazol-4-carbonil)-amino]-acético 132 en un disolvente aprótico tal como DMF produciendo el intermedio 133. La transformación del metil éster del Intermedio 133 se consigue en unas condiciones de saponificación estándar, seguido del acoplamiento con el clorhidrato de 3-amino-3-fenilpropanoato de metilo disponible comercialmente 146 o los isómeros enantioméricamente puros del clorhidrato 3-amino-3-(3-piridil)propanoato de metilo 147 y 148 en unas condiciones de reacción de formación de enlaces amida estándar, formando así el intermedio 135. El grupo protector Boc se elimina en las condiciones convencionales para formar la molécula pequeña de direccionamiento al $\alpha\beta 3$ 136.

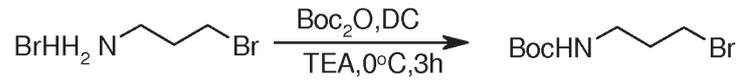
Esquema de reacción 16 para los siguientes ejemplos: Reactivo ligando del $\alpha\beta 3$ 9, Reactivo ligando del $\alpha\beta 3$ 10, Reactivo ligando del $\alpha\beta 3$ 11 y Reactivo ligando del $\alpha\beta 3$ 12:



120

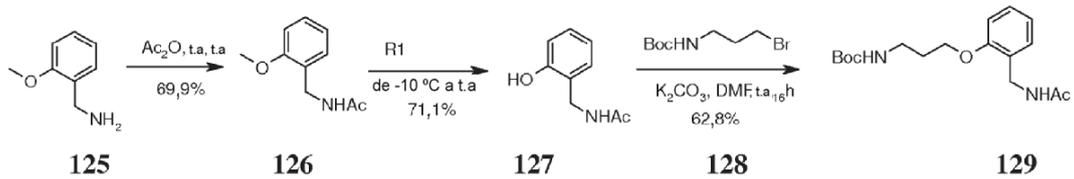
121

122



123

124



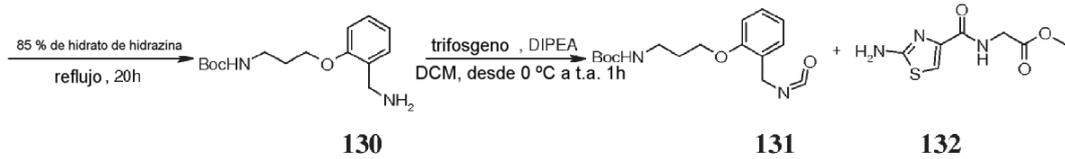
125

126

127

128

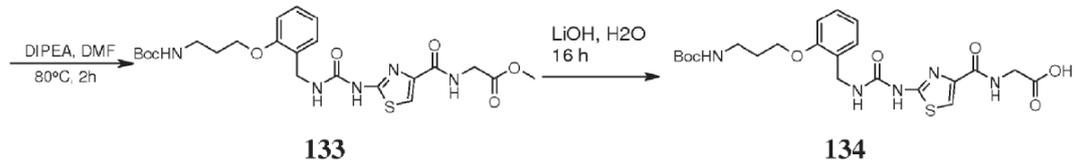
129



130

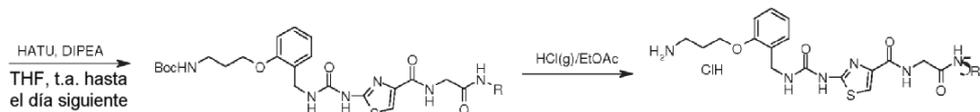
131

132



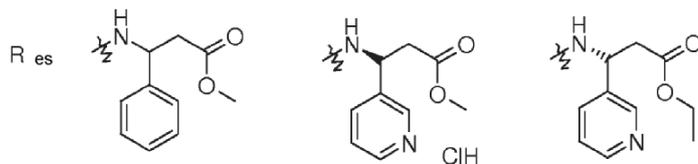
133

134



135

136



146

147

148

Esquema 16

Utilidad

Los compuestos de fórmula I son útiles en la administración de fracciones conjugadas tales como compuestos terapéuticos, moléculas pequeñas, péptidos, ácidos nucleicos, fracciones fluorescentes y polímeros para dirigirse a las células que expresan los complejos del receptor de la integrina $\alpha\text{V}\beta 3$ para diversas aplicaciones terapéuticas y otras. Consecuentemente, los compuestos de fórmula I pueden usarse para el tratamiento de diversas enfermedades y afecciones que están asociadas con la expresión o con la sobreexpresión del $\alpha\text{V}\beta 3$. Dichas enfermedades y afecciones pueden incluir inflamación, cáncer y las enfermedades metabólicas relacionadas.

En algunas realizaciones en particular, la presente divulgación comprende un método para el tratamiento o la prevención del cáncer en un mamífero (preferentemente en un ser humano) en necesidad de dicho tratamiento, en el que el método comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula I. Dichas composiciones pueden ser administradas de una forma coherente con una buena práctica médica. Algunos factores a tener en consideración en este contexto incluyen el trastorno particular que se va a tratar, el mamífero en particular que se va a tratar, la afección clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el lugar de administración del agente, el método de administración, el programa de administración y otros factores conocidos por los profesionales médicos. La "cantidad eficaz" del compuesto que se va a administrar estará gobernada por consideraciones tales como la cantidad mínima necesaria para el tratamiento o la prevención de la enfermedad o de la afección (por ejemplo, la inhibición de la expresión de una proteína objetivo) y para evitar una toxicidad inaceptable. Por ejemplo, dicha cantidad puede ser inferior a la cantidad que es tóxica para las células normales o para el mamífero como un todo. Las composiciones que contienen un compuesto de fórmula I de la invención pueden ser administradas mediante una administración parenteral, intraperitoneal e intrapulmonar. Las infusiones parenterales incluyen una administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea.

Ejemplos

La invención se comprenderá más completamente mediante referencia a los siguientes ejemplos. Sin embargo, no deben ser interpretados como limitantes del ámbito de la invención.

Los reactivos se adquirieron en Aldrich, en Sigma y en Pierce BioScience o en otros proveedores, según se indica a continuación, y se usaron sin purificación adicional. La purificación a escala desde multi-miligramo hasta multi-gramo se llevó a cabo mediante métodos conocidos por los expertos en la materia, tales como una elución en una columna ultrarrápida de gel de sílice. En algunos casos también se efectuaron purificaciones preparativas en columna ultrarrápida mediante el uso de columnas desechables pre-empaquetadas de gel de sílice (RediSep) eluyendo con un sistema CombiFlash. Biotage™ e ISCO™ también son instrumentos de columna ultrarrápida que pueden ser usados en esta invención para la purificación de los intermedios.

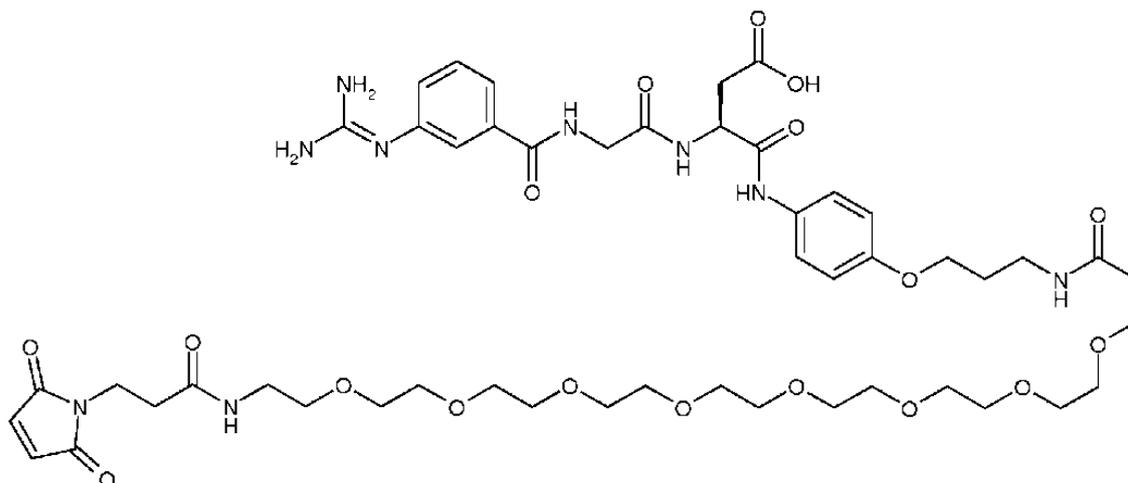
Con el fin de juzgar la identidad y la pureza del compuesto, se registraron los espectros de CL / EM (cromatografía de líquidos / espectroscopía de masas) mediante el uso del siguiente sistema. Para la medición de los espectros de masas, el sistema consistía en un espectrómetro Micromass Platform II: una ionización ES en modo positivo (intervalo de masa: 150 -1.200 amu). La separación cromatográfica simultánea se consiguió con el siguiente sistema de HPLC: cartucho de columna de ES Industries Chromegabond WR C-18 3u 120 Å (de 3,2 x 30 mm); fase móvil A: agua (0,02 % de TFA) y fase B: acetonitrilo (0,02 % de TFA); gradiente desde un 10 % de B hasta un 90 % de B en 3 minutos; tiempo de equilibrado de 1 minuto; caudal de 2 ml/minuto. En algunos casos, se usó acetato de amonio a una concentración de 20 milimolar como modificador para una ionización eficaz durante la HPLC preparativa. En dichos casos, se aísla la sal de amonio.

En algunas separaciones puede ser útil el uso de una cromatografía de fluidos supercríticos. Las separaciones mediante una cromatografía de fluidos supercríticos se llevaron a cabo mediante el uso de un sistema Mettler-Toledo Minigram con las siguientes condiciones típicas: 100 bar, 30 °C, 2,0 ml/min eluyendo una columna de 12 mm AD con un 40 % de MeOH en CO₂ supercrítico. En el caso de analitos con grupos amino básicos, se añadió un 0,2 % de isopropil amina al modificador de metanol.

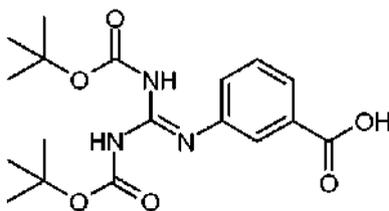
Los compuestos fueron caracterizados bien mediante una RMN ¹H mediante el uso de un espectrómetro de RMN Varian Inova a 400 MHz o bien un espectrómetro de RMN Varian Mercury a 300 MHz, así como una espectrometría de masas de alta resolución mediante el uso de un espectrómetro de masas de alta resolución Bruker Apex-II 4.7T FT. Los compuestos finales también fueron caracterizados por una espectrometría de masas de alta resolución mediante el uso de un LTQ CL Orbitrap vendido por Thermo Electron.

Las abreviaturas usadas en el presente documento son como sigue:

AIBN	2,2'-azobisisobutironitrilo
Bu	butilo
DCE	1,2-dicloroetano



Etapa 1: preparación del ácido 3-(N,N-bis-*tert*-butoxicarbonilguanidino)-benzoico:



5

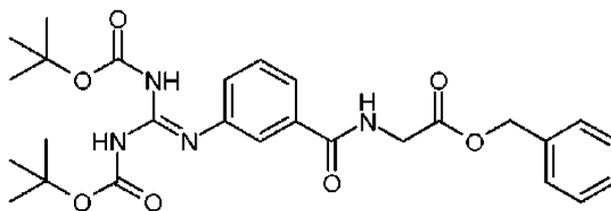
Se trató una solución de ácido 3-aminobenzoico (82,3 g, 0,60 mol), N,N'-bis(*tert*-butoxicarbonil)-S-metilisotiurea (1,3-di-boc-2-metilisotiurea, CAS # 107819-90-9) (174,2 g, 0,6 mol) y piridina (94,92 g, 97 ml, 1,20 mol, 2,0 equivalentes) en una mezcla de dimetilformamida anhidra (600 ml) y 1,2-dicloroetano anhidro (600 ml) con acetato mercúrico (95,6 g, 0,30 mol, 0,5 equivalentes) y se agitó con un agitador mecánico suspendido durante 5 h a la temperatura ambiente. Después, los sólidos se eliminaron mediante filtración, se lavaron con diclorometano y el filtrado y los lavados combinados se evaporaron para proporcionar el producto en bruto (~ 307 g). A este material en bruto se añadió metanol (240 ml) y la mezcla se agitó vigorosamente durante 2 h. Después se añadieron lentamente 2.400 ml de agua mientras se agitaba vigorosamente. Filtrar, lavar los sólidos concienzudamente con agua y secar por aspiración durante una noche para obtener del ácido 3-(N,N-bis-*tert*-butoxicarbonilguanidino)-benzoico con un rendimiento mayor del teórico. Bombear hasta sequedad a alto vacío.

10

El peso obtenido era superior al valor teórico (teórico = 227,6 g, real = 251,2 g, la RMN 1H implica un ~10 % de DMF presente).

15

Etapa 2: preparación del bencil éster del ácido 2-(3-(N,N-bis-*tert*-butoxicarbonilguanidino)benzoi)-aminoacético:



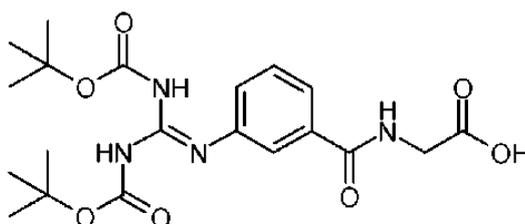
Se agitó una solución de color marrón claro del ácido 3-(N,N-bis-*tert*-butoxicarbonilguanidino) benzoico (171,56 g, 0,4073 mol), 2-cloro-4,6-dimetoxi-triazina (71,52 g, 0,4073 mol) y N-metilmorfolina (41,2 g, 44,78 ml, 0,4073 mol) en tetrahidrofurano anhidro (1600 ml) (agitador mecánico suspendido) durante 2 h a la temperatura ambiente y después se añadieron la sal del bencil éster de glicina p-TsOH (137,44 g, 0,4073 mol) y un segundo equivalente de N-metilmorfolina (41,2 g, 44,78 ml, 0,4073 mol). La mezcla resultante se agitó a la temperatura ambiente durante 36 h. Después, el tetrahidrofurano se eliminó con el evaporador rotatorio y después se añadió acetato de etilo (2.000 ml). La mezcla resultante se lavó sucesivamente con HCl 0,5 N enfriado en hielo (3 x 1.000 ml), agua (1 x 1.000 ml), carbonato de sodio acuoso al 5 % de (1 x 1.000 ml), agua (1 x 1.000 ml), cloruro de sodio acuoso saturado (1 x 1.000 ml) y se secó sobre sulfato de sodio. Los sólidos se eliminaron mediante una filtración, y el disolvente se

25

30

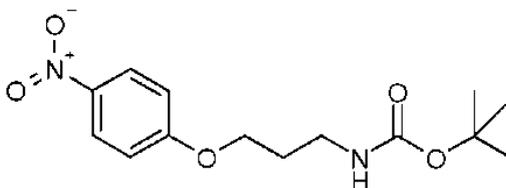
evaporó para proporcionar el producto en bruto (228,5 g) en forma de un aceite. El material en bruto se purificó mediante una cromatografía sobre la Waters Prep500 (10 análisis) mediante el uso de diclorometano:hexano:acetato de etilo en una proporción de 40:45:15 como eluyente, para proporcionar el bencil éster del ácido 2-(3-(N,N-bis-*tert*-butoxicarbonilguanidino)benzoil)-amino-acético (79,3 % de rendimiento). (Nota: en los primeros análisis se obtuvieron 152 g de material limpio y 33 g de un material ligeramente impuro que se cromatografía de nuevo en dos análisis). ES (+) - HRMS m/e calcd. para C₂₇H₃₄N₄O₇ (M + H)⁺ 527,2500, obsd. 527,2499.

Etapa 3: preparación del ácido 2-(3-(N,N-bis-*tert*-butoxicarbonilguanidino)benzoil)-aminoacético



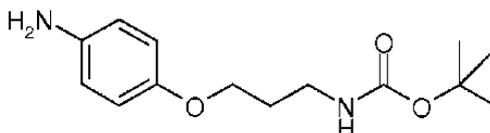
Una solución del bencil éster del ácido 2-(3-(N,N-bis-*tert*-butoxicarbonilguanidino)benzoil)-amino-acético (170,0 g, 0,323 mol) en etanol absoluto (2.000 ml) se hidrogenó sobre Pd al 10 % sobre carbono (20 g de catalizador húmedo, que contiene ~ 50 % agua) a 60 psi durante una noche (18 h) en las instalaciones a alta presión a la temperatura ambiente. El catalizador se eliminó mediante una filtración, y el disolvente se evaporó para proporcionar el producto. El producto se azeotropó con tolueno (3 veces) para eliminar todo el etanol, para proporcionar el ácido 2-(3-(N,N-bis-*tert*-butoxicarbonilguanidino)benzoil)-amino-acético (97,88 % de rendimiento) en forma de un sólido de color blanco. ES (+) - HRMS m/e calcd. para C₂₀H₂₈N₄O₇ (M + H)⁺ 437,2031, obsd. 437,2030.

Etapa 4: preparación del *tert*-butil éster del ácido [3-(4-nitro-fenoxi)-propil]-carbámico:



A una solución del *tert*-butil éster del ácido (3-hidroxi-propil)-carbámico (7,03 g, 40,1 mmol) en THF anhidro (40 ml) se añadieron 4-nitrofenol (5,07 g, 36,5 mmol), trifetilfosfina (10,5 g, 40,1 mmol) a la temperatura ambiente en una atmósfera de nitrógeno. La solución resultante se enfrió hasta ~ 0 °C con un baño de agua helada y después se añadió gota a gota azodicarboxilato de diisopropilo (DIAD, 8,1 g, 40,1 mmol) durante 15-20 minutos. Después de la adición, la solución se calentó hasta la temperatura ambiente y se agitó durante 15 h, momento en el cual un análisis mediante CLEM indicó la presencia de un 16 % del material de partida. Después se añadieron otros 0,1 equivalentes de todos los reactivos anteriores, y la mezcla de reacción se agitó durante otras 15 h. Los sólidos se eliminaron mediante una filtración y se lavaron con acetato de etilo, y después el filtrado se lavó con una solución saturada de cloruro de sodio y se secó sobre sulfato de magnesio anhidro. Una filtración y una concentración proporcionaron el residuo en bruto, que se purificó mediante el uso de una cromatografía en una columna ISCO (340 g) para obtener el *tert*-butil éster del ácido [3-(4-nitro-fenoxi)-propil]-carbámico (64 % de rendimiento) en forma de un sólido de color blanco. ES (+) - HRMS m/e calcd. para C₁₄H₂₀N₂O₅ (M + Na)⁺ 319,1264, obsd. 319,1266.

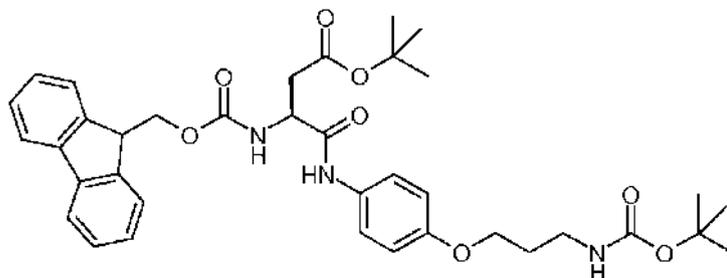
Etapa 5: preparación del *tert*-butil éster del ácido [3-(4-amino-fenoxi)-propil]-carbámico:



A una solución del *tert*-butil éster del ácido [3-(4-nitro-fenoxi)-propil]-carbámico (7,7 g, 26 mmol) en metanol (200 ml, calentado para disolver el material de partida) se añadieron agua (10 ml), cloruro de amonio (20,9 g, 390 mmol, 15 equivalentes) y polvo de cinc (16,4 g, 260 mmol, 10 equivalentes, 3 porciones) a la temperatura ambiente. Después de la adición de polvo de cinc, la mezcla de reacción era exotérmica y la mezcla de reacción se agitó durante 1-2 h, momento en el cual un análisis mediante TLC de la mezcla indicó la ausencia de material de partida. Entonces, los sólidos se eliminaron mediante una filtración y se lavaron con agua y acetato de etilo, y el compuesto orgánico del filtrado se extrajo con acetato de etilo (3 x 100 ml). Los extractos combinados se lavaron con una solución de

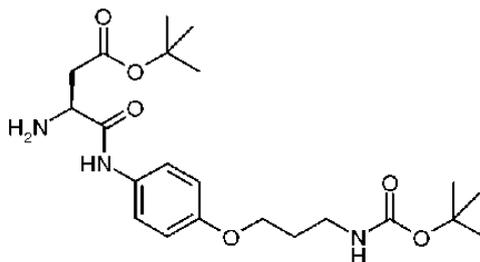
salmuera y se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro. Una filtración y una concentración proporcionaron el residuo en bruto, que se purificó mediante el uso de una cromatografía en una columna ISCO (330 g) para aislar el *tert*-butil éster del ácido [3-(4-amino-fenoxi)-propil]-carbámico (79 % de rendimiento) en forma de un sólido de color blanco. ES (+) - HRMS m/e calcd. para C₁₄H₂₂N₂O₃ (M + Na)⁺ 289,1522, obsd. 289,1523.

5 Etapa 6: preparación del *tert*-butil éster del ácido (S)-N-[4-(3-*tert*-butoxicarbonilamino-propoxi)-fenil]-3-(9H-fluoren-9-ilmtoxycarbonilamino)-succinámico:



10 A una solución del *tert*-butil éster del ácido [3-(4-amino-fenoxi)-propil]-carbámico (5,41 g, 20,2 mmol) y el *tert*-butil éster del ácido (S)-2-(9H-fluoren-9-ilmtoxycarbonilamino)-succínico en DMF (40 ml) se añadieron HOBT (3 g, 22,2 mmol) y DIPEA (8,52 g, 66,6 mmol) a la temperatura ambiente. La solución resultante se enfrió hasta 0 °C con un baño de hielo y se añadió HBTU sólido (8,43 g, 22,2 mmol) en 3 porciones durante un periodo de 5-10 minutos. Después de la adición, se retiró el baño de refrigeración y la mezcla de reacción se dejó calentar hasta la temperatura ambiente y se agitó durante 2,5 h, punto en el cual un análisis mediante CLEM indicó la ausencia de material de partida. Entonces, la mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo (400 ml) y se lavó con agua (400 ml), una solución saturada de bicarbonato de sodio (400 ml) y una solución de salmuera (400 ml). Después de secar sobre sulfato de magnesio anhidro, la filtración se concentró y el residuo en bruto se purificó mediante el uso de una cromatografía en una columna ISCO (330 g) para aislar el *tert*-butil éster del ácido (S)-N-[4-(3-*tert*-butoxicarbonilamino-propoxi)-fenil]-3-(9H-fluoren-9-ilmtoxycarbonilamino)-succinámico (95 % de rendimiento) en forma de un sólido de color blanco. ES (+) - HRMS m/e calcd. para C₃₇H₄₅N₃O₈ (M + Na)⁺ 682,3099, obsd. 682,3105.

25 Etapa 7: preparación del *tert*-butil éster del ácido (S)-3-amino-N-[4-(3-*tert*-butoxicarbonilamino-propoxi)-fenil]-succinámico:

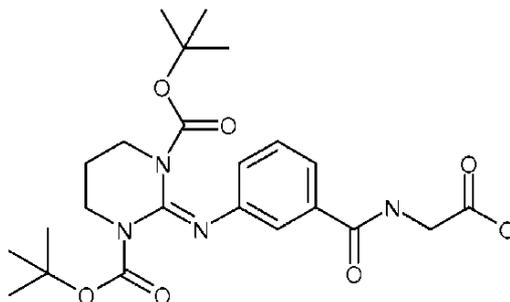


30 A una solución del *tert*-butil éster del ácido (S)-N-[4-(3-*tert*-butoxicarbonilamino-propoxi)-fenil]-3-(9H-fluoren-9-ilmtoxycarbonilamino)-succinámico (11 g, 16,67 mmol) en THF (95 ml) se añadió piperidina (4,26 g, 50 mmol) a la temperatura ambiente. La solución resultante se agitó 4 h, punto en el cual un análisis mediante CLEM indicó la ausencia de material de partida. Entonces, el disolvente se eliminó a vacío y el residuo se azeotropó con tolueno para obtener un sólido de color blanco que se disolvió en un mínimo de acetato de etilo (25-30 ml) en caliente, y después se diluyó con hexanos (250-300 ml) hasta que hubo precipitación. Los sólidos resultantes se recogieron mediante una filtración y se lavaron con hexanos para obtener, después de secar al aire, el *tert*-butil éster del ácido (S)-3-amino-N-[4-(3-*tert*-butoxicarbonilamino-propoxi)-fenil]-succinámico (81 % de rendimiento) en forma de un sólido de color blanco. ES (+) - HRMS m/e calcd. para C₂₂H₃₅N₃O₆ (M + Na)⁺ 460,2418, obsd. 460,2416.

40 Etapa 8: preparación del *tert*-butil éster del ácido (S)-3-(2-(3-(N,N-bis-*tert*-butoxicarbonilguanidino)-benzoilamino)-acetilamino)-N-[4-(3-*tert*-butoxicarbonilamino-propoxi)-fenil]-succinámico:

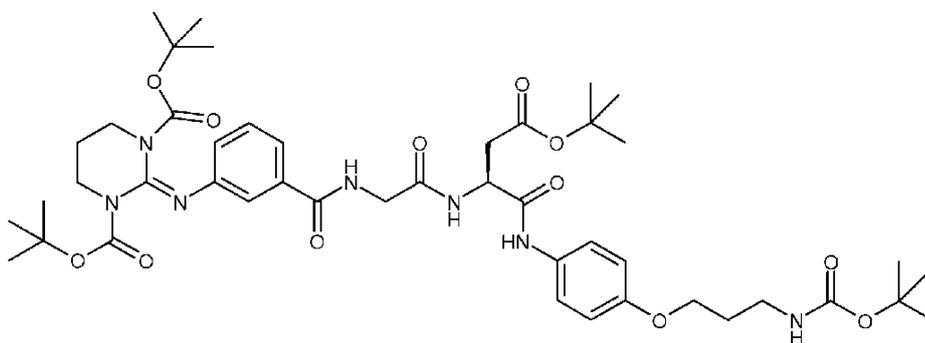
benciléster de glicina p-TsOH (3,9 g, 11,56 mmol) y un segundo equivalente de N-metilmorfolina (1,17 g, 1,27 ml, 11,56 mmol) en tetrahidrofurano anhidro (90 ml), y después de una purificación mediante una cromatografía en una columna ISCO, dio como resultado un aceite viscoso incoloro (3,19 g, 49 %). ES (+) - HRMS m/e calcd. para C₃₀H₃₈N₄O₇ (M + H)⁺ 567,2813, obsd. 567,2810.

5 Etapa 2: preparación del di *tert*-butil éster del ácido 2-[3-(carboximetil-carbamoi)fenilimino]-dihidro-pirimidin-1,3-dicarboxílico:



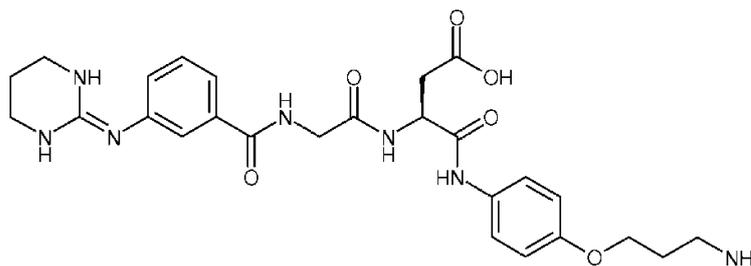
10 El compuesto del título se preparó mediante el uso de un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1, Etapa 3, partiendo del di *tert*-butil éster del ácido 2-[3-(benciloxicarbonilmetilcarbamoi)fenilimino]-dihidropirimidin-1,3-dicarboxílico (475 mg, 0,84 mmol) y Pd al 10 % sobre carbono (250 mg) en etanol absoluto (20 ml), dando como resultado un sólido amorfo de color blanco (355 mg, 89 %). ES (+) - HRMS m/e calcd. para C₂₃H₃₂N₄O₇ (M + H)⁺ 477,2344, obsd. 477,2344.

15 Etapa 3: preparación del di *tert*-butil éster del ácido 2-[3-[[[(S)-2-*tert*-butoxicarbonil-1-[4-(3-*tert*-butoxicarbonilamino-propoxi)fenil]carbamoi]etilcarbamoi]metil]carbamoi]fenilimino]dihidropirimidin-1,3-dicarboxílico:



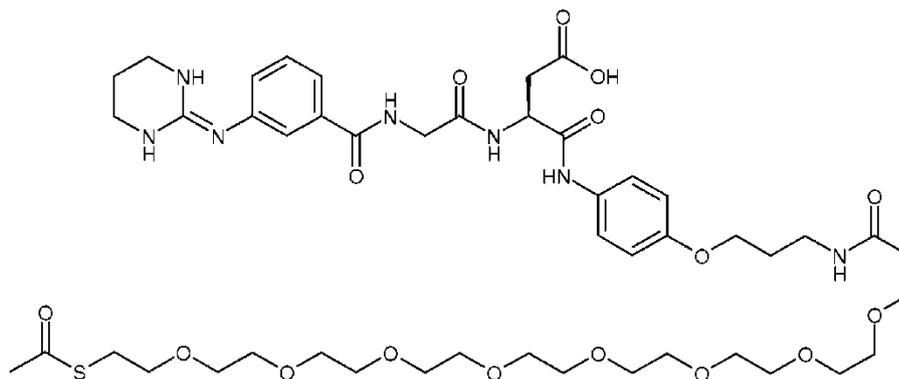
20 El compuesto del título se preparó mediante el uso de un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1, Etapa 8, partiendo del di *tert*-butil éster del ácido 2-[3-(carboximetil-carbamoi)fenilimino]-dihidropirimidin-1,3-dicarboxílico (332 mg, 0,69 mmol), el *tert*-butil éster del ácido (S)-3-amino-N-[4-(3-*tert*-butoxicarbonilamino-propoxi)-fenil]-succinámico (305 mg, 0,69 mmol), HBTU (290 mg, 0,76 mmol), HOBT (104 mg, 0,76 mmol) y DIPEA (297 mg, 400 μl, 2,3 mmol) en DMF (5 ml), y después de una purificación mediante una cromatografía en una columna ISCO, dio como resultado un sólido amorfo de color blanco (602 mg, 97 %). ES (+) - HRMS m/e calcd. para C₄₅H₆₅N₇O₁₂ (M + H)⁺ 896,4764, obsd. 896,4764.

30 Etapa 4: preparación del ácido (S)-N-[4-(3-amino-propoxi)fenil]-3-[2-[3-(tetrahidropirimidin-2-ilidenoamino)benzoi]amino]acetilamino] succinámico; Ligando del αVβ3 2:



5 El compuesto del título se preparó mediante el uso de un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1, Etapa 9, partiendo del di-*tert*-butil éster del ácido 2-[3-[[[(*S*)-2-*tert*-butoxicarbonil-1-[4-(3-*tert*-butoxicarbonilamino-propoxi)fenilcarbamoil]etilcarbamoil]metil]carbamoil]fenilimino]dihidropirimidin-1,3-dicarboxílico (595 mg, 0,66 mmol) y ácido trifluoroacético (10 ml) en diclorometano (20 ml), dando como resultado un sólido de color marrón claro en forma de una sal de trifluoroacetato (555 mg, 96 %). ES (+) - HRMS m/e calcd. para C₂₃H₂₉N₇O₆ (M + H)⁺ 500,2252, obsd. 500,2252.

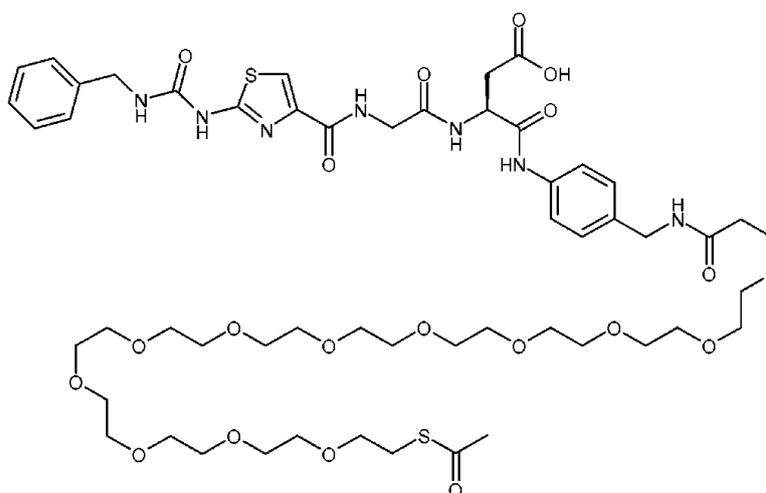
10 Etapa 5: preparación del ácido (S)-N-[[[4-[3-[2-[2-[2-[2-[2-(2-acetilsulfanil-etoxi)etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]-1-oxopropil]amino]propoxi]-fenil]-3-[2-[3-(tetrahidropirimidin-2-ilidenoamino)-benzoilamino]-acetilamino]-succinámico (Reactivo ligando del αVβ3 4):



15 El compuesto del título se preparó mediante el uso de un procedimiento similar al descrito en in Ejemplo 1, Etapa 10, partiendo del ácido (S)-N-[4-(3-amino-propoxi)fenil]-3-[2-[3-(tetrahidropirimidin-2-ilidenoamino)benzoilamino]acetilamino]-succinámico (265 mg, 0,3 mmol), el 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster del ácido 3-[2-[2-[2-[2-[2-(2-acetilsulfanil-etoxi)etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]-propiónico (179 mg, 0,3 mmol) y DIPEA (387 mg, 526 μl, 3,0 mmol) y después de una purificación mediante una HPLC, dio como resultado un aceite viscoso de color amarillo claro (208 mg, 68 %). ES (+) - HRMS m/e calcd. para C₄₇H₇₁N₇O₁₆S (M + H)⁺ 1022,4751, obsd. 1022,4742.

Ejemplo 5

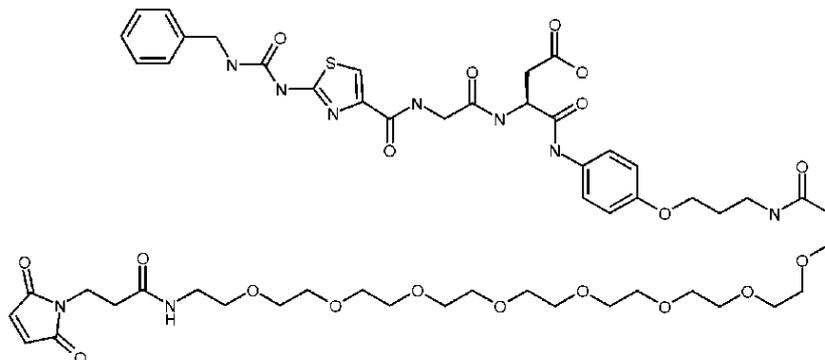
25 Preparación del ácido (S)-N-[[[4-[3-[2-[2-[2-[2-[2-(2-acetilsulfanil-etoxi)etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]-1-oxopropil]amino]propoxi]-fenil]-3-[2-[2-(3-bencilureido)tiazol-4-carbonil]amino]acetilamino]-succinámico; Reactivo ligando del αVβ3 5:



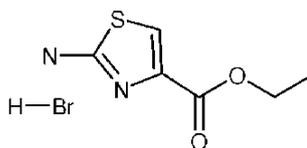
30 El compuesto del título se preparó mediante el uso de un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1, Etapa 10, partiendo del ácido (S)-N-[4-aminometilfenil]-3-[2-[[2-(3-bencilureido)tiazol-4-carbonil]amino]-acetilamino]-succinámico (166 mg, 0,3 mmol), el 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster del ácido 3-[2-[2-[2-[2-[2-(2-acetilsulfanil-etoxi)etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]-propiónico (232 mg, 0,3 mmol) y DIPEA (387 mg, 522 μl, 3,0 mmol) y después de una purificación mediante una HPLC, dio como resultado un aceite de color marrón claro (362 mg, 99 %). ES (+) - HRMS m/e calcd. para C₅₄H₈₁N₇O₂₀S₂ (M + H)⁺ 1212,5051, obsd. 1212,5058.

Ejemplo 6

Ácido (S)-N-[4-[3-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-pirrol-1-il)-propionilamino]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]propionilamino]propoxi]-fenil]-3-[2-[[2-(3-bencil-ureido)-tiazol-4-carbonil]-amino]-acetilamino]-succinámico; Reactivo ligando del $\alpha V\beta 3$ 6:

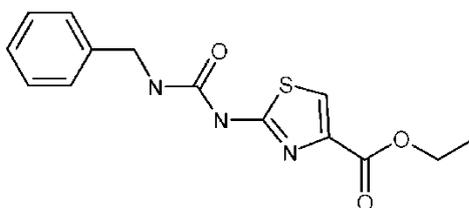


Etapa 1: preparación del bromhidrato del etil éster del ácido 2-amino-tiazol-4-carboxílico:



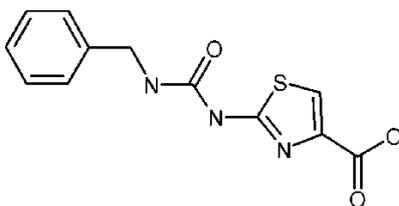
Un matraz de 3 l de 3 cuellos equipado con un condensador, un termómetro y un agitador mecánico, en un baño de aceite, se cargó con tiourea (48,2 g, 634 mmol) y bromopiruvato de etilo (137 g, 88,3 ml, 634 mmol). La reacción se calentó lenta y cuidadosamente hasta que se formó una solución clara (60 °C), tras lo cual que la reacción se volvió exotérmica (la temperatura de la reacción alcanzó los 110 °C) y se agitó según solidificaba la reacción. A la reacción se añadió EA (500 ml), la reacción se retiró del calor y se enfrió hasta la temperatura ambiente. El sólido se filtró y se lavó con EA y con Et₂O, dando como resultado la sal de bromhidrato del etil éster del ácido 2-amino-tiazol-4-carboxílico, dando como resultado un sólido de color blanco (157 g, 98 %).

Etapa 2: preparación del etil éster del ácido 2-(3-bencil-ureido)-tiazol-4-carboxílico:



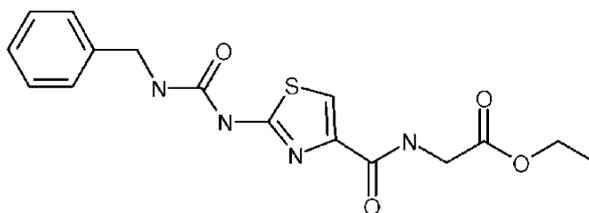
En un recipiente de reacción que contiene la sal de bromhidrato del etil éster del ácido 2-amino-tiazol-4-carboxílico (66,6 g, 263 mmol), 4-etilmorfolina (60,7 g, 67,1 ml, 527 mmol) y DMF anhidra (660 ml) se añadió isocianato de bencilo (42,1 g, 316 mmol), la reacción se agitó a la temperatura ambiente bajo argón durante 7 h, se añadió más isocianato de bencilo (42,1 g, 316 mmol), y la reacción se agitó a la temperatura ambiente bajo argón durante una noche. Al día siguiente la reacción se concentró 2/3, se diluyó con agua (1,6 l), y el precipitado resultante se filtró y se secó por succión durante una noche, produciendo el etil éster del ácido 2-(3-bencil-ureido)-tiazol-4-carboxílico en forma de un sólido de color blanquecino (146 g, 182 %). El análisis mediante una RMN sugirió que el material todavía estaba húmedo con agua y se usó DMF como tal.

Etapa 3: preparación del ácido 2-(3-bencil-ureido)-tiazol-4-carboxílico:



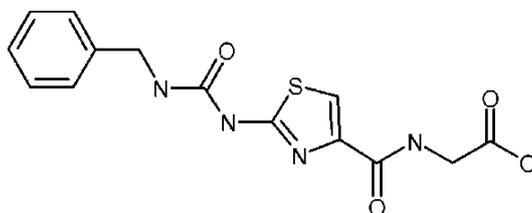
En un recipiente de reacción que contiene el etil éster del ácido 2-(3-bencil-ureido)-tiazol-4-carboxílico húmedo (146 g, se asumen 263 mmol teóricos) se añadió etanol (1,2 l) y NaOH 1 N (1,31 l). La reacción se calentó (60 °C) y se agitó bajo argón durante 4 h. La reacción se filtró y el sólido se desechó. El filtrado se enfrió en un baño de hielo y se acidificó con HCl 1 N (1,31 l) y el precipitado resultante se filtró y se lavó con agua y se secó con succión durante dos días, produciendo el ácido 2-(3-bencil-ureido)-tiazol-4-carboxílico (72 g, 99 %).

Etapa 4: preparación del etil éster del ácido {[2-(3-bencil-ureido)-tiazol-4-carbonil]-amino}-acético:



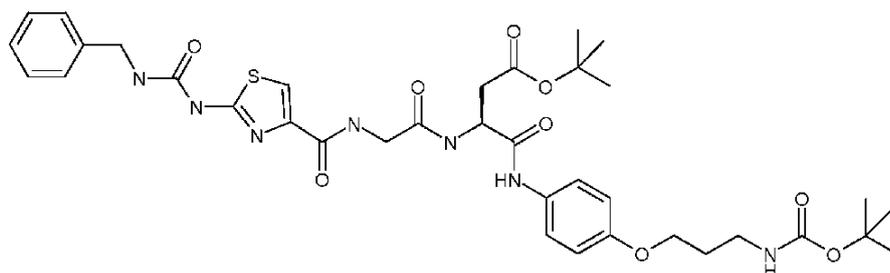
El compuesto del título se preparó mediante el uso de un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1, Etapa 2, partiendo del ácido 2-(3-bencil-ureido)-tiazol-4-carboxílico (72 g, 259 mmol), 2-cloro-4,6-dimetoxi-triazina (45,5 g, 259 mmol), N-metilmorfolina (26,2 g, 28,5 ml, 259 mmol), clorhidrato del etil éster de glicina (36,2 g, 259 mmol) y un segundo equivalente de N-metilmorfolina (26,2 g, 259 mmol), y después de la cristalización y la cromatografía, dio como resultado unos cristales de color blanco en forma de un sólido (72,6 g, 76 %).

Etapa 5: preparación del ácido {[2-(3-bencil-ureido)-tiazol-4-carbonil]-amino}-acético:



El compuesto del título se preparó mediante el uso de un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1, Etapa 3, partiendo del etil éster del ácido {[2-(3-bencil-ureido)-tiazol-4-carbonil]-amino}-acético (72,3 g, 199 mmol), metanol (200 ml), THF (1 l), NaOH 1 N (0,2 l) y HCl 1 N (0,2 l), y después de una neutralización, evaporación y cristalización, dio como resultado unos cristales de color blanco (73,1 g, 109 %). El análisis mediante una RMN sugirió que el producto contenía disolvente, se usó como tal.

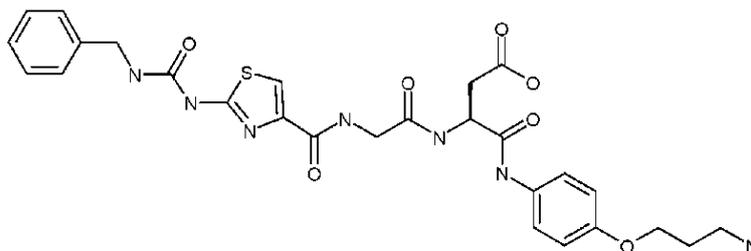
Etapa 6: preparación del *tert*-butil éster del ácido (S)-3-(2-[[2-(3-bencil-ureido)-tiazol-4-carbonil]-amino]-acetilamino)-N-[4-(3-*tert*-butoxicarbonilamino-propoxi)-fenil]-succinámico:



El compuesto del título se preparó mediante el uso de un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1, Etapa 8,

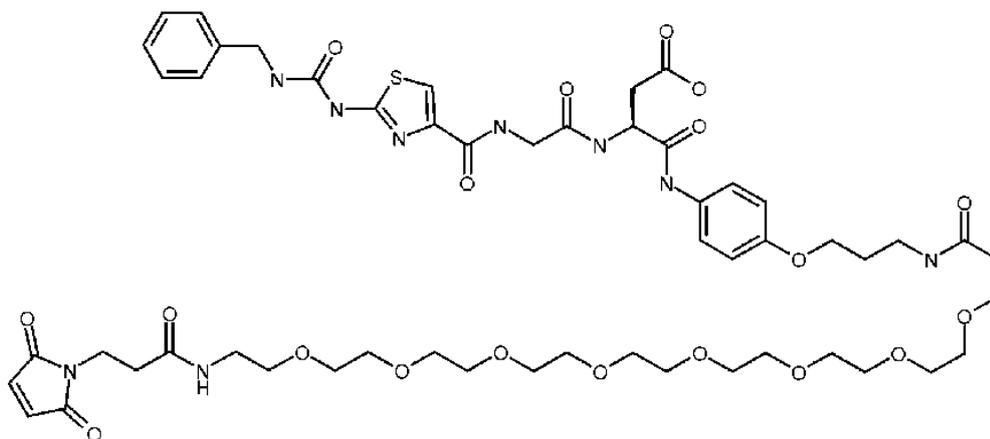
partiendo del ácido {[2-(3-bencil-ureido)-tiazol-4-carbonil]-amino}-acético, el *terc*-butil éster del ácido (S)-3-amino-N-[4-(3-*terc*-butoxicarbonilamino-propoxi)-fenil]-succinámico (1,5 g, 3,43 mmol), HBTU (1,43 g, 3,77 mmol), HOBT (0,51 g, 3,77 mmol) y DIPEA (1,46 g, 1,97 ml, 11,3 mmol), dando como resultado un sólido de color blanco (1,83 g, 70 %). ES (+) - HRMS m/e calcd. para C₃₆H₄₇N₇O₉S (M + Na)⁺ 776,3048, obsd. 776,3050.

5 Etapa 7: preparación del ácido (S)-N-[4-(3-amino-propoxi)-fenil]-3-(2-[[2-(3-bencil-ureido)-tiazol-4-carbonil]-amino]-acetilamino)-succinámico. Reactivo ligando del αVβ3 8, 40389-052) Ligando del αVβ3 3:



10 El compuesto del título se preparó mediante el uso de un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1, Etapa 9, partiendo del *terc*-butil éster del ácido (S)-3-(2-[[2-(3-bencil-ureido)-tiazol-4-carbonil]-amino]-acetilamino)-N-[4-(3-*terc*-butoxicarbonilamino-propoxi)-fenil]-succinámico (1,83 g, 2,48 mmol) dando como resultado un sólido de color blanco (1,29 g, 88 %). ES (+) - HRMS m/e calcd. para C₁₇H₃₁N₇O₇S (M + H)⁺ 598,2079, obsd 598,2077.

15 Etapa 8: preparación del ácido (S)-N-[4-[3-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-pirrol-1-il)-propionilamino]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]propionilamino]propoxi]-fenil]-3-[2-[[2-(3-bencil-ureido)-tiazol-4-carbonil]-amino]-acetilamino]-succinámico:

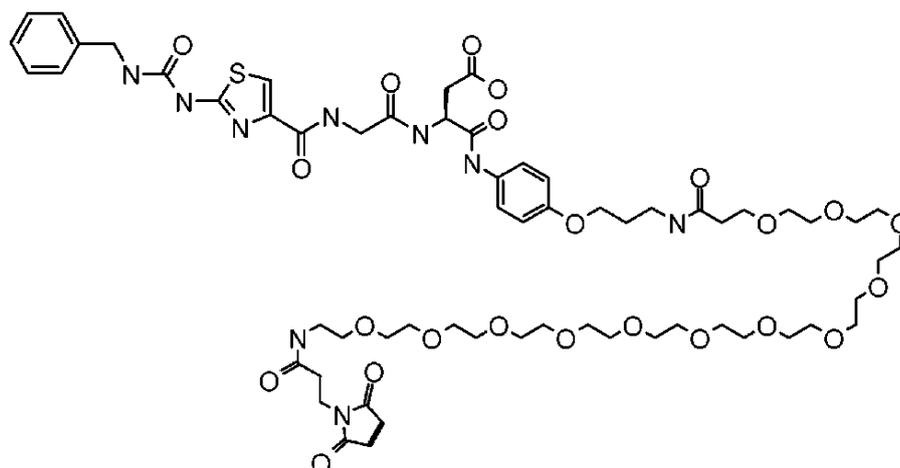


20 El compuesto del título se preparó mediante el uso de un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1, Etapa 10, partiendo del ácido (S)-N-[4-(3-amino-propoxi)-fenil]-3-(2-[[2-(3-bencil-ureido)-tiazol-4-carbonil]-amino]-acetilamino)-succinámico, Reactivo ligando del αVβ3 8, 40389-052) (242 mg, 0,405 mmol), el 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster del ácido 3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-pirrol-1-il)-propionilamino]-etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]-propiónico (280 mg, 0,405 mmol) y DIPEA (262,2 mg, 353 μl, 2,03 mmol) y después de una purificación mediante una HPLC, dio como resultado una goma de color marrón claro (206 mg, 43 %) ES (+) - HRMS m/e calcd. para C₅₃H₇₃N₉O₁₉ (M + H)⁺ 1172,4816, obsd 1172,4806.

30 Ejemplo 7

Preparación del ácido (S)-N-[4-[3-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-pirrol-1-il)-propionilamino]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]propionilamino]etoxi]-fenil]-3-[2-[[2-(3-bencil-ureido)-tiazol-4-carbonil]-amino]-acetilamino]-succinámico; Reactivo ligando del αVβ3 7, 40389-058):

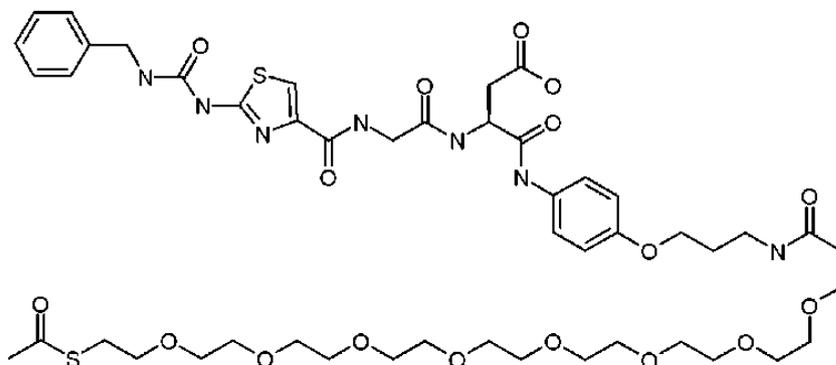
35



El compuesto del título se preparó mediante el uso de un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1, Etapa 10, partiendo del ácido (S)-N-[4-(3-amino-propoxi)-fenil]-3-(2-[[2-(3-bencil-ureido)-tiazol-4-carbonil]-amino]-acetilamino)-succinámico, Reactivo ligando del $\alpha\text{V}\beta 3$ 8, 40389-052) (155 mg, 0,260 mmol), el 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster del ácido 3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-pirrol-1-il)-propionilamino]-etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]-propiónico (225 mg, 0,260 mmol) y DIPEA (167 mg, 226 μl , 1,29 mmol) y después de una purificación mediante una HPLC, dio como resultado una goma de color amarillo claro (149 mg, 42 %) ES (+) - HRMS m/e calcd. para $\text{C}_{61}\text{H}_{89}\text{N}_9\text{O}_{23}\text{S}$ (M + H)⁺ 1348,5865, obsd 1348,5864.

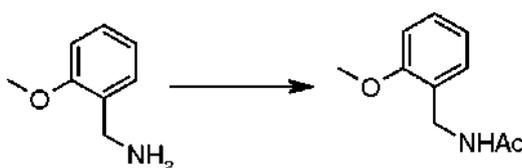
Ejemplo 8

Preparación del ácido (S)-N-[4-[3-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-acetilsulfanil-etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]propionilamino]propoxi]-fenil]-3-[2-[[2-(3-bencil-ureido)-tiazol-4-carbonil]-amino]-acetilamino]-succinámico; Reactivo ligando del $\alpha\text{V}\beta 3$ 8:



El compuesto del título se preparó mediante el uso de un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1, Etapa 10, partiendo del ácido (S)-N-[4-(3-amino-propoxi)-fenil]-3-(2-[[2-(3-bencil-ureido)-tiazol-4-carbonil]-amino]-acetilamino)-succinámico, 40389-052) (120 mg, 0,201 mmol), el 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster del ácido 3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-acetilsulfanil-etoxi]-etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]-propiónico (120 mg, 0,201 mmol) y DIPEA (129,2 mg, 174 μl , 1,01 mmol) y después de una purificación mediante una HPLC, dio como resultado una goma de color marrón claro (206 mg, 43 %) ES (+) - HRMS m/e calcd. para $\text{C}_{48}\text{H}_{69}\text{N}_7\text{O}_{17}\text{S}_2$ (M + H)⁺ 1080,4264, obsd 1080,4257.

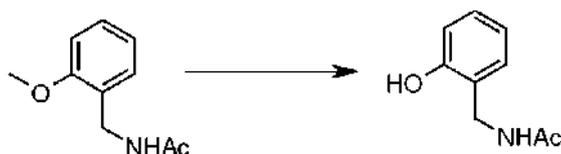
Preparación de la N-(2-metoxibencil) acetamida



A un compuesto de 2-metoxibencilamina puro (40 g, 0,29 mol) se añadió gota a gota Ac_2O (80 ml, 0,85 mol) en un

baño de agua helada. A continuación, la mezcla de reacción se agitó a la temperatura ambiente durante otras 2 horas. La mezcla se vertió en 50 ml de agua y se extrajo con acetato de etilo (3 x 300 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua (3 x 150 ml) y salmuera (100 ml), y se secaron sobre sulfato de sodio anhidro. Después de la filtración y la concentración, el residuo se suspendió en éter de petróleo (200 ml) y se agitó durante 10 minutos, después se filtró y se secó para dar el compuesto del título (36,5 g, 69,9 %) en forma de un sólido puro de color blanco. RMN 1H (300 MHz, CDC13): δ 7,31 - 7,25 (m, 2H), 6,95 - 6,87 (m, 2H), 6,01 (s a, 1H), 4,44 (d, 2H, J = 6,0 Hz), 3,87 (s, 3H), 1,98 (s, 3H).

Preparación de la N-(2-hidroxibencil) acetamida



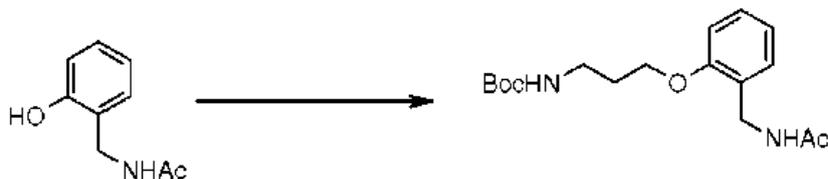
Se disolvió N-(2-metoxibencil) acetamida (6,5 g, 0,036 mol) en DCM (100 ml), y la solución se enfrió hasta -10 °C en una atmósfera de nitrógeno. A esta solución se añadió gota a gota BBr₃ (15 ml, 0,15 mol). Después de la adición, el baño de hielo se retiró y la mezcla de reacción se agitó a la temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción se enfrió de nuevo a -10 °C y se inactivó con agua (20 ml). La mezcla se extrajo con DCM (3 x 100 ml), y la capa orgánica se lavó con agua (3 x 100 ml) y salmuera (100 ml) y se secó para dar el compuesto del título (4,3 g, 71,7 %) en forma de un sólido. Se usó directamente en la siguiente etapa sin purificación adicional. RMN 1H (300 MHz, DMSO): δ 9,56 (s a, 1H), 8,27 (s a, 1H), 7,09 - 7,03 (m, 2H), 6,79 - 6,72 (m, 2H), 4,16 (d, 2H, J = 6,0 Hz), 1,87 (s, 3H). CL-EM: 166,2 [M + H]⁺, tR = 1,15 min.

Preparación del 3-bromopropilcarbamato de *tert*-butilo



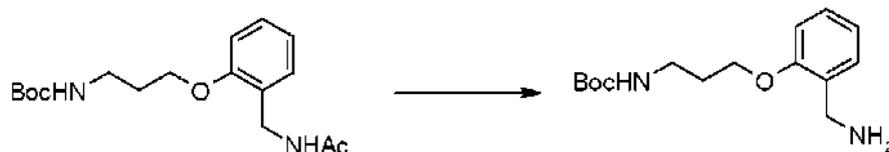
A una suspensión de bromhidrato de 3-bromopropilamina (50 g, 0,228 mol) en DCM (1000 ml) se añadieron (Boc)₂O (52 g, 0,238 mol) y trietilamina (100 ml, 0,722 mol). A continuación, la reacción se agitó a la temperatura ambiente durante otras 3 horas. El disolvente se eliminó a vacío y el residuo se lavó con éter de petróleo (500 ml). La mezcla se filtró y el filtrado se evaporó para dar el compuesto del título (54 g, 99,2 %) en forma de un aceite incoloro. RMN 1H (300 MHz, CDC13): δ 4,69 (s a, 1H), 3,43 (t, 2H, J = 6,6 Hz), 3,27 - 3,23 (m, 2H), 2,10 - 2,03 (m, 2H), 1,27 (s, 9H).

Preparación del *tert*-butil éster del ácido {3-[2-(acetilamino-metil)-fenoxi]-propil}-carbámico



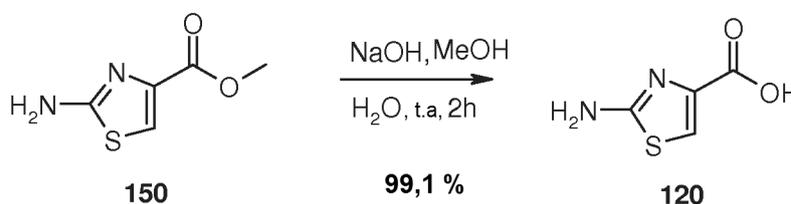
A una solución agitada de N-(2-hidroxibencil) acetamida (18,8 g, 0,11 mol) en DMF (100 ml) se añadió 3-bromopropilcarbamato de *tert*-butilo (32 g, 0,135 mol) y K₂CO₃ (47 g, 0,34 mol) a la temperatura ambiente. A continuación, la mezcla de reacción se agitó a la temperatura ambiente durante 16 horas. La mezcla se filtró y el disolvente se eliminó a vacío para dar un producto en bruto que se purificó mediante una cromatografía en gel de sílice (éter de petróleo / acetato de etilo = 1:3 - 1:4) para dar el compuesto del título (23 g, 62,8 %) en forma de un sólido. RMN 1H (300 MHz, CDC13): δ 8,08 (t, 1H, J = 5,8 Hz), 7,20 - 7,13 (m, 2H), 6,94 - 6,86 (m, 3H), 4,21 (d, 2H, J = 5,4 Hz), 3,97 (t, 2H, J = 5,9 Hz), 3,14 - 3,08 (m, 2H), 1,87 (s, 3H), 1,82 - 1,86 (m, 2H), 1,36 (s, 9H). CL-EM: 323,1 [M + H]⁺, tR = 2,98 min.

Preparación del 3-(2-(aminometil)fenoxi) propilcarbamato de *tert*-butilo



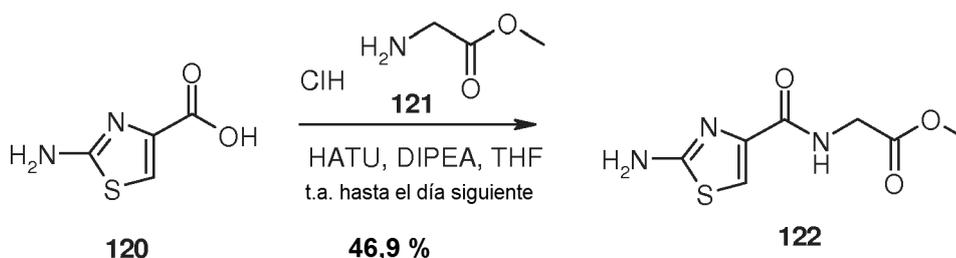
5 Se suspendió el *tert*-butil éster del ácido {3-[2-(acetilamino-metil)-fenoxi]-propil}-carbámico (10,4 g, 0,032 mol) en hidrato de hidrazina (150 ml, 85 %) y la mezcla de reacción se agitó a la temperatura de reflujo durante 20 horas. La mezcla se enfrió hasta la temperatura ambiente y se extrajo con éter dietílico (3 x 150 ml). La fase orgánica combinada se lavó con salmuera (150 ml) y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. Después de la filtración y la concentración, el residuo se purificó mediante una cromatografía en gel de sílice (DCM / MeOH = 20:1 ~ 1:1) para dar el compuesto del título (4 g, 44,6 %). RMN 1H (300 MHz, CDC13): δ 7,33 - 7,28 (m, 2H), 7,01 - 6,90 (m, 2H), 5,41 - 5,36 (m, 1H), 4,15 - 4,11 (m, 2H), 3,91 (s, 2H), 3,44 - 3,40 (m, 2H), 2,09 - 2,05 (m, 2H), 1,90 (s, 2H), 1,50 (s, 9H). CL-EM: 281,1 [M + H]⁺, tR = 2,33 min.

Síntesis del compuesto ácido 2-aminotiazol-4-carboxílico 120



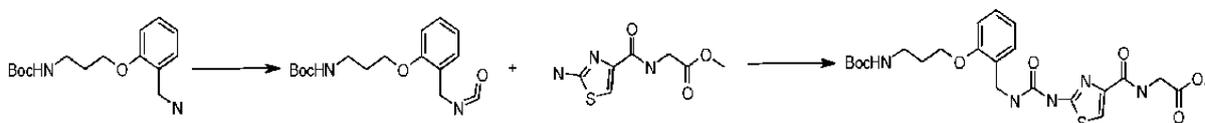
15 A una suspensión del compuesto 150 (125 g, 0,525 mol) en THF (2.500 ml) se añadió gota a gota una solución de NaOH (63 g en 790 ml de agua) durante un periodo de una hora. La mezcla resultante se agitó a la temperatura ambiente durante 2 horas. El disolvente se evaporó y el residuo se trató con HCl 2 N (770 ml), se filtró y se secó para dar el compuesto 120 (75 g, 99,1 %) en forma de un sólido de color amarillo. RMN 1H (300 MHz, DMSO): δ 7,38 (s, 1H), 7,13 (s, 2H).

Síntesis del compuesto metil éster del ácido [(2-amino-tiazol-4-carbonil)-amino]-acético 8



25 A una solución del compuesto 120 (1 g, 6,93 mmol) en DMF (50 ml) se añadió el compuesto 121 (0,97 g, 7,73 mmol), DIPEA (3,5 ml, 21,1 mmol) y HATU (2,93 g, 7,7 mmol). La solución resultante se agitó a la temperatura ambiente durante una noche. La solución de reacción se evaporó a vacío a 85 °C a sequedad, que se trató con 30 ml de THF, y se agitó a la temperatura ambiente durante aproximadamente 0,5 horas, después se filtró, se lavó con un poco de etanol y se secó para dar el compuesto 122 (0,7 g, 46,9 %) en forma de un sólido de color amarillo. RMN 1H (300 MHz, DMSO): δ 8,07 (t, 1H, J = 6,0 Hz), 7,22 (s, 1H), 7,12 (s, 1H), 3,97 (d, 2H, J = 6,0 Hz), 3,64 (s, 3H).

Preparación del metil éster del ácido [(2-{3-[2-(3-*tert*-butoxicarbonilamino-propoxi)-bencil]-ureido}-tiazol-4-carbonil)-amino]-acético



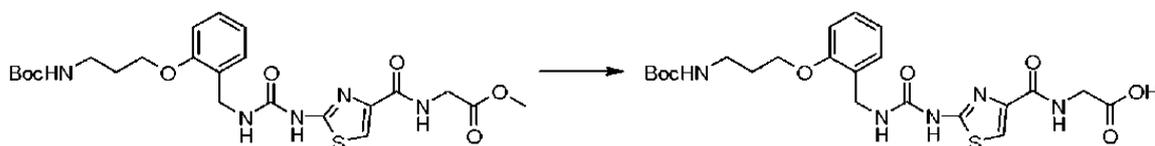
A una solución agitada de 3-(2-(aminometil)fenoxi)propilcarbamato de *tert*-butilo (489 mg, 1,74 mmol) en DCM (50

ml) se añadió una solución de DIPEA (449 mg, 3,48 mmol) en DCM (5,0 ml). Esta solución se añadió gota a gota a otra solución de trifosgeno (180 mg, 0,61 mmol) en DCM (5 ml) a 0 °C en una atmósfera de nitrógeno. Después de la adición, la mezcla se agitó a 0 °C durante otros 15 minutos. La solución se evaporó para dar el *tert*-butil éster del ácido [3-(2-isocianatometil-fenoxi)-propil]-carbámico en forma de un sólido de color blanco. Se disolvió en 2,5 ml de DMF y se usó directamente en la siguiente etapa.

A una solución del metil éster del ácido [(2-amino-tiazol-4-carbonil)-amino]-acético (374 mg, 1,74 mmol) y DIPEA (449 mg, 3,48 mmol) en DMF (2,5 ml) se añadió una solución del *tert*-butil éster del ácido [3-(2-isocianatometil-fenoxi)-propil]-carbámico en DMF (2,5 ml, elaborada anteriormente) a la temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó a 80 °C durante 2 horas. A continuación, la mezcla se enfrió y se vertió en 50 ml de agua, se extrajo con acetato de etilo (3 x 100 ml). La fase orgánica se lavó con salmuera (20 ml) y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. Después de la filtración y la concentración, el residuo se purificó mediante una cromatografía (éter de petróleo / acetato de etilo = 1:2 ~ 1:1) para dar el compuesto del título (165 mg, 18,2 % en dos etapas) en forma de un sólido de color amarillo.

RMN 1H (300 MHz, CD3OD): δ 7,55 (s, 1H), 7,17 - 7,14 (m, 2H), 6,87 - 6,77 (m, 2H), 4,34 (s, 2H), 4,01 - 3,96 (m, 4H), 3,64 (s, 3H), 3,22 - 3,19 (m, 2H), 1,91 - 1,86 (m, 2H), 1,31 (s, 9H). CL-EM: 522,2 [M + H]⁺, tR = 2,73 min.

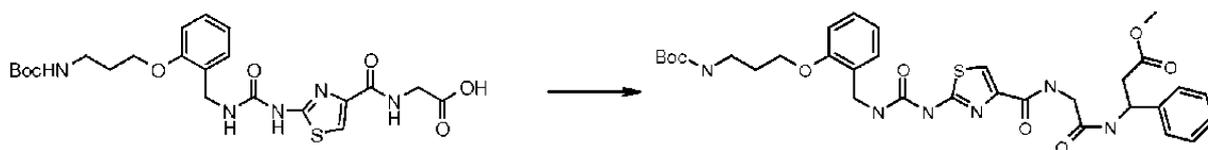
Preparación del ácido [(2-{3-[2-(3-*tert*-butoxicarbonilamino-propoxi)-bencil]-ureido}-tiazol-4-carbonil)-amino]-acético



A una solución del metil éster del ácido [(2-{3-[2-(3-*tert*-butoxicarbonilamino-propoxi)-bencil]-ureido}-tiazol-4-carbonil)-amino]-acético (0,165 g, 0,31 mmol) en THF (5 ml) se añadió gota a gota una solución de LiOH · H₂O (0,132 g, 3,1 mmol) en agua (1 ml) a la temperatura ambiente. A continuación, la solución se agitó a esta temperatura durante 16 horas. El disolvente se evaporó y el residuo se diluyó con 5 ml de agua. La solución acuosa se extrajo con acetato de etilo (10 ml), y la fase acuosa se acidificó con una solución de ácido cítrico 1 N hasta un pH ~ 5. La solución acuosa se extrajo con acetato de etilo (3 x 15 ml), y las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (10 ml) y se secaron sobre Na₂SO₄. Después de la filtración y la concentración, se obtuvo el compuesto del título (0,080 g, 50,9 %) en forma de un sólido.

RMN 1H (300 MHz, DMSO): δ 10,57 (s, 1H), 8,06 (t, 1H, J = 5,8 Hz), 7,63 (s, 1H), 7,26 - 7,20 (m, 2H), 6,98 - 6,88 (m, 4H), 4,32 (d, 2H, J = 5,7 Hz), 4,03 - 3,91 (m, 4H), 3,16 - 3,10 (m, 2H), 1,90 - 1,83 (m, 2H), 1,36 (s, 9H). CL-EM: 508,2 [M + H]⁺, tR = 2,58 min

Preparación del 3-(2-(2-(3-(2-(3-*tert*-butoxicarbonilamino)propoxi)bencil)ureido)tiazol-4-carboxamido)acetamido)-3-fenilpropanoato de metilo

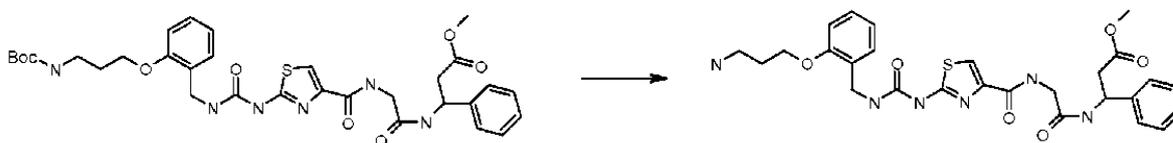


A una solución del ácido [(2-{3-[2-(3-*tert*-butoxicarbonilamino-propoxi)-bencil]-ureido}-tiazol-4-carbonil)-amino]-acético (0,7 g, 1,38 mmol) en THF (25 ml) se añadió DIPEA (1,4 g, 10,8 mmol) y HATU (0,525 g, 1,38 mmol) a la temperatura ambiente. A continuación, la reacción se agitó durante 20 minutos. Se añadió clorhidrato de 3-amino-3-fenilpropanoato de metilo (0,29 g, 1,34 mmol) en una porción, y la mezcla de reacción se agitó durante 16 horas. El disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo se disolvió en 50 ml de acetato de etilo, se lavó con una solución de NaOH 1 N (3 x 15 ml), seguido de HCl 1 N (3 x 15 ml) y agua (3 x 15 ml), después con salmuera (15 ml) y se secó sobre sulfato de sodio. Después de la filtración y la concentración, el residuo se purificó mediante una cromatografía en gel de sílice (eluyendo con acetato de etilo/éter de petróleo/metanol = 25:25:2) para dar el compuesto del título (0,54 g, 58,6 %) en forma de un sólido.

RMN 1H (300 MHz, CD3OD): δ 7,67 (s, 1H), 7,37 - 7,24 (m, 7H), 6,99 - 6,92 (m, 2H), 5,40 (t, 1H, J = 7,3 Hz), 4,46 (s, 2H), 4,13 - 4,04 (m, 4H), 3,67 (s, 3H), 3,34 - 3,32 (m, 2H), 2,90 - 2,86 (m, 2H), 2,03 - 1,98 (m, 2H), 1,43 (s, 9H). CL-EM: 669,2 [M + H]⁺, tR = 3,11 min

Preparación del clorhidrato de 3-(2-(2-(3-(2-(3-aminopropoxi)bencil)ureido)tiazol-4-carboxamido)acetamido)-3-

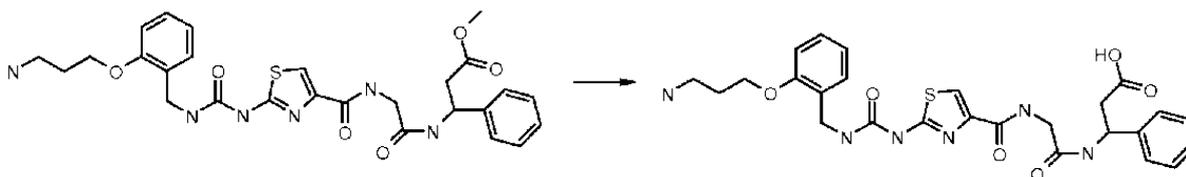
fenilpropanoato de metilo



5 A una solución saturada agitada de HCl en acetato de etilo (250 ml) se añadió gota a gota una solución de 3-(2-(2-(3-(2-(3-(*tert*-butoxicarbonilamino)propoxi)bencil)ureido)tiazol-4-carboxamido)acetamido)-3-fenilpropanoato de metilo (5,5 g, 8,23 mmol) en acetato de etilo (30 ml) a la temperatura ambiente, después la mezcla se agitó a la temperatura ambiente durante 16 horas. El disolvente orgánico se eliminó a presión reducida, y el sólido se trató con éter dietílico (50 ml), y después se filtró para dar el compuesto del título (4,7 g, 94.5 %) en forma de un sólido de color blanco.

10 RMN 1H (300 MHz, CD3OD): δ 7,69 (s, 1H), 7,36 - 7,27 (m, 7H), 7,02 - 6,95 (m, 2H), 5,40 (t, 1H, J = 7,4 Hz), 4,48 (s, 2H), 4,19 (t, 2H, J = 5,6 Hz), 4,06 (d, 2H, J = 2,1 Hz), 3,63 (s, 3H) 3,24 (t, 2H, J = 7,2 Hz), 2,90 - 2,86 (m, 2H), 2,24 - 2,15 (m, 2H). CL-EM: 569 [M + H]⁺, tR = 3,00 min. HPLC: 99,85 % a 214 nm, 99,14 % a 254 nm, tR = 4,05 min

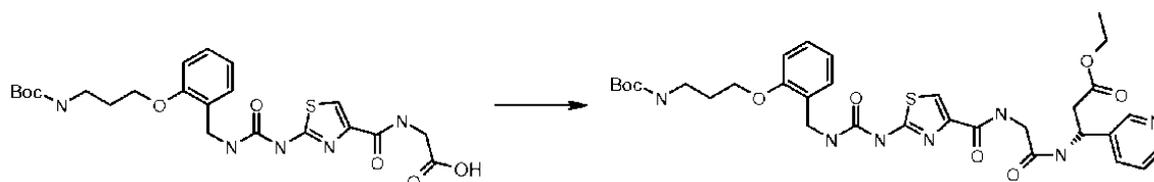
15 Preparación del ácido 3-{2-[(2-{3-[2-(3-amino-propoxi)-bencil]-ureido)-tiazol-4-carbonil]-amino]-acetilamino}-3-fenil-propiónico, Ligando del α V β 3 4:



20 A una solución del clorhidrato del metil éster del ácido 3-{2-[(2-{3-[2-(3-amino-propoxi)-bencil]-ureido)-tiazol-4-carbonil]-amino]-acetilamino}-3-fenil-propiónico (2,0 g, 3,31 mmol, Eq: 1,00) en metanol (10 ml) se añadió hidróxido de sodio 2 M (33,1 mmol, Eq: 10,00). La mezcla de reacción se agitó a 55 °C durante una noche. Durante la neutralización con HCl 1 N el producto en bruto precipitó y se recogió mediante una filtración (2,19 g). El producto en bruto se purificó mediante una HPLC en fase inversa para producir 1.041 mg del compuesto del título informa de una sal del TFA.

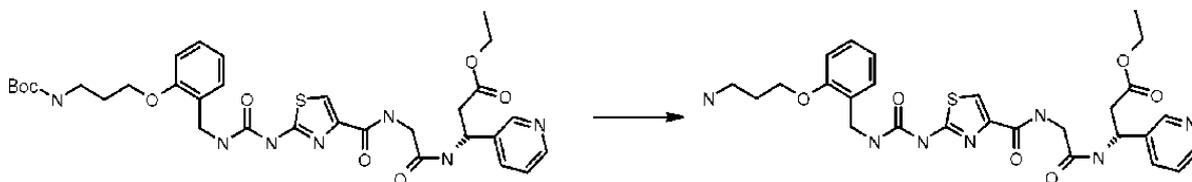
HRMS m/e 555,2006 (M + H)⁺

30 Preparación del 3-(2-(2-(3-(2-(3-(*tert*-butoxicarbonilamino)propoxi)bencil)ureido)tiazol-4-carboxamido)acetamido)-3-(piridin-3-il)propanoato de (R)-etilo



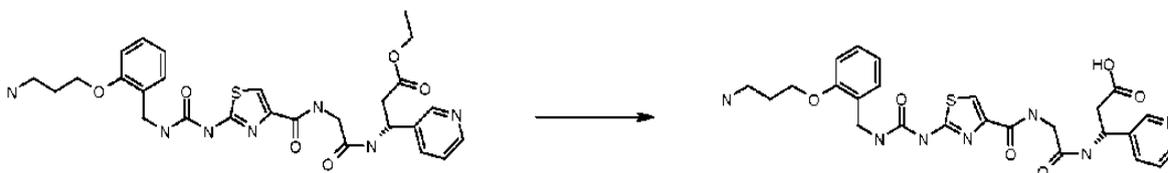
35 A una solución del ácido [(2-{3-[2-(3-*tert*-butoxicarbonilamino-propoxi)-bencil]-ureido)-tiazol-4-carbonil]-amino]-acético (7,08 g, 13,9 mmol) y HATU (5,8 g, 15,2 mmol) en THF (150 ml) a la temperatura ambiente en una atmósfera de nitrógeno se añadió DIPEA (13,9 g, 107,7 mmol). A continuación, la mezcla de reacción se agitó a la temperatura ambiente durante otros 20 minutos. Se añadió el compuesto clorhidrato de 3-amino-3-(piridin-3-il) propanoato de (R)-etilo (4,45 g, 16,8 mmol) en una porción, y la reacción se agitó a esta temperatura durante 16 horas. El disolvente se evaporó y el residuo se disolvió en 500 ml de acetato de etilo, se lavó con HCl 0,3 N (2 x 100 ml) y salmuera (100 ml) y se secó para dar un producto en bruto que se purificó mediante una cromatografía en gel de sílice (eluyendo con metanol al 10 % en acetato de etilo) para dar el compuesto del título (7,2 g, 77.3 %) en forma de un sólido. CL-EM: 684,2 [M + H]⁺, tR = 2,60 min.

45 Preparación del clorhidrato de 3-(2-(2-(3-(2-(3-aminopropoxi)bencil)ureido)tiazol-4-carboxamido)acetamido)-3-(piridin-3-il)propanoato de (R)-etilo



5 A una solución agitada de 3-(2-(2-(3-(2-(3-(*tert*-butoxicarbonilamino)propoxi)bencil)ureido)tiazol-4-carboxamido)acetamido)-3-(piridin-3-il) propanoato de (R)-etilo (2,3 g, 3,36 mmol) en etanol (50 ml) se añadió cloruro de acetilo (5 ml) a 0 °C. A continuación, la solución se agitó a la temperatura ambiente durante 1 hora. El disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo se lavó con acetato de etilo (100 ml) para dar el compuesto del título (1,1 g, 52,6 %) en forma de un sólido de color blanco. RMN 1H (300 MHz, CD3OD): δ 8,97 (s, 1H), 8,83 - 8,81 (m, 1H), 8,73 (d, 1H, J = 8,1 Hz), 8,13 (d, 1H, J = 7,0 Hz), 7,73 - 7,75 (m, 1H), 7,34 - 7,28 (m, 2H), 7,04 - 6,96 (m, 2H), 5,56 - 5,51 (m, 1H), 4,49 (s, 2H), 4,23 - 4,07 (m, 6H), 3,26 (t, 2H, J = 6,9 Hz), 3,11 (d, 2H, J = 6,9 Hz), 2,26 - 2,22 (m, 2H), 1,24 (t, 3H, J = 7,0 Hz). CL-EM: 584,0 [M + H]⁺, tR = 2,17 min. HPLC: 100 % a 214 nm, 100 % a 254 nm, tR = 5,91 min.

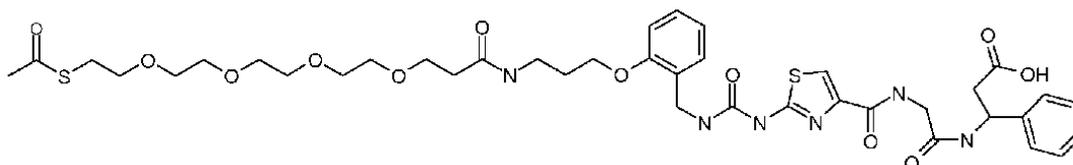
15 Preparación del ácido (R)-3-(2-(2-(3-(2-(3-aminopropoxi)bencil)ureido)tiazol-4-carboxamido)acetamido)-3-(piridin-3-il)-propiónico, Ligando del α V β 3 5



20 A una solución de diclorhidrato de 3-(2-(2-(3-(2-(3-aminopropoxi)bencil)ureido)tiazol-4-carboxamido)acetamido)-3-(piridin-3-il) propanoato de (R)-etilo (1,99 g, 3,1 mmol) en MeOH (10 ml) se añadió hidróxido de sodio 2 N (15,5 ml, 31,0 mmol) y la mezcla de reacción resultante se agitó a 55 °C durante una noche. Después se neutralizó con ácido clorhídrico 1 N y se purificó mediante una HPLC en fase inversa para producir 1,10 g del compuesto del título.

Ejemplo 11

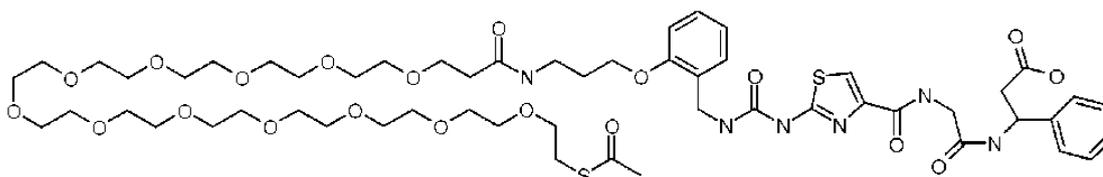
25 Preparación del Reactivo ligando del α V β 3 9



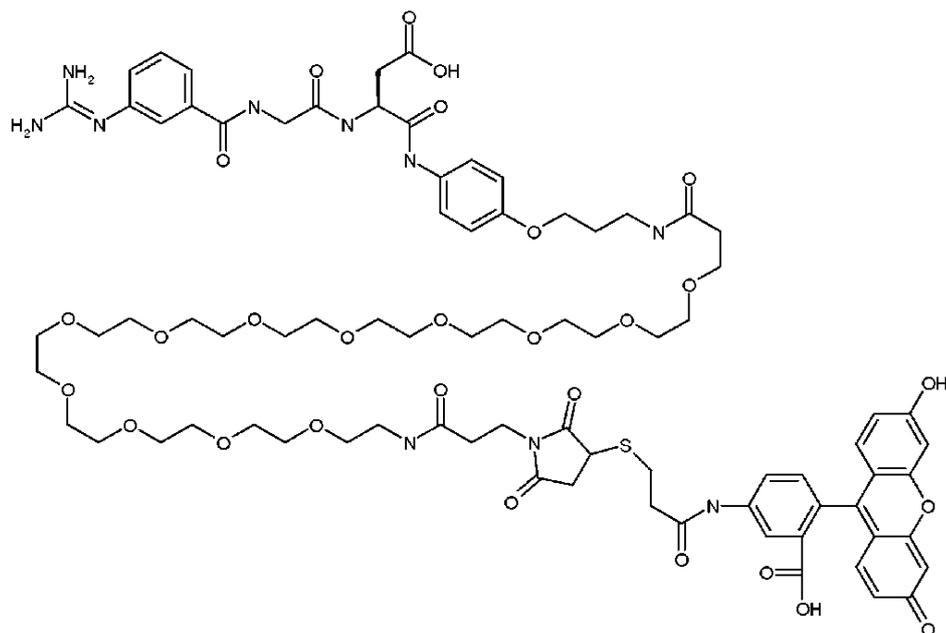
30 El compuesto del título se preparó de una manera similar con ácido 3-{2-[(2-{3-[2-(3-amino-propoxi)-bencil]-ureido)-tiazol-4-carbonil]-amino]-acetilamino}-3-fenil-propiónico y el 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster del ácido 3-(2-{2-[2-(2-acetilsulfanil-etoxi)-etoxi)-etoxi)-etoxi)-propiónico según se muestra en el Ejemplo 7. HRMS m/e 883,2978 (M + Na)⁺

Ejemplo 12

35 Preparación del Reactivo ligando del α V β 3 10



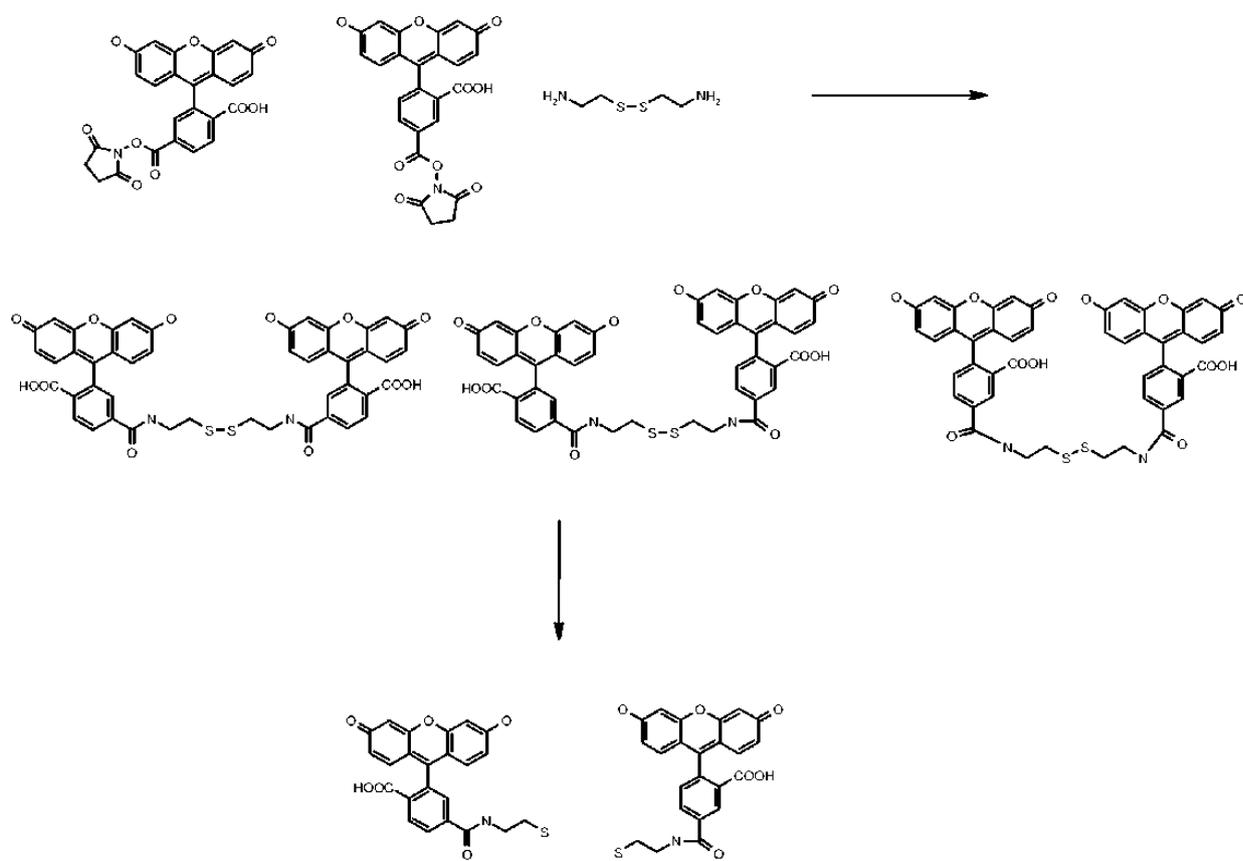
40 El compuesto del título se preparó de una manera similar con ácido 3-{2-[(2-{3-[2-(3-amino-propoxi)-bencil]-ureido)-tiazol-4-carbonil]-amino]-acetilamino}-3-fenil-propiónico y el N-hidroxisuccinimidil éster del ácido 1-(S-acetil)-mercapto-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36-dodecaoxanonatriacontan-39-oico según se muestra en el Ejemplo 7.



5 A una suspensión de color amarillo del ácido (S)-N-[4-[3-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-
 pirrol-1-il)-propionilamino]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]-propionilamino]propoxi]-
 10 fenil]-3-[2-[3-(guanidino)-benzoilamino]-acetilamino]-succinámico (37,5 mg, 0,03 mmol) y 2-[(5-
 fluoroseinil)aminocarbonil]etilmercaptano (reactivo FITC) (15,6 mg, 0,036 m ml) en metanol (5 ml), se añadió un
 exceso de DIPEA (38,7 mg, 52 μ l, 0,3 mmol) a la temperatura ambiente en una atmósfera de nitrógeno. La
 suspensión de color amarillo claro resultante se agitó durante 2 h, momento en el cual el análisis mediante una
 CLEM indicó la ausencia de material de partida. Después, la exceso de DIPEA se eliminó a vacío y el producto
 deseado se aisló mediante una purificación mediante el uso de una HPLC para obtener 25 mg (50 % de rendimiento)
 del derivado ácido (S)-N-[4-[3-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[3-(2,5-dioxo-2,5-dihidropirrol-1-il)-
 15 propionilamino]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]-propionilamino]propoxi]-fenil]-3-[2-
 [3-(guanidino)-benzoilamino]-acetilamino]-succinámico-FITC en forma de un sólido de color pardo.

15 ES (+) - HRMS m/e calcd. para $C_{80}H_{104}N_{10}O_{28}S$ (M + 2H) $^{2+}$ 843,3444, obsd. 843,3437. Datos de la CLEM = M + H,
 1687,6.

Ejemplo del Método b)

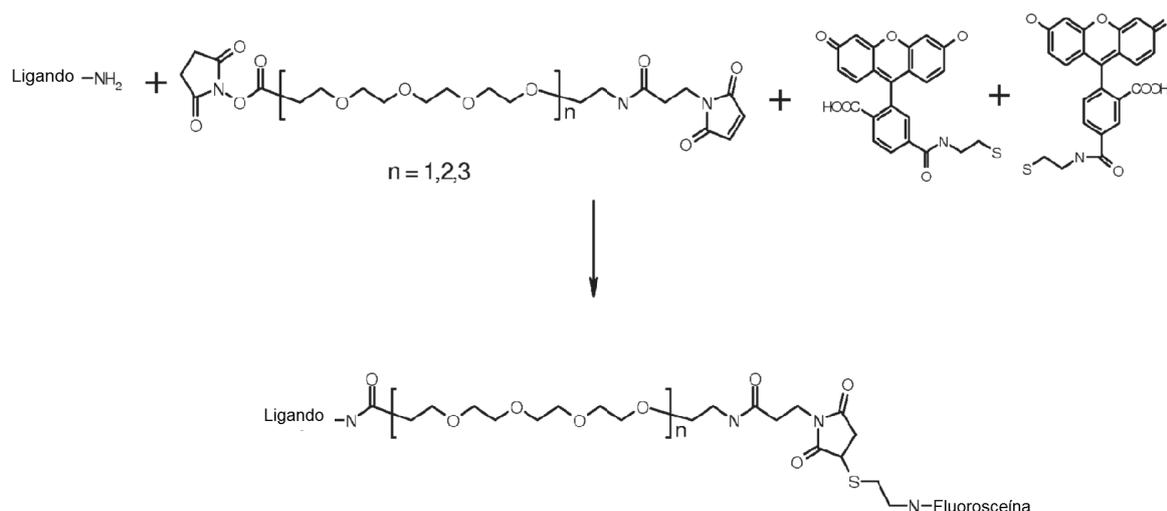


Esquema 17

- 5 Etapa 1. Se disolvieron diclorhidrato de cistamina (68 mg, 0,301 mmol) y DIEA (110 μ l, 2,1 eq) en DMF (10 ml), seguido de la adición de NHS-fluoresceína, una mezcla de 5- y 6-carboxifluoresceína (300 mg, 0,634 mmol), y la mezcla de reacción resultante se agitó durante una noche a la temperatura ambiente. Después, se diluyó con acetato de etilo y se lavó tres veces con agua y una vez con salmuera. El extracto se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se concentró a presión reducida, se redisolvió en una pequeña cantidad de metanol y acetato de etilo, y
- 10 después se trituroó con éter dietílico para obtener 140 mg de un aducto de fluoresceína-cistamina en forma de un sólido de color naranja brillante.

- Etapa 2. El aducto de fluoresceína-cistamina (80 mg, 0,092 mmol) se disolvió en una mezcla 3:1 de metanol y agua (4 ml) y se añadió clorhidrato de TCEP (80 mg, 3 eq). La mezcla de reacción resultante se agitó a la temperatura ambiente durante 2 h. El producto se purificó mediante una HPLC para producir 78 mg del producto. LRMS (ESI) 435,0.
- 15

Preparación de conjugados de molécula pequeña-PEG marcados con fluoresceína



Esquema 18

Procedimiento general: a una solución del ligando (1 eq) en DMSO se añadió DIEA (2 eq) y SM(PEG)_n (1 eq). La mezcla de reacción resultante se agitó a la temperatura ambiente durante 1 h. Después se añadió fluoresceína con un asa de tiol (1 eq) y la mezcla de reacción se agitó durante 10 min adicionales. El producto se purificó mediante una HPLC.

Procedimientos para la unión covalente de ligandos de direccionamiento de molécula pequeña de integrina a oligonucleótidos de 5'-tiol-ARNip

Preparación del ARNip

Síntesis de los oligorribonucleótidos

Los oligorribonucleótidos se sintetizaron según la tecnología del fosoramidito en fase sólida mediante el empleo de un sintetizador ABI 394 (Applied Biosystems) a la escala de 10 μmol. Para la información sobre la secuencia del ARN, véanse las tablas 1 y 2. Los correspondientes ARNip se dirigen contra el gen constitutivo *AHA1*. Las síntesis se llevaron a cabo sobre un soporte sólido fabricado con vidrio poroso controlado (CFG, de 520 Å, con una carga de 75 μmol/g, obtenido en Prime Synthesis, Aston, PA, EE.UU.). Los fosoramiditos de ARN normales, los 2'-O-metilfosoramiditos, así como los reactivos complementarios se adquirieron en Proligo (Hamburg, Alemania). Específicamente, se usaron los siguientes amiditos: (5'-O-dimetoxitritil-N6-(benzoil)-2'-O-t-butildimetilsilil-adenosin-3'-O-(2-cianoetil-N,N-diisopropilamino) fosoramidito, 5'-O-dimetoxitritil-N4-(acetil)-2'-O-t-butildimetilsilil-citidin-3'-O-(2-cianoetil-N,N-diisopropilamino) fosoramidito, (5'-O-dimetoxitritil-N2-(isobutil)-2'-O-t-butildimetilsilil-guanosin-3'-O-(2-cianoetil-N,N-diisopropilamino) fosoramidito y 5'-O-dimetoxitritil-2'-O-t-butildimetilsilil-uridin-3'-O-(2-cianoetil-N,N-diisopropilamino) fosoramidito. Los 2'-O-metilfosoramiditos portaban los mismos grupos protectores que los amiditos de ARN normales. Todos los amiditos se disolvieron en acetonitrilo anhidro (100 mM) y se añadieron tamices moleculares (de 3 Å). Para generar el conector de sulfhidrilo en el extremo 5' del oligómero de disulfuro de 1-O-dimetoxitritil-hexilo, se usó el conector T-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosoramidito de Glen Research (Sterling, Virginia, EE.UU.). Antes de la conjugación con la molécula pequeña, el conector de disulfuro se redujo mediante el uso de Tris-(2-carboxietil) fosfina (TCEP, véase a continuación). Para el marcaje del extremo 5' con el fluoróforo Nu547 se empleó el correspondiente fosoramidito obtenido en Thermo Fisher (Milwaukee, Wisconsin). Se usó 5-etil tiotetrazol (ETT, 500 mM en acetonitrilo) como solución de activación. Los tiempos de acoplamiento fueron de 6 minutos. Con objeto de introducir enlaces de fosforotioato se empleó una solución 100 mM de 3-etoxi-1,2,4-ditiazolin-5-ona (EDITH, obtenida en Link Technologies Lanarkshire, Escocia) en acetonitrilo anhidro.

Escisión y desprotección del oligómero unido al soporte

Después de la finalización de la síntesis en fase sólida, el soporte sólido seco se transfirió a un tubo de 15 ml y se trató con metilamina en metanol (2 M, Aldrich) durante 180 min a 45 °C. Después de una centrifugación, el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo de 15 ml y el CPG se lavó con 1.200 μl de N-metilpirolidin-2-ona (NMP, Fluka, Buchs, Suiza). El lavado se combinó con una solución metanólica de metilamina y se añadieron 450 μl de trifluorhidruro de trietilamina (TEA 3HF, Alfa Aesar, Karlsruhe, Alemania). Esta mezcla se llevó hasta 65 °C durante 150 min. Después de enfriar hasta la temperatura ambiente, se añadieron 0,75 ml de NMP y 1,5 ml de etoxitrimetilsilano (Fluka, Buchs, Suiza). 10 min después, el oligorribonucleótido precipitado se recogió mediante una centrifugación, el sobrenadante se desechó y el sólido fue reconstituido en 1 ml de tampón A (véase a continuación).

Purificación de los oligorribonucleótidos

- Los oligorribonucleótidos en bruto se purificaron mediante una HPLC de intercambio aniónico fuerte (SAX) mediante el empleo de una columna preparativa de 22 x 250 mm DNA Pac 100 (Dionex, Idstein, Alemania) en un sistema AKTA Explorer (GE Healthcare). El tampón A consistía en NaClO₄ 10 mM, EDTA 1 mM, Tris 10 mM, a pH 7,4, urea 6 M y un 20 % de acetonitrilo. El tampón B tenía NaClO₄ 500 mM en tampón A. Se empleó un caudal de 4,5 ml/min. Se registraron las señales de UV a 260 y a 280 nm. Se empleó un gradiente de un 20 % de B hasta un 45 % de B en 55 min. Las fracciones apropiadas se agruparon y se precipitaron con NaOAc 3 M, a pH = 5,2 y un 70 % de etanol.
- Los oligómeros en bruto marcados con Nu547 se purificaron mediante una RP HPLC mediante el uso de una columna XTerra Prep MS C8 de 10 x 50 mm (Waters, Eschborn, Alemania) en un sistema AKTA Explorer (GE Helthcare). El tampón A era trietilacetato de amonio 100 mM (Biosolve, Valquenswaard, Holanda) y el tampón B contenía un 50 % de acetonitrilo en tampón A. Se empleó un caudal de 5 ml/min. Se registraron las señales de UV a 260, a 280 y a 547 nm (en el caso de los oligorribonucleótidos marcados con Nu547). Se empleó un gradiente de un 5 % de B hasta un 60 % de B en 58 volúmenes de columna (VC). Las fracciones apropiadas se agruparon y se precipitaron con NaOAc 3 M, a pH = 5,2 y un 70 % de etanol.

- Finalmente, el oligómero purificado se desalinizó mediante una cromatografía de exclusión por tamaños en una columna que contiene Sephadex G-25 (GE Healthcare). La concentración de la solución fue determinada mediante una medición de la absorbancia a 260 nm en un fotómetro de UV (Beckman Coulter, Krefeld, Alemania). Hasta la hibridación, las hebras individuales se almacenaron en forma de soluciones congeladas a -20 °C.

Preparación de los conjugados de ARN de molécula pequeña

- Las moléculas pequeñas equipadas con una funcionalidad maleimida se conjugaron covalentemente con el ARN a través de un enlace tioéter. Para permitir esta química, se redujeron ~ 60 mg del ARN que contiene el conector de 5'-disulfuro en agua (5 ml) al correspondiente tiol mediante el uso de 1 ml de TCEP (0,5 M en agua, obtenido en Sigma Aldrich). Una vez que la HPLC de intercambio aniónico analítica indicó que se había completado la reacción (~ 2 h a la temperatura ambiente), el ARN se precipitó con 30 ml de etanol / NaOAc 3 M (a pH 5,4) 32:1 (v/v) durante una noche a -20 °C. El sedimento se recogió mediante una centrifugación y se usó para la posterior conjugación con la molécula pequeña.

- En una reacción de conjugación típica, se disolvieron 10 mg de ARN en 2 ml de tampón de fosfato de sodio (0,1 M, pH 7,0). A esta solución se añadió la molécula pequeña (0,12 mM) en ACN/NMP 1:1 (v/v) durante un periodo de 5 minutos. Una vez que la RP CL-ESI EM mostró que se había consumido el ARN introducido, la mezcla se diluyó con agua (~ 10 ml) y se añadieron ~ 40 ml de etanol / NaOAc 3 M (a pH 5,4) 32:1 (v/v) para precipitar el ARN conjugado durante una noche a -20 °C. El sedimento se recogió mediante una centrifugación, se disolvió en agua y, si fue necesario, se purificó mediante una HPLC de intercambio aniónico siguiendo el procedimiento proporcionado anteriormente. Si el conjugado es lo suficientemente puro, la mezcla de reacción se filtró a través de una columna de exclusión por tamaños (Sephadex G-25, GE Healthcare).

Hibridación de los oligorribonucleótidos para generar el ARNip

- Las hebras complementarias se ubicaron mediante la combinación de soluciones equimolares de ARN. La mezcla se liofilizó y se reconstituyó con un volumen apropiado de tampón de hibridación (NaCl 100 mM, fosfato de sodio 20 mM, a pH 6,8) para conseguir la concentración deseada. Esta solución se puso en un baño de agua a 95 °C que se enfrió hasta la temperatura ambiente en 3 h.

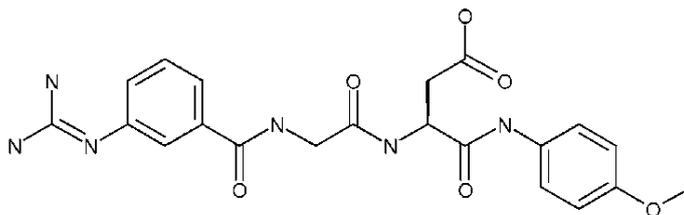
- El siguiente ensayo se llevó a cabo para evaluar la afinidad de unión por el α V β 3 de los compuestos dirigidos al α V β 3 de esta invención.

Ensayo en fase sólida del α V β 3 humano:

- Se recubrieron inmunoplasmas de 96 pocillos (NUNC, Part# 439454) con α V β 3 (R & D, n° de cat. 3050-AV) mediante la adición de 100 μ l de α V β 3 (1x) en cada pocillo, y la incubación de las placas durante una noche a 40C. El tampón usado era tampón A: Tris 20 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 1 mM, a pH 7,4. Después de la eliminación del reactivo del recubrimiento, se añadieron a cada pocillo 150 μ l de BSA al 3,5 % en tampón A para bloquear las placas durante 105 minutos a 370 C. Después del bloqueo, las placas se lavaron 5 veces con 200 μ l de tampón B (tampón A + MnCl₂ 1 mM). Después se añadieron 50 μ l de la solución del compuesto de ensayo (2 x) en DMSO al 5 % y 50 μ l de fibrinógeno (2 x) (Innovative Research, n° de cat. IFIB) a cada pocillo. Las placas se agitaron durante 2 minutos y después se incubaron durante 2 horas durante 370C. Después las placas se lavaron 5 veces con 200 μ l de tampón B, se añadieron a las placas el primer anticuerpo anti-fibrinógeno humano de conejo (Innovative Research, Cat IASHFBGN-GF) en la cantidad de 100 μ l/pocillo, y el segundo anticuerpo conjugado de peroxidasa de rábano picante anti IgG de conejo de cabra (Invitrogen, n° de cat. G21234) en la cantidad de 50 μ l/pocillo, respectivamente. Después de la adición del primer anticuerpo y después de la adición del segundo anticuerpo, las placas se agitaron durante 2 minutos y se incubaron durante 60 minutos a 370 C, y después se lavaron 5 veces con 200 μ l de tampón

B correspondientemente. Las condiciones finales del ensayo fase sólida eran: [$\alpha\text{V}\beta 3$] = 1,25 μg , [fibrinógeno] = 0,75 $\mu\text{g}/\text{ml}$, [Anti-FG] = 1/2.400 (diluido), [HPR-Anti-conejo] = 1/1.000 (diluido). Cuando se completó el ensayo de unión, a las placas se añadieron 100 μl /pocillo del reactivo de detección ABTS (mezcla del reactivo A y el reactivo B) (KPL, n° de cat. 50-62-00). Las placas se agitaron a la TA durante 5-8 min, y gradualmente apareció el desarrollo de un color verde. Después de la adición de 100 μl /pocillo de tampón de detención (ácido fosfórico 1,0 M (HPO_4)), las placas se leyeron con un Envision en un modo de absorbancia de 450 nm.

Se determinó que el compuesto de control (141) tenía una CI_{50} de aproximadamente 2 nM (es decir, el 50 % de las células no se unió al $\alpha\text{V}\beta 3$ de la superficie de los pocillos, dado que los receptores $\alpha\text{V}\beta 3$ de las células estaban presumiblemente unidos o asociados al compuesto de control). Estos resultados se muestran a continuación en las Tablas 3 y 4.



141

Pruebas de la permeabilidad celular y localización de los derivados de molécula pequeña de los antagonistas de la integrina unidos covalentemente a los fluoróforos FITC y al ARNip para una administración dirigida

Procedimiento

Se incubaron células AML MV4-11 en medio de crecimiento (RPMI 1640 con un 10 % de FBS) con Dúplex-27 (500 nM) durante 1 hora a 37 °C. Para la determinación de la unión independiente de VLA-4, se incluyó 140 (10 μM) en una condición para bloquear la unión dependiente de VLA-4. Después de la incubación, las células se lavaron entonces dos veces con D-PBS y se fijaron en paraformaldehído al 1 % durante 10 minutos. La captación del ARNip se analizó mediante imágenes de citometría de flujo mediante el uso de ImageStreamx (Aminis Corporation, Seattle). Los resultados se muestran en la Tabla A y en las Figuras 1-4.

Tabla A

Compuesto (concentración)	Intensidad media de Cy3
Nada	638
140 (10 μM)	663
Dúplex-27 (500 nM)	4.007
140 (10 μM) + Dúplex-27 (500 nM)	2.273

Ensayo del ARNip modificado con la hebra sentido en 5' para la inactivación del ARNm de AHA1 en sistemas celulares

Materiales y métodos

Gen de referencia:	GAPDH
Línea celular:	H1299_Nut-Onc
Densidad de las placas:	5.000 células / pocillo
Formato de las placas:	96 pocillos
Tiempo desde la colocación en placas hasta el tratamiento:	0
Tratamiento de control:	simulado, sin tratar, ARNip de control
Reactivo de transfección:	DharmaFect1
Método de transfección	TF inversa
Volumen del reactivo de TF/pocillo	0,15 ml
Concentración final del ARNip	50 nM
Método de ensayo:	Día 1 manual / Día 2 lavador

Transfección inversa: se transfectaron células H1299 con el ARNip indicado a una concentración final de 50 nM mediante el uso del reactivo de transfección DharmaFect-1 a 0,15 µl/pocillo. Después las células se colocaron en placas de 96 pocillos a 5.000 células/pocillo y se incubaron a 37 °C durante 48 horas.

5 La eficacia de inactivación del ARNip se midió mediante un ensayo de ADN ramificado según indica el vendedor; los resultados de dicha inactivación se muestran en la Figura 5. La viabilidad celular relativa fue evaluada mediante la expresión absoluta de GAPDH en el mismo pocillo (Figura 6).

10 Salvo que se indique lo contrario, todos los compuestos de los ejemplos se prepararon y se caracterizaron según se ha descrito.

LISTADO DE SECUENCIAS

15 <110> F. Hoffmann - La Roche AG

<120> Conjugados de antagonistas de la integrina para una administración dirigida a células que expresan alfa-V-beta-3

20 <130> 30843 WO

<150> US61/591299

<151> 27-01-2012

25 <150> US61/678669

<151> 02-08-2012

<160> 2

30 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 21

<212> ADN

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> ARNip que se dirige a AHA1

40 <400> 1

ggaugaagug gagauuagut t 21

<210> 2

<211> 21

<212> ADN

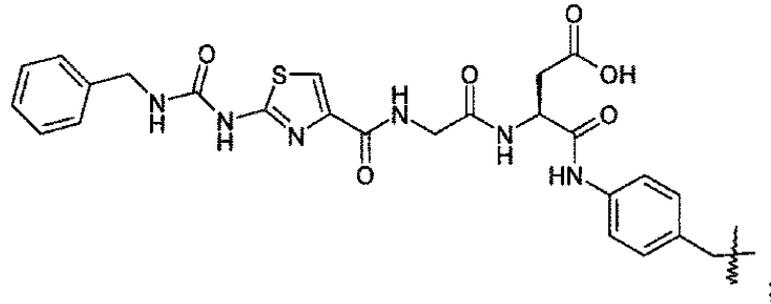
45 <213> Secuencia artificial

<220>

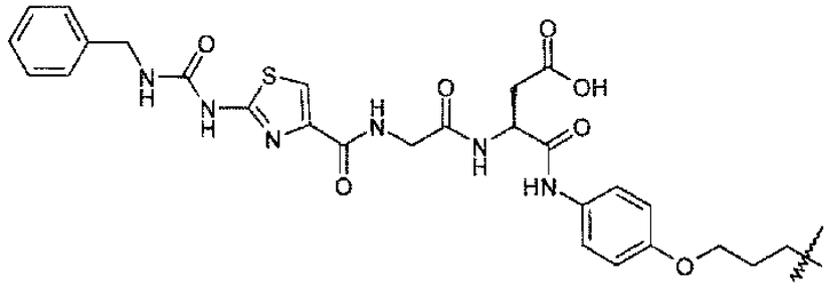
<223> ARNip que se dirige a AHA1

50 <400> 2

acuaaucucc acucaucct t 21

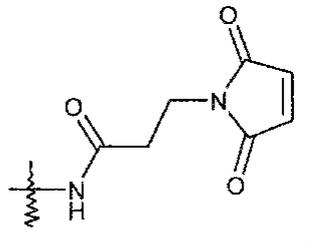


y
(5) un compuesto de la fórmula:



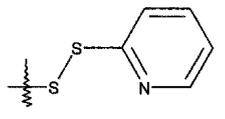
5 R^2 se selecciona entre el grupo que consiste en:

(1) un compuesto de la fórmula:



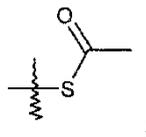
10

(2) un compuesto de la fórmula:



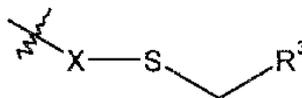
15

(3) un compuesto de la fórmula:

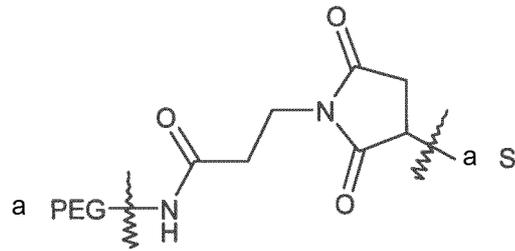


20

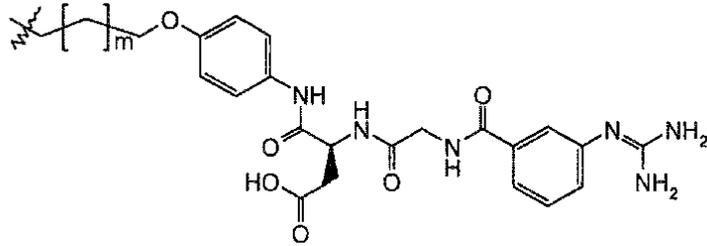
y
(4) un compuesto de la fórmula:



en la que R³ es un resto conjugado y X representa azufre o un compuesto de la fórmula:



2. Un compuesto según la reivindicación 1, en el que R¹ es un compuesto de la fórmula:

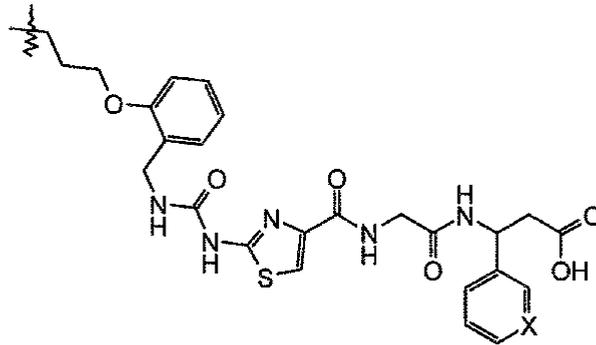


5

en la que m es 0 o 1.

3. Un compuesto según la reivindicación 1, en el que R¹ es un compuesto de la fórmula:

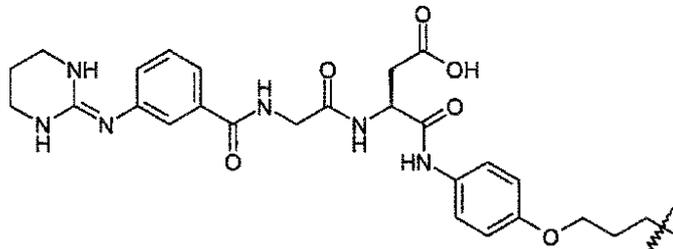
10



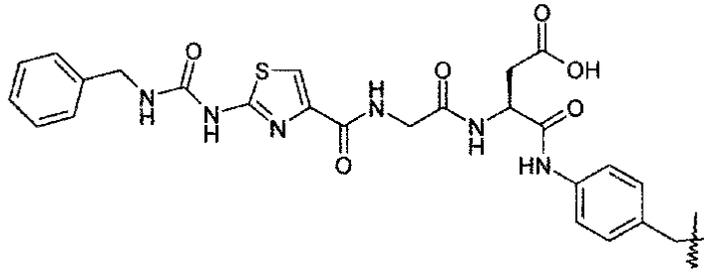
en la que X es N o CH.

4. Un compuesto según la reivindicación 1, en el que R¹ es un compuesto de la fórmula:

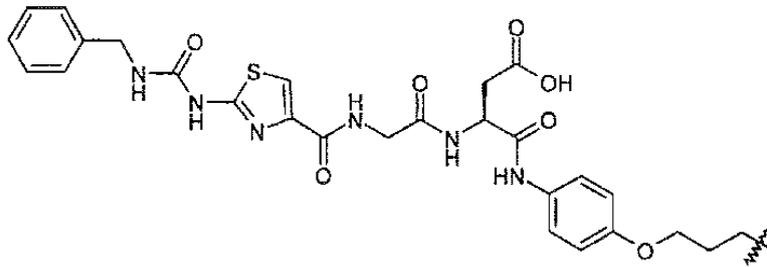
15



5. Un compuesto según la reivindicación 1, en el que R¹ es un compuesto de la fórmula:

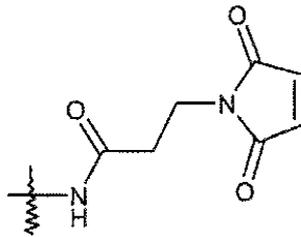


6. Un compuesto según la reivindicación 1, en el que R¹ es un compuesto de la fórmula:



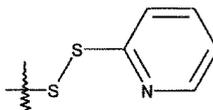
5

7. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que R² es un compuesto de la fórmula:



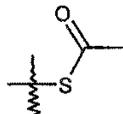
10

8. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que R² es un compuesto de la fórmula:



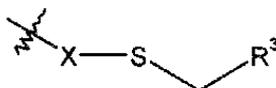
15

9. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que R² es un compuesto de la fórmula:



20

10. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que R² es un compuesto de la fórmula:



en la que R³ es un oligonucleótido mono o bicatenario y X representa azufre o un compuesto de la fórmula:

20. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 para su uso en el tratamiento o la profilaxis de la inflamación, del cáncer o de una enfermedad o una afección metabólica.

5 21. El uso de un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 para la preparación de un medicamento para el tratamiento o la profilaxis de la inflamación, del cáncer o de una enfermedad o una afección metabólica.

Fig. 1 a)

Tabla 1: Resúmenes de la composición de los ARNip mono y bicatenarios derivatizados en 5'

Dúplex ID	Sentido ID	Secuencia 5' → 3'	Antisentido ID	Secuencia 5' → 3'
Dúplex-1	Sentido-1	GGAuGAAGuGGAGAuAGudTsdT (Seq. Id. N° 1)	Antisentido-1	ACuAAUCUCCaACUJucAUCCcdTsdT (Seq. Id. N° 2)
Dúplex-15	Sentido-15	Reactivo ligando del αVβ3 1-(SC6)GGAuGAAGuGGAGAuAGudTsdT (Seq. Id. N° 1)	Antisentido-1	ACuAAUCUCCaACUJucAUCCcdTsdT (Seq. Id. N° 2)
Dúplex-16	Sentido-16	Reactivo ligando del αVβ3 2-(SC6)GGAuGAAGuGGAGAuAGudTsdT (Seq. Id. N° 1)	Antisentido-1	ACuAAUCUCCaACUJucAUCCcdTsdT (Seq. Id. N° 2)
Dúplex-17	Sentido-17	Reactivo ligando del αVβ3 6-(SC6)GGAuGAAGuGGAGAuAGudTsdT (Seq. Id. N° 1)	Antisentido-1	ACuAAUCUCCaACUJucAUCCcdTsdT (Seq. Id. N° 2)
Dúplex-18	Sentido-18	Reactivo ligando del αVβ3 7-(SC6)GGAuGAAGuGGAGAuAGudTsdT (Seq. Id. N° 1)	Antisentido-1	ACuAAUCUCCaACUJucAUCCcdTsdT (Seq. Id. N° 2)

Fig. 1 b)

Tabla 2: Datos analíticos para los conjugados del ARNip de molécula pequeña

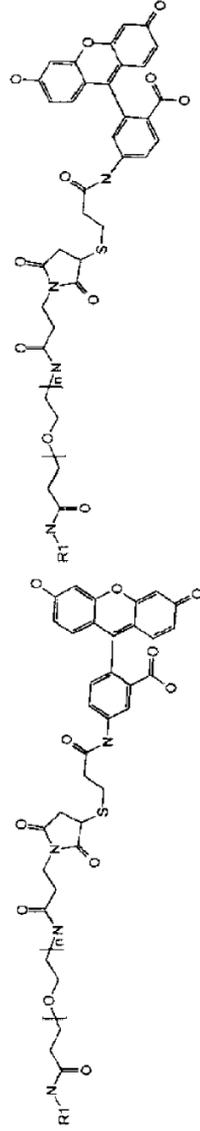
Molécula pequeña	Objetivo	Número	Secuencia (5' -- 3')	Masa calculada	Masa experimental	IEX % de FLP
α V B3-PEG8-Maleimida	Aha1	Sentido-15	Reactivo ligando del α V β 3 1-(SC6)GGAuGAAGuGGAGAuAGudTsdT (Seq. Id. N° 1)	8.170,5	8.175,3	> 82,7
α VB3-PEG 12-Maleimida	Aha1	Sentido-16	Reactivo ligando del α V β 3 2-(SC6)GGAuGAAGuGGAGAuAGudTsdT (Seq. Id. N° 1)	8.346,7	8.349.4	> 75
α VB3-PEGS-maleimida	Aha1	Sentido-17	Reactivo ligando del α V β 3 6-(SC6)GGAuGAAGuGGAGAuAGudTsdT (Seq. Id. N° 1)	8.268,6	8.270,9	86
α VB3-PEG12-maleimida	Aha1	Sentido-18	Reactivo ligando del α V β 3 7-(SC6)GGAuGAAGuGGAGAuAGudTsdT (Seq. Id. N° 1)	8.444,8	8.447.6	> 85

Fig. 1 c)

Tabla 3: Resumen de las potencias del conjugado de molécula pequeña-ARNip en ensayos con antagonistas de la integrina y datos de la KD del ARNip

Elemento de direccionamiento	Configuración				Derivado del ARNip	Ensayo de adhesión a células Jurkat/ VCAM-1 (nM)	Ensayo de adhesión a α VB3 (nM)	Ensayo de adhesión a LFA1 (nM)	% de KD de la AHA1
	Reactivo ligando de molécula pequeña	ARNip	Dúplex	Fluorocromo					
Ninguno		AHA-1	Dúplex-1	No	RD-03518	> 200			98
Ninguno		AHA-1	Dúplex-1N	Nu547	RD-05170	> 200			
Ligando del α VB3 1-PEG 8	Reactivo ligando del α VB3 1	Aha1	Dúplex-15	no	RD-08412		4,6		
Ligando del α VB3 1-PEG 12	Reactivo ligando del α VB3 2	Aha1	Dúplex-16	no	RD-08413		3,4		
Ligando del α VB3 3-PEG 8	Reactivo ligando del α VB3 6	Aha1	Dúplex-17	no	RD-08414		0,7		
Ligando del α VB3 3-PEG 12	Reactivo ligando del α VB3 7	Aha1	Dúplex-18	no	RD-08415		0,1		
Molécula pequeña de α VB3			141				2		
Referencia de ensayo negativa			FITC-22			> 200			
Referencia de ensayo negativa			FITC-23			> 200			

Fig. 1 d) Tabla 4: Identidad, caracterización y potencias de unión de los reactivos marcados con el isómero de FITC



Ejemplo	Elemento de direccionamiento	Método de síntesis: en un paso o con el correspondiente ejemplo de direccionamiento	Ensayo de adhesión a células Jurkat/VCAM-1 (CI50 nM)	Ensayo con α VB3 (CI50 nM)	Ensayo de adhesión a LFA1 (CI50 nM)	Masa calculada	Masa observada
FITC-17	Ligando del α VB3 1-PEG12-FITC	Reactivo ligando del α VB3 2		801		1.685,81	1.687,6 [M + 2] ⁺
FITC-18	Ligando del α VB3 3-PEG12-FITC	Reactivo ligando del α VB3 7			6	869,99	890,7 (M + 2H) ²⁺
FITC-19	Ligando del α VB3 3-PEG8-FITC	Reactivo ligando del α VB3 8				803,86	804,5 [M + 2] ⁺
FITC-20	Ligando del α VB3 4-PEG8-FITC	Método B (en un paso)		7,8		791,355	791,7855 [M + 2H] ⁺
FITC-21	Ligando del α VB3 5-PEG8-FITC	Método B (en un paso)		84		782,845	783,2784 [M + 2H] ²⁺
FITC-22	bencil-PEG4-FITC no dirigido	Método B (en un paso)	9.400			941,019	941,3269 (M + H) ⁺
FITC-23	bencil-PEG8-FITC no dirigido	Método B (en un paso)	> 200		> 10.000	1.117,23	1.117,4317 [M + H] ⁺
142	control positivo				74		
140	control positivo		4				
141	control positivo			2			

Fig. 1 e)

Histograma (en rojo, Dúplex-27 500 nM y Ejemplo 140 10 μ M; en verde, Dúplex-27)

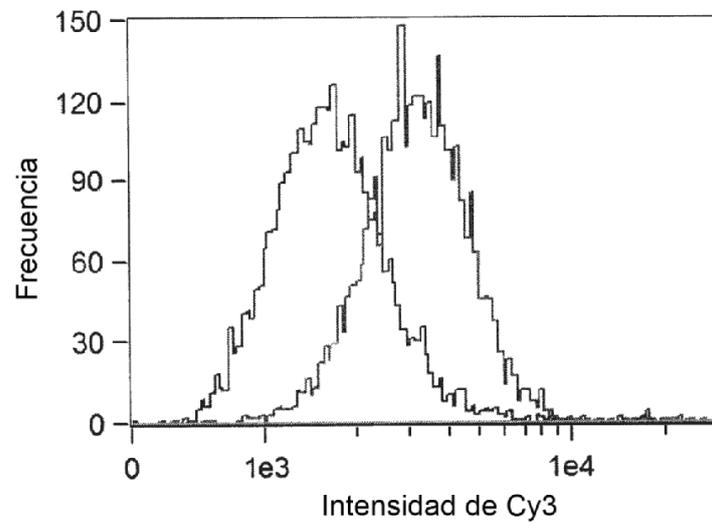


Fig. 2

Imagen representativa de la captación del ARNip (Dúplex-27 (500 nM))

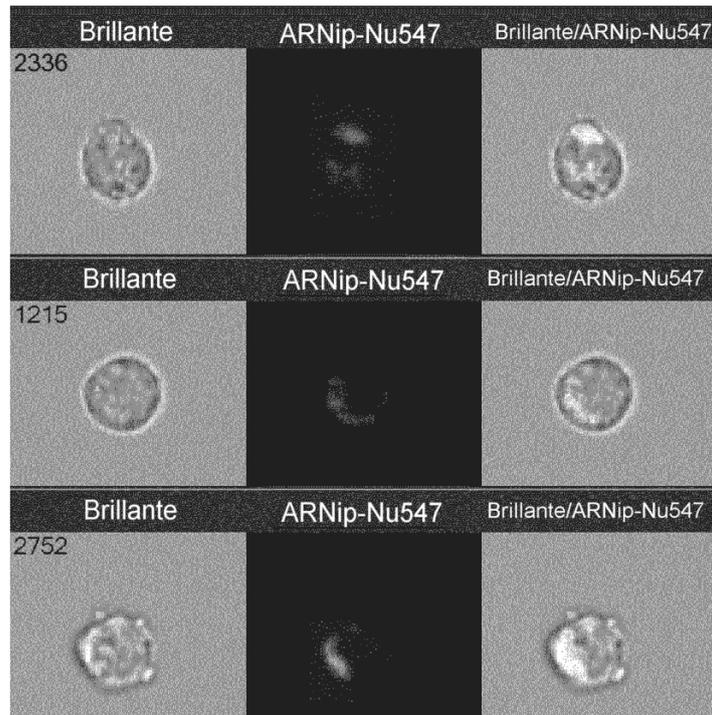


Fig. 3

Imágenes de las células Jurkat con FITC conjugado con el FITC-5 del Ejemplo (FITC marcado con el antagonista de LFA-1) a 10 μ M

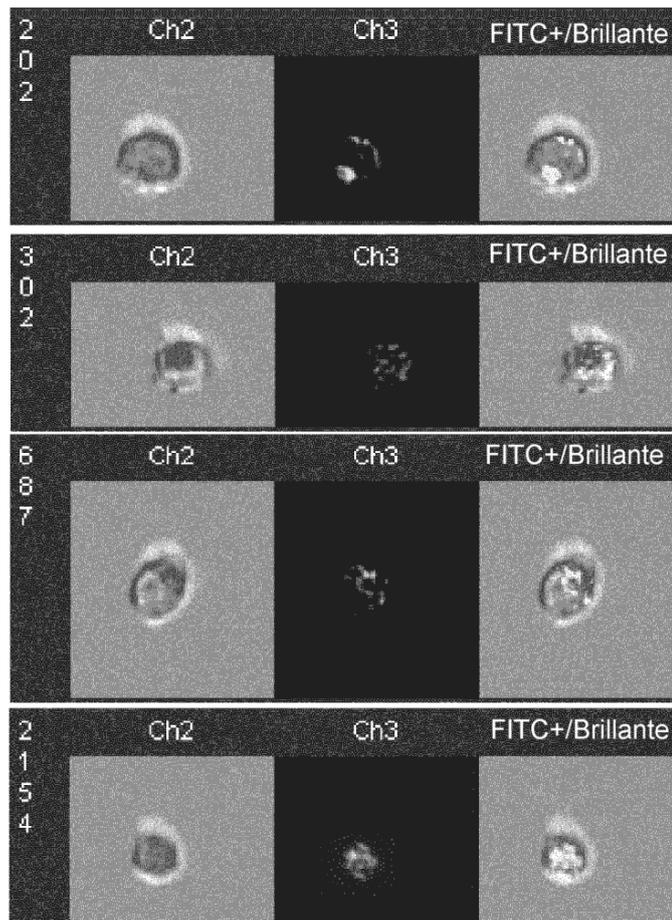
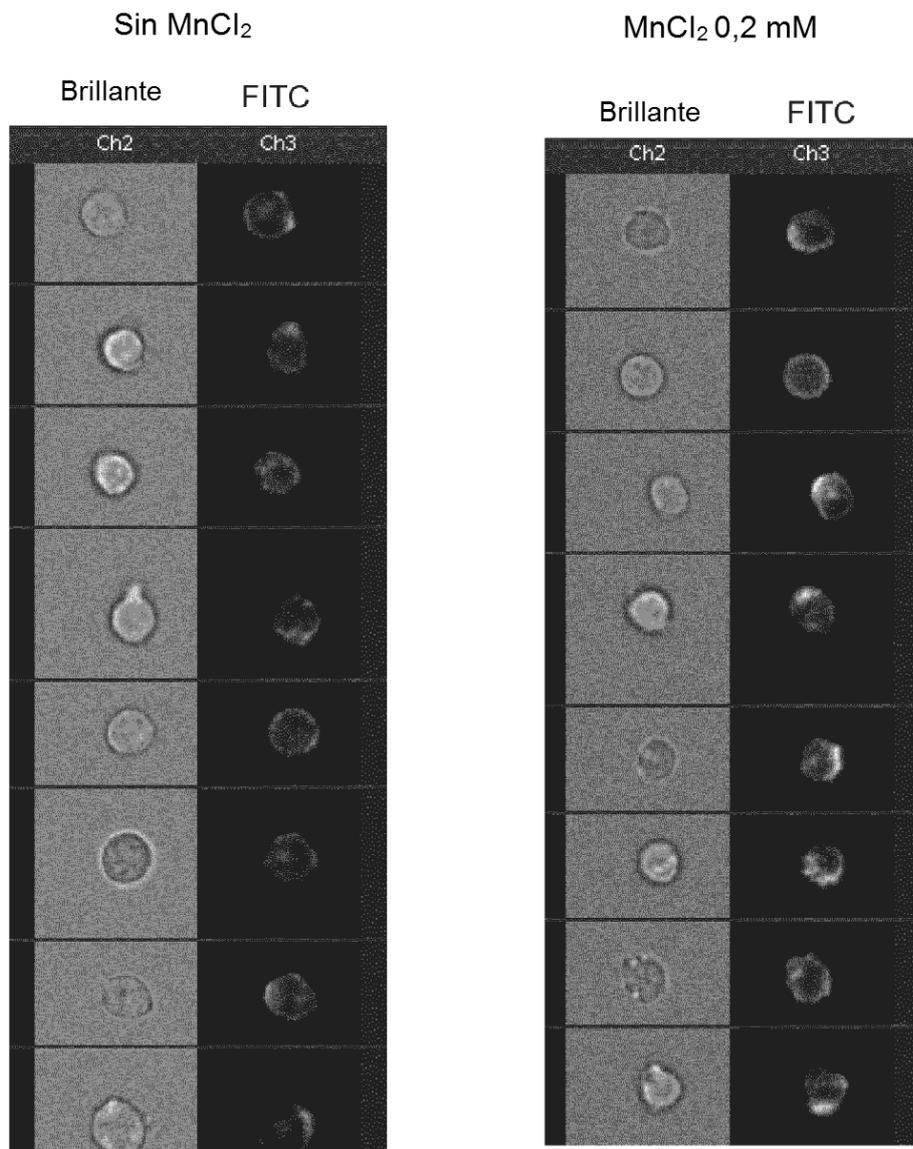


Fig. 4

Imágenes de las células Jurkat con FITC conjugado con el FITC-14 del Ejemplo (FITC marcado con el antagonista de VLA-4) a 10 μ M



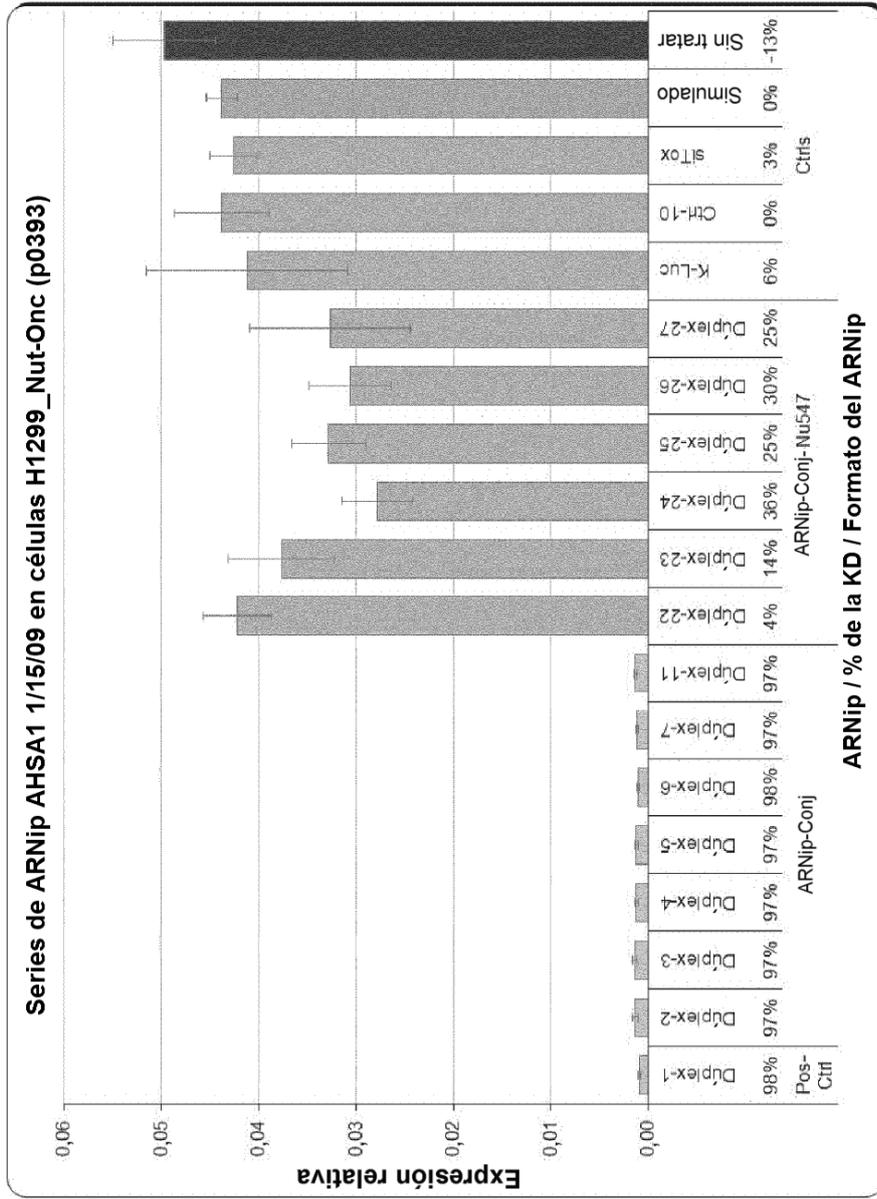


Fig. 5

