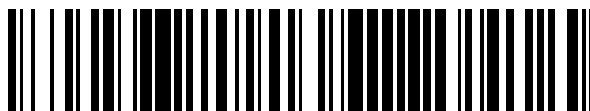


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 617 737**

51 Int. Cl.:

C07D 207/448 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.06.2008** **PCT/EP2008/005164**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.12.2008** **WO09000523**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.06.2008** **E 08759339 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.11.2016** **EP 2170821**

54 Título: **Procedimiento de preparación de enlazadores hidrolizables basados en Fmoc**

30 Prioridad:

26.06.2007 US 937125 P

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

19.06.2017

73 Titular/es:

**BAXALTA INCORPORATED (50.0%)
ONE BAXTER PARKWAY
DEERFIELD, ILLINOIS 60015, US y
BAXALTA GMBH (50.0%)**

72 Inventor/es:

**TURECEK, PETER;
SIEKMANN, JUERGEN;
NOE, CHRISTIAN y
STOIBER, GERHARD**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 617 737 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

Procedimiento de preparación de enlazadores hidrolizables basados en Fmoc

Campo de la invención

La presente invención se refiere a la preparación de un enlazador hidrolizable, que es útil para la modificación de fármacos de proteínas y péptidos.

Antecedentes de la invención

La mayoría de los fármacos de péptidos y proteínas son de corta duración y a menudo tienen una semi-vida circulatoria corta in vivo. Teniendo en cuenta que los fármacos de péptidos y proteínas no se absorben por vía oral, el mantenimiento prolongado de medicamentos terapéuticamente activos en la circulación es una característica deseable de importancia clínica evidente.

Una estrategia atractiva para mejorar las propiedades clínicas de fármacos de proteínas y péptidos es una modificación de los fármacos de proteínas y péptidos con polímeros, por ejemplo, polialquilenóxidos (Roberts et al., Advan Drugs Rev. 54, 459-476 (2002)) o polisacáridos como el ácido polisialico (Fernandes et al., Biochim Biophys Acta 1341, 26-34 (1997)), dextranos o almidón de hidroxietilo. La modificación con poli (etilenglicol) (PEG) se conoce desde algún tiempo. Sin embargo, la modificación de proteínas con PEG a menudo da lugar a una reducción de la actividad de la proteína. Por lo tanto se han desarrollado sistemas alternativos que permiten el acoplamiento liberable del polímero con el fármaco de proteína o péptido utilizando enlazadores químicos hidrolizables o degradables (documento de Estados Unidos 6.515.100, documento Estados Unidos 7.122.189, documento WO 04/089280, documento WO 06/138572). El conjugado de proteína-polímero se puede considerar un profármaco y la actividad de la proteína se puede liberar a partir del conjugado a través de un mecanismo de liberación controlada. Usando estos conceptos se pueden obtener propiedades farmacocinéticas mejoradas del fármaco (Zhao et al., Bioconjugate Chem. 17, 341-351 (2006)).

Peleg-Shulman, Tal et al., Journal of Medicinal Chemistry, 47 (20), 4897-4904 (2004) describe la superación de las cortas semi-vidas circulatorias de fármacos de péptidos y proteínas in vivo. Esto se realiza mediante PEGilación covalente usando un conjugado de PEG-IFN α 2.

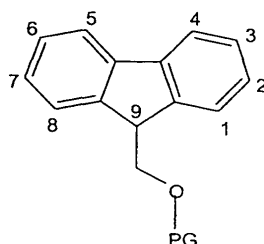
Schechter, Yoram et al., FEBS letters, 579 (11), 2439-2444 (2005) describe un péptido PEGilado reversiblemente, PYY (3-36), para aumentar la semi-vida funcional del péptido. El péptido se usa como medio para controlar la ingesta de alimentos en seres humanos.

Schechter, Yoram et al., Bioconjugate Chemistry, 16 (4), 913-920 (2005) describe la unión covalente de fármacos de péptidos o proteínas tales como HSA-Fmoc-insulina para mejorar la solubilidad acuosa, la acción retardada y un efecto terapéutico prolongado. Por lo tanto, el documento WO 04/089280 sugiere el uso de un enlazador de PEG hidrolizable.

Tsubery et al., (J Biol Chem. 279, 38118-38124 (2004)) demostró un enlazador de PEG hidrolizable para la derivatización de proteínas a base del grupo Fmoc (carbamato de 9-fluorenilmetilo). Se hace reaccionar un grupo fluoreno con anhídrido maleimidopropiónico y N-hidroxisuccinimida, que se hace reaccionar además con poli (etilenglicol) (PEG) y proteínas por sus grupos amino. Sin embargo, la síntesis del enlazador hidrolizable, denominado MAL-FMS-OSU (N-hidroxisuccinimidilcarbonato de 9-hidroximetil-2-(amino-3-maleimido-propionato)-7-sulfofluoreno), adolece de un bajo rendimiento y una reproducibilidad reducida. El problema fundamental de la síntesis de acuerdo con Tsubery et al. es la introducción del grupo maleimida por reacción de 9-hidroximetil-2-amino fluoreno con anhídrido del ácido maleimido propiónico. En esta etapa se produjeron reacciones secundarias no deseadas, como la esterificación del grupo OH en posición 9. Por lo tanto, se ha desarrollado una síntesis mejorada que contiene una etapa adicional para la protección del grupo OH.

Sumario de la invención

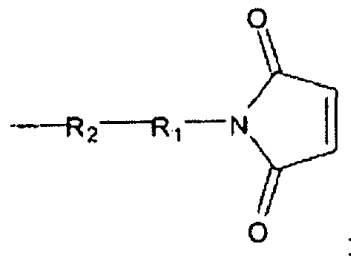
La presente invención proporciona compuestos de fórmula 1 de acuerdo con la reivindicación 7 y un nuevo procedimiento para la síntesis de un compuesto de fórmula general 1 de acuerdo con la reivindicación 1:



(fórmula 1)

en el que PG es un grupo protector de sililo y al menos una de las posiciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 está unida a un radical Y.

Y es un radical que contiene un resto N-maleimidilo que tiene una estructura



- 5 R₁ es un alquilo (C₁-C₈);
R₂ se selecciona del grupo que consiste en -C(O)NR-, -C(O)NR-alquilo (C₁-C₈)-NR-, -NRC(O)- y -NRC(O)-alquilo (C₁-C₈)-NR, en la que R es independientemente hidrógeno o alquilo (C₁-C₈);
al menos una de las posiciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 está unida opcionalmente a un radical X disponible;
X es -SO₃-R³.

- 10 R³ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo (C₁-C₈) y alquilo (C₁-C₈)-R⁴.

R⁴ es un polímero.

Los compuestos de la invención se preparan de acuerdo con un protocolo multi-etapa en el que se utiliza un grupo protector para el grupo 9-hidroximetilo del sistema de anillo de fluoreno. Estos derivados se pueden modificar adicionalmente para producir un éster activado tal como un éster de succinimidilo.

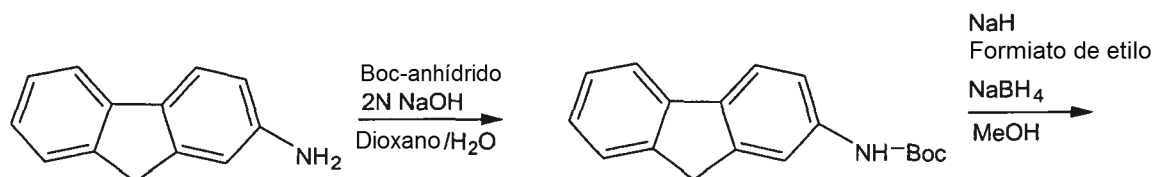
15 **Descripción detallada de la invención**

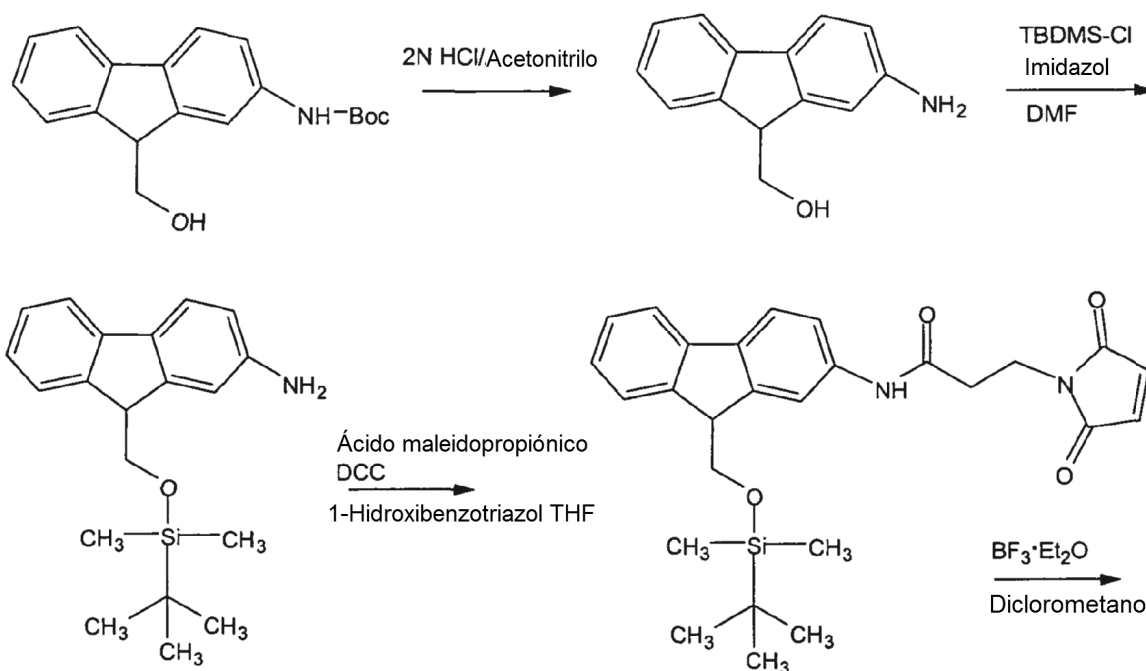
La presente invención permite superar los problemas anteriores por una síntesis que utiliza un grupo protector para dar un compuesto de fórmula 1. Un compuesto de fórmula 1 es un precursor adecuado para las etapas de reacción posteriores que producen un enlazador hidrolizable, como MAL-FMS-OSU y otros derivados MAL-Fmoc-OSU que contienen una maleimida activa (MAL) y un grupo N-hidroxisuccinimida (OSU = NHS) y proporciona los productos

- 20 deseados con un elevado rendimiento y pureza. Estos enlazadores se pueden modificar además con uno o más polímeros y a continuación se pueden utilizar para modificar un fármaco de péptido o proteína.

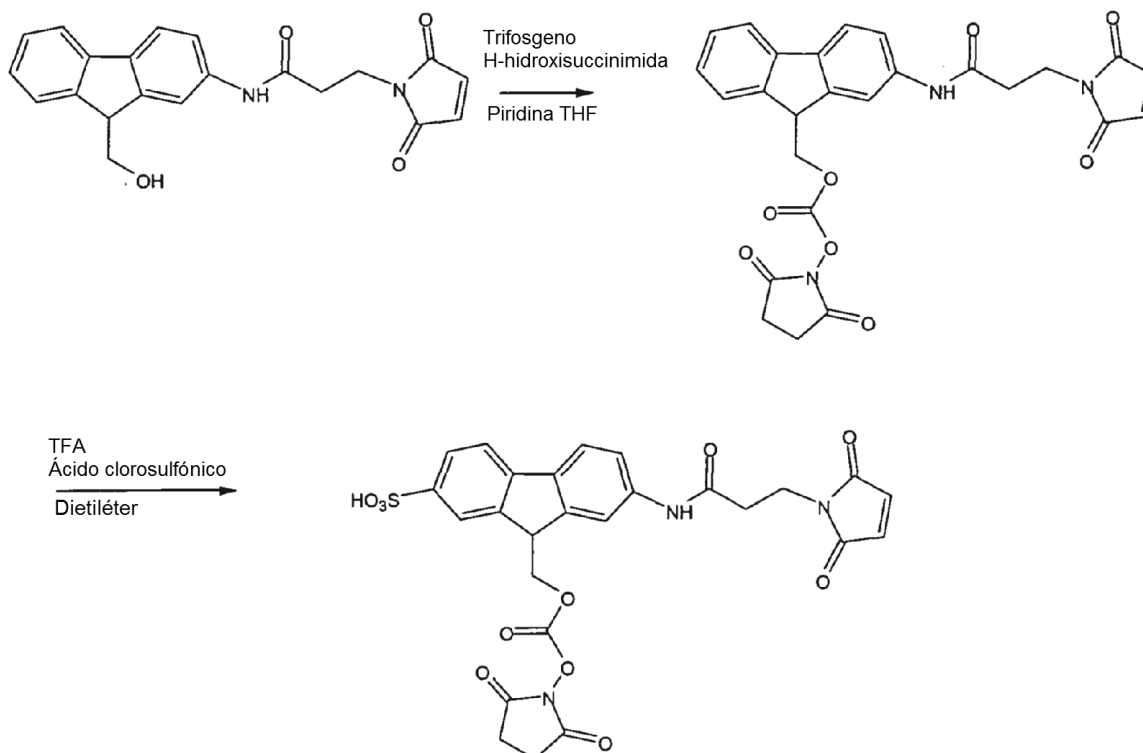
Los compuestos de fórmula 1 se preparan a partir de un fluoreno sustituido con amino. El nuevo protocolo sintético introduce un grupo protector para el grupo hidroximetilo en posición 9 del fluoreno en la etapa 4 del protocolo que se muestra a continuación. El esquema de síntesis siguiente ilustra la preparación de un compuesto de fórmula 1 como

- 25 ejemplo:





Otras etapas de reacción:



5 Etapas 1:

En una primera etapa (véase el esquema anterior), un grupo amina de un fluoreno sustituido con amino se protege por un grupo BOC (*terc*-butiloxycarbonilo), por ejemplo por reacción con Boc-anhídrido o similares. Se puede utilizar cualquier otro grupo protector (adecuado Greene et al., *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, Inc., tercera edición, Nueva York (1999)) para las aminas. Un ejemplo adicional es el grupo Z (benciloxycarbonilo).

Los derivados de fluoreno multi-amino-sustituídos se pueden utilizar en una reacción similar con el fin de sintetizar un compuesto de fórmula 1 que tiene más de un radical Y en posición 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8.

Etapas 2:

- 5 En una segunda etapa se introduce un grupo hidroximetilo en posición 9 del núcleo de fluoreno, por ejemplo, por reacción con NaH o diisopropilamida de litio (LDA) y formiato de etilo y posterior reacción con NaBH₄ u otros agentes reductores como DIBAL (hidruro de diisobutilaluminio) en MeOH.

Etapas 3:

En una tercera etapa, el grupo protector BOC se escinde, por ejemplo, con HCl CF₃COOH o ácido p-toluolsulfónico.

Etapas 4:

- 10 En una cuarta etapa, el grupo 9-hidroximetilo se protege, por ejemplo, por reacción con un haluro de sililo tal como tBDMS-Cl (Corey et al., J Am Chem Soc. 94, 6.190-6.191 (1972)) o 4,4'-trimetoxitritilcloruro.

En una realización, el haluro de sililo es tBDMS-Cl (cloruro de terc-butildimetilsililo). Preferentemente, la reacción con tBDMS-Cl se realiza con imidazol en DMF (dimetilformamida). El uso de un grupo protector de sililo hace la molécula más lipófila, lo que facilita la preparación de compuestos, que se unen a más de un radical Y.

- 15 **Etapas 5:**

En una quinta etapa se introduce un resto N-maleimidilo, por ejemplo, por reacción del grupo amino con un ácido maleimidoalquílico o un anhídrido de ácido maleimidoalquílico.

- 20 El grupo maleimidilo es reactivo frente a grupos tiol. Por lo tanto, los polímeros modificados, tales como PEG-SH, se pueden unir covalentemente al enlazador hidrolizable para producir un enlazador hidrolizable modificado con polímeros.

Etapas 6:

- 25 En esta etapa opcional, se introduce un radical X (-SO₃R³) en el sistema de anillo de fluoreno. Este grupo ácido hace el compuesto más hidrófilo y permite llevar a cabo reacciones de acoplamiento posteriores en disolventes acuosos. Además, un grupo de ácido sulfónico permite el acoplamiento de un segundo polímero por esterificación con un grupo OH de un polímero.

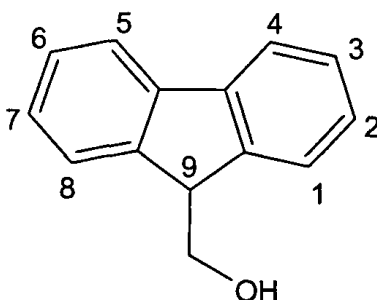
Este procedimiento permite introducir un radical X para dar un compuesto de fórmula 1, que comprende además un radical Y en la posición 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 y también un radical X en al menos una de las posiciones disponibles 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8.

- 30 En una realización, al menos un radical X está unido a las posiciones 2, 4, 5 y/o 7. En otra realización, un radical X está unido a la posición 7.

En otra forma de realización se introduce un radical X (-SO₃R³) en el sistema de anillo de fluoreno después de la etapa 4. Si -SO₃R³ es -SO₃H, el grupo -SO₃H se puede proteger por esterificación.

Otras etapas de reacción:

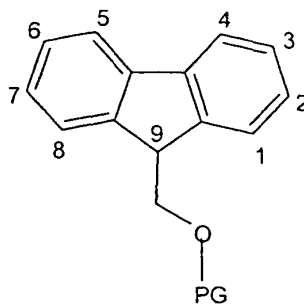
- 35 Después de la condensación con ácido maleimidoalquílico, el 9-hidroximetilo se puede desproteger mediante la eliminación del grupo protector (PG) para dar compuestos de fórmula 2. La desprotección se realiza preferentemente con BF₃, por ejemplo, BF₃ · Et₂O (eterato de trifluoruro de boro).



(fórmula 2)

El MAL-FMS-OSU o sus derivados se pueden sintetizar por reacción de un compuesto de fórmula 2 con N-hidroxisuccinimida o sus derivados, tales como carbonato de N,N'-disuccinimidilo. Las condiciones de reacción para la formación de un succinimidiléster son bien conocidas en la técnica. Un compuesto modificado con succinimidilo para la fórmula 2 se puede modificar adicionalmente por reacción con SH-polímeros y posteriormente se hace reaccionar con grupos amino de fármacos de péptidos o proteínas para producir conjugados de fármacos de péptidos o proteínas que tienen un enlazador hidrolizable que contiene un polímero.

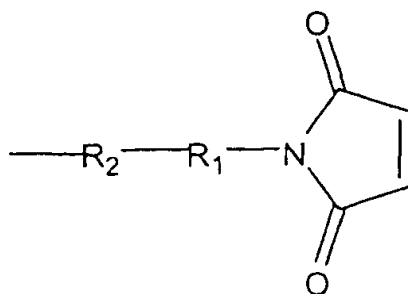
El protocolo ejemplificado anteriormente proporciona un compuesto de fórmula 1:



(fórmula 1)

en la que PG es un grupo protector de sililo y al menos una de las posiciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 está unida a un radical Y.

Y es un resto que contiene N-maleimidilo que tiene una estructura



R¹ es un alquilo (C₁-C₈);

En una realización R¹ se selecciona independientemente en cada caso del grupo que consiste en metilo, etilo, propilo, butilo y hexilo.

R² se selecciona del grupo que consiste en -C(O)NR-, -C(O)NR-alquilo (C₁-C₈)-NR-, -NRC(O)- y -NRC(O)-alquilo (C₁-C₈)-NR, en la que R es independientemente hidrógeno o alquilo (C₁-C₈).

Los compuestos de fórmula 1, que están sustituidos con al menos un radical Y también pueden estar unidos a un radical X en al menos una de las posiciones disponibles 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8.

X es -SO₃-R³.

R³ se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo (C₁-C₈) y alquilo (C₁-C₈)-R⁴.

"Alquilo (C₁-C₈)" se refiere a grupos alquilo monovalentes que tienen de 1 a 8 átomos de carbono. Este término se ejemplifica por grupos tales como metilo, etilo, propilo, butilo, hexilo y similares. Se incluyen alquilo lineales y ramificados.

R⁴ es un polímero. Ejemplos de polímeros son poli (etilenglicol) (PEG), ácido polisilícico (PSA), almidón de hidroxialquilo (HAS) y similares.

Según la presente invención, el compuesto de acuerdo con la fórmula 1, tiene un PG que es un grupo sililo. Ejemplos de un grupo sililo son trimetilsililo, trietilsililo o t-butildifenilsililo. En otra realización PG es un grupo terc-butildimetilsililo.

En una realización R² es -C(O)NH-.

En otra realización R² es -NHC(O)-.

En una realización, el compuesto de fórmula 1 está unido a un radical Y en al menos una de las posiciones 1, 2, 3 o 4.

En otra realización, el compuesto de fórmula 1, que está unido al radical Y en al menos una de las posiciones 1, 2, 3, o 4 y está unido además a un radical X en al menos una de las posiciones 5, 6, 7 u 8.

- 5 En otra realización, los compuestos de fórmula 1, que están sustituidos a al menos un radical Y en al menos una de las posiciones 2 o 3 también pueden estar unidos a un radical X en al menos una de las posiciones 7 u 8.

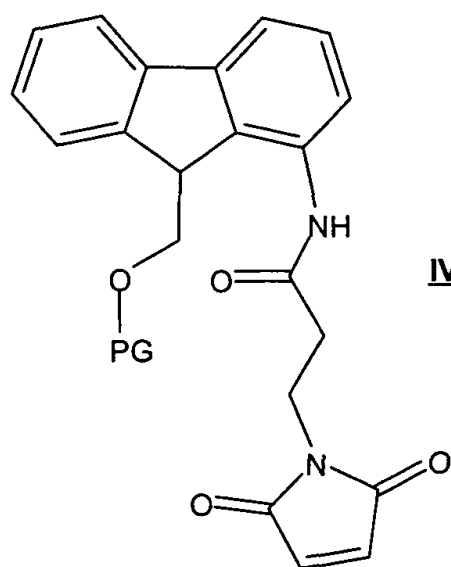
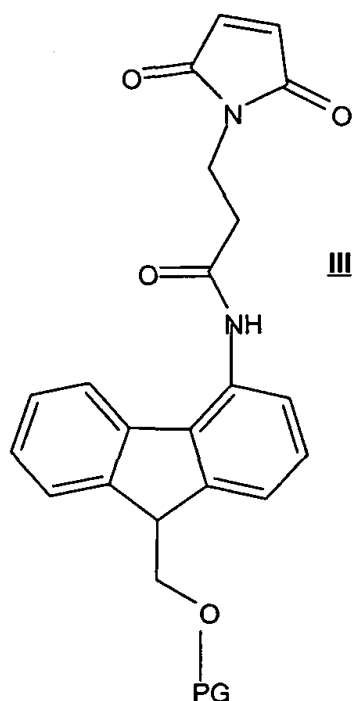
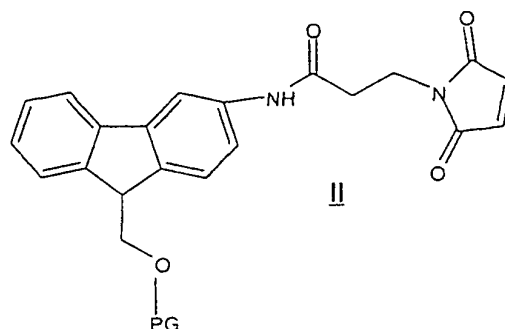
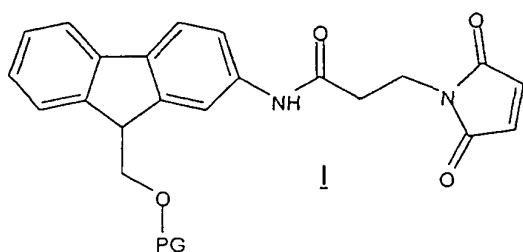
En otra realización, el compuesto de fórmula 1, que están sustituidos con al menos un radical Y, el radical X está unido a la posición 7.

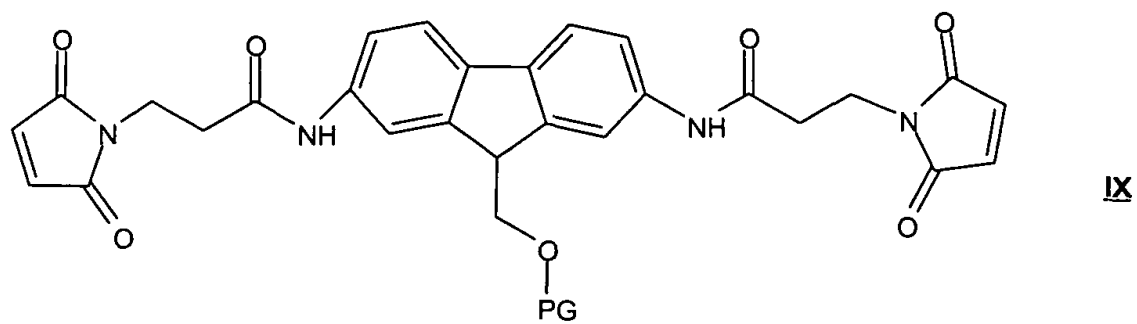
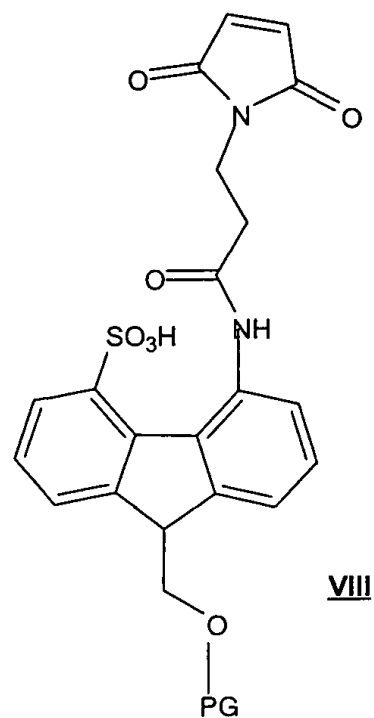
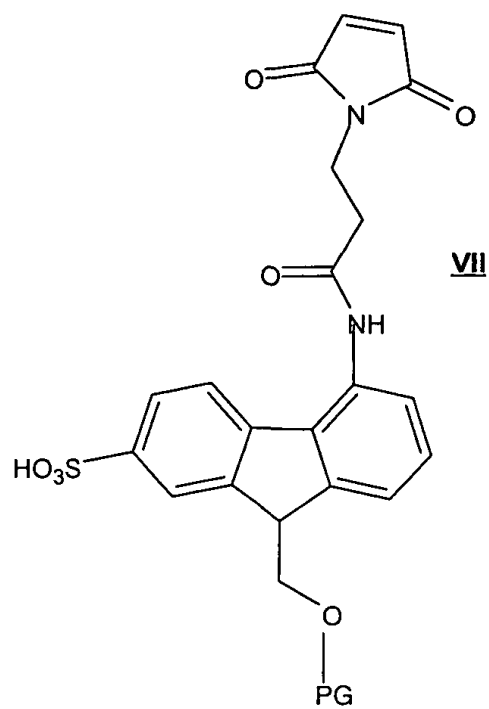
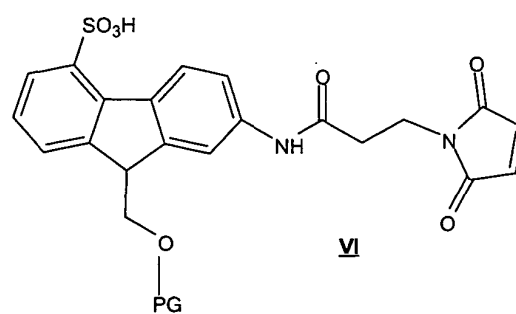
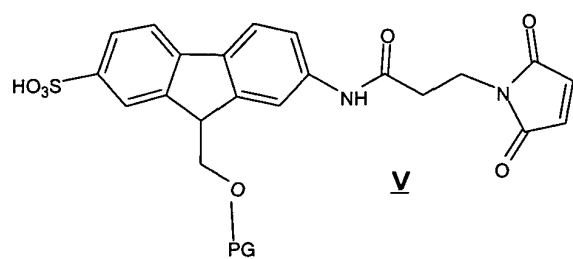
En otra realización, los compuestos de fórmula 1 están unidos a un radical Y en las posiciones 2 y 7.

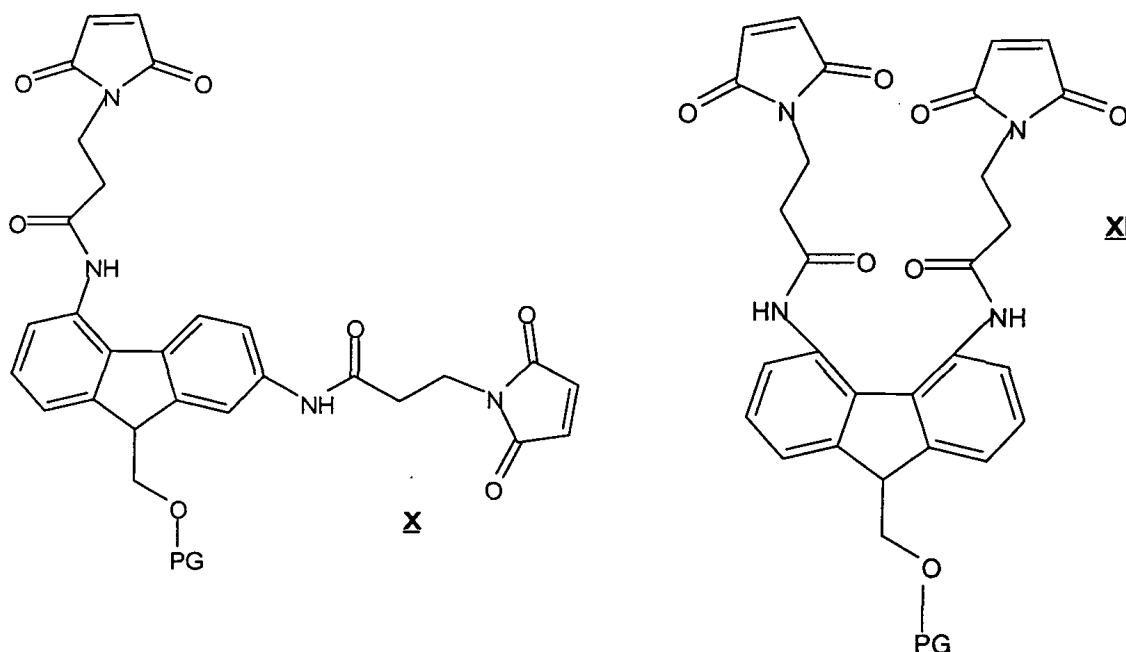
- 10 En otra realización, los compuestos de fórmula 1 están unidos a un radical X y a un radical Y en las posiciones 2 y 7, respectivamente.

En otra realización, el compuesto de fórmula 1 es:

La presente invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos sin limitarse a los mismos.



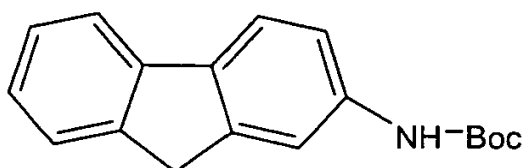




Ejemplos

Las moléculas de MAL-Fmoc-OSu se pueden sintetizar de acuerdo con el siguiente protocolo (Ejemplos 1-8):

Ejemplo 1: Síntesis de 2-(Boc-amino) fluoreno (Albericio et al., Synth Commun 31, 225-32 (2001))



5

Se preparó una suspensión de 2-aminofluoreno (14,4 g, 79,7 mmol) en una mezcla de dioxano-H₂O (2:1/V:V), se enfrió con un baño de hielo y se añadió 42,5 ml de NaOH 2 N con agitación suave. A continuación se añadió Boc₂O (19,1 g, 87,7 mmol, 1,1 equiv) y se prosiguió con la agitación a 25 °C. La evolución de la reacción se siguió por TLC [*R_f* = 0,75 para el 2-(Boc-amino) fluoreno. CHCl₃-MeOH-HOAc (95:5:3)] y el pH se mantuvo entre 9 y 10 mediante la adición de NaOH 2 N. Después de 24 h el análisis TLC mostró la presencia de 2-aminofluoreno [*R_f* = 0,60, CHCl₃-MeOH-HOAc (95:5:3)], por lo que se añadieron otros 5,2 g de Boc₂O (23,8 mmol, 0,3 equiv) y la reacción se prosiguió durante 3 h más hasta la desaparición total del producto de partida. La suspensión se acidificó con KHSO₄ 1 M a pH 3. El sólido se filtró y se lavó con 30 ml de H₂O fría, 30 ml de dioxano-H₂O (2: 1), 30 ml de hexano y se secó al vacío. El producto, un polvo de color amarillo pálido (30,1 g, 90% de rendimiento) se demostró que era puro por TLC [*R_f* = 0,75; CHCl₃/MeOH/HOAc 95:5:3], y se caracterizó por RMN.

10

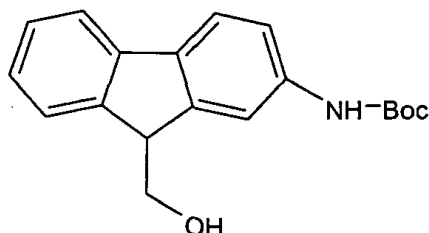
15

RMN ¹H (200 MHz/DMSO) δ = 9,45 (1 H; s; NH); 7,84 - 7,77 (3H, m; H1, H4, H5); 7,59 - 7,17 (4H, m; H2, H6-H8); 3,86 (2H; s; CH₂); 1,49 (9H, s, t-Bu)

RMN ¹³C (50 MHz/DMSO) δ = 152,8 (C intermedio); 143,8 (C9a); 142,6 (C8a); 141,2 (C4b); 138,7 (C2); 135,2 (C4a); 126,7 (C6); 125,8 (C7); 124,9 (C8); 120,0 (C4); 119,2 (C5); 116,9 (C3); 114,8 (C1); 79,02 (CH₂); 39,5 (Cq t-Bu); 28,2 (3xCH₃ t-Bu)

20

Ejemplo 2: Síntesis de 9-hidroximetil-2-(Boc-amino) fluoreno (Albericio et al., Synth Commun 31, 225-32 (2001))



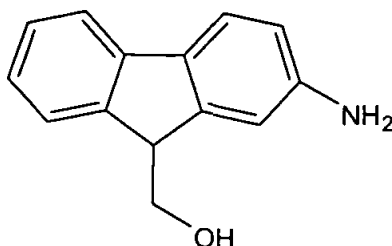
Una solución de 2-(Boc-amino) fluoreno (13,49 g, 47,9 mmol) en 140 ml de THF seco (recién destilado a partir de sodio) se añadió cuidadosamente a una suspensión de 6,3 g de NaH al 60% (160 mmol, 3,3 equiv) en 20 ml de THF seco bajo atmósfera de argón. Se observaron desprendimiento de gas y calentamiento espontáneo. Después de la adición completa de 2-(Boc-amino) fluoreno la mezcla de reacción se agitó durante 1 h a 40 °C. A continuación, la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se añadieron lentamente 9,7 ml de formiato de etilo (120 mmol, 2,5 equiv) para evitar el burbujeo vigoroso de hidrógeno. La suspensión marrón clara inicialmente espesa se aclaró rápidamente a una solución de color marrón oscuro con la adición de formiato de etilo y se agitó durante 1 h. La evolución de la reacción se siguió por TLC [R_f = 0,52 para el producto intermedio, CHCl_3 -MeOH-HOAc (95:5:3)]. La reacción se extinguió con trozos de hielo y 100 ml de H_2O y el disolvente orgánico se eliminó por evaporación rotatoria. A la fase acuosa se le añadió 10 ml de NaOH 2 N y se lavó con 3 x 50 ml de éter dietílico, se enfrió en un baño de hielo y se acidificó con 25 ml de HOAc glacial hasta pH 5. El precipitado blanquecino que apareció entonces se disolvió en 300 ml de EtOAc. La fase acuosa se extrajo con 50 ml de EtOAc y la fase orgánica se lavó con 2 x 75 ml de NaHCO_3 sat. y 1 x 75 ml de salmuera y se secó sobre Na_2SO_4 . El disolvente se eliminó a presión reducida.

Se suspendió 9-formil-2-(Boc-amino) fluoreno en 100 ml de metanol y se añadió en porciones 2,0 g de NaBH_4 [52,9 mmol, 1,1 equiv con respecto al 2-(Boc-amino) fluoreno de partida]. La suspensión que se aclaró rápidamente se sometió a agitación magnética durante 4 horas a temperatura ambiente hasta que el producto de partida desapareció [TLC, R_f = 0,57, PE:MTBE (1:2)]. La mezcla de reacción se diluyó con 300 ml de H_2O y se acidificó con 15 ml de HOAc glacial a pH 5,0, y el precipitado se disolvió directamente en 150 ml de EtOAc. La fase orgánica se lavó con 3 x 50 ml NaHCO_3 sat. y 1 x 50 ml de salmuera y se secó sobre Na_2SO_4 anhidro. El disolvente se evaporó en el evaporador rotatorio para dar un sólido, que se podía utilizar sin purificación adicional. El producto se analizó por RMN (13,1 g, 88% de rendimiento).

RMN ^1H (200 MHz/DMSO) δ = 9,42 (1H, s; NH); 7,87 (1H; s; H1); 7,79 - 7,66 (2H; m; H4, H5); 7,61 (1H, d, J = 7,71 Hz; H8); 7,48 - 7,15 (3H, m, H3, H6, H7); 5,07 (1H, t, J = 4,80 Hz; OH); 4,00 - 3,88 (1 H; m; H9); 3,82 - 3,63 (2H; m; CH_2); 1,49 (9H, s; t-Bu)

RMN ^{13}C (50 MHz/DMSO) δ = 152,88 (C intermedio); 146,05 (C9a); 144,90 (C8a); 140,81 (C4b); 138,64 (C2); 134,90 (C4a); 127,13 (C6); 125,85 (C7); 125,05 (C8); 119,93 (C4); 119,16 (C5); 117,47 (C3); 115,24 (C1); 79,00 (Cq t-Bu); 63,85 (CH_2); 50,19 (C9); 28,20 (3x CH_3 t-Bu)

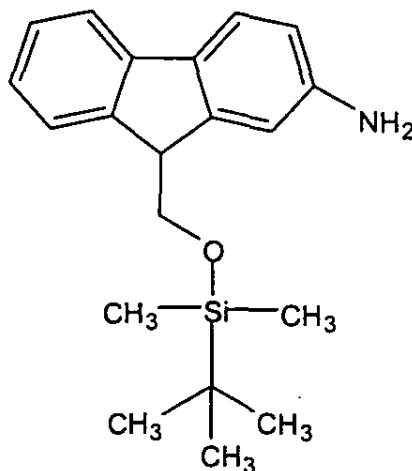
Ejemplo 3: Síntesis de 9-hidroximetil-2-amino fluoreno



Se disolvió 13,0 g de 9-hidroximetil-2-(Boc-amino) fluoreno en 110 ml de acetonitrilo y se agitó a reflujo. Se añadió gota a gota 42 ml de HCl 2 N (2,0 equiv, 84 mmol). La mezcla de reacción se agitó a reflujo durante 45 min. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y la reacción se controló por TLC [R_f = 0,1 PE-MTBE (1:2)]. El disolvente se eliminó parcialmente por evaporación rotatoria y el residuo se disolvió en 70 ml de HCl 2 N. La solución se lavó cuidadosamente con 2 x 50 ml de MTBE. La fase acuosa se ajustó a pH 9 por Na_2CO_3 y se extrajo con 2 x 70 ml de EtOAc. La fase orgánica se lavó con 50 ml de salmuera y se secó sobre Na_2SO_4 . El disolvente se eliminó por evaporación rotatoria. El producto se utilizó sin purificación adicional. La identidad estructural se verificó por RMN (8,76 g, 99% de rendimiento).

RMN ^1H (200 MHz/DMSO) δ = 7,69 - 7,40 (3H; m; 3 x Ar-H); 7,37 - 7,02 (2H; m; 2 x Ar-H); 6,87 (1 H; s; Ar-H); 6,68 (1 H; d; J = 8,34 Hz; Ar-H); 5,19 (2H; s; NH_2); 5,03 (1H, t, J = 4,93 Hz; OH); 3,93 - 3,58 (3H, m; H9, CH_2)

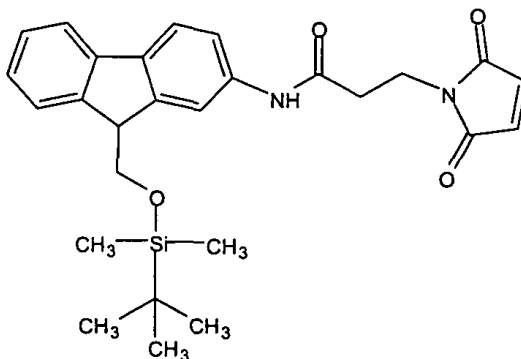
RMN ^{13}C (50 MHz/DMSO) δ = 148,36 (Ar-Cqu); 146,81 (Ar-Cqu); 143,97 (Ar-Cqu); 141,87 (Ar-Cqu); 129,03 (Ar-Cqu); 126,92 (Ar-CH); 124,85 (Ar-CH); 124,24 (Ar-CH); 120,40 (Ar-CH); 117,81 (Ar-CH); 113,00 (Ar-CH); 110,76 (Ar-CH); 64,27 (CH_2); 49,90 (CH)

Ejemplo 4: Síntesis de terc-butildimetilsiloxi-9-metil-2-aminofluoreno

Se disolvió 5,91 g de imidazol (86,8 mmol, 2,1 equiv) en 24 ml de DMF seca y se agitó 10 min en un baño de hielo en atmósfera de argón. Se añadió 7,47 g de cloruro de terc-butildimetilsililo (49,6 mmol, 1,2 equiv) disuelto en DMF seco. Después de 15 minutos de agitación en hielo se añadió gota a gota 8,73 g de 9-hidroxi-2-amino fluoreno (41,3 mmol) disuelto en 40 ml de DMF seco, con enfriamiento y en atmósfera de argón. La reacción se prosiguió durante 15 min en hielo y a continuación a temperatura ambiente. La reacción se controló por TLC [título del producto $R_f = 0,6$, PE-MTBE (1:2)]. Después de 2 horas, el producto de partida [$R_f = 0,1$ PE-MTBE (1:2)] había desaparecido y la mezcla de reacción se diluyó con 400 ml de CH_2Cl_2 y se añadió 100 ml de NaHCO_3 al 5%. La fase orgánica se lavó con 5 x 200 ml de H_2O y se secó sobre Na_2SO_4 . El CH_2Cl_2 se eliminó por evaporación rotatoria y la DMF se eliminó por destilación azeotrópica con tolueno. El aceite marrón residual (13,4 g, 99% de rendimiento) se analizó por RMN y se utilizó sin purificación adicional.

RMN ^1H (200 MHz/DMSO) $\delta = 7,67 - 7,40$ (3H, m; 3 x Ar-H); 7,34 - 7,00 (2H, m; 2 x Ar-H); 6,81 (1H, s; 1 x Ar-H); 6,59 (1 x; dd; $J = 8,02$ Hz y 1,83 Hz; 1 x Ar-H); 5,19 (2H, s; NH_2); 3,97 - 3,76 (2H, m; CH_2); 3,75 - 3,57 (1 H, m; CH); 0,88 (9H, s; 3 x CH_3); 0,03 (6H, s; 2 x CH_3)

RMN ^{13}C (50 MHz/DMSO) $\delta = 148,40$ (Ar-Cqu); 145,81 (Ar-Cqu); 143,67 (Ar-Cqu); 141,88 (Ar-Cqu); 129,08 (Ar-Cqu); 127,10 (Ar-CH); 124,97 (Ar-CH); 124,16 (Ar-CH); 120,47 (Ar-CH); 117,87 (Ar-CH); 113,22 (Ar-CH); 110,58 (Ar-CH); 66,04 ($\text{CH}_2\text{-OH}$); 49,60 (C9); 25,88 (3xCH₃; t-Bu); 18,04 (Cqu; t-Bu); -5,04 (2CH₃; Si-CH₃).

Ejemplo 5: Síntesis de terc-butildimetilsiloxi-9-metil-2-(amino-3-maleimidopropionato) fluoreno

A una solución de 13,5 g de 9-terc-butildimetilsiloximetil-2-aminofluoreno (41,5 mmol) en THF seco (recién destilado a partir de sodio) se le añadieron 9,42 g de N,N'-diciohexilcarbodiimida (75,7 mmol, 1,1 equiv) y 651 mg de 1-hidroxibenzotriazol (4,8 mmol, 0,1 equiv). Se disuelven 13,5 g (41,5 mmol, 1,1 equiv) de ácido 3-maleimidopropiónico en 50 ml de THF seco y se añade gota a gota. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche bajo atmósfera de argón, y la formación de producto se controló por TLC [material de partida $R_f = 0,6$, título del producto $R_f = 0,18$, PE-MTBE (1:2)].

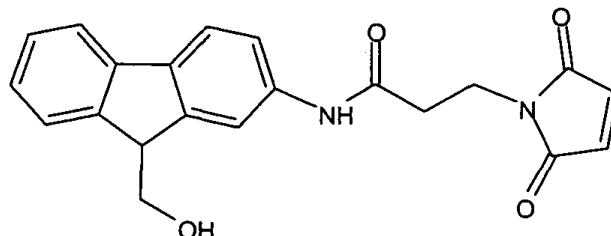
Tan pronto como dejó de detectarse el material de partida, la diciohexilurea se separó por filtración y el THF se eliminó por evaporación rotatoria. El sólido residual se disolvió en 200 ml de CH_2Cl_2 , se lavó con 50 ml de NaHCO_3 al 5% y 50 ml de salmuera y se secó sobre Na_2SO_4 . Los cristales de color pardo se digirieron en 20 ml de MTBE. Después de la filtración el residuo se lavó con pequeñas porciones de MTBE hasta que la solución de lavado se mantiene incolora. Los cristales de color amarillo (10,5 g, 53% de rendimiento) se analizaron mediante RMN.

RMN ^1H (200 MHz/DMSO) $\delta = 10,06$ (1 H, s; NH); 7,92 (1 H, s; H1); 7,82 - 7,70 (2H, m; H4 y H5); 7,62 (1H, d, $J = 7,20$ Hz; H3); 7,49 (1H, d, $J = 8,08$ Hz; H8); 7,41 - 7,18 (2H, m; H6 y H7); 7,03 (2H, s; 2 x Mal-CH); 4,02 (1H, t, $J =$

6,63 Hz; H9); 3,95 - 3,66 (4H, m; Prop-CH₂N y CH₂-OtBDMS); 2,61 (2H; t; J = 7,07 Hz; Prop-CH₂-C=O); 0,84 (9H, s; 3 x t-Bu CH₃); 0,10 - -0,56 (6H; m; 2 x CH₃-Si)

RMN ¹³C (50 MHz/DMSO) δ = 170,81 (C=O Mal); 168,30 (C=O medio); 145,12 (C9a); 144,62 (C8a); 140,68 (C4b); 138,05 (C2); 136,02 (C4a); 134,62 (2 x CH Mal); 127,34 (C6); 126,02 (C7); 125,15 (C8); 119,99 (C4); 119,37 (C5); 118,63 (C3); 116,31 (C1); 65,54 (CH₂OtBDMS); 49,85 (C9); 35,01 (Prop-CH₂-N); 33,91 (Prop-CH₂-CO); 25,84 (3x CH₃ (t-Bu); 18,01 (Cqu t-Bu); -5,40 (CH₃-Si); -5,44 (CH₃-Si)

Ejemplo 6: Síntesis de 9-hidroxitetil-2-(amino-3-maleimidopropionato) fluoreno



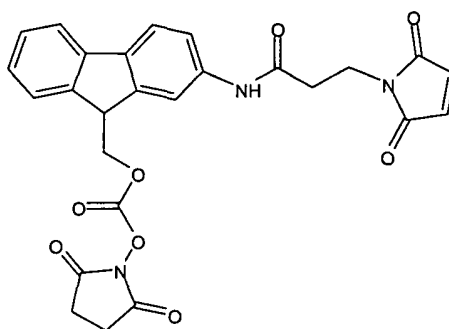
Se disolvieron 10,3 g de terc-butildimetilsiloxi-9-metil-2-(amino-3-maleimidopropionato) fluoreno (21,6 mmol) en 230 ml de CH₂Cl₂ en atmósfera de argón. Se añadieron gota a gota 35 ml de eterato de trifluoruro de boro durante 30 min. La reacción se controló por TLC [material de partida R_f = 0,6, título del producto R_f = 0,38, CH₂Cl₂-metanol (10:1)]. Tan pronto como el material de partida hubo desaparecido, la solución se hidroliza con una solución de NaHCO₃ sat. Los cristales resultantes se filtraron. Se evaporó la fase orgánica de las aguas madres. Este residuo y la torta del filtro se volvieron a disolver en 250 ml de EtOAc y 120 ml de NaHCO₃ al 5%. La fase orgánica se lavó con 1 x 50 ml de NaHCO₃ al 5%, 50 ml de H₂O y 50 ml de salmuera y se secó sobre Na₂SO₄. El disolvente se eliminó por evaporación rotatoria. La estructura del producto se verificó por RMN y espectroscopía de masas.

RMN ¹H (200 MHz/DMSO) δ = 10,09 (1 H; s; NH); 7,88 (1H; s; H1); 7,82 - 7,69 (2H; m; H4 y H5); 7,66 - 7,52 (2H; m; H3 y H8); 7,41 - 7,17 (2H; m; H6 y H7); 7,03 (2H; s; 2 x Mal-CH); 5,09 (1H, t, J = 4,93 Hz; OH); 5,08 (1H, t, J = 6,06 Hz; H9); 3,97 - 3,53 (4H, m; Prop-CH₂N y CH₂OH); 2,61 (2H; t; J = 6,82 Hz; Prop-CH₂-C=O)

RMN ¹³C (50 MHz/DMSO) δ = 170,82 (C=O Mal); 168,38 (C=O medio); 146,00 (C9a); 144,89 (C8a); 140,63 (C4b); 138,05 (C2); 135,92 (C4a); 134,62 (2 x CH Mal); 127,16 (C6); 126,09 (C7); 125,03 (C8); 119,93 (C4); 119,33 (C5); 118,39 (C3); 116,36 (C1); 63,86 (CH₂OH); 50,14 (C9); 35,07 (Prop-CH₂-N); 33,92 (Prop-CH₂-CO)

ESI-MS: encontrado: (M + Na)⁺: 385,2; calculado: (M + Na)⁺: 385

Ejemplo 7: Síntesis de N-hidroxisuccinimidilcarbonato de 9-hidroxitetil-2-(amino-3-maleimidopropionato) fluoreno



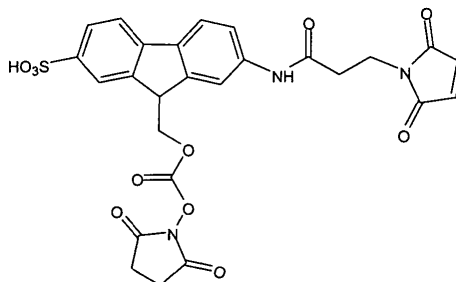
En una solución de 1,8 g de piridina en 7,3 ml de THF absoluto se añadieron 1,7 ml (5,1 mmol) gota a gota a una solución agitada de 0,93 g de 9-hidroxitetil-2-(amino-3-maleimidopropionato) fluoreno (2,6 mmol) y 1,1 g de trifosgeno (3,6 mmol, 1,4 equiv) en 75 ml de THF seco (recién destilado a partir de sodio). Después de 40 min, la sal de clorhidrato de piridina precipitada se retiró por filtración sobre celite y el THF se retiró por evaporación rotatoria. El aceite obtenido se disolvió en 75 ml de tetrahidrofurano seco con 1,1 g de N-hidroxisuccinimida (13,6 mmol, 5,3 equiv). A continuación se añadieron 2,6 ml de la solución de piridina (8,2 mmol), y la solución se agitó durante 40 min. Se separó un poco de sal de clorhidrato de piridina precipitada adicional por filtración sobre celite y el THF se retiró por evaporación rotatoria. El aceite obtenido se disolvió en 70 ml de cloroformo y se lavó con 4 x 40 ml de HCl 0,1 N, 3 x 50 ml de una solución acuosa de NaHCO₃ al 5%, y a continuación con 1 x 40 ml de agua, 40 ml de salmuera y se secó sobre Na₂SO₄. El cloroformo se retiró por evaporación rotatoria. La identidad estructural se verificó mediante RMN y espectroscopía de masas.

RMN ¹H (500 MHz/CDCl₃) δ = 8,35 (1 H; s; NH); 8,00 - 7,95 (1 H; m; H3); 7,71 - 7,65 (2H; m; H4 y H5); 7,50 - 7,46 (1H, d, J = 7,25 Hz; H8); 7,42 - 7,36 (2H; m; H1 y H6); 7,30 - 7,25 (1H, m; H7); 6,69 (2H; s; 2 x Mal-CH); 4,66 (1H, dd; J = 10,40 Hz y 5,99 Hz, H_a-CH₂O); 4,14 (1H, t, J = 10,09 Hz, H_b CH₂O); 4,27 (1H, dd; J = 9,46 Hz y 5,99 Hz; H9); 3,95 (2H; t; J = 7,09 Hz; Prop-CH₂-N); 2,86 (4H; s; 2 x Succ-CH₂); 2,80 - 2,54 (2H; m; Prop-CH₂-C=O)

RMN ¹³C (125 MHz/CDCl₃) δ = 170,53 (C=O Mal); 168,21 (C=O medio); 151,41 (C=O carbonato); 143,79 (C2); 141,13 (C9a); 140,94 (C8a); 137,36 (C4b); 137,11 (C4a); 134,20 (2 x CH Mal); 128,33 (C6); 126,82 (C7); 124,62

(C8); 120,63 (C4); 120,23 (C3); 119,96 (C5); 116,50 (C1); 72,67 (CH₂O); 46,49 (C9); 35,62 (Prop-CH₂-N); 34,15 (Prop-CH₂CO); 25,47 (2 x Succ-CH₂)
 ESI-MS (calculado): (M + H)⁺: 504; (M + Na)⁺: 526
 ESI-MS (encontrado): (M + H)⁺: 504,1; (M + Na)⁺: 526,1

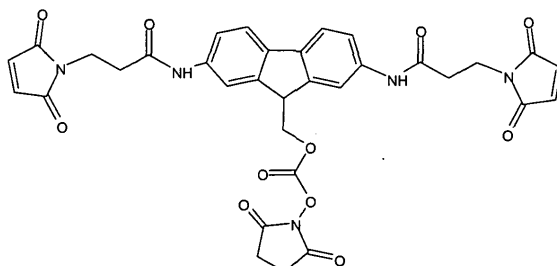
5 Ejemplo 8: Síntesis de N-hidroxisuccinimidilcarbonato de 9-hidroxitil-2-(amino-3-maleimidopropionato)-7-sulfofluoreno



10 A una solución de 1,2 g de N-hidroxisuccinimidilcarbonato de 9-hidroxitil-2-(amino-3-maleimidopropionato) fluoreno (2,1 mmol) en 60 ml de ácido trifluoroacético se le añadió 7 ml de ácido clorosulfónico. Después de 30 min la mezcla de reacción se enfrió a 4 °C y se añadió éter dietílico frío 350 ml. El producto precipitado se filtró y se lavó dos veces con éter dietílico y se secó al vacío.
 La identidad estructural se verificó mediante espectrometría de masas.
 ESI-MS (encontrado): (M + H)⁺: 583,9
 ESI-MS (calculado): (M + H)⁺: 583

15 La síntesis de MAL2-Fmoc-OSu a partir de 2,7-diaminofluoreno se ilustra en el Ejemplo 9.

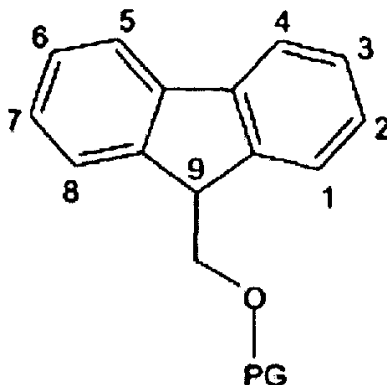
Ejemplo 9: Síntesis de N-hidroxisuccinimidilcarbonato de 9-hidroxitil-2,7-di-(3-amino-maleimidopropionato) fluoreno



20 Se prepara N-hidroxisuccinimidilcarbonato de 9-hidroxitil-2,7-di-(3-amino-maleimidopropionato) fluoreno en las condiciones que se describen en los Ejemplos 1-8. Los grupos amino en el 2,7-diaminofluoreno están protegidos con BOC₂O como se describe por Albericio et al., Synth Commun. 31, 225-32 (2001). A continuación, el grupo formilo se introduce en posición 9 por reacción de diisopropilamida de litio (LDA) y formiato de etilo. El aldehído obtenido se reduce con borohidruro sódico al alcohol correspondiente para formar 9-hidroxitil-2,7-di-(Boc-amino) fluoreno.
 25 Posteriormente, los grupos protectores BOC se escinden con HCl 2 N en CH₃CN y se obtiene 9-hidroxitil-2,7-diaminofluoreno. A continuación, el grupo OH se protege por reacción con terc-butildimetilsililo como se describe en el Ejemplo 5 para formar terc-butildimetilsiloxi-9-metil-2,7-diaminofluoreno. A continuación, se realiza la reacción de los grupos amino libres con ácido maleimidopropiónico en presencia de N,N'-diciclohexilcarbodiimida e hidroxibenzotriazol y se obtiene terc-butildimetilsiloxi-9-metil-2,7-di-(amino-3-maleimidopropionato) fluoreno.
 30 Después de la desprotección del grupo OH en posición 9 con eterato de trifluoruro de boro se forma 9-hidroxitil-2,7-di-(amino-3-maleimidopropionato) fluoreno. Por último se lleva a cabo la reacción con trifosgeno y N-hidroxisuccinimida y se prepara N-hidroxisuccinimidilcarbonato de 9-hidroxitil-2,7-di-(3-amino-maleimidopropionato) fluoreno.

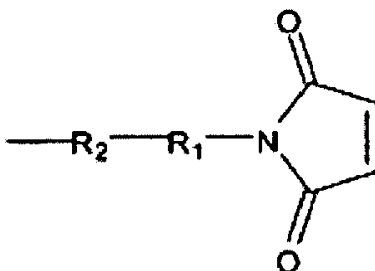
REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de preparación de un compuesto de acuerdo con la fórmula 1:



(fórmula 1)

5 en la que PG es un grupo protector de sililo y al menos una de las posiciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 está unida a un radical Y; Y es un radical que contiene un resto N-maleimidilo que tiene una estructura



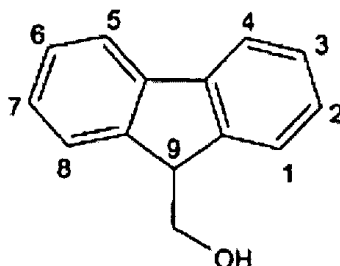
R₁ es un alquilo (C₁-C₈);

10 R₂ se selecciona del grupo que consiste en -C(O)NR-, -C(O)NR-alquilo (C₁-C₈)-NR-, -NRC(O)- y -NRC(O)-alquilo (C₁-C₈)-NR, en la que R es independientemente hidrógeno o alquilo (C₁-C₈); al menos una de las posiciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 disponibles está unida opcionalmente a un radical X;

X es -SO₃R³;

R³ se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo (C₁-C₈) y alquilo (C₁-C₈)-R⁴; y R⁴ es un polímero;

15 dicho procedimiento comprende las etapas de hacer reaccionar el grupo 9-hidroximetilo de un compuesto de fórmula 2:



20 en la que al menos una de las posiciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 está unida a una amina, con un reactivo protector de sililo que introduce PG, y posteriormente hacer reaccionar dicho compuesto con un reactivo de N-maleimidilo para formar el compuesto de fórmula (1).

2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho reactivo protector de sililo es un haluro de sililo.

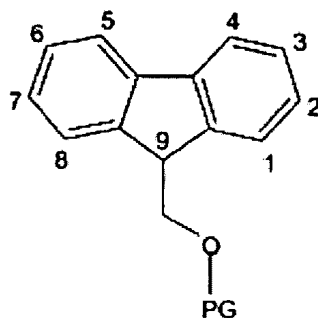
25 3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que dicho haluro es cloruro de terc-butildimetilsililo (tBDMS-Cl).

4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que dicha reacción con tBDMS-Cl se realiza con imidazol en dimetilformamida (DMF).

5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicho reactivo de N-maleimidilo es ácido maleimidoalquílico.

6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que al menos una de las posiciones disponibles 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 está unida a un radical X.

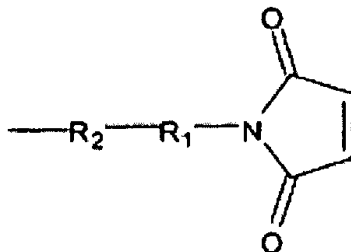
7. Un compuesto de fórmula 1,



(fórmula 1)

10 en la que PG es un grupo protector de sililo y al menos una de las posiciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 está unida a un radical Y; y al menos una de las posiciones disponibles 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 está unida opcionalmente a un radical X;

Y es un resto que contiene N-maleimidilo que tiene una estructura:



15 X es $-\text{SO}_3\text{R}^3$;
 R^3 se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_8$) y alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_8$)- R^4 ;
 R^4 es un polímero;
 R_1 es un alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_8$); y
 R_2 se selecciona del grupo que consiste en $-\text{C}(\text{O})\text{NR}-$, $-\text{C}(\text{O})\text{NR}$ -alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_8$)- $\text{NR}-$, $\text{NRC}(\text{O})-$ y $-\text{NRC}(\text{O})$ -alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_8$)- $\text{NR}-$, en la que R es hidrógeno o alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_8$).

8. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 7, en el que PG es un grupo protector de t-butildimetilsililo.