

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 624 626**

51 Int. Cl.:

**A61K 47/65** (2007.01)

**C07K 5/02** (2006.01)

**C07K 5/068** (2006.01)

**C07K 5/09** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.10.2012** **PCT/EP2012/071373**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.05.2013** **WO13064455**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.10.2012** **E 12779063 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.02.2017** **EP 2773375**

54 Título: **Ligadores basados en tirosina para la conexión desprendible de péptidos**

30 Prioridad:

**03.11.2011 EP 11187737**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**17.07.2017**

73 Titular/es:

**BAYER INTELLECTUAL PROPERTY GMBH**  
**(50.0%)**

**Alfred-Nobel-Str., 10**  
**40789 Monheim am Rhein, DE y**  
**BAYER PHARMA AKTIENGESELLSCHAFT**  
**(50.0%)**

72 Inventor/es:

**FLAMME, INGO;**  
**KÖBBERLING, JOHANNES;**  
**LERCHEN, HANS-GEORG;**  
**GRIEBENOW, NILS;**  
**SCHOHE-LOOP, RUDOLF;**  
**WITTROCK, SVEN y**  
**KRENZ, URSULA**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 624 626 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

Ligadores basados en tirosina para la conexión desprendible de péptidos

La invención se refiere a novedosos ligadores basados en tirosina que permiten la conexión desprendible de péptidos o proteínas con otras entidades moleculares, por ejemplo, polietilenglicol, para procesos para su preparación y su uso para preparar medicamentos para el tratamiento y/o la profilaxis de enfermedades.

Muchos péptidos o proteínas terapéuticamente activos sufren alta eliminación *in vivo*. Existen varios enfoques para formar una preparación de liberación prolongada inyectable de tales fármacos que implique el uso de macromoléculas.

Las matrices de polímero que contienen una molécula de fármaco en un estado no covalentemente unido son muy conocidas. Éstas también pueden ser inyectables como hidrogeles, micropartículas o micelas. La liberación cinética de tales productos de fármaco puede ser bastante poco fidedigna con alta variabilidad entre pacientes. La producción de tales polímeros puede dañar el principio activo sensible o puede experimentar reacciones secundarias con el polímero durante su degradación (D.H. Lee y col., J. Contr. Rel., 2003, 92, 291-299).

La PEGilación permanente de péptidos o proteínas para potenciar su solubilidad, reducir la inmunogenicidad y aumentar la semivida reduciendo la eliminación renal es un concepto muy conocido ya desde principios de los años 80 (Caliceti P., Veronese F.M., Adv. Drug Deliv. Rev, 2003, 55, 1261-1277). Para varios fármacos esto se ha usado con éxito, pero con muchos ejemplos la PEGilación reduce la eficacia del principio activo a un grado al que este concepto ya no es adecuado (T. Peleg-Shulman y col., J. Med. Chem., 2004, 47, 4897-4904).

Una alternativa adecuada son profármacos basados en polímeros. Las actuales definiciones para profármacos por la IUPAC establecen los siguientes términos (International Union of Pure and Applied Chemistry and International Union of Biochemistry: GLOSSARY OF TERMS USED IN MEDICINAL CHEMISTRY (Recommendations 1998); en Pure & Appl. Chem. Vol 70, nº 5, 1998, pág. 1129-1143):

Profármaco: Un profármaco es cualquier compuesto que experimenta biotransformación antes de presentar sus efectos farmacológicos. Los profármacos pueden así visualizarse como fármacos que contienen grupos protectores no tóxicos especializados usados de una manera transitoria para alterar o para eliminar propiedades no deseables en la molécula parental.

Profármaco enlazado a vehículo (profármaco-vehículo): Un profármaco enlazado a vehículo es un profármaco que contiene un enlace temporal de un principio activo dado con un grupo de vehículo transitorio que produce propiedades fisicoquímicas o farmacocinéticas mejoradas y que pueden eliminarse fácilmente *in vivo*, normalmente por una escisión hidrolítica.

Profármaco en cascada: Un profármaco en cascada es un profármaco para el que la escisión del grupo de vehículo se vuelve eficaz solo después del desenmascaramiento de un grupo activante.

Existen varios ejemplos de profármacos de vehículo basados en PEG, la mayoría de ellos con la necesidad de activación enzimática del ligador entre el fármaco activo y el vehículo, principalmente iniciada por hidrólisis enzimática. Como los ésteres se escinden muy fácilmente e impredeciblemente *in vivo*, los ligadores de éster directos para profármaco de vehículo tienen limitaciones a su capacidad de uso (J. Rautio y col., Nature Reviews Drug Discovery, 2008, 7 255-270).

Enfoques alternativos comúnmente usados son ligadores en cascada unidos a una funcionalidad amina en el péptido o proteína. En los ligadores en cascada un grupo de enmascaramiento tiene que eliminarse como etapa limitante de la velocidad en la cascada. Esto activa el ligador para descomponerse en una segunda posición para liberar el péptido o proteína. Comúnmente el grupo de enmascaramiento puede eliminarse por un mecanismo enzimático (R. B. Greenwald y col. en el documento WO2002/089789, Greenwald y col., J. Med. Chem. 1999, 42, 3657-3667, F.M.H. DeGroot y col. en los documentos WO2002/083180 y WO2004/043493, y D. Shabat y col. en el documento WO2004/019993).

Una alternativa que no se basa en la activación enzimática es el concepto de U. Hersel y col. en el documento WO2005/099768. En su enfoque el grupo de enmascaramiento sobre un fenol se elimina en un modo puramente dependiente del pH por el ataque de un nucleófilo interno. Esto activa el ligador para la descomposición adicional.

Como se ha mencionado por U. Hersel y col. en el documento WO2005/099768, "La desventaja en el sistema de profármacos anteriormente mencionado descrito por Greenwald, DeGroot y Shabat es la liberación de productos secundarios de molécula pequeña aromáticos potencialmente tóxicos como metidas de quinona después de la escisión del enlace temporal. Las entidades potencialmente tóxicas son liberadas en una estequiometría 1:1 con el fármaco y pueden asumir altas concentraciones *in vivo*". También se mantiene el mismo problema para el sistema por Hersel y col.

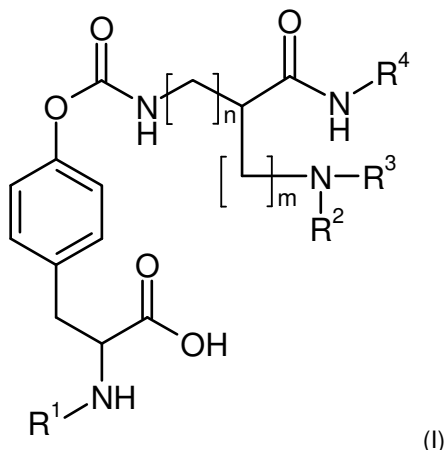
Para moléculas orgánicas pequeñas existe una plétora de diferentes enfoques de profármacos (J. Rautio y col., Nature Reviews Drug discovery, 2008, 7 255-270). El enfoque usado por U. Hersel y col. como mecanismo de liberación para su grupo de enmascaramiento se ha usado como enfoque de profármaco para grupos fenólicos de moléculas pequeñas desde finales de los 80 (W.S. Saari en el documento EP 0296 811 y W.S. Saari y col., J. Med. Chem. 1990, vol. 33, nº 1, pág. 97-101).

Los sistemas de profármacos basados en aminos alternativos se basan en la lenta hidrólisis de bis-hidroxiethylglicina como profármaco en cascada. Los grupos hidroxilo de la bis-hidroxiethylglicina están enmascarados por ésteres que tienen tendencia a hidrólisis por esterasas (R. Greenwald y col., J. Med. Chem. 2004, 47, 726-734 y D. Vetter y col. en el documento WO 2006/136586).

- 10 A diferencia de los enfoques de profármaco enumerados anteriormente, que se basan todos en funcionalidades de amina de enmascaramiento, la presente invención se basa en enmascarar el grupo fenólico de una tirosina en péptidos o proteínas. Se usa un profármaco enlazado a vehículo, basándose en la escisión asistida por nucleófilo interno de un carbamato sobre ese grupo fenólico. La ventaja clave con respecto a otras clases de profármacos mencionadas anteriormente es la inocuidad toxicológica del producto de descomposición del ligador, una urea cíclica permanentemente unida al vehículo. Además, la descomposición del profármaco no depende de mecanismos enzimáticos que podrían producir una alta variabilidad entre pacientes de la escisión cinética. El mecanismo de escisión es únicamente dependiente del pH ya que una amina interna que está protonada a pH ácido se activa a mayor pH (neutro) para actuar de nucleófilo que ataca el carbamato fenólico basado en la tirosina.

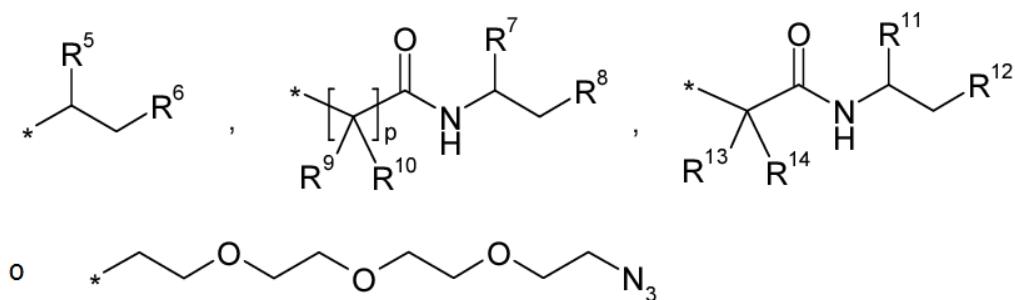
- 20 En el contexto de la presente invención, los compuestos que ahora se describen engloban entidades moleculares basadas en el aminoácido tirosina que permiten la construcción de dichos profármacos de ligador de vehículo de cualquier péptido o proteína que contiene al menos una tirosina.

La presente invención proporciona compuestos de fórmula



en la que

- 25 n representa el número 0, 1, 2, 3 o 4,  
 m representa el número 0, 1, 2, 3 o 4,  
 en la que m y n son juntos el número 1, 2, 3, 4, 5 o 6,  
 R<sup>1</sup> representa terc-butiloxycarbonilo o (9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonilo,  
 R<sup>2</sup> representa terc-butiloxycarbonilo,  
 30 R<sup>3</sup> representa hidrógeno, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo o bencilo,  
 R<sup>4</sup> representa un grupo de fórmula

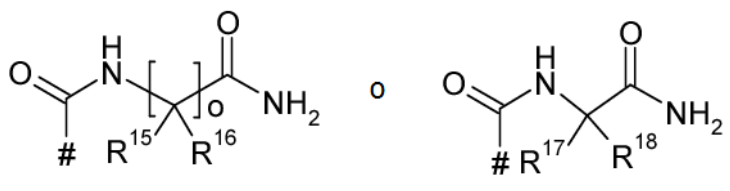


en las que

\* es el punto de unión al nitrógeno,

p representa el número 1, 2, 3, 4 o 5,

5 R<sup>5</sup> representa hidrógeno, aminocarbonilo, alquil (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-aminocarbonilo, fenilaminocarbonilo o un grupo de fórmula



en las que

# es el punto de unión al átomo de carbono,

10 o representa el número 1, 2, 3, 4 o 5,

R<sup>15</sup> representa hidrógeno o alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>),

R<sup>16</sup> representa hidrógeno o alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>),

R<sup>17</sup> representa el grupo lateral de un α-aminoácido natural o sus homólogos o isómeros,

y

15 R<sup>18</sup> representa hidrógeno o metilo,

R<sup>6</sup> representa -S-tritilo, tiolilo, azidilo, acetilenilo, hidroxicarbonilo o amina,

R<sup>7</sup> representa hidrógeno o aminocarbonilo,

R<sup>8</sup> representa -S-tritilo, tiolilo, azidilo, acetilenilo, hidroxicarbonilo o amina,

R<sup>9</sup> representa hidrógeno o alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>),

20 R<sup>10</sup> representa hidrógeno o alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>),

R<sup>11</sup> representa hidrógeno o aminocarbonilo,

R<sup>12</sup> representa -S-tritilo, tiolilo, azidilo, acetilenilo, hidroxicarbonilo o amina,

R<sup>13</sup> representa el grupo lateral de un α-aminoácido natural o sus homólogos o isómeros,

y

25 R<sup>14</sup> representa hidrógeno o metilo,

y sales de los mismos, solvatos de los mismos y los solvatos de sales de los mismos.

Los compuestos según la invención son los compuestos de fórmula (I) y las sales de los mismos, solvatos de los mismos y solvatos de las sales de los mismos, los compuestos que están englobados por la fórmula (I) y son de las fórmulas especificadas más adelante y las sales de los mismos, solvatos de los mismos y solvatos de las sales de los mismos, y los compuestos que están englobados por la fórmula (I) y se especifican más adelante como ejemplos de trabajo y sales de los mismos, solvatos de los mismos y solvatos de las sales de los mismos, si los compuestos que están englobados por la fórmula (I) y se especifican más adelante no son ya sales, solvatos y solvatos de las sales.

Dependiendo de su estructura, los compuestos según la invención pueden existir en formas estereoisoméricas (enantiómeros, diaestereómeros). Por tanto, la invención engloba los enantiómeros o diaestereómeros y las mezclas particulares de los mismos. Los constituyentes estereoisoméricamente homogéneos pueden aislarse de una manera conocida de tales mezclas de enantiómeros y/o diaestereómeros.

Cuando los compuestos según la invención pueden producirse en formas tautómeras, la presente invención engloba todas las formas tautómeras.

En el contexto de la presente invención, sales preferidas son sales fisiológicamente aceptables de los compuestos según la invención. También están incluidas sales que no son adecuadas por sí mismas para aplicaciones farmacéuticas pero, por ejemplo, pueden usarse para el aislamiento o purificación de los compuestos según la invención.

Las sales fisiológicamente aceptables de los compuestos según la invención incluyen sales de adición de ácido de ácidos minerales, ácidos carboxílicos y ácido sulfónicos, por ejemplo, sales de ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido toluenosulfónico, ácido benzenosulfónico, ácido naftalenodisulfónico, ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido propiónico, ácido láctico, ácido tartárico, ácido maleico, ácido cítrico, ácido fumárico, ácido maleico y ácido benzoico.

Sales fisiológicamente aceptables de los compuestos según la invención también incluyen sales de bases usuales, por ejemplo y con preferencia sales de metales alcalinos (por ejemplo, sales de sodio y potasio), sales de metales alcalinotérreos (por ejemplo, sales de calcio y magnesio) y sales de amonio derivadas de amoníaco o aminas orgánicas que tienen 1 a 16 átomos de carbono, por ejemplo y con preferencia etilamina, dietilamina, trietilamina, etildiisopropilamina, monoetanolamina, dietanolamina, trietanolamina, dicitclohexilamina, dimetilaminoetanol, procaína, dibencilamina, *N*-metilmorfolina, arginina, lisina, etilendiamina y *N*-metilpiperidina.

En el contexto de la invención, solvatos se refiere a aquellas formas de los compuestos según la invención que, en el estado sólido o líquido, forman un complejo por coordinación con moléculas de disolvente. Los hidratos son una forma específica de los solvatos, en los que la coordinación es con agua. Solvatos preferidos en el contexto de la presente invención son hidratos.

En el contexto de la presente invención, los sustituyentes tienen el siguiente significado, a menos que se especifique de otro modo:

Alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) son en el contexto de la invención un radical alquilo de cadena lineal o ramificado que tiene respectivamente 1 a 4 átomos de carbono. Ejemplos que pueden mencionarse preferentemente son: metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, iso-butilo, sec-butilo, terc-butilo.

Alquil (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-aminocarbonilo en el contexto de la invención representa un grupo aminocarbonilo con un sustituyente alquilo de cadena lineal o ramificado que contiene 1 a 4 átomos de carbono. Ejemplos que pueden mencionarse preferentemente son: metilaminocarbonilo, etilaminocarbonilo, n-propilaminocarbonilo, isopropilaminocarbonilo, n-butilaminocarbonilo, iso-butilaminocarbonilo, sec-butilaminocarbonilo, terc-butilaminocarbonilo.

El grupo lateral de un  $\alpha$ -aminoácido en el significado de R<sup>13</sup> y R<sup>17</sup> engloba tanto los grupos laterales de  $\alpha$ -aminoácidos que se producen naturalmente como los grupos laterales de homólogos e isómeros de estos  $\alpha$ -aminoácidos. El  $\alpha$ -aminoácido puede tener a este respecto tanto la configuración L como la D o incluso ser una mezcla de la forma L y la forma D. Ejemplos de grupos laterales que pueden mencionarse son: hidrógeno (glicina), metilo (alanina), propan-2-ilo (valina), propan-1-ilo (norvalina), 2-metilpropan-1-ilo (leucina), 1-metilpropan-1-ilo (isoleucina), butan-1-ilo (norleucina), fenilo (2-fenilglicina), bencilo (fenilalanina), p-hidroxibencilo (tirosina), indol-3-ilmetilo (triptófano), imidazol-4-ilmetilo (histidina), hidroximetilo (serina), 2-hidroxietilo (homoserina), 1-hidroxietilo (treonina), mercaptometilo (cisteína), metiltiommetilo (*S*-metilcisteína), 2-mercaptoetilo (homocisteína), 2-metiltioetilo (metionina), carbamoilmetilo (asparagina), 2-carbamoiletilo (glutamina), carboximetilo (ácido aspártico), 2-carboxietilo (ácido glutámico), 4-aminobutan-1-ilo (lisina), 4-amino-3-hidroxibutan-1-ilo (hidroxilisina), 3-aminopropan-1-ilo (ornitina), 3-guanidinopropan-1-ilo (arginina), 3-ureidopropan-1-ilo (citrulina). Grupos laterales de  $\alpha$ -aminoácidos preferidos en el significado de R<sup>2</sup> son hidrógeno (glicina), metilo (alanina), propan-2-ilo (valina), propan-1-ilo (norvalina), imidazol-4-ilmetilo (histidina), hidroximetilo (serina), 1-hidroxietilo (treonina), carbamoilmetilo (asparagina), 2-carbamoiletilo (glutamina), 4-aminobutan-1-ilo (lisina), 3-aminopropan-1-ilo (ornitina), 3-guanidinopropan-1-ilo (arginina). La configuración L se prefiere en cada caso.

En el contexto de la invención, modificador significa otras entidades moleculares, por ejemplo, polietilenglicol.

En las fórmulas del grupo que pueden representar  $R^4$ , el punto final de la línea que está marcado por un \* no es un átomo de carbono o un grupo  $CH_2$ , sino que es parte del enlace con el átomo al que  $R^4$  está unido.

En las fórmulas del grupo que pueden representar  $R^5$ , el punto final de la línea que está marcado por una # no es un átomo de carbono o un grupo  $CH_2$ , sino que es parte del enlace con el átomo al que  $R^5$  está unido.

5 Se da preferencia a compuestos de fórmula (I) en la que

n representa el número 0, 1, 2 o 3,

m representa el número 0, 1, 2 o 3,

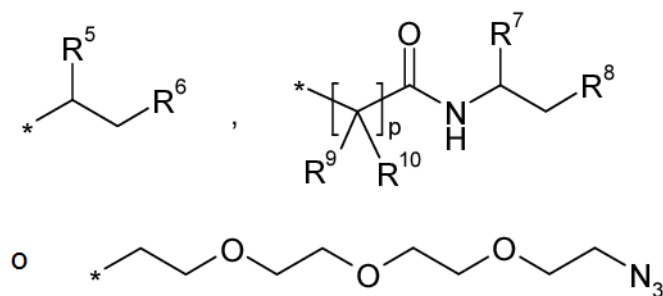
en la que m y n son juntos el número 1, 2, 3 o 4,

$R^1$  representa terc-butiloxicarbonilo o (9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonilo,

10  $R^2$  representa terc-butiloxicarbonilo,

$R^3$  representa hidrógeno, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo o bencilo,

$R^4$  representa un grupo de fórmula



en las que

15 \* es el punto de unión al nitrógeno,

p representa el número 1, 2, 3, 4 o 5,

$R^5$  representa hidrógeno, aminocarbonilo o  $-(C=O)NHCH_2(C=O)NH_2$ ,

$R^6$  representa -S-tritilo,

$R^7$  representa hidrógeno o aminocarbonilo,

20  $R^8$  representa -S-tritilo,

$R^9$  representa hidrógeno,

y

$R^{10}$  representa hidrógeno.

También se da preferencia a compuestos de fórmula (I) en la que

25 n representa el número 2 o 3,

y

m representa el número 0,

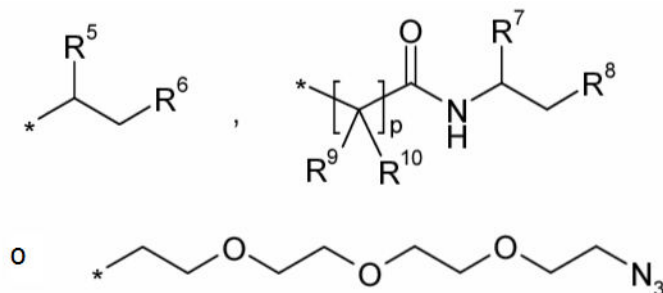
o

n representa el número 0,

30 y

m representa el número 2 o 3,

- $R^1$  representa terc-butiloxicarbonilo o (9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonilo,  
 $R^2$  representa terc-butiloxicarbonilo,  
 $R^3$  representa hidrógeno, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo o bencilo,  
 $R^4$  representa un grupo de fórmula



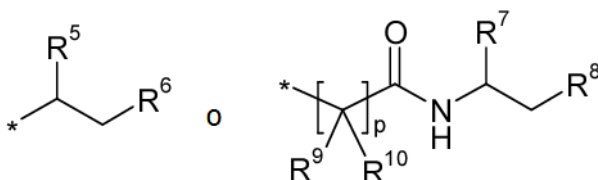
5

en las que

- \* es el punto de unión al nitrógeno,  
 $p$  representa el número 1, 2, 3, 4 o 5,  
 $R^5$  representa hidrógeno, aminocarbonilo o  $-(C=O)NHCH_2(C=O)NH_2$ ,  
 $R^6$  representa  $-S$ -trilito,  
 $R^7$  representa hidrógeno o aminocarbonilo,  
 $R^8$  representa  $-S$ -trilito,  
 $R^9$  representa hidrógeno,  
 $y$   
 $R^{10}$  representa hidrógeno.

También se da preferencia a compuestos de fórmula (I) en la que

- $n$  representa el número 2 o 3,  
 $m$  representa el número 0,  
 $R^1$  representa terc-butiloxicarbonilo o (9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonilo,  
 $R^2$  representa terc-butiloxicarbonilo,  
 $R^3$  representa hidrógeno o metilo,  
 $R^4$  representa un grupo de fórmula



en las que

- \* es el punto de unión al nitrógeno,  
 $p$  representa el número 1 o 5,  
 $R^5$  representa hidrógeno, aminocarbonilo o  $-(C=O)NHCH_2(C=O)NH_2$ ,

- $R^6$  representa –S-tritilo,  
 $R^7$  representa hidrógeno o aminocarbonilo,  
 $R^8$  representa –S-tritilo,  
 $R^9$  representa hidrógeno,

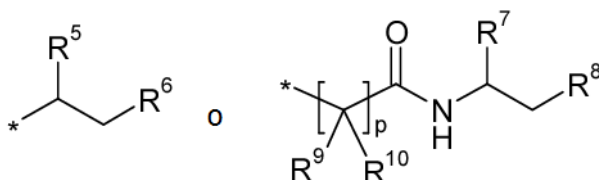
5 y

- $R^{10}$  representa hidrógeno.

También se da preferencia a compuestos de fórmula (I) en la que

- n representa el número 0,  
m representa el número 2 o 3,

- 10  $R^1$  representa terc-butiloxicarbonilo o (9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonilo,  
 $R^2$  representa terc-butiloxicarbonilo,  
 $R^3$  representa hidrógeno o metilo,  
 $R^4$  representa un grupo de fórmula



15 en las que

- \* es el punto de unión al nitrógeno,  
p representa el número 1 o 5,  
 $R^5$  representa hidrógeno, aminocarbonilo o  $-(C=O)NHCH_2(C=O)NH_2$ ,  
 $R^6$  representa –S-tritilo,

- 20  $R^7$  representa hidrógeno o aminocarbonilo,  
 $R^8$  representa –S-tritilo,  
 $R^9$  representa hidrógeno,

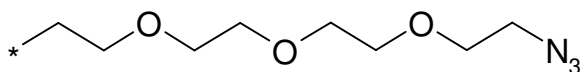
y

- $R^{10}$  representa hidrógeno.

25 También se da preferencia a compuestos de fórmula (I) en la que

- n representa el número 2 o 3,  
m representa el número 0,  
 $R^1$  representa terc-butiloxicarbonilo o (9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonilo,  
 $R^2$  representa terc-butiloxicarbonilo,

- 30  $R^3$  representa hidrógeno o metilo,  
 $R^4$  representa un grupo de fórmula



en la que

\* es el punto de unión al nitrógeno.

También se da preferencia a compuestos de fórmula (I) en la que

n representa el número 0, 1, 2 o 3,

5 m representa el número 0, 1, 2 o 3,

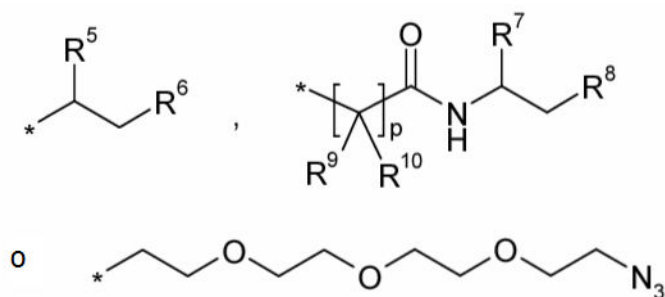
en la que m y n son juntos el número 1, 2, 3 o 4,

R<sup>1</sup> representa terc-butiloxycarbonilo o (9H-fluoren-9-ilmetoxy)carbonilo,

R<sup>2</sup> representa terc-butiloxycarbonilo,

R<sup>3</sup> representa hidrógeno, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo o bencilo,

10 R<sup>4</sup> representa un grupo de fórmula



en las que

\* es el punto de unión al nitrógeno,

p representa el número 1, 2, 3, 4 o 5,

15 R<sup>5</sup> representa hidrógeno, aminocarbonilo, fenilaminocarbonilo o -(C=O)NHCH<sub>2</sub>(C=O)NH<sub>2</sub>,

R<sup>6</sup> representa -S-tritilo,

R<sup>7</sup> representa hidrógeno o aminocarbonilo,

R<sup>8</sup> representa -S-tritilo,

R<sup>9</sup> representa hidrógeno,

20 y

R<sup>10</sup> representa hidrógeno.

También se da preferencia a compuestos de fórmula (I) en la que

n representa el número 2 o 3, y

m representa el número 0,

25 o

n representa el número 0,

y

m representa el número 2 o 3,

o

30 n representa el número 0,

y

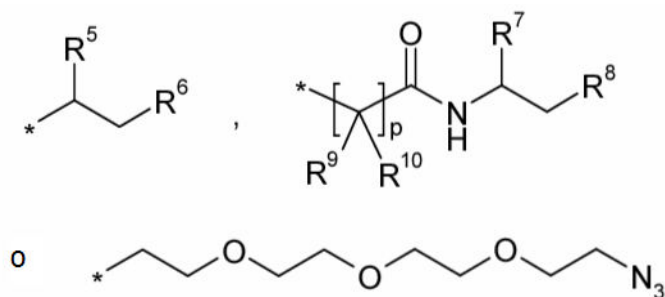
m representa el número 1,

R<sup>1</sup> representa terc-butiloxycarbonilo o (9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonilo,

R<sup>2</sup> representa terc-butiloxycarbonilo,

5 R<sup>3</sup> representa hidrógeno, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo o bencilo,

R<sup>4</sup> representa un grupo de fórmula



en las que

\* es el punto de unión al nitrógeno,

10 p representa el número 1, 2, 3, 4 o 5,

R<sup>5</sup> representa hidrógeno, aminocarbonilo, fenilaminocarbonilo o -(C=O)NHCH<sub>2</sub>(C=O)NH<sub>2</sub>,

R<sup>6</sup> representa -S-tritilo,

R<sup>7</sup> representa hidrógeno o aminocarbonilo,

R<sup>8</sup> representa -S-tritilo,

15 R<sup>9</sup> representa hidrógeno,

y

R<sup>10</sup> representa hidrógeno.

También se da preferencia a compuestos de fórmula (I) en la que

n representa el número 2 o 3,

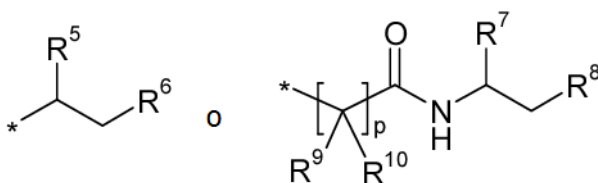
20 m representa el número 0,

R<sup>1</sup> representa terc-butiloxycarbonilo o (9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonilo,

R<sup>2</sup> representa terc-butiloxycarbonilo,

R<sup>3</sup> representa hidrógeno o metilo,

R<sup>4</sup> representa un grupo de fórmula



25

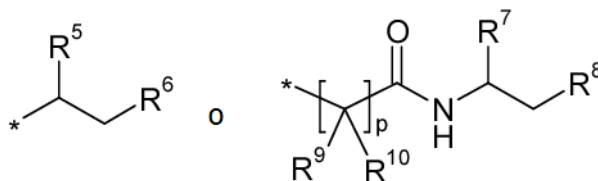
en la que

\* es el punto de unión al nitrógeno,

- p representa el número 1 o 5,  
 $R^5$  representa hidrógeno, aminocarbonilo, fenilaminocarbonilo o  $-(C=O)NHCH_2(C=O)NH_2$ ,  
 $R^6$  representa  $-S$ -trilito,  
 $R^7$  representa hidrógeno o aminocarbonilo,  
5  $R^8$  representa  $-S$ -trilito,  
 $R^9$  representa hidrógeno,  
y  
 $R^{10}$  representa hidrógeno.

También se da preferencia a compuestos de fórmula (I) en la que

- 10 n representa el número 0,  
m representa el número 2 o 3,  
 $R^1$  representa terc-butiloxicarbonilo o (9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonilo,  
 $R^2$  representa terc-butiloxicarbonilo,  
 $R^3$  representa hidrógeno o metilo,  
15  $R^4$  representa un grupo de fórmula

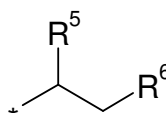


en la que

- \* es el punto de unión al nitrógeno,  
p representa el número 1 o 5,  
20  $R^5$  representa hidrógeno, aminocarbonilo, fenilaminocarbonilo o  $-(C=O)NHCH_2(C=O)NH_2$ ,  
 $R^6$  representa  $-S$ -trilito,  
 $R^7$  representa hidrógeno o aminocarbonilo,  
 $R^8$  representa  $-S$ -trilito,  
 $R^9$  representa hidrógeno,  
25 y  
 $R^{10}$  representa hidrógeno.

También se da preferencia a compuestos de fórmula (I) en la que

- n representa el número 0,  
m representa el número 1,  
30  $R^1$  representa terc-butiloxicarbonilo o (9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonilo,  
 $R^2$  representa terc-butiloxicarbonilo,  
 $R^3$  representa hidrógeno o metilo,  
 $R^4$  representa un grupo de fórmula



en la que

\* es el punto de unión al nitrógeno,

$R^5$  representa hidrógeno, aminocarbonilo, fenilaminocarbonilo o  $-(C=O)NHCH_2(C=O)NH_2$ ,

5 y

$R^6$  representa  $-S$ -trilito.

También se da preferencia a compuestos de fórmula (I) en la que  $n$  representa el número 2 o 3 y  $m$  representa el número 0.

10 También se da preferencia a compuestos de fórmula (I) en la que  $n$  representa el número 2 y  $m$  representa el número 0.

También se da preferencia a compuestos de fórmula (I) en la que  $n$  representa el número 3 y  $m$  representa el número 0.

También se da preferencia a compuestos de fórmula (I) en la que  $n$  representa el número 0 y  $m$  representa el número 2 o 3.

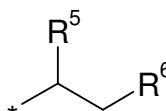
15 También se da preferencia a compuestos de fórmula (I) en la que  $n$  representa el número 0 y  $m$  representa el número 1.

También se da preferencia a compuestos de fórmula (I) en la que  $R^1$  representa terc-butiloxi-carbonilo.

También se da preferencia a compuestos de fórmula (I) en la que  $R^3$  representa hidrógeno o metilo.

También se da preferencia a compuestos de fórmula (I) en la que

20  $R^4$  representa un grupo de fórmula



en la que

\* es el punto de unión al nitrógeno,

$R^5$  representa aminocarbonilo,

25 y

$R^6$  representa  $-S$ -trilito.

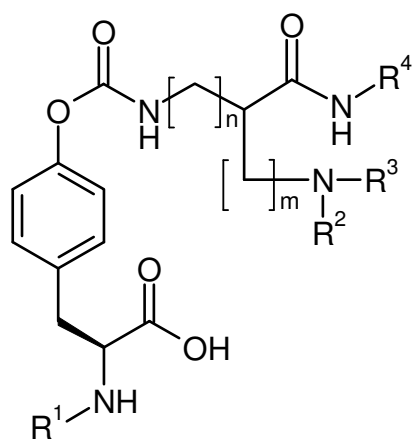
También se da preferencia a compuestos de fórmula (I) en la que  $R^6$  representa  $-S$ -trilito.

También se da preferencia a compuestos de fórmula (I) en la que  $R^8$  representa  $-S$ -trilito.

30 También se da preferencia a compuestos de fórmula (I) en la que  $R^9$  representa hidrógeno y  $R^{10}$  representa hidrógeno.

También se da preferencia a compuestos de fórmula (I) en la que el átomo de carbono al que el sustituyente  $-NHR^1$  está unido tiene configuración  $S$ .

También se da preferencia a compuestos de fórmula (I) que tienen la estructura de fórmula (Ia)

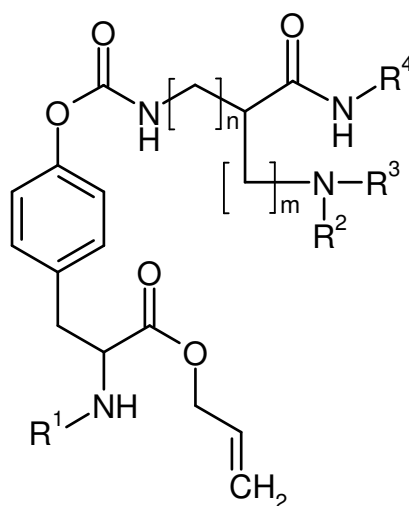


(Ia).

Las definiciones de radicales específicas facilitadas en las combinaciones particulares o combinaciones preferidas de radicales también se sustituyen, independientemente de la combinación particular del radical especificado, con cualquier definición de radical de otras combinaciones.

- 5 Se da preferencia muy particular a combinaciones de dos o más de los intervalos preferidos anteriormente mencionados.

La invención proporciona además un procedimiento para preparar los compuestos de fórmula (I), o sales de los mismos, solvatos de los mismos o los solvatos de sales de los mismos, en el que los compuestos de fórmula (II)



(II),

- 10 en la que

$n$ ,  $m$ ,  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  y  $R^4$  son cada uno como se han definido anteriormente,

se hacen reaccionar con una fuente de paladio (0) y un agente reductor.

La reacción se efectúa generalmente en disolventes inertes, opcionalmente en presencia de una base débil, preferentemente en un intervalo de temperatura de 0 °C a 50 °C a presión estándar.

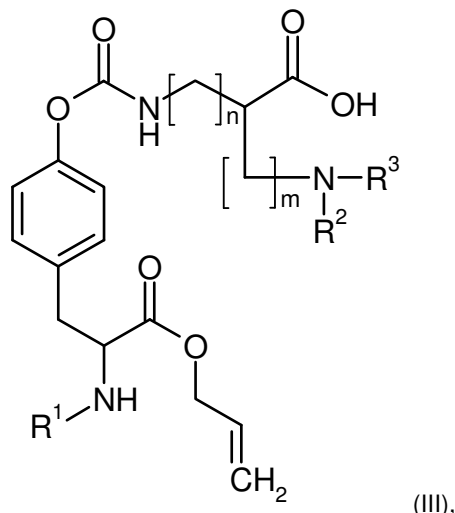
- 15 Los disolventes inertes son, por ejemplo, halohidrocarburos tales como diclorometano, triclorometano o 1,2-dicloroetano, éteres tales como dioxano, tetrahydrofurano o 1,2-dimetoxietano, u otros disolventes tales como acetona, dimetilformamida, dimetilacetamida, 2-butanona o acetonitrilo. Es igualmente posible usar mezclas de los disolventes. Se da preferencia a tetrahydrofurano.

- 20 Las fuentes de paladio (0) son, por ejemplo, tetraquis(trifenilfosfina)paladio (0), tris(dibencilidenacetona)dipaladio (0) o fuentes de paladio (II) que se reducen *in situ* a paladio (0) durante la reacción, dándose preferencia a tetraquis(trifenilfosfina)paladio (0).

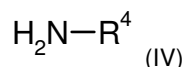
Los agentes reductores son, por ejemplo, ácido fórmico o trietilsilano, dándose preferencia a ácido fórmico.

Las bases son, por ejemplo, trietilamina, N,N-diisopropiletilamina o solución de fosfato de potasio, dándose preferencia a trietilamina.

Los compuestos de fórmula (II) son conocidos o pueden prepararse haciendo reaccionar compuestos de fórmula (III)



- 5 en la que  
n, m,  $R^1$ ,  $R^2$  y  $R^3$  son cada uno como se han definido anteriormente,  
con compuestos de fórmula (IV)



en la que

- 10  $R^4$  son como se han definido anteriormente.

La reacción se efectúa generalmente en disolventes inertes, en presencia de un reactivo deshidratante, opcionalmente en presencia de una base, preferentemente en un intervalo de temperatura de temperatura ambiente a 70 °C a presión estándar.

- 15 Los disolventes inertes son, por ejemplo, halohidrocarburos tales como diclorometano, triclorometano o 1,2-dicloroetano, éteres tales como dioxano, tetrahidrofurano o 1,2-dimetoxietano, u otros disolventes tales como acetona, dimetilformamida, dimetilacetamida, 2-butanona o acetonitrilo. Es igualmente posible usar mezclas de los disolventes. Se da preferencia a diclorometano.

- 20 Reactivos deshidratantes adecuados en este contexto son, por ejemplo, carbodiimidas, por ejemplo, *N,N'*-dietil-, *N,N'*-dipropil-, *N,N'*-diisopropil-, *N,N'*-d ciclohexilcarbodiimida, clorhidrato de *N*-(3-dimetilaminoisopropil)-*N'*-etilcarbodiimida (EDC), *N*-ciclohexilcarbodiimida-*N'*-propiloximetilpoliestireno (PS-carbodiimida), o compuestos de carbonilo tales como carbonildiimidazol, o compuestos de 1,2-oxazolio tales como 3-sulfato de 2-etil-5-fenil-1,2-oxazolio o perclorato de 2-terc-butil-5-metilisoxazolio, o compuestos de acilamino tales como 2-etoxi-1-etoxicarbonil-1,2-dihidroquinolina, o anhídrido propanofosfónico, o cloroformiato de isobutilo, o cloruro de bis-(2-oxo-3-oxazolidinil)fosforilo o hexafluorofosfato de benzotriazoliloxitri(dimetilamino)fosfonio, o hexafluorofosfato de *O*-(benzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio (HBTU), tetrafluoroborato de benzotriazol-1-il-*N*-tetrametiluronio (TBTU), tetrafluoroborato de 2-(2-oxo-1-(2H)-piridil)-1,1,3,3-tetrametiluronio (TPTU) o hexafluorofosfato de *O*-(7-azabenzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio (HATU), o 1-hidroxibenzotriazol (HOBt), o hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitris(dimetilamino)fosfonio (BOP), o hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitris(pirrolidino)fosfonio (PYBOP), o *N*-hidroxisuccinimida, o mezclas de estos con bases.

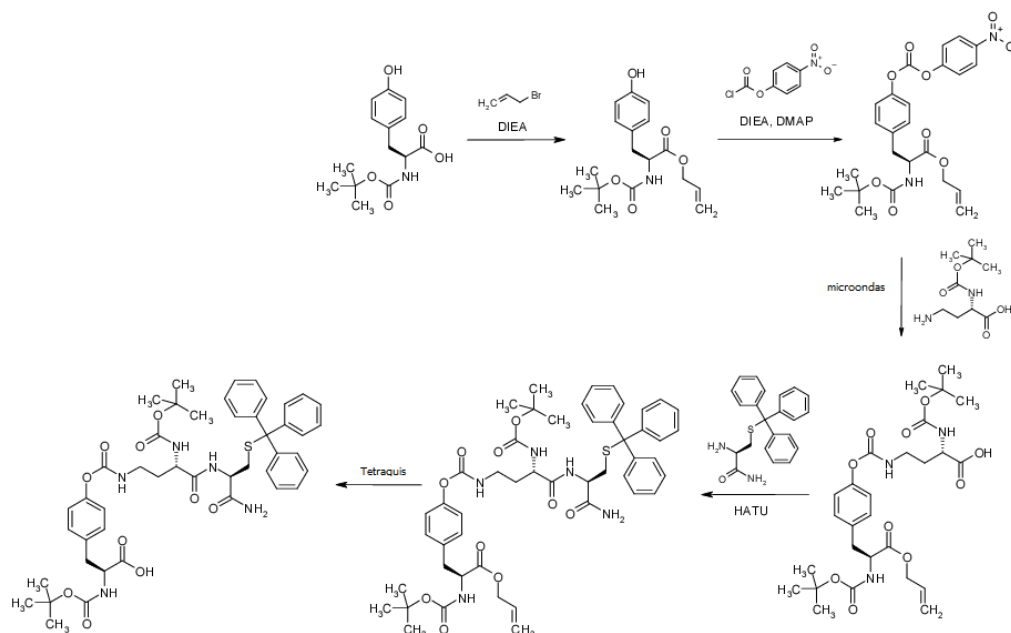
- 30 Las bases son, por ejemplo, carbonatos de metal alcalino, por ejemplo, carbonato sódico o carbonato de potasio, o hidrogenocarbonato de sodio o hidrogenocarbonato de potasio, o bases orgánicas tales como trialkilaminas, por ejemplo, trietilamina, *N*-metilmorfolina, *N*-metilpiperidina, 4-dimetilaminopiridina o *N,N*-diisopropiletilamina, dándose preferencia a *N,N*-diisopropiletilamina.

Preferentemente, la condensación se lleva a cabo con HATU en presencia de *N,N*-diisopropiletilamina.

Los compuestos de fórmula (III) y (IV) son conocidos o pueden sintetizarse por procedimientos conocidos a partir de los compuestos de partida apropiados.

La preparación de los compuestos según la invención puede ilustrarse por el siguiente esquema de síntesis:

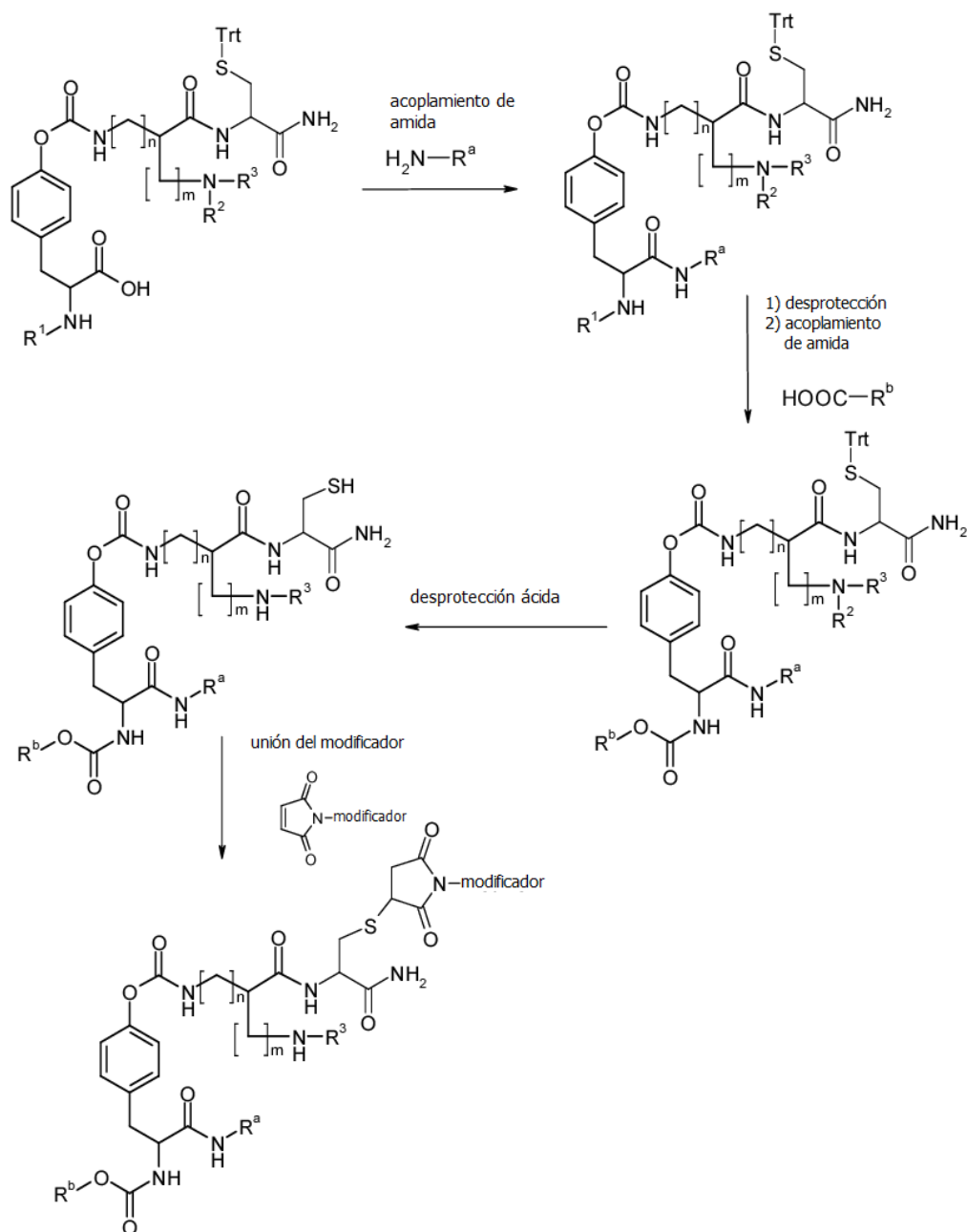
Esquema 1



Los compuestos según la invención pueden usarse como conexión desprendible de péptidos o proteínas con otras entidades moleculares, por ejemplo, polietilenglicol u otros modificadores, para formar un profármaco de dichos péptidos o proteínas.

El principio activo de estos derivados de tirosina es un carbamato entre el grupo OH fenólico de una tirosina en una secuencia de péptidos o de proteínas y una funcionalidad amina de un diaminoácido. La segunda amina del diaminoácido está protonada en condiciones ácidas. Pero a condiciones neutras o básicas actúa de nucleófilo que ataca el carbamato. Esto conduce a la formación de una urea cíclica y liberación de la tirosina sin modificar. La funcionalidad ácido del diaminoácido se usa como punto de unión para un modificador. Pueden preverse muchos enfoques diferentes para unir un modificador en esta funcionalidad. Una metodología común para unir modificadores tales como polietilenglicol a un péptido es haciendo reaccionar PEG-maleimidas con residuos de cisteína u otros tioles. Por tanto, una forma directa para conseguir la tarea deseada es la unión de un residuo de cisteína mediante su funcionalidad amina al grupo carboxi del diaminoácido. El extremo carboxi de la cisteína podría ser, por ejemplo, una amida primaria, pero también son posibles muchas otras modificaciones sobre su extremo C. Entre el diaminoácido y la cisteína o cualquier otra funcionalidad tiol, en la que se prevé fácilmente que una plétora de grupos espaciadores sería adecuada sin cambiar el carácter de este concepto de enlace, ya que toda esta construcción molecular sigue entre la urea cíclica formada a partir del diaminoácido sobre un extremo y el modificador sobre el otro extremo. El péptido o proteína liberado no está cambiado de ningún modo. También la química para unir modificadores al ligador no se limita a la reacción de una funcionalidad tiol con una maleimida. Otros procedimientos muy conocidos para enlazar modificadores tales como PEG a un tiol son igualmente adecuados. También son alternativas muchas otras metodologías de enlace sin tiol tales como química "clic" o formaciones de enlaces sencillos de amida a un modificador funcionalizado con amina. El Esquema 2 muestra una unión de ejemplo de un modificador a un péptido que incorpora el derivado de aminoácido basado en tirosina.

Esquema 2



Los péptidos o proteínas son liberados de dicho profármaco en una manera dependiente del pH. Los profármacos son estables a aproximadamente pH 4, pero liberan el fármaco activo a pH fisiológico. Después de la liberación del péptido o proteína del profármaco todo lo que queda en el péptido o proteína es una tirosina no modificada en el primer punto de unión del ligador. Por lo tanto, todos los péptidos o proteínas que contienen al menos una tirosina son potencialmente susceptibles a tal modificación.

La escisión dependiente del pH del profármaco para liberar el péptido o proteína ayuda a diseñar una degradación controlada de tal profármaco con cinética de fármaco predecible.

Los compuestos según la invención pueden incorporarse en un péptido o proteína según protocolos de síntesis de péptidos en disolución, además de en fase sólida.

Proteínas y péptidos adecuados que contienen al menos un aminoácido de tirosina son, pero no se limitan a, adenosina desaminasa, adiponectina, hormona adrenocorticotrópica (ACTH), adrenomedulina (ADM), agalsidasa, albúmina, inhibidor de proteinasa alfa-1 (API), alfa-1 antitripsina b (AAT), alteplasa, serina ancrod, angiotensina, angiotensinógeno, angiotensina, anistreplasa, hormona antimulleriana, antitrombina III, antitripsinas, aprotinina,

asparaginasas, atriopeptina, bialina, bradiquina, calcitonina, colecistoquinina, coriogonadotropina, coriomamotropina, collagenasa, corticoliberina, corticotropina, DNasa, endorfinas, encefalinas, enoxacina, eritropoyetinas, factor II, factor IIa, factor IX, factor IXa, factor VII, factor VIIa, factor VIII, factor VIIIa, factor X, factor Xa, factor XI, factor XIa, fibrinolisisina, fibrinolisisina, foliberina, hormonas estimulantes del folículo, folitropina, Fsh, galactosidasa, gastrina, grelina, glucagón, péptidos similares al glucagón (GLP-1), glucocerebrosidasa, glutitocina f, gonadoliberina c, gonadotropina, hormona liberadora de gonadotropina, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), factores de crecimiento, hormona liberadora de hormonas del crecimiento, hormonas del crecimiento, hemoglobinas, vacunas para la hepatitis B, hirudina, gonadotropina coriónica humana, lactógeno placentario humano, hialuronidasas, idarubicina, idurnonidasa, inmunoglobulinas, vacunas contra la gripe, inhibina, insulinas, interferones, interleucinas, isotocina g, kalidina, factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), lactasa, leptina, leuprolida, levotiroxina, lipotropina, lisinopril, luliberina, hormona luteinizante, lutropina, hormona estimulante de melanocitos, melanoliberina, melanostatina, melanotropina, péptido natriurético, orexina, hormona liberadora de corticotropina, oxitocina, pancrelipasa, pancreozimina, papaína, hormona paratiroidea, pepsina, proteína activante de fosfolipasa (PLAP), factor activante de plaquetas-acetilhidrolasa (PAF-AH), proangiotensina, prolactina, prolactoliberina, prolactostatina, proteasas, proteína C, relaxina, secretina, senorelina, somatoliberina, somatomedina, somatropinas, estreptocinasa, sucrasa, superóxido dismutasa (SOD), trombopoyetina, timopoyetinano, timosina, hormona estimulante tiroidea, tiroliberina, tirotropina, hormona liberadora de tirotropina, tilactasa, activador tisular del plasminógeno (tPA), factor de necrosis tumoral (TNF), urato oxidasa, urogonadotropina k, urocinasa, vacunas, vasopresina, vasotocina,  $\alpha$ -1 antitripsina. También están incluidas versiones mutantes de péptidos o proteínas enumerados anteriormente o todas las otras proteínas preparadas por metodologías recombinantes tales como anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, proteínas de unión monocatenarias y proteínas de fusión. También están incluidos cualquier péptido sintético o proteínas con actividad biológica.

Los compuestos según la invención son adecuados para su uso para la preparación de profármacos que son adecuados para su uso como medicamentos para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades en seres humanos y animales.

Los compuestos según la invención son adecuados para su uso para la preparación de profármacos liberadores de adrenomedulina (ADM) específicos.

La presente invención proporciona además el uso de los compuestos según la invención para la preparación de profármacos para el tratamiento y/o la prevención de trastornos.

Los profármacos preparados con los compuestos según la invención pueden actuar sistémicamente y/o localmente. Para este fin, pueden administrarse de una forma adecuada, por ejemplo, por la vía parenteral, pulmonar, nasal, sublingual, lingual, bucal, dérmica, transdérmica, conjuntiva, óptica o como implante o prótesis endovascular.

Los profármacos preparados con los compuestos según la invención pueden administrarse en formas de administración adecuadas para estas vías de administración.

La administración parenteral puede tener lugar evitando una etapa de absorción (por ejemplo, intravenosa, intraarterial, intracardiaca, intraespinal o intralumbal) o con inclusión de una absorción (por ejemplo, intramuscular, subcutánea, intracutánea, percutánea o intraperitoneal). Las formas de administración adecuadas para administración parenteral incluyen preparaciones para inyección e infusión en forma de disoluciones, suspensiones, emulsiones, liofilizados o polvos estériles.

Para las otras vías de administración son adecuadas, por ejemplo, formas farmacéuticas para inhalación (que incluyen inhaladores de polvo, nebulizadores), gotas nasales, colirios, disoluciones o sprays; películas/obleas o suspensiones acuosas (lociones, mezclas para agitar), suspensiones lipófilas, pomadas, cremas, sistemas terapéuticos transdérmicos (por ejemplo, parches), leche, pastas, espumas, polvos para extender sobre la piel, implantes o prótesis endovasculares.

Se prefiere administración parenteral, especialmente administración intravenosa.

Los profármacos preparados con los compuestos según la invención pueden convertirse en las formas de administración establecidas. Esto puede tener lugar de un modo en sí conocido mezclando con excipientes farmacéuticamente adecuados no tóxicos inertes. Estos excipientes incluyen vehículos (por ejemplo, celulosa microcristalina, lactosa, manitol), disolventes (por ejemplo, polietilenglicoles líquidos), emulsionantes y dispersantes o humectantes (por ejemplo, dodecilsulfato de sodio, oleato de polioxisorbitano), aglutinantes (por ejemplo, polivinilpirrolidona), polímeros sintéticos y naturales (por ejemplo, albúmina), estabilizadores (por ejemplo, antioxidantes, por ejemplo, ácido ascórbico), colorantes (por ejemplo, pigmentos inorgánicos, por ejemplo, óxidos de hierro) y aromas y/u olores de enmascaramiento.

Se ha encontrado generalmente que es ventajoso, en el caso de administración parenteral, administrar cantidades de aproximadamente 0,001 a 5 mg/kg, preferentemente de aproximadamente 0,01 a 1 mg/kg, de peso corporal para lograr resultados eficaces.

5 Sin embargo, en algunos casos puede ser necesario desviarse de las cantidades establecidas, en particular en función del peso corporal, vía de administración, respuesta individual al principio activo, naturaleza de la preparación y tiempo o intervalo durante el que tiene lugar la administración. Por ejemplo, en algunos casos puede ser suficiente menos de la cantidad mínima anteriormente mencionada, mientras que en otros casos el límite superior establecido debe superarse. En el caso de la administración de cantidades mayores puede ser aconsejable dividir éstas en una pluralidad de dosis individuales durante el día.

Los siguientes ejemplos de trabajo ilustran la invención. La invención no se limita a los ejemplos.

10 Los porcentajes de las siguientes pruebas y ejemplos son, a menos que se establezca de otro modo, porcentajes en peso; partes son partes en peso. Las relaciones de disolventes, relaciones de dilución y datos de concentración para las disoluciones líquido/líquido están cada una basadas en volumen.

## A. Ejemplos

### Abreviaturas

|        |                                                                            |
|--------|----------------------------------------------------------------------------|
| AA     | aminoácido                                                                 |
| Acm    | acetamidometilo                                                            |
| aprox. | aproximadamente                                                            |
| Boc    | <i>tert</i> -butiloxycarbonilo                                             |
| CDI    | carbonyldiimidazol                                                         |
| d      | día(s), doblete (en RMN)                                                   |
| CCF    | cromatografía en capa fina                                                 |
| DCI    | ionización química directa (en EM)                                         |
| dd     | doblete de dobletes (en RMN)                                               |
| DIEA   | N,N-diisopropiletilamina                                                   |
| DMAP   | 4-dimetilaminopiridina                                                     |
| DMF    | <i>N,N</i> -dimetilformamida                                               |
| DMSO   | sulfóxido de dimetilo                                                      |
| d.t.   | del teórico (en rendimiento)                                               |
| eq.    | equivalente(s)                                                             |
| ESI    | ionización por electropulverización (en EM)                                |
| Fmoc   | (9H-fluoren-9-ilmetoxy)carbonilo                                           |
| h      | hora(s)                                                                    |
| HATU   | hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio |
| HPLC   | cromatografía líquida de alta resolución a alta presión                    |
| EM-CL  | espectroscopía de masas acoplada a cromatografía de líquidos               |
| m      | multiplete (en RMN)                                                        |
| min    | minuto(s)                                                                  |
| EM     | espectroscopía de masas                                                    |
| RMN    | espectroscopía de resonancia magnética nuclear                             |
| RP     | fase inversa (en HPLC)                                                     |
| TA     | temperatura ambiente                                                       |

|                |                                                            |
|----------------|------------------------------------------------------------|
| R <sub>t</sub> | tiempo de retención (en HPLC)                              |
| s              | singlete (en RMN)                                          |
| TBTU           | tetrafluoroborato de benzotriazol-1-il-N-tetrametil-uronio |
| tBu            | terc-butilo                                                |
| TFA            | ácido trifluoroacético                                     |
| THF            | tetrahidrofurano                                           |
| Trt            | tritol                                                     |

### Procedimientos de EM-CL y EM

**Procedimiento 1 (EM-CL):** Tipo de instrumento: Waters ACQUITY SQD UPLC System; columna: Waters Acquity UPLC HSS T3 1,8  $\mu$  50 mm x 1 mm; fase móvil A: 1 l de agua + 0,25 ml de ácido fórmico al 99 % de concentración, fase móvil B: 1 l de acetonitrilo + 0,25 ml de ácido fórmico al 99 % de concentración; gradiente: 0,0 min 90 % de A  $\rightarrow$  1,2 min 5 % de A  $\rightarrow$  2,0 min 5 % de A; horno: 50 °C; flujo: 0,40 ml/min; detección de UV: 210 – 400 nm.

**Procedimiento 2 (EM-CL):** Instrumento de EM: tipo: Waters (Micromass) Quattro Micro; tipo de instrumento de HPLC: Agilent 1100 series; columna: Thermo Hypersil GOLD 3  $\mu$  20 mm x 4 mm; fase móvil A: 1 l de agua + 0,5 ml de ácido fórmico al 50 % de concentración, fase móvil B: 1 l de acetonitrilo + 0,5 ml de ácido fórmico al 50 % de concentración; gradiente: 0,0 min 100 % de A  $\rightarrow$  3,0 min 10 % de A  $\rightarrow$  4,0 min 10 % de A; horno: 50 °C; flujo: 2,0 ml/min; detección de UV: 210 nm.

**Procedimiento 3 (HPLC):** Tipo de instrumento: HP 1200 Series; UV DAD; columna: Phenomenex Luna 5  $\mu$ m C5 100Å, 150 mm x 4,6 mm; fase móvil A: 1 l de agua + 0,5 ml de ácido fórmico al 50 % de concentración, fase móvil B: 1 l de acetonitrilo + 0,5 ml de ácido fórmico al 50 % de concentración; gradiente: 0,0 min 95 % de A  $\rightarrow$  5 min 5 % de A;  $\rightarrow$  5,8 min 95 % de A  $\rightarrow$  6,2 min 95 % de A; velocidad de flujo: 2,5 ml/min; horno: TA; detección UV: 210 nm.

**Procedimiento 4 (HPLC):** Tipo de instrumento: HP 1200 Series; UV DAD; columna: Merck Chromolith Fastgradient RP18 50 mm x 2 mm; fase móvil A: 1 l de agua + 0,5 ml de ácido fórmico al 50 % de concentración, fase móvil B: 1 l de acetonitrilo + 0,5 ml de ácido fórmico al 50 % de concentración; gradiente: 0,0 min 95 % de A  $\rightarrow$  2,9 min 5 % de A  $\rightarrow$  3,2 min 5 % de A; velocidad de flujo: 3 ml/min; horno: TA; detección UV: 210 nm.

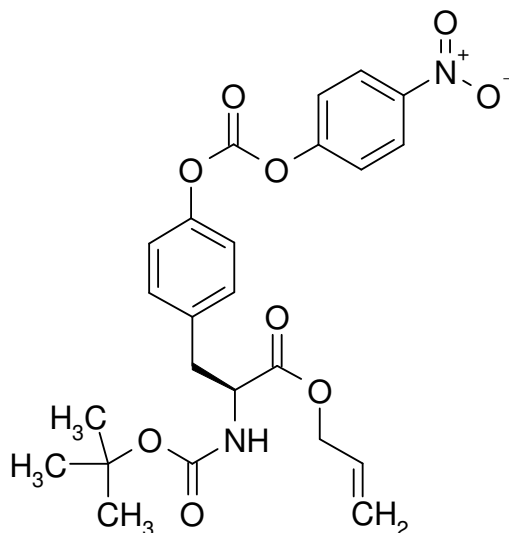
**Sintetizador de microondas:** sintetizador Biotage Emrys Iniciator II, con tamaño de vial variable hasta 20 ml de volumen de reacción y procesador de muestras "Robot 60".

**Tampón citrato a pH 4:** Fluka n° 82566; tampón citrato a pH 4, estabilizado con composición de azida de sodio: ácido cítrico, ~0,056 M; azida de sodio, ~0,05 %; cloruro sódico, ~0,044 M; hidróxido sódico, ~0,068 M.

### Compuestos de partida

#### Ejemplo 1A

Alil-N-(terc-butoxicarbonil)-O-[(4-nitrofenoxi)carbonil]-L-tirosinato

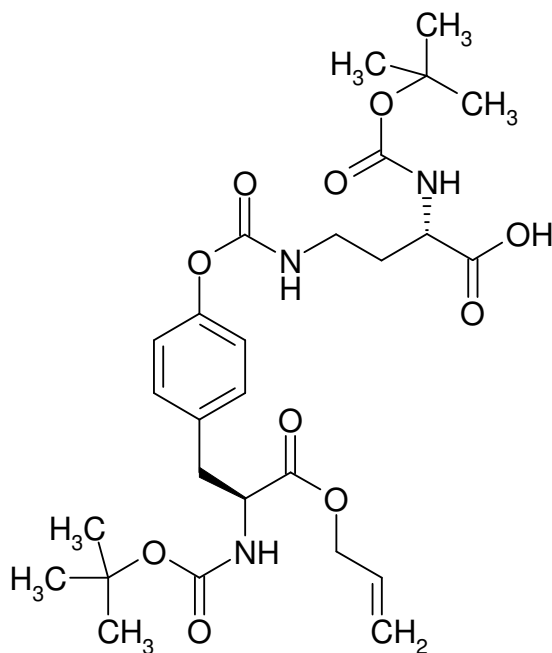


- 36,7 g (114,3 mmoles) de éster alílico de N-Boc-L-tirosina, 23,0 g (114,3 mmoles) de cloroformiato de 4-nitrofenilo, 17,5 ml (125,7 mmoles) de trietilamina y 1,40 g (11,4 mmoles) de 4-dimetilaminopiridina se combinaron en 1000 ml de diclorometano y se agitaron a temperatura ambiente durante 2 h. La mezcla de reacción se extrajo con aprox. 500 ml de agua y con aprox. 250 ml de salmuera y se secó sobre aprox. 100 g de sulfato de sodio. El disolvente se eliminó mediante evaporación rotatoria (aprox. 40 °C, aprox. 200 mbar, aprox. 30 min) y el producto se disolvió en éter dietílico caliente y cristalizó durante la noche a 4 °C. Los cristales se filtraron, se lavaron con éter dietílico frío y se secaron en alto vacío (aprox. 0,1 mbar, 18 h). El rendimiento fue 29,86 g (59,6 mmoles, 52% del teórico) del producto deseado.

EM-CL (Procedimiento 1):  $R_t = 1,23$  min,  $m/z = 487$  (M+H)<sup>+</sup>

## 10 Ejemplo 2A

Ácido (2S)-4-[[[4-[(2S)-3-(aliloxi)-2-[(terc-butoxicarbonil)amino]-3-oxopropil]fenoxi)carbonil]-amino]-2-[(terc-butoxicarbonil)amino]butanoico

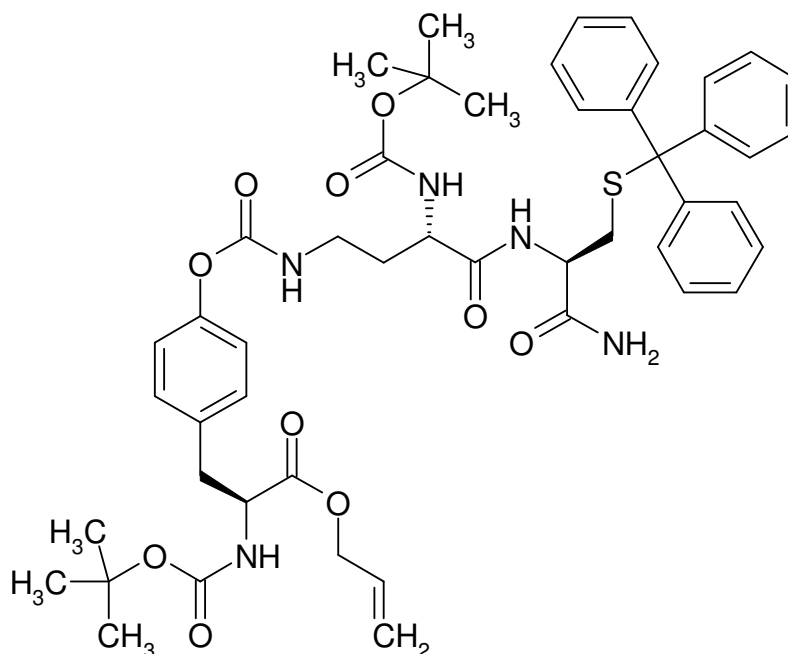


- 4,0 g (8,22 mmoles) del compuesto del Ejemplo 1A se disolvieron en 60 ml de diclorometano. Se añadieron 1,795 (8,22 mmoles) de ácido (2S)-4-amino-2-[(terc-butoxicarbonil)amino]butanoico y 1,43 ml (8,22 mmoles) de N,N-diisopropiletilamina. La mezcla de reacción se fraccionó en 3 porciones. Las porciones se calentaron durante 30 min en un tubo cerrado a 75 °C en un sintetizador de microondas. De la mezcla de reacción combinada el disolvente se eliminó mediante evaporación rotatoria (aprox. 40 °C, aprox. 200 mbar, aprox. 30 min). El producto en bruto se disolvió en diclorometano y se sometió a cromatografía sobre aprox. 600 ml de gel de sílice. Los disolventes usados fueron diclorometano/acetato de etilo 4/1, diclorometano/acetato de etilo 1/1, diclorometano/metanol 4/1 y diclorometano/metanol 1/1. Las fracciones que contenían producto se combinaron y se concentraron a sequedad a presión reducida. Esto dio 4,02 g (6,54 mmoles, 80 % del teórico) del producto deseado.

EM-CL (Procedimiento 1):  $R_t = 1,07$  min,  $m/z = 564$  (M-H)<sup>-</sup>

## Ejemplo 3A

- 25 Alil-O-[(3S)-4-[(2R)-1-Amino-1-oxo-3-(tritisulfanil)propan-2-il]amino]-3-[(terc-butoxi-carbonil)amino]-4-oxobutil]carbamoil)-N-(terc-butoxicarbonil)-L-tirosinato

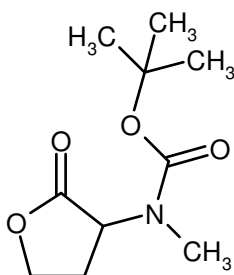


2,50 g (4,42 mmoles) del compuesto del Ejemplo 2A se disolvieron en 100 ml de diclorometano. Se añadieron 1,602 g (4,42 mmoles) de S-tritil-L-cisteinamida, 0,77 ml (4,42 mmoles) de N,N-diisopropiletilamina y 1,68 g (4,42 mmoles) de HATU. La mezcla de reacción se fraccionó en 5 porciones. Las porciones se calentaron durante 30 min en un tubo cerrado a 60 °C en un sintetizador de microondas. De la mezcla de reacción combinada el disolvente se eliminó mediante evaporación rotatoria (aprox. 40 °C, aprox. 200 mbar, aprox. 30 min). El producto en bruto se disolvió en diclorometano y se sometió a cromatografía sobre aprox. 600 ml de gel de sílice. Los disolventes usados fueron diclorometano/acetato de etilo 2/1, diclorometano/acetato de etilo 1/1, diclorometano/metanol 20/1 y diclorometano/metanol 10/1. Las fracciones que contenían producto se combinaron y se concentraron a sequedad a presión reducida. Esto dio 4,12 g (3,30 mmoles, 75 % del teórico, pureza del 73 %) del producto deseado.

EM-CL (Procedimiento 1):  $R_t = 1,36$  min,  $m/z = 911$  ( $M+H$ )<sup>+</sup>

#### Ejemplo 4A

Metil(2-oxotetrahydrofurano-3-il)carbamato de terc-butilo



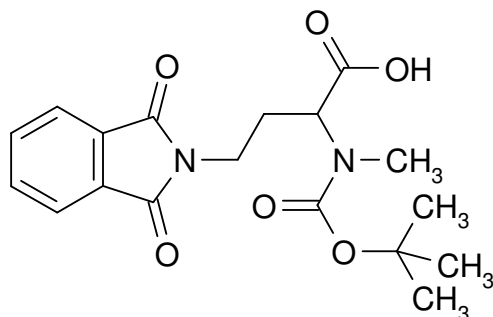
El compuesto se sintetizó según Alberico, Dino; Paquin, Jean-Francois; Lautens, Mark; Tetrahedron, 2005, vol. 61, pág. 6283 - 6297.

5,18 g (25,7 mmoles) de (tetrahydro-2-oxo-3-furanil)carbamato de terc-butilo, 4,81 ml (77,2 mmoles) de yodometano se disolvieron en 100 ml de dimetilformamida seca. La solución se enfrió a 0 °C y se añadieron 1,34 g (60 % en aceite mineral, 33,5 mmoles) de hidruro de sodio. La reacción se calentó hasta temperatura ambiente y se agitó durante la noche. La mezcla de reacción se añadió a aprox. 400 ml de agua y la mezcla se extrajo tres veces con aprox. 300 ml de acetato de etilo. Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron a sequedad a presión reducida. Esto dio 8,70 g (25,7 mmoles, 100 % del teórico, pureza del 63 %) del producto deseado.

Los datos analíticos fueron según la bibliografía. El producto se usó en la siguiente etapa sintética sin más purificación.

#### Ejemplo 5A

Ácido 2-[(terc-butoxicarbonil)(metil)amino]-4-(1,3-dioxo-1,3-dihidro-2H-isoindol-2-il)butanoico

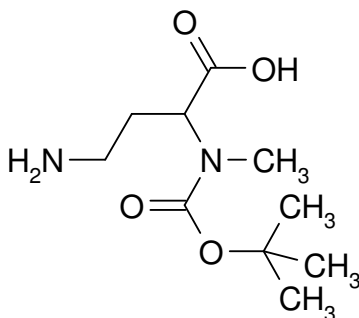


- 8,70 g (aprox. 25 mmoles, pureza de aprox. el 63%) del compuesto del Ejemplo 4A se disolvieron en 560 ml de dimetilformamida. Se añadieron 8,23 g (44,4 mmoles) de ftalimida de potasio y la mezcla de reacción se calentó a 150 °C durante 7 h. Se eliminaron aprox. 400 ml del disolvente mediante evaporación rotatoria (aprox. 60 °C, aprox. 10 mbar, aprox. 30 min). La mezcla de reacción se vertió en una mezcla de aprox. 100 ml de agua, 200 g de hielo y 15 ml de ácido acético. Después de fundir el hielo restante la mezcla de reacción se filtró y el filtrado se extrajo 3 veces con aprox. 100 ml de diclorometano. Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron a sequedad a presión reducida. El producto en bruto se disolvió en diclorometano y se sometió a cromatografía sobre aprox. 70 ml de gel de sílice. Los disolventes usados fueron diclorometano/acetato de etilo 9/1 a diclorometano/acetato de etilo 6/4. Las fracciones que contenían producto se combinaron y se concentraron a sequedad a presión reducida. Esto dio 2,39 g (6,04 mmoles, 24 % del teórico) de producto.

EM-CL (Procedimiento 1):  $R_t = 0,92$  min,  $m/z = 363$  (M+H)<sup>+</sup>

#### Ejemplo 6A

- 15 Ácido 4-amino-2-[(terc-butoxicarbonil)(metil)amino]butanoico



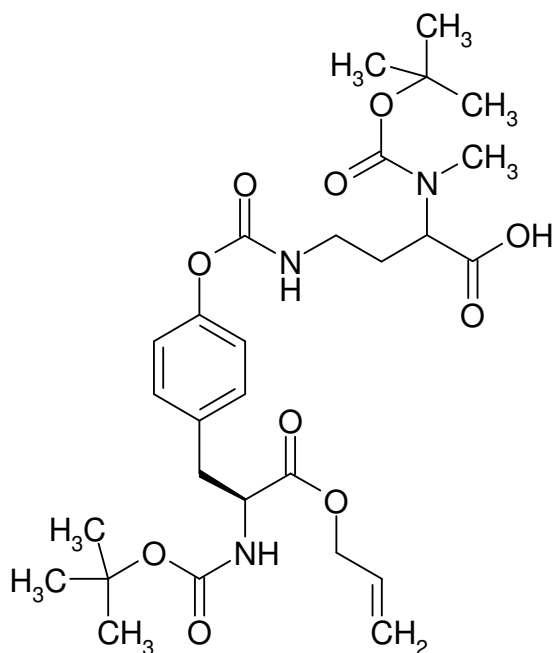
- 11,8 g (32,6 mmoles) del compuesto del Ejemplo 5A se disolvieron en aprox. 640 ml de etanol y 23,8 ml (488 mmoles) de hidracina hidratada se añadieron a la mezcla de reacción. Después de agitar durante la noche, la mezcla de reacción se filtró y el filtrado se concentró a sequedad a presión reducida. El producto en bruto se disolvió en etanol y se añadieron aprox. 50 g de gel de sílice, el disolvente se eliminó a presión reducida. El sólido resultante se añadió sobre una columna de gel de sílice de aprox. 500 g y se sometió a cromatografía. Los disolventes usados fueron diclorometano/metanol 9/1 a diclorometano/metanol 1/1. Las fracciones que contenían producto se combinaron y se concentraron a sequedad a presión reducida. Esto dio 2,98 g (12,8 mmoles, 39 % del teórico) de producto.

- 25 EM-CL (Procedimiento 2):  $R_t = 0,21$  min,  $m/z = 233$  (M+H)<sup>+</sup>

EM-DCI (Procedimiento 5):  $m/z = 233$  (M+H)<sup>+</sup>

#### Ejemplo 7A

Ácido 4-[[[4-[(2S)-3-(aliloxi)-2-[(terc-butoxicarbonil)amino]-3-oxopropil]fenoxi]carbonil]-amino]-2-[(terc-butoxicarbonil)(metil)amino]butanoico

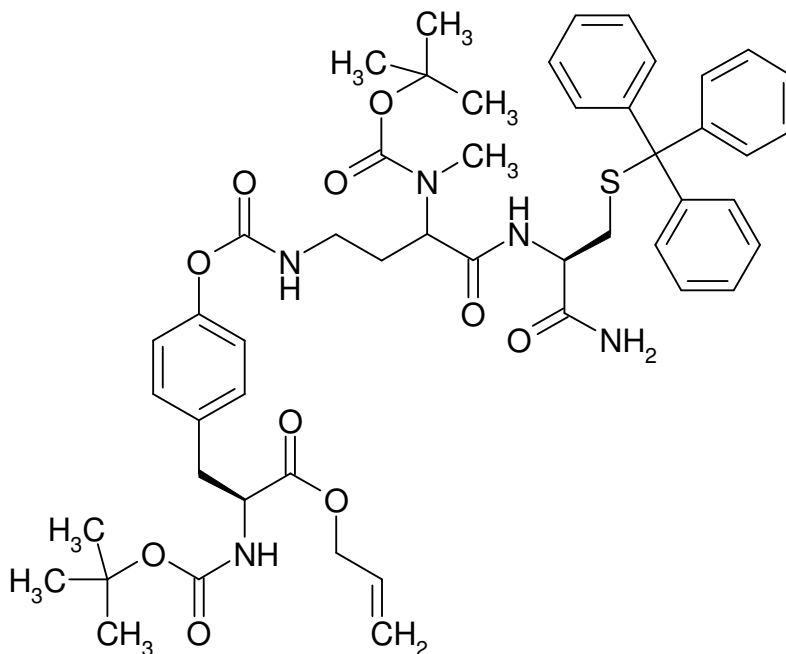


0,931 g (1,92 mmoles) del compuesto del Ejemplo 1A se disolvieron en 30 ml de diclorometano. Se añadieron 0,455 g (1,92 mmoles) del compuesto del Ejemplo 6A. La mezcla de reacción se fraccionó en 2 porciones. Las porciones se calentaron durante 30 min en un tubo cerrado a 80 °C en un sintetizador de microondas. De la mezcla de reacción combinada el disolvente se eliminó a presión reducida. El producto en bruto se purificó por RP-HPLC preparativa sobre una columna C18 con un gradiente de agua/metanol de 9/1 a 1/9. Las fracciones que contenían producto se combinaron y se concentraron a sequedad a presión reducida. Esto dio 0,523 g (0,85 mmoles, 44 % del teórico) del producto deseado como una mezcla de 2 diaestereómeros.

EM-CL (Procedimiento 1):  $R_t = 1,08$  y  $1,11$  min,  $m/z = 578$  (M-H)<sup>-</sup>

#### Ejemplo 8A

Alil-O-[(4-[[[(2R)-1-amino-1-oxo-3-(tritisulfanil)propan-2-il]amino]-3-[(terc-butoxicarbonil)-(metil)amino]-4-oxobutil]carbamoil]-N-(terc-butoxicarbonil)-L-tirosinato



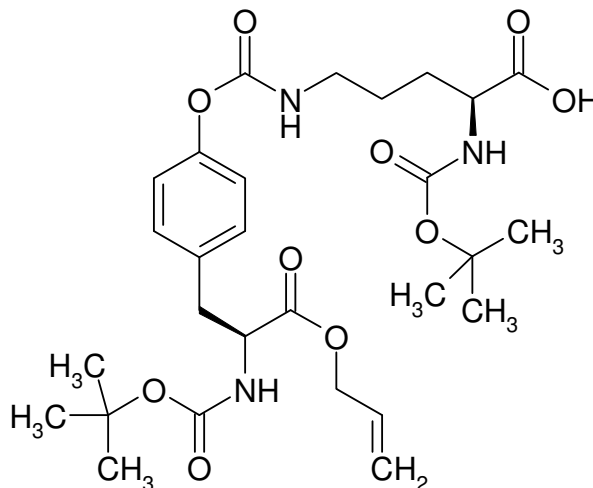
2,24 g (3,86 mmoles) del compuesto del Ejemplo 7A se disolvieron en 100 ml de diclorometano. Se añadieron 1,401 g (3,86 mmoles) de S-tritil-L-cisteinamida, 0,67 ml (3,86 mmoles) de N,N-diisopropiletilamina y 1,47 g (3,86 mmoles)

de HATU. La mezcla de reacción se fraccionó en 5 porciones. Las porciones se calentaron durante 30 min en un tubo cerrado a 60 °C en un sintetizador de microondas. De la mezcla de reacción combinada el disolvente se eliminó mediante evaporación rotatoria (aprox. 40 °C, aprox. 200 mbar, aprox. 30 min). El producto en bruto se purificó por RP-HPLC preparativa sobre una columna C18 con un gradiente de agua/metanol de 9/1 a 1/9. Las fracciones que

EM-CL (Procedimiento 1):  $R_t = 1,41$  y  $1,43$  min,  $m/z = 924$  ( $M+H$ )<sup>+</sup>

### Ejemplo 9A

$N^5$ -[(4-{(2S)-3-(Aliloxi)-2-[(terc-butoxicarbonil)amino]-3-oxopropil}fenoxi)carbonil]- $N^2$ -(terc-butoxicarbonil)-L-ornitina

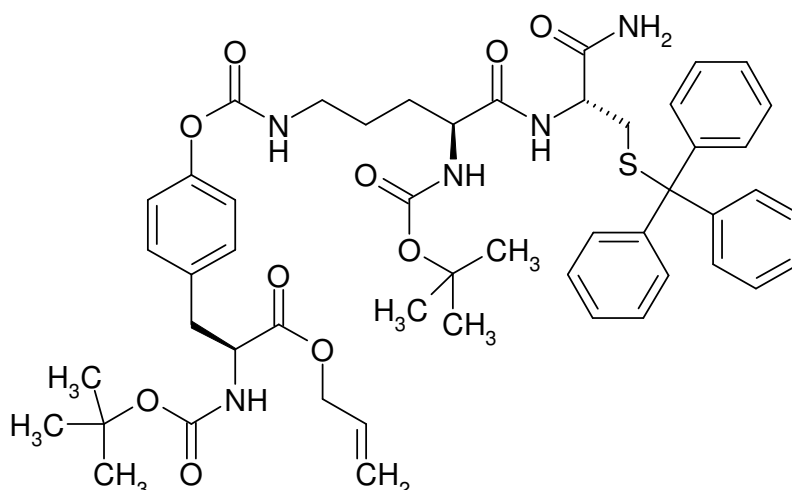


6,00 g (12,33 mmoles) del compuesto del Ejemplo 1A se disolvieron en 120 ml de diclorometano. Se añadieron 2,57 g (12,33 mmoles) de  $N^2$ -(terc-butoxicarbonil)-L-ornitina. La mezcla de reacción se fraccionó en 6 porciones. Las porciones se calentaron durante 90 min en un tubo cerrado a 75 °C en un sintetizador de microondas. La mezcla de reacción combinada se extrajo con aprox. 100 ml de solución saturada de cloruro de amonio. La fase acuosa se retroextrajo dos veces con aprox. 30 ml de diclorometano cada vez. Las fases orgánicas combinadas se extrajeron con aprox. 50 ml de salmuera y se secaron sobre sulfato de sodio. El disolvente se eliminó a presión reducida. El producto en bruto se disolvió en diclorometano y se sometió a cromatografía sobre aprox. 600 ml de gel de sílice. Los disolventes usados fueron diclorometano, diclorometano/metanol 40/1 a diclorometano/metanol 1/1. Las fracciones que contenían producto se combinaron y se concentraron a sequedad a presión reducida. Esto dio 2,63 g (4,06 mmoles, 33 % del teórico, 89% pureza) del producto deseado.

EM-CL (Procedimiento 1):  $R_t = 1,03$  min,  $m/z = 578$  ( $M-H$ )<sup>-</sup>

### Ejemplo 10A

$N^5$ -[(4-{(2S)-3-(Aliloxi)-2-[(terc-butoxicarbonil)amino]-3-oxopropil}fenoxi)carbonil]- $N^2$ -(terc-butoxicarbonil)-L-ornitil-S-tritil-L-cisteinamida

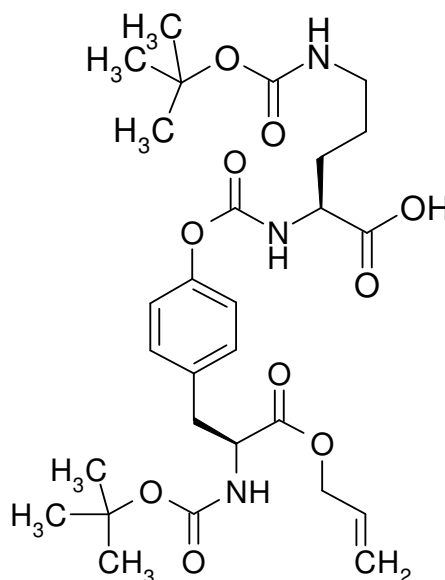


1,20 g (2,07 mmoles) del compuesto del Ejemplo 9A se disolvieron en 48 ml de diclorometano. Se añadieron 0,750 g (2,07 mmoles) de S-tritil-L-cisteinamida, 0,36 ml (2,07 mmoles) de N,N-diisopropiletilamina y 0,787 g (2,07 mmoles) de HATU. La mezcla de reacción se fraccionó en 3 porciones. Las porciones se calentaron durante 30 min en un tubo cerrado a 60 °C en un sintetizador de microondas. De la mezcla de reacción combinada el disolvente se eliminó mediante evaporación rotatoria (aprox. 40 °C, aprox. 200 mbar, aprox. 30 min). El producto en bruto se disolvió en diclorometano y se sometió a cromatografía sobre aprox. 400 ml de gel de sílice. Los disolventes usados fueron diclorometano/acetato de etilo 2/1, diclorometano/acetato de etilo 1/1. Las fracciones que contenían producto se combinaron y se concentraron a sequedad a presión reducida. Esto dio 1,30 g (1,5 mmoles, 56 % del teórico, 82% pureza) del producto deseado.

EM-CL (Procedimiento 1):  $R_t = 1,35$  min,  $m/z = 924$  (M+H)<sup>+</sup>

### Ejemplo 11A

N<sup>2</sup>-[(4-{(2S)-3-(Aliloxi)-2-[(terc-butoxicarbonil)amino]-3-oxopropil}fenoxi)carbonil]-N<sup>5</sup>-(terc-butoxicarbonil)ornitina

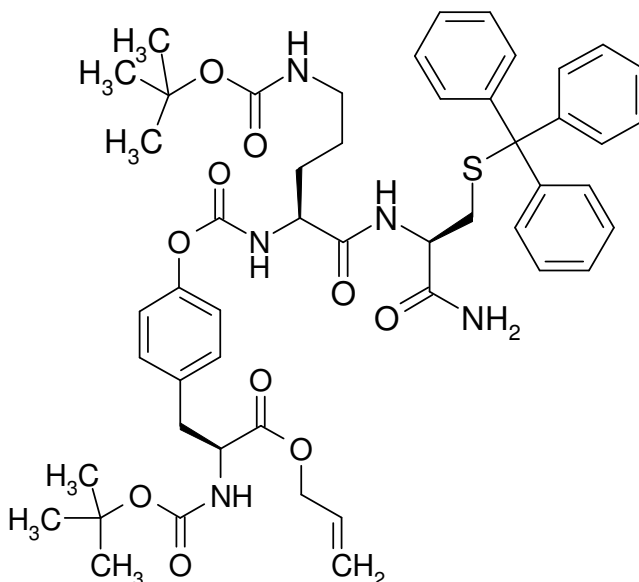


3,00 g (6,16 mmoles) del compuesto del Ejemplo 1A se disolvieron en 60 ml de diclorometano. Se añadieron 1,43 g (6,16 mmoles) de N<sup>5</sup>-(terc-butoxicarbonil)-L-ornitina. La mezcla de reacción se fraccionó en 3 porciones. Las porciones se calentaron durante 30 min en un tubo cerrado a 75 °C en un sintetizador de microondas. La mezcla de reacción combinada se extrajo con aprox. 500 ml de solución saturada de cloruro de amonio. La fase acuosa se retroextrajo dos veces con aprox. 30 ml de diclorometano cada vez. Las fases orgánicas combinadas se extrajeron con aprox. 50 ml de salmuera y se secaron sobre sulfato de sodio. El disolvente se eliminó a presión reducida. El producto en bruto se disolvió en diclorometano y se sometió a cromatografía sobre aprox. 500 ml de gel de sílice. Los disolventes usados fueron diclorometano, diclorometano/metanol 20/1 a diclorometano/metanol 1/1. Las fracciones que contenían producto se combinaron y se concentraron a sequedad a presión reducida. Esto dio 2,29 g (3,50 mmoles, 57 % del teórico, 89% pureza) del producto deseado.

EM-CL (Procedimiento 1):  $R_t = 1,07$  min,  $m/z = 578$  (M-H)<sup>-</sup>

### Ejemplo 12A

N<sup>2</sup>-[4-[(2S)-3-(Aliloxi)-2-[(terc-butoxicarbonil)amino]-3-oxopropil]fenoxi]carbonil]-N<sup>5</sup>-(terc-butoxicarbonil)-L-ornitil-S-tritil-L-cisteinamida



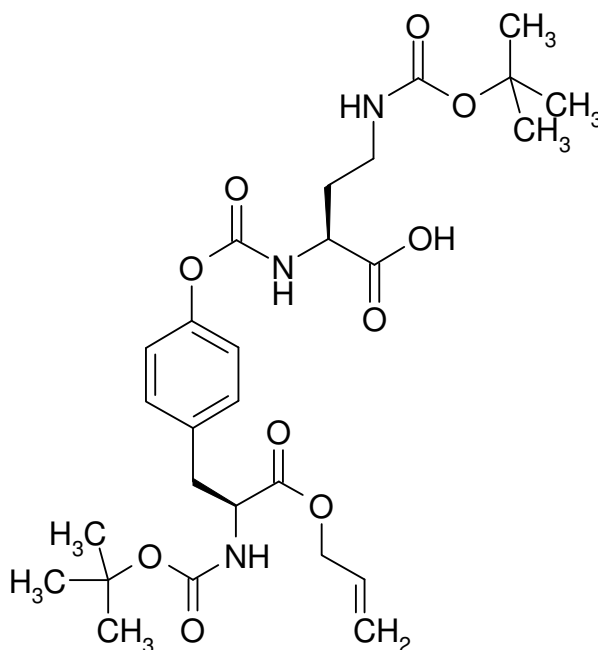
5

1,50 g (2,59 mmoles) del compuesto del Ejemplo 11A se disolvieron en 60 ml de diclorometano. Se añadieron 0,940 g (2,59 mmoles) de S-tritil-L-cisteinamida, 0,45 ml (2,60 mmoles) de N,N-diisopropiletilamina y 0,984 g (2,59 mmoles) de HATU. La mezcla de reacción se fraccionó en 3 porciones. Las porciones se calentaron durante 30 min en un tubo cerrado a 60 °C en un sintetizador de microondas. De la mezcla de reacción combinada el disolvente se eliminó mediante evaporación rotatoria (aprox. 40 °C, aprox. 200 mbar, aprox. 30 min). El producto en bruto se disolvió en diclorometano y se sometió a cromatografía sobre aprox. 400 ml de gel de sílice. Los disolventes usados fueron diclorometano/acetato de etilo 2/1, diclorometano/acetato de etilo 1/1. Las fracciones que contenían producto se combinaron y se concentraron a sequedad a presión reducida. Esto dio 1,72 g (1,64 mmoles, 63 % del teórico, 88% pureza) del producto deseado.

15 EM-CL (Procedimiento 1):  $R_t = 1,35$  min,  $m/z = 924$  (M+H)<sup>+</sup>

### Ejemplo 13A

Ácido (2S)-2-[[[4-[(2S)-3-(aliloxi)-2-[(terc-butoxicarbonil)amino]-3-oxopropil]fenoxi]carbonil]-amino]-4-[(terc-butoxicarbonil)amino]butanoico



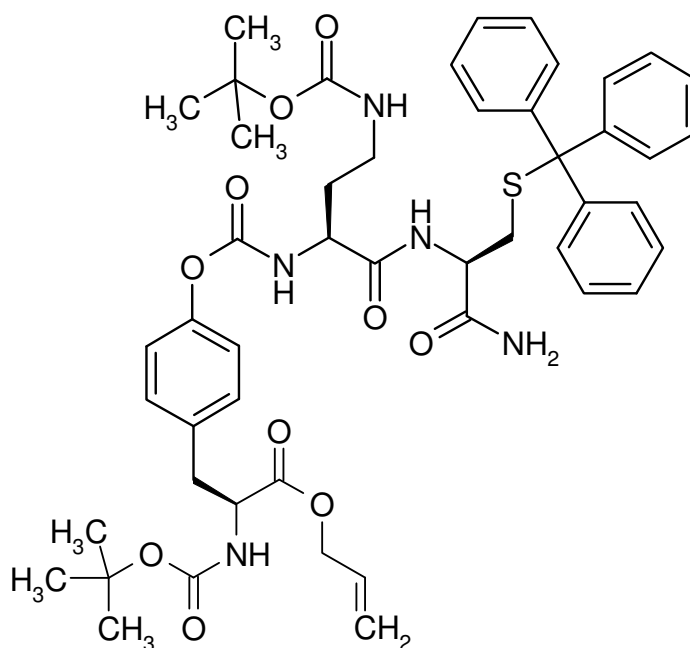
7,50 g (15,4 mmoles) del compuesto del Ejemplo 1A se disolvieron en 150 ml de diclorometano. Se añadieron 3,36 g (15,4 mmoles) de ácido (2S)-2-amino-4-[(terc-butoxicarbonil)amino]butanoico. La mezcla de reacción se fraccionó en 10 porciones. Las porciones se calentaron durante 30 min en un tubo cerrado a 75 °C en un sintetizador de microondas. La mezcla de reacción combinada se extrajo con aprox. 100 ml de solución saturada de cloruro de amonio. La fase acuosa se retroextrajo dos veces con aprox. 50 ml de diclorometano cada vez. Las fases orgánicas combinadas se extrajeron con aprox. 50 ml de salmuera y se secaron sobre sulfato de sodio. El disolvente se eliminó a presión reducida. El producto en bruto se disolvió en diclorometano y se sometió a cromatografía sobre aprox. 1 l de gel de sílice. Los disolventes usados fueron diclorometano/acetato de etilo 4/1, diclorometano/metanol 10/1 a 10

diclorometano/metanol 1/1. Las fracciones que contenían producto se combinaron y se concentraron a sequedad a presión reducida. Esto dio 8,70 g (10,8 mmoles, 70 % del teórico) del producto deseado.

EM-CL (Procedimiento 1):  $R_t = 1,06$  min,  $m/z = 564$  (M-H)<sup>-</sup>

#### Ejemplo 14A

Alil-N-(terc-butoxicarbonil)-O-[[[(4R,7S)-4-carbamoyl-13,13-dimetil-6,11-dioxo-1,1,1-trifenil-12-oxa-2-tia-5,10-diazatetradecan-7-il]carbamoyl]-L-tirosinato

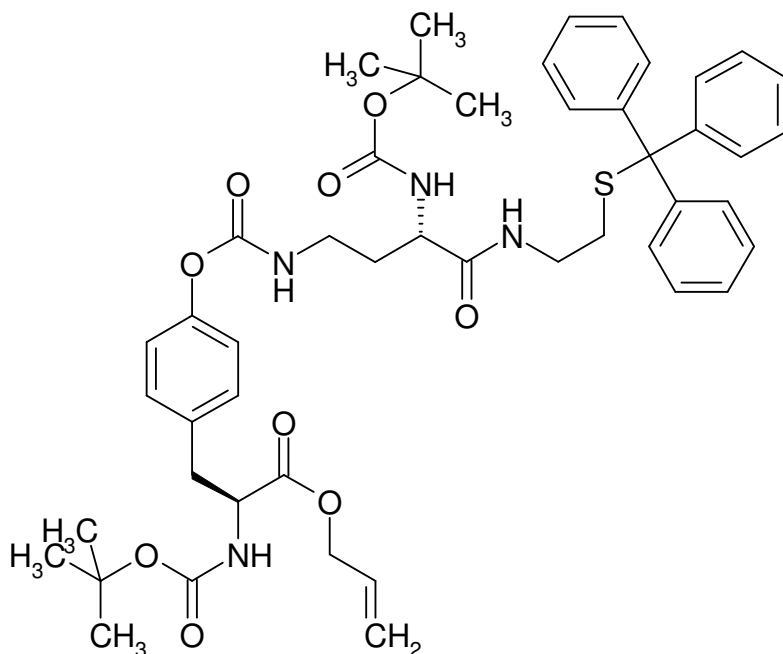


3,00 g (5,30 mmoles) del compuesto del Ejemplo 13A se disolvieron en 120 ml de diclorometano. Se añadieron 1,92 g (5,30 mmoles) de S-tritil-L-cisteinamida, 0,92 ml (5,30 mmoles) de N,N-diisopropiletilamina y 2,02 g (5,30 mmoles) de HATU. La mezcla de reacción se fraccionó en 6 porciones. Las porciones se calentaron durante 30 min en un tubo cerrado a 60 °C en un sintetizador de microondas. De la mezcla de reacción combinada el disolvente se eliminó mediante evaporación rotatoria (aprox. 40 °C, aprox. 200 mbar, aprox. 30 min). El producto en bruto se disolvió en diclorometano y se sometió a cromatografía sobre aprox. 800 ml de gel de sílice. Los disolventes usados fueron diclorometano/acetato de etilo 2/1, diclorometano/acetato de etilo 1/1. Las fracciones que contenían producto se combinaron y se concentraron a sequedad a presión reducida. Esto dio 4,91 g (3,73 mmoles, 70 % del teórico, 69% pureza) del producto deseado.

10 EM-CL (Procedimiento 1):  $R_t = 1,35$  min,  $m/z = 910$  (M+H)<sup>+</sup>

### Ejemplo 15A

Alil-N-(terc-butoxicarbonil)-O-[[[(3S)-3-[(terc-butoxicarbonil)amino]-4-oxo-4-[[2-(tritisulfanil)etil]amino]butil]carbamoil]-L-tirosinato

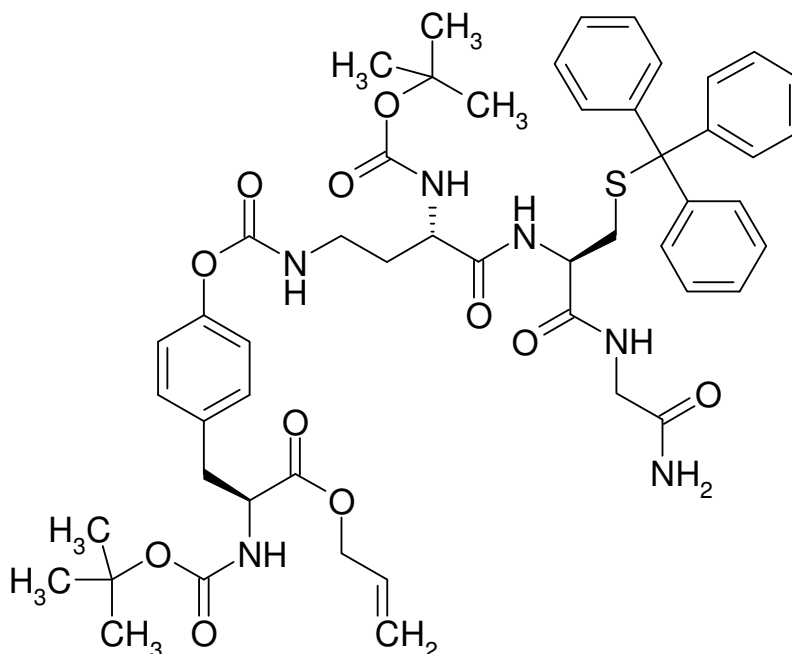


15 351 mg (0,63 mmoles) del compuesto del Ejemplo 2A se disolvieron en 15 ml de diclorometano. Se añadieron 200 mg (0,63 mmoles) de 2-(tritisulfanil)etanamina, 0,11 ml (0,63 mmoles) de N,N-diisopropiletilamina y 238 mg (0,63 mmoles) de HATU. La mezcla de reacción se calentó durante 30 min en un tubo cerrado a 60 °C en un sintetizador de microondas. De la mezcla de reacción el disolvente se eliminó a presión reducida. El producto en bruto se purificó por RP-HPLC preparativa sobre una columna C18 con un gradiente de agua/metanol de 9/1 a 1/9. Las fracciones  
20 que contenían producto se combinaron y se concentraron a sequedad a presión reducida. Esto dio 98 mg (0,110 mmoles, 16 % del teórico) del producto deseado.

EM-CL (Procedimiento 1):  $R_t = 1,45$  min,  $m/z = 867$  (M+H)<sup>+</sup>

### Ejemplo 16A

25 N-[(2S)-4-[[[(4-[(2S)-3-(Aliloxi)-2-[(terc-butoxicarbonil)amino]-3-oxopropil]fenoxy)-carbonil]amino]-2-[(terc-butoxicarbonil)amino]butanoil]-S-tritil-L-cisteinglicinamida

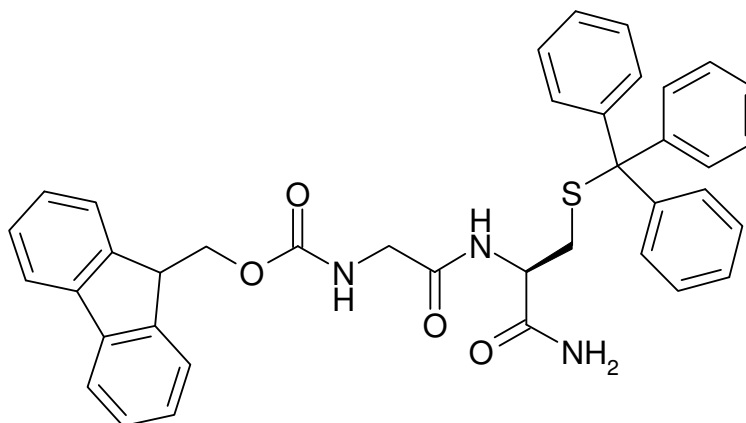


173 mg (0,31mmol) del compuesto del Ejemplo 2A se disolvieron en 10 ml de diclorometano. Se añadieron 128 mg (0,31 mmoles) de S-tritil-L-cisteinglicinamida, 53  $\mu$ l (0,31 mmoles) de N,N-diisopropiletil-amina y 116 mg (0,31 mmoles) de HATU. La mezcla de reacción se calentó durante 30 min en un tubo cerrado a 60 °C en un sintetizador de microondas. De la mezcla de reacción el disolvente se eliminó a presión reducida. El producto en bruto se purificó por RP-HPLC preparativa sobre una columna C18 con un gradiente de agua/metanol de 9/1 a 1/9. Las fracciones que contenían producto se combinaron y se concentraron a sequedad a presión reducida. Esto dio 57 mg (0,02 mmoles, 18 % del teórico) del producto deseado.

EM-CL (Procedimiento 1):  $R_t = 1,31$  min,  $m/z = 968$  (M+H)<sup>+</sup>

#### Ejemplo 17A

N-[(9H-Fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]glicil-S-tritil-L-cisteinamida

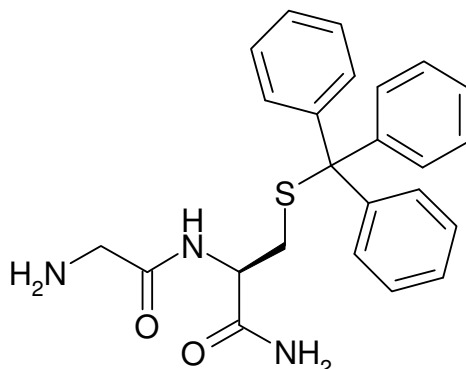


1,00 g (3,36 mmoles) de N-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]glicina se disolvió en 30 ml de diclorometano. Se añadieron 1,41 g (3,36 mmoles) de S-tritil-L-cisteinglicinamida, 0,59 ml (3,36 mmoles) de N,N-diisopropiletilamina y 1,28 g (3,36 mmoles) de HATU. La mezcla de reacción se calentó durante 30 min en un tubo cerrado a 60 °C en un sintetizador de microondas. De la mezcla de reacción el disolvente se eliminó a presión reducida. El producto en bruto se disolvió en diclorometano y se sometió a cromatografía sobre aprox. 300 ml de gel de sílice. Los disolventes usados fueron diclorometano, diclorometano/metanol 20/1, diclorometano/metanol 10/1. Las fracciones que contenían producto se combinaron y se concentraron a sequedad a presión reducida. Esto dio 1,63 g (2,06 mmoles, 81 % del teórico) del producto deseado.

EM-CL (Procedimiento 1):  $R_t = 1,31$  min,  $m/z = 642$  (M+H)<sup>+</sup>

**Ejemplo 18A**

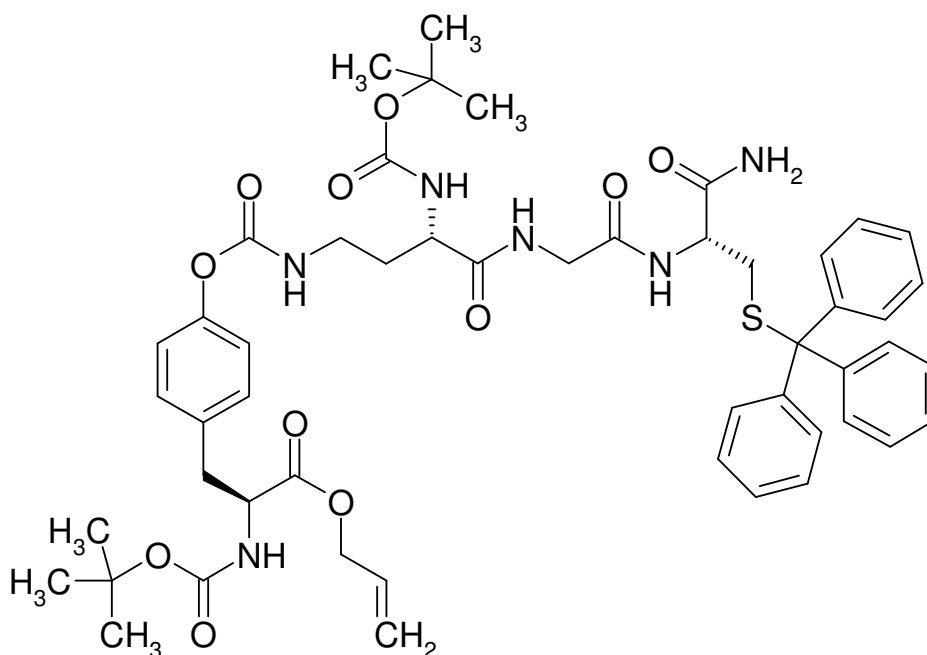
Glicil-S-tritil-L-cisteinamida



- 5 1,53 g (2,38 mmoles) del compuesto del Ejemplo 17A se disolvieron en 18 ml de dimetilformamida y se añadieron 0,47 ml (4,79 mmoles) de DIEA. Después de un tiempo de reacción de una hora, el producto en bruto se purificó por RP-HPLC preparativa sobre una columna C18 con un gradiente de agua/metanol de 9/1 a 1/9. Las fracciones que contenían producto se combinaron y se concentraron a sequedad a presión reducida. Esto dio 416 mg (0,97 mmoles, 40 % del teórico) del producto deseado.

EM-CL (Procedimiento 1):  $R_t = 0,76$  min,  $m/z = 418$  (M-H)<sup>-</sup>**Ejemplo 19A**

N-((2S)-4-[[[4-((2S)-3-(Aliloxi)-2-[(terc-butoxicarbonil)amino]-3-oxopropil]fenoxi)-carbonil]amino]-2-[(terc-butoxicarbonil)amino]butanoil]glicil-S-tritil-L-cisteinamida

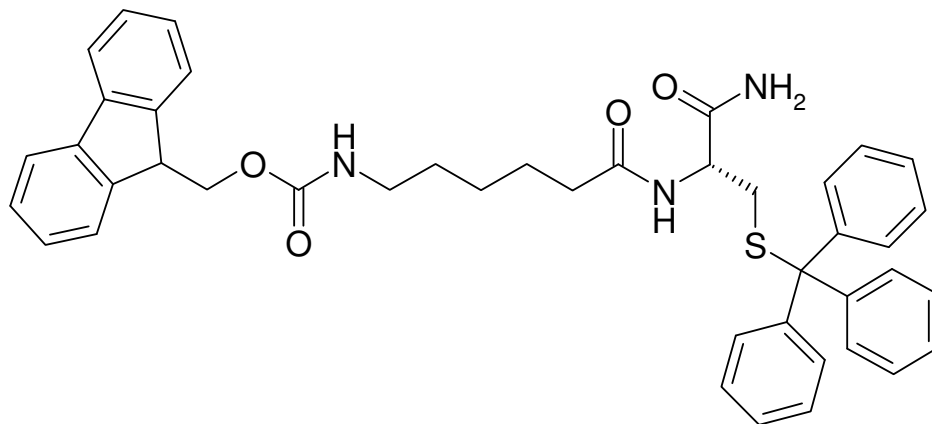


- 15 559 mg (0,99 mmoles) del compuesto del Ejemplo 2A se disolvieron en 15 ml de diclorometano. Se añadieron 415 mg (0,99 mmoles) del compuesto del Ejemplo 18A, 173  $\mu$ l (0,99 mmoles) de N,N-diisopropiletilamina y 376 mg (0,99 mmoles) de HATU. La mezcla de reacción se calentó durante 30 min en un tubo cerrado a 60 °C en un sintetizador de microondas. De la mezcla de reacción el disolvente se eliminó a presión reducida. El producto en bruto se disolvió en diclorometano y se sometió a cromatografía sobre aprox. 70 ml de gel de sílice. Los disolventes usados fueron diclorometano, diclorometano/metanol 20/1 a diclorometano/metanol 5/1. Las fracciones que contenían producto se combinaron y se concentraron a sequedad a presión reducida. Esto dio 860 mg (0,69 mmoles, 70 % del teórico) del producto deseado.
- 20

EM-CL (Procedimiento 1):  $R_t = 1,30$  min,  $m/z = 968$  (M+H)<sup>+</sup>

### Ejemplo 20A

9H-Fluoren-9-ilmetil-(6-[[[(2R)-1-amino-1-oxo-3-(tritisulfanil)propan-2-il]amino]-6-oxohexil]carbamato

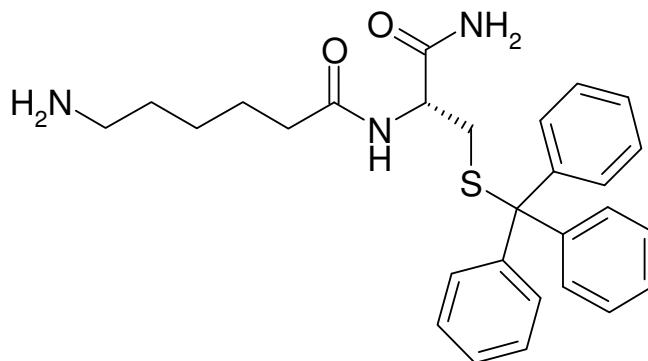


- 5 500 mg (1,42 mmoles) de ácido 6-[[[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]amino]hexanoico se disolvieron en 18 ml de diclorometano. Se añadieron 513 mg (1,42 mmoles) de S-tritil-L-cisteinglicinamida, 246  $\mu$ l (1,42 mmoles) de N,N-diisopropiletilamina y 537 mg (1,42 mmoles) de HATU. La mezcla de reacción se calentó durante 30 min en un tubo cerrado a 60 °C en un sintetizador de microondas. De la mezcla de reacción el disolvente se eliminó a presión reducida. El producto en bruto se purificó por RP-HPLC preparativa sobre una columna C18 con un gradiente de agua/metanol de 9/1 a 1/9. Las fracciones que contenían producto se combinaron y se concentraron a sequedad a presión reducida. Esto dio 678 mg (0,70 mmoles, 49 % del teórico) del producto deseado.

EM-CL (Procedimiento 1):  $R_t = 1,38$  min,  $m/z = 698$  (M+H)<sup>+</sup>

### Ejemplo 21A

6-Amino-N-[[[(2R)-1-amino-1-oxo-3-(tritisulfanil)propan-2-il]hexanamida

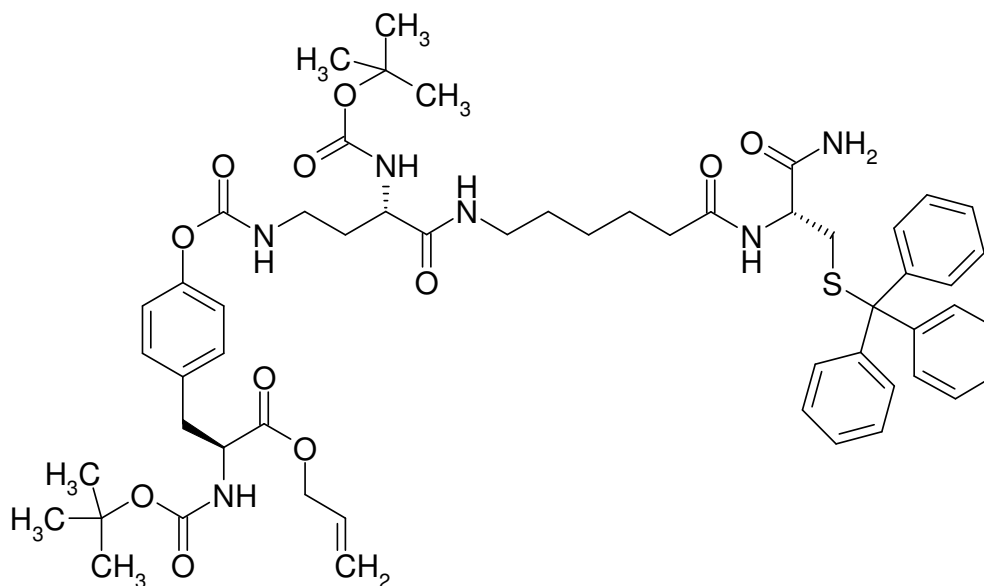


- 15 678 mg (0,97 mmoles) del compuesto del Ejemplo 20A se disolvieron en 7 ml de dimetilformamida y se añadieron 0,19 ml (1,94 mmoles) de DIEA. Después de un tiempo de reacción de una hora, el producto en bruto se purificó por RP-HPLC preparativa sobre una columna C18 con un gradiente de agua/metanol de 9/1 a 1/9. Las fracciones que contenían producto se combinaron y se concentraron a sequedad a presión reducida. Esto dio 457 mg (0,93 mmoles, 95 % del teórico) del producto deseado.

EM-CL (Procedimiento 1):  $R_t = 0,85$  min,  $m/z = 476$  (M+H)<sup>+</sup>

### Ejemplo 22A

Alil-O-([[(3S)-4-[[[(2R)-1-amino-1-oxo-3-(tritisulfanil)propan-2-il]amino]-6-oxohexil]-amino]-3-[(terc-butoxicarbonil)amino]-4-oxobutil]carbamoil)-N-(terc-butoxicarbonil)-L-tirosinato

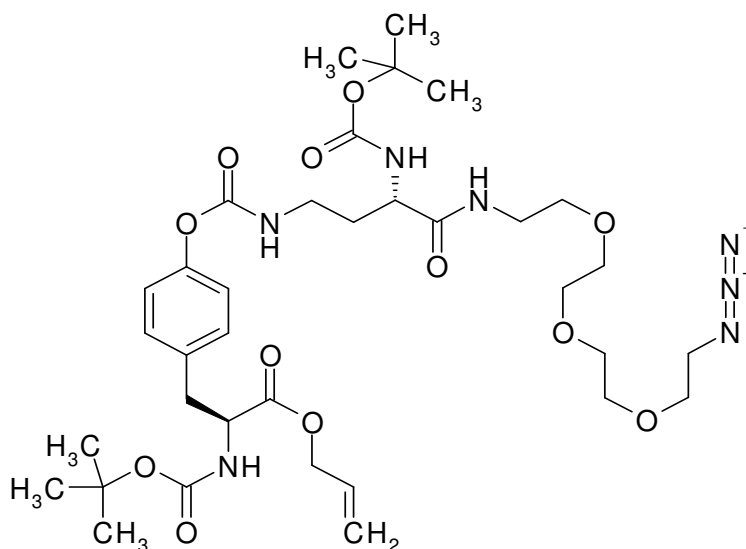


457 mg (0,81 mmoles) del compuesto del Ejemplo 2A se disolvieron en 15 ml de diclorometano. Se añadieron 384 mg (0,81 mmoles) del compuesto del Ejemplo 21A, 141  $\mu$ l (0,81 mmoles) de N,N-diisopropiletilamina y 307 mg (0,81 mmoles) de HATU. La mezcla de reacción se calentó durante 30 min en un tubo cerrado a 60 °C en un sintetizador de microondas. De la mezcla de reacción el disolvente se eliminó a presión reducida. El producto en bruto se purificó en dos porciones por RP-HPLC preparativa sobre una columna C18 con un gradiente de agua/metanol de 9/1 a 1/9. Las fracciones que contenían producto se combinaron y se concentraron a sequedad a presión reducida. Esto dio 255 mg (0,22 mmoles, 28 % del teórico) del producto deseado.

EM-CL (Procedimiento 1):  $R_t = 1,31$  min,  $m/z = 1032$  (M+H)<sup>+</sup>

### Ejemplo 23A

Alil-O-((14S)-1-azido-14-[(terc-butoxicarbonil)amino]-13-oxo-3,6,9-trioxa-12-azahexadecan-16-il)carbamoyl)-N-(terc-butoxicarbonil)-L-tirosinato

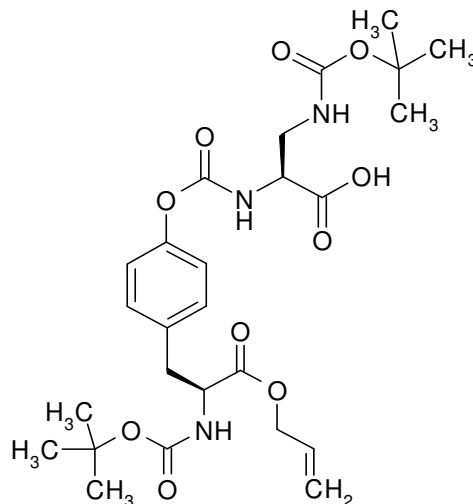


518 mg (0,92 mmoles) del compuesto del Ejemplo 2A se disolvieron en 15 ml de diclorometano. Se añadieron 200 mg (0,92 mmoles) de 2-{2-[2-(2-azidoeto)etoxi]etoxi}etanamina, 160  $\mu$ l (0,92 mmoles) de N,N-diisopropiletilamina y 348 mg (0,92 mmoles) de HATU. La mezcla de reacción se calentó durante 30 min en un tubo cerrado a 60 °C en un sintetizador de microondas. De la mezcla de reacción el disolvente se eliminó a presión reducida. El producto en bruto se purificó por RP-HPLC preparativa sobre una columna C18 con un gradiente de agua/metanol de 9/1 a 1/9. Las fracciones que contenían producto se combinaron y se concentraron a sequedad a presión reducida. Esto dio 276 mg (0,34 mmoles, 37 % del teórico) del producto deseado.

EM-CL (Procedimiento 1):  $R_t = 1,15$  min,  $m/z = 766$  (M+H)<sup>+</sup>

**Ejemplo 24A**

N-[(4-[(2S)-3-(Aliloxi)-2-[(terc-butoxicarbonil)amino]-3-oxopropil]fenoxi)carbonil]-3-[(terc-butoxicarbonil)amino]-L-alanina

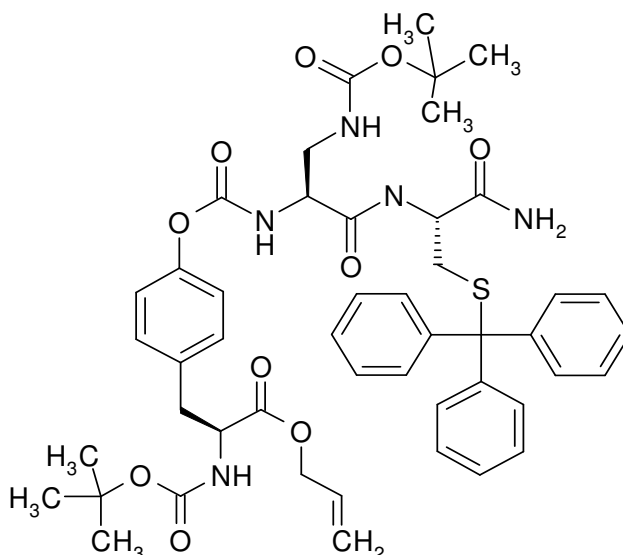


- 5 2,45 g (5,0 mmoles) del compuesto del Ejemplo 1A se disolvieron en 40 ml de dicloroetano. Se añadieron 1,03 g (5,0 mmoles) de 3-[(terc-butoxicarbonil)amino]-L-alanina. La mezcla de reacción se calentó a 85 °C durante 2 h. El disolvente se eliminó a presión reducida. El producto en bruto se disolvió en diclorometano y se sometió a cromatografía sobre aprox. 150 ml de gel de sílice. Los disolventes usados fueron diclorometano/metanol 20/1 a diclorometano/metanol 1/1. Las fracciones que contenían producto se combinaron y se concentraron a sequedad a presión reducida. Esto dio 1,23 g (2,2 mmoles, 44 % del teórico) del producto deseado.

EM-CL (Procedimiento 1):  $R_t = 1,06$  min,  $m/z = 550$  (M-H)<sup>-</sup>

**Ejemplo 25A**

N-[(4-[(2S)-3-(Aliloxi)-2-[(terc-butoxicarbonil)amino]-3-oxopropil]fenoxi)carbonil]-3-[(terc-butoxicarbonil)amino]-L-alanil-S-tritil-L-cisteinamida



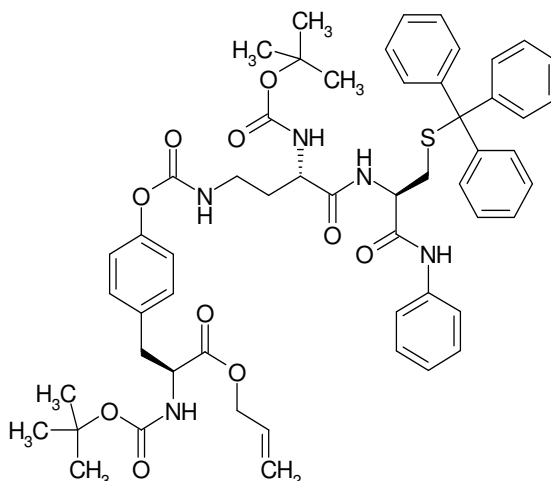
- 15 1,23 g (2,23 mmoles) del compuesto del Ejemplo 24A se disolvieron en 25 ml de diclorometano. Se añadieron 0,81 g (2,23 mmoles) de S-tritil-L-cisteinamida, 0,39 ml (2,23 mmoles) de N,N-diisopropiletilamina y 0,85 g (2,23 mmoles) de HATU. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. De la mezcla de reacción el disolvente se eliminó mediante evaporación rotatoria (aprox. 40 °C, aprox. 200 mbar, aprox. 30 min). El producto en bruto se disolvió en diclorometano y se sometió a cromatografía sobre aprox. 70 ml de gel de sílice. Los disolventes usados fueron diclorometano/metanol 20/1 a diclorometano/metanol 5/1. Las fracciones que contenían producto se

combinaron y se concentraron a sequedad a presión reducida. Esto dio 2,38 g (2,03 mmoles, 91 % del teórico, 76% pureza) del producto deseado.

EM-CL (Procedimiento 1):  $R_t = 1,37$  min,  $m/z = 897$  (M+H)<sup>+</sup>

### Ejemplo 26A

- 5 Alil-O-({(3S)-4-([[(2R)-1-anilino-1-oxo-3-(tritisulfanil)propan-2-il]amino]-3-[(terc-butoxicarbonil)amino]-4-oxobutil]carbamoyl)-N-(terc-butoxicarbonil)-L-tirosinato

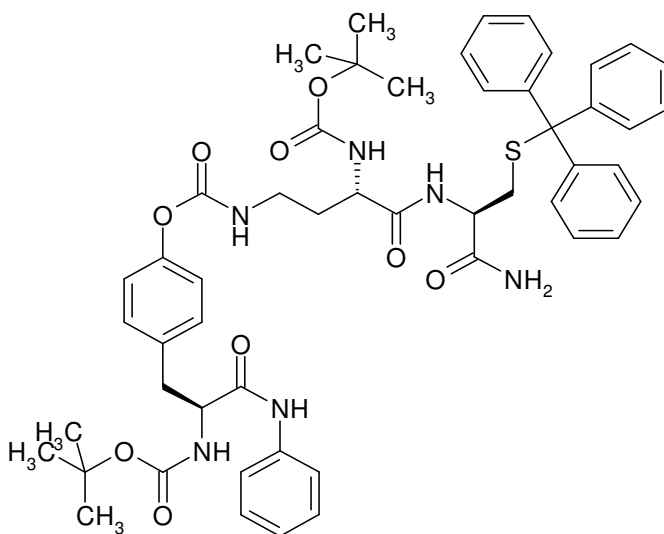


- 10 456 mg (0,68 mmoles) del compuesto del Ejemplo 2A se disolvieron en 8 ml de diclorometano. Se añadieron 300 mg (0,68 mmoles) de N-fenil-S-tritil-L-cisteinamida, 0,12 ml (0,68 mmoles) de N,N-diisopropiletilamina y 260 mg (0,68 mmoles) de HATU. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 h. De la mezcla de reacción el disolvente se eliminó a presión reducida. El producto en bruto se purificó en dos porciones por RP-HPLC preparativa sobre una columna C18 con un gradiente de agua/metanol de 9/1 a 1/9. Las fracciones que contenían producto se combinaron y se concentraron a sequedad a presión reducida. Esto dio 361 mg (0,37 mmoles, 53 % del teórico) del producto deseado.

- 15 EM-CL (Procedimiento 1):  $R_t = 1,48$  min,  $m/z = 987$  (M+H)<sup>+</sup>

### Ejemplo 1B

terc-Butil-[(2S)-1-([[(2R)-1-amino-1-oxo-3-(tritisulfanil)propan-2-il]amino]-4-[[4-[(2S)-3-anilino-2-[(terc-butoxicarbonil)amino]-3-oxopropil]fenoxi]carbonil]amino]-1-oxobutan-2-il]carbamato



5 250 mg (0,29 mmoles) del compuesto del Ejemplo 1 se disolvieron en 10 ml de diclorometano. Se añadieron 40 mg (0,43 mmoles) de anilina, 164 mg (0,43 mmoles) de HATU y 75  $\mu$ l (0,43 mmoles) de DIEA. La mezcla de reacción se calentó durante 30 min en un tubo cerrado a 60 °C en un sintetizador de microondas. El producto en bruto se concentró a sequedad a presión reducida. El producto en bruto se disolvió en metanol y se purificó por RP-HPLC preparativa sobre una columna C18 con un gradiente de agua/metanol dando 271 mg de producto (88 % del teórico).

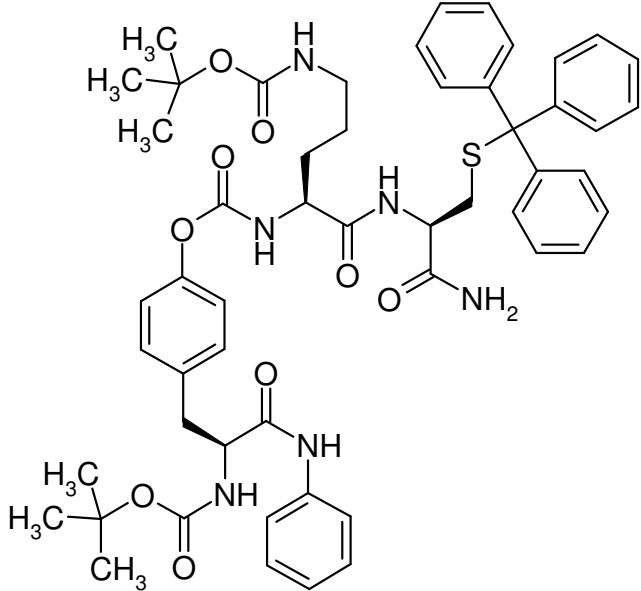
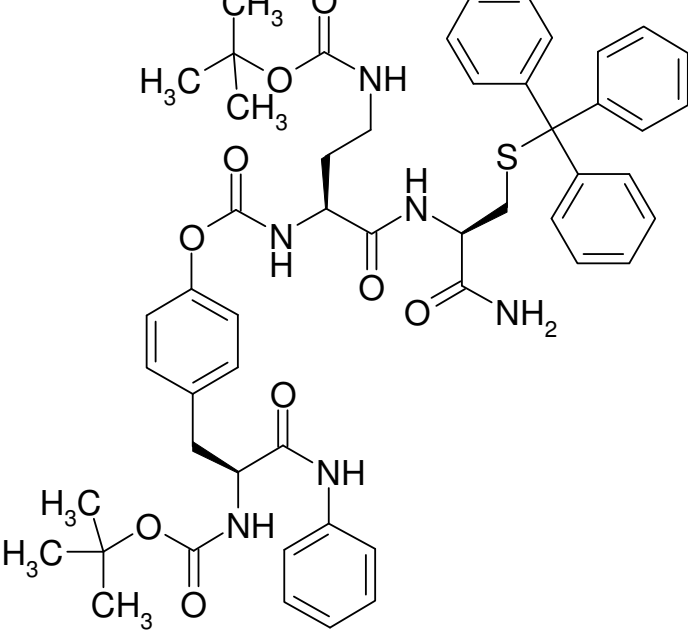
EM-CL (Procedimiento 1):  $R_t = 1,31$  min,  $m/z = 945$  (M+H)<sup>+</sup>

Usando los ácidos carboxílicos apropiados (Ejemplos de trabajo 2 a 12), los ejemplos de la siguiente tabla se preparan análogamente al Ejemplo 1B.

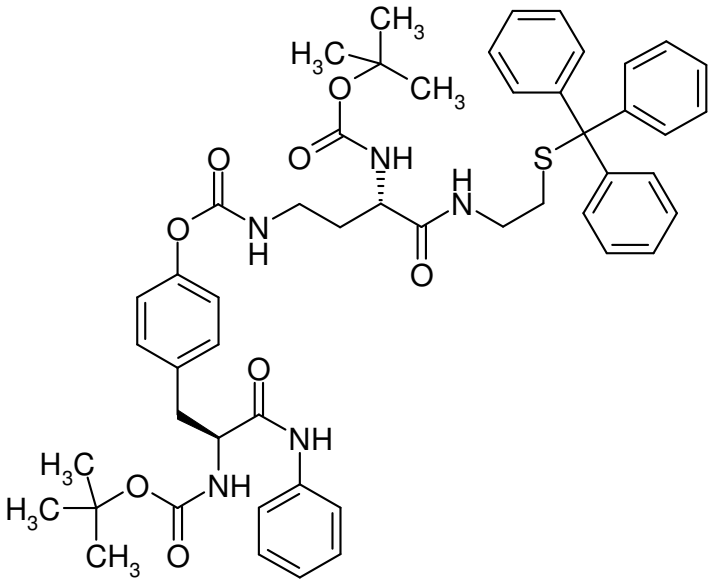
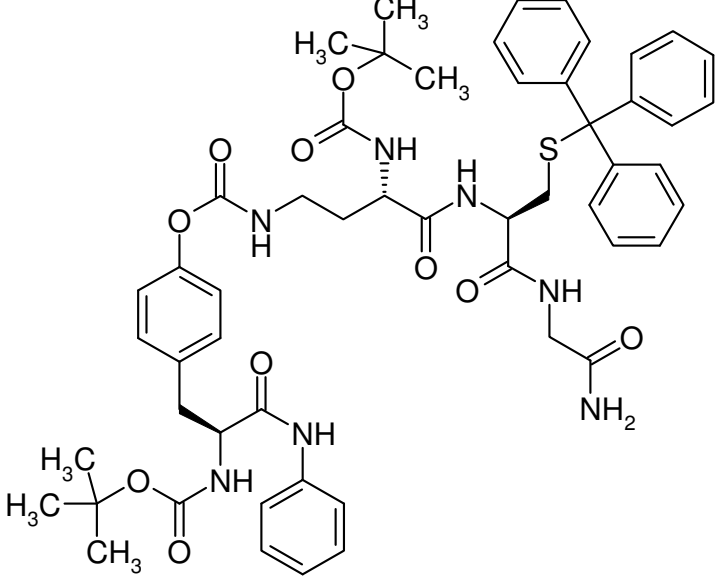
10

| Ejemplo | Estructura | Caracterización                                                                           |
|---------|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| 2B      |            | EM-CL (Procedimiento 1):<br>$R_t = 1,34$ y<br>1,37 min,<br>$m/z = 959$ (M+H) <sup>+</sup> |
| 3B      |            | EM-CL (Procedimiento 1):<br>$R_t = 1,32$ min,<br>$m/z = 959$ (M+H) <sup>+</sup>           |

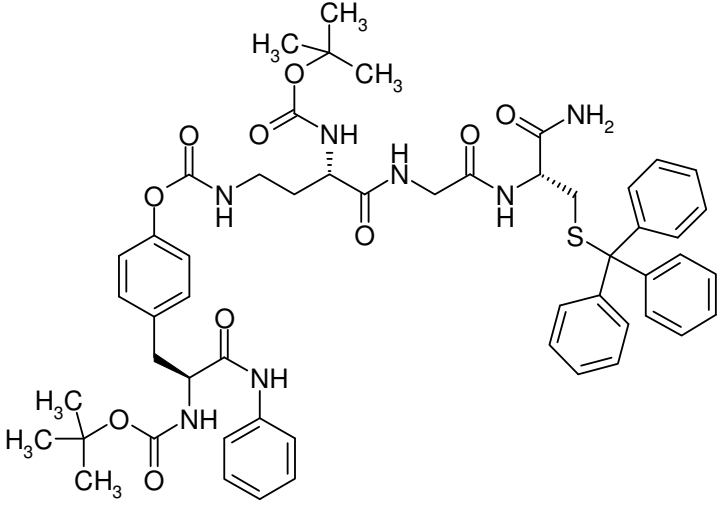
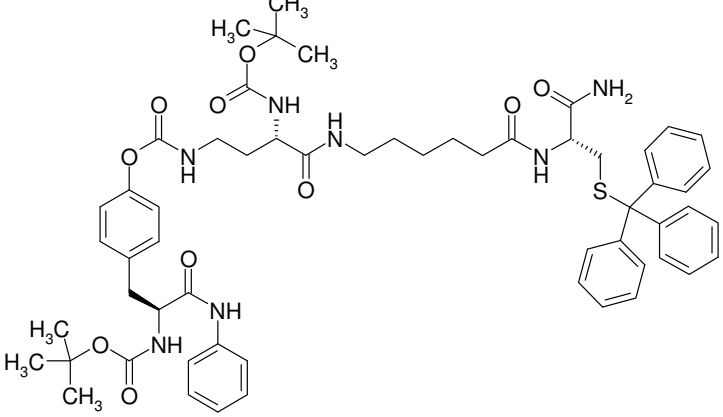
(continuación)

| Ejemplo | Estructura                                                                           | Caracterización                                                              |
|---------|--------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| 4B      |    | EM-CL (Procedimiento 1):<br>$R_t = 1,32 \text{ min,}$<br>$m/z = 959 (M+H)^+$ |
| 5B      |  | EM-CL (Procedimiento 1):<br>$R_t = 1,30 \text{ min,}$<br>$m/z = 945 (M+H)^+$ |

(continuación)

| Ejemplo | Estructura                                                                          | Caracterización                                                               |
|---------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| 6B      |   | EM-CL (Procedimiento 1):<br>$R_t = 1,43 \text{ min,}$<br>$m/z = 903 (M+H)^+$  |
| 7B      |  | EM-CL (Procedimiento 1):<br>$R_t = 1,29 \text{ min,}$<br>$m/z = 1002 (M+H)^+$ |

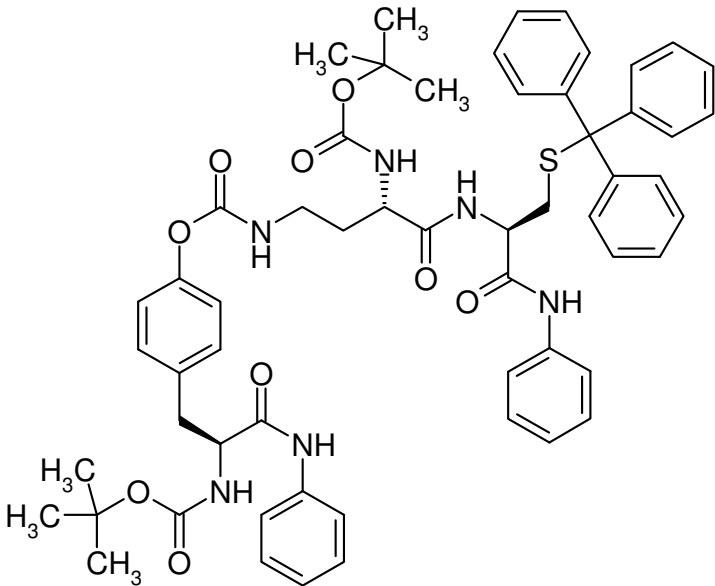
(continuación)

| Ejemplo | Estructura                                                                          | Caracterización                                                             |
|---------|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| 8B      |   | EM-CL (Procedimiento 1):<br>Rt = 1,27 min,<br>m/z = 1002 (M+H) <sup>+</sup> |
| 9B      |  | EM-CL (Procedimiento 1):<br>Rt = 1,29 min,<br>m/z = 1058 (M+H) <sup>+</sup> |

(continuación)

| Ejemplo | Estructura | Caracterización                                                            |
|---------|------------|----------------------------------------------------------------------------|
| 10B     |            | EM-CL (Procedimiento 2):<br>Rt = 2,42 min,<br>m/z = 801 (M+H) <sup>+</sup> |
| 11B     |            | EM-CL (Procedimiento 1):<br>Rt = 1,36 min,<br>m/z = 931 (M+H) <sup>+</sup> |

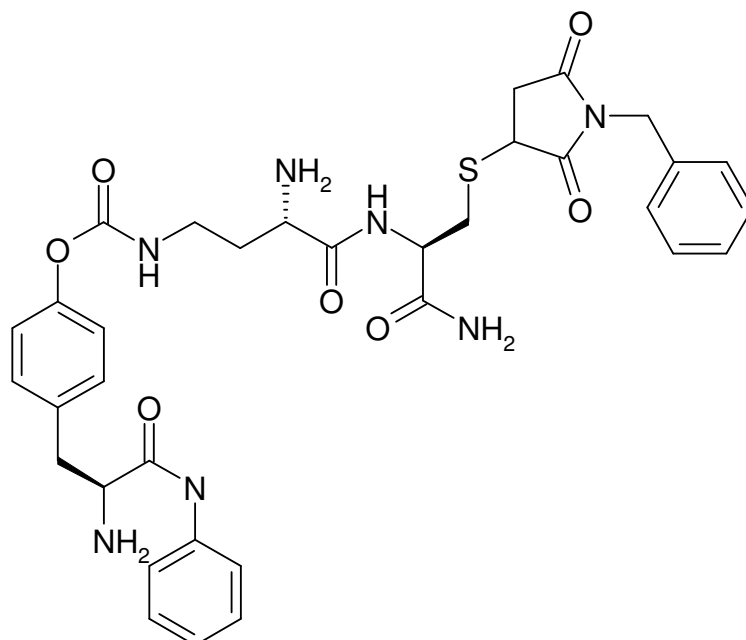
(continuación)

| Ejemplo | Estructura                                                                         | Caracterización                                                             |
|---------|------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| 12B     |  | EM-CL (Procedimiento 1):<br>Rt = 1,48 min,<br>m/z = 1022 (M+H) <sup>+</sup> |

**Ejemplo 1C**

5

O-[[[(3S)-3-Amino-4-((2R)-1-amino-3-[(1-bencil-2,5-dioxopirrolidin-3-il)sulfanil]-1-oxopropan-2-il)amino)-4-oxobutyl]carbamoil]-N-fenil-L-tirosinamida



10

238 mg (0,25 mmoles) del compuesto del Ejemplo 1B se disolvieron en 10 ml de dicloroetano. Se añadieron 0,12 ml de trietilsilano, aprox. 10 ml de ácido trifluoroacético y aprox. 0,5 ml de agua. La mezcla de reacción se agitó durante aprox. 30 min a temperatura ambiente. Se añadieron 100 ml de dicloroetano y la mezcla de reacción se evaporó a presión reducida a aprox. 1 ml de volumen de disolvente. Se añadieron aprox. 100 ml de agua y la mezcla de reacción se extrajo tres veces con aprox. 50 ml de diclorometano. A la fase acuosa se añadieron 15 ml de ácido acético. La fase acuosa se congeló y se liofilizó. Los liofilizados se disolvieron en aprox. 50 ml de metanol y se añadieron 0,183 mg (0,98 mmoles) de N-bencilmaleimida. La mezcla de reacción se agitó durante la noche a

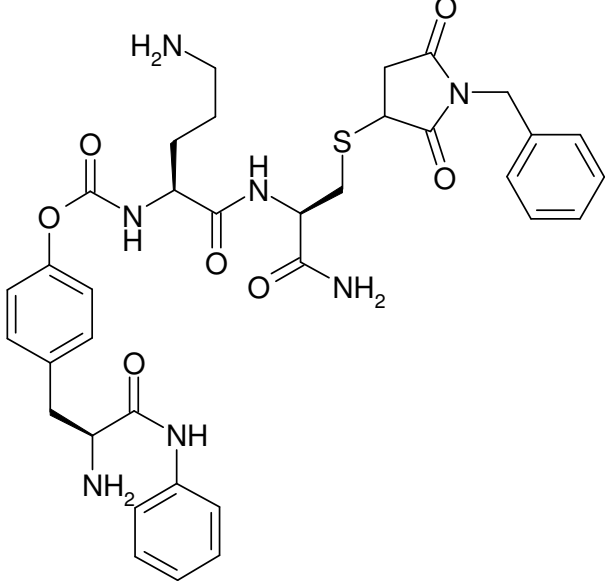
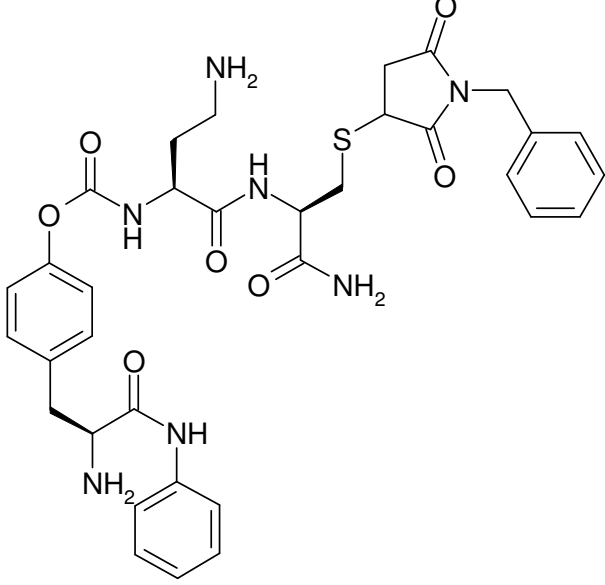
5

10

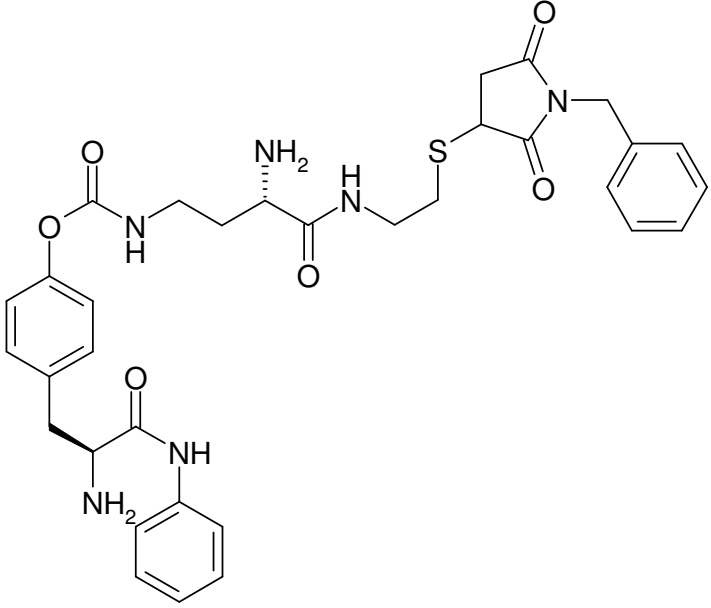
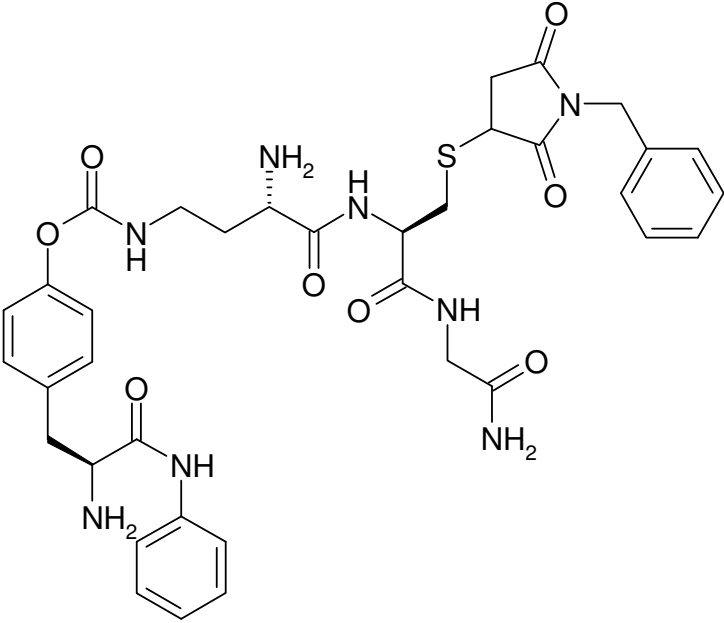
10

| Ejemplo | Estructura | Caracterización                                                              |
|---------|------------|------------------------------------------------------------------------------|
| 2C      |            | EM-CL (Procedimiento 1): $R_t = 0,64$ min,<br>$m/z = 704$ (M+H) <sup>+</sup> |
| 3C      |            | EM-CL (Procedimiento 1): $R_t = 0,63$ min,<br>$m/z = 704$ (M+H) <sup>+</sup> |

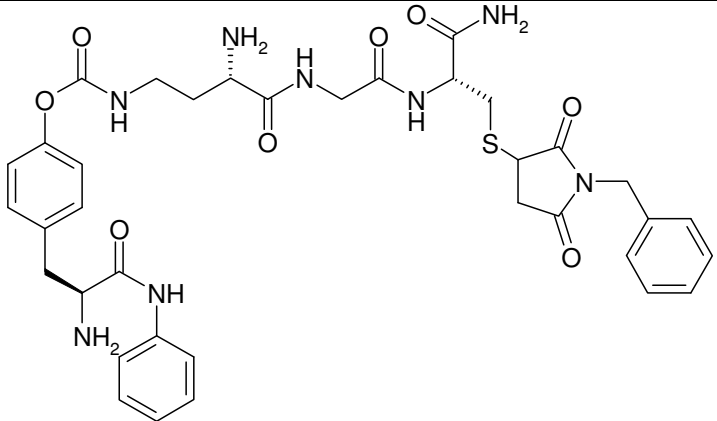
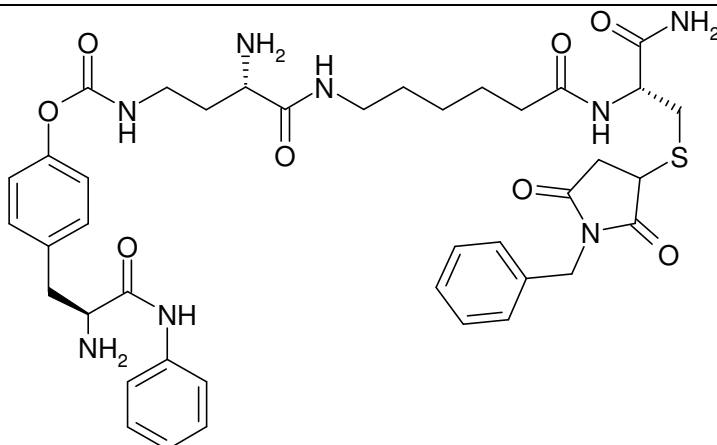
(continuación)

|    |                                                                                     |                                                             |
|----|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| 4C |   | EM-CL (Procedimiento 1): Rt = 0,61 min,<br>m/z = 704 (M+H)+ |
| 5C |  | EM-CL (Procedimiento 1): Rt = 0,55 min,<br>m/z = 690 (M+H)+ |

(continuación)

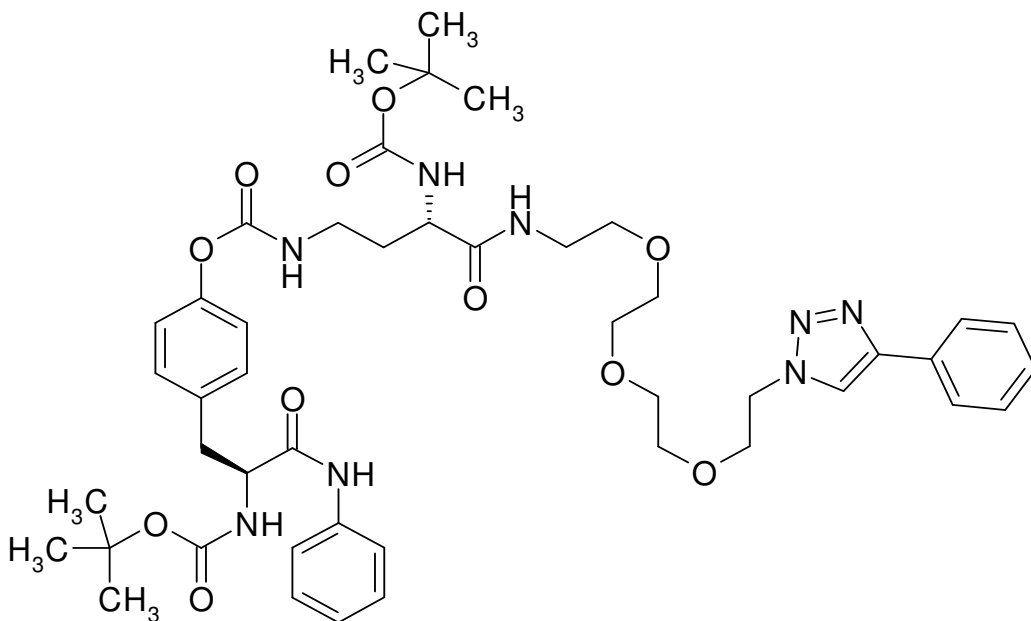
|    |                                                                                     |                                                                                |
|----|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| 6C |   | <p>EM-CL (Procedimiento 1): Rt = 0,67 min,<br/>m/z = 647 (M+H)<sup>+</sup></p> |
| 7C |  | <p>EM-CL (Procedimiento 1): Rt = 0,61 min,<br/>m/z = 747 (M+H)<sup>+</sup></p> |

(continuación)

|    |                                                                                     |                                                                         |
|----|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| 8C |   | EM-CL (Procedimiento 1): Rt = 0,61 min,<br>m/z = 747 (M+H) <sup>+</sup> |
| 9C |  | EM-CL (Procedimiento 2): Rt = 1,53 min,<br>m/z = 803 (M+H) <sup>+</sup> |

**Ejemplo 10Ca**

5 N-alfa-(terc-butoxicarbonil)-O-[[[(14S)-14-[(terc-butoxicarbonil)amino]-13-oxo-1-(4-fenil-1H-1,2,3-triazol-1-il)-3,6,9-trioxa-12-azahexadecan-16-il]carbamoil]-N-fenil-L-tirosinamida

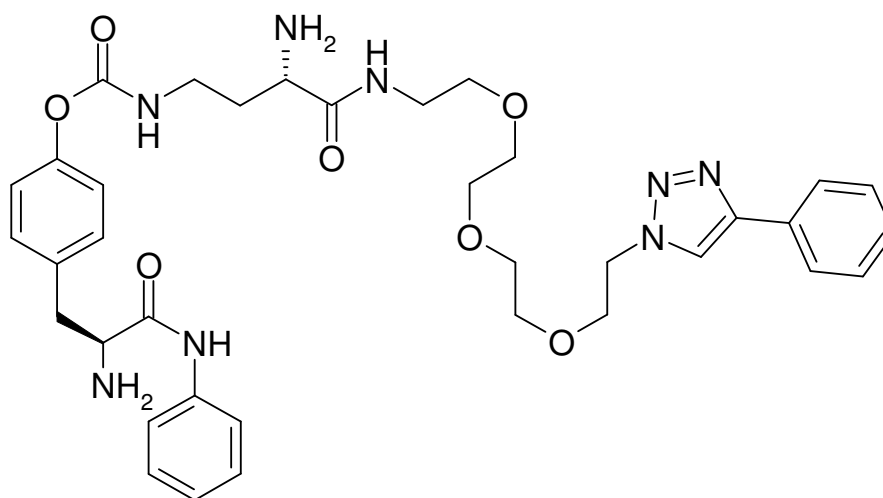


40 mg (0,05 mmoles) del compuesto del Ejemplo 10B se disolvieron en una mezcla de 4 ml de DMSO y 1 ml de agua. Se añadieron 10 mg (0,10 mmoles) de fenilacetileno, 0,8 mg de sulfato de cobre (II) (0,005 mmoles), 445 mg (2,25 mmoles) de ascorbato de sodio y 1,8 mg (0,01 mmoles) de 1,10-fenantrolina. El pH de la mezcla de reacción se ajustó a 4 mediante la adición de 3 a 4 gotas de ácido sulfúrico al 10 % y la mezcla de reacción se agitó durante la noche. La mezcla de reacción se diluyó con aprox. 10 ml de agua y se extrajo dos veces con aprox. 10 ml de acetato de etilo. Las fases orgánicas combinadas se evaporaron a sequedad y se redisolviaron en aprox. 5 ml de metanol y se purificaron por RP-HPLC preparativa sobre C18 con un gradiente de agua/metanol. Las fracciones que contenían producto se combinaron y se concentraron a sequedad a presión reducida. Esto dio 36 mg (0,04 mmoles, 79 % del teórico) del producto deseado.

10 EM-CL (Procedimiento 1):  $R_t = 1,12$  min,  $m/z = 903$  (M+H)<sup>+</sup>

#### Ejemplo 10Cb

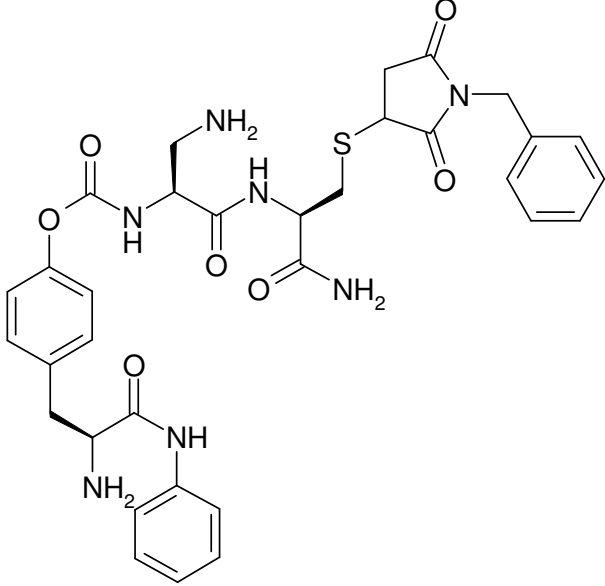
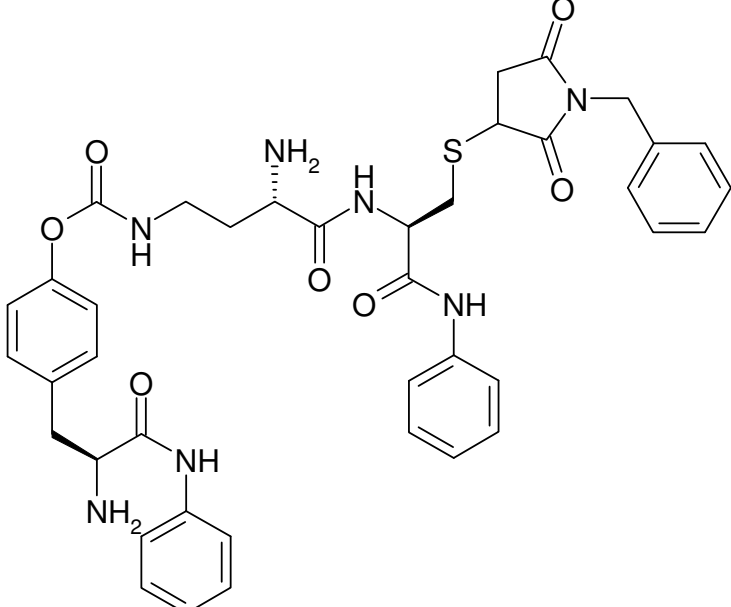
O-[[[(14S)-14-Amino-13-oxo-1-(4-fenil-1H-1,2,3-triazol-1-il)-3,6,9-trioxa-12-azahexadecan-16-il]carbamoil]-N-fenil-L-tirosinamida



15 36 mg (0,04 mmoles) del compuesto del Ejemplo 10Ca se disolvieron en 2,5 ml de dicloroetano. Se añadieron 0,02 ml de trietilsilano, aprox. 2,5 ml de ácido trifluoroacético y aprox. 0,1 ml de agua. La mezcla de reacción se agitó durante aprox. 30 min a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se evaporó a sequedad, y se redisolvió en aprox. 15 ml de agua. La mezcla de reacción se extrajo tres veces con aprox. 10 ml de diclorometano. Después de  
20 añadir aprox. 0,5 ml de ácido acético, la fase acuosa se liofilizó. El liofilizado se redisolvió en aprox. 5 ml de metanol y se purificó por RP-HPLC preparativa sobre C18 con un gradiente de agua/metanol. Las fracciones que contenían producto se combinaron y se concentraron a sequedad a presión reducida. Esto dio 13 mg (0,02 mmoles, 45 % del teórico) del producto deseado.

EM-CL (Procedimiento 1):  $R_t = 0,57$  min,  $m/z = 703$  (M+H)<sup>+</sup>

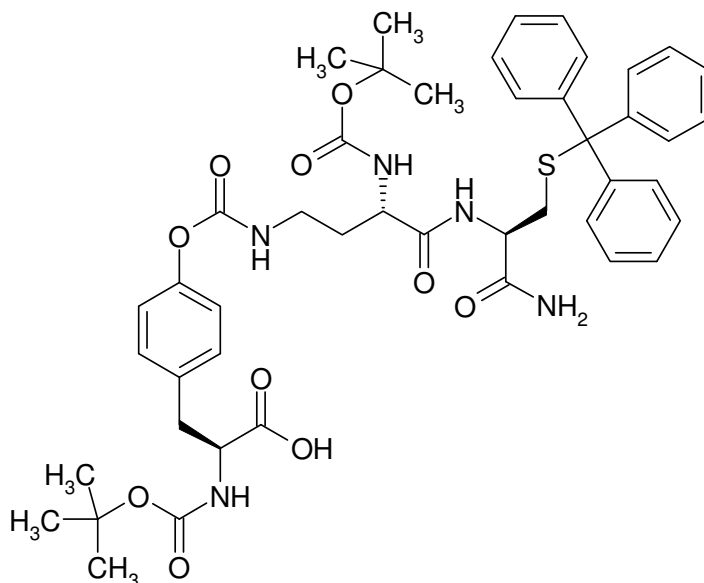
25 Usando los precursores apropiados (Ejemplos 11B y 12B), los ejemplos de la siguiente tabla se preparan análogamente al Ejemplo 1C.

| Ejemplo | Estructura                                                                          | Caracterización                                             |
|---------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| 11C     |   | EM-CL (Procedimiento 1): Rt = 0,60 min,<br>m/z = 676 (M+H)+ |
| 12C     |  | EM-CL (Procedimiento 2): Rt = 1,69 min,<br>m/z = 767 (M+H)+ |

## Ejemplos de trabajo

## Ejemplo 1

5 O-({(3S)-4-{{(2R)-1-Amino-1-oxo-3-(tritisulfanil)propan-2-il}amino}-3-[(terc-butoxicarbonil)-amino]-4-oxobutil}carbamoil)-N-(terc-butoxicarbonil)-L-tirosina



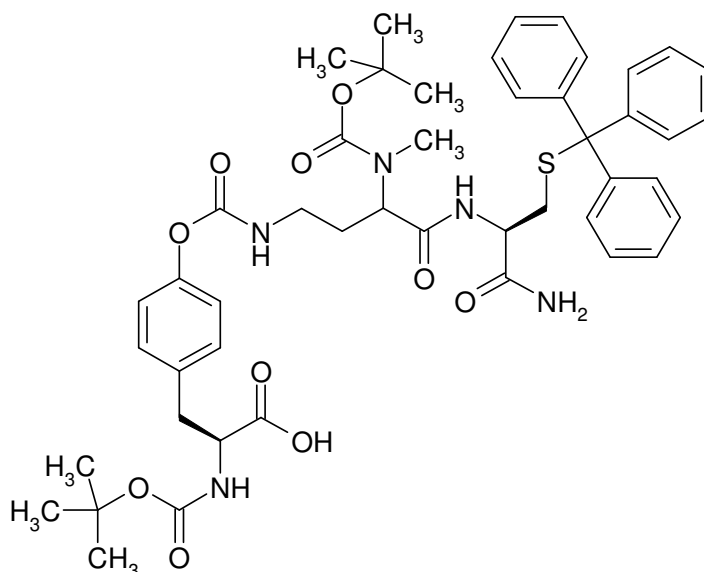
4,14 g (4,55 mmoles) del compuesto del Ejemplo 3A se disolvieron en 90 ml de tetrahidrofurano. Se añadieron 3,17 ml (22,8 mmoles) de trietilamina, 0,86 ml (22,8 mmoles) de ácido fórmico y 0,526 g (0,455 mmoles) de tetraquis(trifenilfosfina)paladio (0). La mezcla de reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La reacción se diluyó con aprox. 100 ml de agua, y se extrajo dos veces con aprox. 100 ml de diclorometano. Las fases orgánicas combinadas se extrajeron con salmuera, se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron a sequedad a presión reducida. El producto en bruto se disolvió en diclorometano y se sometió a cromatografía sobre aprox. 500 ml de gel de sílice. Los disolventes usados fueron diclorometano, diclorometano/metanol 20/1 y diclorometano/metanol 1/1. Las fracciones que contenían producto se combinaron y se concentraron a sequedad a presión reducida. Esto dio 2,62 g de producto en bruto con una pureza del 94,5 %. El producto se purificó adicionalmente por RP-HPLC preparativa sobre C18 con un gradiente de agua/metanol dando 2,35 g (2,70 mmoles, 59 % del teórico) de producto puro.

EM-CL (Procedimiento 1):  $R_t = 1,22$  min,  $m/z = 871$  ( $M+H$ )<sup>+</sup>

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>,  $\delta$ ppm):  $\delta = 7,92$  (d, 1H), 7,65 (t, 1H), 7,28-7,35 (m, 12H), 7,25-7,28 (t, 3H), 7,15-7,20 (m, 4H), 6,95 (d, 2H), 4,29 (q, 1H), 4,00 (m, 1H), 3,92 (m, 1H), 3,11 (m, 3H), 2,90 (m, 1H), 2,36 (m, 2H), 1,84 (m, 1H), 1,68 (m, 1H), 1,34 (d, 18H).

## Ejemplo 2

O-[(4-[[[(2R)-1-Amino-1-oxo-3-(tritisulfanil)propan-2-il]amino]-3-[(terc-butoxicarbonil)-(metil)amino]-4-oxobutil]carbamoil]-N-(terc-butoxicarbonil)-L-tirosina



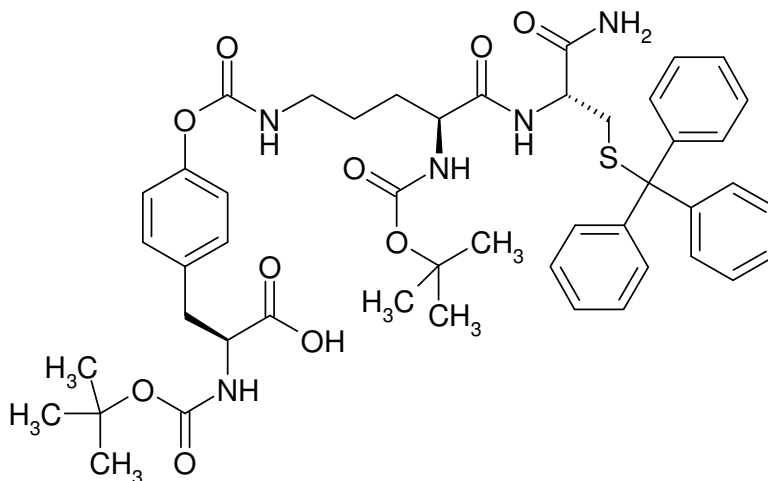
2,2 g (2,38 mmoles) del compuesto del Ejemplo 8A se disolvieron en 48 ml de tetrahidrofurano. Se añadieron 1,66 ml (11,9 mmoles) de trietilamina, 0,45 ml (11,9 mmoles) de ácido fórmico y 0,275 g (0,238 mmoles) de tetraquis(trifenilfosfina)paladio (0). La mezcla de reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La reacción se diluyó con aprox. 50 ml de agua y se extrajo dos veces con aprox. 50 ml de diclorometano. Las fases orgánicas combinadas se extrajeron con salmuera, se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron a sequedad a presión reducida. El producto en bruto se disolvió en diclorometano y se sometió a cromatografía sobre aprox. 100 g de gel de sílice. Los disolventes usados fueron diclorometano, diclorometano/metanol 50/1 y diclorometano/metanol 4/1. Las fracciones que contenían producto se combinaron y se concentraron a sequedad a presión reducida. Esto dio 1,44 g (1,61 mmoles, 68 % del teórico) de producto como una mezcla de diaestereómeros.

EM-CL (Procedimiento 1):  $R_t = 1,20$  y  $1,24$  min,  $m/z = 884$  ( $M+H$ )<sup>+</sup>

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>,  $\delta$ /ppm):  $\delta = 8,00$  (m, 1H), 7,65-7,90 (m, 4H), 7,18-7,35 (m, 18H), 7,10 (m, 2H), 6,96 (m, 4H), 4,60 (m, 1H), 4,46 (m, 1H), 4,30 (m, 2H), 4,05 (m, 2H), 3,00 (m, 4H), 2,75 (m, 6H), 2,36 (m, 3H), 2,00 (m, 2H), 1,82 (m, 2H), 1,40 (m, 3H), 1,35 (s, 18H).

### Ejemplo 3

N<sup>2</sup>-(terc-Butoxicarbonil)-N<sup>5</sup>-[4-[(2S)-2-[(terc-butoxicarbonil)amino]-2-carboxietil]fenoxi)-carbonil]-L-ornitil-S-tritil-L-cisteinamida



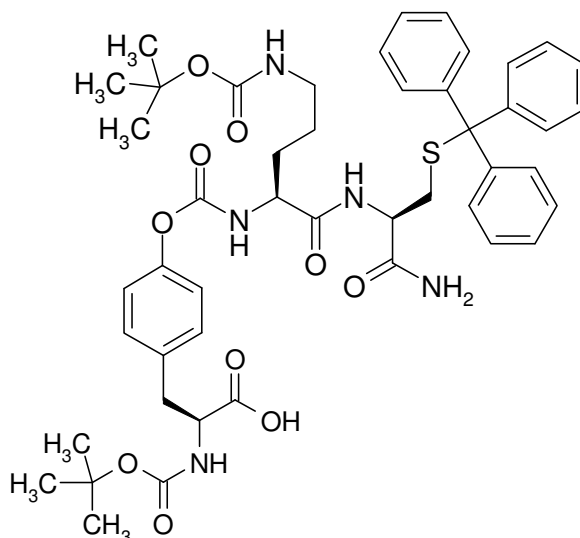
3,06 g (2,33 mmoles) del compuesto del Ejemplo 10A se disolvieron en 46 ml de tetrahidrofurano. Se añadieron 1,63 ml (11,6 mmoles) de trietilamina, 0,44 ml (11,6 mmoles) de ácido fórmico y 0,265 g (0,233 mmoles) de tetraquis(trifenilfosfina)paladio (0). La mezcla de reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La reacción se diluyó con aprox. 50 ml de agua y se extrajo dos veces con aprox. 50 ml de diclorometano. Las fases orgánicas combinadas se extrajeron con salmuera, se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron a sequedad a presión reducida. El producto en bruto se disolvió en diclorometano y se sometió a cromatografía sobre aprox. 500 ml de gel de sílice. Los disolventes usados fueron diclorometano, diclorometano/metanol 40/1 y diclorometano/metanol 1/1. Las fracciones que contenían producto se combinaron y se concentraron a sequedad a presión reducida. Esto dio 1,40 g de producto en bruto con una pureza del 86 %. El producto se purificó adicionalmente por RP-HPLC preparativa sobre una columna C18 con un gradiente de agua/metanol dando 2 fracciones: 0,93 g de producto (45 % del teórico).

EM-CL (Procedimiento 1):  $R_t = 1,18$  min,  $m/z = 885$  ( $M+H$ )<sup>+</sup>

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>,  $\delta$ /ppm):  $\delta = 7,89$  (d, 1H), 7,65 (t, 1H), 7,25-7,35 (m, 12H), 7,20-7,25 (m, 6H), 7,10-7,20 (m, 3H), 6,95 (d, 2H), 4,29 (m, 1H), 4,05 (m, 1H), 3,88 (m, 1H), 3,11 (d, 1H), 3,00 (m, 4H), 2,75 (m, 2H), 2,36 (m, 3H), 1,64 (m, 1H), 1,51 (m, 3H), 1,36 (s, 9H), 1,32 (s, 9H).

### Ejemplo 4

N<sup>5</sup>-(terc-Butoxicarbonil)-N<sup>2</sup>-[4-[(2S)-2-[(terc-butoxicarbonil)amino]-2-carboxietil]fenoxi)-carbonil]-L-ornitil-S-tritil-L-cisteinamida



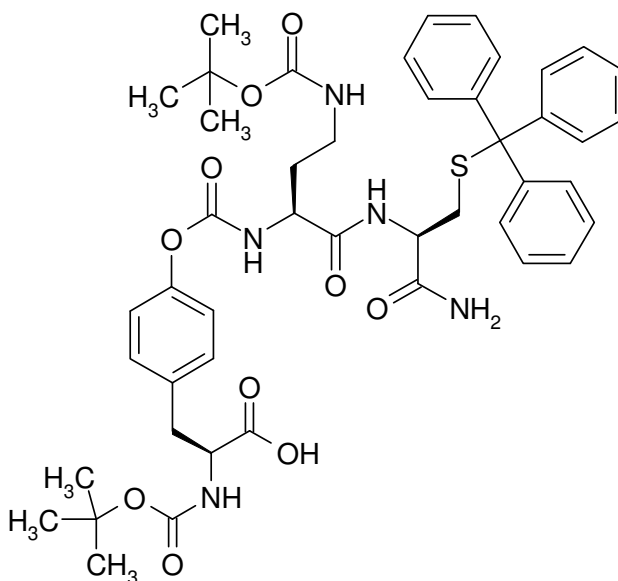
5,27 g (5,65 mmoles) del compuesto del Ejemplo 12A se disolvieron en aprox. 60 ml de tetrahidrofurano. Se añadieron 2,1 ml (15,2 mmoles) de trietilamina, 0,57 ml (15,2 mmoles) de ácido fórmico y 0,35 g (0,30 mmoles) de tetraquis(trifenilfosfina)paladio (0). La mezcla de reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La reacción se diluyó con aprox. 60 ml de agua y se extrajo dos veces con aprox. 50 ml de diclorometano. Las fases orgánicas combinadas se extrajeron con salmuera, se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron a sequedad a presión reducida. El producto en bruto se disolvió en diclorometano y se sometió a cromatografía sobre aprox. 500 ml de gel de sílice. Los disolventes usados fueron diclorometano, diclorometano/metanol 20/1 y diclorometano/metanol 1/1. Las fracciones que contenían producto se combinaron y se concentraron a sequedad a presión reducida. El producto en bruto se purificó adicionalmente por RP-HPLC preparativa sobre una columna C18 con un gradiente de agua/metanol dando 1,37 g (24 % del teórico) de producto.

EM-CL (Procedimiento 1):  $R_t = 1,17$  min,  $m/z = 885$  (M+H)<sup>+</sup>

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>,  $\delta$ ppm):  $\delta = 12,6$  (sa, 1H), 8,05 (d, 1H), 7,97 (d, 1H), 7,06 - 7,39 (m, 20H), 6,97 (d, 2H), 6,79 (t, 1H), 4,30 (dd, 1H), 4,07 (m, 1H), 4,00 (m, 1H), 2,85 - 3,04 (m, 3H), 2,30 - 2,40 (m, 2H), 1,65 (m, 1H), 1,41 - 1,60 (m, 4H), 1,37 (s, 9H), 1,32 (s, 9H).

### Ejemplo 5

N-(terc-Butoxicarbonil)-O-[(4R,7S)-4-carbamoyl-13,13-dimetil-6,11-dioxo-1,1,1-trifenil-12-oxa-2-tia-5,10-diazatetradecan-7-il]carbamoyl-L-tirosina



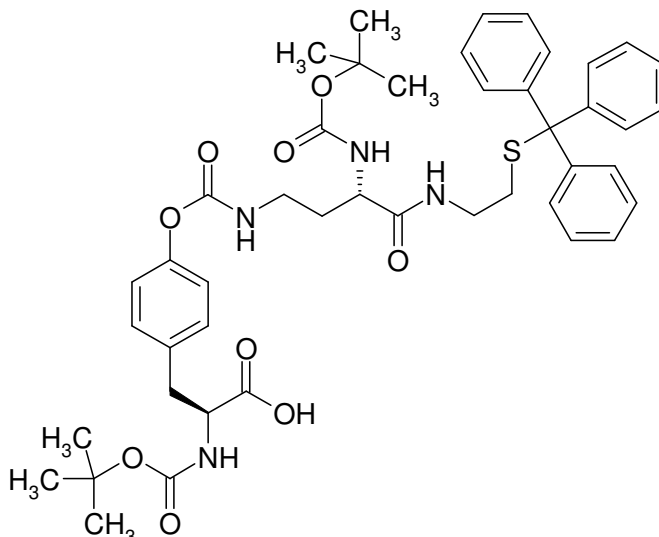
4,91 g (5,40 mmoles) del compuesto del Ejemplo 14A se disolvieron en aprox. 110 ml de tetrahidrofurano. Se añadieron 3,8 ml (27 mmoles) de trietilamina, 1,02 ml (27 mmoles) de ácido fórmico y 0,62 g (0,54 mmoles) de tetraquis(trifenilfosfina)paladio (0). La mezcla de reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La reacción se diluyó con aprox. 60 ml de agua y se extrajo dos veces con aprox. 50 ml de diclorometano. Las fases orgánicas combinadas se extrajeron con salmuera, se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron a sequedad a presión reducida. El producto en bruto se disolvió en diclorometano y se sometió a cromatografía sobre aprox. 500 ml de gel de sílice. Los disolventes usados fueron diclorometano, diclorometano/metanol 40/1 y diclorometano/metanol 1/1. Las fracciones que contenían producto se combinaron y se concentraron a sequedad a presión reducida. El producto en bruto se purificó adicionalmente por RP-HPLC preparativa sobre una columna C18 con un gradiente de agua/metanol dando 1,96 g (42 % del teórico) de producto.

EM-CL (Procedimiento 1):  $R_t = 1,20$  min,  $m/z = 871$  (M+H)<sup>+</sup>

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>,  $\delta$ ppm):  $\delta = 12,6$  (sa, 1H), 8,05 (t, 2H), 7,16 – 7,39 (m, 19H), 7,12 (d, 1H), 6,98 (d, 2H), 6,83 (t, 1H), 4,32 (dd, 1H), 4,00 – 4,11 (m, 2H), 2,92 – 3,12 (m, 3H), 2,81 (m, 1H), 2,30 – 2,40 (m, 2H), 1,82 (m, 1H), 1,67 (m, 1H), 1,38 (s, 9H), 1,32 (s, 9H).

### Ejemplo 6

N-(terc-Butoxicarbonil)-O-[(3S)-3-[(terc-butoxicarbonil)amino]-4-oxo-4-[[2-(tritisulfanil)-etil]amino]butil]carbamoil]-L-tirosina



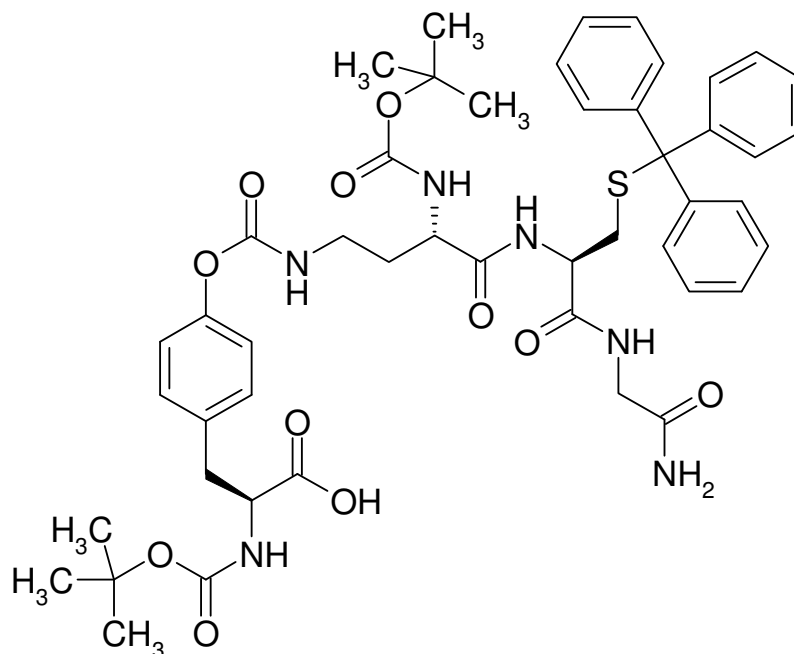
98 mg (0,1 mmoles) del compuesto del Ejemplo 15A se disolvieron en aprox. 4 ml de tetrahidrofurano. Se añadieron 70  $\mu$ l (0,5 mmoles) de trietilamina, 19  $\mu$ l (0,5 mmoles) de ácido fórmico y 11 mg (0,01 mmoles) de tetraquis(trifenilfosfina)paladio (0). La mezcla de reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La reacción se diluyó con aprox. 5 ml de agua y se extrajo dos veces con aprox. 5 ml de diclorometano. Las fases orgánicas combinadas se extrajeron con salmuera, se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron a sequedad a presión reducida. El producto en bruto se purificó por RP-HPLC preparativa sobre una columna C18 con un gradiente de agua/metanol dando 67 mg (79 % del teórico) de producto.

EM-CL (Procedimiento 1):  $R_t = 1,32$  min,  $m/z = 827$  (M+H)<sup>+</sup>

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>,  $\delta$ ppm):  $\delta = 12,6$  (sa, 1H), 7,85 (t, 1H), 7,59 (m, 1H), 7,29 – 7,37 (m, 12H), 7,18 – 7,27 (m, 5H), 7,07 (sa, 1H), 6,98 (d, 2H), 6,88 (d, 1H), 4,07 (m, 1H), 3,90 (m, 1H), 2,93 – 3,09 (m, 5H), 2,81 (m, 1H), 2,20 (t, 2H), 1,78 (m, 1H), 1,64 (m, 1H), 1,36 (s, 9H), 1,32 (s, 9H).

### Ejemplo 7

N-[(2S)-2-[(terc-Butoxicarbonil)amino]-4-[[4-[(2S)-2-[(terc-butoxicarbonil)amino]-2-carboxietil]fenoxi]carbamoil]amino]butanoil]-S-tritil-L-cisteinglicinamida



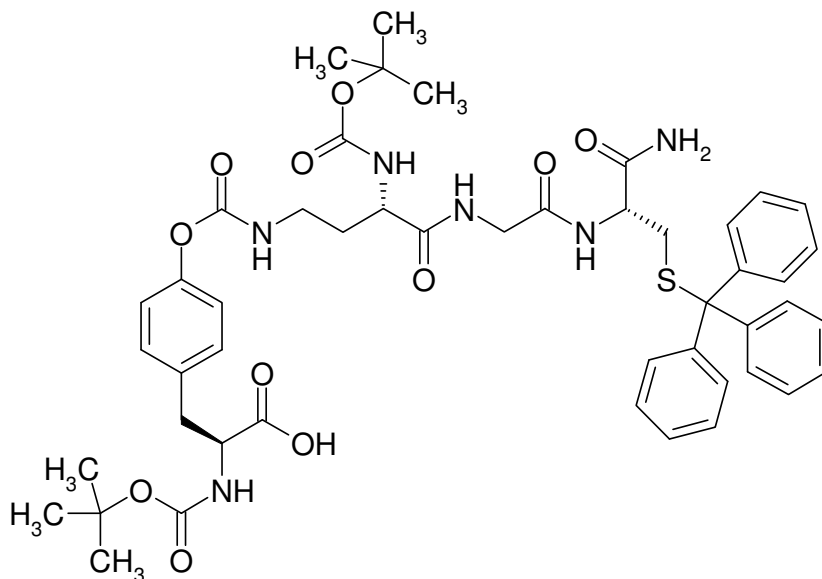
60 mg (0,031 mmoles) del compuesto del Ejemplo 16A se disolvieron en aprox. 3 ml de tetrahidrofurano. Se añadieron 22  $\mu$ l (0,16 mmoles) de trietilamina, 6  $\mu$ l (0,16 mmoles) de ácido fórmico y 4 mg (0,003 mmoles) de tetraquis(trifenilfosfina)paladio (0). La mezcla de reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La reacción se diluyó con aprox. 5 ml de agua y se extrajo dos veces con aprox. 5 ml de diclorometano. Las fases orgánicas combinadas se extrajeron con salmuera, se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron a sequedad a presión reducida. El producto en bruto se purificó por RP-HPLC preparativa sobre una columna C18 con un gradiente de agua/metanol dando 26 mg (86 % del teórico) de producto.

EM-CL (Procedimiento 2):  $R_t = 2,55$  min,  $m/z = 927$  (M+H)<sup>+</sup>

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>,  $\delta$ ppm):  $\delta = 12,6$  (sa, 1H), 8,08 (m, 2H), 7,63 (t, 1H), 7,18 – 7,38 (m, 18H), 7,03 – 7,15 (m, 3H), 6,99 (d, 2H), 4,28 (dd, 1H), 3,95 – 4,10 (m, 2H), 3,64 (dd, 1H), 3,51 (m, 1H), 3,04 – 3,13 (m, 2H), 3,00 (dd, 1H), 2,81 (m, 1H), 2,42 (d, 2H), 1,84 (m, 1H), 1,67 (m, 1H), 1,36 (s, 9H), 1,32 (s, 9H).

### Ejemplo 8

N-[(2S)-2-[(terc-Butoxicarbonil)amino]-4-[[4-[(2S)-2-[(terc-butoxicarbonil)amino]-2-carboxietil]fenoxi)carbonil]amino]butanoil]glicil-S-tritil-L-cisteinamida



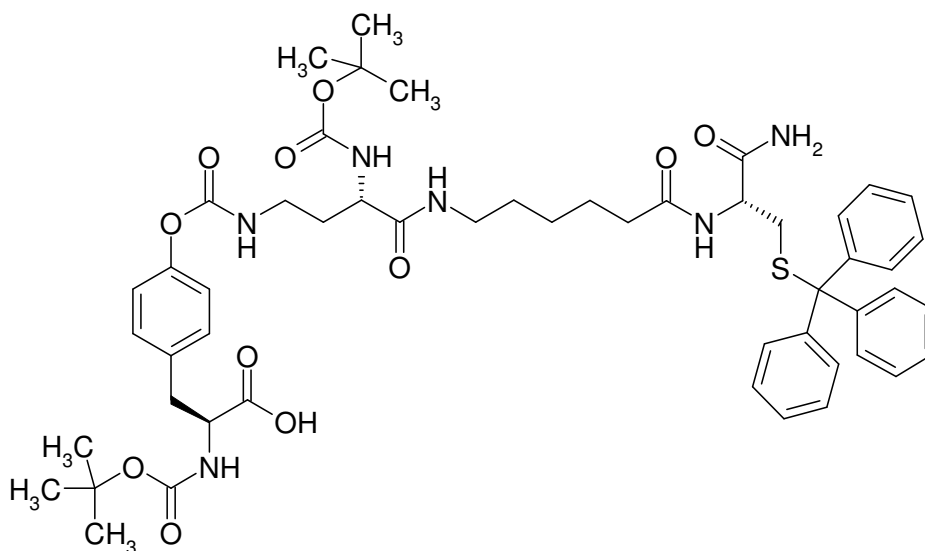
860 mg (0,89 mmoles) del compuesto del Ejemplo 19A se disolvieron en aprox. 20 ml de tetrahidrofurano. Se añadieron 620  $\mu$ l (4,45 mmoles) de trietilamina, 168  $\mu$ l (4,45 mmoles) de ácido fórmico y 103 mg (0,089 mmoles) de tetraquis(trifenilfosfina)paladio (0). La mezcla de reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La reacción se diluyó con aprox. 50 ml de agua y se extrajo dos veces con aprox. 50 ml de diclorometano. Las fases orgánicas combinadas se extrajeron con salmuera, se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron a sequedad a presión reducida. El producto en bruto se purificó por RP-HPLC preparativa sobre una columna C18 con un gradiente de agua/metanol dando 329 mg (38 % del teórico) de producto.

EM-CL (Procedimiento 1):  $R_t = 1,16$  min,  $m/z = 927$  (M+H)<sup>+</sup>

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>,  $\delta$ ppm):  $\delta = 8,16$  (d, 1H), 8,04 (t, 1H), 7,64 (t, 1H), 7,20 – 7,39 (m, 15H), 7,15 (d, 3H), 7,07 (d, 1H), 6,95 (d, 2H), 4,28 (dd, 1H), 4,02 (dd, 1H), 3,91 (m, 1H), 3,76 (m, 2H), 2,99 – 3,15 (m, 3H), 2,88 (m, 1H), 2,29 – 2,42 (m, 2H), 1,86 (m, 1H), 1,68 (m, 1H), 1,37 (s, 9H), 1,33 (s, 9H).

### Ejemplo 9

O-({(3S)-4-[(6-[(2R)-1-Amino-1-oxo-3-(tritisulfanil)propan-2-il]amino)-6-oxohexil]amino)-3-[(terc-butoxicarbonil)amino]-4-oxobutil}carbamoil)-N-(terc-butoxicarbonil)-L-tirosina



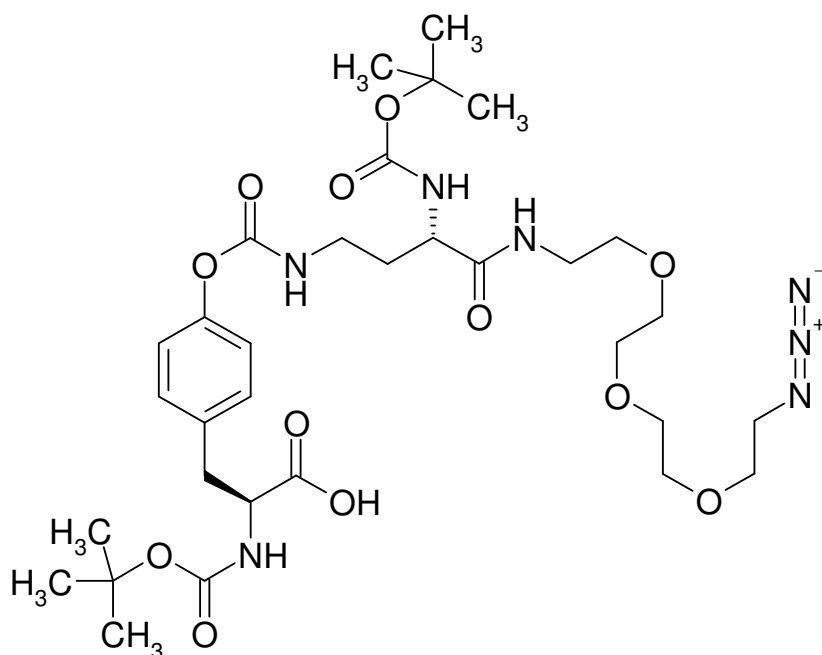
250 mg (0,24 mmoles) del compuesto del Ejemplo 22A se disolvieron en aprox. 5 ml de tetrahidrofurano. Se añadieron 170  $\mu$ l (1,22 mmoles) de trietilamina, 48  $\mu$ l (1,22 mmoles) de ácido fórmico y 28 mg (0,024 mmoles) de tetraquis(trifenilfosfina)paladio (0). La mezcla de reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La reacción se diluyó con aprox. 20 ml de agua y se extrajo dos veces con aprox. 20 ml de diclorometano. Las fases orgánicas combinadas se extrajeron con salmuera, se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron a sequedad a presión reducida. El producto en bruto se purificó por RP-HPLC preparativa sobre una columna C18 con un gradiente de agua/metanol dando 167 mg (65 % del teórico) de producto.

EM-CL (Procedimiento 1):  $R_t = 1,19$  min,  $m/z = 983$  (M+H)<sup>+</sup>

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>,  $\delta$ ppm):  $\delta = 12,6$  (sa, 1H), 8,00 (d, 1H), 7,75 (t, 1H), 7,63 (t, 1H), 7,18 – 7,37 (m, 19H), 7,12 (d, 1H), 7,08 (s, 1H), 7,00 (d, 2H), 4,31 (m, 1H), 4,06 (m, 1H), 3,93 (m, 1H), 2,92 – 3,11 (m, 6H), 2,81 (dd, 1H), 2,30 (m, 2H), 2,10 (t, 2H), 1,79 (m, 1H), 1,66 (m, 1H), 1,40 – 1,54 (m, 3H), 1,37 (s, 9H), 1,32 (s, 9H), 1,23 (m, 2H).

### Ejemplo 10

O-({(14S)-1-Azido-14-[(terc-butoxicarbonil)amino]-13-oxo-3,6,9-trioxa-12-azahexadecan-16-il}carbamoil)-N-(terc-butoxicarbonil)-L-tirosina



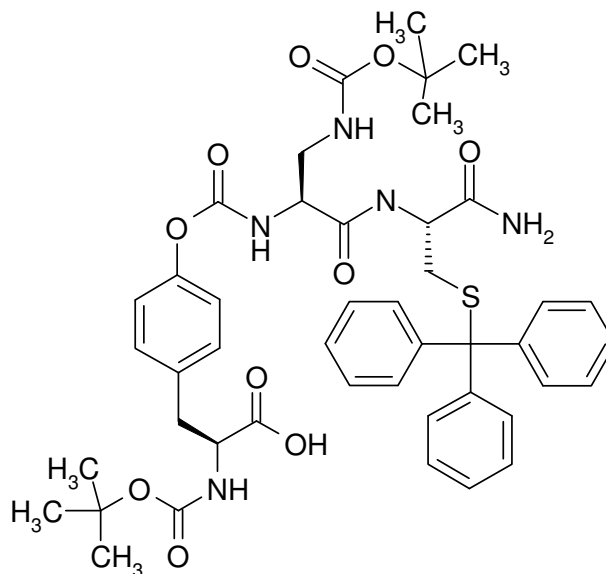
276 mg (0,344 mmoles) del compuesto del Ejemplo 23A se disolvieron en aprox. 15 ml de tetrahidrofurano. Se añadieron 235  $\mu$ l (1,68 mmoles) de trietilamina, 63  $\mu$ l (1,68 mmoles) de ácido fórmico y 39 mg (0,034 mmoles) de tetraquis(trifenilfosfina)paladio (0). La mezcla de reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La reacción se diluyó con aprox. 20 ml de agua y se extrajo dos veces con aprox. 20 ml de diclorometano. Las fases orgánicas combinadas se extrajeron con salmuera, se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron a sequedad a presión reducida. El producto en bruto se purificó por RP-HPLC preparativa sobre una columna C18 con un gradiente de agua/metanol dando 167 mg (65 % del teórico) de producto.

EM-CL (Procedimiento 1):  $R_t = 0,98$  min,  $m/z = 726$  (M+H)<sup>+</sup>

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>,  $\delta$ ppm):  $\delta = 7,85$  (t, 1H), 7,61 (t, 1H), 7,15 (d, 2H), 6,91 – 6,99 (m, 3H), 3,96 (m, 1H), 3,86 (sa, 1H), 3,59 (dd, 2H), 3,46 – 3,57 (m, 9H), 3,40 (m, 4H), 3,13 – 3,29 (m, 2H), 2,98 – 3,11 (m, 3H), 2,82 – 2,92 (m, 1H), 1,79 (m, 1H), 1,66 (m, 1H), 1,38 (s, 9H), 1,34 (s, 9H).

### Ejemplo 11

3-[(terc-Butoxicarbonil)amino]-N-[(4-[(2S)-2-[(terc-butoxicarbonil)amino]-2-carboxietil]-fenoxi)carbonil]-L-alanil-S-tritil-L-cisteinamida



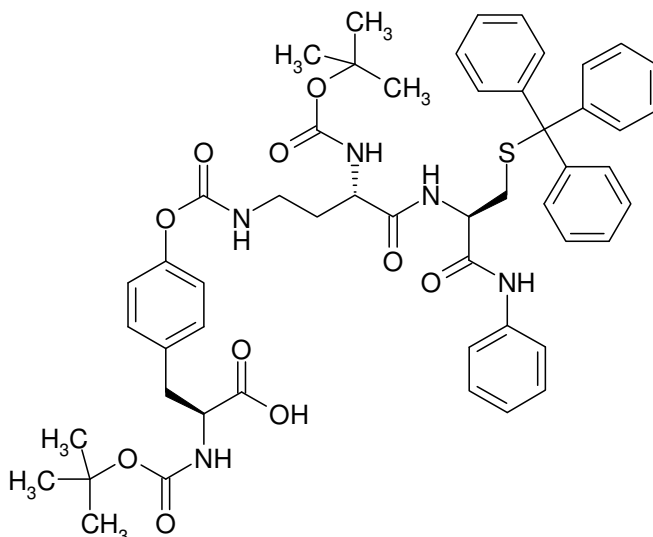
2,38 g (2,03 mmoles) del compuesto del Ejemplo 25A se disolvieron en aprox. 35 ml de tetrahidrofurano. Se añadieron 1,42 ml (10 mmoles) de trietilamina, 0,38 ml (10 mmoles) de ácido fórmico y 0,24 g (0,20 mmoles) de tetraquis(trifenilfosfina)paladio (0). La mezcla de reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La reacción se diluyó con aprox. 20 ml de agua y se extrajo dos veces con aprox. 30 ml de diclorometano. Las fases orgánicas combinadas se extrajeron con salmuera, se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron a sequedad a presión reducida. El producto en bruto se disolvió en diclorometano y se sometió a cromatografía sobre aprox. 70 ml de gel de sílice. Los disolventes usados fueron diclorometano/metanol 10/1 a diclorometano/metanol 1/1. Las fracciones que contenían producto se combinaron y se concentraron a sequedad a presión reducida dando 0,72 g (41 % del teórico) de producto.

10 EM-CL (Procedimiento 1):  $R_t = 1,18$  min,  $m/z = 855$  (M-H)<sup>-</sup>

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>,  $\delta$ ppm):  $\delta = 8,15$  (m, 1H), 7,75 (m, 1H), 7,16 – 7,39 (m, 19H), 6,99 (d, 2H), 6,80 (m, 1H), 4,25 (m, 2H), ), 4,13 (m, 2H), ), 4,00 (m, 2H), 2,92 – 3,12 (m, 3H), 2,81 (m, 1H), 2,40 (m, 2H), 1,38 (s, 9H), 1,32 (s, 9H), 1,10 (m, 4H).

### Ejemplo 12

15 O-({(3S)-4-{{[(2R)-1-Anilino-1-oxo-3-(tritisulfanil)propan-2-il]amino}-3-[(terc-butoxicarbonil)-amino]-4-oxobutil}carbamoil)-N-(terc-butoxicarbonil)-L-tirosina



405 mg (0,41 mmoles) del compuesto del Ejemplo 26A se disolvieron en 10 ml de tetrahidrofurano. Se añadieron 0,29 ml (2,05 mmoles) de trietilamina, 78  $\mu$ l (2,05 mmoles) de ácido fórmico y 47 mg (0,04 mmoles) de tetraquis(trifenilfosfina)paladio (0). La mezcla de reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La reacción se diluyó con aprox. 10 ml de agua, y se extrajo dos veces con aprox. 10 ml de diclorometano. Las fases orgánicas combinadas se extrajeron con salmuera, se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron a sequedad a presión reducida. El producto en bruto se purificó por RP-HPLC preparativa sobre una columna C18 con un gradiente de agua/metanol dando 306 mg (79 % del teórico) de producto.

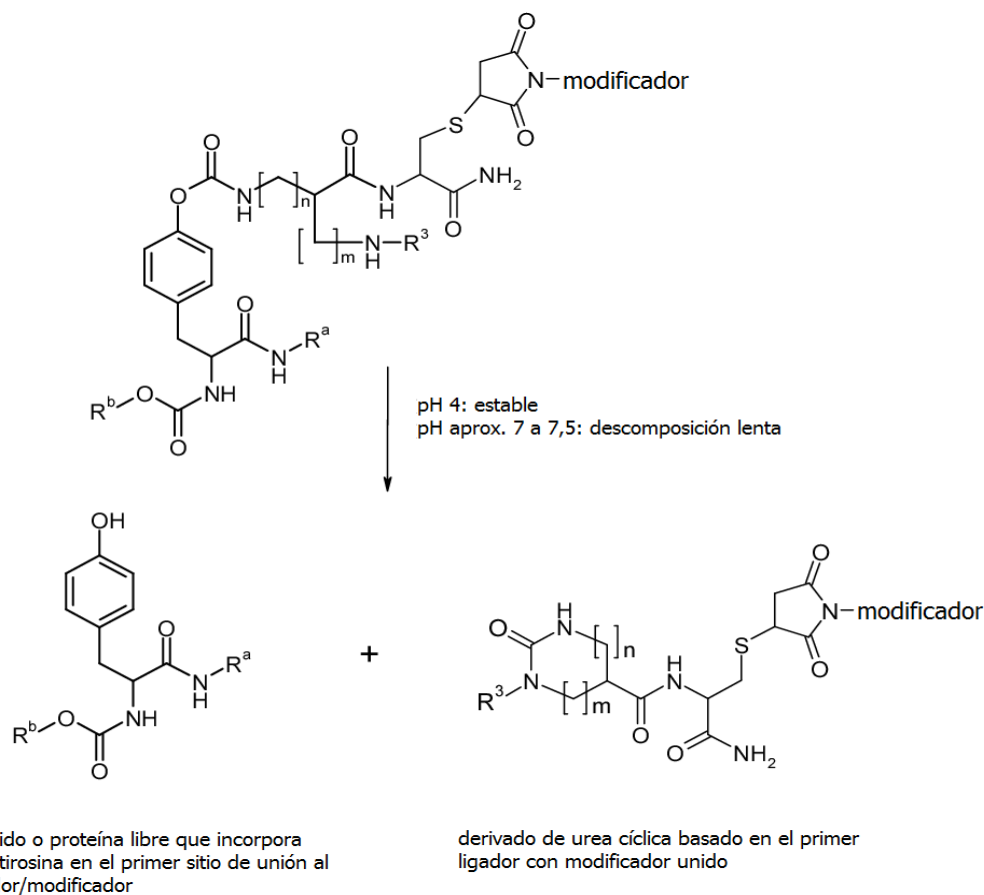
25 EM-CL (Procedimiento 1):  $R_t = 1,39$  min,  $m/z = 947$  (M+H)<sup>+</sup>

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>,  $\delta$ ppm):  $\delta = 8,08$  (d, 1H), 7,60 (m, 1H), 7,55 (m, 1H), 7,28-7,35 (m, 16H), 7,22-7,6 (m, 4H), 7,07 (m, 2H), 6,92 (m, 2H), 4,60 (m, 1H), 4,05 (m, 4H), 2,85-3,20 (m, 4H), 2,80 (m, 1H), 2,45 (m, 2H), 1,85 (m, 1H), 1,66 (m, 1H), 1,35 (d, 18H), 1,28 (m, 2H).

### B. Evaluación de la actividad de ligador del vehículo

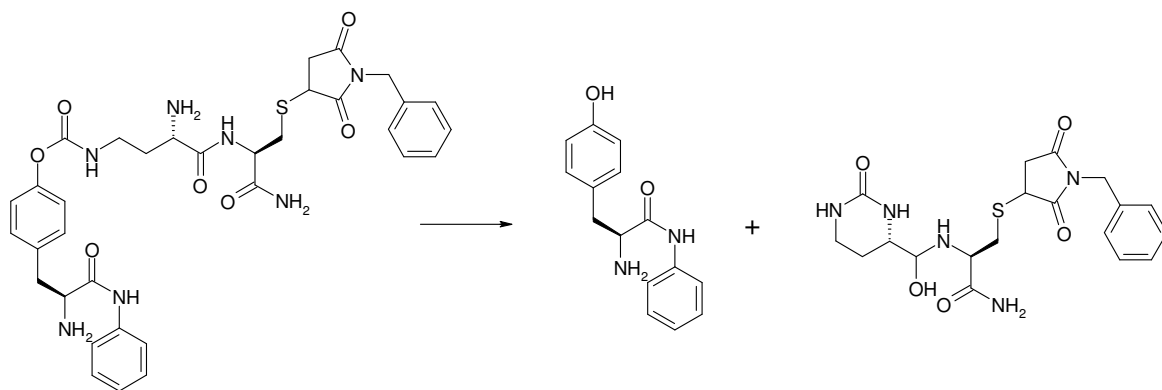
30 La idoneidad de los compuestos según la invención para su uso como ligador de vehículo puede demostrarse usando los siguientes sistemas de ensayo. Para ilustrar la diferente cinética de diferentes ligadores, derivados simples de la molécula basada en tirosina se sintetizaron y se monitorizó la escisión en diferentes momentos de tiempo en tampón a pH 4 y pH 7,4. Basándose en la composición exacta de la estructura de ligador basado en tirosina, la formación de la urea cíclica con liberación concomitante del grupo OH de tirosina libre tiene diferente escisión cinética. Esto puede medirse fácilmente *in vitro* y usarse como indicador para la cinética *in vivo*. El Esquema 3 muestra a modo de ejemplo la descomposición de un profármaco que libera la tirosina que contiene péptido y un derivado de urea cíclico basándose en el anterior ligador con el modificador unido.

### Esquema 3



Con el Ejemplo 1C, O-[[[(3S)-3-amino-4-((2R)-1-amino-3-[(1-bencil-2,5-dioxopirrolidin-3-il)sulfanil]-1-oxopropan-2-il)amino)-4-oxobutil]carbamoil]-N-fenil-L-tirosinamida, la reacción de escisión es del siguiente modo:

#### Esquema 4



5

#### 1) Descripción de la prueba (*in vitro*)

Para los estudios cinéticos con respecto a la estabilidad de los diferentes ligadores, 0,3 mg del compuesto de prueba seco se disuelven en 0,5 ml de acetonitrilo. Para una mejor dilución la muestra se sónica durante aproximadamente 10 segundos. Luego se añade 1,0 ml de las disoluciones de tampón y las muestras se sonicán de nuevo.

#### 10 Composición química de la solución/tampón que se usan:

pH 4: 1 litro de agua desionizada se ajustó a pH 4 con ácido clorhídrico 1 N

pH 7,4: 90 g de cloruro sódico, 13,61 g de dihidrogenofosfato de potasio y 83,35 g de solución de hidróxido sódico 1 M se disolvieron en 1 litro de agua desionizada. Esta solución se diluyó con agua a la tasa de 1:10.

La concentración del compuesto de prueba se analiza por HPLC cada hora durante 24 horas a temperatura ambiente. La cantidad del compuesto de prueba se determina por las áreas de los picos.

Procedimiento de HPLC: Agilent 1100 con DAD (G1315B), bomba binaria (g1312A), inyector automático (G1329A), termostato de la columna (G1330B), columna: Kromasil 100 C18 / 250 mm x 4 mm / 5 µm, temperatura de la columna: 30 °C, eluyente A: agua + 5 ml de ácido perclórico/l, eluyente B: acetonitrilo, gradiente: 0-1,0 min 90 % de A, 10 % de B; 1,0-20,0 min 10 % de A, 90 % de B; 20,0-21,0 min 10 % de A, 90 % de B; 21,0-23,0 min 90 % de A, 10 % de B; 23,0-25,0 min 90 % de A, 10 % de B; velocidad de flujo: 1,5 ml/min, detección: 210 nm, volumen de inyección: 10 µl.

Los resultados de la escisión de los compuestos de prueba se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1:

| <b>Ejemplo nº</b> | <b>% escindido<br/>pH 4, 0 h</b> | <b>% escindido<br/>pH 4, 24 h</b> | <b>% escindido<br/>pH 7,4, 0 h</b> | <b>% escindido<br/>pH 7,4, 6 h</b> | <b>% escindido<br/>pH 7,4, 24 h</b> |
|-------------------|----------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| <b>1C</b>         | <b>0</b>                         | <b>1</b>                          | <b>0</b>                           | <b>7</b>                           | <b>21</b>                           |
| <b>2C</b>         | <b>0</b>                         | <b>0</b>                          | <b>0</b>                           | <b>6</b>                           | <b>21</b>                           |
| <b>3C</b>         | <b>0</b>                         | <b>0</b>                          | <b>0</b>                           | <b>2</b>                           | <b>11</b>                           |
| <b>4C</b>         | <b>0</b>                         | <b>0</b>                          | <b>0</b>                           | <b>23</b>                          | <b>65</b>                           |
| <b>5C</b>         | <b>0</b>                         | <b>0</b>                          | <b>0</b>                           | <b>75</b>                          | <b>100</b>                          |
| <b>6C</b>         | <b>0</b>                         | <b>0</b>                          | <b>0</b>                           | <b>6</b>                           | <b>20</b>                           |
| <b>7C</b>         | <b>0</b>                         | <b>0</b>                          | <b>0</b>                           | <b>6</b>                           | <b>23</b>                           |
| <b>8C</b>         | <b>0</b>                         | <b>0</b>                          | <b>0</b>                           | <b>6</b>                           | <b>23</b>                           |
| <b>9C</b>         | <b>0</b>                         | <b>0</b>                          | <b>0</b>                           | <b>7</b>                           | <b>25</b>                           |
| <b>10Cb</b>       | <b>0</b>                         | <b>0</b>                          | <b>0</b>                           | <b>4</b>                           | <b>14</b>                           |
| <b>11C</b>        | <b>0</b>                         | <b>19</b>                         | <b>0</b>                           | <b>100</b>                         | <b>100</b>                          |
| <b>12C</b>        | <b>0</b>                         | <b>0</b>                          | <b>0</b>                           | <b>29</b>                          | <b>76</b>                           |

Los datos muestran que el Ejemplo 11C se escinde muy rápidamente, incluso a pH 4. Los Ejemplo 4C, Ejemplo 5C y Ejemplo 12C se escinden rápidamente mientras que el Ejemplo 3C y el Ejemplo 10Cb se escinden lentamente. Todos los otros tienen una cinética de escisión moderada.

#### **C. Realizaciones a modo de ejemplo de composiciones farmacéuticas**

Los compuestos según la invención pueden convertirse en preparaciones farmacéuticas de los siguientes modos:

##### Solución i.v.:

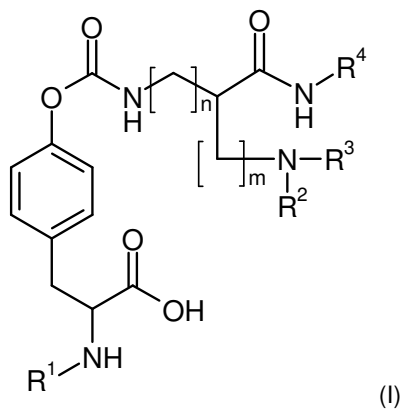
Un compuesto según la invención se disuelve a una concentración por debajo de la solubilidad de saturación en un disolvente fisiológicamente aceptable (por ejemplo, tampones de pH 4 a pH 7, solución isotónica de cloruro sódico, solución de glucosa al 5% y/o solución de PEG 400 al 30%). La solución se esteriliza por filtración y se envasa en recipientes para inyección estériles y libres de pirógenos.

##### Disolución s.c.:

Un compuesto según la invención se disuelve a una concentración por debajo de la solubilidad de saturación en un disolvente fisiológicamente aceptable (por ejemplo, tampones de pH 4 a pH 7, solución isotónica de cloruro sódico, solución de glucosa al 5% y/o solución de PEG 400 al 30%). La solución se esteriliza por filtración y se envasa en recipientes para inyección estériles y libres de pirógenos.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula



en la que

5 n representa el número 0, 1, 2, 3 o 4,

m representa el número 0, 1, 2, 3 o 4,

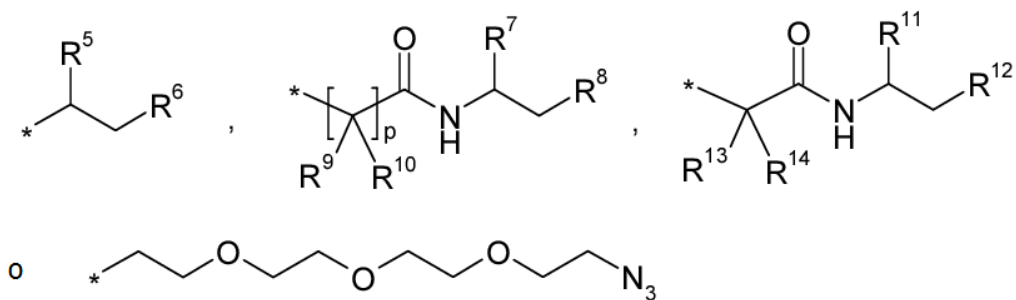
en la que m y n son juntos son el número 1, 2, 3, 4, 5 o 6,

R<sup>1</sup> representa terc-butiloxicarbonilo o (9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonilo,

R<sup>2</sup> representa terc-butiloxicarbonilo,

10 R<sup>3</sup> representa hidrógeno, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo o bencilo,

R<sup>4</sup> representa un grupo de fórmula

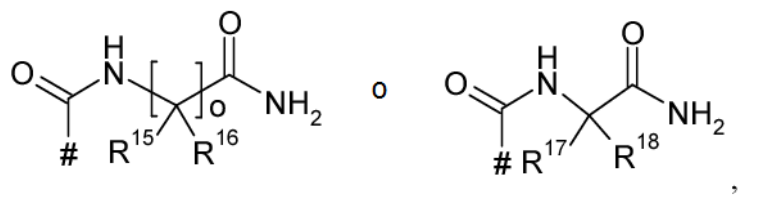


en las que

\* es el punto de unión al nitrógeno,

15 p representa el número 1, 2, 3, 4 o 5,

R<sup>5</sup> representa hidrógeno, aminocarbonilo, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-aminocarbonilo, fenilaminocarbonilo o un grupo de fórmula



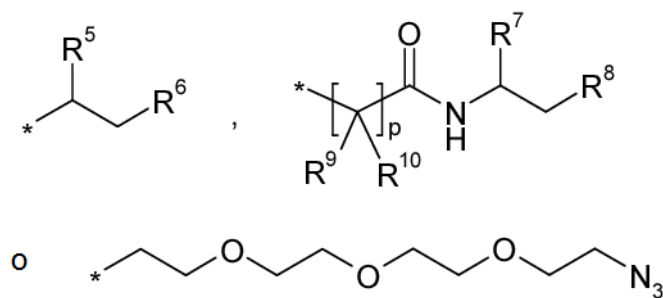
en las que

- # es el punto de unión al átomo de carbono,  
 o representa el número 1, 2, 3, 4 o 5,  
 $R^{15}$  representa hidrógeno o alquilo ( $C_1-C_4$ ),  
 $R^{16}$  representa hidrógeno o alquilo ( $C_1-C_4$ ),  
 5  $R^{17}$  representa el grupo lateral de un  $\alpha$ -aminoácido natural o sus homólogos o isómeros,  
 y  
 $R^{18}$  representa hidrógeno o metilo,  
 $R^6$  representa -S-tritilo, tiolilo, azidilo, acetilenilo, hidroxicarbonilo o amina,  
 $R^7$  representa hidrógeno o aminocarbonilo,  
 10  $R^8$  representa -S-tritilo, tiolilo, azidilo, acetilenilo, hidroxicarbonilo o amina,  
 $R^9$  representa hidrógeno o alquilo ( $C_1-C_4$ ),  
 $R^{10}$  representa hidrógeno o alquilo ( $C_1-C_4$ ),  
 $R^{11}$  representa hidrógeno o aminocarbonilo,  
 $R^{12}$  representa -S-tritilo, tiolilo, azidilo, acetilenilo, hidroxicarbonilo o amina,  
 15  $R^{13}$  representa el grupo lateral de un  $\alpha$ -aminoácido natural o sus homólogos o isómeros,  
 y  
 $R^{14}$  representa hidrógeno o metilo,

o una de las sales del mismo, solvatos del mismo o los solvatos de sales del mismo.

2. Un compuesto según la reivindicación 1, **caracterizado porque**

- 20 n representa el número 0, 1, 2 o 3,  
 m representa el número 0, 1, 2 o 3,  
 en la que m y n son juntos el número 1, 2, 3 o 4,  
 $R^1$  representa terc-butiloxicarbonilo o (9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonilo,  
 $R^2$  representa terc-butiloxicarbonilo,  
 25  $R^3$  representa hidrógeno, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo o bencilo,  
 $R^4$  representa un grupo de fórmula



en las que

- \* es el punto de unión al nitrógeno,  
 30 p representa el número 1, 2, 3, 4 o 5,

$R^5$  representa hidrógeno, aminocarbonilo, fenilaminocarbonilo o  $-(C=O)NHCH_2(C=O)NH_2$ ,  
 $R^6$  representa  $-S$ -trilito,  
 $R^7$  representa hidrógeno o aminocarbonilo,  
 $R^8$  representa  $-S$ -trilito,  
 $R^9$  representa hidrógeno,  
y  
 $R^{10}$  representa hidrógeno.

3. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, **caracterizado porque**

n representa el número 2 o 3,

y

m representa el número 0,

o

n representa el número 0,

y

m representa el número 2 o 3,

o

n representa el número 0,

y

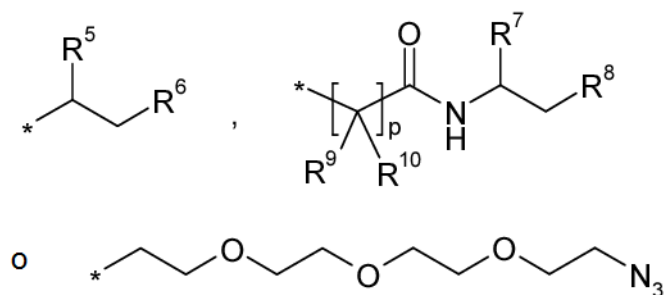
m representa el número 1,

$R^1$  representa terc-butiloxicarbonilo o (9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonilo,

$R^2$  representa terc-butiloxicarbonilo,

$R^3$  representa hidrógeno, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo o bencilo,

$R^4$  representa un grupo de fórmula



en las que

\* es el punto de unión al nitrógeno,

p representa el número 1, 2, 3, 4 o 5,

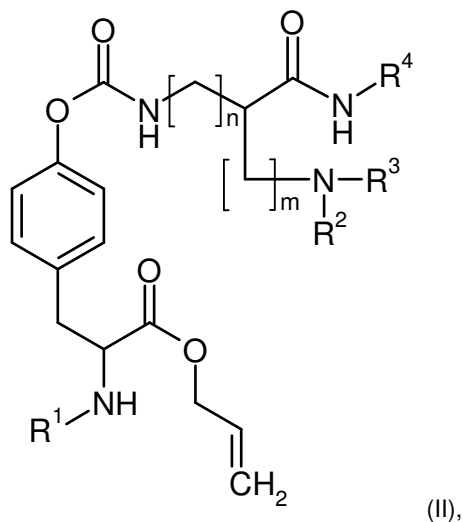
$R^5$  representa hidrógeno, aminocarbonilo, fenilaminocarbonilo o  $-(C=O)NHCH_2(C=O)NH_2$ ,

$R^6$  representa  $-S$ -trilito,

$R^7$  representa hidrógeno o aminocarbonilo,

$R^8$  representa -S-tritilo,  
 $R^9$  representa hidrógeno,  
 y  
 $R^{10}$  representa hidrógeno.

- 5 4. Un procedimiento de preparación de un compuesto de fórmula (I) o una de las sales del mismo, solvatos del mismo o los solvatos de sales del mismo según la reivindicación 1, **caracterizado porque** un compuesto de fórmula (II)



en la que

- 10 n, m,  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  y  $R^4$  son cada uno como se define en la reivindicación 1,  
 se hace reaccionar con una fuente de paladio (0) y un agente reductor.

5. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para la preparación de profármacos para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades.