

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 672 526**

51 Int. Cl.:

A61K 47/60 (2007.01)

A61K 47/54 (2007.01)

A61K 47/65 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.06.2009 PCT/US2009/048943**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.12.2009 WO09158668**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.06.2009 E 09771199 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.03.2018 EP 2306986**

54 Título: **Profármacos y conjugados de fármaco-macromolécula que presentan velocidades de liberación de fármaco controladas**

30 Prioridad:

15.09.2008 US 192050 P
26.06.2008 US 133148 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.06.2018

73 Titular/es:

PROLYNX LLC (100.0%)
26118 Research Road
Hayward, CA 94545, US

72 Inventor/es:

SANTI, DANIEL, V.;
ASHLEY, GARY y
HEARN, BRIAN

74 Agente/Representante:

RIZZO, Sergio

Observaciones :

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

ES 2 672 526 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

Profármacos y conjugados de fármaco-macromolécula que presentan velocidades de liberación de fármaco controladas

- 5 **[0001]** Esta solicitud reivindica beneficio de prioridad sobre la solicitud provisional de los EE.UU. con N.º de Serie 61/192,050 presentada el 15 de septiembre de 2008, y 61/133,148 presentada el 26 de junio de 2008.

CAMPO TÉCNICO

[0002] La invención se refiere a compuestos que están diseñados para un control farmacocinético en la administración de fármacos. En particular, la invención se refiere a profármacos y a conjugados de fármaco-macromolécula que presentan velocidades deseadas de liberación de fármaco.

10 ANTECEDENTES

[0003] Muchos fármacos se ven afectados por parámetros farmacocinéticos desfavorables que limitan su efectividad. El rápido aclaramiento de estos fármacos de los compartimentos fisiológicos, ya sea por vía metabólica o por excreción, da como resultado una corta vida útil y una exposición reducida a los objetivos. Por ejemplo, el potencial terapéutico de los fármacos a base de péptidos y proteínas es enorme, pero los fármacos a base de péptidos y proteínas suelen experimentar un rápido aclaramiento sistémico debido a la inestabilidad metabólica y al aclaramiento renal. Asimismo, los ácidos nucleicos como el ADN antisentido y ARN pequeño de interferencia (ARNip) tienen un gran potencial terapéutico, pero se ven afectados por la inestabilidad metabólica y la impermeabilidad celular. Finalmente, muchas pequeñas moléculas orgánicas también experimentan un rápido aclaramiento que limita su efectividad terapéutica.

20 **[0004]** Por tanto, sería muy conveniente tener métodos para prolongar la semivida en la circulación sistémica y/o en otros compartimentos fisiológicos y mejorar la disponibilidad y la absorción celular de terapéuticas a base de pequeñas moléculas, péptidos, proteínas y ácidos nucleicos a fin de proporcionar terapias a base de fármacos y genes mejoradas en el tratamiento de enfermedades.

25 **[0005]** Un método para aumentar la semivida fisiológica de los fármacos es aumentar su tamaño hidrodinámico uniéndolos a macromoléculas. La eliminación de moléculas grandes, por ejemplo proteínas de alto peso molecular, anticuerpos, polímeros, poli(etilenglicol) (PEG), de la circulación sistémica puede ser extremadamente lenta. El metabolismo del PEG que presenta un peso molecular de >5000 es insignificante, y la filtración glomerular y la excreción biliar del PEG que presenta un peso molecular de ~50 kDa tiene una eficacia mínima. Por ejemplo, se ha observado que las semividas plasmáticas en ratas o ratones de varios conjugados de PEG-superóxido dismutasa (PEG-SOD) varían de 1,5 horas para un conjugado que utilice PEG con un peso molecular de 1900 a 36 horas para un conjugado que utilice PEG con un peso molecular de 72 000, mientras que la semivida del SOD no conjugado era de 0,08 horas. Véase Veronese, "Peptide and protein PEGylation: a review of problems and solutions," *Biomaterials* (2001) 22:405-417. De la misma manera, los anticuerpos monoclonales y la seroalbúmina presentan tiempos de permanencia muy largos en el compartimento sistémico y en otros compartimentos fisiológicos, que da lugar a semividas compartimentales/sistémicas considerablemente prolongadas de los fármacos conjugados macromoleculares, que dependen en gran medida del peso molecular del conjugado.

40 **[0006]** Para fármacos a base de péptidos y proteínas, la unión covalente de los residuos poliméricos, por ejemplo de PEG (conocida como «PEGilación»), ha sido efectiva a la hora de mejorar los parámetros farmacocinéticos, y también puede ocultar el agente del fármaco al metabolismo y al sistema inmune, dando lugar a una reducción de la inmunogenicidad. La PEGilación ha dado lugar a estos fármacos modificados como PEG- adenosina desaminasa bovina para el tratamiento de síndrome de inmunogenicidad combinada grave ligada al cromosoma X (ADAGEN®, Enzon), PEG-interferón alfa para el tratamiento de la hepatitis C (PEGASYS®, Hoffman-LaRoche; PEG-Intron®, Schering-Plough/Enzon), PEG- L-asparaginasa para el tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda (Oncaspar®, Enzon), PEG-factor estimulante de colonias de granulocitos humanos recombinantes para el tratamiento de la neutropenia (Neulasta®, Amgen), PEG-anti-factor de necrosis tumoral alfa para el tratamiento de la enfermedad de Crohn (Cimzia®, Enzon), PEG-antagonista del receptor de la hormona del crecimiento para el tratamiento de la acromegalia (Somavert®, Pfizer), y PEG-Fab anti-TNF para la artritis reumatoide (CD870, Pfizer).

50 **[0007]** También se ha demostrado que la PEGilación mejora la administración de los ácidos nucleicos a las células. Por ejemplo, La publicación de patente de EE.UU. 2008/0064863 da a conocer ácidos nucleicos bicatenarios, de los cuales una cadena está unida de forma covalente a una unidad de poli(óxido de etileno), en complejo con un polícatión para su utilización en la administración de fármacos de ácidos nucleicos a las células. El documento de patente WO2007/021142 da a conocer moléculas de ARNip PEGiladas de forma covalente. El PEG-aptámero anti-VEGF se ha aprobado para el tratamiento intraocular de la degeneración macular asociada a la edad (Macugen®, OSI/Pfizer).

[0008] También se ha observado la PEGilación de pequeñas moléculas. Se ha demostrado que el EZN-2208, un conjugado PEG de SN-38, el metabolito activo del irinotecán, está activo en modelos tumorales preclínicos. En este ejemplo, la PEGilación mejora la solubilidad de los fármacos de moléculas pequeñas.

5 **[0009]** Se ha dado a conocer la unión covalente de fármacos peptídicos y proteicos a macromoléculas diferentes al PEG. Por ejemplo, se han observado conjugados de varios fármacos peptídicos, como péptidos miméticos de trombospondina-1, antagonistas de la angiopoyetina-2, péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1), y exendinas, con un anticuerpo monoclonal.

10 **[0010]** Sin embargo, la modificación covalente de péptidos, proteínas y pequeñas moléculas con PEG, u otras macromoléculas, suele causar una pérdida deletérea de la actividad biológica del fármaco original. Por consiguiente, alguna actividad reciente se ha centrado en el desarrollo de PEGilación reversible o transitoria, en la que las cadenas de polímeros se conjugan al fármaco a través de una unidad de enlazador escindible. El conjugado PEGilado final tiene un tamaño molecular suficiente para presentar una retención sistémica favorable. Bajo condiciones fisiológicas, la escisión de la unidad de enlace por una enzima o por acción química da lugar a la liberación de un fármaco o profármacos que se convierte rápidamente en el fármaco activo. Dependiendo de la
15 velocidad de escisión de la unidad de enlace en relación con la velocidad de aclaramiento del profármaco o del fármaco libre, pueden llevarse a cabo suficientes concentraciones de estado constantes del fármaco activo para la actividad biológica utilizando este enfoque.

20 **[0011]** Se ha observado el éxito obtenido mediante este enfoque, por ejemplo, utilizando la inmunotoxina SS1P conjugada de manera reversible a PEG mediante residuos de lisina. Véase Filpula, et al., "Releasable PEGylation of Mesothelin Targeted Immunotoxin SS1P Achieves Single Dosage Complete regression of a Human Carcinoma in Mice", *Bioconjugate Chemistry* (2007) 18:773-784. Mientras que el SS1P sin modificar se eliminó del plasma del ratón con una semivida de 26 minutos, la PEGilación reversible prolongó la semivida hasta 2,5-5 horas. Se ha demostrado que la PEGilación reversible del péptido natriurético atrial (que presenta una semivida plasmática de 2-5 minutos) da como resultado efectos extendidos y prolongados en la presión
25 sanguínea de ratas tratadas con adrenalina (Nesher, et al., *Bioconjugate Chem* (2008) 19:342-348).

30 **[0012]** La mayoría de los métodos para fármacos PEGilados de manera reversible u otros fármacos conjugados macromoleculares presentan posibles inconvenientes. Por ejemplo, algunos requieren hidrólisis enzimática por proteasas o esterases de suero, otros necesitan un entorno reducido para escindir un enlace de disulfuro, y la mayoría liberan un profármaco «auto-inmolativo» que experimenta una escisión espontánea al fármaco activo y un pequeño agente alquilante potencialmente tóxico. Sería beneficioso diseñar versiones de PEGilación reversible o de fijación de fármacos macromoleculares que no necesiten, y que no se vean afectadas por, entidades difíciles de controlar como enzimas, y entornos redox.

35 **[0013]** El documento de patente WO 2005/099768 está dirigido a profármacos poliméricos que presentan enlaces temporales a grupos amino de entidades biológicamente activas como péptidos, proteínas, productos naturales o compuestos químicos sintéticos. Se describen profármacos enlazados a un portador en cascada, los cuales comprenden una fracción biológicamente activa y un grupo de enmascaramiento que presenta al menos un nucleófilo y que son diferentes del portador. La velocidad a la que se libera el fármaco de los profármacos está controlada por la velocidad de eliminación de la fracción de enmascaramiento que, a su vez está controlada o bien de manera enzimática o bien por el nucleófilo adjunto que ayuda a la escisión de la fracción de
40 enmascaramiento por ciclización o catálisis intramolecular. Se da a conocer un compuesto insulínico mono-PEGilado (compuesto 9g). Greenwald R. B. et al., "Effective drug delivery by PEGylated drug conjugates," *Advanced Drug Delivery Reviews* (2003) 55:217-250 da a conocer conjugados de fármacos PEGilados de manera reversible que comprenden una fracción de enlace de carbamato escindible. Filupa D et al., "Releasable PEGylation of proteins with customized liners," *Advanced Drug Delivery Reviews* (2008) 60:29-29 da a conocer
45 una PEGilación reversible de proteínas mediante la utilización de enlaces que están sujetos a eliminación intramolecular.

50 **[0014]** La patente de EE.UU. 6,504,005 describe moléculas de profármacos que liberan fármaco activo bajo condiciones fisiológicas debido a la beta eliminación dependiente del pH. Se describe un modo de realización específico de este enfoque en el documento WO2004/089279. Este enfoque, aunque está limitado en alcance y ejemplos, que utiliza una velocidad de escisión espontánea de primer orden del fármaco del portador del PEG que se inicia cuando el conjugado se expone a un pH fisiológico, se describe en el documento de publicación de patente de los Estados Unidos N.º 2006/0171920. Una estrategia general para proporcionar conjugados de fármaco-macromolécula que presenten una variedad de velocidades de liberación espontáneas de primer orden que sean predecibles y controlables en condiciones fisiológicas proporcionaría una valiosa herramienta
55 terapéutica para el tratamiento de enfermedades.

Exposición de la invención

[0015] La presente invención proporciona profármacos y conjugados de fármaco-macromolécula para controlar la velocidad de liberación de agentes terapéuticos («fármacos») cuando se administran a pacientes que requieren tratamiento con los agentes terapéuticos. Los profármacos y los conjugados de fármaco-

macromolécula de la invención proporcionan un medio para administrar agentes terapéuticos durante un periodo de tiempo prolongado, incluso para agentes terapéuticos que se aclaran rápidamente del sistema, prolongando por consiguiente los efectos terapéuticos de los agentes terapéuticos.

5 **[0016]** En un aspecto, la invención está dirigida a compuestos que son conjugados de fármaco-macromolécula de la fórmula (3) tal como se define en la reivindicación 1

donde Z es el residuo de una macromolécula;

L' es el residuo de un enlace;

D es el residuo de un fármaco;

X es O o S;

10 A es alquilenilo (C₂), arilo o está ausente;

cada R¹ y R² es independientemente H; CH;

NO₂;

arilo opcionalmente sustituido;

heteroarilo opcionalmente sustituido;

15 alquenilo opcionalmente sustituido;

alquinilo opcionalmente sustituido; o

cada R¹ y R² es independientemente COR³ o SO₂R³ donde

R³ es H o alquilo opcionalmente sustituido;

arilo opcionalmente sustituido;

heteroarilo opcionalmente sustituido;

alquenilo opcionalmente sustituido;

alquinilo opcionalmente sustituido; o

20 OR o NR₂ donde cada R es independientemente H o alquilo opcionalmente sustituido; o

cada R¹ y R² es independientemente SR⁴ donde

R⁴ es alquilo opcionalmente sustituido;

arilo opcionalmente sustituido;

heteroarilo opcionalmente sustituido;

alquenilo opcionalmente sustituido; o

alquinilo opcionalmente sustituido;

30 donde los sustituyentes opcionales se seleccionan del grupo que consiste en grupos donadores de electrones como alquilo C₁-C₄; alcoxi C₁-C₄; alquiltio C₁-C₄; amino; alquilamino; y dialquilamino; y grupos atractores de electrones como halógeno; difluorometilo; trifluorometilo; nitro; ciano; C(O)R, donde R es H, alquilo C₁-C₄, alcoxi C₁-C₄ o amino; y SOR y SO₂R, donde R es alquilo C₁-C₄, arilo, o heteroarilo,

35 donde estos varios sustituyentes opcionales pueden estar enlazados a anillos de arilo y heteroarilo, los cuales varios sustituyentes pueden ser iguales o diferentes

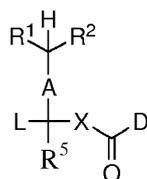
donde R¹ y R² pueden estar unidos para formar un anillo de 3-8 miembros; y

donde R¹ y R² no pueden ser H;

donde R⁵ es H o alquilo (C₁₋₆).

40 **[0017]** Normalmente, el residuo de enlace es una cadena bivalente que presenta un peso molecular entre 14 Da y 20 kDa que puede incluir insaturación, heteroátomos, estructuras anulares, porciones aromáticas, y/o porciones heteroaromáticas que enlaza de forma covalente Z al resto de la molécula. El enlace puede incluir una cadena principal de péptidos, una cadena principal de pseudopéptidos, un residuo de maleimido, triazol, o fenileno, o una combinación de los mismos. En algunos modos de realización, el carbonilo mostrado en la fórmula (3) se origina en el propio fármaco. En algunos modos de realización, R⁵ es H.

45 **[0018]** En otro aspecto, la presente invención proporciona profármacos que presentan la fórmula (2):



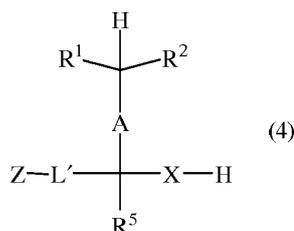
(2)

donde X, A, R¹, R², y R⁵ y D se definen como anteriormente, y L es un grupo de enlace capaz de unirse a una macromolécula.

[0019] En algunos modos de realización, R⁵ es H.

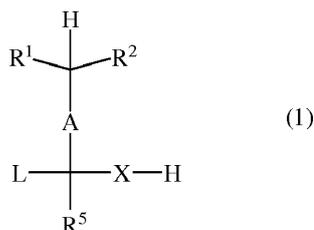
- 5 **[0020]** Los compuestos de la fórmula (3) y de la fórmula (2) liberan el fármaco a velocidades controladas bajo condiciones fisiológicas en el cuerpo, mediante eliminación no enzimática. La velocidad de la liberación del fármaco es ajustable por la elección adecuada de los grupos R¹ y R². En algunos modos de realización, cada uno de los grupos R¹ y R² puede sustituirse independientemente por sustituyentes donadores de electrones y/o atractores de electrones que alteren la acidez del protón R¹-CH-R² interviniente de manera que pueda
- 10 conseguirse una enorme flexibilidad y control sobre la velocidad de eliminación del fármaco. En determinados modos de realización de la invención, las mezclas de compuestos de fórmula (3) o de fórmula (2), cada una con una velocidad diferente de liberación del fármaco bajo condiciones fisiológicas, puede establecer un perfil de administración del fármaco adaptable para un paciente que necesite el tratamiento.

- 15 **[0021]** La invención también está dirigida a métodos para preparar los compuestos de las fórmulas (3) y (2), además de a compuestos que son intermedios para su formación. Por consiguiente, en otro aspecto, la invención está dirigida a compuestos de la fórmula



donde X, A, L', Z, R¹, R² y R⁵ están definidos como anteriormente.

Descritos en el presente documento también se encuentran compuestos de la fórmula



20

donde A, X, L, R¹, R² y R⁵ están definidos como anteriormente.

- [0022]** La invención también está dirigida a composiciones farmacéuticas que contengan compuestos de la fórmula (2) o (3). La invención está dirigida de manera adicional a compuestos de la fórmula (2) y (3) para su utilización como un medicamento. En los métodos para preparar estos profármacos o conjugados de macromoléculas, el punto de partida es, en general, el compuesto de la fórmula (1) que puede convertirse directamente a los profármacos de la fórmula (2) mediante una reacción adecuada con el compuesto del fármaco. El profármaco de la fórmula (2) entonces puede, a su vez, convertirse en el conjugado macromolecular de la fórmula (3) debido a la reacción de L con la macromolécula, Z. De forma alternativa, el compuesto de la fórmula (3) puede prepararse convirtiendo el compuesto de la fórmula (1) en el compuesto de la fórmula (4) que
- 25
- 30 luego se somete a reacción con el fármaco.

Breve descripción de los dibujos

[0023]

La FIGURA 1 muestra la eliminación catalítica del fármaco del conjugado de fármaco-portador macromolecular de la invención.

La FIGURA 2 muestra una variedad de grupos funcionales para R¹ y R² y sus efectos en la acidez de los protones adyacentes. Según aumenta la acidez (menor pKa), la velocidad de deprotonación y, por tanto, la velocidad a la que se libera el fármaco del profármaco o del conjugado de fármaco-macromolécula se espera que aumente.

La FIGURA 3 muestra el efecto de la sustitución de la acidez del 9-protón en varios fluorenos 2-sustituídos. Como se indica, el efecto sigue la correlación de energía libre lineal de Hammett, de tal manera que la acidez de cualquier fluoreno 2-sustituído puede estimarse cuidadosamente basándose en el parámetro-sigma del sustituyente.

La FIGURA 4 muestra perfiles de liberación de fármaco calculados para una serie de profármacos que presentan diferentes velocidades de liberación, con una velocidad fija de aclaramiento del sistema de 0,5 al día, expresado como la fracción de fármaco total administrado. Velocidades de liberación relativamente rápidas (por ejemplo, una velocidad de liberación de 5 al día) proporciona una concentración máxima más alta de fármaco liberado durante menos tiempo. Velocidades de liberación relativamente lentas (por ejemplo, una velocidad de liberación de 0,1 al día) proporciona una concentración máxima más baja de fármaco liberado durante más tiempo.

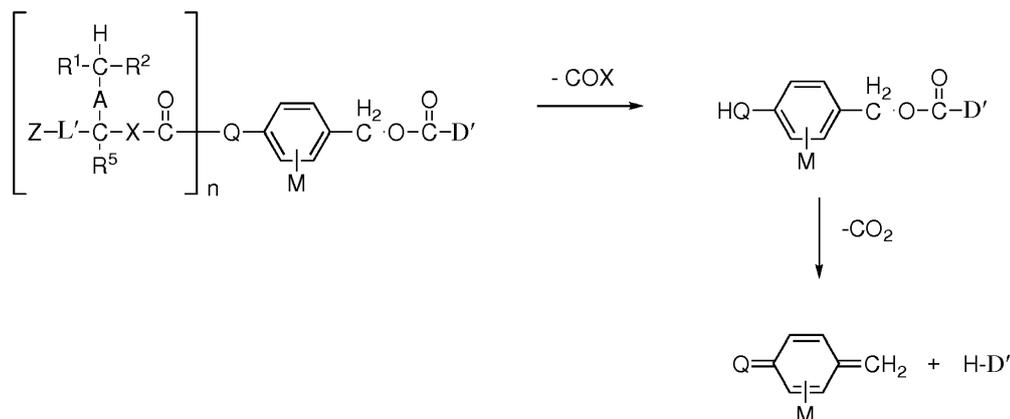
La FIGURA 5 muestra perfiles de liberación de fármaco calculados para una serie de profármacos que presentan diferentes velocidades de liberación, con una velocidad fija de aclaramiento del sistema de 0,5 al día, expresado como el porcentaje de concentración máxima (% C_{max}) frente al tiempo. A medida que disminuye la velocidad a la que se libera el fármaco del profármaco o del conjugado de fármaco-macromolécula, se extiende el periodo de tiempo tras la administración en el que la concentración de fármaco libre es superior a un porcentaje particular de la concentración máxima.

Modos para llevar a cabo la invención

[0024] Los compuestos de las fórmulas (2) y (3) están diseñados para controlar la farmacocinética del fármaco definido como «D». El mecanismo mediante el cual el fármaco, D, se libera, se muestra en la Figura 1 utilizando la fórmula (3) a modo de ejemplo. La velocidad se controla según un mecanismo de eliminación dependiente del pH. Los grupos R¹ y R² se seleccionan para proporcionar la reactividad apropiada del protón interviniente R¹-CH-R², como se ilustra en parte en la Figura 2, y por consiguiente controlando la velocidad a la que se libera el fármaco del profármaco o conjugado. La naturaleza del grupo de enlace y del grupo A también influye en este proceso, proporcionando múltiples puntos de control sobre la velocidad a la que se libera el fármaco del conjugado resultante. Las propiedades de R¹ y R² pueden modularse mediante la adición opcional de sustituyentes donadores de electrones o atractores de electrones, tal como se ilustra en la Figura 3.

[0025] Una ventaja particular de los compuestos de la invención es la posición de fijación del grupo de enlace. Aunque es posible fijar un grupo de enlace a uno de los grupos R¹ o R², hacerlo complica cualquier química de sustitución adicional de R¹ o R², y puede resultar en interacciones electrónicas entre el grupo de enlace y los sustituyentes donadores de electrones o atractores de electrones, limitando por consiguiente el ajuste de las velocidades de liberación del fármaco.

[0026] Aunque, normalmente, la forma activa del fármaco se libera directamente de los conjugados de la invención, en algunos casos, es posible liberar el fármaco activo en forma de un profármaco del mismo. A continuación se muestra un ejemplo de dicho sistema:



donde Q = O o NH, D' es la forma activa de un fármaco,
M = sustituciones habituales de arilo

[0027] Como se ha señalado anteriormente, los compuestos de las fórmulas (2) y (3) proporcionan velocidades de liberación ajustables para los fármacos a fin de controlar la farmacocinética de estos fármacos. Con el fin de preparar estos compuestos, varias sustancias intermedias son de las fórmulas (1), (2) y (4); como ya se ha señalado, los compuestos de la fórmula (2) también son profármacos con velocidades de liberación ajustables.

5 Los compuestos de la fórmula (1) no tienen ni el fármaco ni la macromolécula fijados y pueden considerarse materiales de partida.

[0028] Como todos estos compuestos comparten los sustituyentes R^1 , R^2 , R^5 , A, y X, los varios modos de realización de estos sustituyentes tal como se presentan en la alternativa expuesta más abajo en relación con los compuestos de la fórmula (1) pueden extrapolarse a los compuestos de las fórmulas (2), (3) y (4). Además, la naturaleza de L en las fórmulas (1) y (2) determina la naturaleza de L' en las fórmulas (4) y (3). Por consiguiente, las alternativas descritas a continuación para la fórmula (1) se importan en el presente documento como alternativas en las fórmulas (2), (3) y (4).

10

DEFINICIONES

[0029] Por el término «grupo donador de electrones» se hace referencia a un sustituyente que da lugar a una disminución de la acidez del grupo H bencílico. Ejemplos de sustituyentes donadores de electrones adecuados incluyen, pero sin carácter limitativo, alquilo inferior, por ejemplo, alquilo C_1-C_4 , alcoxi inferior (alcoxi C_1-C_4), alquiltio inferior (alquiltio C_1-C_4), amino, alquilamino y dialquilamino. Por el término «grupo atractor de electrones» se hace referencia a un sustituyente que da lugar a un aumento de la acidez del grupo H bencílico. Ejemplos de sustituyentes atractores de electrones adecuados incluyen, pero sin carácter limitativo, halógeno, difluorometilo, trifluorometilo, nitro, ciano, $C(=O)-R$, donde R es H, alquilo inferior (alquilo C_1-C_4), alcoxi inferior (alcoxi C_1-C_4), o amino, o SOR, o SO_2R , donde R es alquilo inferior (alquilo C_1-C_4), arilo o heteroarilo. Los sustituyentes atractores de electrones o donadores de electrones distintos de hidrógeno pueden estar presentes en múltiples posiciones en los anillos a los que están unidos. Aunque, por comodidad, en la mayor parte de los ejemplos, únicamente se muestra una única aparición de un sustituyente distinto de hidrógeno en un anillo sencillo, también pueden estar presentes múltiples sustituyentes y están dentro del alcance de la presente invención. Los sustituyentes pueden ser iguales o diferentes.

15

20

25

[0030] El término «alquilo» pretende incluir grupos hidrocarburo lineales, ramificados o cíclicos saturados de 1-8 carbonos, o en algunos modos de realización, de 1-6, 1-4 átomos de carbono.

[0031] El término «alqueno» pretende incluir hidrocarburos insaturados no aromáticos con dobles enlaces carbono-carbono. El término «alqueno (C_2)» hace referencia a un doble enlace carbono-carbono mono-, di-, tri-, o tetra-sustituido de cualquier configuración geométrica.

30

[0032] El término «alquino» pretende incluir hidrocarburos insaturados no aromáticos con triples enlaces carbono-carbono. El término «alquino (C_2)» hace referencia a un triple enlace carbono-carbono mono- o disustituido.

35

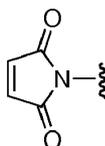
[0033] El término «alcoxi» pretende incluir grupos alquilo unidos a oxígeno, incluyendo metoxi, etoxi, isopropoxi, ciclopropoxi, ciclobutoxi, y similares.

[0034] El término «arilo» pretende incluir grupos hidrocarburo aromáticos de 6-18 carbonos, preferiblemente 6-10 carbonos, incluyendo grupos tales como fenilo, naftilo, y antraceno. El término «heteroarilo» incluye anillos aromáticos que comprenden 3-15 carbonos que contienen al menos un átomo N, O o S, preferiblemente 3-7 carbonos que contienen al menos un átomo N, O o S, incluyendo grupos tales como pirrolilo, piridilo, pirimidinilo, imidazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, tiazolilo, isotiazolilo, quinolilo, indolilo, indenilo y similares.

40

[0035] El término «halógeno» incluye bromo, flúor, cloro y yodo.

[0036] El término «malecido» hace referencia a un grupo de la fórmula



[0037] Los términos «proteína» y «péptido» se usan en el presente documento de forma intercambiable independientemente de la longitud de cadena, y estos términos incluyen adicionalmente pseudopéptidos que comprenden enlaces diferentes a enlaces amida, tales como enlaces CH_2NH_2 , así como peptidomiméticos.

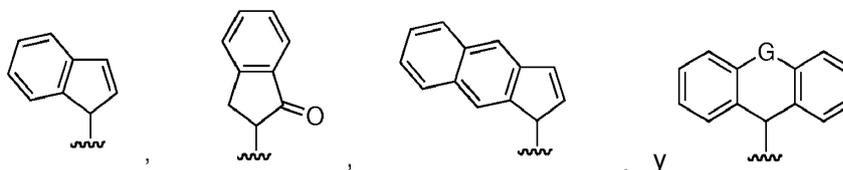
45

[0038] Los términos «ácidos nucleicos» y «oligonucleótidos» también se usan de forma intercambiable independientemente de la longitud de cadena. Los ácidos nucleicos u oligonucleótidos pueden ser monocatenarios o dúplex o pueden ser ADN, ARN o formas modificadas de los mismos con enlaces alterados,

50

tales como fosfodiésteres, fosforamidatos y similares. Tanto para las proteínas como para los ácidos nucleicos útiles como fármacos en los compuestos de la invención, estos términos también incluyen aquellos con cadenas laterales no encontradas en la naturaleza en el caso de proteínas, y bases no encontradas en la naturaleza en el caso de ácidos nucleicos.

- 5 **[0039]** Moléculas pequeñas, en el contexto de fármacos, es un término comprendido en la técnica, y se entiende que incluye compuestos diferentes a las proteínas y ácidos nucleicos que se sintetizan o se aíslan de la naturaleza y, en general, no se parecen a proteínas o ácidos nucleicos. Típicamente, tienen pesos moleculares de <1.000, aunque no hay punto de corte específico reconocido. No obstante, el término se entiende bien en los campos de farmacología y medicina.
- 10 **[0040]** El término «macromolécula» hace referencia a una macromolécula que presenta un peso molecular de entre aproximadamente 10.000 y 100.000, que en sí misma está desprovista esencialmente de actividad de señalización ciclotóxica, hormonal o celular, pero es capaz de conjugarse con una molécula de fármaco activa a fin de servir para transportar la molécula de fármaco activa en la circulación sistémica y dispone un depósito de fármaco activo que se libera durante un tiempo.
- 15 **[0041]** Cuando R¹ y R² están unidos para formar estructuras cíclicas, esto incluye los grupos en los que la fracción de R¹-CH-R² forma una subestructura como, por ejemplo,



y formas de las mismas opcionalmente sustituidas con grupos atrectores de electrones y/o donadores de electrones tal como se ha descrito anteriormente, donde G es un enlace; C=O; SO, SO₂, CX₂, o CX₂CX₂ en los que cada X es independientemente H o Cl.

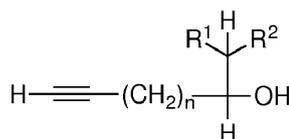
20

Variantes de la Fórmula (1)

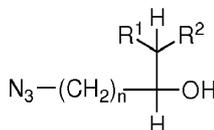
[0042] En los ejemplos expuestos a continuación, se señalará que los grupos arilo, por ejemplo, normalmente contienen solo un sustituyente. Esto es solo por razones de simplicidad, se entenderá que se incluyen los modos de realización de R¹ y R² donde los sistemas de anillo contienen múltiples sustituyentes distintos de hidrógeno.

25

[0043] En algunos modos de realización, los compuestos de la fórmula (1) tienen una fórmula más específica:

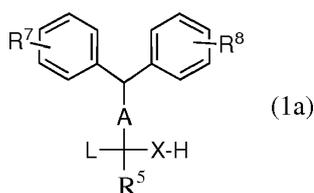


o la fórmula:



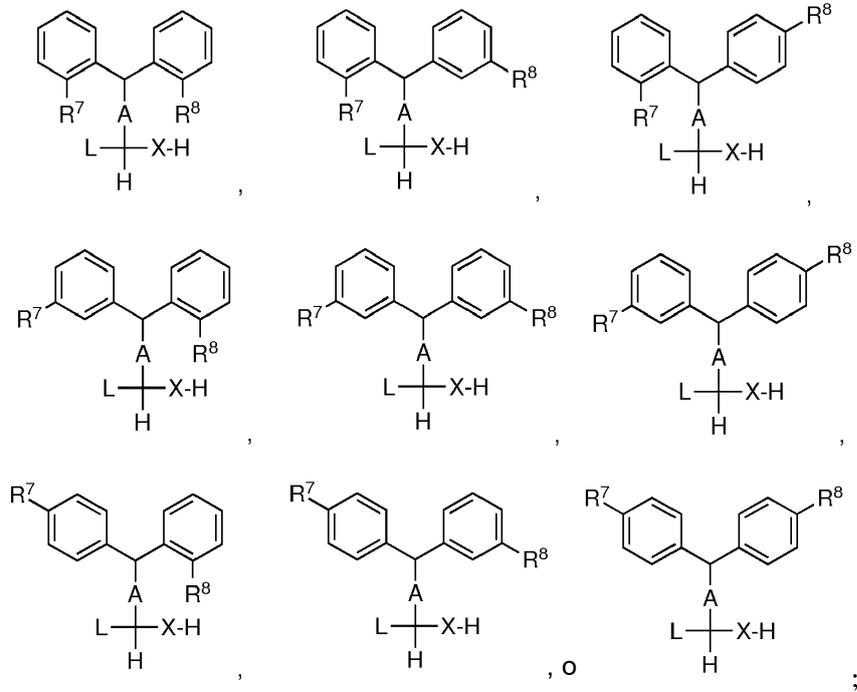
30 donde n = 1-6

[0044] En algunos modos de realización, las moléculas de la fórmula (1) tienen la fórmula (1a) más específica



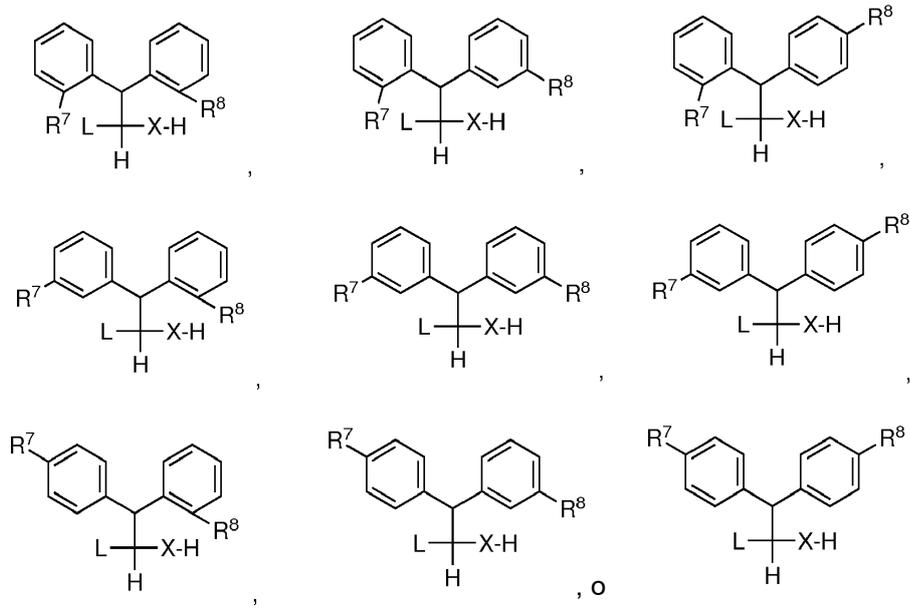
donde R^7 y R^8 son cada uno independientemente H, un grupo donador de electrones, o un grupo atractor de electrones, y donde las formas donadoras de electrones y/o atractoras de electrones de R^7 y R^8 están presentes en 1-5 posiciones, preferiblemente 3 o menos, en las fracciones fenilo; X es O o S; A es alqueniлено (C_2), arilo o está ausente; y L es un grupo de enlace capaz de fijarse a una macromolécula, R^5 es H o alquilo (C_{1-6}), por ejemplo:

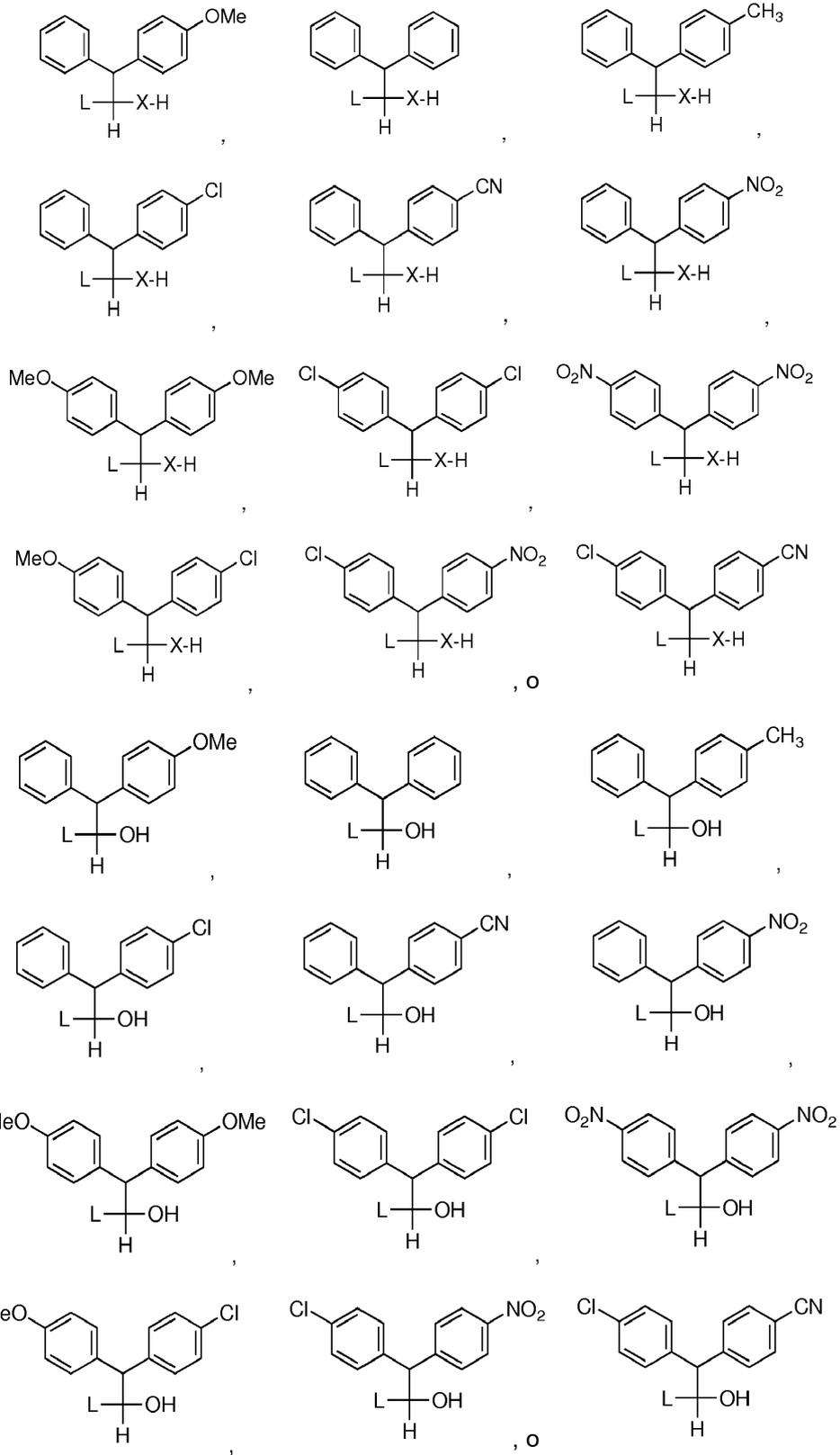
5



o,

10 por ejemplo

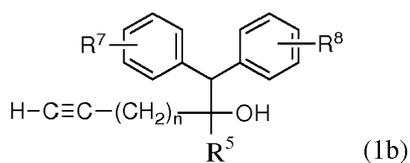




5

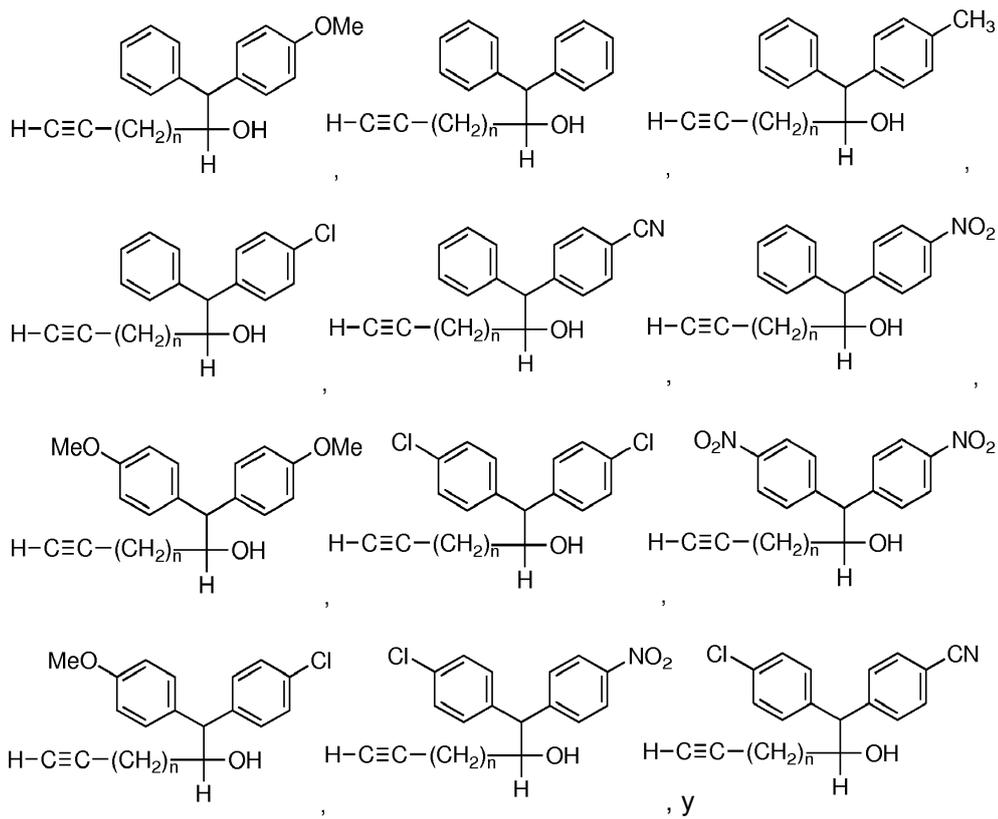
[0045] En un modo de realización más particular, las moléculas de la fórmula (1) tienen la estructura (1b) más específica

10

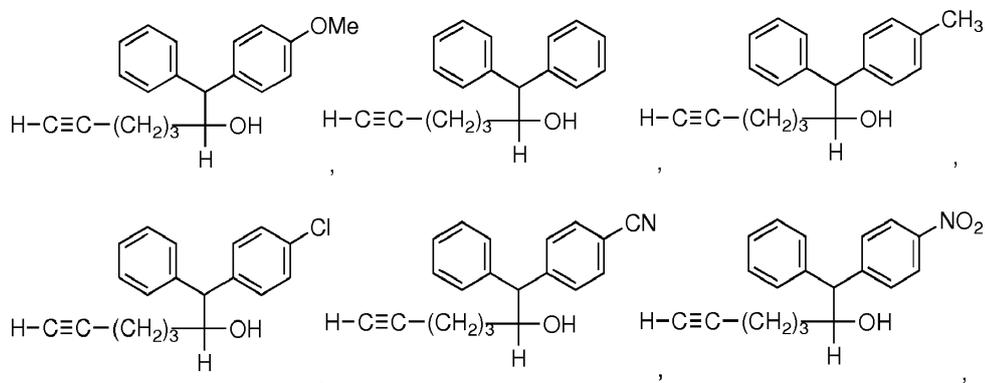


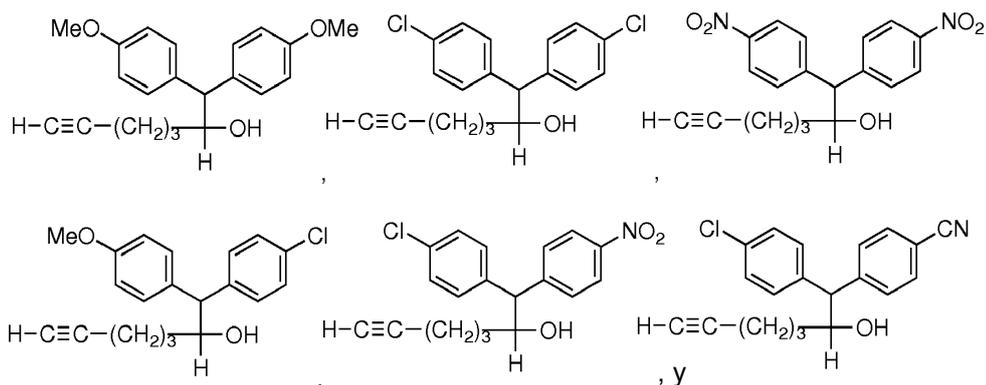
donde, como anteriormente, R⁷ y R⁸ son cada uno independientemente H, un grupo donador de electrones, o un grupo atractor de electrones, y donde las formas donadoras de electrones y/o atractoras de electrones de R⁷ y R⁸ están presentes en 1-5 posiciones en las fracciones fenilo; R⁵ es H o alquilo (C₁₋₆), y n = 1-6.

5 [0046] Entre los ejemplos se incluyen

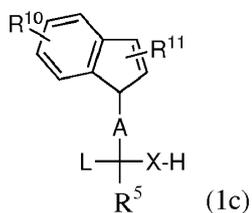


10 además de





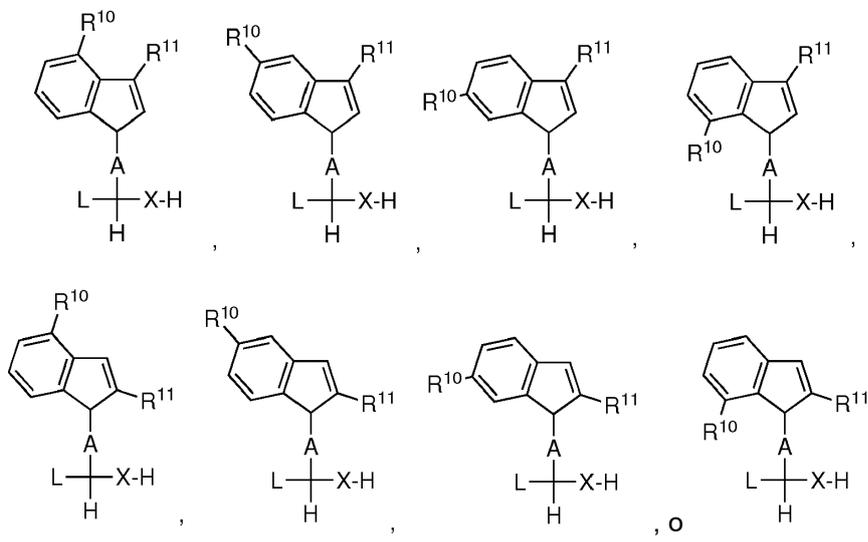
[0047] En determinados modos de realización, las moléculas de la fórmula (1) tienen la fórmula (1c) más específica



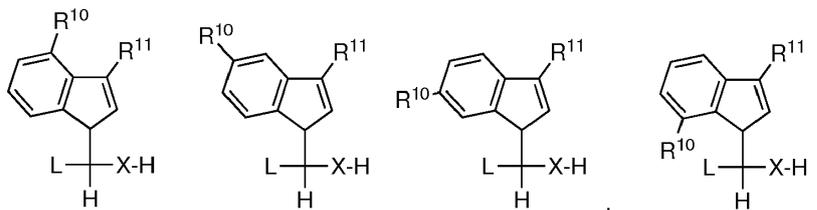
5

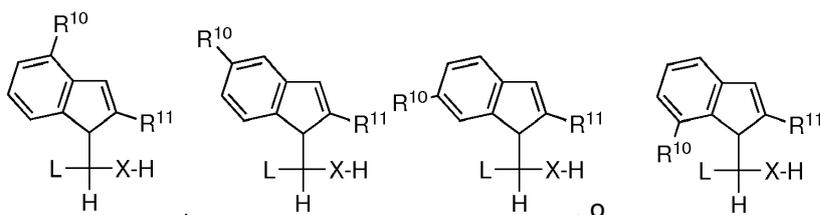
donde X es O o S; A es alqueniilo (C_2), arilo o está ausente; L es un grupo de enlace capaz de fijarse a una macromolécula; y donde R^5 es H o alquilo (C_{1-6}), R^{10} y R^{11} son cada uno independientemente H, un grupo donador de electrones, o un grupo atractor de electrones, y donde R^{10} y R^{11} pueden presentarse como sustituyentes distintos de hidrógeno en 1-4 o 1-2 posiciones en sus respectivos anillos. Entre los ejemplos se incluyen

10

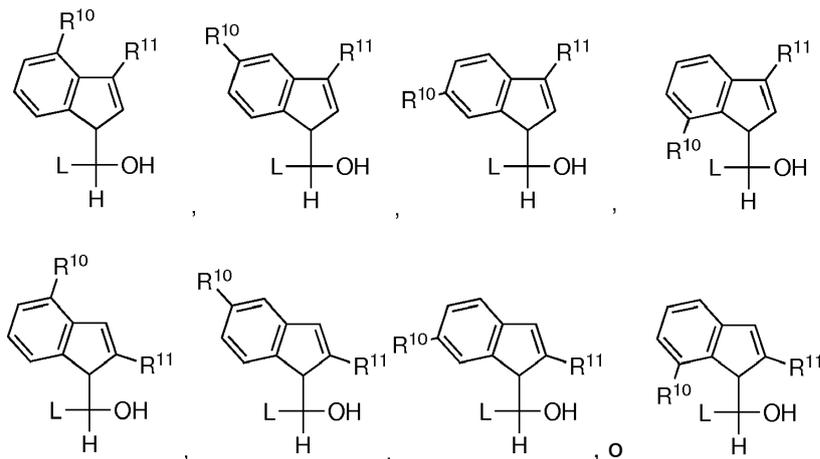


además de

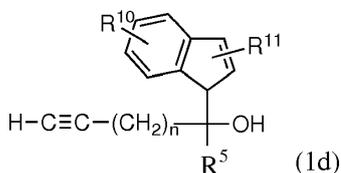




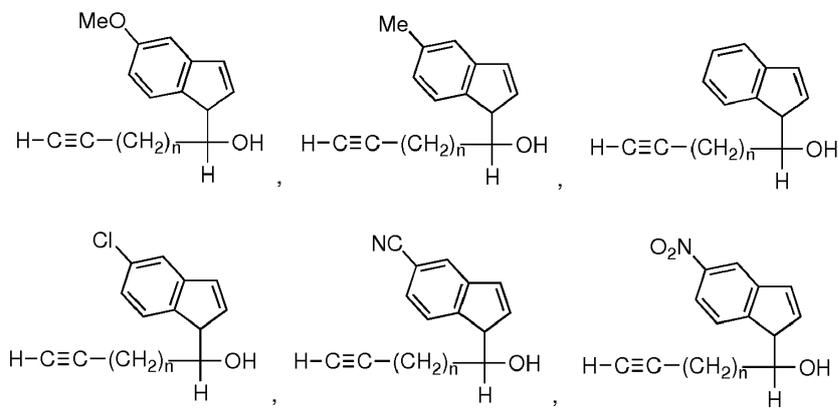
[0048] En modos de realización más particulares, las moléculas de fórmula (1c) incluyen



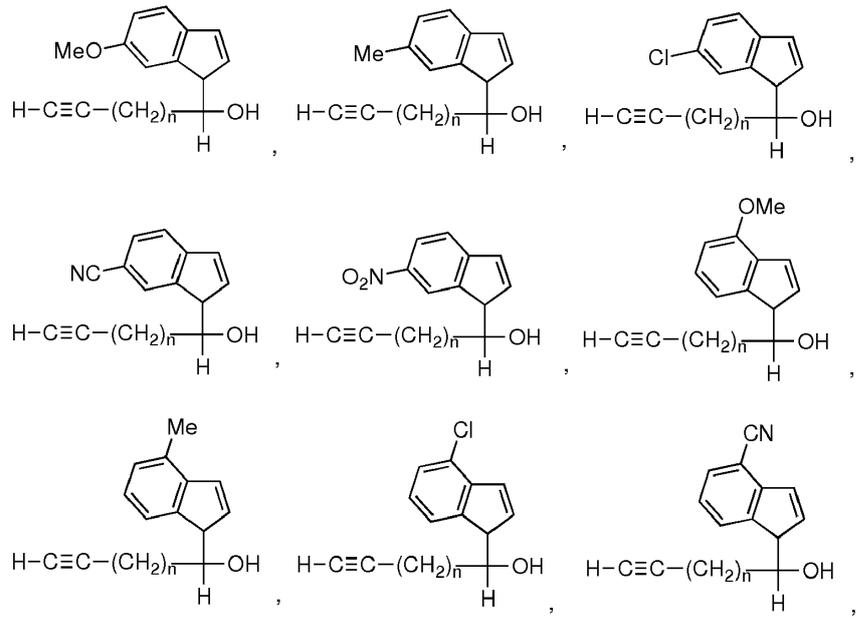
5 [0049] En un modo de realización particular, las moléculas de la fórmula (1) tienen la fórmula (1d) más específica



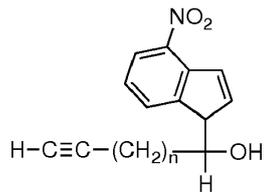
donde R^{10} y R^{11} son cada uno independientemente H, un grupo donador de electrones, o un grupo atractor de electrones, y donde R^{10} y R^{11} pueden presentarse como sustituyentes distintos de hidrógeno en 1-4 o 1-2 posiciones en sus respectivos anillos, $n = 1-6$, y R^5 es H o alquilo (C_{1-6}), por ejemplo:



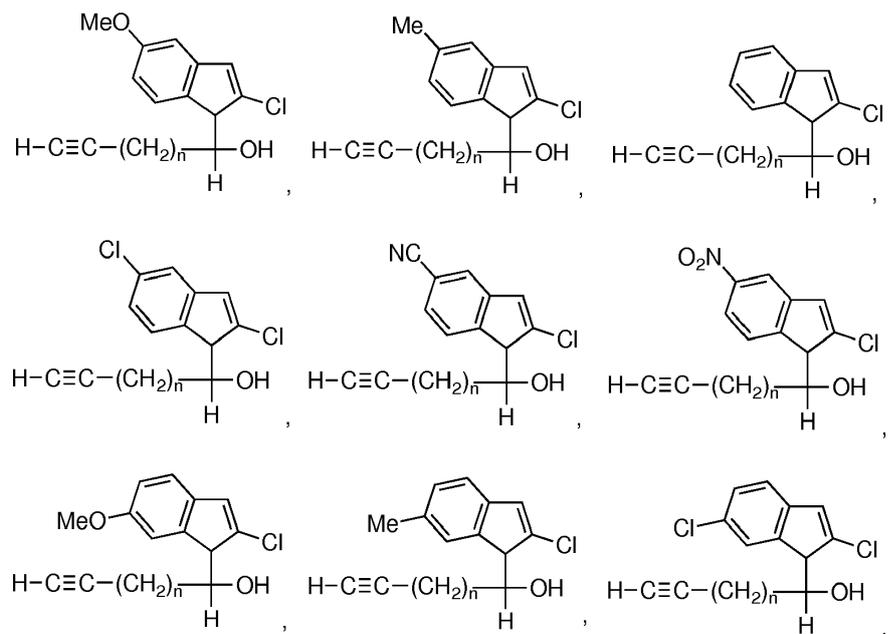
10

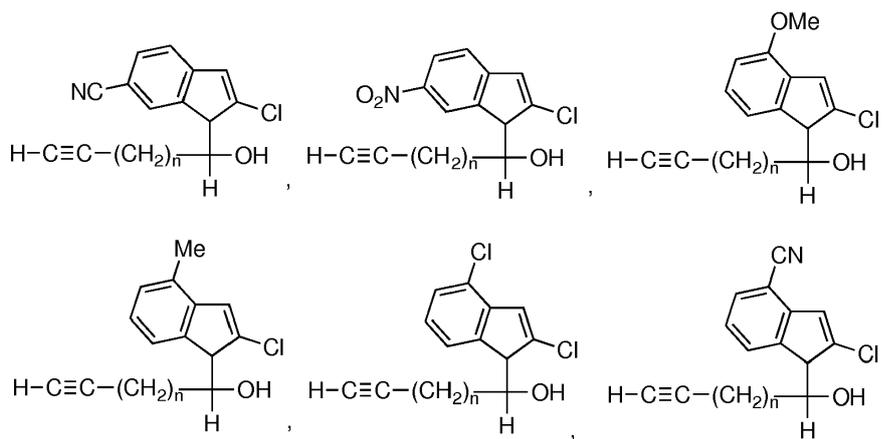


y

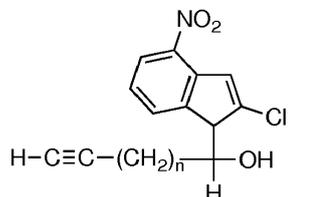


además de

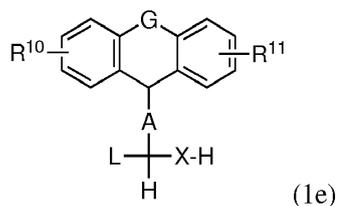




y



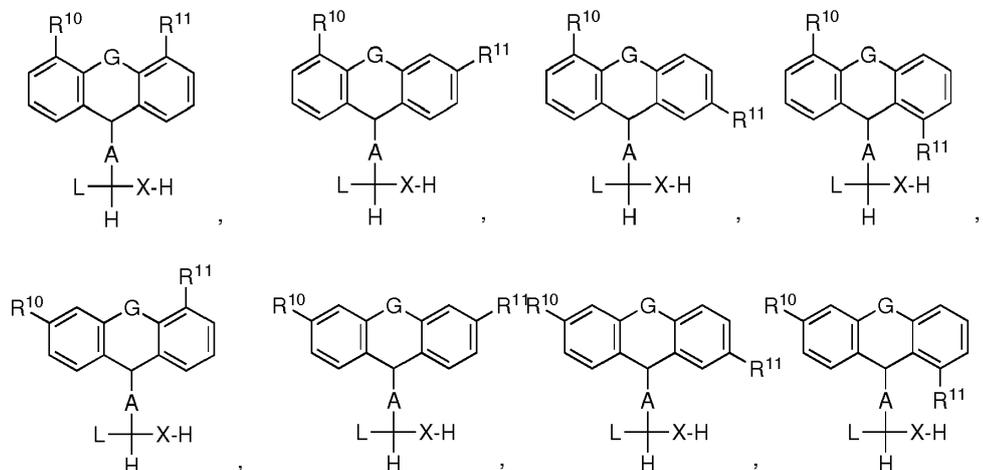
5 [0050] En determinados modos de realización, las moléculas tienen la fórmula (1e)

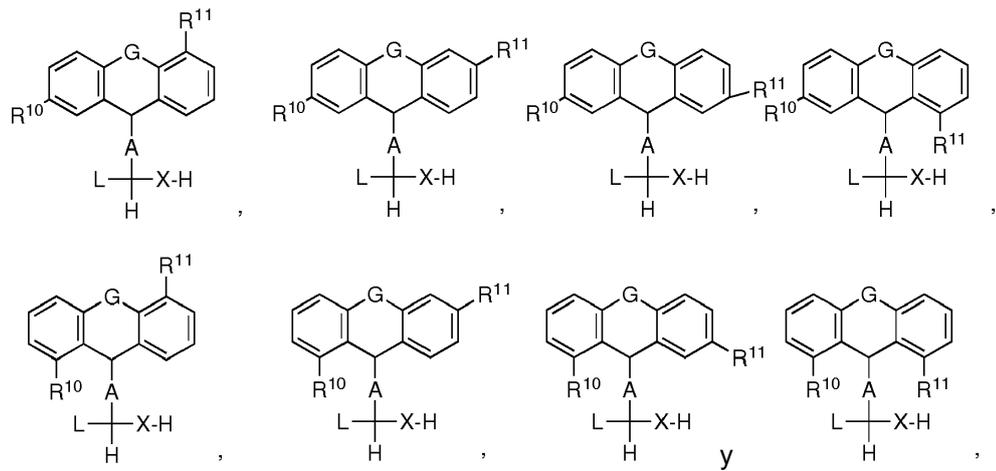


donde R^{10} y R^{11} son cada uno independientemente H, un grupo donador de electrones, o un grupo atractor de electrones, donde R^{10} y R^{11} pueden ser sustituyentes distintos de hidrógeno en 1-4 posiciones en sus respectivos anillos; X es O o S; A es alqueniлено (C_2), arilo o está ausente; L es un grupo de enlace capaz de fijarse a una macromolécula; y G es un enlace, C=O, O, SO, SO_2 , CX_2 , o CX_2CX_2 , donde cada X es independientemente H o Cl, y R^5 es H o alquilo (C_{1-6}),

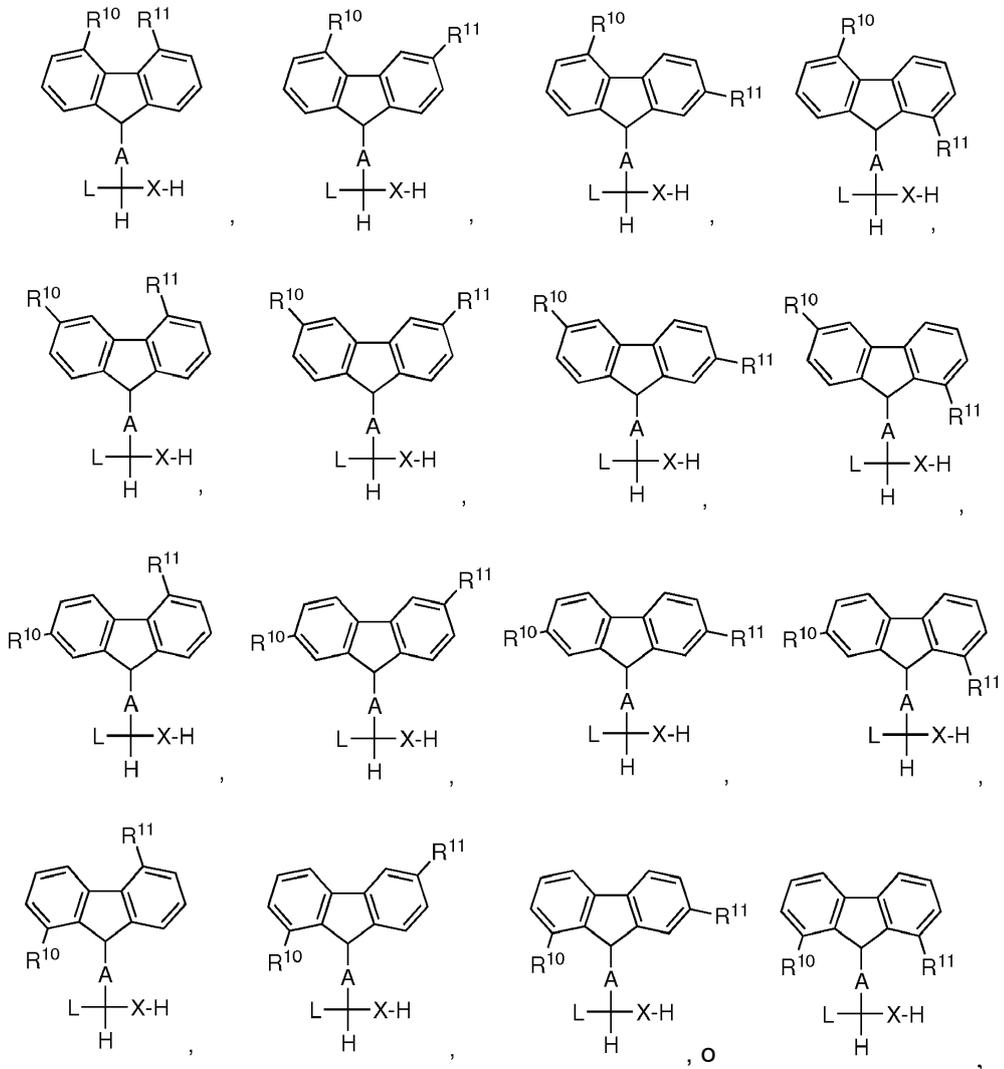
10

[0051] Entre los ejemplos se incluyen

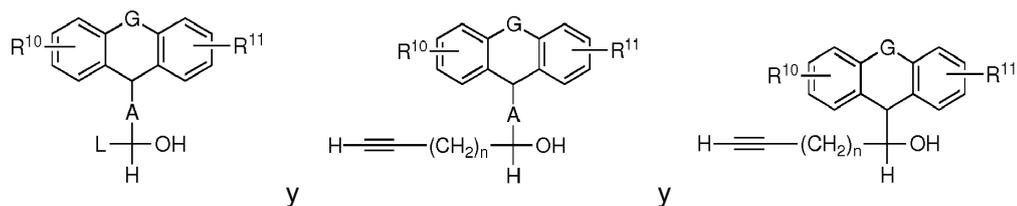




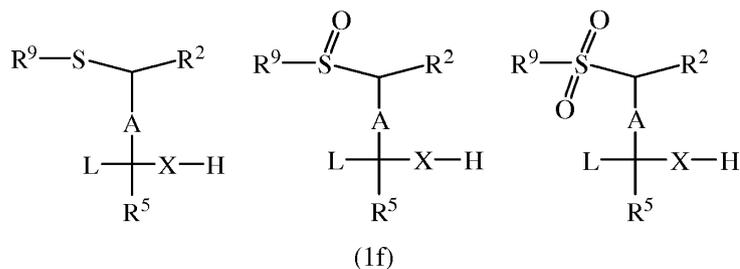
además de



incluidos



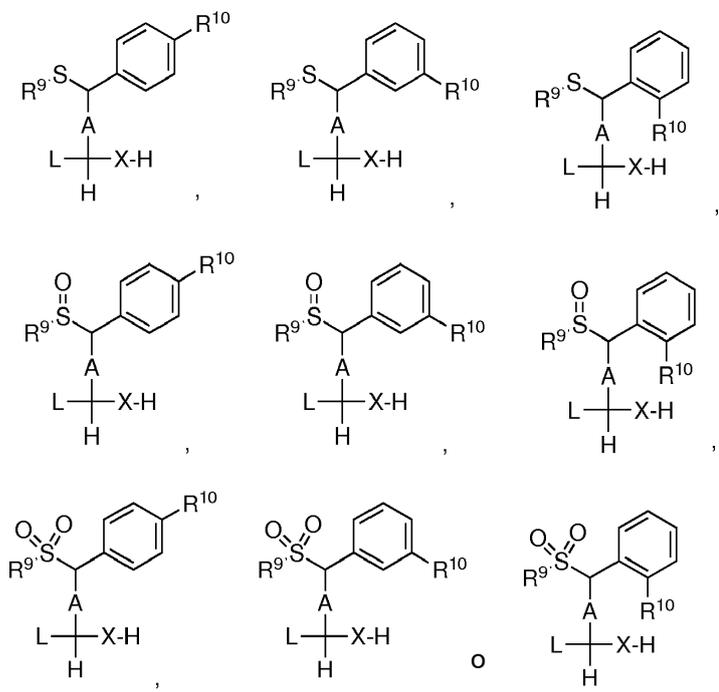
[0052] En determinados modos de realización, las moléculas de la fórmula (1) tienen la fórmula (1f) más específica



5 donde R² es arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, alqueniilo, alquilo, CN, NO₂, C(=O)-R³, SOR³, SO₂R³, SR⁴, X es O o S; A es alqueniilo (C₂), arilo o está ausente; L es un grupo de enlace capaz de fijarse a una macromolécula; R⁹ es alquilo, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, alqueniilo o alquinilo, y R⁵ es H o alquilo (C₁₋₆).

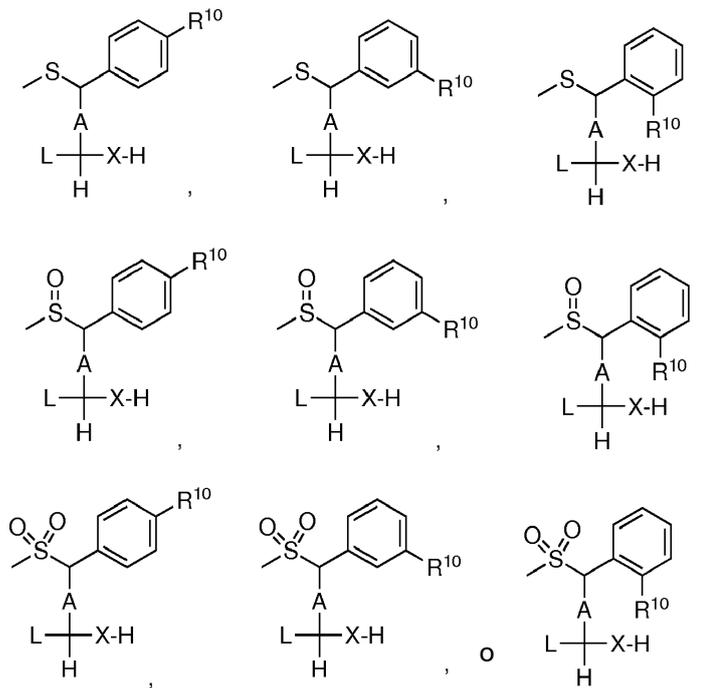
10 **[0053]** En un modo de realización, R² es H. En otro modo de realización, R² es arilo, arilo sustituido, heteroarilo, o heteroarilo sustituido. En otro modo de realización, R² es H.

[0054] Ejemplos de fórmula (1f) donde R¹⁰ es H o un grupo atractor de electrones o donador de electrones incluyen

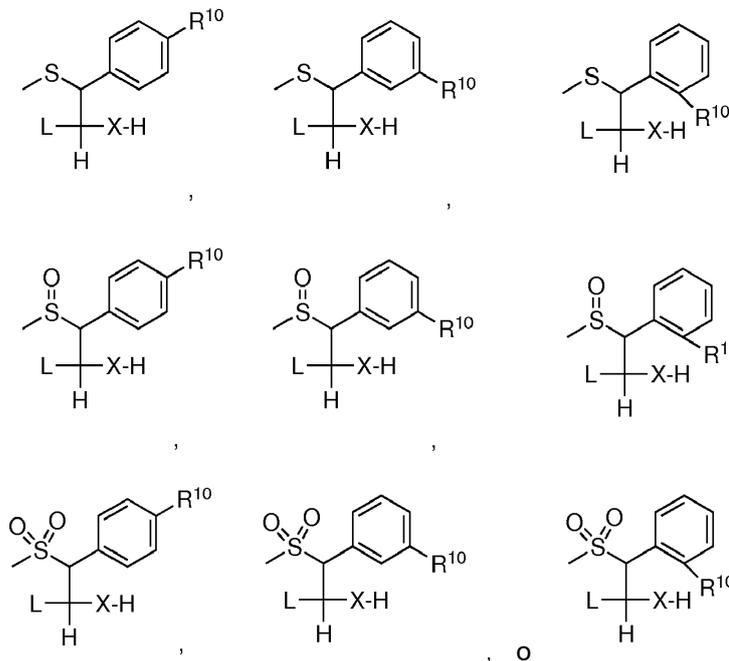


15

además de



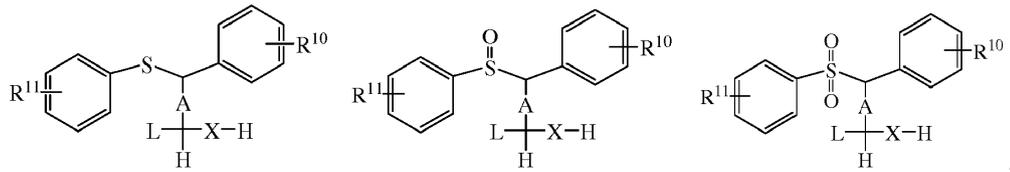
[0055] En modos de realización aún más particulares, las moléculas de fórmula (1f) incluyen



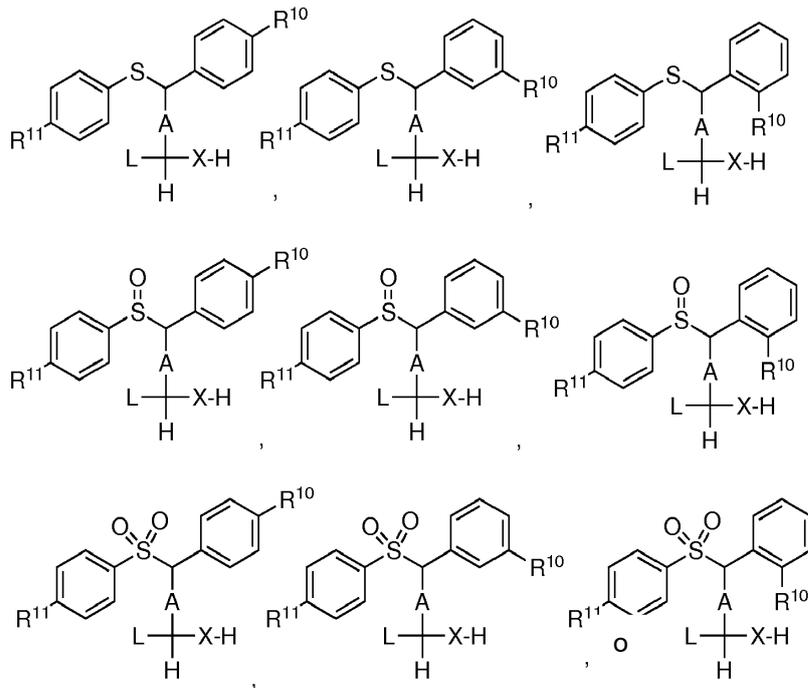
5

[0056] Aunque se muestra solo un ejemplo de sustitución por R¹⁰, puede darse R¹⁰ como un sustituyente atractor de electrones o donador de electrones en 1-5 posiciones de los anillos fenilo a los que está unido.

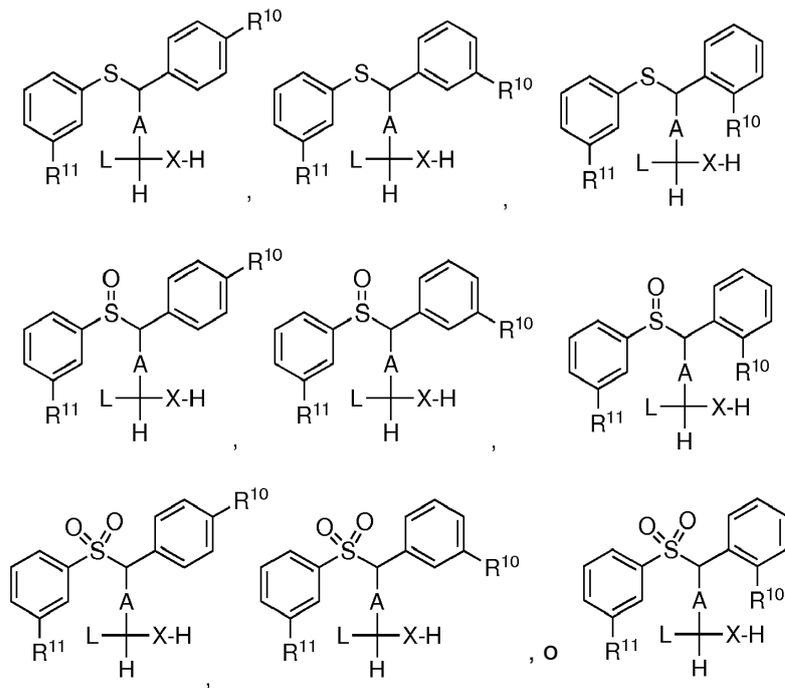
10 **[0057]** En un modo de realización particular, las moléculas de fórmulas (1f) donde R¹⁰ y R¹¹ es cada uno independientemente H, o un grupo donador de electrones o atractor de electrones, donde R¹⁰ y R¹¹ como sustituyentes distintos de hidrógeno pueden estar presentes en 1-5 posiciones de sus respectivos anillos fenilo tienen la fórmula



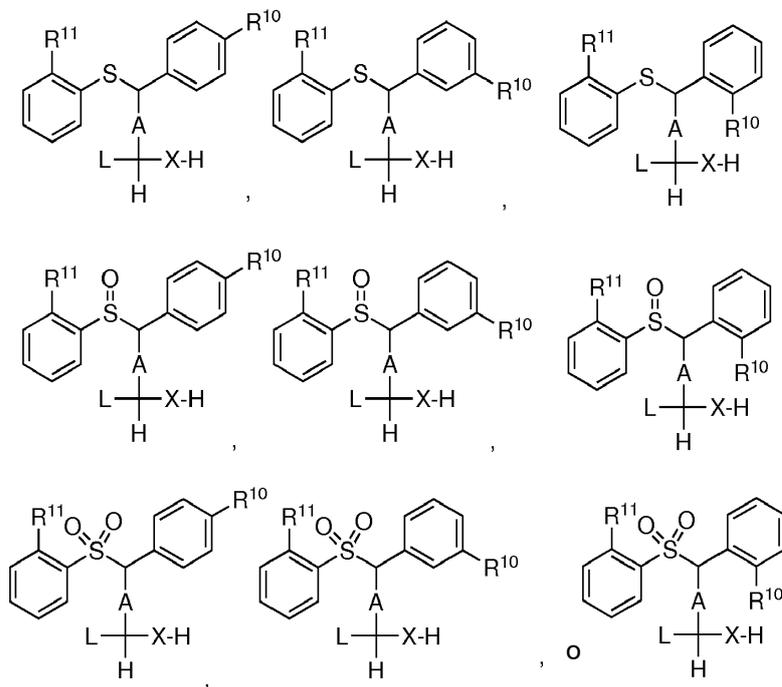
incluidas



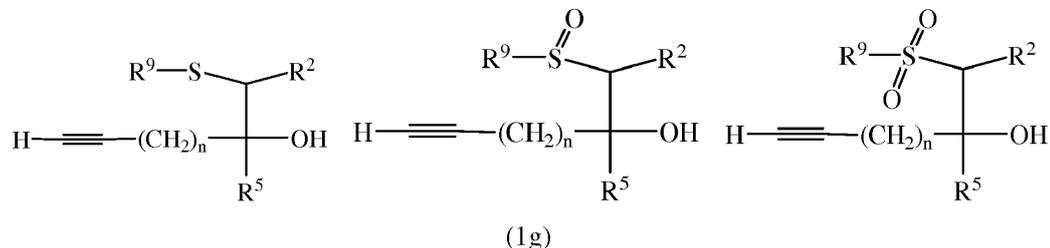
y



[0058] en otro modo de realización más particular, los compuestos de la fórmula (1) tienen la fórmula



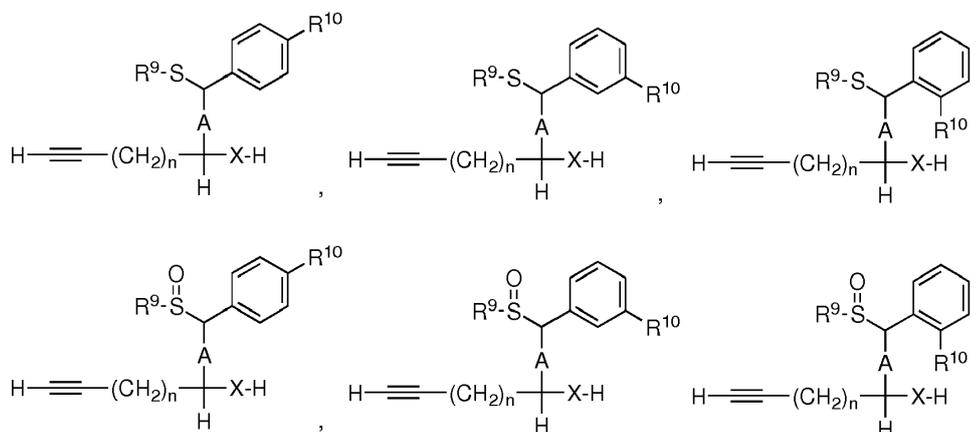
5 [0059] En determinados modos de realización, las moléculas de la fórmula (1) tienen la fórmula (1g) más específica

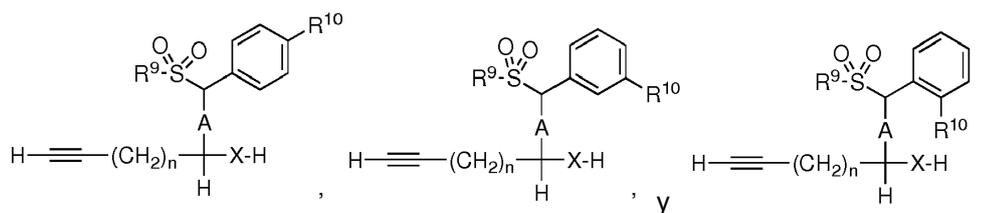


donde R² es H, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, alquenilo, alquinilo, CN, NO₂, C(O)-R³, SOR³, SO₂R³, o SR⁴; R⁹ es alquilo, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, alquenilo o alquinilo; n = 1-6, y R⁵ es H o alquilo (C₁₋₆).

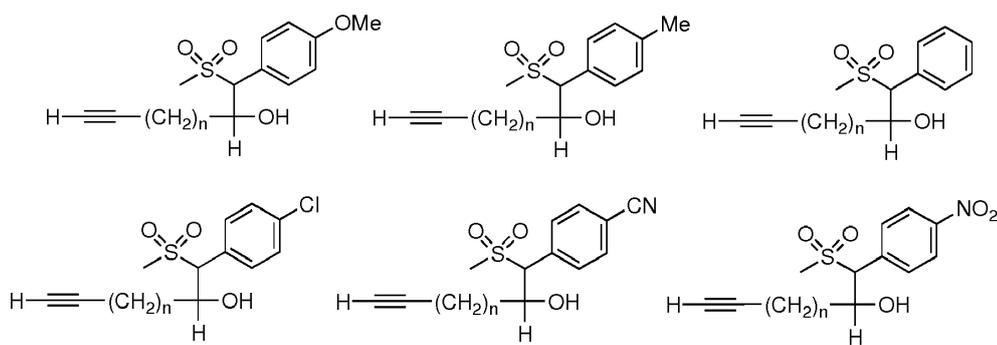
10

[0060] Las moléculas de la fórmula (1g) donde R¹⁰ es H, o un grupo atractor de electrones o donador de electrones incluyen

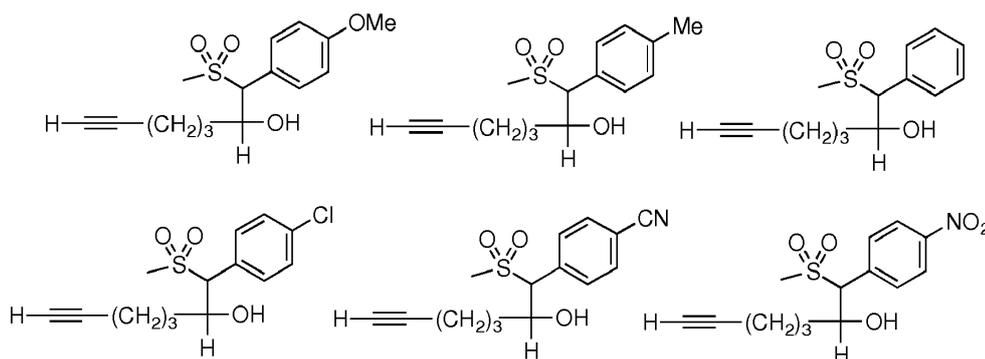




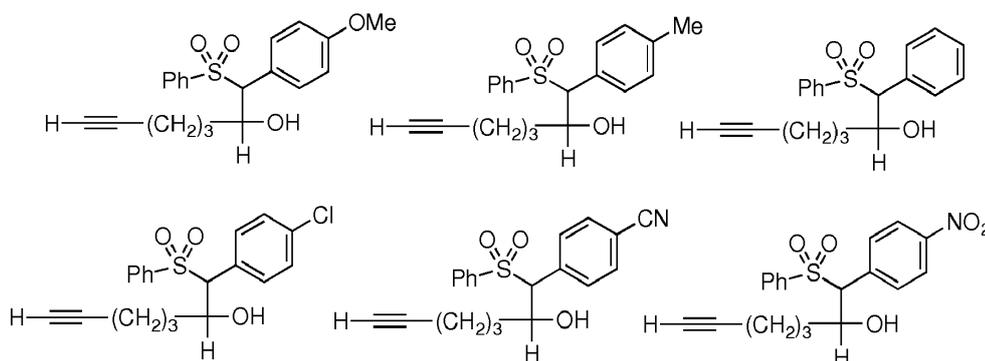
además de



5 y



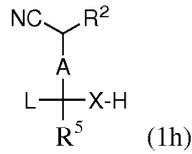
y



10

[0061] Aunque R¹⁰ como un sustituyente distinto de hidrógeno se ha mostrado solo en una posición, este sustituyente distinto de hidrógeno puede presentarse en 1-5 posiciones de la fracción fenilo mostrada.

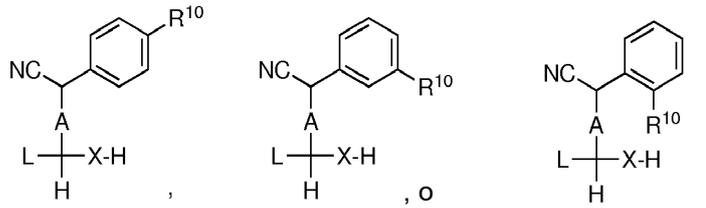
[0062] En determinados modos de realización, las moléculas de la fórmula (1) tienen la fórmula (1h) más específica



donde R² es H, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, alqueniilo, alquinilo, CN, NO₂, C(=O)-R³, SOR³, SO₂R³, o SR⁴; X es O o S; A es alqueniilo (C₂), arilo o está ausente; L es un grupo de enlace capaz de fijarse a una macromolécula, y R⁵ es H o alquilo (C₁₋₆).

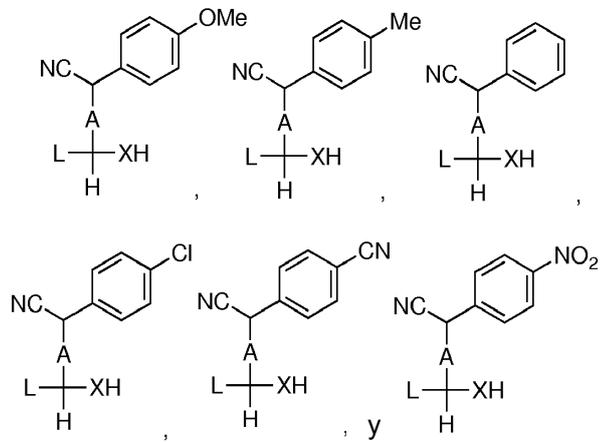
5 **[0063]** En otro modo de realización, R² es H. En otro modo de realización, R² es arilo, arilo sustituido, heteroarilo o heteroarilo sustituido.

[0064] Las moléculas de fórmula (1h) incluyen



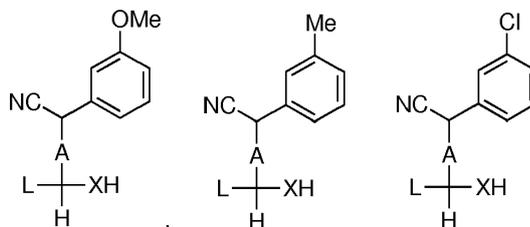
10 donde R¹⁰ es H, un grupo atractor de electrones o un grupo donador de electrones. Aunque R¹⁰ se muestra específicamente solo en una posición en los anillos fenilo anteriormente mencionados, un modo de realización distinto a hidrógeno de R¹⁰ puede estar presente en 1-5 posiciones, preferiblemente 3 posiciones o menos en el anillo fenilo.

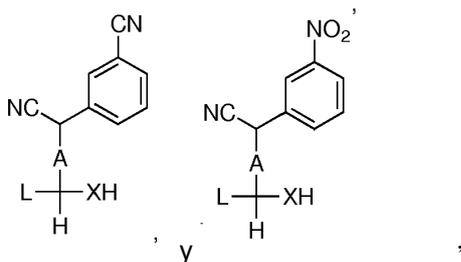
[0065] Las moléculas de fórmula (1h) incluyen además



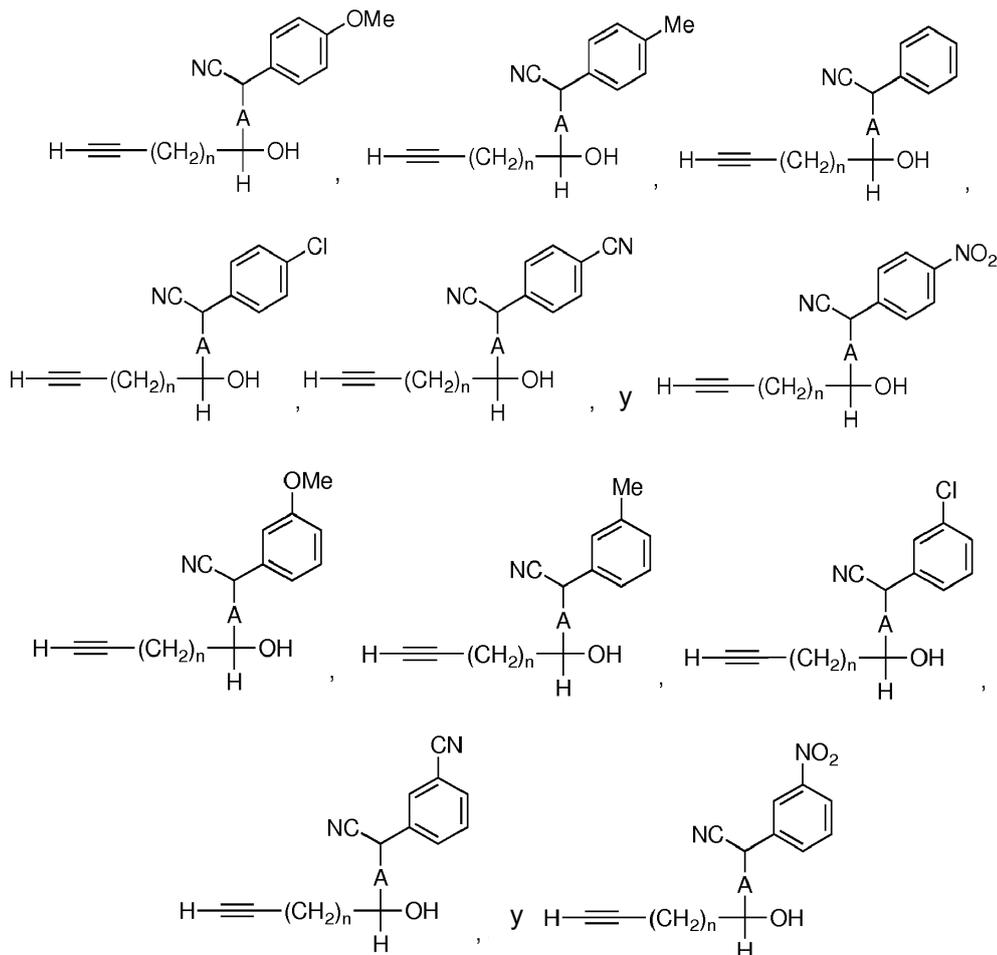
15

y





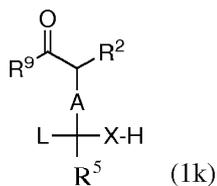
además de



5

donde n = 1-6

[0066] En determinados modos de realización, las moléculas de la fórmula (1) tienen la fórmula (1k) más específica

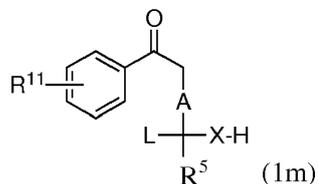


10

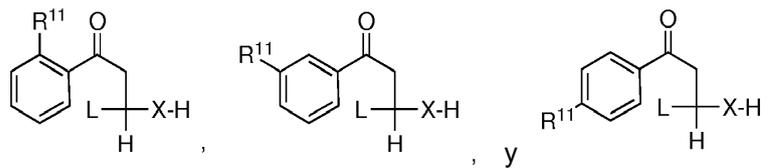
donde R² es H, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, alquenoilo, alquinoilo, CN, NO₂, C(=O)-R³, SOR³, SO²R³, o SR⁴; X es O o S; A es alquenoileno (C₂), arilo o está ausente, y L es un grupo de enlace capaz de fijarse a una macromolécula, y R⁵ es H o alquilo (C₁₋₆).

[0067] En un modo de realización particular, las moléculas de la fórmula (1k) tienen $R^2 = H$, dando moléculas de la fórmula (1m), donde R^{11} es H o un grupo atractor de electrones o donador de electrones, donde R^{11} como un sustituyente distinto de hidrógeno puede estar presente en 1-5 posiciones, preferiblemente menos de 3 posiciones en la fracción fenilo.

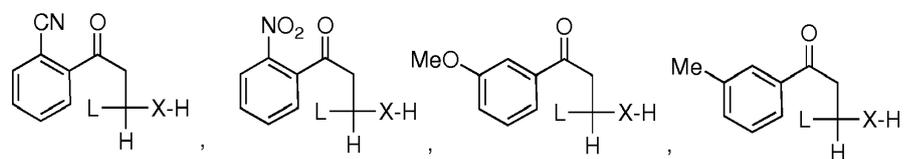
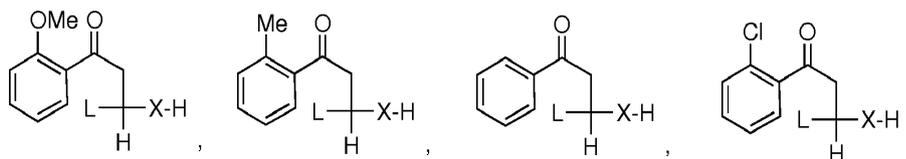
5



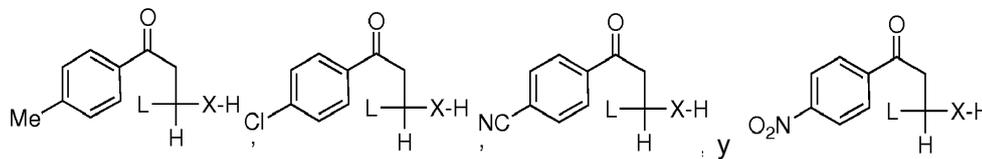
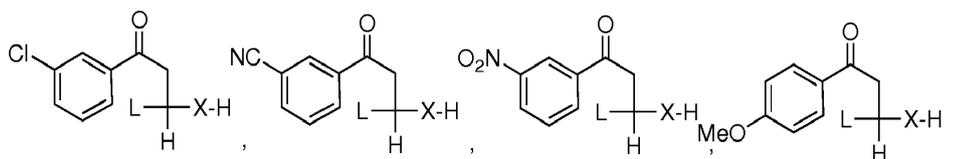
[0068] Las moléculas de fórmula (1m) incluyen



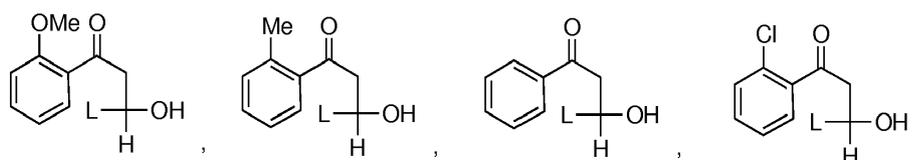
además de

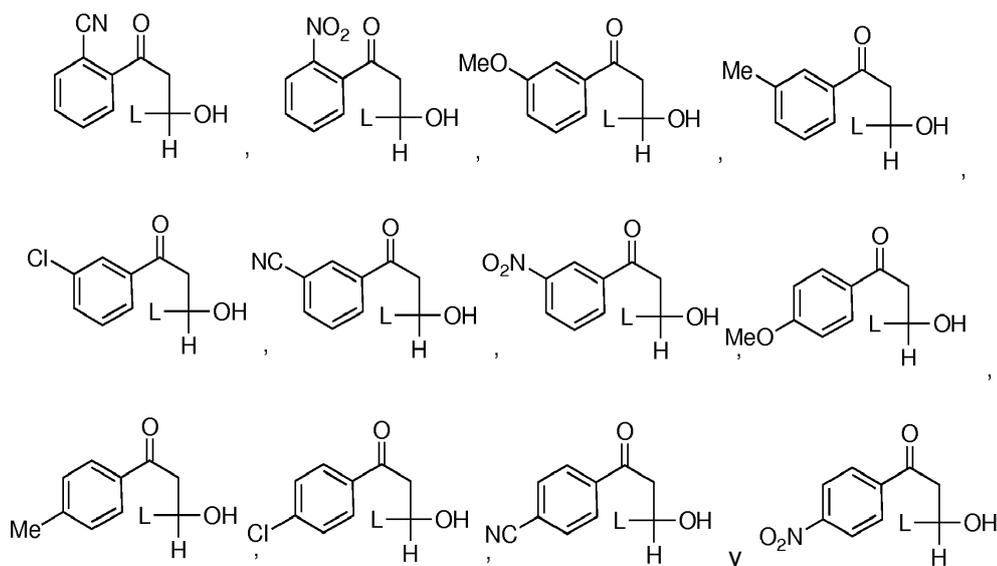


10

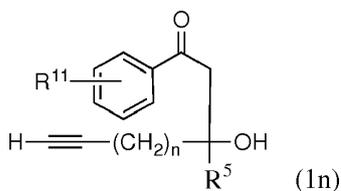


y





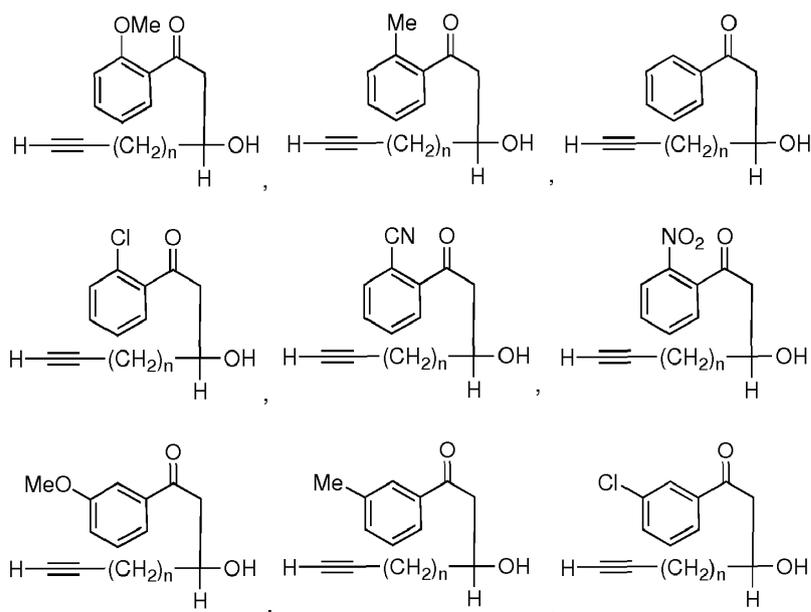
[0069] En un modo de realización particular, las moléculas de la fórmula (1m) tienen la fórmula (1n)



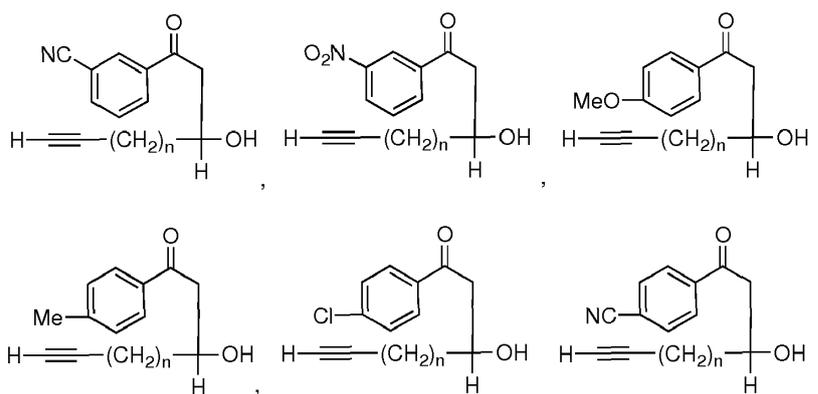
5

donde n = 1-6; R¹¹ es un grupo atractor de electrones, o un grupo donador de electrones donde R¹¹ como sustituyente distinto de hidrógeno puede estar presente en 1-5 posiciones, preferiblemente en menos de 3 posiciones en la fracción fenilo, y R⁵ es H o alquilo (C¹⁻⁶).

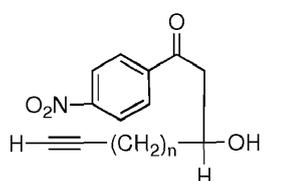
[0070] Las moléculas de fórmula (1n) incluyen



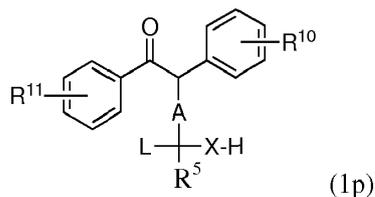
10



y

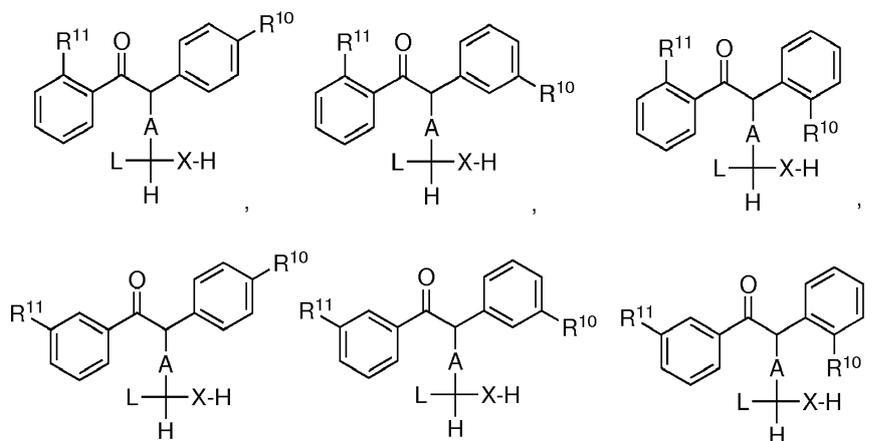


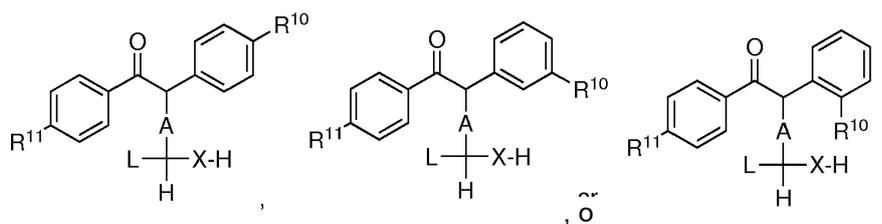
- 5 **[0071]** En un modo de realización particular, las moléculas de la fórmula (1k) tienen $\text{R}^2 = \text{arilo}$, y tienen la fórmula (1p)



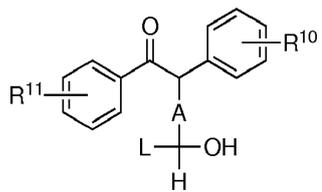
- 10 donde X es O o S; A es alquilenilo (C_2), arilo o está ausente; L es un grupo de enlace capaz de fijarse a una macromolécula; R^{10} y R^{11} son cada uno independientemente H, un grupo atractor de electrones, o un grupo donador de electrones, donde una forma diferente a hidrógeno de R^{10} y R^{11} puede estar presente en 1-5 posiciones, preferiblemente 3 o menos posiciones de la fracción fenilo, y R^5 es H o alquilo (C^{1-6}).

[0072] Las moléculas de fórmula (1p) incluyen

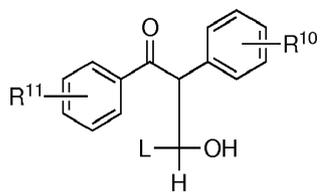




además de

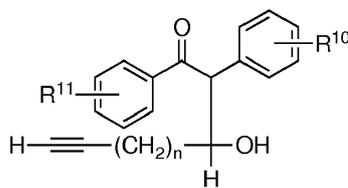


y

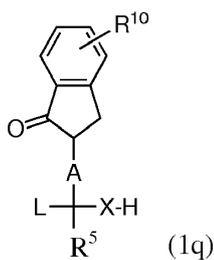


5

y

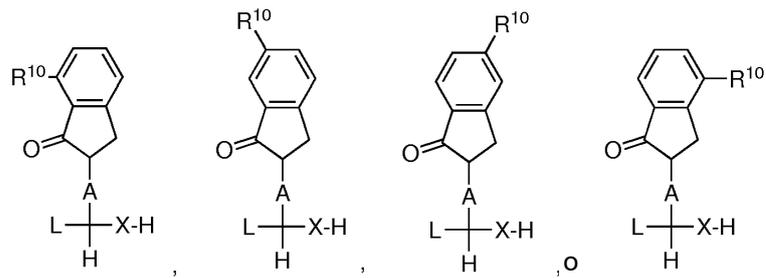


[0073] En un modo de realización particular, las moléculas de la fórmula (1) tienen la fórmula (1q) más específica

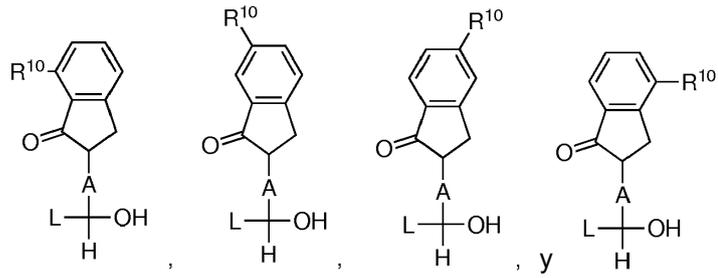


10 donde X es O o S; A es alquilenilo (C₂), arilo o está ausente; L es un grupo de enlace capaz de fijarse a una macromolécula; R¹⁰ es H, un grupo atractor de electrones, o un grupo donador de electrones, donde una forma diferente a hidrógeno de R¹⁰ puede estar presente en 1-4 posiciones, preferiblemente 2 o menos posiciones de la fracción fenilo, y R⁵ es H o alquilo (C¹⁻⁶).

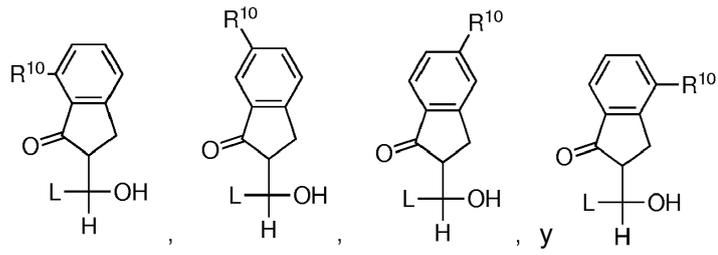
[0074] Las moléculas de fórmula (1q) incluyen



[0075] Las moléculas de fórmula (1q) incluyen

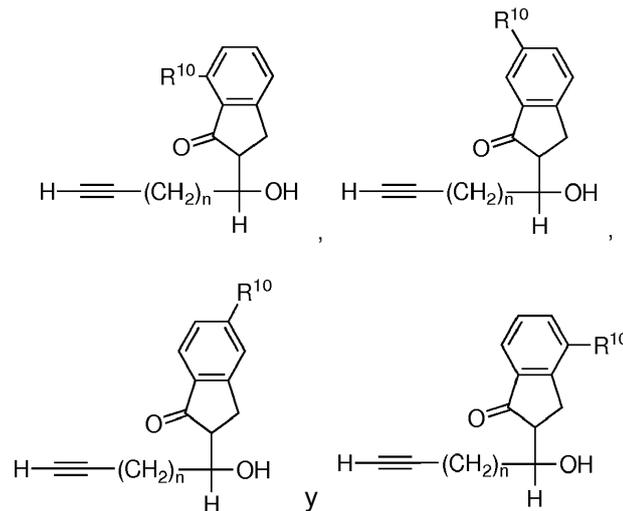


y

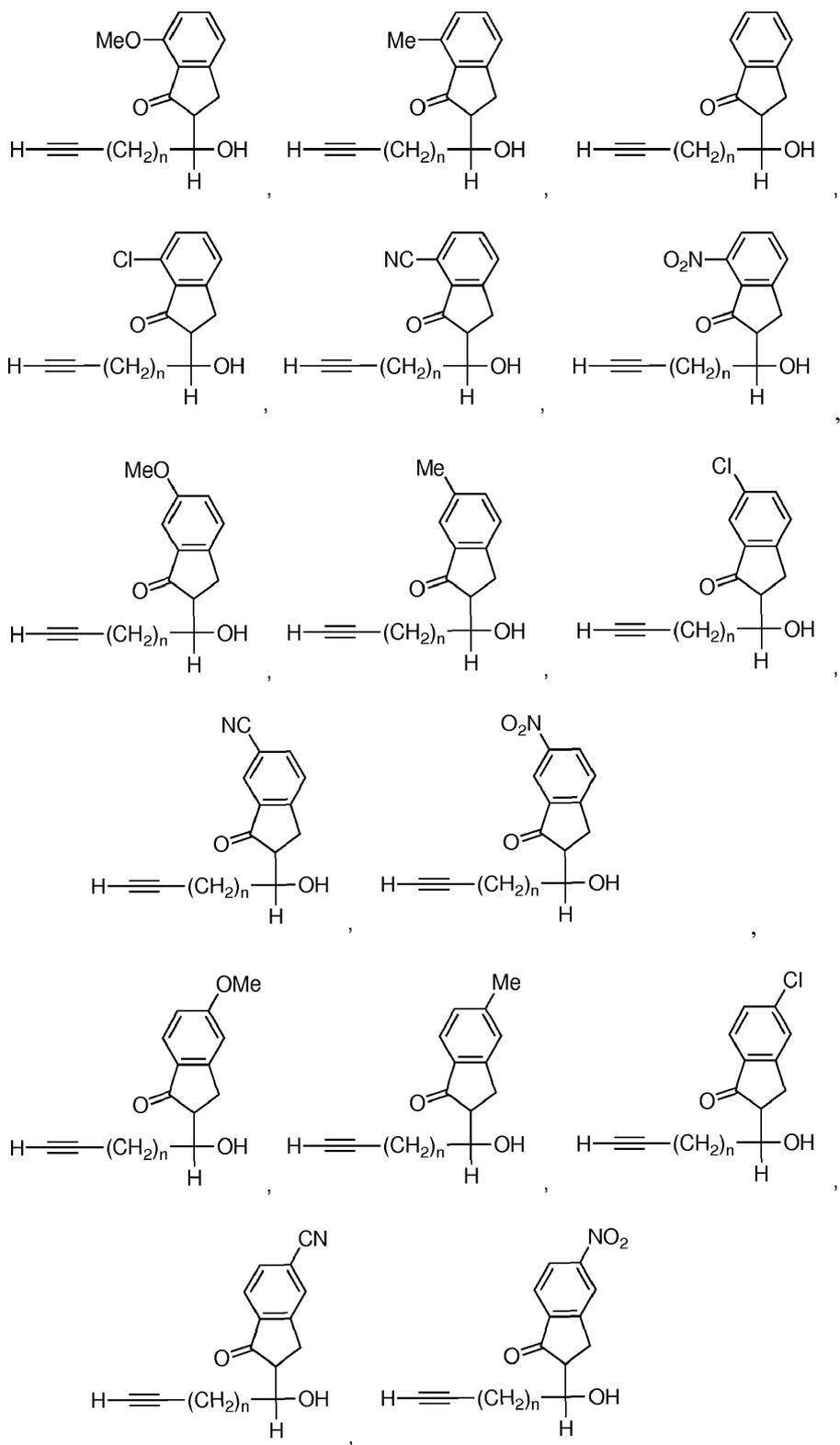


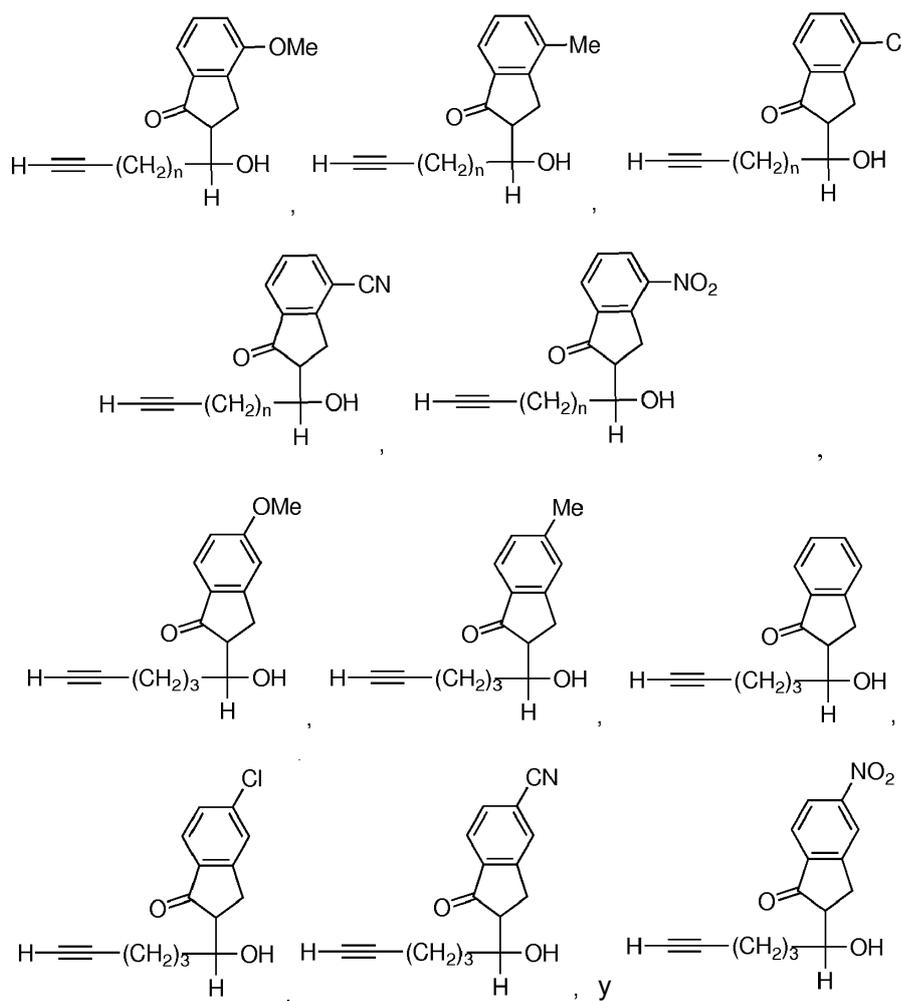
5

y

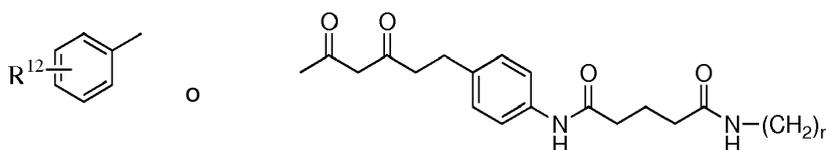


[0076] Las moléculas de fórmula (1q) incluyen además





- 5 **[0077]** L es un grupo de enlace capaz de fijarse a una macromolécula. El término «grupo de enlace capaz de fijarse a una macromolécula» se refiere a un grupo que comprende una funcionalidad mediante la cual L puede unirse químicamente a una macromolécula. Ejemplos de funcionalidad adecuada incluyen, pero sin carácter limitativo, aminas, alcoholes, tioles, cloruros, yoduros, bromuros, azidas, maleimidas, alquenos, alquinos, aldehídos, carboxilatos, y fosfatos. Por consiguiente, en un modo de realización, L es $(\text{CH}_2)_n\text{R}^{12}$,

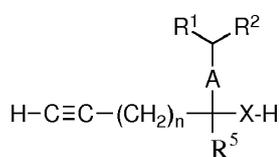


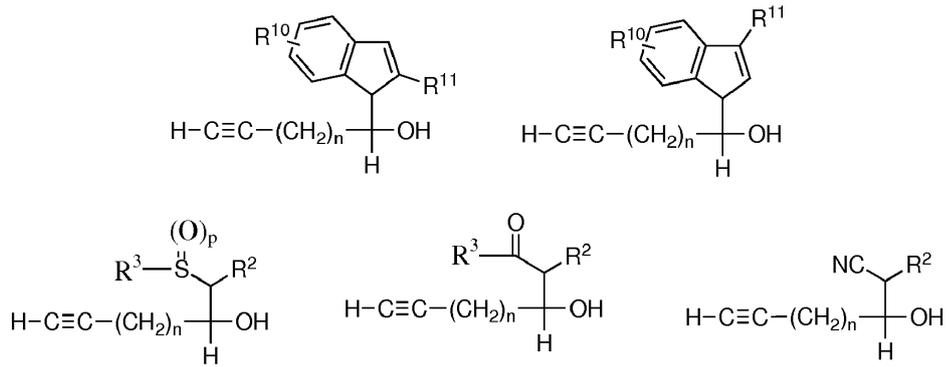
10

donde $n = 1-6$ y R^{12} es NH_2 , N_3 , Cl , Br , I , SH , COOH , CHO , $\text{CH}=\text{CH}_2$, CCH , o maleimido.

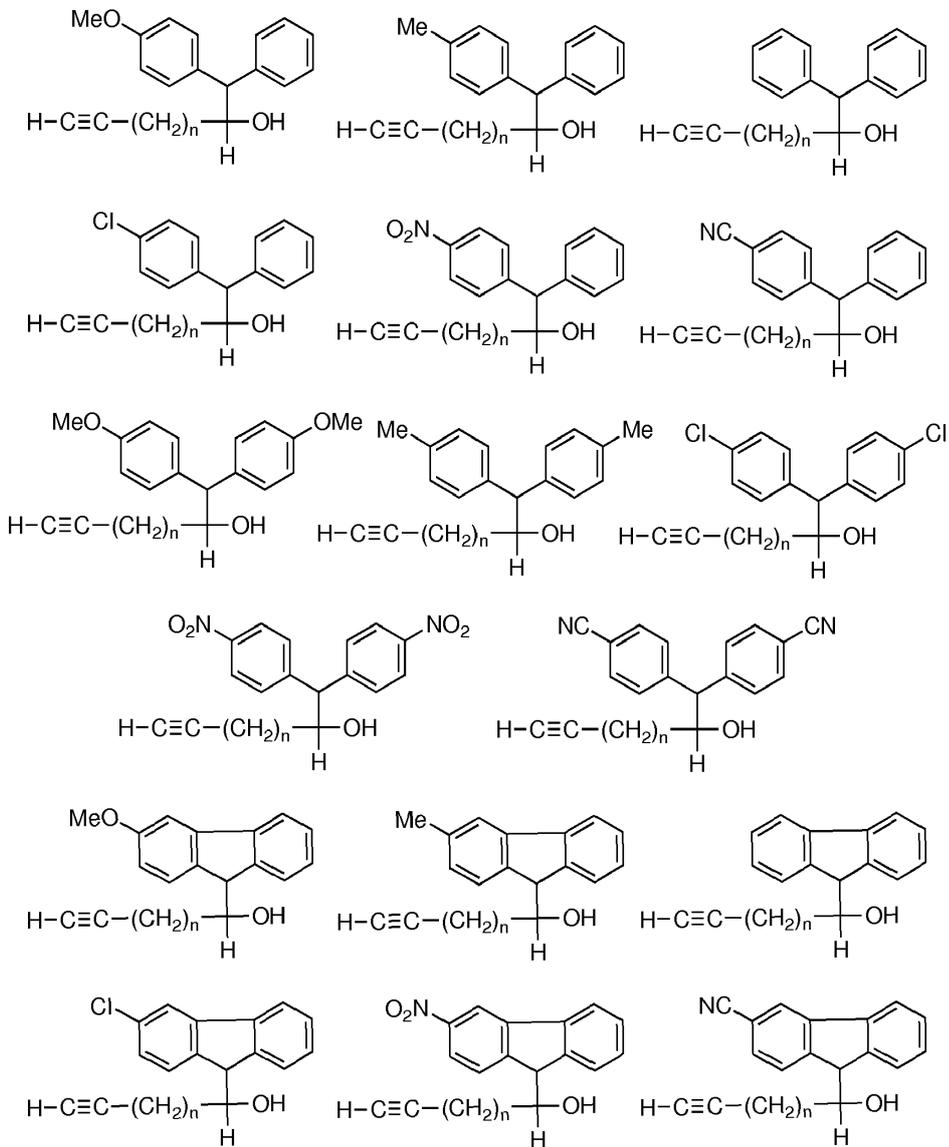
[0078] En un modo de realización particular, L es $(\text{CH}_2)_n\text{R}^{12}$, donde $n = 1-6$, y R^{12} es NH_2 , N_3 , I , SH , COOH , CHO , CCH , o maleimido, o R^{12} es N_3 , SH , CHO , CCH , o maleimido, o R^{12} es N_3 o CCH .

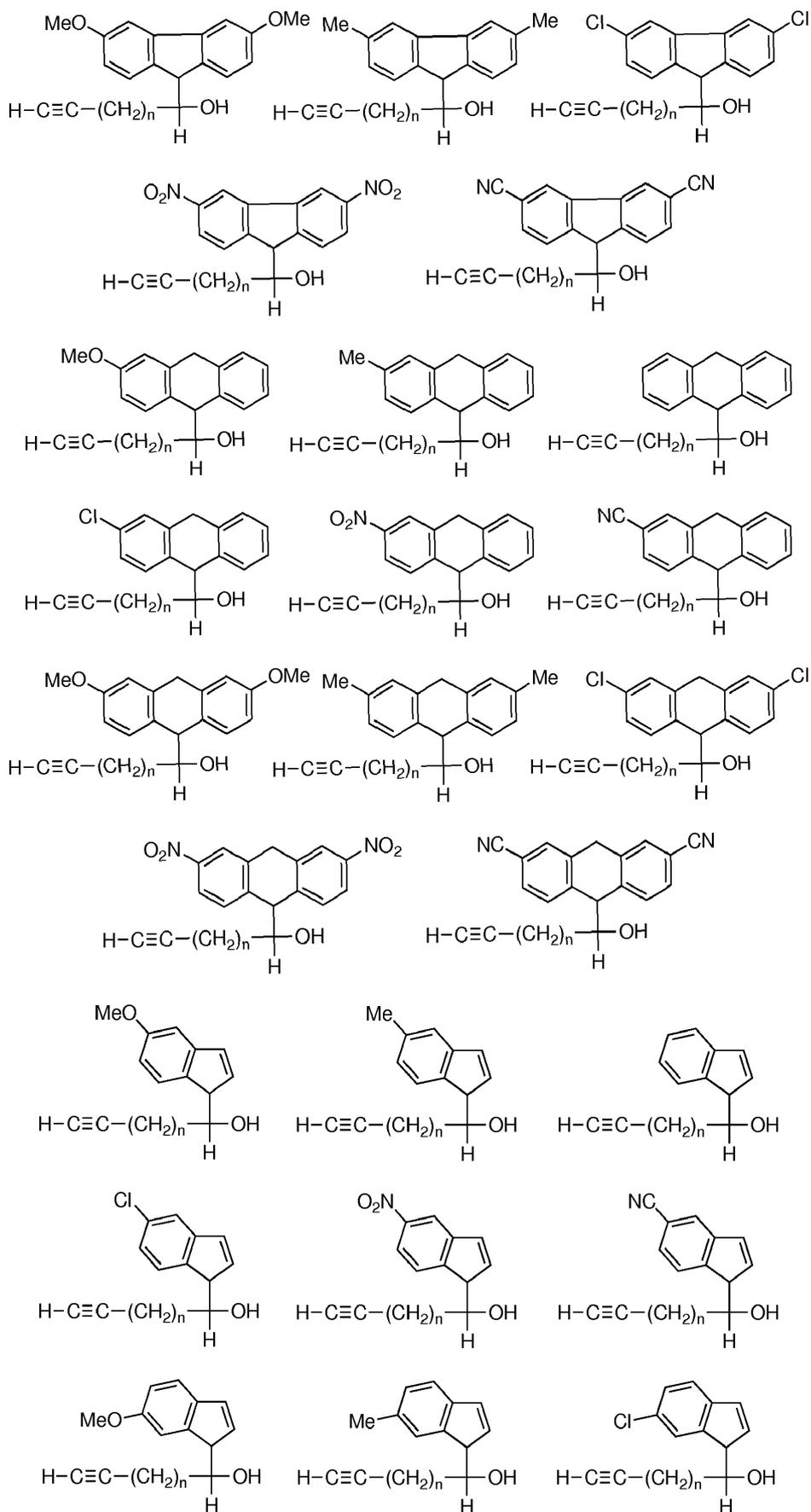
- 15 **[0079]** En determinados modos de realización, L es $\text{CH}_2)_n\text{CCH}$, dando compuestos de la fórmula (1) que presentan la fórmula

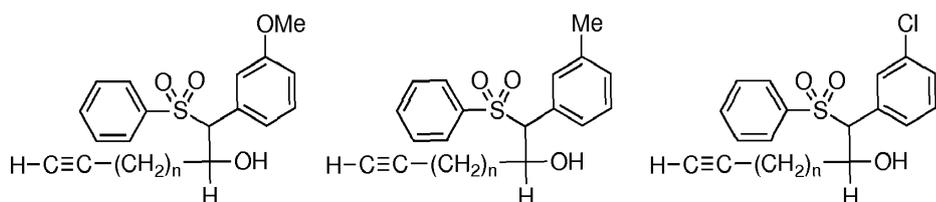
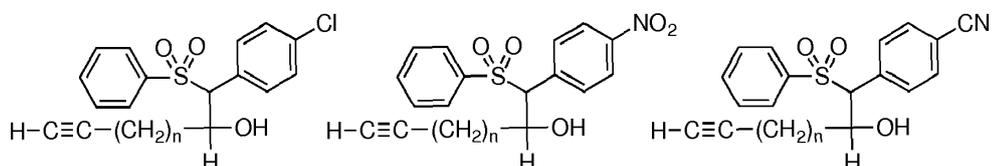
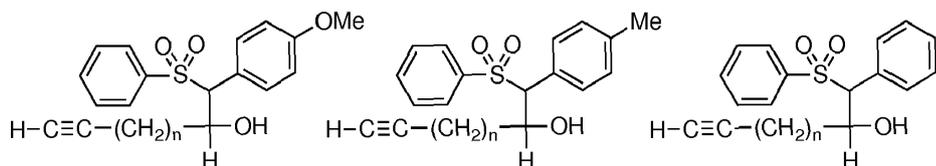
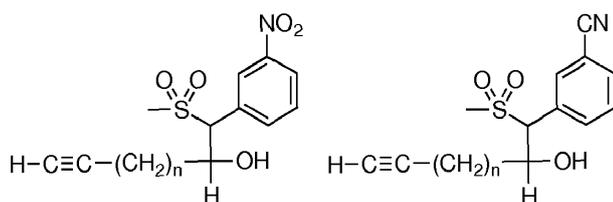
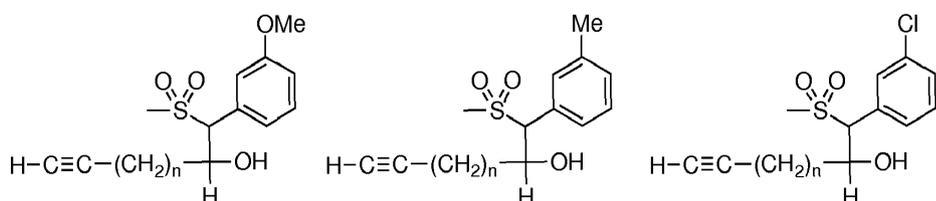
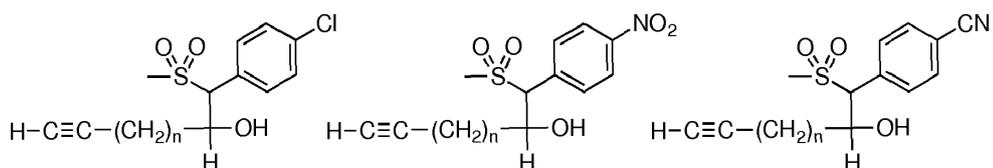
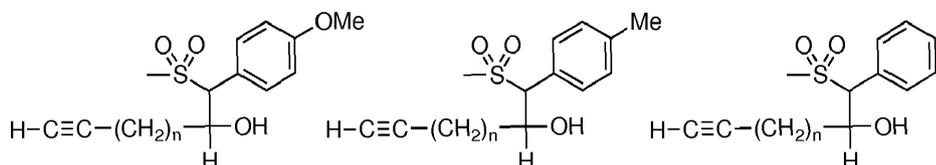
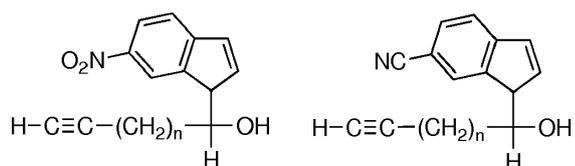


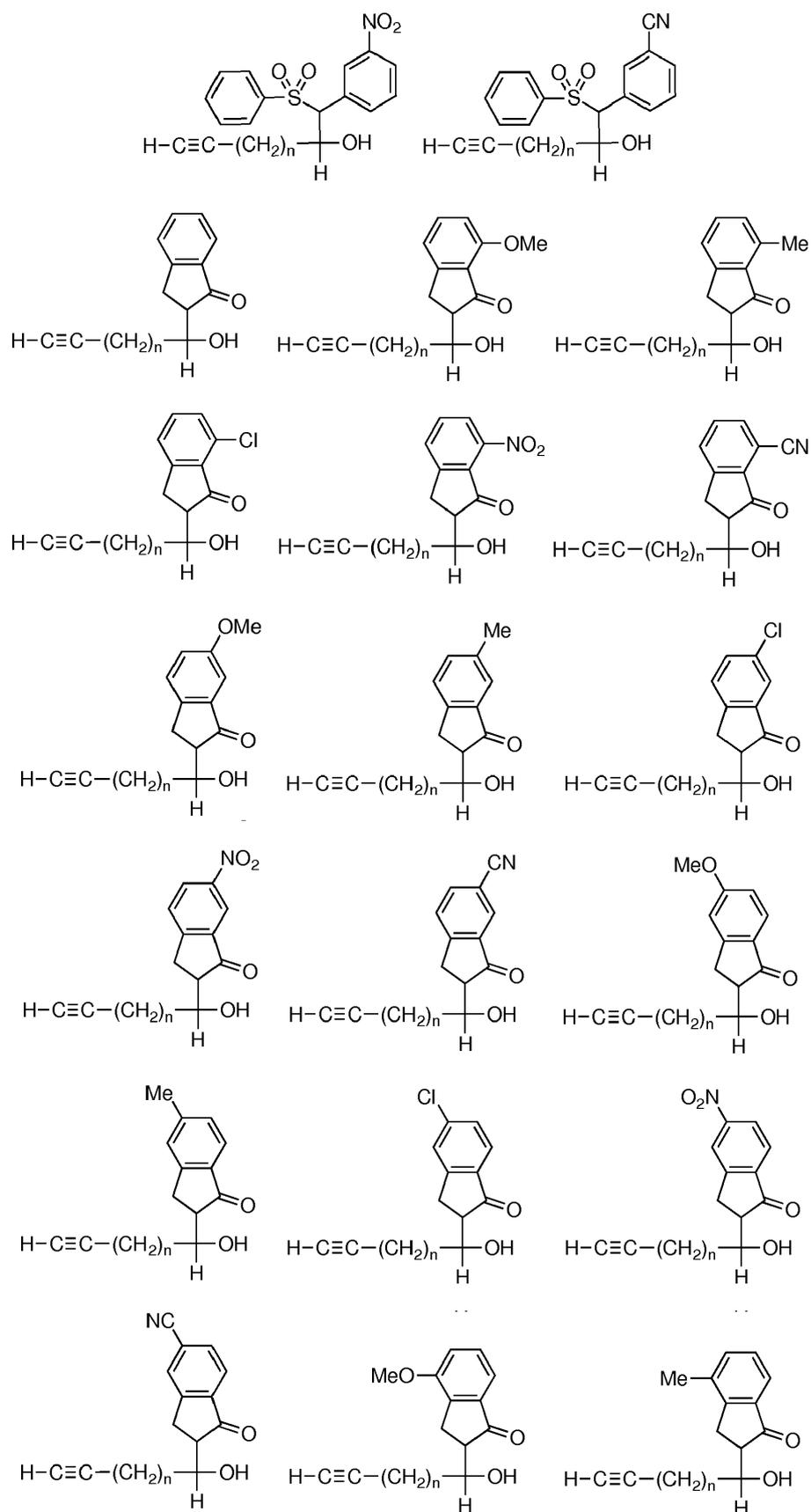


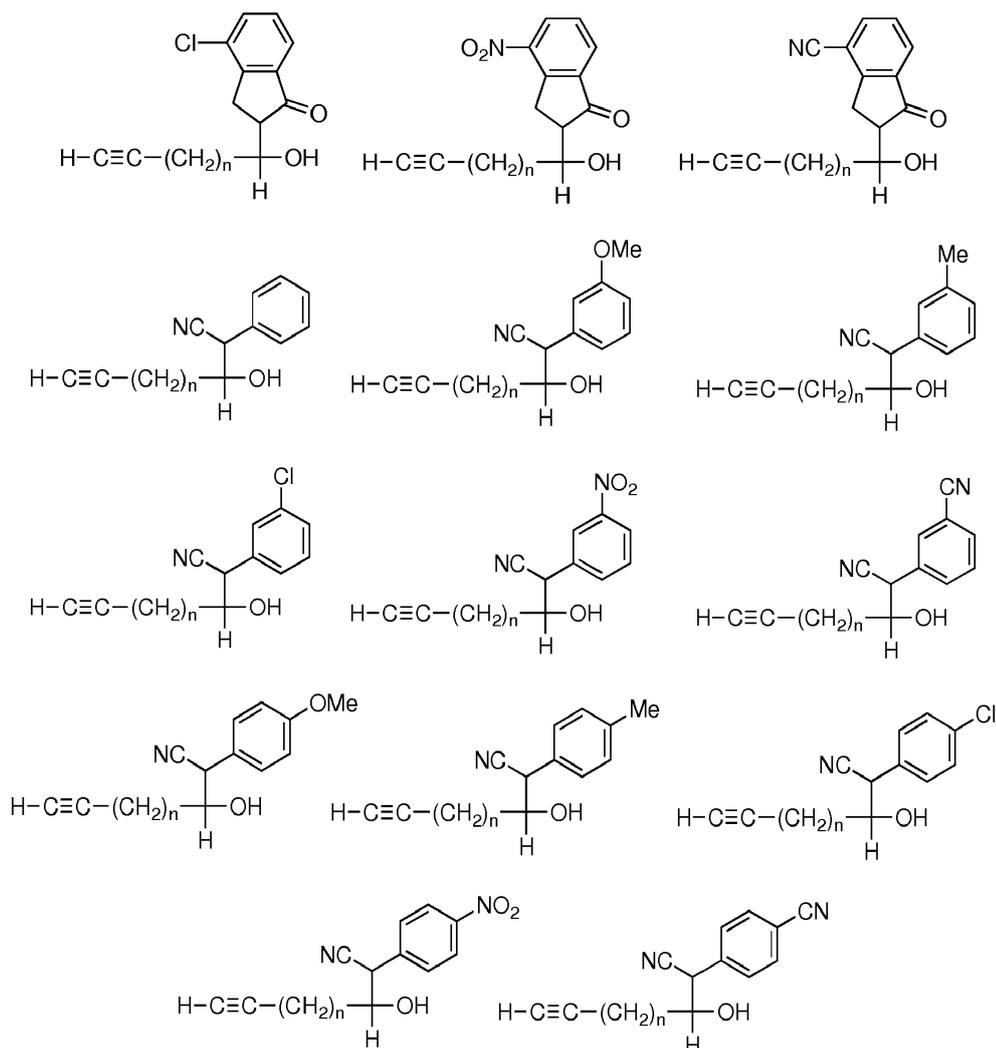
[0081] En modos de realización más particulares, las moléculas de fórmula (1) incluyen











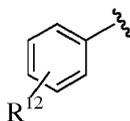
5

donde $n = 1-6$. En modos de realización más particulares, $n = 3$.

[0082] En todos los ejemplos anteriores de compuestos (1a)-(1q), las formas distintas a hidrógeno de los sustituyentes en los sistemas anulares pueden estar presentes en múltiples ubicaciones, preferiblemente en no más de 2 o 3 ubicaciones. Los sustituyentes distintos de hidrógeno de un único anillo pueden ser los mismos o diferentes.

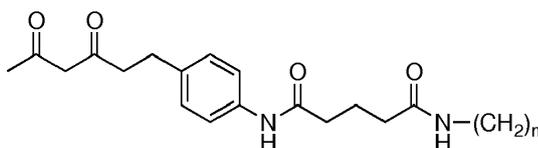
10

[0083] En otro modo de realización, L es



donde R^{12} es NH_2 , N_3 , Cl, Br, I, SH, OH, COOH, CHO, $CH=CH_2$, CCH, o maleimido.

[0084] En otro modo de realización, L es un grupo de la fórmula



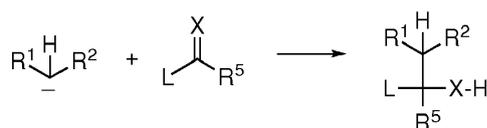
15

donde n = 1-6 Estos compuestos pueden prepararse partiendo de compuestos donde L = (CH₂)_nNH₂, mediante reacción con ácido 4-[4-(3,5-Dioxo-hexil)-fenilcarbamoil]-butírico en presencia de un agente de condensación, por ejemplo una carbodiimida (DCC, EDCI) o un reactivo de uronio (p. ej., HATC, HBTA, TATU).

5 **[0085]** La naturaleza de L' está determinada por la naturaleza de los modos de realización anteriores de L, y por consiguiente estos modos de realización son ilustrativos de las fórmulas (3) y (4).

Preparación de los compuestos de la Fórmula (1)

10 **[0086]** Los compuestos de la Fórmula (1) donde A está ausente pueden prepararse mediante la adición de un carbanión R¹R²CH⁻ formado reaccionando R¹R²CH₂ con una base fuerte, por ejemplo, butil-litio, NaH, diisopropilamida de litio, bis(trimetilsililamida) de litio, o similar, con una molécula L-C(=X)R⁵ para producir un compuesto de la fórmula (1x)

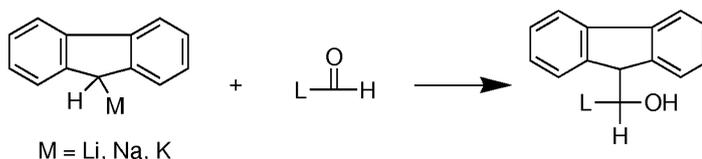


(1x).

15 **[0087]** Alternativamente, los compuestos de fórmula (1x) donde A está ausente y X = O pueden prepararse mediante un proceso de dos etapas. En la primera etapa, la adición de un carbanión R¹R²CH⁻ formado reaccionando R¹R²CH₂ con una base fuerte, por ejemplo, butil-litio, NaH, diisopropilamida de litio, bis(trimetilsililamida) de litio, o similar, con un éster L-C(=O)OR*, donde R* es alquilo inferior, produce una cetona intermedia R¹R²CH-C(=O)-L, que puede someterse a reacción en la segunda etapa con un agente reductor adecuado, por ejemplo NaBH₄ o NaBH₃CN, para proporcionar el compuesto de la fórmula (1) donde X=O.

20 **[0088]** Por ejemplo, cuando L-CHO es 5-hexenal, se obtiene un compuesto de la fórmula (1a) donde X = O y L es (CH₂)₃CH=CH₂. Cuando L-CHO es 5-hexenal, se obtiene un compuesto de la fórmula (1a) donde X = O y L es (CH₂)₃CCH. Cuando L es 6-azidohexanal, se obtiene un compuesto de la fórmula (1a) donde X = O y L es (CH₂)₅N₃. Cuando L es 3-azidobenzaldehído, se obtiene un compuesto de la fórmula (1a) donde X = O y L es 3-azidofenilo. Cuando L = 4-bromobenzaldehído, se obtiene un compuesto de la fórmula (1a) donde X = O y L es 4-bromofenilo.

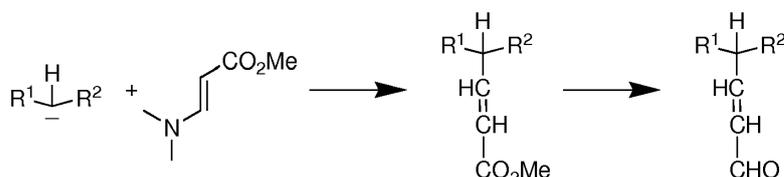
25 **[0089]** Por ejemplo, cuando R¹R²CH₂ = fluoreno se somete a reacción con una base fuerte, por ejemplo, butil-litio, NaH, o diisopropilamida de litio, para formar un carbanión fluorenilo, que después se somete a reacción con L-CHO, la reacción es la siguiente:



30 **[0090]** Los compuestos correspondientes donde X = S pueden prepararse de manera similar utilizando el análogo apropiado Z-C(=S)R⁵ o pueden prepararse de manera alternativa mediante una transformación química posterior de los compuestos (1a) utilizando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo activación del grupo alcohol en (1a), por ejemplo mediante la conversión a un bromuro utilizando PBr₃ o Ph₃PBr₂, o mediante conversión al tosilato o triflato, y desplazamiento por un grupo nucleófilo adecuado como tiourea o tiosulfato para formar un compuesto de la fórmula (1b). En un modo de realización preferido, el tiosulfato se utiliza para formar una sustancia intermedia que está hidrolizada por tratamiento ácido para formar el tior.

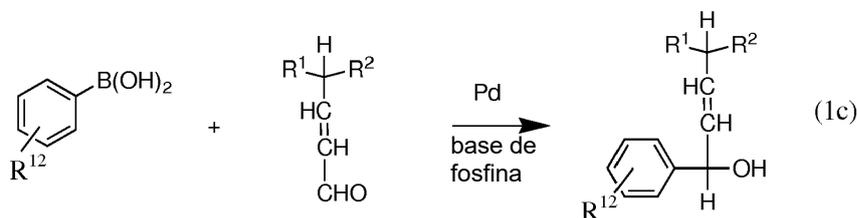
35 **[0091]** En determinados modos de realización, A = alquenileno (C₂). Los compuestos en los que

A = alquenileno (C₂) puede prepararse mediante la adición del carbanión obtenido por litiación de R¹R²CH₂, por ejemplo usando una base fuerte tal como NaH, butil-litio, bis(trimetil-sililamida) de litio, o similar, a un compuesto insaturado, tal como 3-(dimetilamino)-acrilato de metilo para proporcionar un éster intermedio, que puede reducirse, a través de una etapa o a través de múltiples etapas, para dar el aldehído insaturado correspondiente:



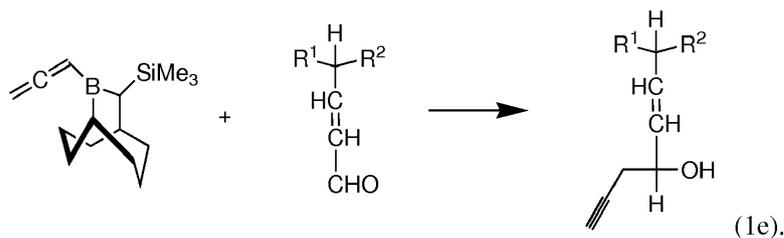
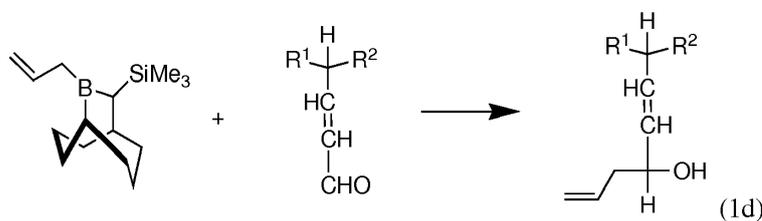
40

[0092] La reacción del aldehído insaturado con un ácido alborónico R^{12} -aril- $B(OH)_2$, en presencia de un catalizador de paladio, por ejemplo como se describe en Org. Letts. (2005) 7:4153-5, proporciona un compuesto de fórmula (1c), donde A = alqueniлено (C_2), L = arilo sustituido, y X = O.



- 5 **[0093]** De manera alternativa, la reacción del aldehído insaturado con un alilborano según el método de Soderquist proporciona compuestos de fórmula (1d), donde A = alqueniлено (C_2), X = O, y L = $CH_2CH=CH_2$, y la fórmula (1e), donde A = alqueniлено (C_2), X = O y

L = CH_2CCH . Véase Burgos, C. H., et al., J. Am. Chem. Soc. (2005) 127:8044.



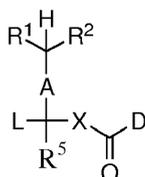
10

Preparación de los compuestos de las Fórmulas (2), (3) y (4)

- [0094]** Después, los materiales de partida de la fórmula (1) se derivatizan o bien primero al fármaco o bien primero a la macromolécula para obtener una sustancia intermedia en la formación del compuesto de la fórmula (3). En estas sustancias intermedias y en el producto de la fórmula (3), todos los modos de realización que resultan de las muchas formas expuestas de la fórmula (1), y específicamente los modos de realización de L, A, X, R^1 , R^2 y R^5 , se retienen en las sustancias intermedias y en el producto final de fórmula (3), excepto que L, cuando reacciona con la macromolécula, se convierte en L' como resultado de esta reacción.

- [0095]** Por tanto, en las siguientes ilustraciones de la sustancia intermedia donde se añade primero el fármaco, todos los modos de realización de R^1 , R^2 , R^5 , A, X y L expuestos anteriormente para la fórmula (1) se incluyen como ejemplos de los compuestos de la fórmula (2):

20



(2)

donde Z es el residuo de una macromolécula;
L es una fracción de enlace que puede reaccionar para acoplarse a una macromolécula;
D es el residuo de un fármaco;
X es O o S;
A es alqueniлено (C_2), arilo o está ausente;
cada R^1 y R^2 es independientemente H; CN;

25

NO₂;
 arilo opcionalmente sustituido;
 heteroarilo opcionalmente sustituido;
 alquenilo opcionalmente sustituido;
 alquinilo opcionalmente sustituido; o

5

cada R¹ y R² es independientemente COR³ o SO₂R³ donde

R³ es H o alquilo opcionalmente sustituido;

arilo opcionalmente sustituido;
 heteroarilo opcionalmente sustituido;
 alquenilo opcionalmente sustituido;
 alquinilo opcionalmente sustituido; o

10

OR o NR₂ donde cada R es independientemente H o alquilo opcionalmente sustituido; o

cada R¹ y R² es independientemente SR⁴ donde

R⁴ es alquilo opcionalmente sustituido;
 arilo opcionalmente sustituido;
 heteroarilo opcionalmente sustituido;
 alquenilo opcionalmente sustituido; o
 alquinilo opcionalmente sustituido;

15

donde los sustituyentes opcionales se seleccionan del grupo consistente en grupos donadores de electrones como alquilo C₁-C₄; alcoxi C₁-C₄; alquiltio C₁-C₄; amino; alquilamino; y dialquilamino; y grupos atractores de electrones como halógeno; difluorometilo; trifluorometilo; nitro, ciano, C(O)R, donde R es H, alquilo C₁-C₄; alcoxi C₁-C₄ o amino; y SOR y SO₂R, donde R es alquilo C₁-C₄, arilo, o heteroarilo.

20

donde estos varios sustituyentes opcionales pueden unirse a anillos arilos o heteroarilos, los cuales varios sustituyentes pueden ser los mismos o diferentes;

25

donde R¹ y R² pueden unirse para formar un anillo de 3-8 miembros; y

donde R¹ y R² no pueden ser H;

donde R⁵ es H o alquilo (C₁₋₆).

[0096] Por consiguiente, L, A, R¹, R² y R⁵, además de X, se definen de manera genérica como anteriormente para el compuesto de fórmula (1), y los modos de realización específicos de estos sustituyentes ejemplificados anteriormente para la fórmula (1) se incorporan en el presente documento por referencia como ejemplos de la fórmula (2).

30

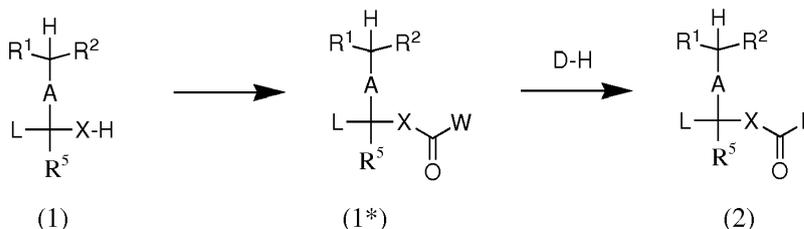
[0097] Los compuestos de la fórmula (2) pueden liberar el agente terapéutico a una velocidad controlada o pueden utilizarse como intermediarios para conectar el agente terapéutico con una macromolécula. Las fórmulas (2) y (3) liberan el agente terapéutico a una velocidad controlada según un mecanismo de eliminación dependiente del pH.

35

[0098] Como se ha expuesto anteriormente, la naturaleza de R¹, R², A y L influye en la velocidad de liberación.

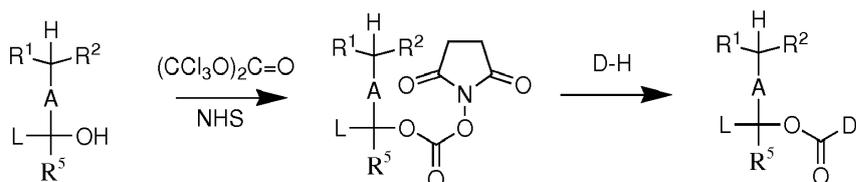
[0099] Los compuestos de la fórmula (2) pueden prepararse generalmente por condensación de una molécula de fórmula (1), descrita anteriormente, con una molécula de fármaco D. En un modo de realización de la invención, un compuesto de fórmula (1) se activa primero por condensación mediante una reacción con un reactivo adecuado, por ejemplo fosgeno o trifosgeno, opcionalmente en la presencia de N-hidroxisuccinimida, 1,1-carbonildiimidazol; 1,1-carbonilditriazol; o reactivos similares para la conversión de un compuesto de fórmula (1) en un compuesto activado de fórmula (1*), donde W = F, Cl, imidazolilo, triazolilo o O-succinimidilo:

40



45

[0100] Por ejemplo, la reacción de un compuesto de fórmula (1) donde X = O con trifosgeno y N-hidroxisuccinimida produce un compuesto de fórmula (1*) donde X = O y W = O-succinimidilo.



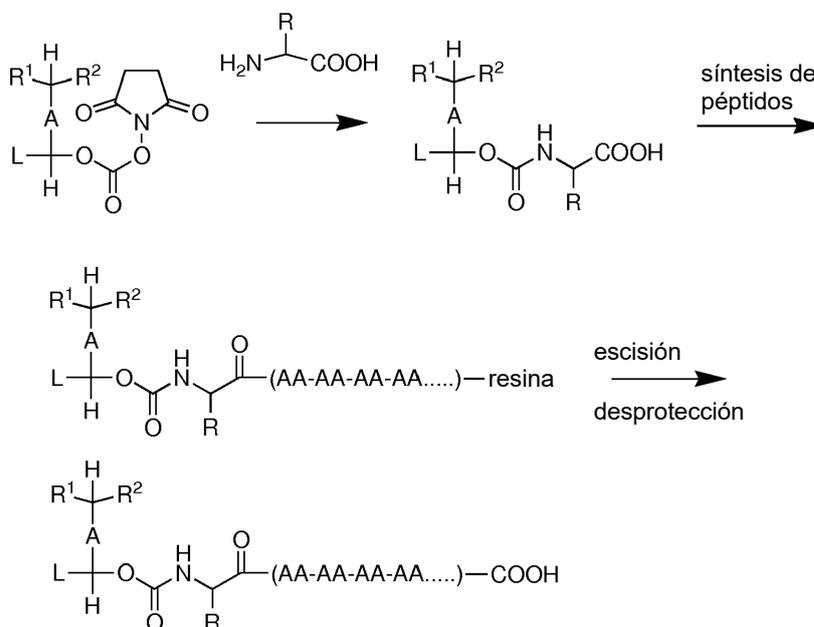
5 **[0101]** Los compuestos de fórmula (1*) donde X = O y W = O-succinimidilo se prefieren particularmente cuando la molécula de fármaco a conjugar, D-H, tiene un grupo amino. En este caso, el profármaco resultante de fórmula (2) comprende un enlace carbamato. Para casos donde D-H es un fármaco peptídico o proteico, el grupo amino que reacciona con los compuestos de la fórmula (1*) puede ser un grupo alfa-amino terminal o el grupo amino de una cadena lateral, por ejemplo de una lisina, ornitina o residuo de aminoácido no natural.

[0102] De forma alternativa, el reactivo de activación puede ser un cloroformiato de fenilo sustituido, por ejemplo, cloroformiato de 4-nitrofenilo, cloroformiato 2,4-dinitrofenilo, o cloroformiato de pentafluorofenilo, resultando en la formación de un carbonato de fenilo sustituido intermedio.

10 **[0103]** Los compuestos de la fórmula (1*) donde X = O y W = F o Cl se prefieren particularmente cuando la molécula de fármaco a conjugar, D-H, no tiene grupo amino sino que en su lugar tiene un grupo hidroxilo, por ejemplo cuando D-H es un fármaco peptídico o proteico de un residuo de treonina, serina o tirosina de cadena lateral, o cuando D-H es un fármaco basado en ácido nucleico como ácido desoxinucleico o ácido ribonucleico.

15 **[0104]** En el caso de los fármacos basados en ácidos nucleicos, en proteínas o en péptido, pueden estar presentes múltiples grupos reactivos, dando lugar a múltiples reacciones con el compuesto de la fórmula (1*). El alcance de esta reacción múltiple puede controlarse utilizando condiciones estándar conocidas en la técnica, por ejemplo variando la temperatura de reacción, las concentraciones y las estequiometrías a fin de obtener el producto de reacción deseado.

20 **[0105]** En un modo de realización de la invención, D es un fármaco peptídico, donde D se conjuga a la molécula de la fórmula (1) para producir una molécula de fórmula (2). En otro modo de realización de la invención, D es un fármaco peptídico, donde la molécula de la fórmula (2) se prepara mediante un método en el que la molécula de fórmula (1) se fija durante la síntesis de D. Por ejemplo, la etapa final en la síntesis de D mediante métodos de síntesis del péptido en fase sólida bien conocidos en la técnica implica la fijación del aminoácido N-terminal de la secuencia de péptido D en forma protegida. En el presente modo de realización, esta etapa final utiliza el aminoácido N-terminal en una forma que utiliza un compuesto de la fórmula (1) como el grupo protector.



donde R es la cadena lateral de un aminoácido.

[0106] Este modo de realización tiene la ventaja de que la posición y estequiometría de derivatización está completamente controlada.

30 **[0107]** Como se describe anteriormente, el fármaco se conjuga a través del grupo XH, que es OH o SH. El fármaco comprenderá un grupo funcional compatible, por ejemplo carboxilo, OH, NH₂, alquilo-NH como MeNH,

EtNH, y ⁱPrNH: NH-arilo como NH-fenilo o NH-fenilo sustituido; y SH. Los grupos funcionales en el portador y en el fármaco se conjugan utilizando un grupo (C=O) carbonilo.

[0108] En general, los fármacos de interés son péptidos o proteínas o ácidos nucleicos, como aptámeros u oligómeros antisentido, o pequeñas moléculas.

- 5 **[0109]** Ejemplos de fármacos adecuados incluyen aquellos para uso humano o veterinario, incluidos, pero sin carácter limitativo, fármacos antidiabéticos (p. ej., insulina); promotores del crecimiento (p. ej., hormona de crecimiento humana o bovina); antibacterianos incluidos aminoglucósidos (p. ej., gentamicina, neomicina y estreptomycin), penicilinas (amoxicilina, ampicilina, piperacilina), cefalosporinas (p. ej., cefaclor, cefminox y cefalexina), macrólidos (p. ej., carbomicina, eritromicina, telitromicina) y péptidos (p. ej., bacitracina, gramidinas y polimixinas), trimetoprima, ácido piromídico, y sulfametazina; fármacos analgésicos y antiinflamatorios (p. ej., paracetamol, aspirina, ibufenaco, indometacina), fármacos antialérgicos y antiasmáticos (p. ej., amlexanoxo y cromolín), fármacos antihipercolesterolemicos (p. ej., ácido clofíbrico, ácido oxiniácico y triparanol), bloqueantes beta-alérgicos y fármacos antihipertensivos (p. ej., bupranolol, captopirilo, indenolol, propranolol, y ácido 4-aminobutanoico), fármacos antineoplásicos (p. ej., daunorubicina, azacitidina, 6-mercaptopurina, interferones, interlucina-2, metotrexato, 5-fluorouracilo, taxol, 5-fluorouracilo, capcitabina, y vinblastina), fármacos antivíricos (p. ej., aciclovir, ganciclovir, amantadina, interferones, AZT y ribavirín, etc).

- [0110]** Se prefieren particularmente fármacos peptídicos, proteicos y de ácido nucleico. Ejemplos de fármacos peptídicos adecuados para su utilización en los compuestos que sustentan la invención incluyen pero sin carácter limitativo: péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1), exendina-2, exendina-3, exendina-4, factor natriurético atrial (ANF), ghrelina, vasopresina, hormona de crecimiento, hormona liberadora de hormona de crecimiento (GHRH), RC-3095, somatostatina, bombesina, PCK-3145, Phe-His-Ser-Cys-Asn (PHSCN), IGF1, péptido natriurético de tipo B, péptido YY (PYY), interferones, trombospondina, angiopoyetina, calcitonina, hormona liberadora de gonadotropina, hirudina, glucagón, anti-TNF-alfa, factor de crecimiento de fibroblastos, factor estimulante de colonias de granulocitos, obinepitida, hormona tiroidea pituitaria (PTH), leuprolida, sernorelina, pramorelin, nesiritida, rotigaptida, cilengitida, MBP-8298, AL-108, enfuvirtida, timalfasina, daptamicina, HLF1-11, Lactoferrina, Delmitida, glutatión, epítipo PR1 de célula T, péptidos 1-11 de proteasa-3, epítipo P3 de célula B, hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH), sustancia P, neurocinina A, neurocinina B, CKK-8, encefalinas, incluidas encefalina leucina y encefalina metionina, dermaseptina, dermaseptina-[des-Ala20, Gln34], péptido aniónico antimicrobial asociado al surfactante, Apidaecina IA; Apidaecina IB; OV-2; 1025, Péptido amida de acetil-adhesina (1025 - 1044); Theromacin (49-63); Pexiganán (MSI-78); Indolicidina; Apelina - 15 (63-77); CFPIO (71-85); Inhibidor del Factor Letal (LF) relacionado con el carunculo; Bactenecina, Inhibidor 2 de Proteasa del Virus de la Hepatitis C NS3; Inhibidor 3 de Proteasa del Virus de la Hepatitis C NS3, Inhibidor de Proteasa 4 del Virus de la Hepatitis NS3; NS4A-NS4B de Virus de la Hepatitis C (Inhibidor 1 de Proteasa NS3); Sustratos de Proteasa HIV-1, HIV-2; Péptido Anti-FItI; Bak - BH3; péptido Bax BH3 (55-74) (tipo salvaje); Bid BH3 -r8; CTT (Inhibidor de Gelatinasa); E75 (Her-2/neu) (369-377); Motivo Peptídico Quimérico de Unión a GRP78; p53 (17-26); Antagonista de EGFR2/KDR; Colivelina AGA-(C8R) HNGI 7 (derivado de Humanina); Factor Neurotrófico Dependiente de la Actividad (ADNF); Inhibidor 1 de beta-secretasa; Inhibidor 2 de beta-secretasa; ch[beta]-amiloides (30-16); Humanun (HN) sHNG, [Gly4] - HN; Humanina-[Gly 4]; inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (BPP); Inhibidor III de Renina; Anexina 1 (ANXA - 1; Ac2-12); Péptido 1 Antiinflamatorio; Péptido 2 Antiinflamatorio; Apelina 12 Antiinflamatoria; Bombesina-[D-Phe12, Leu14]; Péptido de antennapedia (ácido) (penetratina); Péptido líder de antennapedia (CT); Mastoparín; [Thr28, Nle31]-Colecistoquinina (25-33) sulfatada; Nociceptina (1-13) (amida); Factor Inhibidor de Fibrinólisis; Fibrinógeno-Gamma (377-395); Xenina; Obestatina (humana); [His1, Lys6]-GHRP (GHRP-6); [Ala5, [beta]-Ala8] -Neurocinina A (4-10); Neuromedina B; Neuromedina C; Neuromedina N; Factor Neurotrófico Dependiente de la Actividad (ADNF-14); Acetalina 1 (Antagonista de Receptor Opiode 1); Acetalina 2 (Antagonista de Receptor Opiode 2); Acetalina 3 (Antagonista de Receptor Opiode 3); ACTH (1-39) (humana); ACTH (7-38) (humana); Sauvagina; Hormona adipocinética (Locusta Migratoria); Factor de ADP-Ribosilación Miristoilado 6, myr-ARF6 (2-13); PAMP (1-20) (Proadrenomedulina (1-20) humana); AGRP (25-51); Amilina (8-37) (humana); Angiotensina I (humana); Angiotensina II (humana); Apstatina (Inhibidor de Aminopeptidasa P); Brevinina - 1; Magainina 1; RL-37; LL-37 (Péptido antimicrobial) (humano); Cecropina A; Péptido antioxidante A; Péptido antioxidante B; L-Carnosina; Bcl 9-2; NPVF; Neuropéptido AF (hNPAF) (Humano); Péptido Bax BH3 (55-74); Péptido Inhibidor de bFGF; Péptido Inhibidor de bFGF II; Bradiquinina; [Des-Arg1 O]-HOE 140; Inhibidor II de Caspasa 1, Inhibidor VIII de Caspasa 1; Proteína Smac N7 (; Inhibidor 1 Peptídico Derivado de MEK1; hBD-1 ([beta]-Defensina-1) (humana); hBD-3 ([beta]-Defensina-3) (humana); hBD-4 ([beta]-Defensina-4) (humana); HNP-1 (Defensina de Péptido de Neutrófilo Humano 1); HNP-2 (Dinorfina A (1-17) de Defensina de Péptido de Neutrófilo Humano -2); Endomorfina-1; [beta]-Endorfina (humana, porcina); Endotelina 2 (humana); Péptido Inhibidor de la Unión del Fibrógeno; Ciclo-(-GRGDSP); TP508 (Péptido derivado de Trombina); Galanina (humana); GIP (humano); Péptido liberador de gastrina (humano); Gastrina-1 (humana); Ghrelina (humana); Péptido PDGF-BB; [D-Lys3] - GHRP - 6; Proteína del núcleo del HCV (1-20); Fragmento de Péptido de Integrina a3B1 (325) (amida); Pentapéptido de Laminina (amida) Factor Potenciador de Melanotropina (MPF); VA-[beta]-MSH, Lipotropina - Y (Derivada de Poopiomelanocortina); Péptido Natriurético Atrial (1-28) (Humano); Péptido Vasonátrina (1-27); [Ala5, B - Ala8] -Neurocinina A (4-10); Neuromedina L (NKA); Neuropéptido Y Ac-(Leu28, 31)

- (24-26); Alitesina; Péptido Cerebral II; Neurotensina- [D-tyrII]; Péptido Inhibidor de Dominio de Unión IKKy NEMO (NBD); Péptido Inhibidor PTD-p50 (NLS); Orexina A (bovina, humana, ratón, rata); Orexina B (humana); Acuaporina - 2(254-267) (Pancreastatina humana)(37-52); Polipéptido Pancreático (humano); Neuropéptido; Péptido YY (3-36) (humano) Hidroximetil-Fitoquelatina 2; PACAP (1-27) (amida, humana, bovina, rata); Péptido Liberador de Prolactina (1-31) (humano); Salusin-alfa; Salusin-beta; Saposin C22; Secretina (Humana); L-Selectina; Endoquinina A/B; Endoquinina C (humana); Endoquinina D (Humana); Agonista del Receptor de Trombina (42-48) (humano); LSKL (Inhibidor de Trombospondinas); Hormona Liberadora de Tirotrópina (TRH); Fragmento P55-TNFR; Urotensina II (humana); VIP (humano, porcino, rata), Antagonista de VIP; Melodermina; Exenatida; ZPIO (AVEOO100); Pramlintida; AC162352 (PYY)(3-36); PYY; Obinepitida; Glucagón; GRP; Ghrelina (GHRP6); Leuprolida; Histrelina; Oxitocina; Atosiban (RWJ22164); Sermorelina; Nesiritida; bivalirudina (Hirulog); Icatibant; Aviptadin; Rotigaptida (ZP123, GAP486); Cilengtida (EMD-121924, péptidos RGD); AlbuBNP; Angiotensina II; MBP-8298; Arginina Leucina Peptídica; Ziconotida; AL-208; AL-108; Carbeticon; Tripéptido; SAL; Coliven; Humanina; ADNF-14; VIP (Péptido Vasoactivo Intestinal); Timalfasina; Bacitracina; Gramidicina; Pexiganán (MSI-78); PI 13; PAC-113; SCV- 07; HLF1-11 (Lactoferrina); DAPTA; TRI-1144; Tritpticina; Antiflammin 2; Gattex (Teduglutida ALX-0600); Stimuvax (L-BLP25); Crisalina (TP508); Melanona II; Espantida II; Ceruletida; Sincalida; Pentagastrina; Secretina; Péptido de Endostatina; E-selectina; HER2; IL-6; IL-8; IL-10; PDGF; Trombospondina; uPA (1); uPA (2); VEGF; VEGF (2); Pentapéptido-3; XXLRR; Fibrillogénesis de Beta-Amiloide; Endomorfina-2; TIP 39 (Neuropéptido Tuberoinfundibular); PACAP (1-38) (amida, humana, bovina, rata); péptido activador de TGFB; Factor de sensibilización de insulina (ISF402); Péptido BI de Factor de Crecimiento Transformante (TGF-BI); Factor de Liberación de Caeruleina; IELLQAR (MAPS de 8 ramas); Tigapotida PK3145; Goserelina; Abarélix; Cetrorelix; Ganirelix; Degarelix (Triptorelina); Barusiban (FE 200440); Pralmorelina; Octreotida; Eptifibatida; Netamifide (INN-00835); Daptomicina; Espantida II; Delmitida (RDP-58); AL-209; Enfuvirtida; IDR-I; Hexapéptido-6; cadena de Insulina-A; Lanreótido; Hexa[rho]éptido-3; cadena de Insulina-B; Cadena de Glargina-A; Cadena de Glargina-B; análogo de cadena de insulina lispro-B; análogo de cadena de insulina asparta-B; análogo de cadena de Insulina glulisina-B; análogo de cadena de insulina detemir-B; análogo de somatostatina inhibidora de tumores; Pancreastatina (37-52); fragmento de éptido intestinal vasoactivo (KKYL-NH2); y Dinorfina A. Estos y otros fármacos peptídicos y proteicos incluidos, por ejemplo en el documento de patente WO2008/058016 A1 son adecuados para su uso en los compuestos que sustentan la presente invención.
- 30 **[0111]** Ejemplos de fármacos proteicos adecuados para su utilización en los compuestos que sustentan la invención incluyen, pero no se limitan a: inmunotoxina SS1P, deaminasa de adenosina, argininas, y otros.
- [0112]** Ejemplos de fármacos basados en ácidos nucleicos adecuados para el uso en compuestos que subyacen a la invención incluyen, pero sin carácter limitativo, cadenas codificantes y cadenas antisentido de cualquier gen de un animal, y particularmente de un mamífero. Estos genes pueden ser aquellos que ya son sujetos del ADN antisentido a los que se les ha proporcionado el propósito de tratar varias enfermedades, por ejemplo, genes para proteína C quinasa-alfa (Aprinocarsen, cáncer de pulmón no microcítico), BCL-2 (Oblimersen, melanoma maligno, cáncer de pulmón), ICAM-1 (ISIS-3082, enfermedad de Crohn, hepatitis C relacionada con el HCV, daño por isquemia/reperfusión en un trasplante), factor de necrosis tumoral alfa (artritis reumatoide, SARS, y psoriasis), receptor A1 de la adenosina (asma), quinasa c-raf (cáncer de ovario), H-ras (cáncer de páncreas), c-myc (cardiopatía isquémica), proteína A RI quinasa-alfa (cáncer de colon, sida), ADN metiltransferasa (cáncer sólido), receptor de VEGF (cáncer), ribonucleótido reductasa (cáncer de riñón), citomegalovirus IE2 (retinitis por CMV), metaloproteinasas de matriz-9 (cáncer de próstata), TGF beta 2 (glioma maligno), CD49d (esclerosis múltiple), PTP-1B (diabetes), c-myc (cáncer), EGFR (cáncer de mama), mdr1 (cáncer), autotaxina (cáncer), anclaje de fosfatidilinositol glicano de clase F (PIGF, cáncer), y GLUT-1 (cáncer). Los fármacos de ácidos nucleicos pueden ser ADN, ADN modificado, como ADN-fosforotioato, ARN, ARN modificado como 2'-OMe-ARN, ácidos nucleicos bloqueados, ácidos nucleico peptídicos, o híbridos.
- [0113]** En un modo de realización de la invención, D es un fármaco oligonucleótido. Los compuestos de la fórmula (2) donde D es un oligonucleótido pueden prepararse por síntesis química del fármaco oligonucleótido que comprende una modificación 5'-terminal que permite la conjugación con una molécula de fórmula (1). Por ejemplo, el oligonucleótido puede sintetizarse químicamente de manera que la unidad de nucleótido 5'-terminal, añadida a la última ronda de síntesis, comprenda un grupo fosfato modificado para contener un grupo aminoalquilo. El oligonucleótido modificado por aminas resultante se conjuga después a una molécula de fórmula (1) para formar una molécula de fórmula (2) donde D es un fármaco oligonucleótido. Véase, p. ej., Zhao, et al., *Bioconjugate Chemistry* (2005) 16(4):758-766.
- 55 **[0114]** Los efectos predichos en el cambio de la velocidad de liberación del fármaco del profármaco de la fórmula (2) se ilustran en las Figuras 4 y 5. La Figura 4 muestra perfiles de liberación del fármaco calculados para una serie de profármacos que presentan diferentes velocidades de liberación, con una velocidad fija de aclaramiento del sistema de 0,5 al día, expresado como la fracción de fármaco total administrado, asumiendo un aclaramiento lento del profármaco. Velocidades de liberación relativamente rápidas (por ejemplo, una velocidad liberación de 5 al día) determina una concentración máxima más alta de fármaco liberado durante una duración más corta.

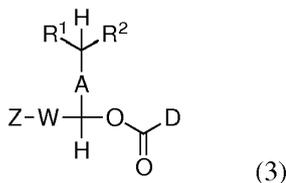
Velocidades de liberación relativamente lentas (por ejemplo, una velocidad de liberación de 0,1 al día) determina una concentración máxima más baja de fármaco liberado durante una duración más corta.

5 **[0115]** Como la cantidad total de fármaco administrado puede variar según la necesidad, es útil considerar la liberación del fármaco del compuesto de fórmula (2) en términos relativos al nivel máximo de fármaco libre conseguido. La Figura 5 muestra perfiles de liberación del fármaco calculados para una serie de profármacos que presentan diferentes velocidades de liberación, con una velocidad fija de aclaramiento del sistema de 0,5 al día, expresado como el porcentaje de concentración máxima (% Cmax) frente al tiempo. Según disminuye la velocidad a la que se libera el fármaco del profármaco o del conjugado de fármaco-macromolécula, se extiende el periodo de tiempo tras la administración en el que la concentración de fármaco libre es superior a un porcentaje determinado de la concentración máxima.

10 **[0116]** Los modelos ilustrados en las Figuras 4 y 5 sirven para demostrar que los varios perfiles de tiempo-concentración pueden conseguirse seleccionando la velocidad apropiada a la que se libera el fármaco del profármaco de la fórmula (2) relativa a la velocidad a la que se aclara el fármaco del sistema.

15 **[0117]** La presente invención también incluye composiciones que contienen mezclas que comprenden dos o más profármacos de fórmula (2) donde los fármacos, D, son los mismos o diferentes. En un modo de realización de dicha mezcla, cada profármaco de fórmula (2) tiene una velocidad de liberación diferente bajo condiciones fisiológicas.

[0118] La farmacocinética también se controla incluyendo una macromolécula como en los compuestos de la fórmula



20 donde Z es el residuo de una macromolécula;

L' es el residuo de un enlace;

D es el residuo de un fármaco;

X es O S;

25 A es alquenileno (C₂), arilo o está ausente;
cada R¹ y R² es independientemente H; CH;

NO₂;

arilo opcionalmente sustituido;

heteroarilo opcionalmente sustituido;

30 alquenilo opcionalmente sustituido;

alquinilo opcionalmente sustituido; o

cada R¹ y R² es independientemente COR³, SOR³ o SO₂R³ donde

R³ es H o alquilo opcionalmente sustituido;

arilo opcionalmente sustituido;

35 heteroarilo opcionalmente sustituido;

alquenilo opcionalmente sustituido;

alquinilo opcionalmente sustituido; o

OR o NR₂ donde cada R es independientemente H o alquilo opcionalmente sustituido; o

cada R¹ y R² es independientemente SR⁴ donde

40 R⁴ es alquilo opcionalmente sustituido;

arilo opcionalmente sustituido;

heteroarilo opcionalmente sustituido;

alquenilo opcionalmente sustituido; o

alquinilo opcionalmente sustituido;

45 donde los sustituyentes opcionales se seleccionan del grupo que consiste en grupos donadores de electrones como alquilo C₁-C₄; alcoxi C₁-C₄; alquiltio C₁-C₄; amino; alquilamino; y dialquilamino; y grupos

atractores de electrones como halógeno, difluorometilo; trifluorometilo, nitro; ciano; C(O)R, donde R es H, alquilo C₁-C₄, alcoxi C₁-C₄ o amino; y SOR y SO₂R, donde R es alquilo C₁-C₄ arilo, o heteroarilo, donde estos varios sustituyentes opcionales pueden estar enlazados a anillos de arilo y heteroarilo, los cuales varios sustituyentes pueden ser iguales o diferentes

- 5 donde R¹ y R² pueden unirse para formar un anillo de 3-8 miembros; y
donde R¹ y R² no pueden ser H; y
donde R⁵ es H o alquilo (C₁₋₆).

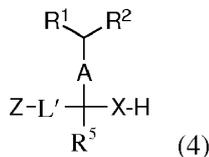
[0119] En muchos modos de realización, R⁵ es H.

- 10 [0120] Como sucede con los compuestos de la fórmula (2), los modos de realización expuestos para R¹, R², A, X, R⁵ y L ilustrados en el caso de la fórmula (1) se aplican y estos modos de realización se incorporan en el presente documento por referencia como sustituyentes apropiados de la fórmula (3). En el caso de L', la naturaleza de L determina su estructura, y por consiguiente las variantes descritas en conexión con las fórmulas (1) y (2) también se aplican aquí.

- 15 [0121] Los fármacos ilustrados e indicados anteriormente en conexión con la fórmula (2) se aplican también a la fórmula (3).

- 20 [0122] Tras la liberación del fármaco de la fórmula (3) por eliminación no enzimática, el grupo de enlace sigue unido a la macromolécula. Se ha demostrado que la velocidad de aclaramiento de las moléculas del cuerpo depende de su radio hidrodinámico, y de ahí su peso molecular. Véase, por ejemplo, Veronese, Biomaterials (2001) 22:405-417, que muestra que la semivida del superóxido dismutasa (SOD) en ratones aumenta desde 0,08 horas para SOD libre hasta 1,5 horas para SOD conjugado a PEG cuyo peso molecular sea de 1.900 Da, hasta 36 horas para SOD conjugado a PEG cuyo peso molecular sea de 72.000 Da. Por lo tanto, la conjugación de profármacos de fórmula (2) a una macromolécula para obtener una molécula de fórmula (3) puede utilizarse para aumentar el tiempo de circulación del profármaco.

- 25 [0123] Los portadores macromoleculares para la administración del fármaco también son sustancias intermedias alternativas en la formación de compuestos de fórmula (3).



[0124] Como sucedió con los compuestos de las fórmulas (2) y (3), todas las variaciones descritas específicamente para R¹, R², R⁵, X y L descritas para la fórmula (1) se incorporan en modos de realización específicos de compuestos de fórmula (4).

- 30 [0125] En algunos modos de realización, Z es una proteína, oligosacárido, o polímero sintético que presenta un peso molecular de entre 10.000 y 250.000.

- 35 [0126] En algunos modos de realización, la macromolécula Z es un polímero sintético que presenta un peso molecular de entre 10.000 y 250.000. En modos de realización más específicos, la macromolécula Z es un polímero sintético que presenta un peso molecular de entre 10.000 y 100.000. En determinados modos de realización, Z es un poli(etilenglicol) (PEG), monometoxi-PEG (mPEG), poli(etileneimina) (PEI) o un copolímero de PEG-PEI linear, ramificado o dendrimérico derivatizado. Muchos tamaños de polímeros sintéticos derivatizados como el PEG y el mPEG están disponibles en el mercado, presentando una variedad de grupos funcionales terminales que resultan en moléculas que comprenden hidroxilo, amina, azida, carboxilo, aldehído, éster de N-hidroxisuccinimidil, imidazolicarboxamino, imidazolicarboxi, carbonato de nitrofenilo, isocianato, maleimido, tiol o grupos funcionales de epóxidos. Otros derivados de polímeros sintéticos pueden prepararse utilizando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante derivitización utilizando un aldehído heteroaromático o aromático sustituido por bromometilo, o un haluro de propargilo o de alilo.
- 40

- 45 [0127] En otro modo de realización, la macromolécula Z es una proteína cuyo peso molecular es de entre 10.000 y 250.000. En un modo de realización de la invención más específico, Z es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, ya sea monoclonal o policlonal. Dependiendo de la secuencia de la proteína, se presentarán varios grupos funcionales activos como aminas y tioles. De forma alternativa, la proteína puede derivitizarse químicamente mediante la utilización de métodos conocidos en la técnica para añadir grupos como tioles y maleimidas.

- 50 [0128] En otro modo de realización, Z es un oligosacárido que presenta un peso molecular de entre 10.000 y 250.000. En determinados modos de realización, Z es un dextrano que presenta un peso molecular de entre

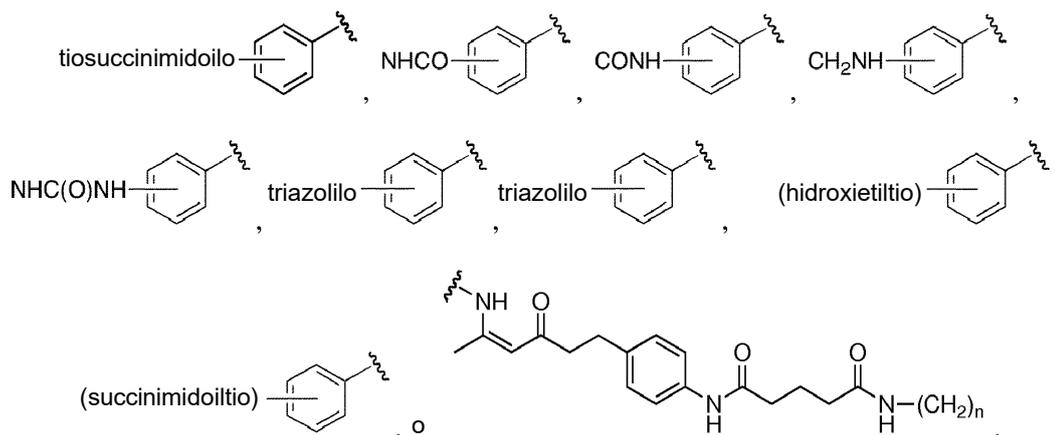
10.000 y 250.000. En modos de realización más específicos, Z es un dextrano que presenta un peso molecular de entre 10.000 y 100.000.

5 **[0129]** La macromolécula Z comprenderá al menos un grupo funcional R¹³ adecuado para reaccionar con una molécula de fórmula (1) o (2) Para compuestos de la invención, grupo R¹³ adecuados incluyen, pero sin carácter limitativo: hidroxilo, amina, azida, carboxilo, aldehído, éster de N-hidroxisuccinimidil, imidazolicarboxamino, imidazolicarboxi, carbonato de nitrofenilo, isocinato, maleimido, tior, epóxido, CCH (alquino terminal), y grupos guanidino.

[0130] En un modo de realización particular, Z es el anticuerpo m38c2 o una versión humanizada del mismo (Solicitud de Patente de EE.UU. N.º 2006/0205670).

10 **[0131]** En determinados modos de realización, en los compuestos de la fórmula (3) o (4), Z se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo, una albúmina; un polietilenglicol (PEG) lineal, ramificado o dendimérico; un monometoxipolietilenglicol (mPEG) lineal, ramificado o dendimérico; una polietilenimina (PEI) lineal, ramificada o dendimérica; un copolímero de PEG-PEI lineal, ramificado o dendimérico; un dextrano lineal, ramificado o dendimérico; y una nanopartícula. En modos de realización particulares de la invención, los conjugados de fármaco-macromolécula tienen la fórmula (3a) donde Z es un anticuerpo. En otros modos de realización de la invención particulares, los conjugados de fármaco-macromolécula tienen la fórmula (3a) donde Z es un polietilenglicol (PEG) lineal, ramificado o dendimérico. En otros modos de realización particulares, los conjugados de fármaco-macromolécula tienen la fórmula (3a) donde Z es un monometoxipolietilenglicol (mPEG) lineal, ramificado o dendimérico.

20 **[0132]** En compuestos de las fórmulas (3) y (4) de la invención, L' puede ser (CH₂)_nNHCO, (CH₂)_nNHCH₂, (CH₂)_nNHCONH, (CH₂)_ntriazolilo, (CH₂)_ntiosuccinimidoilo, (CH₂)_n(hidroxietiltio), (CH₂)_nsuccinimidoiltio, (CH₂)_nCONH,

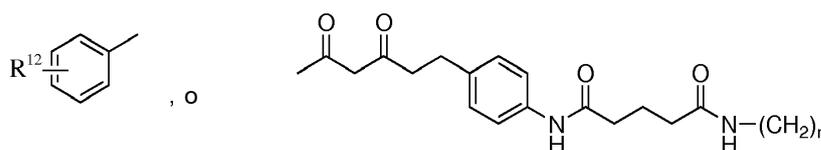


donde n = 1-6

Acoplamiento a macromoléculas

30 **[0133]** Los compuestos de fórmula (4) se preparan tal como se describen a continuación donde el reactivo a acoplar con la macromolécula Z es el compuesto de fórmula (1); si se emplea el compuesto de fórmula (2), resultan los compuestos de fórmula (3). De manera similar, los compuestos de fórmula (4) pueden convertirse tal como se ha descrito anteriormente en compuestos de fórmula (3) mediante reacción con los fármacos apropiados como se ha descrito anteriormente.

35 **[0134]** En cada caso, el grupo de enlace L' se forma por la reacción de un grupo funcional R¹³ en la macromolécula Z con un grupo funcional R¹² en el grupo de enlace L de las moléculas de fórmula (1) o (2) durante el proceso de conjugación. Tal como se ha descrito anteriormente, los compuestos de las fórmulas (1) y (2), L es (CH₂)_nR¹²,



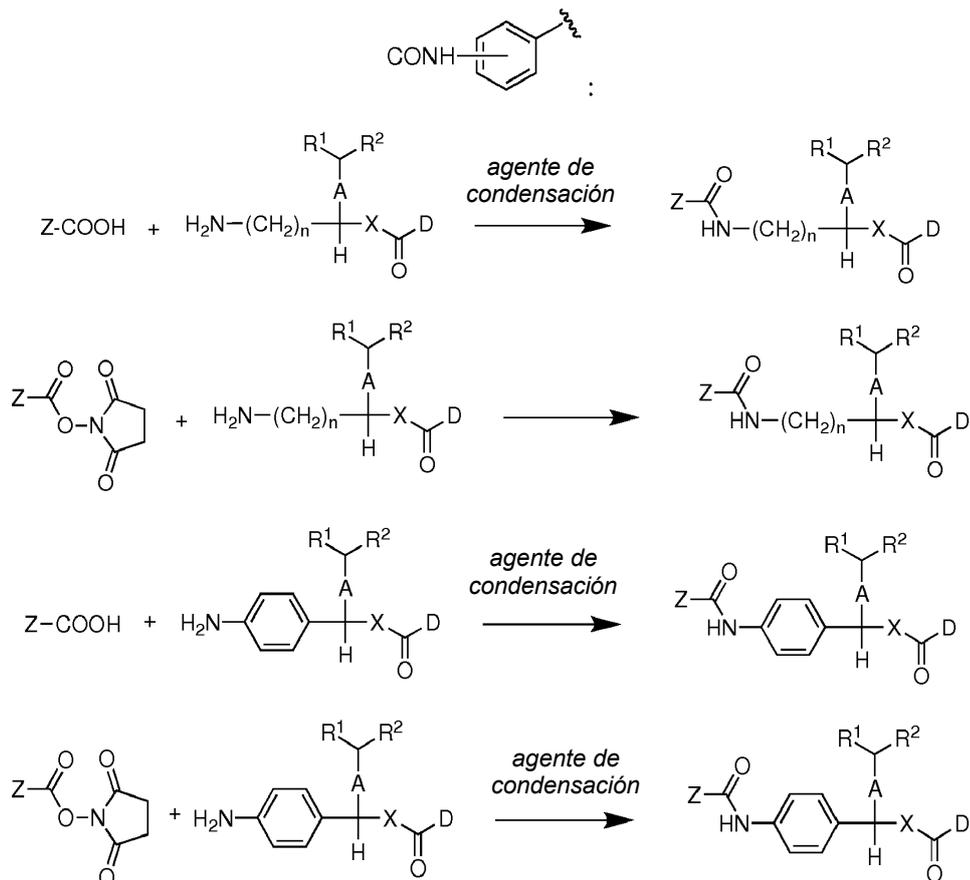
donde $n = 1-6$ y R^{12} es NH_2 , N_3 , Cl , Br , I , SH , $COOH$, CHO , $CH=CH_2$, CCH , o maleimido.

[0135] Los compuestos de la fórmula (3) o (4) pueden prepararse mediante cualquiera de las varias rutas, la más apropiada dependerá principalmente de la naturaleza del grupo R^{12} en el grupo L. El método apropiado y la naturaleza del grupo de enlace L' resultante se determina por la elección de grupos funcionales de la siguiente manera, mediante una reacción con el compuesto de la fórmula (2) tal como se ilustra.

5

[0136] Cuando R^{12} es NH_2 , la macromolécula derivatizada Z- R^{13} se conjuga a los compuestos de la fórmula (1) o (2) a través de $R^{13} = COOH$, utilizando un agente de condensación como una carbodiimida, o directamente utilizando $R^{13} = CO-O$ -succinimidoilo (éster de N-hidroxisuccinimidoilo), CO-imidazolilo, o CO-O-(nitrofenilo), para obtener el enlace de amida L' = $(CH_2)_nNHCO$ o

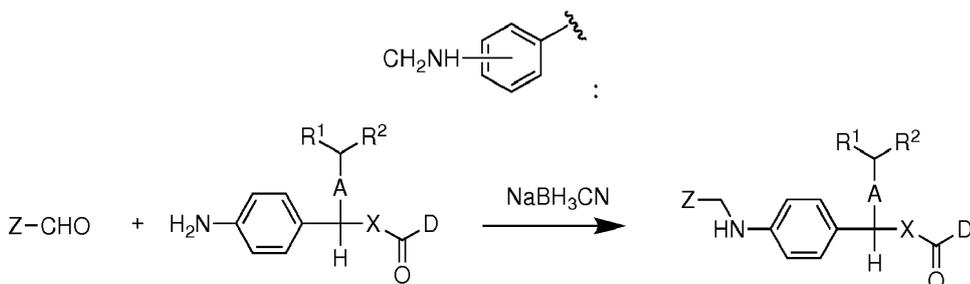
10

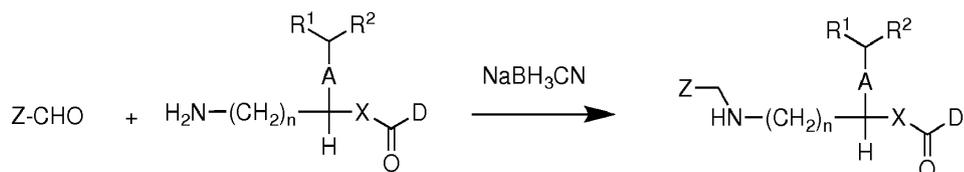


15 donde Z, X, A, D, R^1 y R^2 son como se definen anteriormente.

[0137] De forma alternativa, cuando R^{12} es NH_2 , la macromolécula derivatizada Z- R^{13} se conjuga a los compuestos de la fórmula (1) o (4) a través de $R^{13} = CHO$, utilizando aminación reductiva, por ejemplo con $NaBH_3CN$, para obtener el enlace de amina L' = $(CH_2)_nNH-CH_2$ o

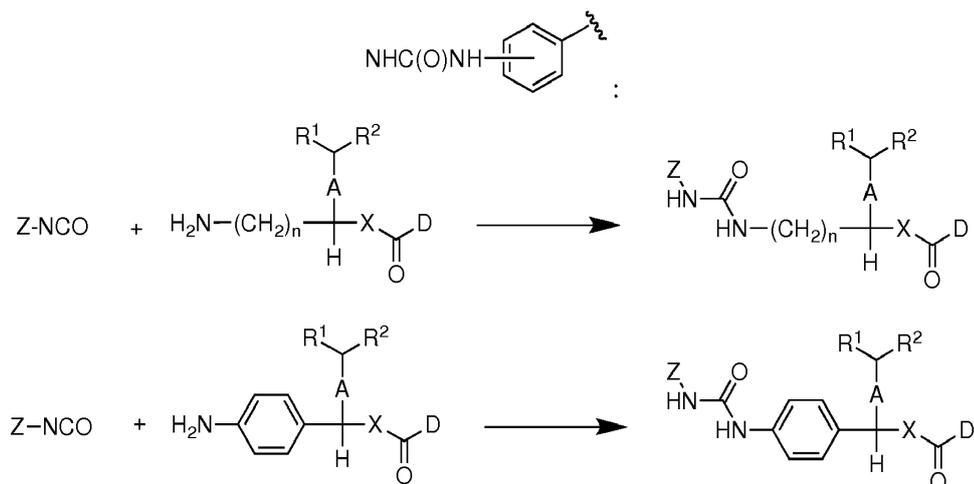
20





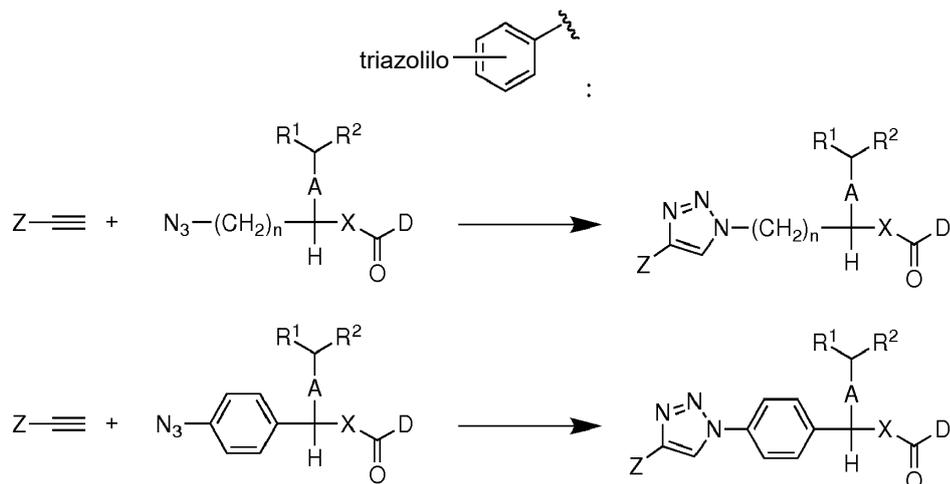
donde Z, X, A, D, R¹, y R² son como se definen anteriormente.

- 5 **[0138]** De forma alternativa, cuando R¹² es NH₂, la macromolécula derivatizada Z-R¹³ se conjuga a los compuestos de la fórmula (1) o (2) a través de R¹³ = isocianato, para obtener el enlace de urea L' = (CH₂)_nNH-CO-NH- o



donde Z, X, A, D, R¹, y R² son como se definen anteriormente.

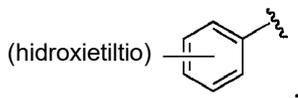
- 10 **[0139]** Cuando R¹² es N₃, la macromolécula derivatizada Z-R¹³ puede conjugarse a los compuestos de fórmula (2) a través de R¹³ = CCH, utilizando condiciones para «química click», una reacción de cicloadición 1,3-dipolar, para formar un enlace de 1,2,3-triazol en W = (CH₂)_n-triazolilo o



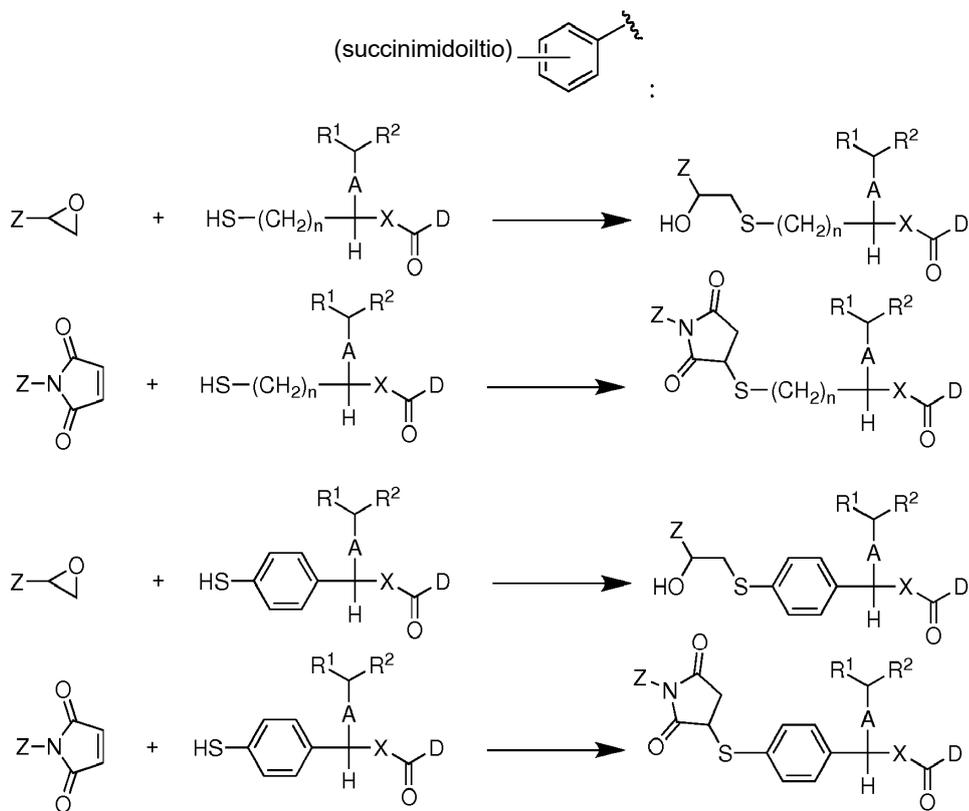
15

donde Z, X, A, D, R¹, y R² son como se definen anteriormente.

- [0140]** Cuando R¹² es SH, la macromolécula derivatizada Z-R¹³ se conjuga a los compuestos de la fórmula (1) o (2) a través de R¹³ = maleído o epóxido para formar L' = (CH₂)_n-(hidroxietiltio),

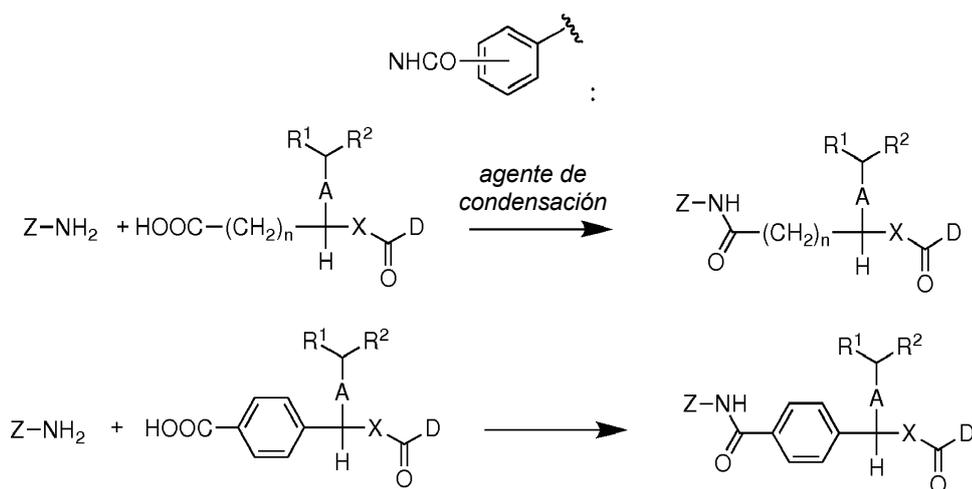


$(\text{CH}_2)_n$ -(succinimidoilitio), o



5 donde Z, X, A, D, R¹, y R² son como se definen anteriormente.

[0141] Cuando R¹² es COOH, la macromolécula derivatizada Z-R¹³ se conjuga a los compuestos de la fórmula (1) o (2) a través de R¹³ = amina utilizando un agente de condensación como una carbodiimida para obtener L' = (CH₂)_n-CONH o

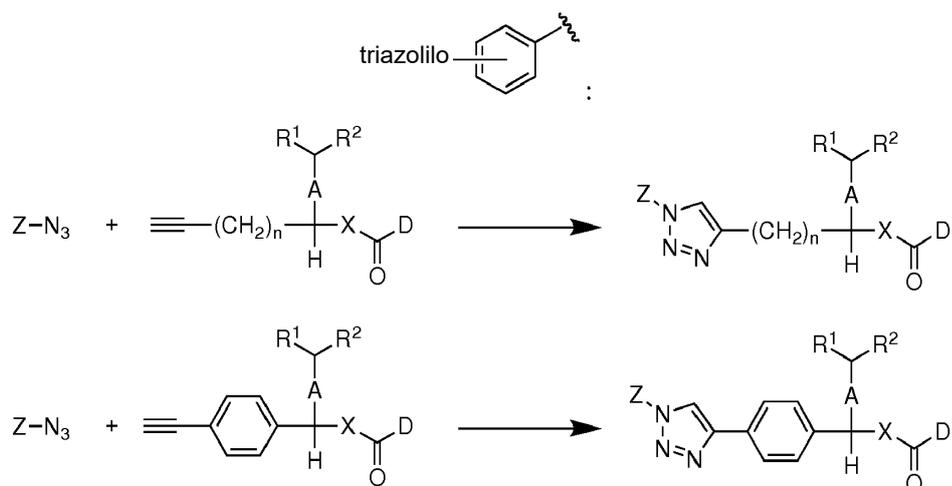


10

donde Z, X, A, D, R¹, y R² son como se definen anteriormente.

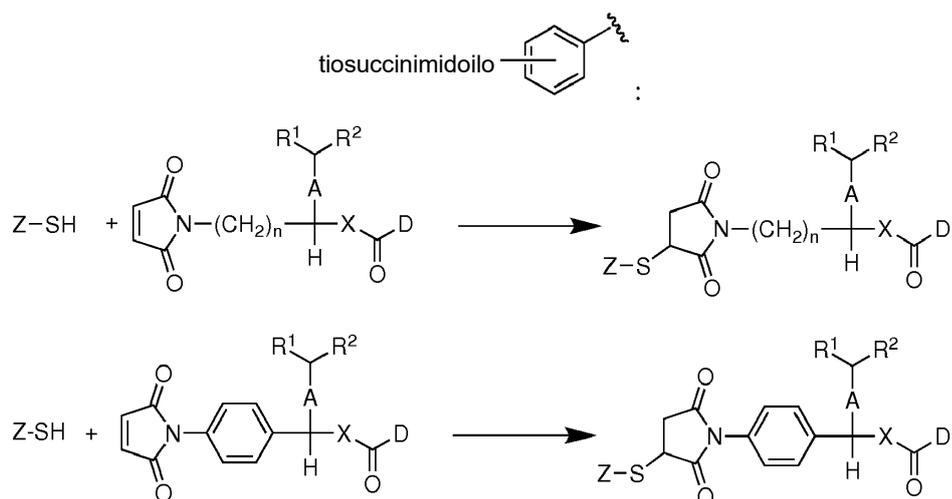
[0142] Cuando R¹² es CCH, la macromolécula derivatizada Z-R¹³ se conjuga a los compuestos de la fórmula (1) o (2) a través de R¹³ = N₃ utilizando «química click» para formar un enlace de 1,2,3-triazol en L' = (CH₂)_n-triazolilo o

15



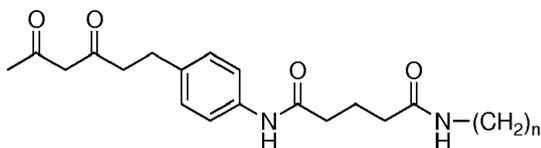
donde Z, X, A, D, R¹, y R² son como se definen anteriormente.

- 5 **[0143]** Cuando R¹² es malemido, la macromolécula derivatizada Z-R¹³ se conjuga a los compuestos de la fórmula (2) a través de R¹³ = SH para obtener L' = (CH₂)_n-succinimidoilto o



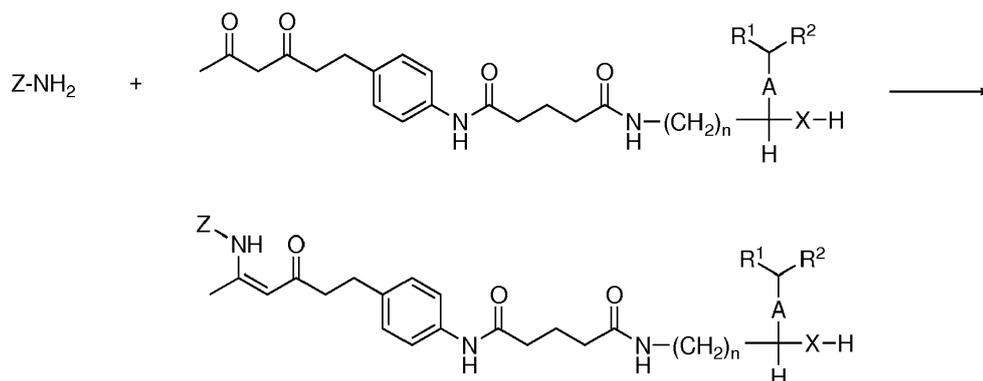
- 10 donde Z, X, A, D, R¹, y R² son como se definen anteriormente.

[0144] En un modo de realización de la invención, L es un grupo que presenta la fórmula

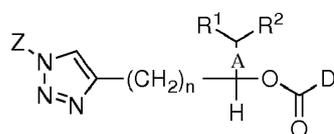


donde n = 1-6 y Z es un anticuerpo que comprende un residuo de lisina reactivo de modo que R¹³ = NH₂. En este modo de realización, la conjugación del profármaco y la macromolécula proporciona un enlace de enamino-cetona:

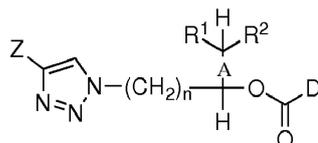
15



[0145] En algunos modos de realización, los conjugados de fármaco-macromolécula de la fórmula (3) tienen la fórmula:

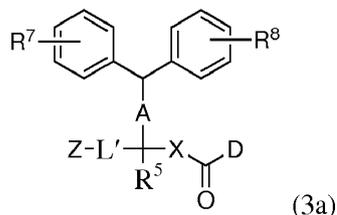


5 o



donde R^1 , R^2 , Z, A y D son como se han definido anteriormente, y n es 1-6.

[0146] En un modo de realización, los conjugados de fórmula (3) tienen una fórmula (3a) más específica



10 donde

Z es el residuo de una macromolécula;
D es el residuo de una molécula de fármaco;
X es O o S;

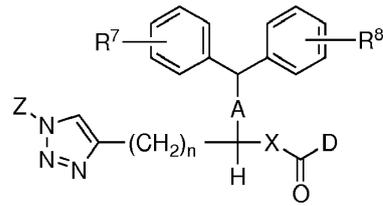
15

L' es el residuo de un grupo de enlace;
A es alquilenilo (C_2), arilo o está ausente;
 R^7 y R^8 son cada uno independientemente H, un grupo donador de electrones o un grupo atractor de electrones, donde R^7 y R^8 en la forma de sustituyentes distintos de hidrógeno pueden estar presentes en 1-5 posiciones, preferiblemente 3 posiciones o menos en los anillos a los que están enlazados, y R^5 es H o alquilo (C^{1-6}).

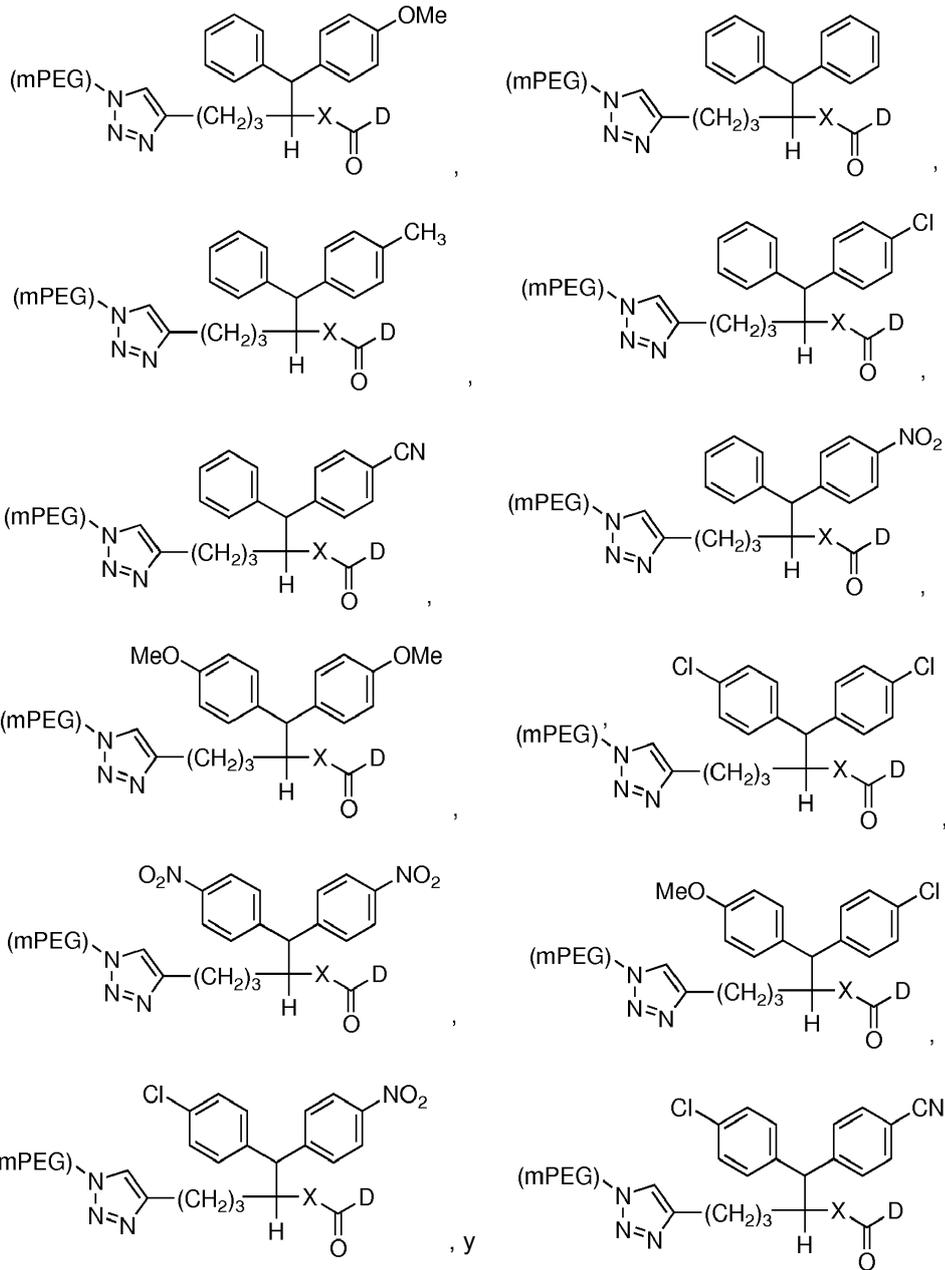
20

[0147] En algunos modos de realización de la fórmula (3a), Z y L' son como se han descrito anteriormente, y/o X es O, y/o A está ausente o es alquilenilo (C_2).

[0148] Los compuestos de la fórmula (3a) se ilustran en:

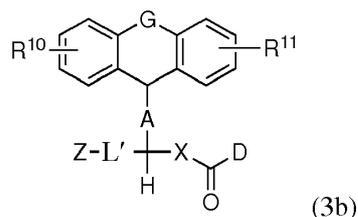


Incluidos ejemplos que incluyen:



5

10 **[0149]** En otro modo de realización, conjugados de fármaco-macromolécula de la fórmula (3) tienen la fórmula (3b) más específica



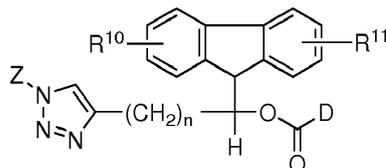
donde

- Z es el residuo de una macromolécula;
 D es el residuo de una molécula de fármaco;
 X es de O o S;
 L' es el residuo de un grupo de enlace;
 A es alqueniño (C_2), arilo o está ausente;
 G es un enlace C=O, O, S, SO, SO₂, CX₂ o CX₂CX₂, donde cada X es independientemente H o Cl y
 R¹⁰ y R¹¹ son cada uno independientemente H, un grupo donador de electrones o un grupo atractor de electrones, donde cada uno de R¹⁰ y R¹¹ puede estar presente en 1-4 posiciones, preferiblemente 2 posiciones o menos en los anillos a los que están enlazados.

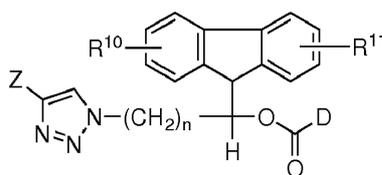
[0150] En determinados modos de realización de la invención, los conjugados de fármaco-macromolécula tienen la fórmula (3b) donde Z y L' son como se ejemplifica anteriormente.

[0151] En la fórmula (3b) X puede ser O, y/o donde A está ausente, o es alqueniño (C_2).

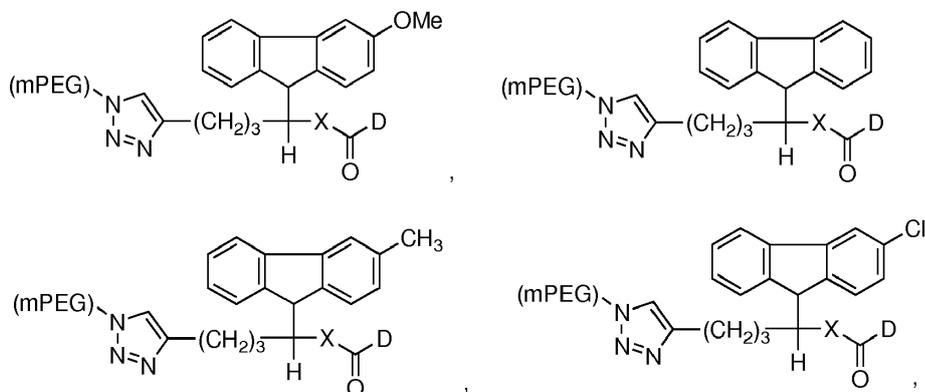
- [0152]** En modos de realización de la invención particulares, los conjugados de fármaco-macromolécula de la fórmula (3b) tienen la fórmula más específica:

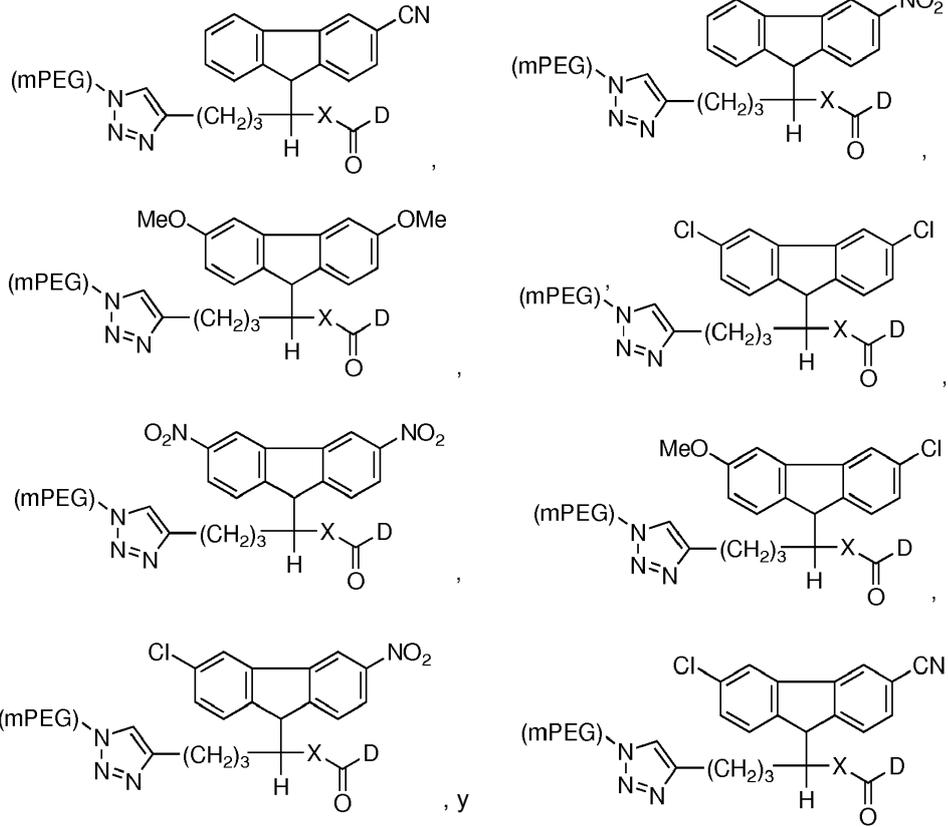


o

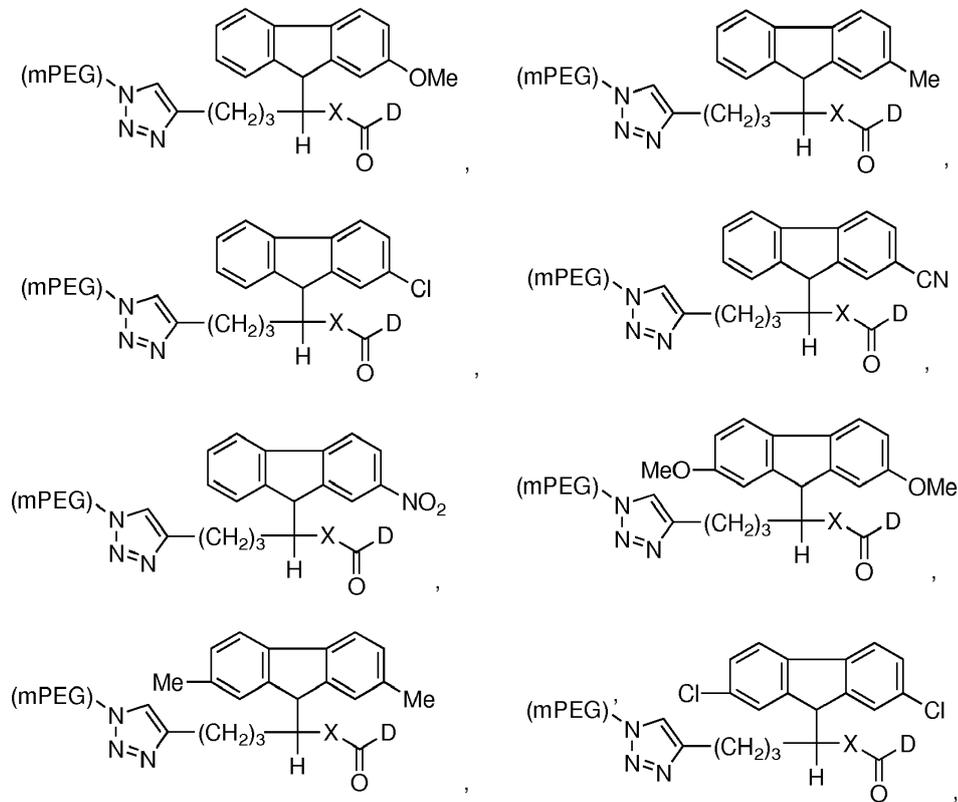


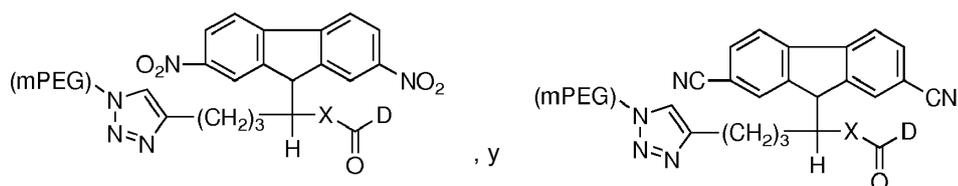
- [0153]** Modos de realización ilustrativos de la invención, los conjugados de fármaco-macromolécula de la fórmula (3b) incluyen



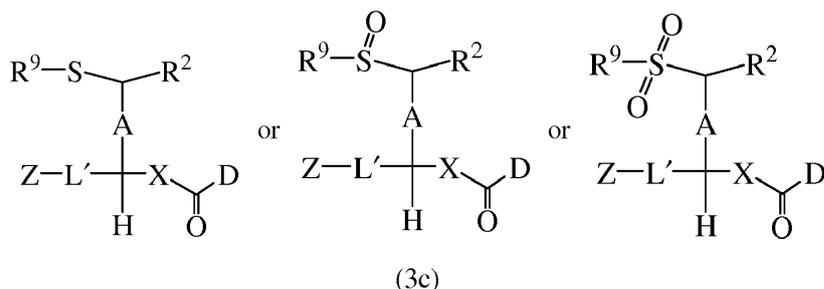


además de





[0154] En otro modo de realización de la invención, los conjugados de fórmula (3) tienen la fórmula (3c)



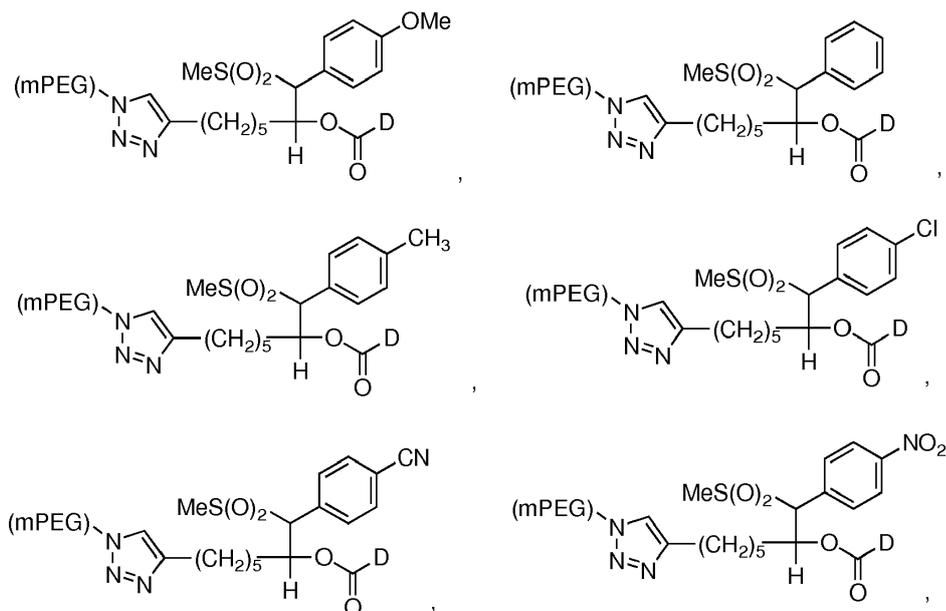
donde, como anteriormente

- 5 Z es el residuo de una macromolécula;
 D es el residuo de una molécula de fármaco;
 X es O o S;
 L' es el residuo de un grupo de enlace;
 A es alquenileno (C₂), arilo o está ausente;
- 10 R² es H, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, alquenilo, alquinilo, CN, NO₂, COR³, SOR³ o SO₂R³; y
 R⁹ es alquilo, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, alquenilo, o alquinilo, y donde R² y R⁹ pueden conectarse para formar una estructura cíclica.

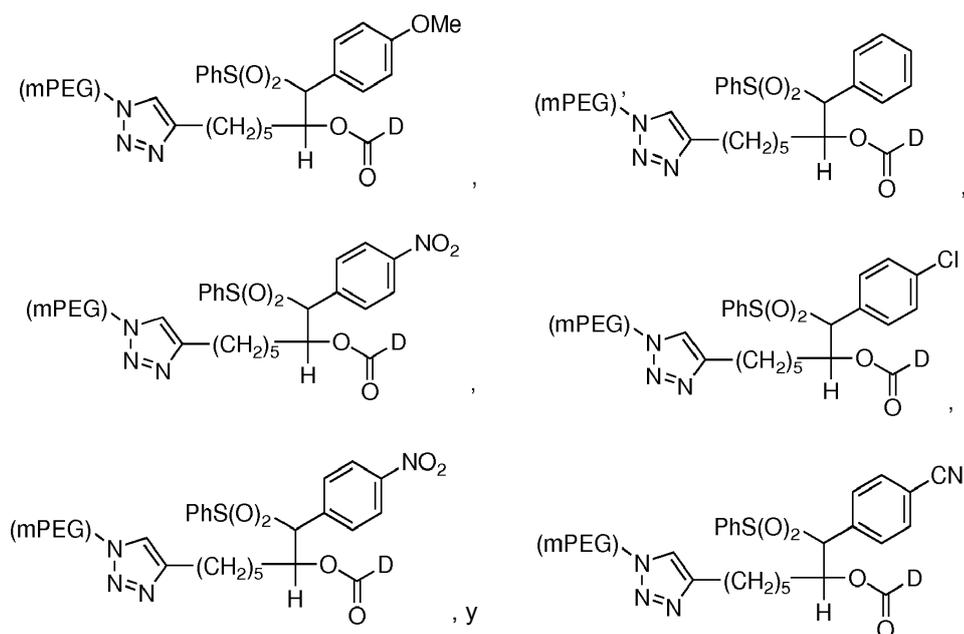
15 [0155] Los conjugados de fórmula (3c) pueden comprender modos de realización de Z y L' ilustrados anteriormente.

[0156] En algunos modos de realización, de la fórmula (3c) X es O, y/o A está ausente, o es alquenileno (C₂).

[0157] Los conjugados de fármaco-macromolécula de la fórmula (3c) pueden incluir

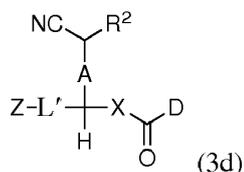


20



5 **[0158]** En cada una de las moléculas de ejemplo, un sustituyente distinto de hidrógeno puede estar presente en 1-5 posiciones, preferiblemente 3 o menos posiciones en el anillo fenilo mostrado.

[0159] En otro modo de realización, los conjugados de la fórmula (3) tienen la fórmula (3d) más específica



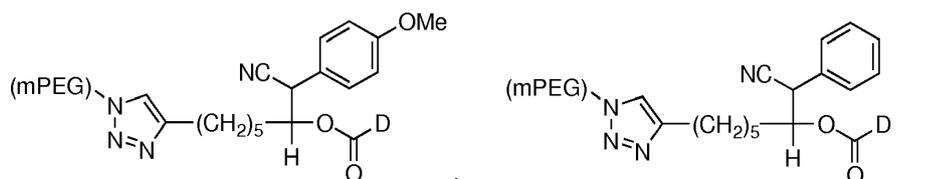
donde

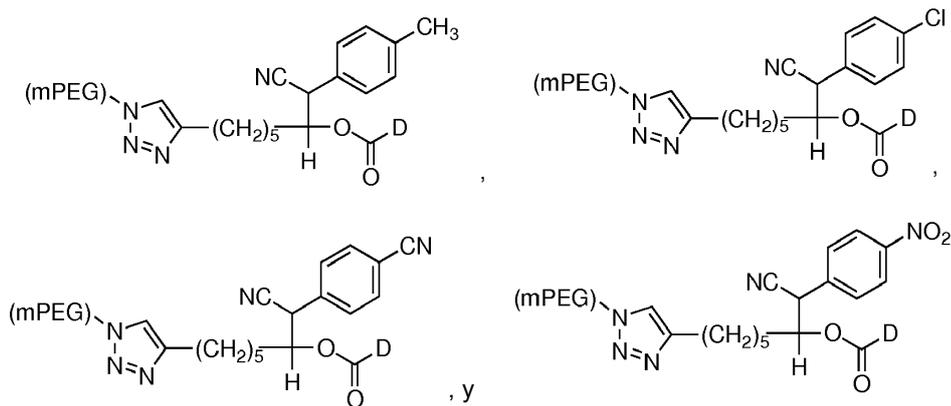
- 10 Z es el residuo de una macromolécula;
 D es el residuo de una molécula de fármaco;
 X es O o S;
 L' es el residuo de un grupo de enlace;
 A es alqueniño (C₂), arilo o está ausente; y
 15 R² es H, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, alqueniño, alquiniño, CN, NO₂, COR³, SOR³ o SO₂R³

[0160] Los conjugados de fármaco-macromolécula tienen la fórmula (3d) y pueden incluir modos de realización de Z y L' tal como se ha mencionado anteriormente.

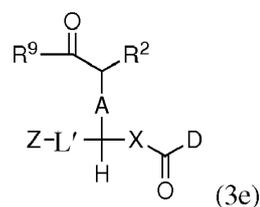
[0161] La fórmula (3d) incluye modos de realización donde X es O, y/o donde A está ausente o es alqueniño (C₂).

20 **[0162]** En determinados modos de realización de la invención, los conjugados de fármaco-macromolécula de la fórmula (3d) incluyen





[0163] En otro modo de realización, los conjugados de la fórmula (3) tienen la fórmula (3e) más específica



5 donde

Z es el residuo de una macromolécula;

D es el residuo de una molécula de fármaco;

X es O o S;

L' es el residuo de un grupo de enlace;

10

A es alqueniño (C₂), arilo o está ausente;

R² es H, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, alqueniño, alquiniño, CN, NO₂, COR³, SOR³ o SO₂R³; y

R⁹ es alquilo, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, alqueniño, o alquiniño, y donde R² y R⁹ pueden estar conectados para formar una estructura cíclica.

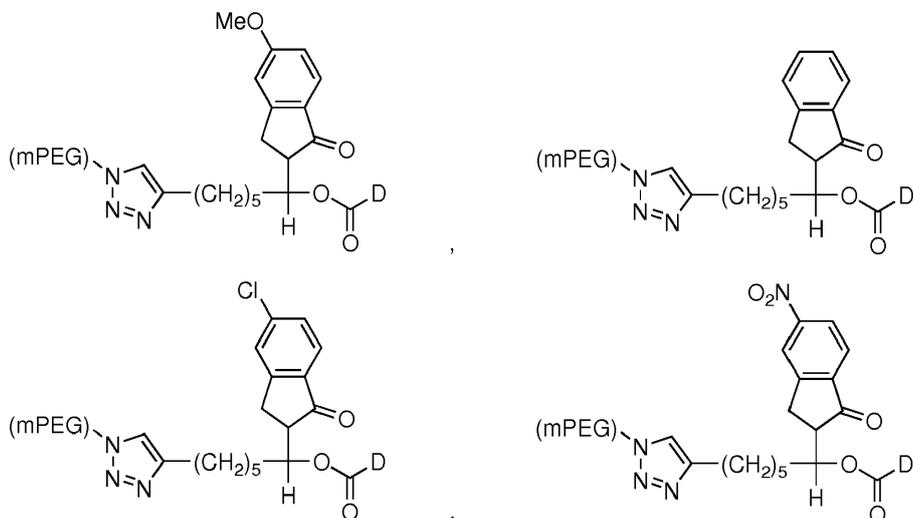
15

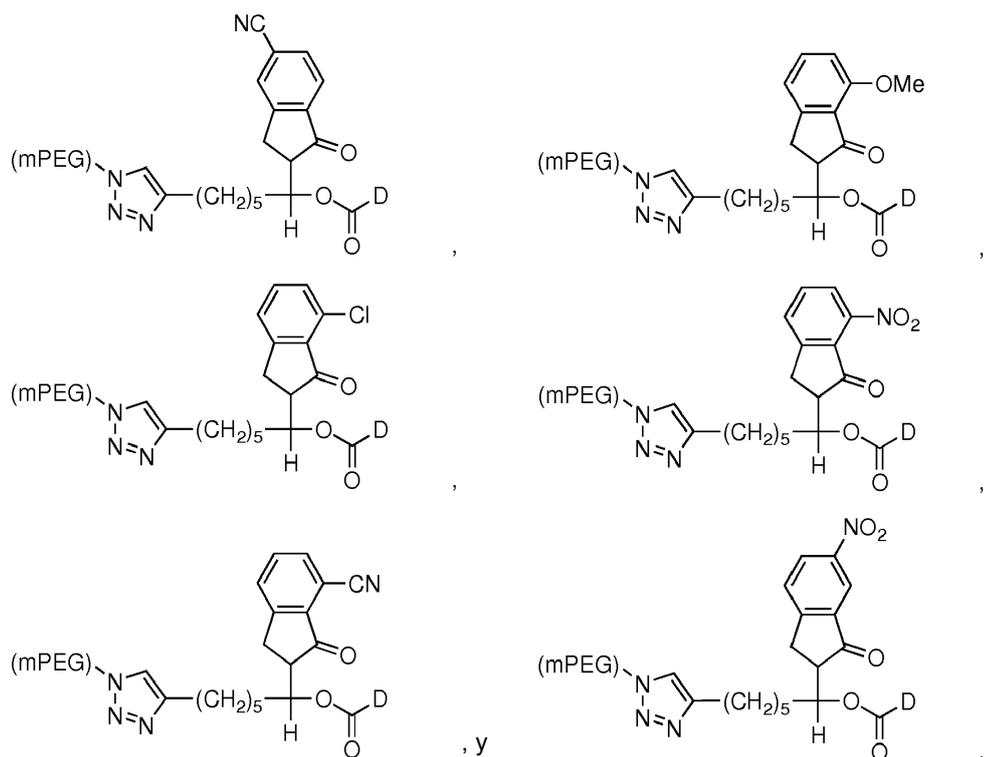
[0164] Los conjugados de la fórmula (3e) contienen modos de realización de Z y L' tal como se ha mencionado anteriormente.

[0165] En la fórmula (3e) X puede ser O, y/o A está ausente, o es A es alqueniño (C₂).

[0166] En determinados modos de realización de la invención, los conjugados de fármaco-macromolécula de la fórmula (3e) incluyen

20





- 5 **[0167]** Las anteriores ilustraciones de las fórmulas (3a)-(3e) incluyen además modos de realización donde cualquier anillo que muestre sustituyentes distintos de hidrógeno puede sustituirse en múltiples posiciones en el mismo. Los sustituyentes pueden ser iguales o diferentes.

COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

- 10 **[0168]** Las composiciones que sustentan la presente invención comprenden compuestos de fórmula (2) o (3) o sales farmacéuticamente aceptables del mismo o mezclas del mismo, y un portador farmacéuticamente aceptable. Se contempla cualquier vía de administración adecuada de los fármacos a humanos y animales, por ejemplo a través de una administración convencional inyectable, implantable, oral, intraocular, intratecal, rectal, o tópica. Estas preparaciones pueden prepararse por medios convencionales conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo tal como se describe en Remington's Pharmaceutical Science, A. R. Gennaro, ed., 17a edición, 1985, Mack Publishing Company, Easton, Penn., EE.UU.
- 15 **[0169]** Los sujetos que se puedan tratar con los compuestos de fórmula (2) o (3) y las composiciones de los mismos incluyen humanos, animales veterinarios, ganado, y animales de laboratorio como ratas y ratones.
- 20 **[0170]** Las composiciones pueden contener mezclas que comprenden dos o más compuestos de fórmula (3) o de fórmula (2). En un modo de realización, la mezcla comprende dos o más compuestos de fórmula (2) o (3), donde cada compuesto de fórmula (2) o (3), tiene el mismo fármaco D pero una velocidad diferente de liberación de fármaco bajo condiciones fisiológicas, proporcionando por consiguiente un perfil de liberación del fármaco adaptado para el fármaco D.
- 25 **[0171]** En otro modo de realización, la mezcla comprende dos o más compuestos de fórmula (2) o (3), donde cada compuesto de fórmula (2) o (3) tiene un fármaco D diferente, y opcionalmente una velocidad diferente de liberación de fármaco para cada fármaco D bajo condiciones fisiológicas, proporcionando por consiguiente una terapia combinada adaptada. Además de controlar la liberación de un único fármaco, los compuestos que sustentan la presente invención por lo tanto pueden controlar las velocidades de liberación (y por consiguiente, concentraciones y duraciones de acción en estado continuo) de dos o más fármacos. Por lo tanto, para combinaciones de dos fármacos uno puede optimizar la concentración y duración de ambos fármacos. En un modo de realización, un conjugado óptimo para un primer fármaco A se determina de manera experimental. Este conjugado óptimo se caracteriza por tener concentraciones de fármaco óptimas frente al perfil temporal (es decir, concentraciones de fármaco óptimas y la duración de la exposición). Utilizando el conjugado optimizado del primer fármaco A junto con conjugados del segundo fármaco B, presentando cada conjugado de fármaco B un perfil de liberación de fármaco diferente, se determina de manera experimental la combinación más efectiva. Un experimento contrario puede llevarse a cabo a continuación, utilizando el conjugado óptimo de fármaco B junto
- 35 con múltiples conjugados del segundo fármaco A a fin de verificar que se ha determinado la mezcla óptima.

[0172] En otro modo de realización, cada uno de los fármacos A y B se convierten en conjugados que tienen un conjunto de semividas para liberar los fármacos de los conjugados (por ejemplo: semividas de 1, 2, 4, y 8 horas). Después se analizan las combinaciones de estos conjugados que abarcan todas las posibles permutaciones de los conjugados de fármaco A y B.

- 5 **[0173]** En un modo de realización particular de la invención, GLP-1 o un análogo del mismo, por ejemplo una exendina, se conjuga para formar un primer conjugado de fármaco-macromolécula de fórmula (3), y se conjuga gastrina para formar un segundo conjugados de fármaco-macromolécula de fórmula (3). En otro modo particular de realización de la invención, se conjuga insulina para formar un primer conjugado de fármaco-macromolécula de fórmula (3), y se conjuga un péptido C de insulina para formar un segundo conjugado de fármaco-macromolécula de la fórmula (3).

[0174] La invención se ilustra pero sin carácter limitativo por los ejemplos descritos a continuación.

Ejemplo 1

Procedimiento General, Fórmula (1), A = Ausente, X = O

(Dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas del método como material de partida)

- 15 **[0175]** Una solución de $R^1R^2CH_2$ (1,0 equivalente) en tetrahidrofurano (THF) se añade a una solución de diisopropilamida de litio (LDA) o butil-litio a $-78\text{ }^\circ\text{C}$ (1,0 equivalente). Se deja que la mezcla se caliente lentamente hasta $0\text{ }^\circ\text{C}$ y luego se volvió a enfriar hasta $-78\text{ }^\circ\text{C}$ antes de la adición de aldehído L-CHO (1,0 equivalente). Después de 30 minutos, se deja que la mezcla se caliente lentamente hasta temperatura ambiente, se extingue por adición de NH_4Cl acuoso saturado, y se extrae con éter. El extracto se lava de manera secuencial con 1 N HCl, NH_4Cl acuoso saturado, y salmuera, luego se seca sobre $MgSO_4$, se filtra y se evapora. El producto se purifica por cromatografía sobre gel de sílice si es necesario.

Ejemplo 2

Procedimiento General, Formula (1), A = Ausente, X = S

(Dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas del método como material de partida)

- 25 **[0176]** Se añade una solución del compuesto de fórmula (1) donde A está ausente y $X = O$ (1,0 equivalente) en THF a una solución de 1 M de bis(trimetilsililamida) de litio (LiHMDS) (1.0 equivalente) a $-78\text{ }^\circ\text{C}$. Tras 15 minutos, se añade una solución de cloruro de p-toluenosulfonilo (1.0 equivalente), y se deja que la mezcla se caliente lentamente hasta llegar a temperatura ambiente, se extingue por adición de NH_4Cl acuoso saturado y se extrae con éter. El extracto se lava de manera secuencial con 1 N HCl, NH_4Cl acuoso saturado, y salmuera, luego se seca sobre $MgSO_4$, se filtra y se evapora. El tosiloato en bruto resultante se disuelve en isopropanol y se hace reaccionar con tiosulfato de sodio acuoso a $50\text{ }^\circ\text{C}$ para formar la sal de Bunte, que se hidroliza mediante un tratamiento con HCl acuoso. El producto de mercaptano se purifica por cromatografía sobre gel de sílice.

Ejemplo 3

Procedimiento General, Formula (1), A = Alquenileno (C_2), X = O, L = Arilo Sustituido

- 35 (Dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas del método como material de partida)
- [0177]** Una solución de $R^1R^2CH_2$ (1,0 equivalente) en tetrahidrofurano (THF) se añade a una solución de diisopropilamida de litio (LDA) o butil-litio a $-78\text{ }^\circ\text{C}$ (1,0 equivalente). Se deja que la mezcla se caliente lentamente hasta $0\text{ }^\circ\text{C}$ y luego se volvió a enfriar hasta $-78\text{ }^\circ\text{C}$ antes de la adición de 3-(dimetilamino)propenoato de metilo (1,0 equivalente). Se deja que la mezcla se caliente lentamente hasta temperatura ambiente, se extingue por adición de 1 N HCl y se extrae con éter. El extracto se lava de manera secuencial con 1 N HCl, NH_4Cl acuoso saturado, y salmuera, luego se seca sobre $MgSO_4$, se filtra y se evapora. El éster producto se purifica por cromatografía sobre gel de sílice.

- 45 **[0178]** Una solución del éster (1,0 equivalente) en THF se trata con un exceso de hidruro de litio y aluminio, luego se extingue por adición de ácido oxálico y se extrae con éter. El extracto se lava de manera secuencial con 1 N HCl, NH_4Cl acuoso saturado, y salmuera, luego se seca sobre $MgSO_4$, se filtra y se evapora. El alcohol producto se purifica por cromatografía sobre gel de sílice.

- 50 **[0179]** El alcohol mencionado anteriormente (1,0 equivalente) se oxida al aldehído mediante reacción con periodinano de Dress-Martin (1,5 equivalente) en solución de diclorometano. La solución se filtra y se lava de manera secuencial con 1 N HCl, NH_4Cl acuoso saturado, y salmuera, luego se seca sobre $MgSO_4$, se filtra y se evapora. El aldehído producto se purifica por cromatografía sobre gel de sílice.

[0180] El aldehído mencionado anteriormente se somete a reacción con el ácido arilborónico tal como se describe en Organic Letters (2005) 7:4153-4155 (incorporado en el presente documento como referencia). Por

consiguiente, una mezcla que comprende el aldehído (1,0 equivalente), ácido arilborónico (2,0 equivalentes), Cs_2CO_3 (2,0 equivalentes), $\text{Pd}_2(\text{dba})_3 \cdot \text{CHCl}_3$ (0.025 equivalente), y Ph_3P (0.05 equivalente) en tolueno se calienta a 80 °C durante 24 horas. Después de enfriarlo a temperatura ambiente, la mezcla se concentra y el producto se purifica por cromatografía sobre gel de sílice.

5 Ejemplo 4

Procedimiento General, Fórmula (1), A = Alquenileno (C_2), X = S, L = Arilo Sustituido

(Dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas del método como material de partida)

[0181] El producto del Ejemplo 3 se convierte en el compuesto correspondiente en el que X = S utilizando el procedimiento del Ejemplo 2.

10 Ejemplo 5

Procedimientos Generales, Activación de Compuestos de Fórmula (1), X = O según los 4-Nitrofenilcarbonatos

(Dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas del método como material de partida)

15 **[0182]** Una solución del compuesto de la fórmula (1) (1,0 equivalente) en THF se añade a un 1,0 M de solución de LiHMDS (1,0 equivalente) en THF a -78 °C. Después de 15 minutos, se añade una solución de bis(4-nitrofenil) carbonato (1,5 equivalente). Se deja que la mezcla se caliente lentamente hasta temperatura ambiente, se extingue por adición de 1 N HCl, y se extrae con éter. El extracto se lava de manera secuencial con 1 N HCl, agua, y salmuera, luego se seca sobre MgSO_4 , se filtra y se evapora. El 4-nitrofenilcarbonato producto se purifica por cromatografía sobre gel de sílice.

Ejemplo 6

20 Procedimiento General, Activación de Compuestos de Fórmula (1), X = O según los N-hidroxisuccinimidoil carbonatos a través de Cloroformatos Intermedios

(Dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas del método como material de partida)

25 **[0183]** Una solución del compuesto de la fórmula (1) (1 equivalente) en cloroformo se trata con trifosgeno (5 equivalentes) durante 24 horas a temperatura ambiente. El solvente se elimina por evaporación para proporcionar el cloroformiato en bruto.

30 **[0184]** El cloroformiato se disuelve en THF y se trata con N-hidroxisuccinimida (4 equivalentes) y 2.6-lutidina (6 equivalentes) a temperatura ambiente. Cuando se haya completado tal como se calcula mediante un análisis de HPLC, la mezcla se diluye con acetato de etilo y se lava de manera secuencial con 1 N HCl, agua, y salmuera, luego se seca sobre MgSO_4 , se filtra y se evapora. El N-hidroxisuccinimidoil carbonato se purifica por cromatografía HPLC.

Ejemplo 7

Procedimiento General, Fórmula (2), X = O, D = Péptido por Conjugación

35 **[0185]** Una solución del péptido en tampón acuoso, pH 7.5, se trata con una solución del compuesto activado del Ejemplo 5 o del Ejemplo 6 (1 equivalente) en DMSO. El pH se mantiene como sea necesario mediante la adición de 1 N NaOH. El progreso de la reacción se monitoriza mediante HPLC. Cuando se calcule que se ha completado, la mezcla se purifica por HPCL preparativa.

Ejemplo 8

Procedimiento general, Fórmula (2), X = O, D = Ácido Nucleico por Conjugación

40 **[0186]** Una solución del ácido nucleico en tampón acuoso, pH 7.5, se trata con una solución del compuesto activado del Ejemplo 5 o del Ejemplo 6 (1 equivalente) en DMSO. El pH se mantiene como sea necesario mediante la adición de 1 N NaOH. El progreso de la reacción se monitoriza mediante HPLC. Cuando se calcule que se ha completado, la mezcla se purifica por HPCL preparativa.

Ejemplo 9

Procedimiento General, Fórmula (2), X = O, D = péptido por síntesis

45 **[0187]** El péptido se sintetiza utilizando condiciones estándar conocidas en la técnica, por ejemplo utilizando química FMOC. Tras el acoplamiento del aminoácido final, el grupo protector de FMOC terminal se retira por tratamiento bajo condiciones estándar. Después, el péptido unido a resina se somete a reacción con el exceso

de compuesto del Ejemplo 5 o del Ejemplo 6 para completar el N-terminal. Luego, el péptido se desprotege y se escinde de la resina utilizando TFA/trietilsilano, y se purifica por HPLC con inversión de fase.

Ejemplo 10

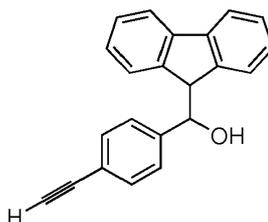
Procedimiento General, Fórmula (3), X = OH, D = péptido, Z = mPEG

- 5 **[0188]** Un compuesto de la fórmula (1) donde X = O, A está ausente y L = HCC-(CH₂)_n donde n = 0-6 se prepara según el método del Ejemplo 1 utilizando el alquilaldehído terminal apropiado HCC-(CH₂)_nCHO. Este compuesto se activa según el método del Ejemplo 5 o Ejemplo 6, y se une al péptido D según el método del Ejemplo 7 o Ejemplo 9 para proporcionar un compuesto de la fórmula (2) donde X = O, D = péptido, y L = HCC-(CH₂)_n.
- 10 **[0189]** De forma alternativa, un compuesto de la fórmula (1) donde X = O, A está ausente y L = etinilfenilo se prepara según el método del Ejemplo 1 utilizando el alquilbenzaldehído apropiado. Este compuesto se activa según el método del Ejemplo 5 o del Ejemplo 6, y se acopla a un péptido D según el método del Ejemplo 7 o del Ejemplo 9 para proporcionar un compuesto de la fórmula (2) donde X = O, D = péptido, y L = alquilfenilo.
- 15 **[0190]** Una solución de THF en mPEG-N₃ (1 equivalente) y el compuesto de alquilaldehído descrito anteriormente de la fórmula (2) (1 equivalente) se trata con CuSO₄·5H₂O acuoso (0,1 equivalente) y ascorbato de sodio (0,5 equivalente) se agita durante 24 horas a temperatura ambiente. La mezcla se liofiliza, luego se purifica por HPCL preparativa en fase inversa.

Ejemplo 11

- 20 (4-etinilfenil)(9H-fluoren-9-il)metanol (Dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas del método como material de partida)

[0191] Fórmula (1): A = ausente; X = O, R¹R²CH = 9-fluorenilo; L = 4-etinilfenilo

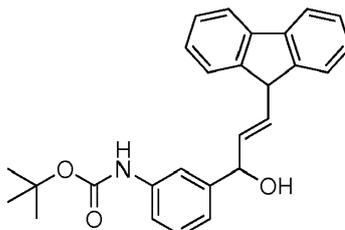


- 25 **[0192]** Una solución de fluoreno (1,0 equivalente) en tetrahidrofurano (THF) se añade a una solución de diisopropilamida de litio (LDA) a -78 °C (1,0 equivalente). Se deja que la mezcla se caliente lentamente hasta 0 °C y luego se vuelve a enfriar hasta -78 °C antes de la adición de 4-etinil-benzaldehído (1,0 equivalente). Después de 30 minutos, se deja que la mezcla se caliente lentamente hasta temperatura ambiente, se extingue por adición de NH₄Cl acuoso saturado, y se extrae con éter. El extracto se lava de manera secuencial con 1 N HCl, NH₄Cl acuoso saturado, y salmuera, luego se seca sobre MgSO₄, se filtra y se evapora. El producto se purifica por cromatografía sobre gel de sílice.

30 Ejemplo 12

Alcohol 1-(3-(*tert*-butoxicarbonilamino)fenil-3-(9H-fluoren-9-il)alilo (Dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas del método como material de partida)

[0193] Fórmula (1): A = CH=CH; X = O; R¹R²CH = 9-fluorenilo; L = 3-(N-BOC-amino)fenilo



- 35 **[0194]** Una solución de fluoreno (1,0 equivalente) en tetrahidrofurano (THF) se añade a una solución de diisopropilamida de litio (LDA) a -78 °C (1,0 equivalente). Se deja que la mezcla se caliente lentamente hasta 0 °C

5 y luego se volvió a enfriar hasta $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ antes de la adición de 3-(dimetilamino)propenoato de metilo (1,0 equivalente). Se deja que la mezcla se caliente lentamente hasta temperatura ambiente, se extingue por adición de 1 N HCl, y se extrae con éter. El extracto se lava de manera secuencial con 1 N HCl, NaHCO_3 acuoso saturado, y salmuera, luego se seca sobre MgSO_4 , se filtra y se evapora. El éster producto se purifica por cromatografía sobre gel de sílice.

[0195] Una solución de éster (1,0 equivalente) en THF se trata con exceso de hidruro de litio y aluminio, luego se extinguió por adición de ácido oxálico y se extrajo con éter. El extracto se lava de manera secuencial con 1 N HCl, NaHCO_3 acuoso saturado, y salmuera, luego se seca sobre MgSO_4 , se filtra y se evapora. El alcohol producto se purifica por cromatografía sobre gel de sílice.

10 **[0196]** El alcohol mencionado anteriormente (1,0 equivalente) se oxida al aldehído mediante una reacción con periodinano de Dress-Martin (1,5 equivalente) en solución de diclorometano. La solución se filtra y se lava de manera secuencial con 1 N HCl, NH_4Cl acuoso saturado, y salmuera, luego se seca sobre MgSO_4 , se filtra y se evapora. El aldehído producto se purifica por cromatografía sobre gel de sílice.

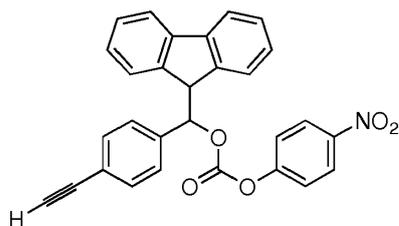
15 **[0197]** Una mezcla que comprende el aldehído descrito anteriormente (1,0 equivalente), ácido 3-(N-BOC-amino)fenilborónico (2,0 equivalentes), Cs_2CO_3 (2,0 equivalentes), $\text{Pd}_2(\text{dba})_3\cdot\text{CHCl}_3$ (0,025 equivalente), y Ph_3P (0,05 equivalente) en tolueno se calienta a $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas. Tras enfriarlo hasta temperatura ambiente, la mezcla se concentra y el producto se purifica por cromatografía sobre gel de sílice.

Ejemplo 13

Carbonato de (4-etinilfenil)(9H-fluoren-9-il)metil4-nitrofenilo

20

[0198]

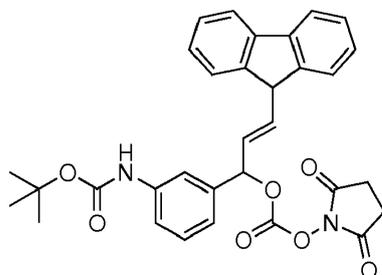


25 **[0199]** Una solución de (4-etinilfenil)(9H-fluoren-9-il)metanol (1,0 equivalente) en THF se añade a una solución 1.0 M de LiHMDS (1,0 equivalente) en THF a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$. Después de 15 minutos, se añadió una solución de carbonato de bis(4-nitrofenil) (1,5 equivalente). Se deja que la mezcla se caliente lentamente hasta temperatura ambiente, se extingue por adición de 1 N HCl, y se extrae con éter. El extracto se lava de manera secuencial con 1 N HCl, agua, y salmuera, luego se seca sobre MgSO_4 , se filtra y se evapora. El carbonato de 4-nitrofenilo de producto se purifica por cromatografía sobre gel de sílice.

Ejemplo 14

30 N-hidroxisuccinimidoil carbonato de 1-(3-(tert-butoxicarbonilamino)fenil)-3-(9H-fluoren-9-il)alilo

[0200]



35 **[0201]** Una solución de alcohol 1-(3-(tert-butoxicarbonilamino)fenil)-3-(9H-fluoren-9-il)alílico (1 equivalente) en cloroformo se trata con trifosgeno (5 equivalentes) y piridina (2 equivalentes) durante 24 horas a temperatura ambiente. El solvente se retira por evaporación para proporcionar el cloroformiato en bruto.

5 **[0202]** El cloroformiato se disuelve en THF y se trata con N-hidroxisuccinimida (4 equivalentes) y 2,6-lutidina (6 equivalentes) a temperatura ambiente. Cuando se haya completado tal como se calcula mediante un análisis por HPLC, la mezcla se diluye con acetato de etilo y se lava de manera secuencial con 1 N HCl, agua, y salmuera, luego se seca sobre MgSO₄, se filtra y se evapora. El N-hidroxisuccinimidoil carbonato producto se purifica por cromatografía en HPLC.

Ejemplo 15

Exendina-4 derivada de [(4-etinilfenil)(9H-fluoren-9-il)metoxicarbonilo]

10 **[0203]** Una solución de exendina-4 (HGEGTFTSDL SKQMEEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPPS) en tampón acuoso, pH 7.5, se trata con una solución del compuesto activado del Ejemplo 13 (1 equivalente) en DMSO. El pH se mantiene como sea necesario mediante la adición de 1 N NaOH. El progreso de la reacción se monitoriza mediante HPLC. Cuando se calcule que se ha completado, la mezcla se purifica por HPCL preparativa.

Ejemplo 16

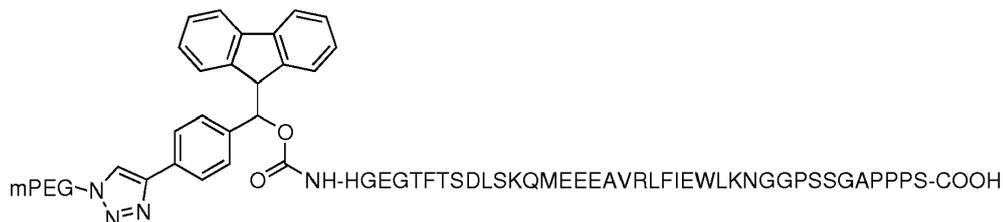
N-[(4-etinilfenil)(9H-fluoren-9-il)metoxicarbonil]-exendina-4

15 **[0204]** La secuencia peptídica de la exendina-4 (HGEGTFTSDL SKQMEEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPPS) se sintetiza utilizando química Fmoc estándar. Tras el acoplamiento del aminoácido histidina final, el grupo protector de Fmoc terminal se retira por tratamiento bajo condiciones estándar. Después, el péptido unido a resina se somete a reacción con el exceso de compuesto del Ejemplo 13 para completar el N-terminal. Luego, el péptido se desprotege y se escinde de la resina utilizando TFA/trietilsilano, y se purifica por HPLC con inversión de fase utilizando una metodología estándar.

20 Ejemplo 17

N-[(4-(mPEG-triazolil)fenil)(9H-fluoren-9-il)metoxicarbonil]-exendina-4

[0205]



25 **[0206]** Una solución en THF de mPEG-N₃ (1 equivalente) y del compuesto alquínico del Ejemplo 16 (1 equivalente) se trata con CuSO₄•5H₂O acuoso (0,1 equivalente) y ascorbato de sodio (0.5 equivalente) se mezcla durante 24 horas a temperatura ambiente. La mezcla se seca, luego se purifica por HPCL preparativa en fase inversa.

Ejemplo 18

Exendina-4 derivada de 1-(3-(*tert*-butoxicarbonilamino)fenil)-3-(9H-fluoren-9-il)aliloxicarbonilo

30 **[0207]** Una solución de exendina-4 (HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSS-GAPPPS) en tampón acuoso, pH 7.5, se trata con una solución del compuesto activado del Ejemplo 14 (1 equivalente) en DMSO. El pH se mantiene como sea necesario mediante la adición de 1 N NaOH. El progreso de la reacción se monitoriza mediante HPLC. Cuando se calcula que se ha completado, la mezcla se purifica por HPCL preparativa.

Ejemplo 19

35 N-[1-(3-(*tert*-butoxicarbonilamino)fenil)-3-(9H-fluoren-9-il)aliloxicarbonil]-exendina-4

[0208]



[0209] La secuencia peptídica de exendina-4 (HGEFTFTSDLSKQMEEEEAVRL-FIEWLKNGGPSSGAPPPS) se sintetiza utilizando química Fmoc estándar. Tras el acoplamiento del aminoácido de histidina final, el grupo protector de Fmoc terminal se retira por tratamiento bajo condiciones estándar. Después, el péptido unido a resina se somete a reacción con el exceso de compuesto del Ejemplo 14 para completar el N-terminal. Luego, el péptido se desprotege y se escinde de la resina utilizando TFA/trietilsilano, y se purifica por HPLC con inversión de fase utilizando una metodología estándar.

Ejemplo 20

N-[1-(3-(mPEG-carboxamido)fenil)-3-(9H-fluoren-9-il)aliloxicarbonil]-exendina-4

[0210]



10

[0211] El compuesto del Ejemplo 19 se disuelve en TFA/trietilsilano para retirar el grupo tert-butoxicarbonilo, luego se evapora hasta sequedad. El compuesto resultante se disuelve en acetonitrilo y se somete a reacción con éster de N-hidroxisuccinimida mPEG-carboxilato en presencia de un tampón de pH 6. La mezcla se agita a temperatura ambiente durante toda la noche, luego se seca. El péptido en bruto se purifica por HPLC de fase inversa.

15

Ejemplo 21

5-hexinal (Grupo de enlace)

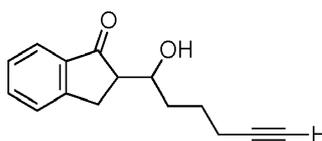
[0212] Bajo una atmósfera de nitrógeno, se añadió 5-hexin-1-ol (3 mL, 27,5 mmol, 1,0 Eq) a una mezcla a 0 °C de acetato de sodio (4,5 g, 27,4 mmol, 2,0 equiv.) y MgSO₄ (1,48 g) en CH₂Cl₂ seco (50 mL), seguido de clorocromato de piridinio (PCC) (11,85 g, 27,5 mmol, 2,0 equiv.). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas, y se añadió éter etílico (Et₂O) (20 mL). La mezcla resultante se filtró a través de una pequeña capa de gel de sílice, y el residuo se lavó con 40 mL of Et₂O/éter de petróleo (1:1). El filtrado limpio se concentró a la mitad de su volumen original, luego se secó sobre tamices moleculares y se almacenó en el refrigerador para la próxima etapa.

20

Ejemplo 22

(Dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas del método como material de partida)

[0213]



30

[0214] Bajo la protección de N₂, se añadió n-Butil-litio (2,7 mL, 7,8 mmol) a la solución de N,N-diisopropilamina (1,1 mL, 7,8 mmol) en 20 ml de tetrahidrofurano (THF) anhidro a 55 °C, la mezcla de reacción se agitó durante 15 minutos, y se enfrió hasta -78 °C. Se añadió indanona (0,95 g, 7,2 mmol) en THF (10 mL) a la mezcla anterior mediante una cánula. Tras agitarlo a la misma temperatura durante 30 minutos, se añadió una solución de 5-hexinal al matraz y se agitó durante 3 horas. La reacción se extinguió por adición de una solución de NaHSO₄ (1 g en 10 mL de agua), y la mezcla de reacción se calentó hasta temperatura ambiente. La capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (EtOAc) (15mL × 2), y la solución orgánica combinada se secó sobre MgSO₄ y se concentró bajo presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía por desorción súbita sobre gel de sílice para obtener el producto como un sólido de color rojo (0,52 g, rendimiento 38,3 %).

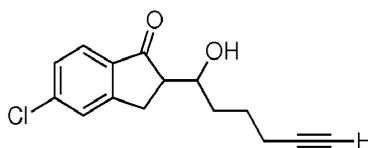
35

Ejemplo 23

(Dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas del método como material de partida)

[0215]

40

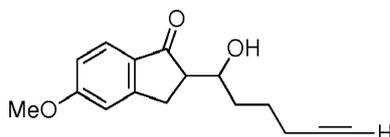


- [0216]** Bajo una atmósfera de nitrógeno, se añadió n-butil-litio (2,5M en hexanos, 1,0 mL, 3,0 mmol) a una solución de N,N-diisopropilamina (0,42 mL, 3,0 mmol) en tetrahidrofurano (THF) anhidro (6 mL) a 0 °C. La mezcla de reacción resultante se agitó a la misma temperatura durante 15 minutos, luego se enfrió hasta -78 °C. Se añadió 5-Cloro-2,3-dihidroinden-1-ona (0,5 g, 3,0 mmol) en THF (3 mL). Tras agitarlo a -78 °C durante 30 minutos, se añadió una solución de 5-hexinal. Después, la mezcla de reacción se removió a -78 °C durante 2 horas, se extinguió por adición de NH₄Cl sat. ac. y se calentó hasta temperatura ambiente. La fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (EtOAc), y la solución orgánica combinada se lavó con salmuera, se secó sobre MgSO₄ anhidro, se filtró y se concentró bajo presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice para obtener el producto como un sólido de color amarillo (0,29 g, rendimiento 41,3 %).

Ejemplo 24

(Dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas del método como material de partida)

- [0217]**

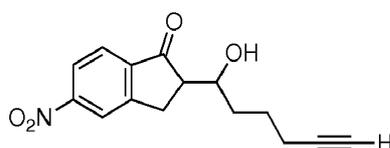


- [0218]** Bajo la protección de N₂, se añadió n-butil-litio (2,5 M en hexanos, 2,7 mL, 7,8 mmol) a una solución de N,N-diisopropilamina (1,1 mL, 7,8 mmol) en THF anhidro (20 mL) a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó durante 15 minutos y después se enfrió hasta -78 °C. Se añadió 5-Metoxi-2,3-dihidroinden-1-ona (1,17 g, 7,2 mmol) en THF (10 mL) a la mezcla anterior mediante una cánula. Tras agitarlo a la misma temperatura durante 30 minutos, se añadió una solución de 5-hexinal al matraz y la mezcla de reacción se agitó a -78 °C durante 3 horas. La reacción se extinguió por adición de una solución saturada de NH₄Cl (10 mL), y luego se calentó hasta temperatura ambiente. La mezcla se extrajo con EtOAc (15 mL x 2), y la solución orgánica combinada se secó sobre MgSO₄ y se concentró bajo presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía por desorción súbita sobre gel de sílice para obtener el producto como un sólido de color blanco (0,58 g, rendimiento 31,2 %).

Ejemplo 25

(Dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas del método como material de partida)

[0219]

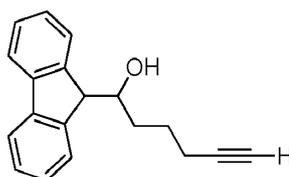


- [0220]** Bajo la protección de N₂, se añadió n-butil-litio (2,5 M en hexanos, 0,39 mL, 1,13 mmol) a una solución de N,N-diisopropilamina (0,17 mL, 1,13 mmol) en THF anhidro (4 mL) a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 20 minutos, y se enfrió hasta -78 °C, y se añadió 5-nitro-2,3-dihidroinden-1-ona (0,2 g, 1,13 mmol) en THF (4 mL) mediante una aguja. Tras agitarlo a la misma temperatura durante 30 minutos, se añadió una solución de 5-hexinal (ca. 1 mmol), y luego se agitó a -78 °C durante 3 horas. La reacción se extinguió por adición de NaHSO₄ (0,24 g en 5 mL de agua), y se calentó hasta temperatura ambiente. La capa acuosa se extrajo con EtOAc (15 mL x 2), y la solución orgánica combinada se secó sobre MgSO₄ anhidro, se filtró, se concentró, y el residuo se purificó con cromatografía en columna sobre gel de sílice para obtener el producto como un sólido de color amarillo claro (0,117 g, rendimiento 38 %).

Ejemplo 26

- (Dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas del método como material de partida)

[0221]

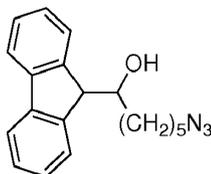


5 **[0222]** Bajo una atmósfera de nitrógeno, se añadió n-butil-litio (2,5 M en hexanos, 0,47 mL, 1,35 mmol) a una solución de fluoreno (0,24 g, 1,48 mmol) en THF anhidro (2 mL) a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, y la mezcla de reacción se agitó a la misma temperatura durante 2,5 horas. Se añadió una solución de 5-hexinal y la reacción se agitó a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 3 horas, se extinguió por adición de NH_4Cl sat. ac., y se calentó hasta llegar a temperatura ambiente. La mezcla se extrajo con EtOAc, y luego la fase orgánica combinada se lavó con salmuera, se secó sobre MgSO_4 anhidro, se filtró y se concentró bajo presión reducida. El producto en bruto se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice para obtener el producto como un sólido de color amarillo claro (0,040 g, rendimiento 11,9%).

10 **Ejemplo 27**

(Dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas del método como material de partida)

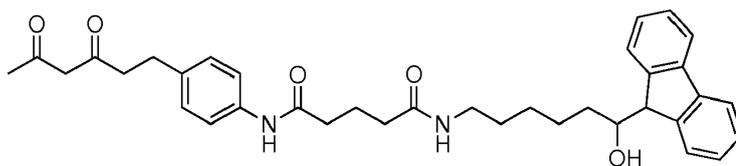
[0223]



15 **[0224]** Bajo una atmósfera de nitrógeno, se añadió n-butil-litio (2,5 M en hexanos, 0,47 mL, 1,35 mmol) a una solución de fluoreno (0,24 g, 1,48 mmol) en THF anhidro (2 mL) a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, y la mezcla de reacción se agitó a la misma temperatura durante 2,5 horas. Se añade una solución de 6-azidohexanal y la reacción se agita a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 3 horas, se extingue por adición de NH_4Cl sat. ac., y se calienta hasta llegar a temperatura ambiente. La mezcla se extrajo con EtOAc, y luego la fase orgánica combinada se lava con salmuera, se seca sobre MgSO_4 anhidro, se filtra y se concentra bajo presión reducida. El producto en bruto se purifica por cromatografía en columna sobre gel de sílice para obtener el producto deseado.

20 **Ejemplo 28**

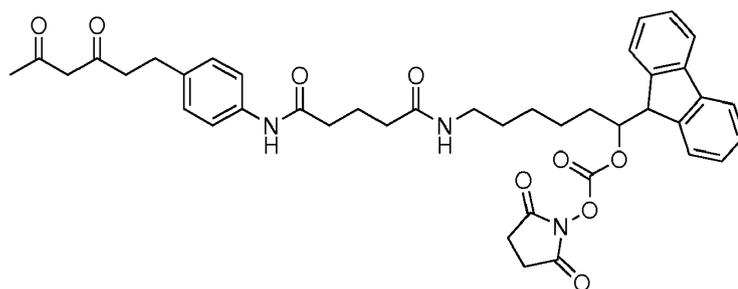
[0225]



25 **[0226]** Una solución de 9-(6-azido-1-hidroxihexil)fluoreno (1 Eq) en 9:1 dimetilformamida/agua se trata con trimetilfosfina (10 Eq) durante 1 hora a temperatura ambiente. A la solución resultante se añade ácido 4-[4-(3,5-Dioxo-hexil)-fenilcarbamoil]-butírico (1 Eq) y dimetilaminopropil-etil-carbodiimida (EDCI) (5 Eq). Tras agitarlo durante toda la noche, la mezcla se diluye con acetato de etilo y se lava de manera secuencial con agua, 1N HCl, NaHCO_3 sat. ac., y salmuera, luego se seca sobre MgSO_4 , se filtra y se concentra. El producto se aísla por cromatografía sobre gel de sílice.

30 **Ejemplo 29**

[0227]

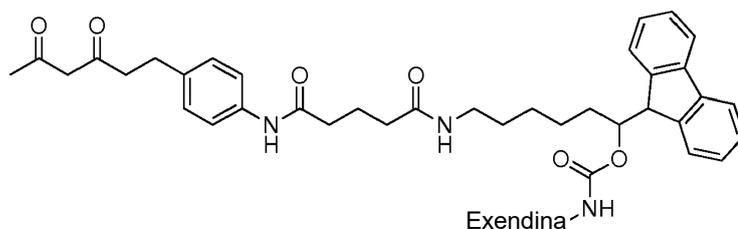


[0228] Una solución del compuesto del Ejemplo 28 (1 Eq) en cloroformo se trata con trifosgeno (5 equivalentes) durante 24 horas a temperatura ambiente. El solvente se retira por evaporación para proporcionar el cloroformiato en bruto.

- 5 **[0229]** El cloroformiato se disuelve en THF y se trata con N-hidroxisuccinimida (4 equivalentes) y 2,6-lutidina (6 equivalentes) a temperatura ambiente. Cuando se haya completado tal como se calcula mediante un análisis de HPLC, la mezcla se diluye con acetato de etilo y se lava de manera secuencial con 1 N HCl, agua, y salmuera, luego se seca sobre MgSO₄, se filtra y se evapora. El N-hidroxisuccinimidóil carbonato producto se purifica por cromatografía en HPLC.

10 Ejemplo 30

[0230]



[0231] Una solución de exendina-4 (HGEFTFTSDL SKQMEEEEAVR LFIEWLKNNGG PSSGAPPPS) en tampón acuoso, pH 7.5, se trata con una solución del compuesto activado del Ejemplo 29 (1 equivalente) en DMSO. El pH se mantiene como sea necesario mediante la adición de 1 N NaOH. El progreso de la reacción se monitoriza mediante HPLC. Cuando se calcula que se ha completado, la mezcla se purifica por HPCL preparativa.

15

Ejemplo 31

Formación de un Conjugado Anticuerpo-Exendina

[0232] Un anticuerpo (por ejemplo, h38C2 IgG1 o b12 IgG1; véase el documento de publicación de patente de los Estados Unidos N.º 2006/0205670 A1) se añade a una solución de un compuesto del Ejemplo 30 a una concentración final de sitios de unión al anticuerpo de 25 nM y de 125 nM (2). Esta mezcla se incuba a temperatura ambiente durante 10 minutos. La formación del conjugado está determinada por la formación de absorbancia UV a 318 nm.

20

Ejemplo 32

Utilización de Mezclas de Conjugado

[0233] Además de controlar la liberación de un único fármaco, los compuestos de la invención pueden controlar las velocidades de liberación (y por consiguiente, las concentraciones y duraciones de acción en estado continuo) de dos o más fármacos. Por lo tanto, para combinaciones de dos fármacos uno puede optimizar la concentración y la duración de ambos fármacos. En un modo de realización, se determina de manera experimental un conjugado de fármaco-macromolécula óptimo para un primer fármaco A. Dicho conjugado de fármaco-macromolécula óptimo se caracteriza por tener una concentración de fármaco óptima frente al perfil temporal (es decir, concentraciones de fármaco óptimas y la duración de la exposición). Utilizando el conjugado de fármaco-macromolécula optimizado del primer fármaco A junto con múltiples conjugados de fármaco-macromolécula del segundo fármaco B, presentando cada conjugado de fármaco B un perfil de liberación de fármaco diferente, se determina de manera experimental la combinación más efectiva. Un experimento contrario puede llevarse a cabo a continuación, utilizando el conjugado óptimo de fármaco B junto con múltiples conjugados de fármaco-macromolécula del segundo fármaco a fin de verificar que se ha determinado la mezcla óptima.

30

35

[0234] En otro modo de realización de la invención, cada uno de los fármacos A y B se convierten en conjugados que tienen un conjunto de semividas para liberar el fármaco de los conjugados de fármaco-macromolécula (por ejemplo: semividas de 1, 2, 4, y 8 horas). Después se analizan las combinaciones de estos conjugados que abarcan todas las permutaciones de los conjugados de fármaco A y B. (Tabla 1).

- 5 **Tabla 1** Ejemplos de permutaciones de conjugados de combinaciones farmacológicas a analizar para determinar la combinación óptima. Semividas de la liberación del primer fármaco A del conjugado = w, x, y, y z horas.
Semividas de la liberación del segundo fármaco B del conjugado = a, b, c, y d horas.

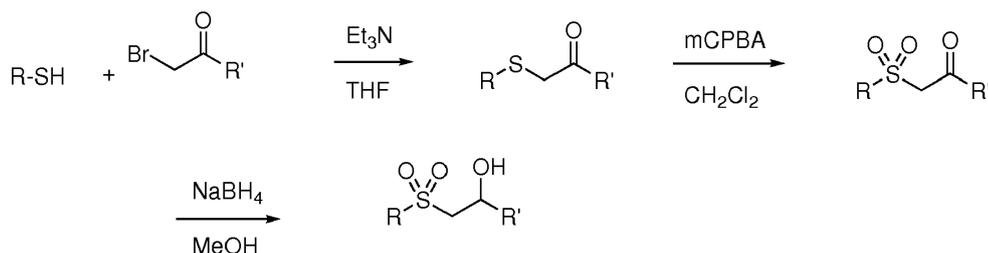
T1/2 del conjugado-B	T1/2 del conjugado-A			
	w	x	y	z
a	w,a	x,a	y,a	z,a
b	w,b	x,b	y,b	z,b
c	w,c	x,c	y,c	z,c
d	w,d	x,d	y,d	z,d

Ejemplo 33

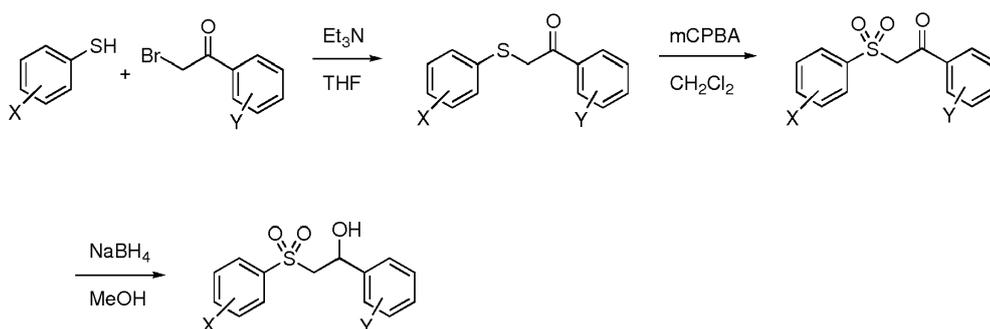
Procedimiento General para la Preparación de Enlaces de Sulfona

- 10 (Dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas del método como material de partida)

[0235] Los enlaces de sulfona pueden prepararse generalmente primero sometiendo a reacción un tiol apropiado con una bromoacetona para generar un beta-cetosulfuro, que posteriormente se oxida a la beta-cetosulfona; la reducción del carbonilo produce después una beta-hidroxisulfona.



- 15 **[0236]** En un ejemplo, esto se ilustra por la reacción de un tiofenol y una bromoacetofenona de la siguiente manera.

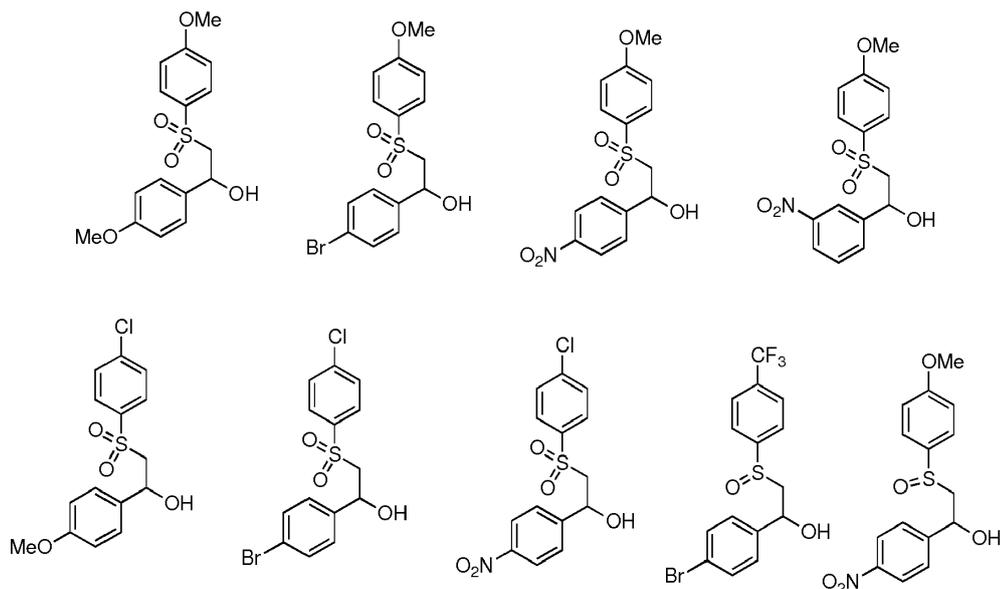


- 20 **[0237]** A una solución del tiofenol apropiado (1 eq) y 2-bromoacetofenona apropiada (1 eq) en tetrahidrofurano (THF) se añade trietilamina (Et_3N) (1,2 eq). La reacción se agita a temperatura ambiente durante 1 hora. Tras diluirla con acetato de etilo (EtOAc), la reacción se extingue con NH_4Cl sat. (ac). Las capas se separan, y la fase acuosa se extrae con EtOAc (2x). Las capas orgánicas combinadas se secan sobre MgSO_4 , se filtran y se concentran mediante evaporación rotatoria para proporcionar mercaptocetona en bruto.

- 25 **[0238]** A una solución de la mercaptocetona (1 eq) se añade ácido 3-cloroperoxibenzoico (mCPBA) (3 eq) en porciones. Para secuencias cuyo objetivo sea generar los sulfóxidos, es suficiente utilizar 1 eq de mCPBA. La reacción se agita a temperatura ambiente hasta que el análisis por TLC indique que el proceso de reacción se ha completado. Tras diluirla con EtOAc, la reacción se lava con NaHCO_3 (ac). Las capas se separan, y la fase

acuosa se extrae con EtOAc (2x). Las capas orgánicas combinadas se secan sobre MgSO₄, se filtran y se concentran para proporcionar cetosulfona en bruto. La purificación por cromatografía en gel de sílice (eluyendolo con EtOAc en hexano) proporciona la cetosulfona deseada.

- 5 **[0239]** A una suspensión de cetosulfona (1 eq) en MeOH se añade NaBH₄ sólido (1 eq) en porciones. La reacción se agita a temperatura ambiente hasta que el análisis por TLC indica que el progreso de la reacción se ha completado, por lo general 30 minutos. Se extingue cuidadosamente con NH₄Cl (aq) y después se diluye con EtOAc. Las capas se separan, y la fase acuosa se extrae con EtOAc (2x). Las capas orgánicas combinadas se secan sobre MgSO₄, se filtran y se concentran para proporcionar hidroxisulfona en bruto, que puede purificarse o bien por cromatografía en gel de sílice (eluyendolo con EtOAc en hexanos) o por cristalización (EtOAc/hexano).
- 10 **[0240]** Compuestos preparados utilizando este método:

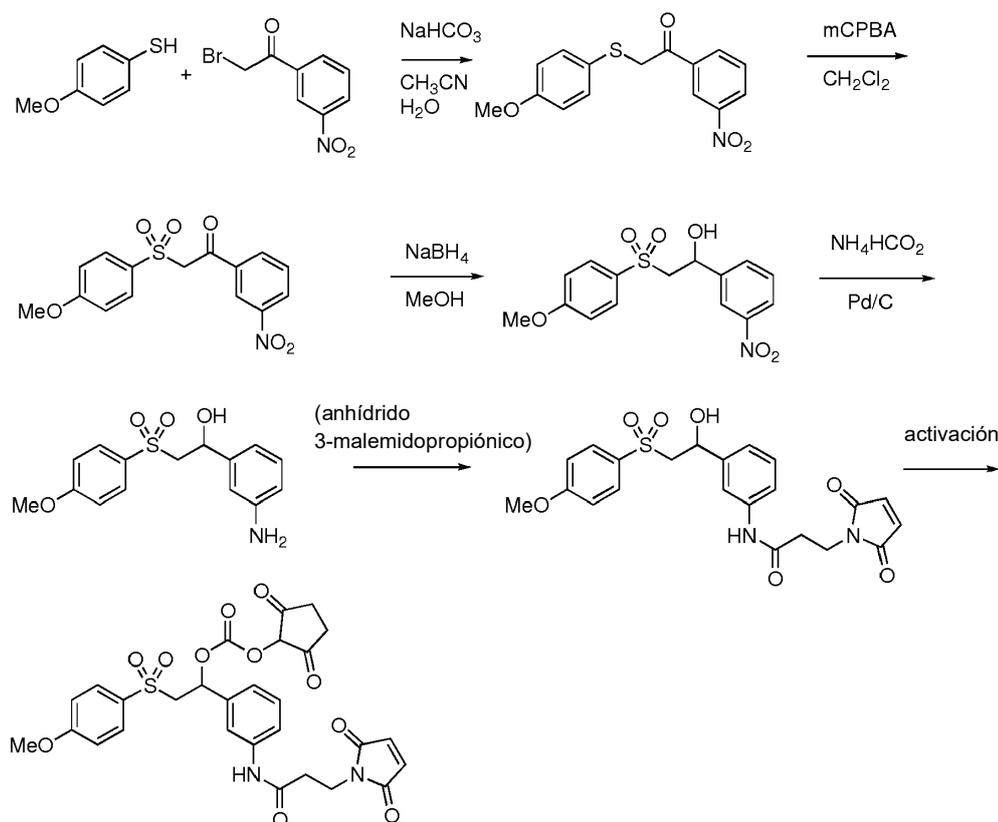


[0241] El reemplazo de la bromoacetofenona con una bromoacetona alifática apropiada permite la preparación de enlaces con los segmentos alifáticos correspondientes

15 Ejemplo 34

Preparación de un Enlace de Sulfona Bifuncional

[0242]



[0243] Etapa 1. Se añadió 4-metoxiofenol (615 μL) a una mezcla de 2-bromo-3'-nitroacetofenona (1,22 g) en 10 mL de 1:1 acetonitrilo/agua con bicarbonato de sodio (0,84 g). Después de 1 hora, la mezcla resultante se diluyó con agua y se extrajo con acetato de etilo. El extracto se secó con MgSO_4 , se filtró y se evaporó hasta obtener un aceite naranja, que se cristalizó tras añadir 3:1 hexano/acetato de etilo. Los cristales naranjas se recogieron y se secaron para proporcionar el beta-cetosulfuro, 1,1 g.

[0244] Etapa 2. Se añadió ácido 3-cloroperoxibenzoico húmedo (2,0 g, ~50 %) cuidadosamente en pequeñas porciones a una solución de cetosulfuro (670 mg) en 10 mL de diclorometano. La mezcla se calentó. Después de agitarla durante 2 horas, la suspensión se diluyó con acetato de etilo y se lavó cuidadosamente con NaHCO_3 sat., y salmuera, luego se secó con MgSO_4 , se filtró y se evaporó para obtener 630 mg de cetosulfona sólida, que se cristalizó a partir de acetato de etilo.

[0245] Etapa 3. Se añadió bohidruro de sodio (100 mg) a una suspensión de cetosulfona (400 mg) en 5 mL de metanol. Después de 30 minutos, se añadió NH_4Cl sat. ac. y la mezcla se concentró. El residuo se repartió entre acetato de etilo y agua, luego la fase orgánica se lavó con salmuera, se secó con MgSO_4 , se filtró y se evaporó para obtener el producto en bruto, que se cristalizó a partir de acetato de etilo/hexano para obtener 360 mg del nitroalcohol.

[0246] Etapa 4. Se añadió formato de amonio sólido (200 mg) a una mezcla del nitroalcohol (217 mg) y paladio al 10 % sobre carbono (50 mg) en 5 mL de metanol. La mezcla se agitó enérgicamente durante 1 hora, después se añadieron 50 mg adicionales de catalizador. Después de 30 minutos adicionales, la mezcla se filtró y se evaporó. El residuo se disolvió en acetato de etilo y se lavó cuidadosamente con NaHCO_3 sat., agua y salmuera, y luego se secó con MgSO_4 , se filtró a través de un tapón de gel de sílice, y se evaporó para obtener 180 mg del aminoalcohol como un cristal transparente.

[0247] Etapa 5. El aminoalcohol puede acilarse en la amina para proporcionar un medio más fácil de fijación al portador macromolecular, utilizando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, una solución del aminoalcohol puede someterse a reacción con anhídrido de ácido 3-maleimidopropiónico tal como se describe para los 2-aminofluorenos (Tsubery, H., et al., J. Biological Chem. (2004) 279:38118-38124). De forma alternativa, el aminoalcohol puede acilarse en la amina utilizando un derivado de azida de ácido, por ejemplo cloruro de 6-azidohexanoilo o anhídrido 6-azidohexanoico. De forma alternativa, el aminoalcohol puede acilarse en la amina utilizando un derivado de alquil-ácido, por ejemplo cloruro de 5-hexinoilo o anhídrido 5-hexinoico.

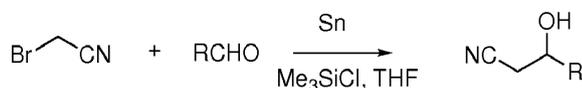
[0248] Etapa 6. El aminoalcohol acilado se activa para la fijación del fármaco como el N-hidroxisuccinimil carbonato, utilizando los métodos descritos anteriormente o conocidos en la técnica.

Ejemplo 35Procedimiento General para la Preparación de Enlaces de Nitrilo

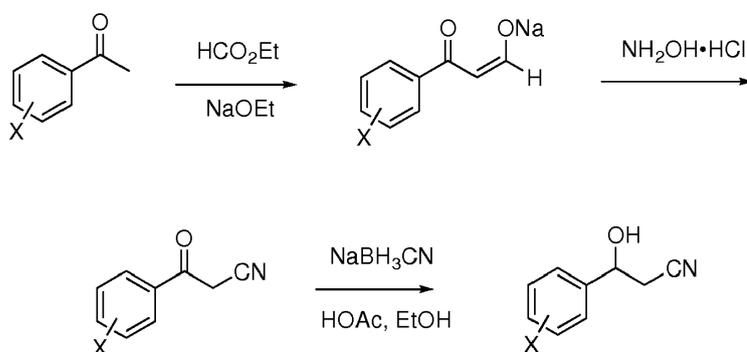
(Dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas del método como material de partida)

[0249]

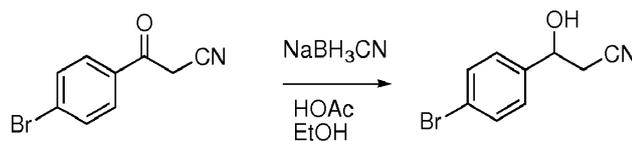
5

**[0250]** En un método, los enlaces de nitrilo pueden prepararse según la reacción mediada por estaño del bromoacetnitrilo con aldehídos según el método de Sun and Shi, J. Chem. Research (S) (1999), 318-319.**[0251]** En otro método, los enlaces de nitrilo pueden prepararse mediante la reducción de beta-cetonitrilos, que a su vez pueden prepararse a partir de cetonas por reacción de un enolato de beta-cetoaldeído con clorhidrato de hidroxilamina.

10

**[0252]** Por ejemplo, la preparación de benzoilacetnitrilo se proporciona en el documento de patente de EE.UU. N.º 6,861,162.Ejemplo 3615 Preparación de 3-(4-bromofenil)-3-hidroxiopropanonitrilo

(Dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas del método como material de partida)

[0253]

20

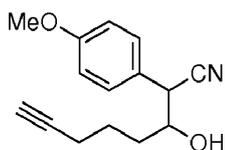
[0254] Una suspensión de 4-bromobenzoilacetnitrilo (500 mg) en etanol (5 mL) y ácido acético (300 µL) se calentó con cianoborohidruro de sodio (280 mg) utilizando una placa calentadora a 80 °C durante 2 horas. Tras enfriarlo a temperatura ambiente, la mezcla se diluyó con agua y se concentró a un jarabe, que se diluyó con acetato de etilo y se lavó con agua, NaHCO₃ sat., y salmuera. El extracto se secó con MgSO₄, se filtró y se evaporó para proporcionar 510 mg de un aceite turbio, que se filtró a través de gel de sílice utilizando 1:1 acetato de etilo/hexano para proporcionar el producto (496 mg) como un aceite espeso.

25

Ejemplo 37

(Dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas del método como material de partida)

[0255]

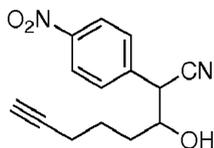


- [0256]** Bajo la protección de N_2 , se añadió n-butil-litio (1,8 mL, 5,2 mmol) a una solución de N,N-diisopropilamina (0,75 mL, 5,2 mmol) en tetrahidrofurano (THF) anhidro (10 mL) a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó durante 30 minutos y después se enfrió hasta -78 °C. Se añadió 2-(4-metoxifenil)acetonitrilo (0,6 mL, 4,34 mmol) a la mezcla anterior mediante una jeringa. Tras agitarlo a la misma temperatura durante 30 minutos, se añadió una solución de 5-hexinal (ca. 4 mmol) al matraz con una jeringa y la mezcla de reacción se agitó a -78 °C durante 1,5 horas. La reacción se extinguió por adición de una solución saturada de NH_4Cl , y luego se calentó hasta llegar a temperatura ambiente. La mezcla se extrajo con EtOAc (3x 30 mL), y la solución orgánica combinada se secó sobre $MgSO_4$ y se concentró bajo presión reducida. El producto se purificó por cromatografía sobre gel de sílice.
- 10 RMN de 1H ($CDCl_3$): δ 7,18 (d, 2H, J = 5,4 Hz), 6,83 (d, 2H, J = 5,4 Hz), 3,72-3,76 (s+m, 5H), 2,47 (1H, s), 2,13 (m, 2H), 1,88 (t, 1H), 1,51-1,68 (m, 4H).

Ejemplo 38

(Dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas del método como material de partida)

[0257]



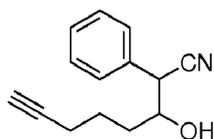
15

- [0258]** El producto se preparó según el método del Ejemplo 33, sustituyendo 2-(4-nitrofenil)acetonitrilo en lugar de 2-(4-metoxifenil)acetonitrilo. RMN de 1H ($CDCl_3$): δ 8,20 (d, 2H, J = 5,6 Hz), 7,51 (d, 2H, J = 5,6 Hz), 3,99 (m, 2H), 2,17 (m, 2H), 1,89 (br s, 1H), 1,65 (m, 2H), 1,55 (m, 2H).

Ejemplo 39

- 20 (Dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas del método como material de partida)

[0259]



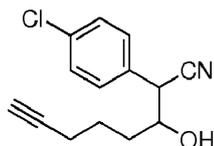
25

- [0260]** Este producto se preparó según el método del Ejemplo 37, sustituyendo 2-fenilacetonitrilo en lugar de 2-(4-metoxifenil)acetonitrilo. RMN de 1H ($CDCl_3$): δ 7,3 (m, 5H), 3,9 (m, 2H), 2,23 (m, 2H), 1,96 (br s, 1H), 1,77 (m, 2H), 1,60 (m, 2H).

Ejemplo 40

(Dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas del método como material de partida)

[0261]



30

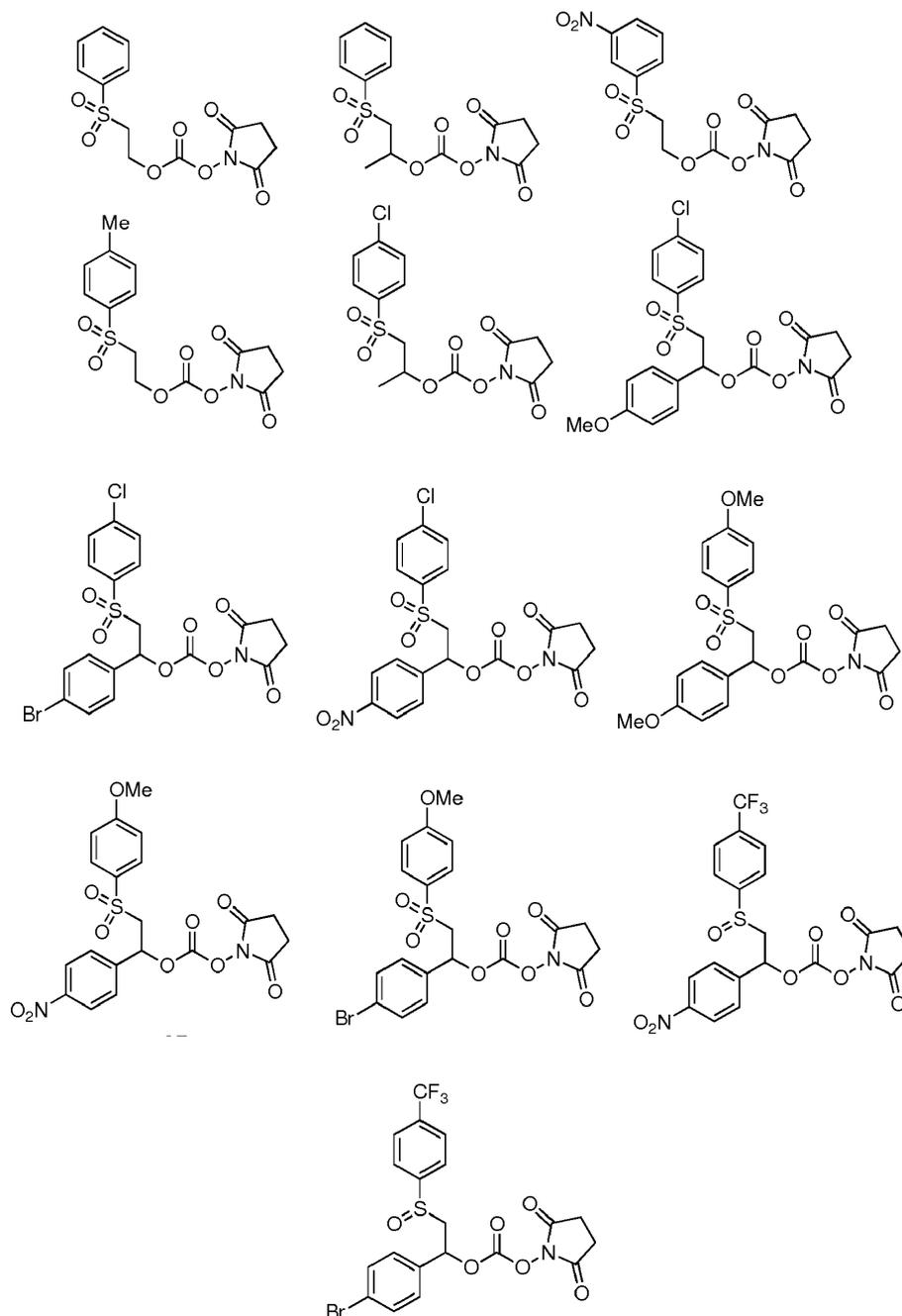
- [0262]** Este producto se preparó según el método del Ejemplo 37, sustituyendo 2-(4-clorofenil)-acetonitrilo en lugar de 2-(4-metoxifenil)acetonitrilo. RMN de 1H ($CDCl_3$): δ 7,2-7,3 (m, 4H), 3,8 (m, 2H), 2,23 (m, 2H), 1,96 (br s, 1H), 1,8-1,5 (m, 4H).

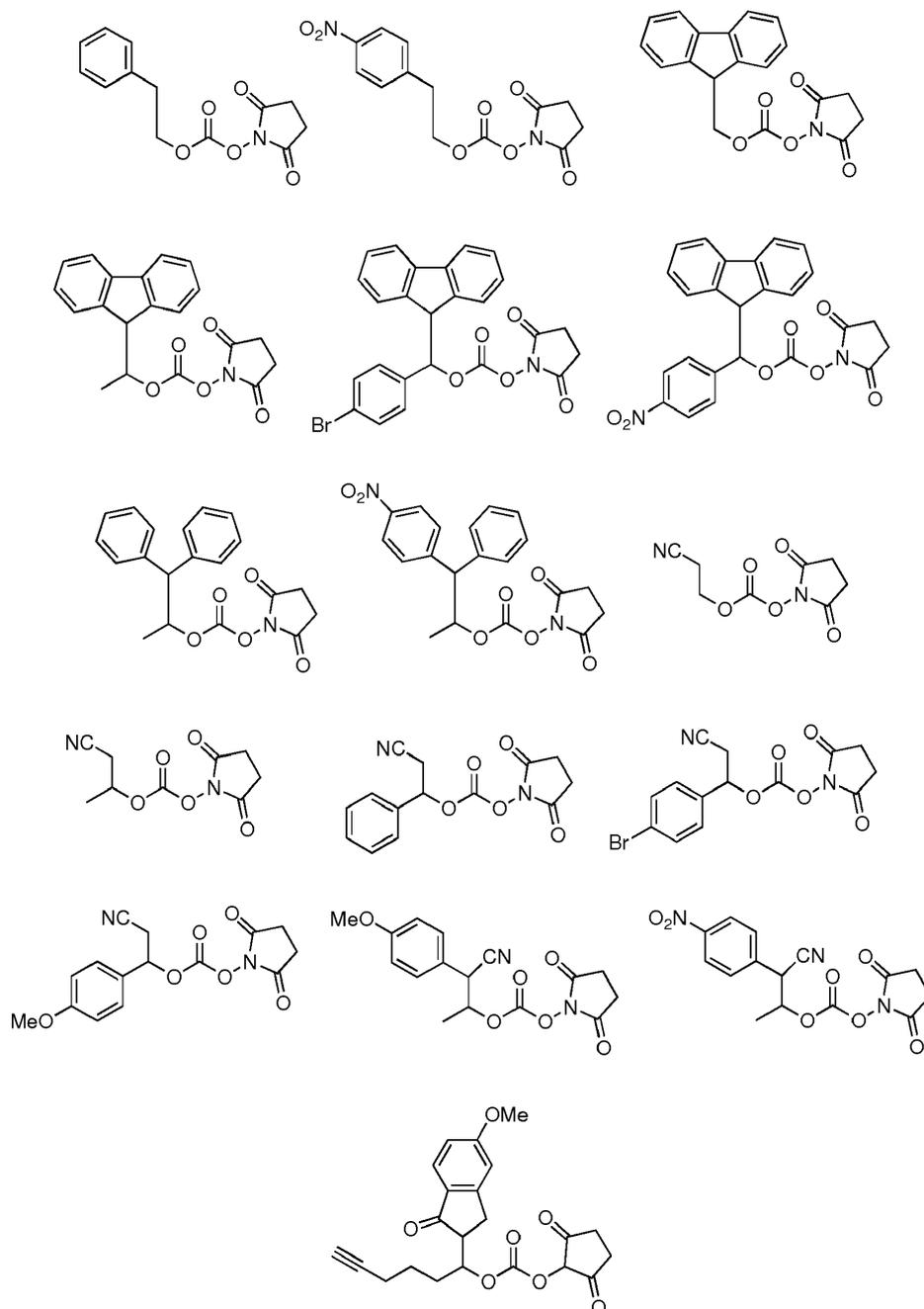
Ejemplo 41

Procedimiento general para la activación mediante la utilización de Carbonato de N,N'-disuccinimidilo

[0263] Una mezcla del compuesto preparada como en el Ejemplo 33 (1 mmol), carbonato de N,N'-disuccinimidilo, y 4-(dimetilamino)piridina (0,1 mmol) en 2 mL de acetonitrilo seco se agita durante 1 hora (para alcoholes primarios) o durante 16 horas (para alcoholes secundarios), luego se diluye con 5 mL de agua que contiene 0,2 mL de 1 N HCl y se extrae con acetato de etilo. La fase orgánica se lava con agua y salmuera, luego se seca sobre MgSO₄, se filtra y se concentra para proporcionar el carbonato mezclado en bruto, adecuado para un uso adicional. El carbonato mezclado se purifica opcionalmente de manera adicional por cromatografía en gel de sílice utilizando acetato de etilo/hexano.

[0264] Los compuestos preparados de acuerdo con este método incluyen:



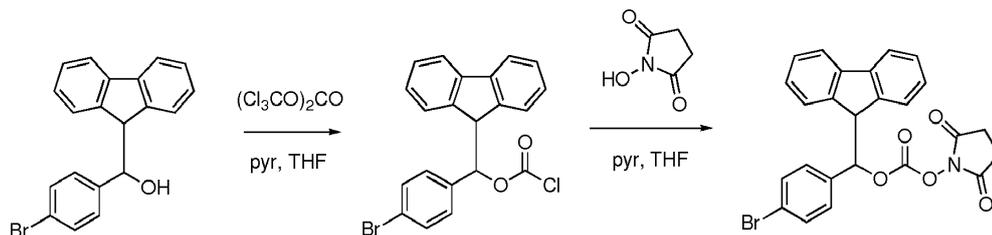


5

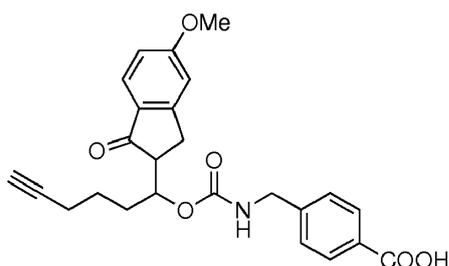
Ejemplo 42Procedimiento general para la activación mediante la utilización de trifosgeno y N-Hidroxisuccinimida

- 10 **[0265]** Una solución de un alcohol de la fórmula (1) (0,5 mmol) y trifosgeno (0,72 mmol) en 5 mL de tetrahidrofurano (THF) anhidro se agita bajo una atmósfera inerte, y se añade piridina (84 μ L) gota a gota para obtener un precipitado de color blanco. Después de 10 minutos, la mezcla se filtra utilizando presión de nitrógeno y se concentró para retirar el exceso de fosgeno. El residuo se vuelve a disolver en 5 mL de THF y se trata con H-hidroxisuccinimida (3,65 mmol) y piridina (130 μ L) durante 20 minutos, después se evapora hasta sequedad. El residuo se disuelve en acetato de etilo, se lava de manera sucesiva con agua, 0,1 N HCl, NaHCO₃ sat., y salmuera, luego se seca sobre MgSO₄, se filtra y se evapora para proporcionar el carbonato en bruto. La purificación por cromatografía sobre gel de sílice (acetato de etilo/hexano) produce el producto.
- 15

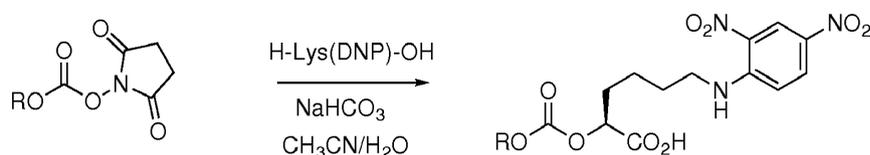
Ejemplo 43Activación de (4-bromofenil)-(9-fluorenil)metanol utilizando trifosgeno y N-hidroxisuccinimida

[0266]

[0267] Una solución de (4-bromofenilo)-(9-fluorenil)metanol (175 mg, 0,5 mmol) y trifosgeno (212 mg, 0,72 mmol) en 5 mL de THF anhidro se trató con piridina (84 μ L) durante 10 minutos bajo una superficie inerte, luego se filtró y se evaporó. El residuo se disolvió en 5 ml de THF y se trató con N-hidroxisuccinimida (310 mg, 2,65 mmol) y piridina (130 μ L) durante 209 minutos, luego se evaporó hasta sequedad. El residuo se disolvió en acetato de etilo, se lavó de manera sucesiva con agua, 0,1 N HCl, NaHCO_3 sat, y salmuera, luego se secó sobre MgSO_4 , se filtró y se evaporó para obtener el carbonato en bruto. El producto en bruto se disolvió en 1 mL de diclorometano y se cargó en una columna de 5-mL de gel de sílice equilibrada en hexano. La elución inicial utilizando hexano eliminó un poco de material coloreado. La columna se eluyó después con 3:1 hexano/acetato de etilo, y finalmente 1:1 hexano/acetato de etilo que eluyó el producto purificado (206 mg, 92 %)

Ejemplo 44**[0268]**

[0269] El carbonato mezclado en bruto del Ejemplo se disolvió en DMSO (0,5 mL) y se mezcló con 4-(aminometil)benzonato de sodio (0,1 mL de una solución de 1,0 M en agua). Después de 5 minutos, la mezcla se diluyó con 5 mL de agua, y la solución lechosa se lavó tres veces con diclorometano. La fase acuosa se acidificó utilizando 1 N HCl, luego se extrajo tres veces con acetato de etilo. Los extractos de acetato de etilo se combinaron, se lavaron con agua, se secaron sobre MgSO_4 , se filtraron y se evaporaron hasta sequedad. El residuo se lavó una vez con 1:1 EtOAc/hexanos, luego se disolvió en EtOAc y se volvió a concentrar para obtener el producto purificado (7 mg).

Ejemplo 45Método general para la preparación de derivados de N_ϵ -2,4-dinitrofenil)L-lisina**[0270]**

25

[0271] Una solución de clorhidrato de N_ϵ -(2,4-dinitrofenil)-L-lisina (35 mg) en 600 μ L de agua y 200 μ L de 1,0 N NaOH se trata de manera sucesiva con 200 μ L de 1,0 M NaHCO_3 y una solución de 0,1 mmol del carbonato de N-hidroxisuccinimida en 1,0 mL de acetonitrilo. La solución resultante de color amarilla se agita a temperatura ambiente durante 1 hora, luego se diluye por adición de 10 mL de agua y se carga sobre una columna de extracción en fase sólida C18 (Varian, Bond Elut, 1g). La columna se lava con 3 mL de agua, 1 mL de 1 % $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$ en agua, 3 mL de agua, luego 3 mL de metanol acuoso al 50 % para eluir cualquier análogo de lisina no reactado. El producto se eluye con metanol al 100 %, y la solución de color amarillo se evapora hasta sequedad.

30

Ejemplo 46

Método general para medir las velocidades a las que el fármaco se libera de los compuestos de fórmula (2)

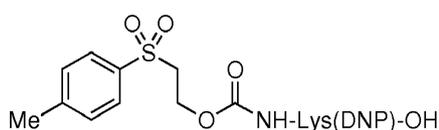
[0272] Este ilustra un ejemplo de un método para medir la velocidad a la que se libera un fármaco de un compuesto de fórmula (2). Las soluciones madre del compuesto de fórmula (2) se preparan disolviendo el compuesto en un solvente adecuado miscible en agua, por ejemplo DMSO o acetonitrilo. Un volumen adecuado de esta solución madre se diluye después en tampón acuoso que contiene opcionalmente un patrón interno para un análisis por HPLC, por ejemplo un benzoato de sodio, para obtener una solución transparente, que se mantiene a una temperatura fija. Los compuestos poco solubles pueden necesitar la adición de un cosolvente como DMSO. Las alícuotas se eliminan periódicamente y o bien se analizan inmediatamente por HPLC o se extinguen por adición de un volumen igual de ácido trifluoroacético (TFA) AL 1 % en acetonitrilo y se almacena para un posterior análisis. Una parte de la alícuota se inyecta en una columna de HPLC para su análisis. Las áreas de los picos para el compuesto restante de fórmula (2) y, si es posible, el propio fármaco, se miden después y se comparan al área del pico del patrón interno. En determinados casos, por ejemplo al utilizar fármacos que no tienen una absorbancia de luz ultravioleta lo suficientemente fuerte para ser detectada por HPLC, la concentración de fármaco libre puede medirse mediante un análisis espectral de masas.

[0273] Como un ejemplo, las velocidades de liberación de N ϵ -(2,4-dinitrofenil)-L-lisina, «H-Lys(DNP)-OH», de varios compuestos se determinan de la siguiente manera. Se prepararon mezclas de reacción que contenían tampón de 0,1 M, 0,05 % NaN₃, y aproximadamente 0,1 mg/mL del compuesto de partida, y se mantuvieron a 37 °C. Se eliminaron las alícuotas periódicamente y se analizaron mediante inyección en una columna de HPLC con inversión de fase Varian Polaris C18-A de 3 μ m (150 x 4,6 mm), equilibrada en 50:50 agua/metanol (cada uno conteniendo ácido acético al 0,5 %) a un caudal de 0,8 mL/min. Los compuestos se eluyeron de la columna mediante la utilización de un gradiente de metanol al 100 % + ácido acético al 0,5 % y se detectaron mediante absorbancia a 350 nm. La integración de los picos dejó áreas para el resto del material de partida (A_S) y para H-Lys(DNP)-OH (A_P) liberados y el porcentaje de la reacción se calculó según

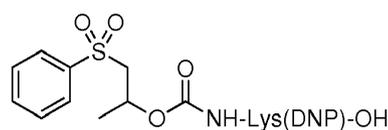
$$\% \text{ reacción} = A_P / (A_P + A_S) * 100$$

[0274] Las velocidades de liberación se calcularon después a partir de la pendiente de un diagrama de ln(100 - % reacción) frente al tiempo, y las semividas se calcularon como T_{1/2} = ln(2)/velocidad.

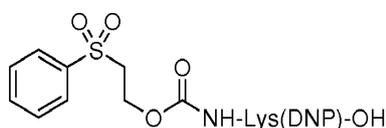
[0275] Las semividas para la liberación de N ϵ -(2,4-dinitrofenil)-L-lisina (H-Lys(DNP)-OH) como modelo para la liberación de fármacos se determinó en PBS, pH 7.4, a 37 °C para los siguientes compuestos con los resultados tal como se muestran. Es evidente que la naturaleza de R¹ y R² y los sustituyentes de este proporcionan una amplia variedad de velocidades de liberación.



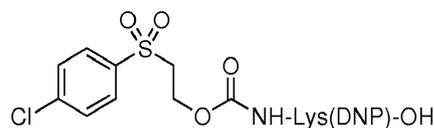
$$T_{1/2} = 56 \text{ hrs}$$



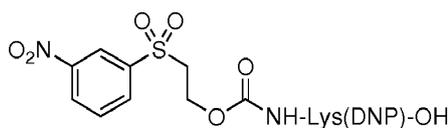
$$T_{1/2} = 72 \text{ hrs}$$



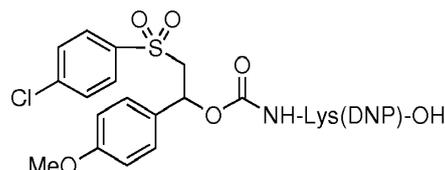
$$T_{1/2} = 30 \text{ hrs}$$



$$T_{1/2} = 46 \text{ hrs}$$

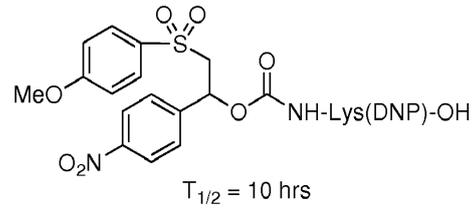
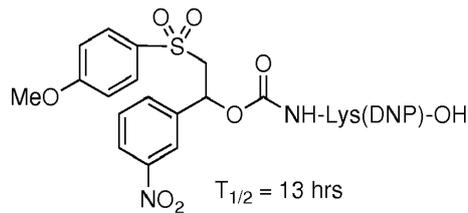
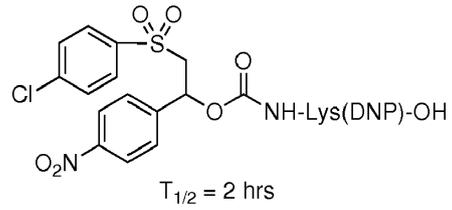
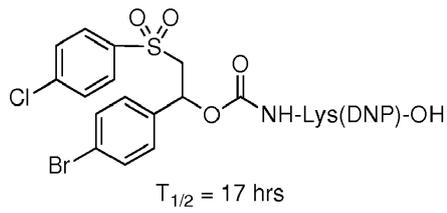


$$T_{1/2} = 2 \text{ hrs}$$

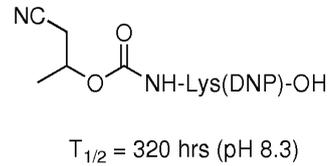
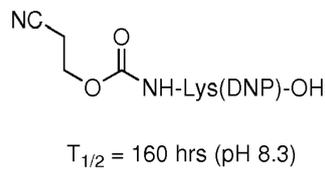


$$T_{1/2} = 18 \text{ hrs}$$

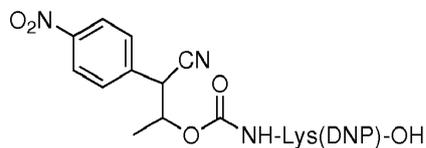
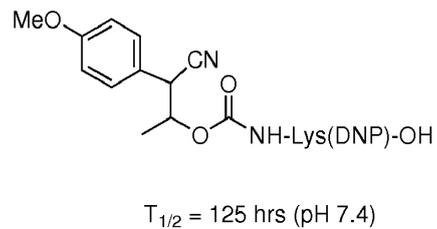
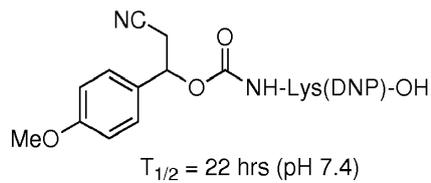
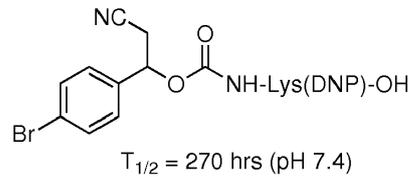
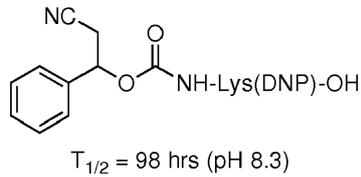
ES 2 672 526 T3



[0276] Las semividas para la liberación de Nε-(2,4-dinitrofenil)-L-lisina (H-Lys(DNP)-OH) de los enlaces de sulfonilo en PBS, pH 7.4, a 37 °C.



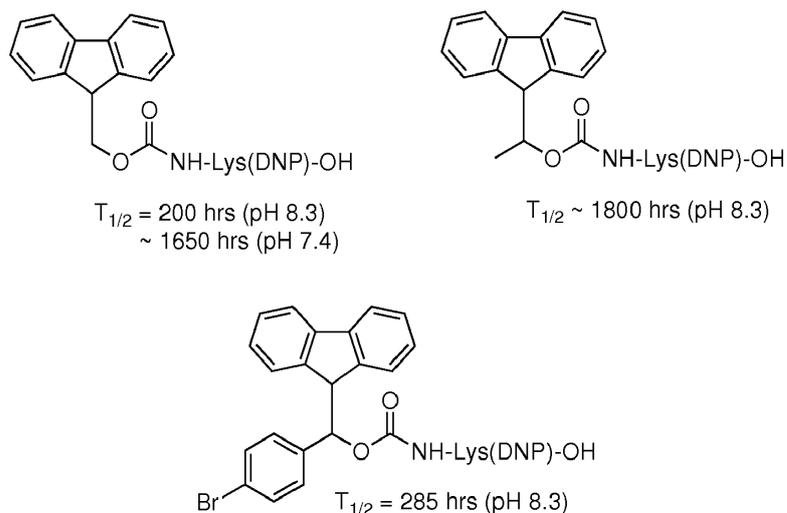
5



$T_{1/2} \sim 80$ hrs (bifásico; pH 7.4)

[0277] Las semividas para la liberación de Nε-(2,4-dinitrofenil)-L-lisina (H-Lys(DNP)-OH) de los enlaces de nitrilo en PBS, pH 7.4, o en 0,1 M Tris•HCl, pH 8.3, 37 °C.

10



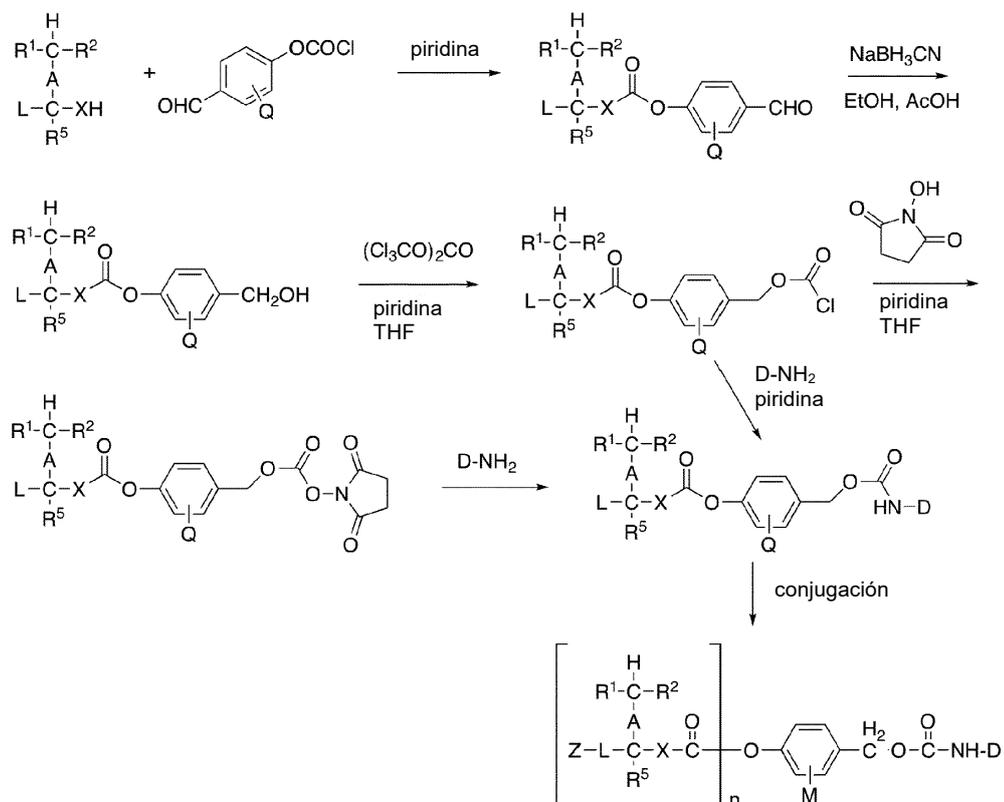
[0278] Las semividas para la liberación de Nε-(2,4-dinitrofenil)-L-lisina (H-Lys(DNP)-OH) de los enlaces de fluorenilo en PBS, pH 7.4, o en 0,1 M Tris•HCl, pH 8.3, 37 °C.

5 **Ejemplo 47**

Preparación de profármacos con 4-Hidroxibenzilo enlazado

(Dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas cuando n = 1)

[0279]



10 **[0280]** Etapa 1. Se añade piridina (1,5 mmol) a una mezcla del enlace (1,0 mmol) y al cloroformiato de 4-formifenil (1,2 mmol) en tetrahidrofurano seco, y la reacción se monitoriza mediante una cromatografía en capa fina. Al concluir, la mezcla se diluye con acetato de etilo, se lava con agua y salmuera, se seca y se concentra. El producto de aldeído en bruto se purifica por cromatografía sobre gel de sílice.

[0281] Etapa 2. Se añade cianoborohidruro de sodio (2 mmol) a la mezcla de aldehído de la Etapa 1 (1 mmol) en ácido acético al 5 % y etanol (2 mL). La mezcla se calienta hasta ~75 °C durante 2 horas, luego se deja enfriar y se concentra. El residuo se disuelve en acetato de etilo, se lava con agua y salmuera, luego se seca y se evapora para proporcionar el alcohol bencílico en bruto, que se purifica por cromatografía sobre gel de sílice.

5 **[0282]** Etapa 3. Se añade piridina (2 mmol) gota a gota a una mezcla del alcohol bencílico de la Etapa 2 (1 mmol) y trifosgeno (3 mmol) en tetrahidrofurano seco. Después de agitarla durante 1 hora, la mezcla se filtra y se evapora hasta sequedad para proporcionar el cloroformiato en bruto, que se utiliza sin una purificación adicional.

10 **[0283]** Etapa 4. Se añade piridina (2 mmol) a una mezcla del cloroformiato en bruto de la Etapa 3 y N-hidroxisuccinimida (5 mmol). Después de agitarlo durante 30 minutos, la mezcla se filtra y se concentra. El residuo se disuelve en acetato de etilo, se lava con agua y salmuera, después se seca y se evapora para obtener el carbonato de succinimidilo en bruto, que se purifica por cromatografía sobre gel de sílice.

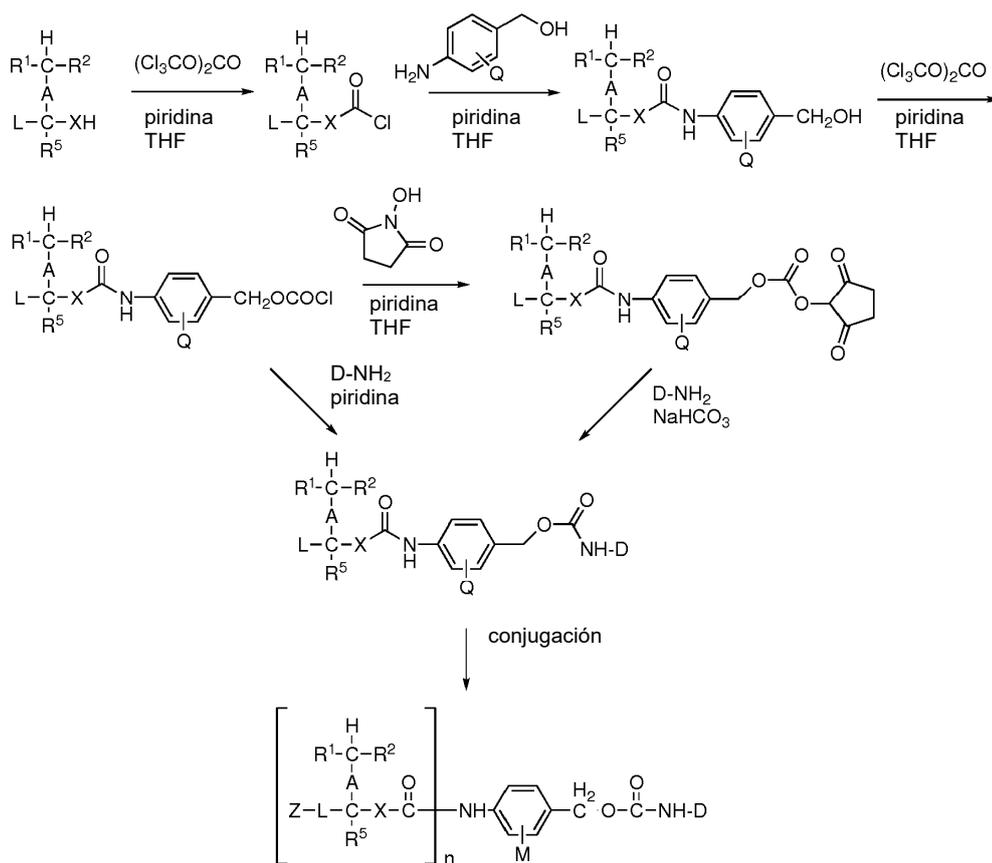
15 **[0284]** Etapa 5. Se añade una solución del carbonato de succinimidilo de la Etapa 4 en acetonitrilo (1 equivalente) a una solución del fármaco que contiene amino en 0,1 M NaHCO₃. Después de 1 hora, la mezcla se diluye con agua y se carga en un cartucho de extracción en fase sólida C18, El cartucho se lava con agua, luego se eluye con un gradiente por etapas de agua y acetonitrilo. Las fracciones que contienen el producto se reúnen y se evaporan hasta sequedad, y se purifican opcionalmente de manera adicional utilizando HPLC preparativa.

Ejemplo 48

Preparación de profármacos con 4-Aminobencilo enlazado

(Dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas cuando n = 1)

20 **[0285]**



[0286] Etapa 1. Se añade piridina (1,5 mmol) a una mezcla del enlace (1,0 mmol) y trifosgeno (3 mmol) en tetrahidrofurano seco. Tras agitar durante 1 hora, la mezcla se filtra y se evapora hasta sequedad para obtener el cloroformiato en bruto, que se utiliza sin una purificación adicional.

25 **[0287]** Etapa 2. Una mezcla del cloroformiato en bruto de la Etapa 1, el alcohol 4-aminobencílico (1 mmol), y piridina (2 mmol) en tetrahidrofurano seco (5 mL) se agita a temperatura ambiente. Cuando se haya completado,

la mezcla se evapora, y el residuo se disuelve en acetato de etilo y se lava con agua y salmuera, luego se seca y se evapora para obtener el carbamato en bruto, que se purifica por cromatografía sobre gel de sílice.

5 **[0288]** Etapa 3. Se añade piridina (2 mmol) gota a gota a una mezcla del carbamato de la Etapa 2 (1 mmol) y trifosgeno (3 mmol) en tetrahidrofurano seco. Después de agitar durante 1 hora, la mezcla se filtra y se evapora a sequedad para obtener el cloroformiato en bruto, que se utiliza sin una purificación adicional.

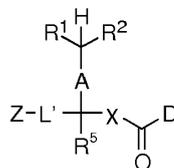
[0289] Etapa 4. Se añade piridina (2 mmol) a una mezcla del cloroformiato en bruto de la Etapa 3 y N-hidroxisuccinimida (5 mmol). Después de agitarlo durante 30 minutos, la mezcla se filtra y se concentra. El residuo se disuelve en acetato de etilo, se lava con agua y salmuera, luego se seca y se evapora para obtener el carbonato de succinimidilo en bruto, que se purifica por cromatografía sobre gel de sílice.

10 **[0290]** Etapa 5. Una solución del carbonato de succinimidilo de la Etapa 4 en acetonitrilo (1 equivalente) se añade a una solución del fármaco que contiene amina en 0,1 M NaHCO₃. Después de 1 hora, la mezcla se diluye con agua y se carga en un cartucho de extracción en fase sólida C18, el cartucho se lava con agua, luego se eluye con un gradiente por etapas de agua y acetonitrilo. Las fracciones que contienen el producto se reúnen y se evaporan a sequedad, y se purifican opcionalmente de manera adicional utilizando HPCL preparativa.

15

REIVINDICACIONES

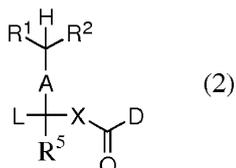
1. Un compuesto de la fórmula



(3)

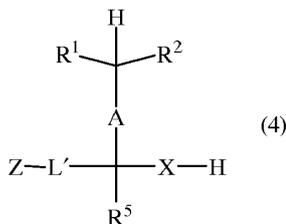
- 5 donde Z es el residuo de una macromolécula;
 L' es el residuo de un enlace;
 D es el residuo de un fármaco;
 X es O o S;
 A es alquenileno (C₂), arilo o está ausente;
 cada R¹ y R² es independientemente H; CH;
- 10 NO₂;
 arilo opcionalmente sustituido;
 heteroarilo opcionalmente sustituido;
 alquenilo opcionalmente sustituido;
 alquinilo opcionalmente sustituido; o
- 15 cada R¹ y R² es independientemente COR³ o SOR³ o SO₂R³ donde
 R³ es H o alquilo opcionalmente sustituido;
 arilo opcionalmente sustituido;
 heteroarilo opcionalmente sustituido;
 alquenilo opcionalmente sustituido;
 alquinilo opcionalmente sustituido; o
- 20 OR o NR₂ donde cada R es independientemente H o alquilo opcionalmente sustituido; o
 cada R¹ y R² es independientemente SR⁴ donde
 R⁴ es alquilo opcionalmente sustituido;
 arilo opcionalmente sustituido;
 heteroarilo opcionalmente sustituido;
 alquenilo opcionalmente sustituido; o
 alquinilo opcionalmente sustituido;
- 25 donde los sustituyentes opcionales se seleccionan del grupo que consiste en grupos donadores de
 electrones como alquilo C₁-C₄; alcoxi C₁-C₄; alquiltio C₁-C₄; amino; alquilamino; y dialquilamino; y grupos
 30 atractores de electrones como halógeno; difluorometilo;
 trifluorometilo, nitro; ciano; C(O)R, donde R es H, alquilo C₁-C₄, alcoxi C₁-C₄ o amino; y SOR y SO₂R,
 donde R es alquilo C₁-C₄, arilo, o heteroarilo,
 donde estos varios sustituyentes opcionales pueden estar enlazados a anillos de arilo o heteroarilo,
 los cuales varios sustituyentes pueden ser iguales o diferentes;
- 35 donde R¹ y R² pueden estar unidos para formar un anillo de 3-8 miembros; y
 donde R¹ y R² no pueden ser H;
 donde R⁵ es H o alquilo (C₁₋₆).
2. El compuesto de la reivindicación 1 donde R⁵ es H.
3. El compuesto de la reivindicación 1 donde A es alquenileno o está ausente.
- 40 4. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 donde el residuo de enlace es una cadena bivalente
 presentando un peso molecular entre 14 Da y 20 kDa que puede incluir insaturación, heteroátomos,
 estructuras anulares, porciones aromáticas, y/o porciones heteroaromáticas que enlazan Z de forma
 covalente al resto de la molécula.
- 45 5. El compuesto de la reivindicación 4 donde el enlace es un péptido o un pseudopéptido y/o comprende triazol
 y/o fenileno, y/o un residuo de maleimido.

6. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-5 donde la macromolécula es un anticuerpo, un polisacárido, una albúmina, o un polímero sintético, como polietilenglicol (PEG).
7. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-6 donde el fármaco es un péptido, un ácido nucleico o una molécula pequeña.
- 5 8. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-7 donde uno de R¹ y R² es CN, o donde al menos uno de R¹ y R² comprende fenilo o fenileno, o donde uno de R¹ y R² es SO₂R³ y el otro es H, alquilo o fenilo.
9. Un compuesto de la fórmula



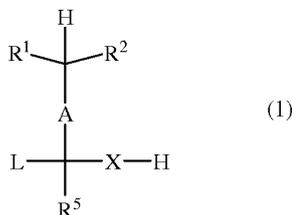
10 donde, R¹, R², R⁵, A, X y D están definidos según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, 7 u 8, y donde L es un grupo de enlace capaz de unirse a una macromolécula.

10. Un compuesto de la fórmula



donde R¹, R², R⁵, A, X, Z y L' están definidos como en la reivindicación 1, 2, 3, 4, 5, 6 u 8.

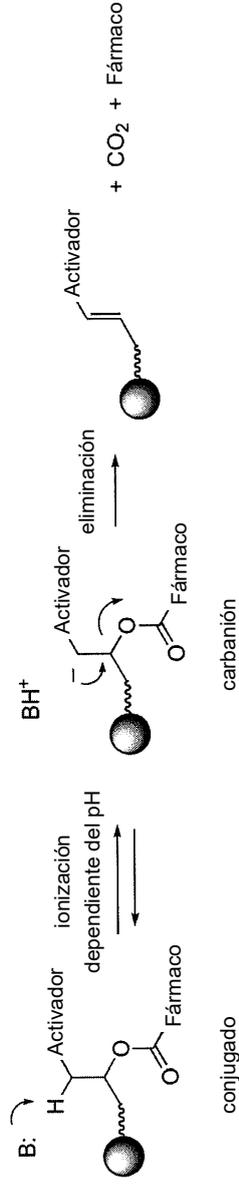
- 15 11. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-9.
12. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para su utilización como medicamento.
13. Un método para preparar un compuesto de la fórmula (3) como se define en la reivindicación 1, comprendiendo dicho método la reacción de un compuesto de la fórmula (2) como se define en la reivindicación 9 con una macromolécula, o
- 20 comprendiendo dicho método la reacción de un compuesto de la fórmula (4) como se define en la reivindicación 10 con un fármaco en condiciones por las que dicho fármaco se acopla al compuesto de la fórmula (4).
14. Un método para preparar un compuesto de la fórmula (2) como se define en la reivindicación 9, comprendiendo dicho método comprende la reacción de un compuesto de fórmula (1):



25

donde R¹, R², R⁵, A y X están definidos como en la reivindicación 1, 2, 3 u 8, y donde L es un grupo de enlace capaz de unirse a una macromolécula; con un fármaco en condiciones por las cuales dicho fármaco se acopla al compuesto de fórmula (1).

La velocidad de liberación del fármaco depende del grado de ionización en el pH fisiológico



- La velocidad de liberación del fármaco es proporcional a la fracción del conjugado ionizado al carbanión en el pH fisiológico
 § Más ionización causa una mayor velocidad de liberación del fármaco
- La fracción del conjugado que está ionizada está determinada por la acidez (pK_a) del protón adyacente al activador
 § Más ácido (menor pK_a) causa una mayor ionización
- El pK_a está determinado por la naturaleza del activador

Figura 1

Varios grupos de activación proporcionan una amplia variedad de acideces para controlar la velocidad

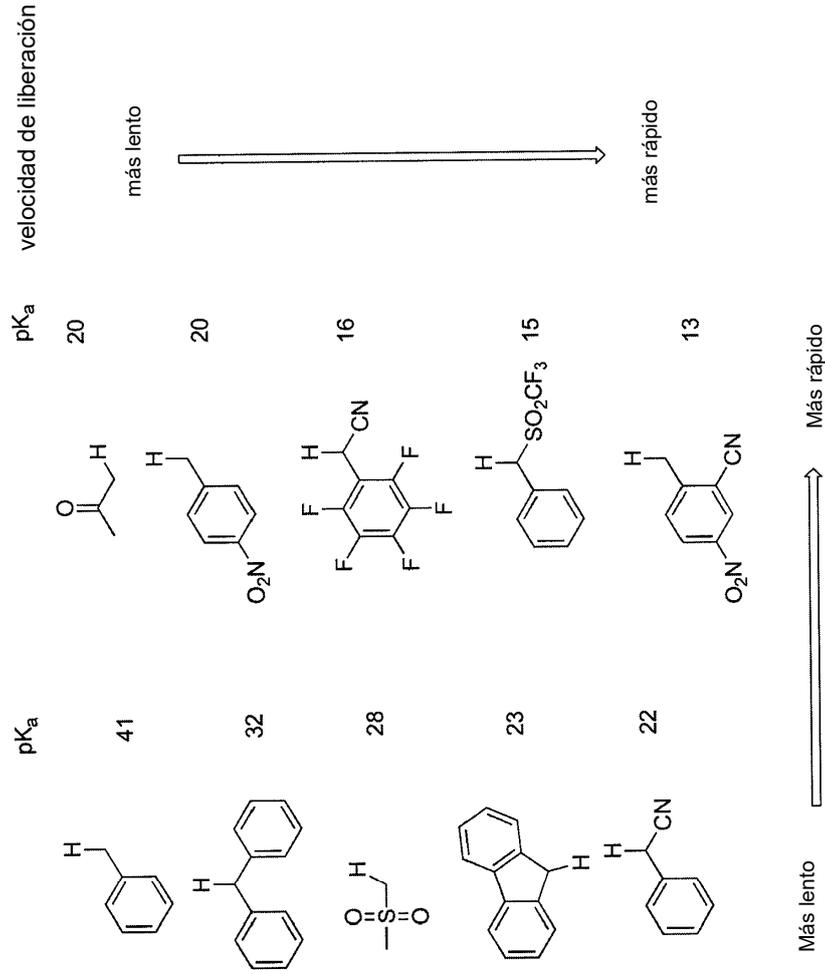


Figura 2

pKa calculado de fluorenos 2-sustituidos
(Bowden & Cockerill, *J. Chem. Soc. B* (1970)173-9).

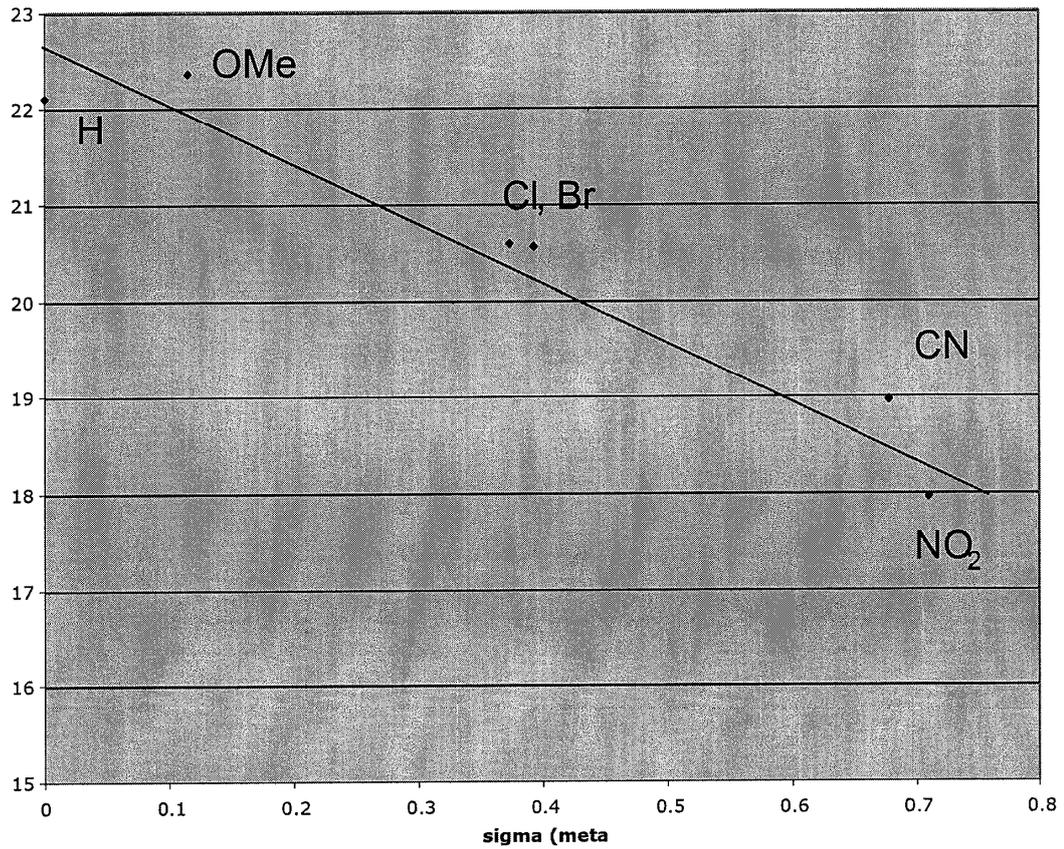


Figura 3

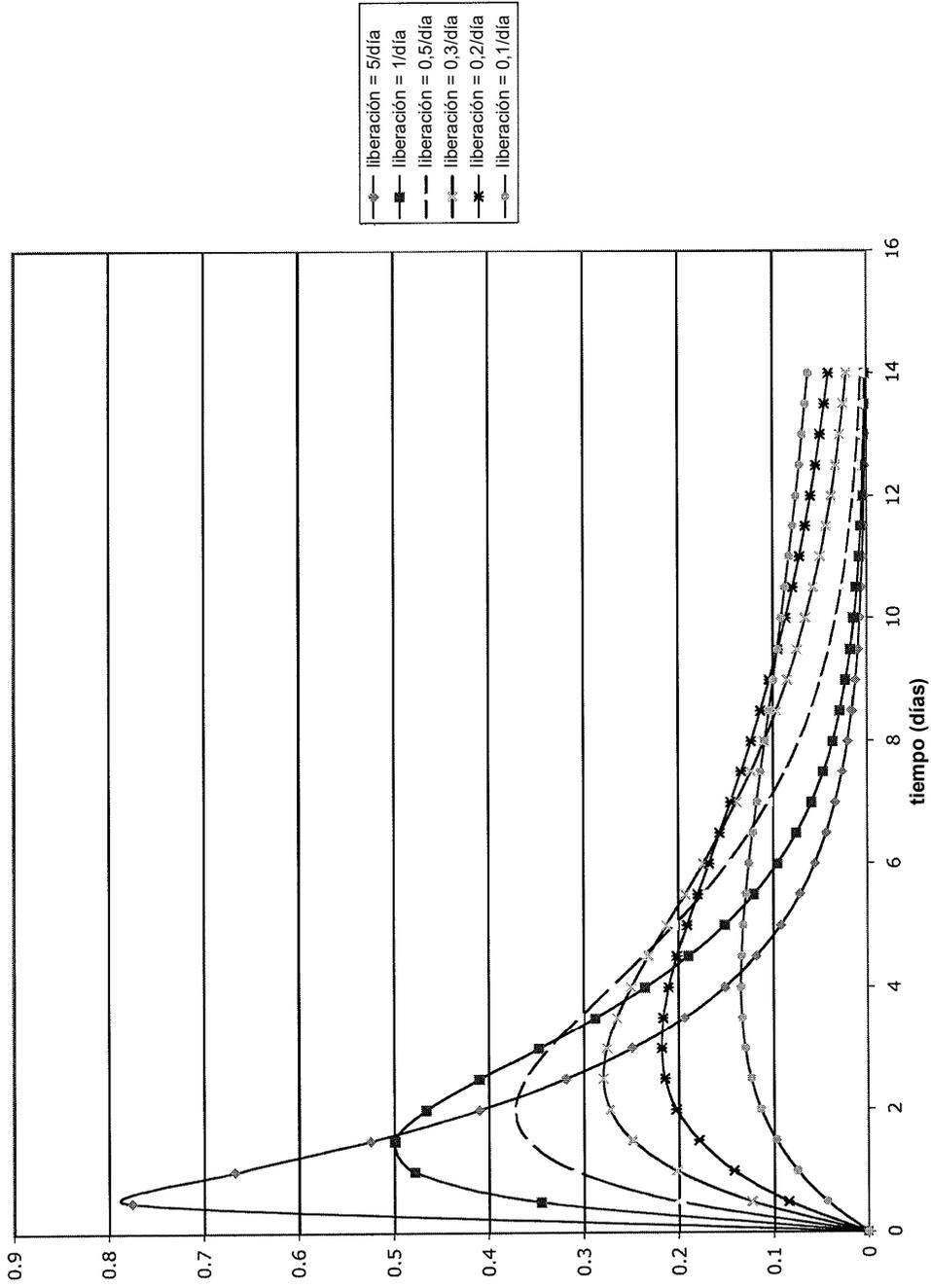


Figura 4

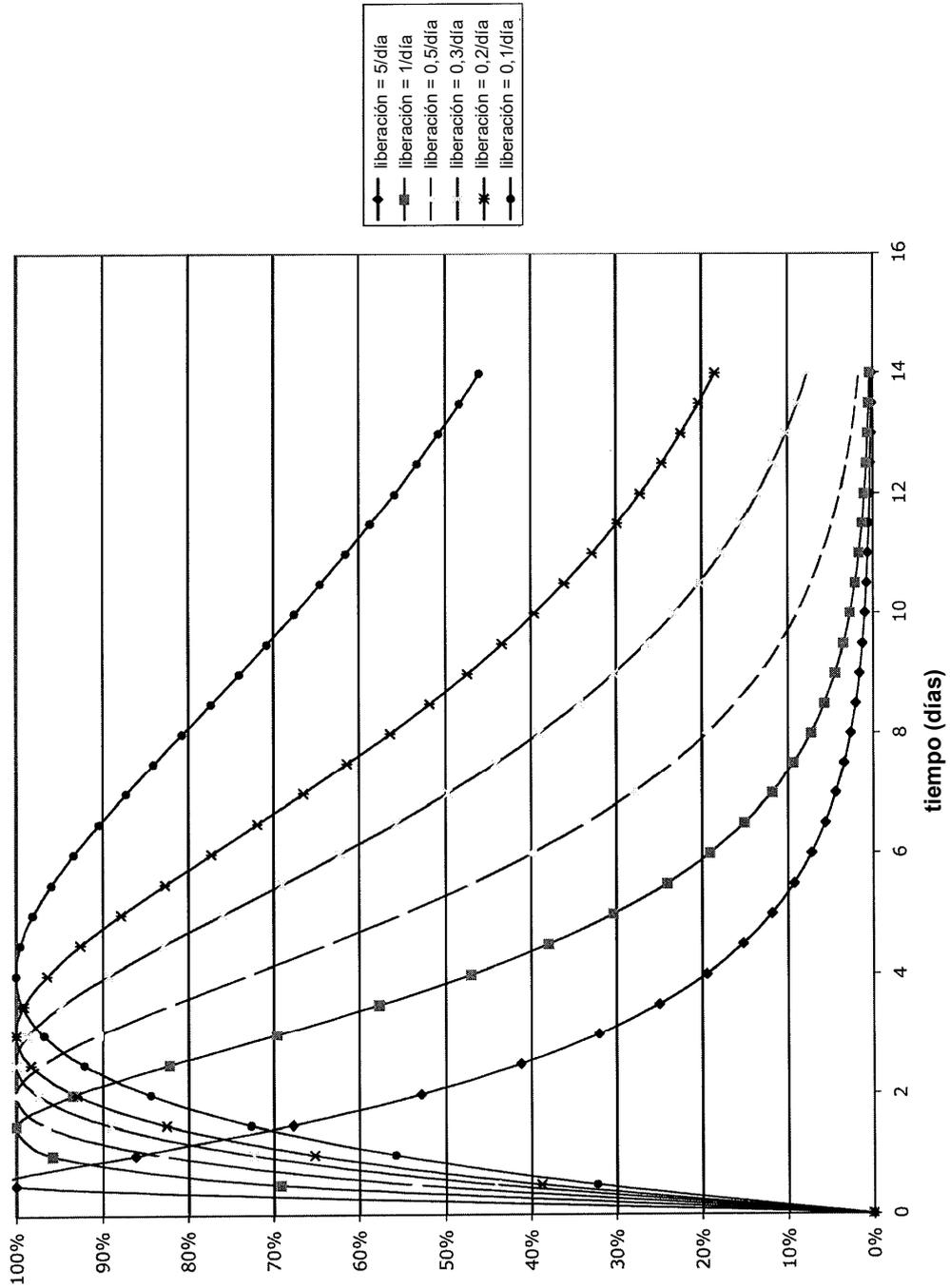


Figura 5