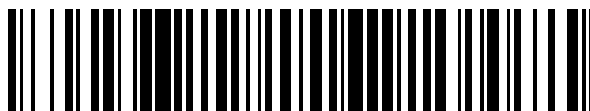


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 712 178**

51 Int. Cl.:

G01N 33/58	(2006.01)	C07F 9/50	(2006.01)
G01N 33/84	(2006.01)		
C07K 1/13	(2006.01)		
C07C 255/44	(2006.01)		
C07C 323/60	(2006.01)		
C07D 207/404	(2006.01)		
C07C 255/35	(2006.01)		
C07C 255/37	(2006.01)		
C07C 255/41	(2006.01)		
C07C 255/42	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.07.2014 PCT/EP2014/064387**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **08.01.2015 WO15001117**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.07.2014 E 14739728 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2018 EP 3017307**

54 Título: **Compuestos de 3-arilpropionitrilo para marcar con tiol**

30 Prioridad:

04.07.2013 EP 13305950

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

09.05.2019

73 Titular/es:

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG (50.0%)
4, rue Blaise Pascal
67000 Strasbourg, FR y
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (50.0%)

72 Inventor/es:

WAGNER, ALAIN y
KONIEV, OLEKSANDR

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 712 178 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

Compuestos de 3-arilpropionitrilo para marcar con tiol

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para marcar compuestos que comprenden restos de tiol con compuestos de 3-arilpropionitrilo, y a los compuestos así obtenidos.

Antecedentes de la invención

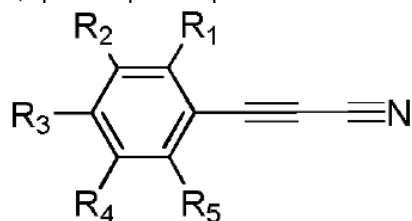
Más del 90% de las proteínas humanas contienen cisteínas, mientras que la síntesis in silico del proteoma humano reveló que solo aproximadamente el 15% de todos los péptidos tripticos humanos detectables por espectroscopia de masas (MS) contienen al menos una cisteína en su secuencia. Esta observación combinada con la presencia de un grupo tiol altamente reactivo en su cadena lateral hace que la cisteína sea un objetivo atractivo para el marcado químico. La cisteína es el único aminoácido codificado que transporta un grupo sulfhidrilo nucleófilo (o tiol) (-SH), que excede en gran medida la reactividad de cualquier otra función nucleófila susceptible de estar presente en las proteínas. Como consecuencia, la derivatización de la cisteína quimioespecífica es, con mucho, el método más utilizado para el marcado químico de proteínas. Entre la gran cantidad de métodos de modificación química de cisteína descritos en la bibliografía hasta el momento, los reactivos como las maleimidas N-sustituidas, las 4-vinilpiridinas y las yodoacetamidas son los más utilizados. Todos ellos tienen inconvenientes que les impiden ser una metodología ideal para el marcado de cisteína, aunque son adecuados para esta tarea. Estos inconvenientes son principalmente la presencia de reacciones secundarias no deseadas, en particular para yodoacetamidas y maleimidas, y la inestabilidad del producto de adición en entornos biológicos debido al intercambio de tiol reversible y otras reacciones secundarias.

B. Trofimov et al. (Synthesis, Vol. 2009, No. 18, 10 de julio de 2009, 3136-3142) describen un procedimiento para modificar la L-cisteína haciéndola reaccionar con 3-fenilprop-2-inenitrilo (ver Esquema 1). Dado que el 3-fenilprop-2-inenitrilo no está sustituido con un resto marcado, este procedimiento no es adecuado para marcar la L-cisteína o los compuestos que llevan un resto cisteína, tales como las proteínas.

25 La presente invención se refiere a un procedimiento para marcar compuestos que comprenden al menos un resto tiol, tal como cisteína, con compuestos que comprenden un resto marcado y un resto 3-arilpropionitrilo. Dichos compuestos y sus productos de adición con derivados de cisteína (proteínas) muestran una estabilidad inesperada en una amplia gama de condiciones. El procedimiento para marcar compuestos que comprenden restos tiol de la invención puede, por lo tanto, usarse para una amplia gama de aplicaciones.

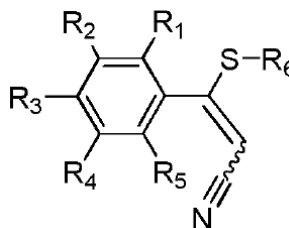
Sumario de la invención

El primer objeto de la invención es un procedimiento para la preparación de un compuesto marcado que comprende un resto tiol, que comprende poner en contacto un compuesto que comprende un resto tiol con un compuesto de



fórmula (I)

en la que de R₁ a R₅ son como se definen en la reivindicación 1.



35 Otro objeto de la invención es un compuesto de fórmula (III) , en donde R₆ es una proteína y de R₁ a R₅ son como se definen en la Reivindicación 1.

Breve descripción de las figuras.

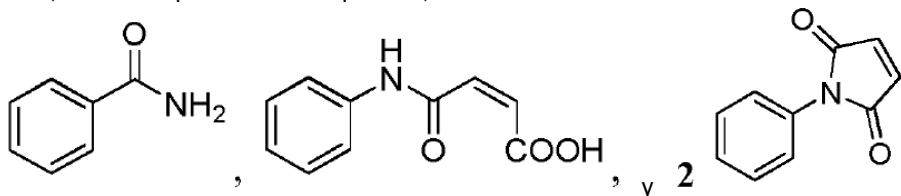
Fig. 1: Evolución de la intensidad de la fluorescencia en el tiempo obtenida en plasma humano para la misma concentración de los compuestos A y B.

40 Fig. 2: a) Evolución de la intensidad de la fluorescencia en el tiempo obtenida in cellulo para la misma concentración de los compuestos A y B.

b) Relación de intensidad compuesto B/compuesto A en diferentes momentos in cellulo.

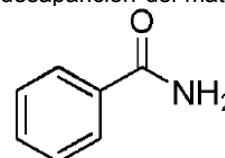
c) Imágenes al microscopio de células tratadas con los compuestos A y B, superposición del marcado de TAMRA y Hoechst. Las manchas blancas alrededor del núcleo corresponden a la sonda hidrolizada. A - sonda de arilpropionitrilo, B - sonda de maleimida.

5 Fig. 3: Monitoreo por HPLC de la hidrólisis de fenilmaleimida (2) en PBS (1x, pH 7,6) a una concentración de 1 mM a 25°C; los picos corresponden, desde el más tardío hasta el más reciente, a

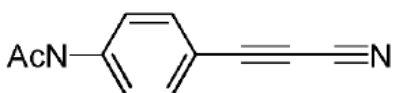


10 mediante la desaparición del material de partida (a). La constante de velocidad de pseudo primer orden para la reacción se determinó representando el $\ln([\text{fenilmaleimida}])$ en función del tiempo y analizando mediante regresión lineal. La constante corresponde al valor absoluto de la pendiente determinada (b).

Fig. 4: Monitoreo por HPLC de la estabilidad hidrolítica de N-(4-(cianoetil)fenil)acetamida (pNHAc-APN, 11) en PBS (1x, pH 7,6) a una concentración 1 mM a 25°C. La conversión fue monitoreada por la desaparición del material de



partida; los picos corresponden, desde el más reciente al más tardío, a



15 después de 5 horas de monitoreo.

Fig. 5: Resultados de la prueba de MTT para los compuestos 1, 2, 3, 5, 7, 11, 10 y 9.

Fig. 6: Electroforesis en gel del Mutante CD38-C375 marcado con un compuesto de acuerdo con la invención y con el correspondiente compuesto de maleimida, antes de la purificación (a) y después de la purificación (b).

20 Fig. 7: Estrategia de preparación del conjugado anticuerpo-TAMRA con un compuesto de acuerdo con la invención, y la comparación con la maleimida correspondiente.

Fig. 8: Electroforesis en gel de los conjugados obtenidos respectivamente con el compuesto de acuerdo con la invención (CBTF) y con la correspondiente maleimida (SMCC).

Fig. 9: Espectro de masas para el conjugado obtenido con el compuesto de acuerdo con la invención.

Fig 10: Zoom en el espectro de masas de la figura 10.

25 Fig 11: Espectro de masas obtenido con la maleimida.

Fig 12: Zoom en el espectro de masas de la figura 12.

Fig. 13: Esquema general de la conjugación directa del compuesto 58 con Trastuzumab parcialmente reducido.

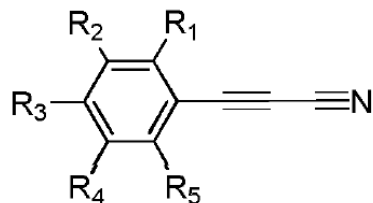
Fig. 14: El análisis de SDS-PAGE de los conjugados obtenidos muestra que el compuesto 58 está unido covalentemente al anticuerpo

30 Fig. 15: Esquema general del rebrote de fragmentos de anticuerpos usando los compuestos 33 y 34.

Fig. 16: El análisis de SDS-PAGE muestra que los fragmentos de anticuerpos se unen exitosamente con los compuestos 33 y 34.

Descripción detallada de la invención

El primer objeto de la invención es un procedimiento para la preparación de un compuesto marcado que comprende un resto tiol, que comprende poner en contacto dicho compuesto que comprende un resto tiol con un compuesto de



fórmula (I)

en donde cada uno de R₁ a R₅ se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en:

- 5 - átomos de hidrógeno,
 - grupos alquilo, alqueno o alquino, opcionalmente interrumpidos por al menos un heteroátomo seleccionado entre O, N y S,
 - grupos arilo,
 - grupos alcoxi,
- 10 - átomos de halógeno,
 - grupos amino (-NRR'), en donde R y R' son independientemente átomos de hidrógeno, grupos alquilo, alqueno, alquino o arilo como se definen a continuación,
 - grupo hidroxilamina (-ONH₂),
 - grupo hidrazina (-NH-NH₂),
- 15 - grupo nitro (-NO₂),
 - grupo azido (-N₃),
 - grupo diazonio (-N₂⁺),
 - grupo maleimida,
 - grupos alquilo o aril-carboxilo (-C(=O)OR), en donde R es como se describe anteriormente,
- 20 - grupos alquil- o aril-carbonilo (-C(=O)R), en donde R es como se describe anteriormente,
 - grupo hidroxilo (-OH),
 - grupo ácido borónico -B(OR'')₂, en donde R'' es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo,
 - grupos fosfina o fosfonio,
 - grupo isocianato (-N=C=O) o isotiocianato (-N=C=S),
- 25 - grupo clorosulfonilo (-SO₂Cl),
 - un grupo -O-C(=O)-C(N₂)-CF₃ o un grupo -C(=O)-C(N₂)-CF₃,
 - ésteres activados, como -C(=O)-NHS, en donde NHS significa N-hidrosuccinimidilo, ésteres perfluorados y acilureas
 - un grupo -C≡C-C≡N, y
- 30 - grupos alquilo sustituidos con al menos uno de los grupos enumerados anteriormente, en donde al menos uno de R₁ a R₅ comprende un resto marcador, que está opcionalmente unido al anillo fenilo a través de un grupo enlazador, y en el que dicho resto marcador se selecciona de un anticuerpo; un agente terapéutico; o una sonda fluorescente.

El resto marcador que está comprendido en el compuesto de fórmula (I) puede unirse directamente al anillo de fenilo. También puede unirse al anillo de fenilo a través de un grupo "enlazador", como un COO, un NH-C(=O)-NH, un NH-C(=O)-O, un triazol o un grupo CONH. También puede estar presente como un sustituyente de uno de los grupos R₁ a R₅ como se describe anteriormente.

En una realización preferida, R₃ se refiere, o preferiblemente, R₃ es un resto marcador.

- En la presente invención, el término "alquilo" se refiere a un grupo hidrocarburo lineal, cíclico o ramificado que comprende de 1 a 20 átomos de carbono, preferiblemente de 1 a 6 átomos de carbono, en particular de 1 a 3 átomos de carbono. Entre los grupos alquilo se pueden citar, por ejemplo, los grupos metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, sec-butilo, terc-butilo, n-pentilo, n-hexilo y ciclohexilo. Un grupo alquilo, de acuerdo con la invención, puede estar interrumpido por al menos un heteroátomo seleccionado de N, O y S. Entre los grupos alquilo interrumpidos por al menos un heteroátomo se pueden citar los grupos de polietilenglicol de fórmula $-(OCH_2-CH_2)_n-OH$, en donde n es de 1 a 1000, preferiblemente de 1 a 100, en particular, de 1 a 8. Un grupo alquilo de acuerdo con la invención puede estar sustituido con al menos un átomo de halógeno.
- El término "alqueno" se refiere a un grupo alquilo como se define anteriormente, que comprende además al menos un doble enlace C=C.
- El término "alquino" se refiere a un grupo alquilo como se define anteriormente, que comprende además al menos un triple enlace C≡C. Entre los grupos alquinos se pueden citar, por ejemplo, los grupos de acetileno y ciclooctino.
- El término "alcoxi" se refiere a un grupo alquilo como se definió anteriormente, unido al resto de la molécula a través de un átomo de oxígeno.
- El término "arilo" se refiere a un grupo que comprende al menos un anillo plano que comprende un sistema π conjugado hecho de dobles enlaces y/o dobles sin enlace, en donde cada átomo del anillo comprende un orbital p, los orbitales p se superponen entre sí, y la deslocalización de los electrones π disminuye la energía de la molécula. Preferiblemente, el grupo arilo es un grupo arilo hidrocarbonado, que comprende opcionalmente al menos un heteroátomo seleccionado de N, O y S. Preferiblemente, un grupo arilo se selecciona del grupo que consiste en grupos fenilo, piridinilo, pirimidinilo, pirazinilo, piridazinilo, triazinilo, furanilo, tiofenilo, pirrolilo, imidazolilo, tiazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, dihidroisoxasolilo, triazolilo, diazinilo, tetrazinilo, pirazolilo y naftilo. En particular, se selecciona un grupo arilo del grupo que consiste en grupos isoxazolilo, dihidroisoxasolilo, triazolilo, diazinilo, tetrazinilo y pirazolilo.
- El término "halógeno" se refiere a un átomo seleccionado del grupo que consiste en los átomos de F, Cl, Br e I. Preferiblemente, un halógeno es un átomo de Cl o Br.
- Los isómeros ópticos y geométricos, racematos, tautómeros, sales, hidratos, solvatos y mezclas de los mismos de los compuestos también están abarcados por el alcance de las fórmulas (I) y (III) de la presente invención.
- Cuando los compuestos de acuerdo con la invención están en forma de sales, son preferiblemente sales farmacéuticamente aceptables. Dichas sales incluyen sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables, sales de adición de base farmacéuticamente aceptables, sales de metal farmacéuticamente aceptables, sales de amonio y amonio alquiladas. Las sales de adición de ácidos incluyen sales de ácidos inorgánicos y ácidos orgánicos. Ejemplos representativos de ácidos inorgánicos adecuados incluyen ácidos clorhídrico, bromhídrico, yodhídrico, fosfórico, sulfúrico, nítrico y similares. Los ejemplos representativos de ácidos orgánicos adecuados incluyen ácido fórmico, acético, tricloroacético, trifluoroacético, propiónico, benzoico, cinámico, cítrico, fumárico, glicólico, láctico, maleico, málico, malónico, mandélico, oxálico, picánico, pirúvico, salicílico, succínico, metanosulfónico, etanosulfónico, tartárico, ascórbico, pamoico, bismetilen salicílico, etanodisulfónico, glucónico, citracónico, aspártico, esteárico, palmítico, EDTA, glicólico, p-aminobenzoico, glutámico, bencenosulfónico, ácidos p-toluenosulfónico, sulfatos, nitratos, fósforos, percloratos, boratos, acetatos, benzoatos, hidroxinaftoatos, glicerofosfatos, cetoglutaratos y similares. Otros ejemplos de sales de adición de ácidos orgánicos o inorgánicos farmacéuticamente aceptables incluyen las sales farmacéuticamente aceptables enumeradas en J. Pharm. Sci. 1977, 66, 2. Preferiblemente, la sal no comprende ningún resto tiol.
- El término "contraión" puede ser cualquier ion apropiado que compense la carga del grupo de diazonio, y puede ser elegido fácilmente por cualquier experto en la técnica. Por ejemplo, el contraión puede seleccionarse del grupo que consiste en halogenados, BF_4^- , NO_3^- , HSO_4^- , PF_6^- , CH_3COO^- , $N(SO_2CF_3)_2^-$, $CF_3SO_3^-$, $CH_3SO_3^-$, CF_3COO^- , $(CH_3O)(H)PO_2^-$ y $N(CN)_2^-$.
- En la presente invención, los grupos hidroxilo (OH), amino (NH_2 o NHR) y carboxilo (COOH) pueden protegerse con grupos protectores apropiados. Se puede hacer referencia a T. W. Green, P. G. M. Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, Wiley-Interscience, Nueva York, 1999.
- Entre los grupos protectores para los grupos hidroxilo se pueden citar el acetilo (Ac), el benzoilo (Bz), el bencilo (Bn), el éter β -metoxietoximetílico (MEM), el dimetoxitritilo, el [bis-(4-metoxifenil)fenilmetil] (DMT), el éter metoximetílico (MOM), metoxitritil [(4-metoxifenil)difenilmetilo, MMT), éter p-metoxibencilo (PMB), metiltiometil éter, pivaloilo (Piv), tetrahidropiraniilo (THP), tetrahidrofurano (THF) y tritil(trifenilmetilo, Tr).
- Entre los grupos protectores para los grupos amino se pueden citar el carbamato de t-butilo (Boc), el carbamato de 2-trimetilsililetilo (Teoc), el carbamato de 1-(1-adamantil)-1-metiletilo (Adpoc), el carbamato de 1-metil-1-(4-bifenilo)etilo (Bpoc), carbamato de 1-(3,5-di-t-butilfenil)-1-metiletilo (t-Bumeoc), carbamato de 1-adamantilo (Adoc), carbamato de p-metoxibencilo (Moz), carbamato de 9-antrilmetilo, carbamato de difenilmetilo, carbamato de 9-fluorenilmetilo (Fmoc), carbamato de 9-(2-sulfo) fluorenilmetilo, carbonato de 9-(2,7-dibromo)fluorenilmetilo, 2,7-di-t-

butil-[9-(10,10-dioxo-10,10,10-tetrahidrotioxantil)]metilcarbamato (DBD-Tmoc), carbamato de 2-(N,N-diciclohexilcarboxamido)etilo, carbamato de 2-fosfonioetilo (Peoc), carbamato de 2-feniletilo, carbamato de bencilo (Cbz), carbamato de alilo (Alloc), carbamato de 1-isopropilalilo (Ipaoc), carbamato de 4-nitrocinaamilo (Noc), carbamato de 8-quinolilo y N-ftalimida.

- 5 Entre los grupos protectores para grupos carboxilo se pueden citar los ésteres metílicos, los ésteres bencílicos, los ésteres terc-butílicos, los ésteres silílicos, el 2,6-dimetilfenol, el 2,6-diisopropilfenol y el 2,6-di-terc-butilfenol.

El término "marcador" o "resto marcador" se selecciona de un anticuerpo, un agente terapéutico o una sonda fluorescente.

- 10 Las sondas fluorescentes son apropiadas para la permitir la detección del compuesto de la invención. Ejemplos de sondas fluorescentes son fluoresceína, puntos cuánticos, colorantes de cianina Cy3® y Cy5®, los tintes Alexa Fluor®, los tintes Dylight fluor®, los tintes IRIS®, tintes Seta®, tintes SeTau®, tintes SRfluor®, tintes Square® o rojo de Nilo, FL o carboxitetrametilrodamina (TAMRA).

- 15 Los anticuerpos son apropiados para permitir la vectorización de un agente de interés con el compuesto de la invención y, por lo tanto, para ayudar al compuesto y/o al agente de interés a alcanzar el tejido u órgano apropiado, como el hígado o la vejiga.

Los agentes terapéuticos son apropiados para permitir la modificación de los parámetros ADME del compuesto.

En una realización, cada uno de R₁ a R₅ se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en:

- grupos alquino,
- grupos amino,
- 20 - grupos hidroxilamina (-ONH₂),
- grupos hidrazina (-NH-NH₂),
- grupos azido (-N₃),
- grupo diazonio (-N₂⁺), preferiblemente en presencia de un contraión,
- grupo maleimida,
- 25 - grupos ácido carboxilo,
- grupos aldehído (-CHO),
- grupos borónicos -B(OR'')₂, en donde R'' es como se describe más arriba, y
- ésteres activados.

- 30 En una realización preferida, ninguno de R₁ a R₅ comprende un grupo libre SH. En una realización preferida, R₁ y/o R₅ no comprenden ningún grupo nucleófilo, tal como grupos amino, grupos hidroxilamina, grupos hidrazina o grupos hidroxilo.

En realizaciones específicas, 1, 2, 3, 4 o 5 de R₁ a R₅ son diferentes de los átomos de hidrógeno.

Síntesis de los compuestos de la invención.

- 35 Los compuestos de fórmula (I) de acuerdo con la invención se pueden sintetizar, por ejemplo, en dos etapas a partir del correspondiente yodoareno, mediante acoplamiento con alcohol propargílico, por ejemplo a través de un acoplamiento de Sonogashira. El acoplamiento es seguido preferiblemente por oxidación; por ejemplo, la oxidación puede ser una oxidación en tándem realizada con MnO₂ en presencia de una solución de amoníaco. Alternativamente, los compuestos de la invención pueden sintetizarse mediante cianación de arilalquinos. La cianación se puede realizar, por ejemplo, con CuCN, arilsocianatos, cianobenzotriazoles o cianoimidazoles.

- 40 Marcado de compuestos que comprenden al menos un resto tiol.

Los compuestos de fórmula (I) se usan en un procedimiento para marcar compuestos que comprenden al menos un resto SH de tiol. Preferiblemente, el procedimiento de la invención comprende poner en contacto al menos un compuesto de fórmula (I) con un compuesto que comprende al menos un resto tiol SH, o una muestra susceptible de comprender dicho compuesto.

- 45 Preferiblemente, la muestra es una muestra biológica, en particular una muestra acuosa.

El término "marcado" en la presente invención se refiere a la formación de un enlace covalente entre el átomo de azufre del resto tiol y el resto propiolonitrilo de los compuestos de fórmula (I).

5 El compuesto que comprende un resto tiol (compuesto R_6 -SH) puede ser, por ejemplo, un fluoróforo, un inhibidor, un aminoácido, un péptido, una proteína, una enzima, un fármaco, un profármaco y/o un metabolito farmacéutico. Puede ser cualquier grupo químico que esté unido a un grupo tiol (SH) para formar un "compuesto que comprende un resto tiol". Preferiblemente comprende átomos de carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, fósforo y/o azufre.

En particular, el compuesto que comprende un resto tiol puede ser cisteína, o un derivado, tal como un éster del mismo, o un péptido o una proteína que comprende al menos un residuo de cisteína. Alternativamente, el compuesto que comprende un resto tiol puede ser una superficie que presenta al menos un grupo libre SH.

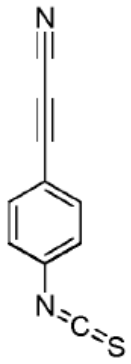
10 El marcado de los compuestos que comprenden un resto tiol con compuestos de fórmula (I) se puede usar para un gran número de aplicaciones.

15 En una primera realización, el marcado de los compuestos que comprenden un resto tiol con compuestos de fórmula (I) se puede usar en la detección y/o cuantificación del compuesto que comprende el resto tiol en una muestra. Los medios de detección en la presente invención identifican la presencia o ausencia de los compuestos deseados en la muestra. La muestra puede ser cualquier muestra susceptible de comprender el compuesto que comprende al menos un resto tiol. Por ejemplo, la muestra puede ser una muestra biológica, por ejemplo un fluido biológico, como sangre, plasma, suero, saliva, orina, etc., un extracto de productos naturales, un tejido biológico o una parte del mismo o un medio que comprende las células.

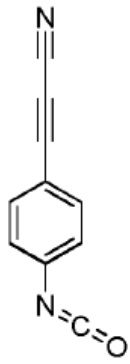
20 En una segunda realización, el marcado de los compuestos que comprenden un resto tiol con compuestos de fórmula (I) se puede usar para la bio-conjugación del compuesto que comprende un resto tiol con un fármaco (agente terapéutico).

Por ejemplo, un compuesto de fórmula (I) que comprende un compuesto de interés como marcador puede permitir la vectorización selectiva y/o la unión del compuesto de interés al compuesto que comprende al menos un resto tiol.

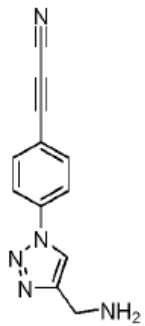
25 Al menos se puede agregar un marcador a los siguientes compuestos de fórmula (II) para formar los compuestos de fórmula (I) como se describió anteriormente:



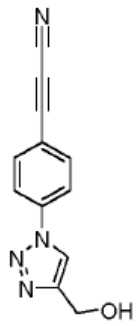
21



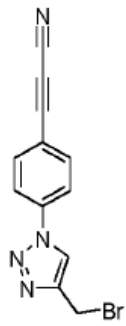
84



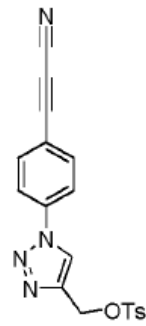
85



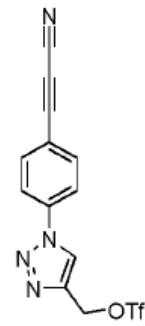
55



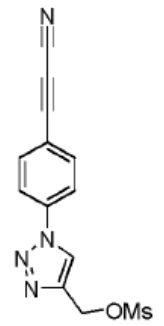
56



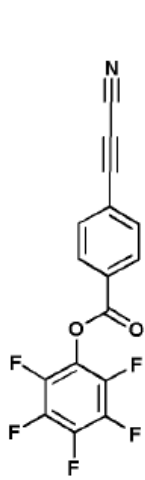
86



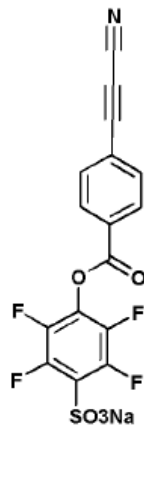
87



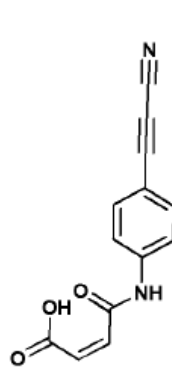
88



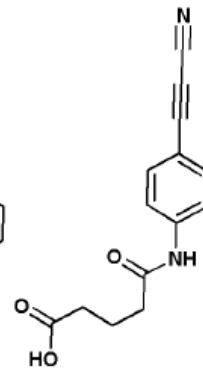
17



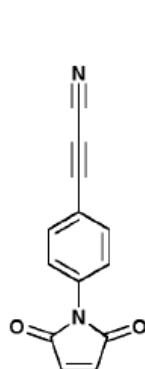
18



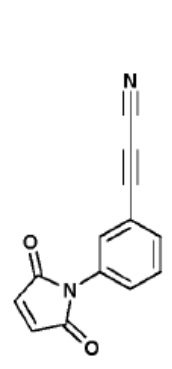
89



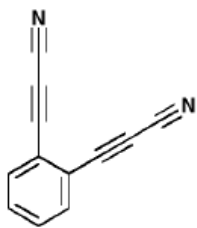
90



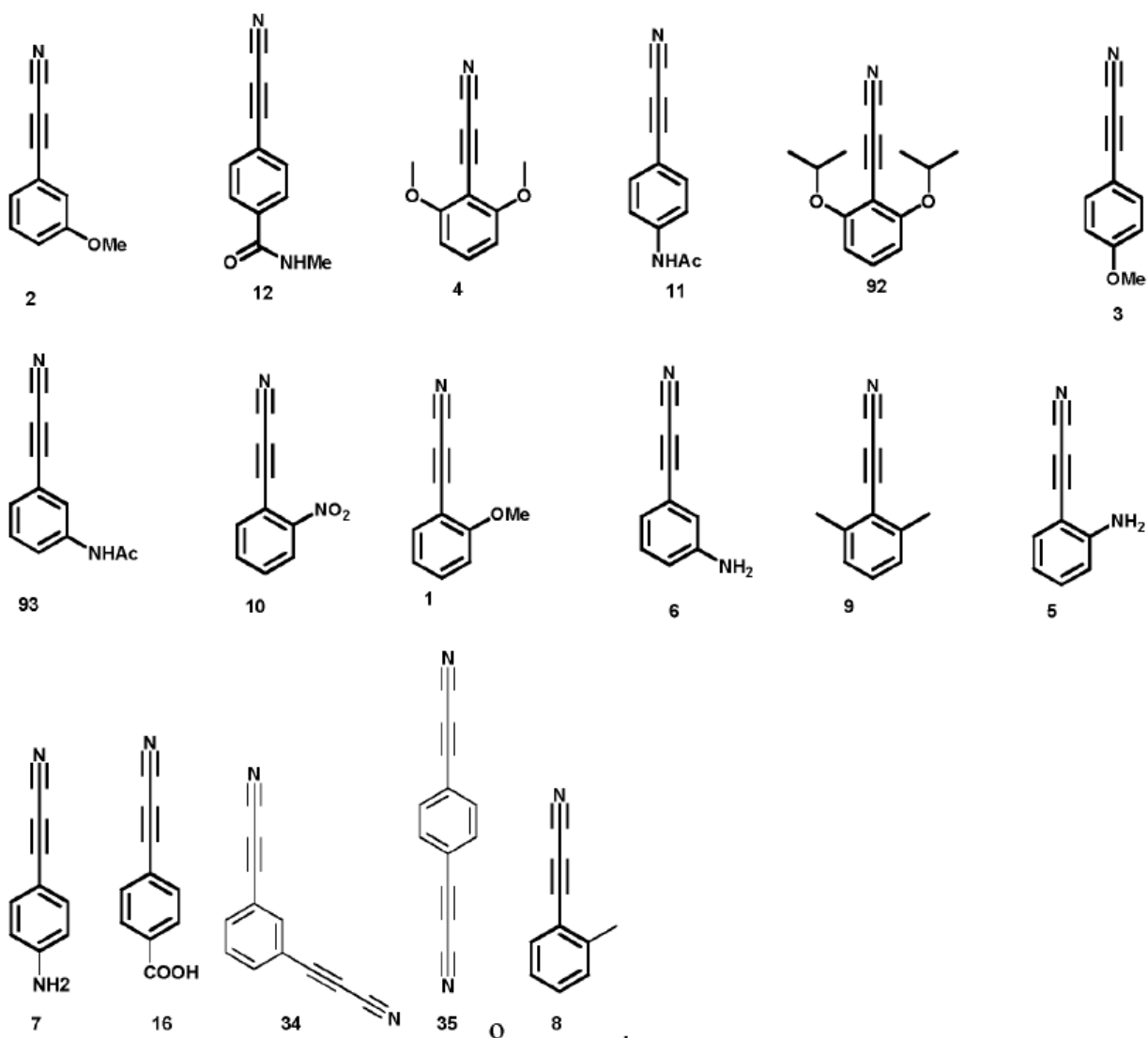
41



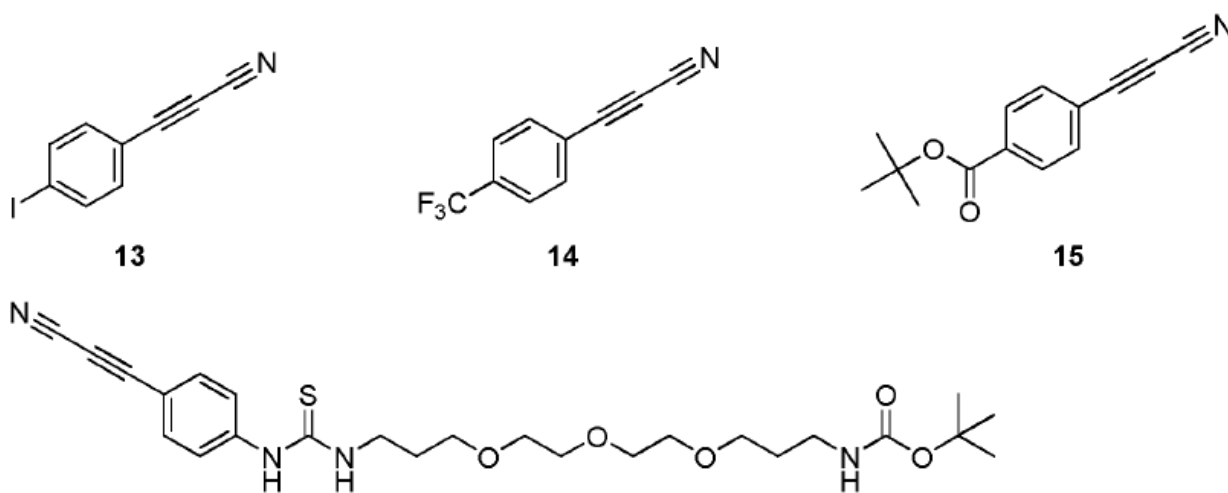
91

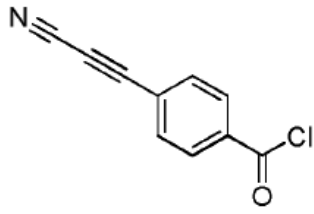


33

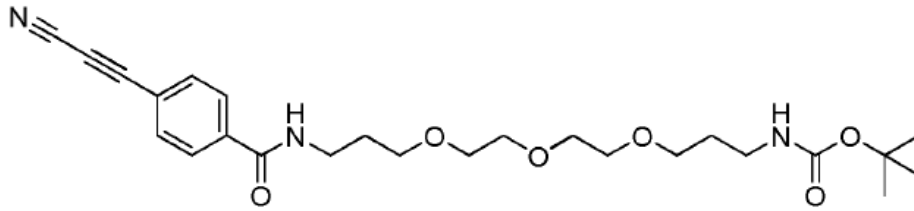


Entre los compuestos de fórmula (II) también se pueden citar los siguientes compuestos:

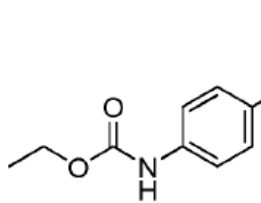




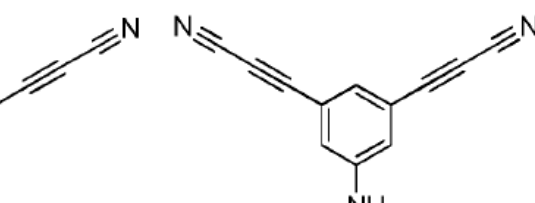
23



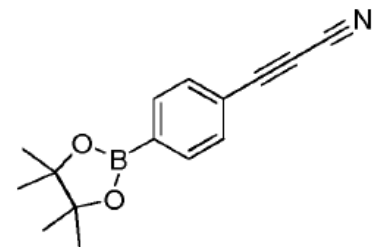
24



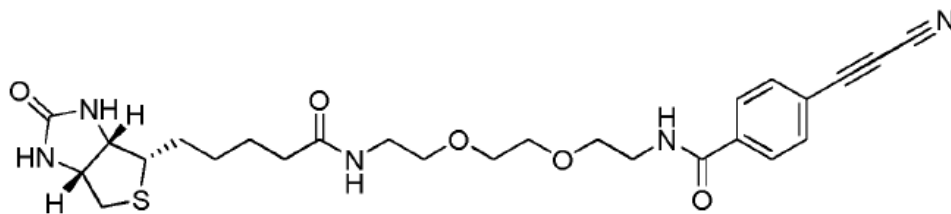
26



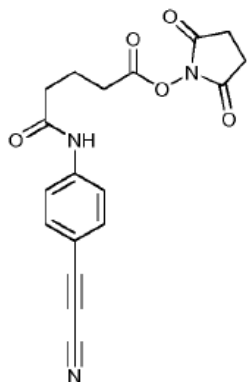
31



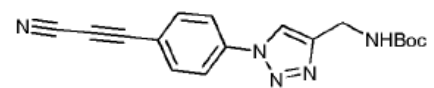
32



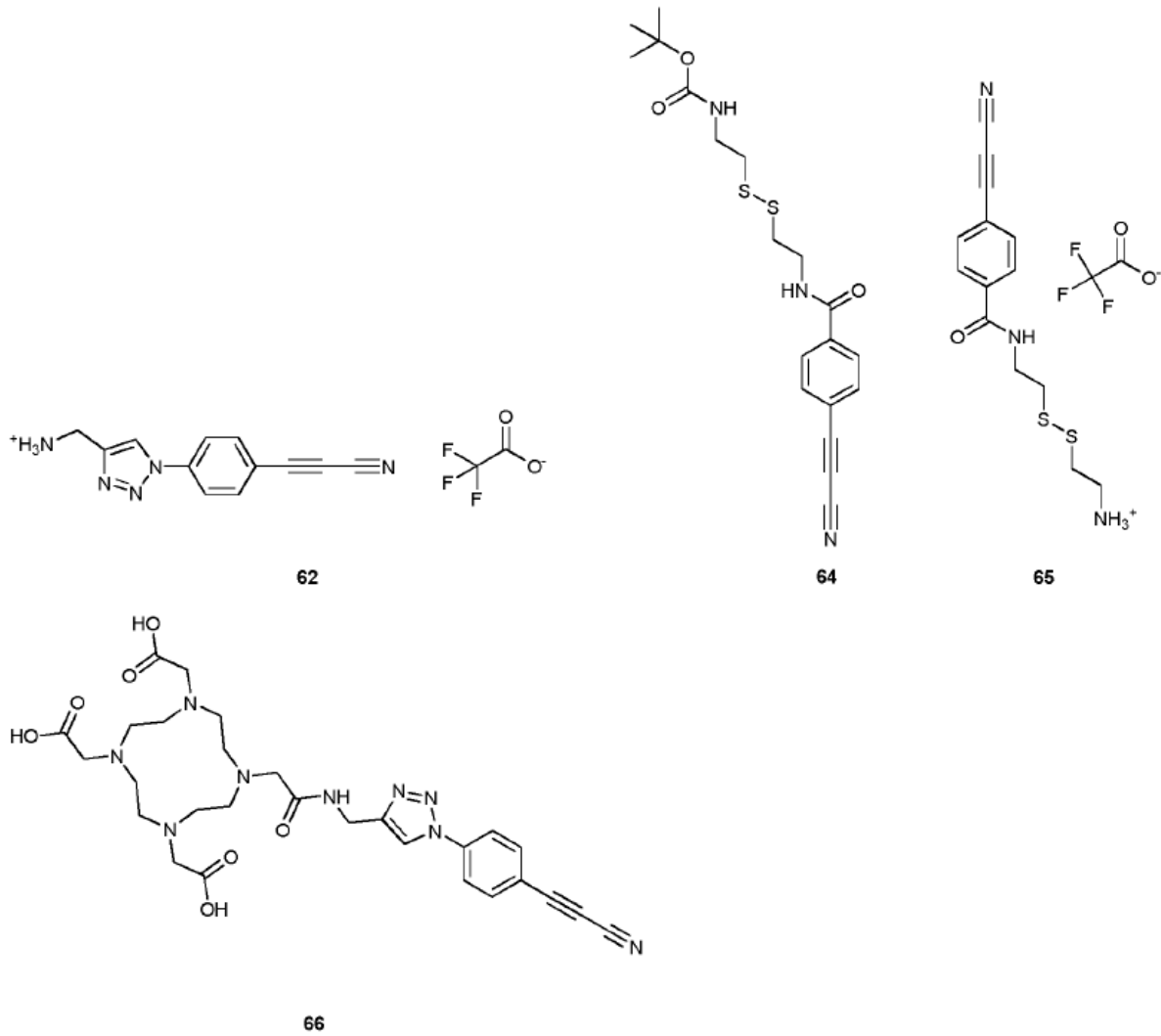
37



42



61

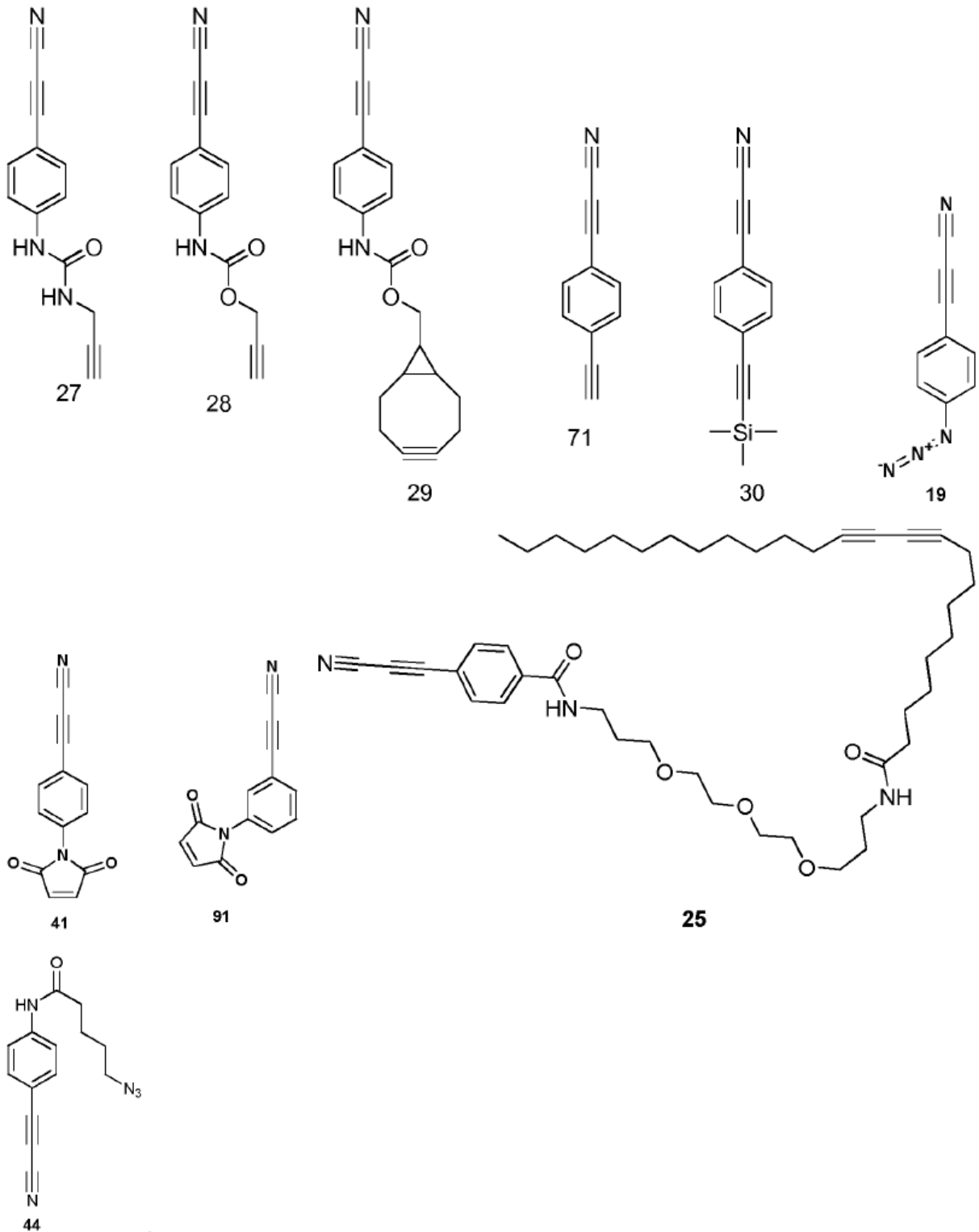


5 El procedimiento para marcar un compuesto que comprende un resto tiol de acuerdo con la invención puede comprender además, antes de la etapa de poner en contacto el compuesto que comprende un resto tiol con un compuesto de fórmula (I), una etapa preliminar de preparación del compuesto de fórmula (I), que comprende poner en contacto un compuesto de fórmula (II) con un compuesto que comprende un resto marcador, o un precursor del mismo.

El término "precursor" se refiere en el presente caso a un grupo químico que puede formar, después de ponerse en contacto con el compuesto de fórmula (II), el resto marcador.

10 En los compuestos anteriores de fórmula (II), los restos de maleimida y NHS-éster permiten, respectivamente, la unión adicional del compuesto a otro grupo tiol o amina; el grupo N₃ permite un enlace adicional del compuesto a otro grupo alquino y el grupo alquino permite un enlace adicional del compuesto a otro grupo N₃.

El compuesto de fórmula (II) se puede seleccionar entre los siguientes compuestos:



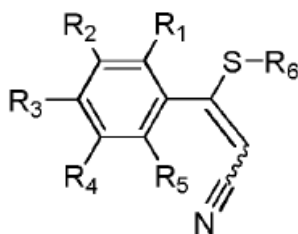
En los compuestos de fórmula (I) de acuerdo con la invención, al menos uno de R₁ a R₅ está unido adicionalmente a un compuesto de interés.

5 Un compuesto de interés o marcador puede ser un fluoróforo, por ejemplo rodamina, un agente terapéutico o un anticuerpo.

Cuando el procedimiento de marcado de acuerdo con la invención se realiza con un compuesto de fórmula (I) de este tipo, el procedimiento proporciona la formación de un conjugado entre el compuesto de interés y el compuesto que comprende un resto tiol.

En una realización, el compuesto de interés es un anticuerpo, y el compuesto que comprende un resto tiol es un agente terapéutico. El conjugado obtenido por el procedimiento de marcaje de acuerdo con la invención es un anticuerpo terapéutico.

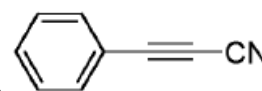
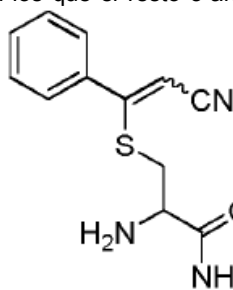
Otro objeto de la invención es un compuesto de fórmula (III):



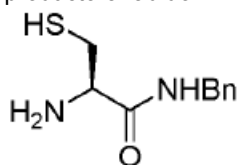
(III)

5

donde R₁ a R₅ son como se describe en la reivindicación 1, y en donde R₆ es una proteína. Los compuestos de fórmula (III) como se describió anteriormente han demostrado ser altamente más estables en condiciones biológicas que los compuestos correspondientes en los que el resto 3-arylpropionitrilo se reemplaza por un resto maleimida.



Esto se debe a que el producto añadido



entre el compuesto y el

10 derivado de cisteína 3 fue particularmente estable en una amplia gama de condiciones, tales como condiciones fisiológicas. En particular, dicho producto de adición fue estable en un amplio rango de pH (de 0 a 14), y no se pudo observar ningún producto de intercambio después de una hora de reacción con un exceso de feniltiol y glutatión.

La invención se ilustrará con más detalle con referencia a los siguientes ejemplos.

15 Ejemplos

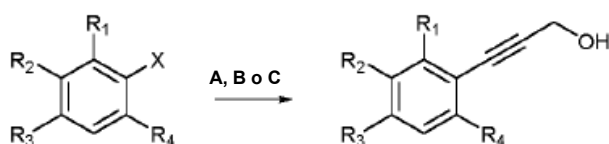
Ejemplo 1: Síntesis de compuestos de la invención.

- Síntesis de los compuestos de fórmula (II)

Una serie de compuestos de fórmula (II) se sintetizaron y caracterizaron de acuerdo con los siguientes procedimientos.

20 Procedimientos generales:

Acoplamiento de Sonogashira



25 A. A una solución desgasificada de haluro de arilo apropiado (1 eq., 1 mmol) en DMF (5 ml) y DIPEA (10 eq., 10 mmol), se añadieron PdCl₂(PPh₃)₂ premezclado (0,03 eq., 30 μmol) y CuI (0,06 eq., 60 μmol). La masa de reacción obtenida se desgasificó, se agitó durante otros 5 minutos, seguido de la adición de alcohol propargílico (1,2 eq., 1,2 mmol). La masa de reacción se agitó durante 1-24 horas (controlada por TLC). Se añadió HCl 1 M (50 ml) (si contenía grupos amino libres, en su lugar se agregaron 50 ml de agua) y la mezcla de reacción se extrajo con

acetato de etilo (3 x 20 ml). Las fracciones de acetato de etilo se lavaron con agua (1 x 10 ml), se secaron sobre MgSO₄ y se evaporaron para dar un producto bruto. Los productos se purificaron por cromatografía ultrarrápida (gradiente de 20 minutos desde 100% de ciclohexano hasta 100% de acetato de etilo).

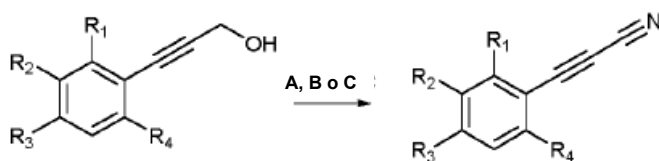
5 B. A una solución desgasificada del haluro de arilo apropiado (1 eq., 1 mmol) en THF (5 ml) y TEA (5 ml), se agregaron PdCl₂(PPh₃)₂ (0,03 eq., 30 μmol) premezclado y CuI (0,06 eq., 60 μmol), seguido de la adición de alcohol propargílico (2 eq., 1,2 mmol). La masa de reacción se agitó durante 1-24 horas (controlada por TLC). Se evaporaron THF y TEA y el producto bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida (gradiente de 20 minutos desde 100% de ciclohexano hasta 100% de acetato de etilo).

10 C. A una solución desgasificada del haluro de arilo adecuado (1 eq., 1 mmol) en propilamina o pirrolidina (3 ml), se añadió Pd(PPh₃)₄ (0,05 eq., 50 μmol). La masa de reacción se calentó durante la noche (30-50°C), se evaporó y el producto bruto se purificó por cromatografía instantánea (gradiente de 20 minutos desde 100% de ciclohexano hasta 100% de acetato de etilo).

Preparación de MnO₂ altamente activo.

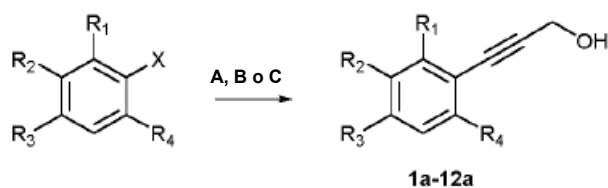
15 Se añadió gradualmente una solución de MnCl₂ · 4H₂O (1 eq., 1 mol, 200 g) en agua (2 l) a 70°C durante 10 minutos, con agitación, a una solución de KMnO₄ (1 eq., 1 mol, 160 g) en agua (2 L) a 60°C en una campana. Se produjo una reacción potente con evolución de cloro; la suspensión se agitó durante 2 horas y se mantuvo durante la noche a temperatura ambiente. El precipitado se separó por filtración, se lavó a fondo con agua (4 l) hasta pH 6,5-7 y el lavado dio una prueba de cloruro despreciable. La torta del filtro se secó luego a 120-130°C durante 18 h; esto dio un polvo amorfo de color marrón chocolate, muy disperso.

20 Oxidación de MnO₂



25 Procedimiento ligeramente modificado descrito por McAllister et al.^{824A} una solución del alcohol propargílico apropiado (1 eq., 1 mmol) en THF (4,5 ml), MgSO₄ (15 eq., 15 mmol), MnO₂ altamente activo (25 eq., 25 mmol) y solución de NH₃ 2M en IPA (4 eq., 4 mmol, 2 ml). La masa de reacción obtenida se agitó fuertemente a temperatura ambiente durante 0,5-12 horas (controlada por TLC). Se añadieron DCM (20 ml) y la masa de reacción obtenida se filtró a través de Celite, se evaporó para proporcionar un producto bruto y se purificó por cromatografía ultrarrápida, en caso de que fuera necesario.

3-(Aрил)prop-2-in-1-oles (1a-12a) sustituidos:



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	X	Protocolo
1a	OMe	H	H	H	I	B
2a	H	OMe	H	H	Br	C
3a	H	H	OMe	H	I	B
4a	OMe	H	H	OMe	I	C
5a	NH ₂	H	H	H	I	B
6a	H	NH ₂	H	H	I	A
7a	H	H	NH ₂	H	I	A
8a	Me	H	H	H	I	B

9a	Me	H	H	Me	I	A
10a	NO ₂	H	H	H	Br	B
11a	H	H	NHAc	H	I	A
12a	H	H	CONHMe	H	I	A

3-(2-Metoxifenil)prop-2-in-1-ol (1a).

Tiempo de reacción: 18 horas; rendimiento: 72%.

5 ¹H RMN (400 MHz, METANOL-d₄) δ 7,36 (dd, J= 1,5, 7,5 Hz, 1H), 7,26-7,33 (m, 1H), 6,97 (d, J= 8,3 Hz, 1H), 6,86-6,93 (m, 1H), 4,43 (s, 2H), 3,84 (s, 3H); ¹³C RMN (101 MHz, METANOL-d₄) δ 161,6, 134,5, 131,0, 121,5, 113,4, 112,0, 92,7, 82,0, 56,2, 51,5.

3-(3-Metoxifenil)prop-2-in-1-ol (2a).

Tiempo de reacción: 16 horas; rendimiento: 87%.

10 ¹H RMN (400 MHz, METANOL-d₄) δ 7,15-7,24 (pseudo-t, J= 7,5 Hz, 1H), 7,00 (d, J= 7,5 Hz, 1H), 6,93-6,98 (m, 1H), 6,87 (dd, J= 2,13, 7,5 Hz, 1H), 4,41 (s, 2H), 3,73 (s, 3H); ¹³C RMN (101 MHz, METANOL-d₄) δ 160,9, 130,6, 125,4, 125,1, 117,8, 115,7, 88,8, 85,6, 55,9, 51,4.

3-(4-Metoxifenil)prop-2-in-1-ol (3a).

Tiempo de reacción: 16 horas; rendimiento: 92%.

15 ¹H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ 7,40 (d, J= 8,78 Hz, 2H), 6,86 (d, J= 8,78 Hz, 2H), 4,51 (d, J= 4,9 Hz, 2H), 3,83 (s, 3H), 1,78 (t, J= 4,9 Hz, 1H); ¹³C RMN (101 MHz, CLOROFORMO-d) δ 159,8, 133,2, 114,6, 114,0, 85,9, 85,7, 55,3, 51,7.

3-(2-Aminofenil)prop-2-in-1-ol (4a).

Tiempo de reacción: 24 horas; rendimiento: 62%.

20 ¹H RMN (400 MHz, METANOL-d₄) δ 7,19 (dd, J= 1,25, 7,9 Hz, 1H), 7,03-7,12 (m, 1H), 6,75 (d, J= 7,9 Hz, 1H), 6,56-6,65 (m, 1H), 4,47 (s, 2H), 4,26 (s, 2H); ¹³C RMN (101 MHz, METANOL-d₄) δ 150,3, 133,0, 130,6, 118,2, 115,6, 93,8, 78,9, 69,5, 51,0.

3-(3-Aminofenil)prop-2-in-1-ol (5a).

Tiempo de reacción: 18 horas; rendimiento: 77%.

25 ¹H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ 7,08 (t, J= 7,8 Hz, 1H), 6,83 (d, J= 7,8 Hz, 1H), 6,76 (s, 1H), 6,64 (dd, J= 1,5, 7,8 Hz, 1H), 4,46 (s, 2H), 2,17 (s, 1H); ¹³C RMN (101 MHz, CLOROFORMO-d) δ 146,3, 129,2, 123,4, 122,0, 118,0, 115,5, 87,0, 85,6, 51,4.

3-(4-Aminofenil)prop-2-in-1-ol (6a).

Tiempo de reacción: 18 horas; rendimiento: 42%.

30 ¹H RMN (400 MHz, METANOL-d₄) δ 7,11-7,21 (d, J= 8,5 Hz, 2H), 6,53-6,68 (d, J= 8,5 Hz, 2H), 4,37 (s, 2H); ¹³C RMN (101 MHz, METANOL-d₄) δ 149,7, 133,8, 115,7, 112,5, 86,7, 85,9, 51,4;

3-(2-Nitrofenil)prop-2-in-1-ol (7a).

Tiempo de reacción: 15 horas; rendimiento: 35%.

35 ¹H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ 7,97 (d, J= 8,0 Hz, 1H), 7,54-7,60 (d, J= 8,0 Hz, 1H), 7,46-7,54 (t, J= 8,0 Hz, 1H), 7,36-7,44 (t, J= 8,0 Hz, 1H), 4,49 (s, 2H), 1,68 (s ancho, 1H); ¹³C RMN (101 MHz, CLOROFORMO-d) δ 149,9, 134,8, 132,8, 128,9, 124,6, 118,0, 95,2, 80,9, 51,7.

4-(3-Hidroxiprop-1-in-1-il)-N-metilbenzamida (8a).

Tiempo de reacción: 12 horas; rendimiento: 91%.

¹H RMN (400 MHz, METANOL-d₄) δ 7,72-7,82 (m, J= 8,28 Hz, 2H), 7,41-7,53 (m, J= 8,28 Hz, 2H), 4,43 (s, 2H), 2,92 (s, 3H); ¹³C RMN (101 MHz, METANOL-d₄) δ 169,9, 135,2, 132,7, 128,3, 127,6, 91,5, 84,7, 51,3, 27,1.

N-(4-(3-Hidroxi-prop-1-in-1-il)fenil)acetamida (9a).

Tiempo de reacción: 18 horas; rendimiento: 85%.

¹H RMN (400 MHz, METANOL-d₄) δ 7,56-7,64 (d, J= 8,8 Hz, 2H), 7,47-7,56 (d, J= 8,8 Hz, 2H), 4,74 (s, 2H), 2,04 (s, 3H); ¹³C RMN (101 MHz, METANOL-d₄) δ 171,9, 143,8, 135,7, 120,7, 112,8, 106,2, 84,5, 62,7, 24,1.

5 3-(o-Tolil)prop-2-in-1-ol (10a).

Tiempo de reacción: 5 horas; rendimiento: 70%.

¹H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ 7,40 (d, J= 7,5 Hz, 1H), 7,11-7,24 (m, 3H), 4,54 (s, 2H), 2,43 (s., 3H); ¹³C RMN (101 MHz, CLOROFORMO-d) δ 138,2, 131,2, 128,4, 128,0, 119,3, 115,3, 86,5, 85,2, 51,2, 21,2.

3-(2,6-Dimetilfenil)prop-2-in-1-ol (11a) .

10 Tiempo de reacción: 24 horas; rendimiento: 25%.

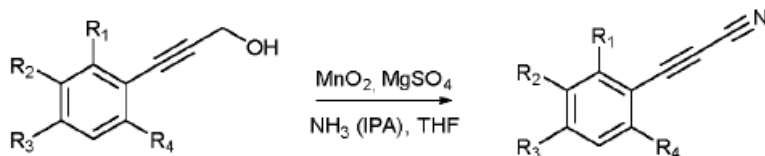
¹H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ 7,03 (t, J= 7,5 Hz, 1H), 6,95 (d, J= 7,5 Hz, 2H), 4,50 (s, 2H), 2,34 (s, 7H); ¹³C RMN (101 MHz, CLOROFORMO-d) δ 140,5, 127,9, 126,7, 122,3, 95,6, 83,3, 51,9, 21,1.

3-(2,6-DiMetoxifenil)prop-2-in-1-ol (12a).

Condiciones de reacción: 30°C, propilamina, 16 horas; rendimiento: 38%.

15 ¹H RMN (400 MHz, METANOL-d₄) δ 7,25 (t, J= 8,4 Hz, 1H), 6,62 (d, J= 8,4 Hz, 2H), 4,46 (s, 2H), 3,84 (s, 6H); ¹³C RMN (101 MHz, METANOL-d₄) δ 163,0, 131,0, 104,7, 102,5, 97,0, 78,1, 56,4, 51,7.

3-Aril-propionitrilos (1-12) sustituidos:



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Tiempo, h	Rendimiento, %
1	OMe	H	H	H	3	45
2	H	OMe	H	H	2	85
3	H	H	OMe	H	3	95
4	OMe	H	H	OMe	4	60
5	NH ₂	H	H	H	1	47
6	H	NH ₂	H	H	2	71
7	H	H	NH ₂	H	9	94
8	Me	H	H	H	1,5	70
9	Me	H	H	Me	2	55
10	NO ₂	H	H	H	4	21
11	H	H	NHAc	H	2	92
12	H	H	CONHMe	H	2	61

20 3-(2-Metoxifenil) propionitrilo (1, APN-o-OMe).

¹H RMN (400 MHz, METANOL-d₄) δ 7,51-7,65 (m, 2H), 7,12 (d, J= 8,3 Hz, 1H), 7,01 (t, J= 7,7 Hz, 1H), 3,94 (s, 4H); ¹³C RMN (101 MHz, METANOL-d₄) δ 164,7, 136,4, 135,3, 122,0, 112,6, 107,7, 106,4, 81,8, 66,7, 56,7; IR (película

ES 2 712 178 T3

neta, cm^{-1}): 2946, 2264, 2142 1596, 1490, 1245, 1164, 1122, 1047, 1021, 752, 498; GC-ESI-HRMS: 157,05276; encontrado 157,05044.

3-(3-Metoxifenil) propiolonitrilo (2, APN-m-OMe).

5 ^1H RMN (400 MHz, METANOL- d_4) δ 7,38 (t, $J = 7,8$ Hz, 1H), 7,27 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H), 7,20-7,24 (m, 1H), 7,12-7,20 (m, 1H), 3,83 (s, 3H); ^{13}C RMN (101 MHz, METANOL- d_4) δ 161,2, 131,4, 127,1, 120,0, 119,4, 119,2, 106,0, 84,1, 62,7, 56,1; IR (película neta, cm^{-1}): 2491, 2264, 2144, 1595, 1573, 1488, 1464, 1420, 1324, 1294, 1207, 1178, 1045, 783, 681, 494; GC-ESI-HRMS: 157,05276; encontrado 157,05298.

3-(4-Metoxifenil) propiolonitrilo (3, APN-p-OMe).

10 ^1H RMN (400 MHz, CLOROFORMO- d) δ 7,46-7,70 (m, $J = 8,8$ Hz, 2H), 6,86-6,96 (m, $J = 8,8$ Hz, 2H), 3,86 (s, 3H); ^{13}C RMN (101 MHz, CLOROFORMO- d) δ 161,4, 134,4, 113,7, 108,2, 104,8, 82,7, 61,5, 54,5; IR (película neta, cm^{-1}): 2985, 2358, 2342, 2263, 2178, 2149, 1603, 1514, 1307, 1270, 1180, 1028, 835, 808, 669, 424; GC-ESI-HRMS: 157,05276; encontrado 157,05337.

3-(2,6-DiMetoxifenil)propiolonitrilo (4, APN-o,o'-diOMe):

15 ^1H RMN (400 MHz, CLOROFORMO- d) δ 7,38 (t, $J = 8,5$ Hz, 1H), 6,53 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H), 3,88 (s, 6H); ^{13}C RMN (101 MHz, CLOROFORMO- d) δ 164,4, 133,8, 106,2, 103,4, 96,5, 77,7, 70,5, 56,2; IR (película neta, cm^{-1}): 2847, 2359, 2259, 2201, 2139, 1926, 1586, 1574, 1478, 1432, 1302, 1255, 1188, 1109, 1025, 778, 727, 648, 632, 545, 506, 488, 420; GC-ESI-HRMS: 187,06333; encontrado 184,06465.

3-(2-Aminofenil) propiolonitrilo (5, APN-o-NH₂).

20 ^1H RMN (500 MHz, METANOL- d_4) δ 6,81 (d, $J = 7,88$ Hz, 1H), 6,65-6,76 (m, 1H), 6,08-6,19 (m, 2H), 3,85 (s ancho, 1H); ^{13}C RMN (126 MHz, CLOROFORMO- d) δ 151,4, 134,0, 133,4, 118,2, 115,0, 105,8, 101,0, 81,6, 68,5; IR (película neta, cm^{-1}): 3413, 3332, 3211, 2925, 2853, 2250, 2136, 1632, 1600, 1563, 1486, 1452, 1312, 1273, 1252, 1161, 740, 673, 493; GC-ESI-HRMS: 142,05310; encontrado 142,05458.

3-(3-Aminofenil) propiolonitrilo (6, APN-m-NH₂).

25 ^1H RMN (400 MHz, CLOROFORMO- d) δ 7,17 (t, $J = 7,6$ Hz, 1H), 6,99 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H), 6,74-6,89 (m, 2H), 3,85 (s ancho, 2H); ^{13}C RMN (101 MHz, CLOROFORMO- d) δ 146,8, 129,8, 123,6, 118,7, 118,7, 118,0, 105,7, 83,7, 62,3; IR (película neta, cm^{-1}): 3426, 3340, 2923, 2852, 2265, 2142, 1630, 1594, 1579, 1513, 1448, 1326, 1313, 1300, 1220, 1164, 993, 882, 862, 784, 680, 534, 456; GC-ESI-HRMS: 142,05310; encontrado 142,05197.

3-(4-Aminofenil) propiolonitrilo (7, APN-p-NH₂).

30 ^1H RMN (400 MHz, METANOL- d_4) δ 7,26 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H), 6,51 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H); ^{13}C RMN (101 MHz, METANOL- d_4) δ 152,5, 135,1, 113,6, 105,6, 102,3, 86,3, 60,2; IR (película neta, cm^{-1}): 3431, 3333, 3211, 2250, 2132, 1632, 1599, 1513, 1438, 1303, 1178, 1043, 949, 826, 814, 526, 495, 452; GC-ESI-HRMS: 142,05310; encontrado 142,05464.

3-(o-Tolil) propiolonitrilo (8, APN-o-Me).

35 ^1H RMN (400 MHz, CLOROFORMO- d) δ 7,47 (d, $J = 7,78$ Hz, 1H), 7,28-7,36 (m, 1H), 7,18 (d, $J = 8,03$ Hz, 1H), 7,08-7,16 (m, 1H), 2,39 (s, 3H); ^{13}C RMN (101 MHz, CLOROFORMO- d) δ 143,4, 134,1, 131,8, 130,1, 126,1, 117,4, 105,6, 82,4, 66,4, 20,5; IR (película neta, cm^{-1}): 2295, 2257, 2141, 1599, 1484, 1456, 1383, 1291, 1199, 1162, 1116, 1039, 757, 711, 672, 548, 490, 452; GC-ESI-HRMS: 141,05785; encontrado 141,05926.

3-(2,6-Dimetilfenil)propiolonitrilo (9, APN-o,o'-diMe).

40 ^1H RMN (400 MHz, CLOROFORMO- d) δ 7,12-7,27 (t, $J = 7,5$ Hz, 1H), 7,01 (d, $J = 7,5$ Hz, 2H), 2,38 (s, 6H); ^{13}C RMN (101 MHz, CLOROFORMO- d) δ 143,8, 131,2, 127,3, 117,6, 105,6, 81,5, 70,2, 20,8; IR (película neta, cm^{-1}): 2923, 2856, 2261, 2138, 1732, 1595, 1468, 1381, 1265, 1168, 1033, 774, 728, 490; GC-ESI-HRMS: 155,07350; encontrado 155,07507.

3-(2-Nitrofenil)propiolonitrilo (10, APN-o-NO₂).

45 ^1H RMN (400 MHz, METANOL- d_4) δ 8,28-8,35 (m, 1H), 7,96-8,06 (m, 1H), 7,81-7,90 (m, 2H); ^{13}C RMN (101 MHz, METANOL- d_4) δ 151,9, 138,3, 135,2, 134,1, 126,6, 114,2, 105,7, 79,0, 68,6; IR (película neta, cm^{-1}): 2268, 1604, 1567, 1528, 1502, 1480, 1345, 851, 787, 744, 709, 687, 537, 491; GC-ESI-HRMS: 172,02728; encontrado 172,02869.

N-(4-(Cianoetnil)fenil)acetamida (11, APN-p-NHAc).

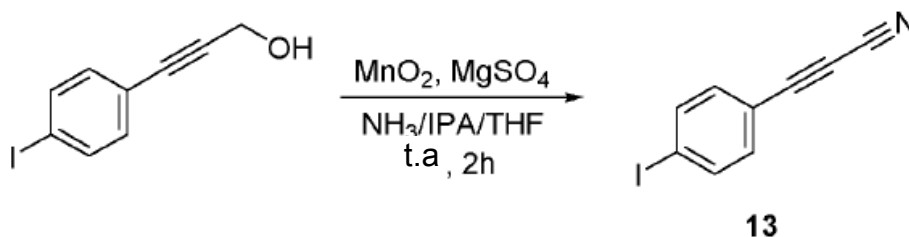
50 ^1H RMN (400 MHz, METANOL- d_4) δ 7,56-7,63 (m, $J = 8,8$ Hz, 2H), 7,49-7,56 (m, $J = 8,8$ Hz, 2H), 2,04 (s, 3H); ^{13}C RMN (101 MHz, METANOL- d_4) δ 171,9, 143,8, 135,7, 120,7, 112,8, 106,2, 84,5, 62,7, 24,1; IR (película neta, cm^{-1}):

3303, 3174, 3098, 2278, 2262, 2139, 1670, 1594, 1535, 1407, 1364, 1321, 1263, 1177, 834, 534; GC-ESI-HRMS: 184,06366; encontrado 184,06212.

4-(Cianoetil)-N-metilbenzamida (12, APN-p-CONHMe):

5 ^1H RMN (400 MHz, METANOL- d_4) δ 7,96-8,05 (m, J = 7,78 Hz, 2H), 7,85-7,93 (m, J = 7,78 Hz, 2H), 3,03 (s, 3H); ^{13}C RMN (101 MHz, METANOL- d_4) δ 169,1, 138,3, 134,9, 129,0, 121,6, 105,9, 83,0, 64,6, 28,8; IR (película neta, cm^{-1}): 3348, 2270, 1641, 1549, 1502, 1408, 1392, 1327, 1303, 1283, 1162, 854, 760, 617, 488; GC-ESI-HRMS: 184,06366; encontrado 184,06465.

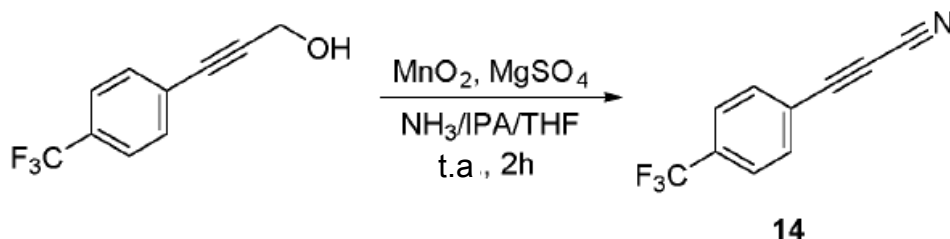
3-(4-Yodofenil) propiolonitrilo (13):



10 El producto fue sintetizado según el procedimiento general de MnO_2 -oxidación. Tiempo de reacción: 30 minutos; rendimiento: 61%.

15 ^1H RMN (400MHz, CLOROFORMO- d) δ = 7,78 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 7,32 (d, J = 8,5 Hz, 3H); ^{13}C RMN (101 MHz, CLOROFORMO- d) δ 138,1, 134,4, 116,8, 105,2, 99,2, 81,9, 64,2, El compuesto 13 se puede utilizar para el método de marcaje de acuerdo con la invención (con radioisótopo ^{125}I).

3-(4-(trifluorometil) fenil) propiolonitrilo (14):

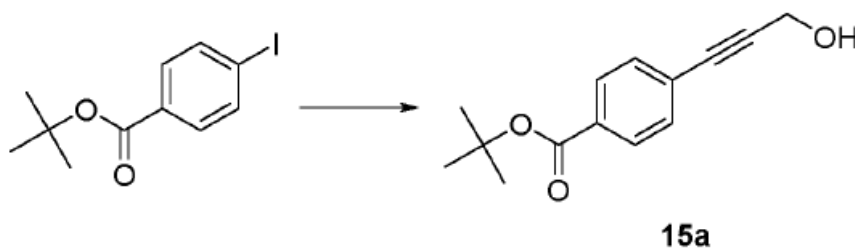


El producto fue sintetizado según el procedimiento general de MnO_2 -oxidación. Tiempo de reacción: 1 hora; rendimiento: 45%.

20 ^1H RMN (400MHz, CLOROFORMO- d) δ = 7,76 (d, J = 8,3 Hz, 2H), 7,70 (d, J = 8,3 Hz, 2H).

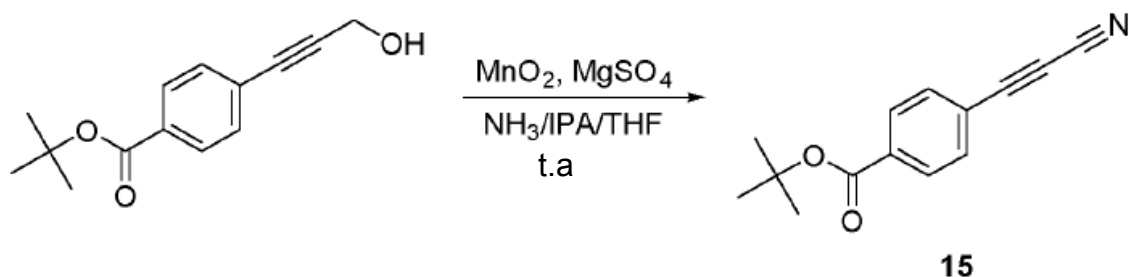
El compuesto 14 se puede utilizar para el método de marcaje de acuerdo con la invención (con radioisótopo ^{18}F).

4-(3-Hidroxiprop-1-in-1-il)benzoato de terc-butilo (15a):



25 El producto fue sintetizado según el procedimiento general B para el acoplamiento. Rendimiento: 98%. ^1H RMN (400MHz, CLOROFORMO- d) δ = 7,93 (d, J = 8,1 Hz, 2H), 7,47 (d, J = 8,1 Hz, 2H), 4,53 (s, 2H), 1,60 (s, 9H); ^{13}C RMN (101 MHz, CLOROFORMO- d) δ = 165,1, 131,7, 131,4, 129,3, 126,6, 89,8, 85,1, 81,4, 51,6, 28,1.

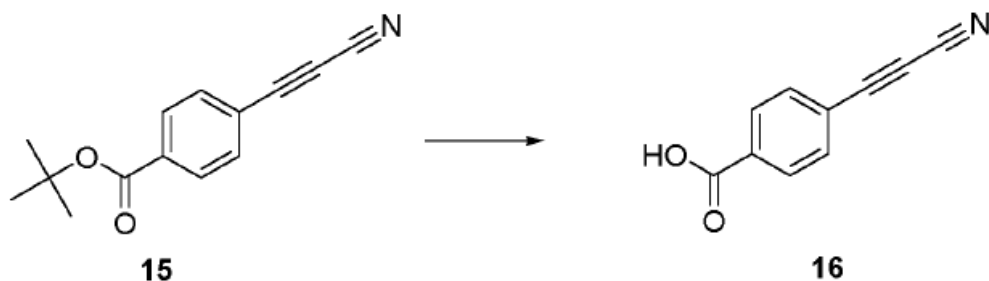
4-(Cianoetil)benzoato de terc-butilo (15):



El producto fue sintetizado según el procedimiento general de MnO_2 -oxidación. Tiempo de reacción: 15 minutos; rendimiento: 48%.

^1H RMN (400MHz, DMSO-d_6) δ = 8,00 (d, J = 8,3 Hz, 2H), 7,94 (d, J = 8,3 Hz, 2H), 1,56 (s, 9H); ^{13}C RMN (101MHz, CLOROFORMO- d) δ = 164,3, 134,8, 133,3, 129,7, 121,3, 105,2, 82,2, 81,9, 64,8, 28,1.

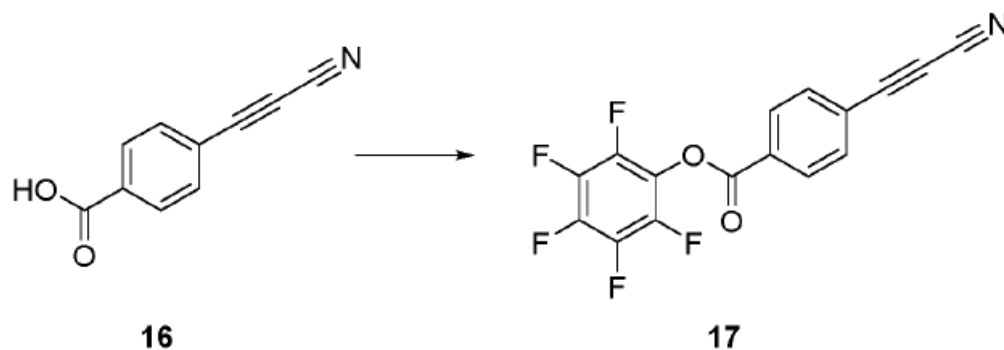
Ácido 4-(cianoetil)benzoico (16):



A la solución de 4-(2-cianoet-1-in-1-il) benzoato de terc-butilo (1 eq., 350 mg, 1,54 mmol) en MeCN (14 mL) se añadió TFA (30,6 eq., 5,372 g, 3,5 mL, 47,1 mmol). La mezcla se agitó durante 36h a t.a. y luego se filtró y se lavó con 3x2 mL de Et_2O . El precipitado consistió en ácido 4-(2-cianoet-1-in-1-il)benzoico puro (140 mg, 0,823 mmol, 53% rendimiento).

^1H RMN (400MHz, METANOL- d_4) δ = 8,12 (d, J = 8,3 Hz, 3H), 7,83 (d, J = 8,3 Hz, 2H).

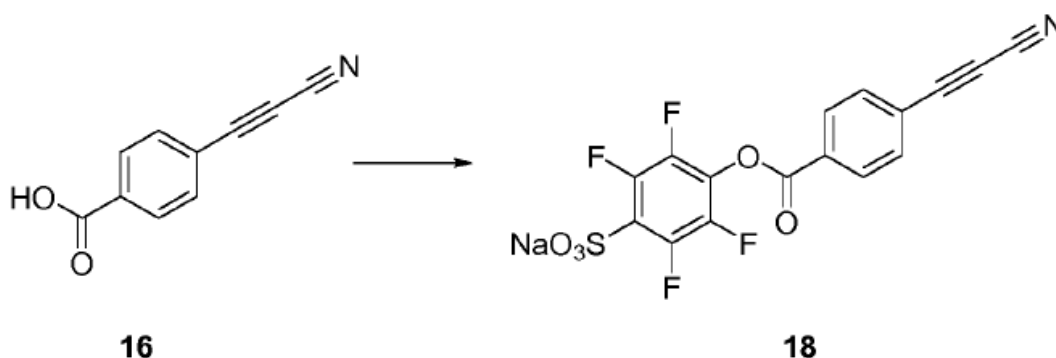
4-(Cianoetil)benzoato de perfluorofenilo (17):



La solución de pentafluorofenol (1 eq., 89,2 mg, 0,484 mmol) y ácido 4-(2-cianoet-1-in-1-il)benzoico (1 eq., 82,9 mg, 0,484 mmol) en THF (4,84 ml) se enfrió a 0°C y DCC (1 eq., 99,9 mg, 0,484 mmol) se añadió a la mezcla. La solución resultante se agitó a t.a. durante 14h, luego se filtró y se lavó con Et_2O . El filtrado se evaporó para dar 4-(2-cianoet-1-in-1-il) benzoato de pentafluorofenilo (120 mg, 0,358 mmol, 74% de rendimiento) como un sólido blanco.

^1H RMN (400MHz, DMSO-d_6) δ = 8,29 (d, J = 8,3 Hz, 2H), 8,08 (d, J = 8,3 Hz, 2H). El compuesto 17 se puede utilizar para un método de bio-conjugación según la invención.

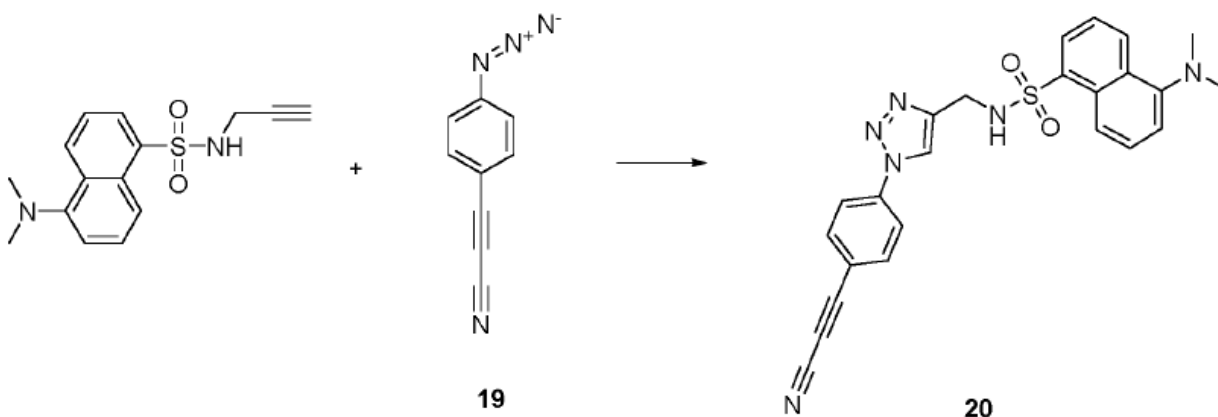
4-((4-(Cianoetil)benzoil)oxi)-2,3,5,6-tetrafluorobencenosulfonato de sodio (18):



5 A la solución del ácido 4-(2-cianoet-1-in-1-il)benzoico (1 eq., 54,2 mg, 0,317 mmol) y 2,3,5,6-tetrafluoro-4-hidroxibenceno-1-sulfonato de sodio (1 eq., 84,9 mg, 0,317 mmol) en DMF seco (0,792 mL) se añadió DCC (1 eq., 65,3 mg, 0,317 mmol). La mezcla resultante se agitó a t.a. durante 36h, luego se enfrió a 0°C, se agitó durante 1h, se filtró y se lavó con 0,8 mL de DMF seco. El filtrado se diluyó con 16 mL de Et₂O, se agitó durante 15 minutos para completar la cristalización y se filtró el precipitado para dar 4-((4-(2-cianoet-1-in-1-il)benzoil)oxi)-2,3,5,6-tetrafluorobencenosulfonato de sodio (72,5 mg, 0,172 mmol, 54% rendimiento) como un sólido blanco.

¹H RMN (400MHz, DMSO-d₆) δ = 8,31 (d, J = 6,3 Hz, 2H), 8,09 (d, J = 6,3 Hz, 2H). El compuesto 18 se puede utilizar para un método de bioconjugación según la invención.

10 N-((1-(4-(2-cianoet-1-in-1-il)fenil)-1H-1,2,3-triazol-4-il) metil)-5-(dimetilamino) naftaleno-1-sulfonamida (20):

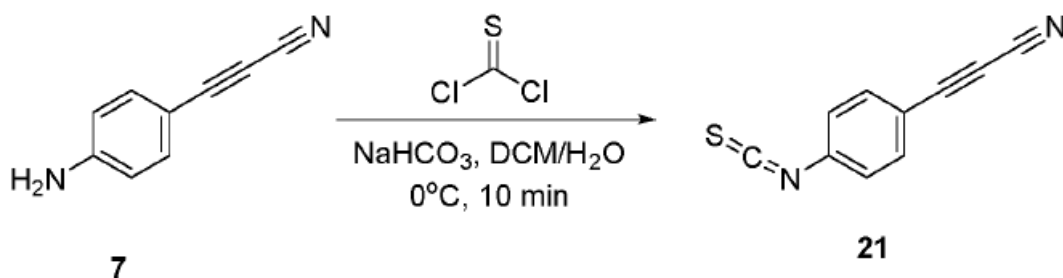


15 Fueron solubilizados 5-(dimetilamino)-N-(prop-2-in-1-il) naftaleno-1-sulfonamida (1 eq., 395 mg, 1,37 mmol) y 3-(4-azidofenil)prop-2-inenitrilo (1 eq., 230 mg, 1,37 mmol) en tBuOH (6,91 mL). A esta mezcla se añadió una solución de sulfato de cobre pentahidrato (10%, 34,2 mg, 0,137 mmol) en 0,5 mL de agua seguido de la solución de ascorbato sódico (0,5 eq., 135 mg, 0,685 mmol) en 0,5 mL de agua. La solución resultante se agitó durante 2h y luego se concentró en el evaporador rotatorio. El residuo se extrajo con DCM. La capa orgánica se lavó con solución acuosa saturada de NH₄Cl y con agua, se seco sobre MgSO₄ y se evaporó para dar 20 (544 mg, 1,19 mmol, 87% de rendimiento) como un sólido verde.

20 ¹H RMN (400MHz, DMSO-d₆) δ = 8,59 (s ancho, 1H), 8,34 (d, J = 7,3 Hz, 1H), 8,33 (s, 1H) 8,26 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 8,13 (d, J = 7,3 Hz, 1H), 8,00 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 7,83 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 7,61-7,51 (m, 2H), 7,18 (d, J = 7,5 Hz, 1H), 4,21 (s, 2H), 2,71 (s, 6H). ¹³C RMN (101MHz, DMSO-d₆) δ = 151,2, 144,8, 138,4, 135,7, 135,6, 129,4, 128,9, 128,8, 128,6, 127,8, 123,4, 121,3, 119,9, 119,0, 116,0, 114,9, 105,3, 82,5, 63,1, 44,9, 37,6.

El compuesto 20 se puede utilizar para un método de detección (con tintes, por ejemplo) según la invención.

3-(4-Isotiocianatofenil)propionitrilo (21):

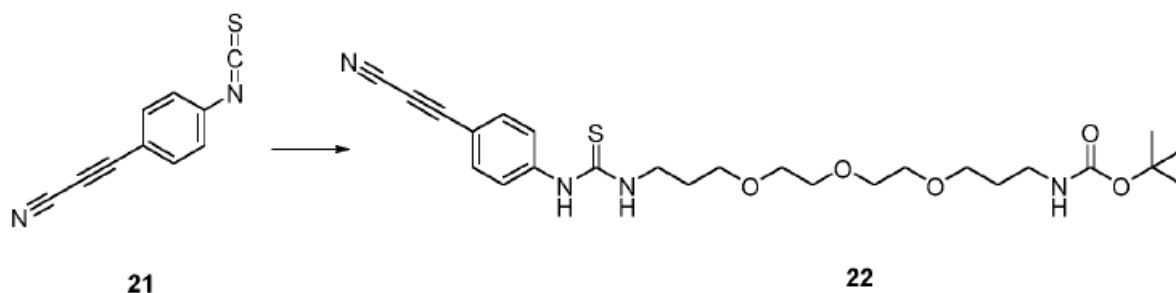


5 En un frasco de 50 mL RB, se agitó una solución de hidrogenocarbonato sódico (886 mg, 10,55 mmol) en 10 mL de agua durante 10 min y a ella se añadió diclorometano (10 mL) seguido de 3-(4-aminofenil) prop-2-inenitrilo (500 mg, 3,52 mmol). La mezcla de la reacción se enfrió a 0°C, tiósgeno (402 µl, 5,28 mmol) fue introducido gota a gota durante un período de 30 minutos y se agitó continuamente a temperatura ambiente durante 1 h. La fase orgánica fue separada y secada sobre MgSO₄ anhidro. La concentración de la solución proporcionó el compuesto 21 puro (609 mg, 3,31 mmol, 94% de rendimiento) en forma de un sólido amarillo.

¹H RMN (400MHz, ACETONITRILÓ-D₃) δ = 7,71 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 7,37 (d, J = 8,5 Hz, 2H).

El compuesto 21 se puede utilizar para un método de bioconjugación según la invención.

10 (1-((4-(Cianoetnil) fenil)amino)-1-tioxo-6,9,12-trioxa-2-azapentadecan-15-il)carbamato de terc-butilo (22):

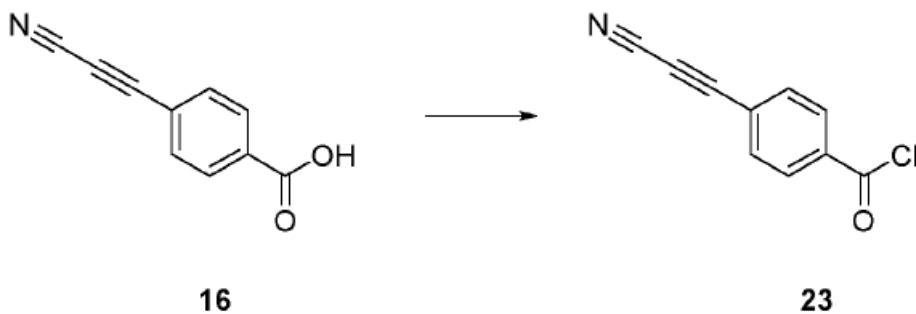


15 Se disolvió (3-(2-(2-(3-aminopropoxi)etoxi)etoxi)propil)carbamato de terc-butilo (1 eq., 91,5 mg, 0,271 mmol) en DCM (2 mL) y se enfrió a 0°C. A esta solución se añadió lentamente 3-(4-isotiocianatofenil)prop-2-inenitrilo (1 eq., 50 mg, 0,271 mmol) en 1 mL de DCM y la mezcla se agitó durante 30 min. La mezcla de la reacción fue concentrada a 1 mL y el residuo fue purificado por cromatografía ultrarrápida (gradiente de DCM/MeOH, de 100/0 a 90/10) para dar (1-((4-(cianoetnil) fenil) amino)-1-tioxo-6,9,12-trioxa-2-azapentadecan-15-il)carbamato de terc-butilo (126 mg, 0,25 mmol, 92% de rendimiento) como un aceite amarillo.

¹H RMN (400MHz, METANOL-D₄) δ = 7,66 (s, 4H), 3,65-3,54 (m, 12H), 3,50 (t, J = 6,1 Hz, 2H), 3,12 (t, J = 6,8 Hz, 2H), 1,91 (quin, J = 6,1 Hz, 2H), 1,72 (quin, J = 6,4 Hz, 2H), 1,45 (s, 9H).

20 ¹³C RMN (101MHz, METANOL-D₄) δ = 182,0, 158,5, 144,6, 135,6, 106,4, 84,8, 80,0, 71,6, 71,5, 71,3, 71,3, 70,0, 68,2, 63,0, 38,8, 31,0, 29,8, 29,0.

Cloruro de 4-(2-cianoetnil)benzoilo (23):

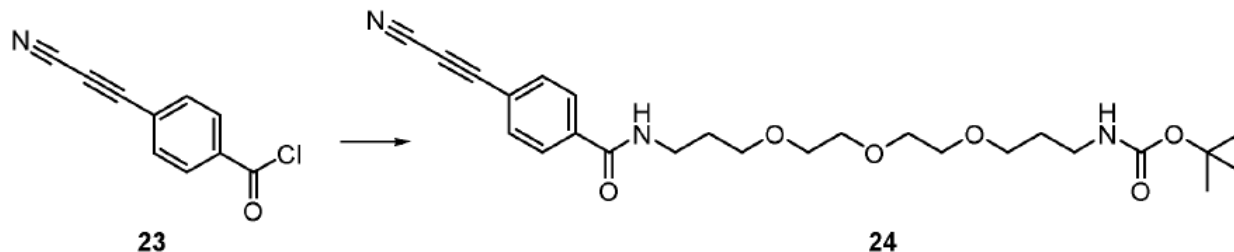


25 Se disolvió ácido 4-(2-cianoet-1-in-1-il) benzoico (1 eq., 30 mg, 0,175 mmol) en DCM (2 mL) y se añadió SOCl₂ (31,5 eq., 400 µL, 5,51 mmol). La mezcla se agitó en reflujo hasta que el sólido se disolvió por completo y luego se evaporó para dar el compuesto 23 puro (29,6 mg, 0,156 mmol, 89% de rendimiento) como un sólido blanco.

^1H RMN (400MHz, CLOROFORMO-d) δ = 8,08 (d, J = 8,3 Hz, 2H), 7,67 (d, J = 8,3 Hz, 2H).

El compuesto 23 se puede utilizar para un método de bioconjugación según la invención.

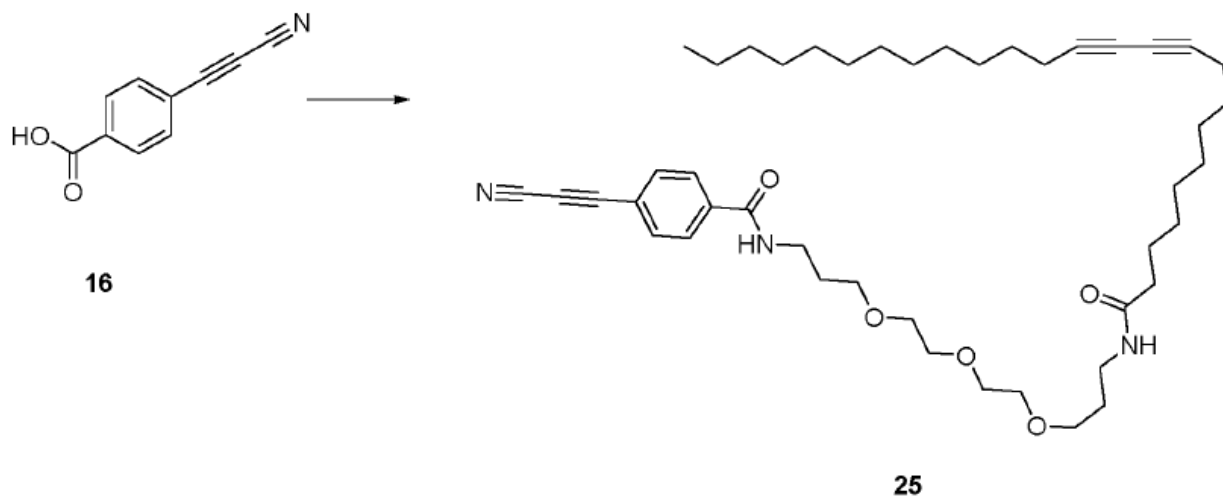
(1-(4-(Cianoetil) fenil)-1-oxo-6,9,12-trioxa-2-azapentadecan-15-il) carbamato de terc-butilo (24):



- 5 Se disolvieron (3-(2-(2-(3-aminopropoxi)etoxi)etoxi)propil)carbamato de terc-butilo (1 eq., 50 mg, 0,156 mmol) y NEt_3 (5 eq., 78,9 mg, 0,108 mL, 0,78 mmol) en 1 mL de DCM y se enfriaron a -78°C . A esta solución se añadió lentamente el compuesto 23 (1 eq., 29,6 mg, 0,156 mmol) en 1 mL de DCM. La mezcla se calentó gradualmente a t.a. y se agitó durante 2h. La mezcla de la reacción entonces fue inyectada en una columna de cromatografía ultrarrápida y se eluyó con DCM/MeOH (gradiente de 100/0 a 90/10) para dar el compuesto 24 puro (40,6 mg, 0,086 mmol, 55%) como un aceite amarillo.

^1H RMN (400MHz, METANOL- d_4) δ = 7,92 (d, J = 8,3 Hz, 2H), 7,82 (d, J = 8,3 Hz, 2H), 3,72-3,45 (m, 14H), 3,12 (t, J = 6,8 Hz, 2H), 1,90 (quin, J = 6,3 Hz, 2H), 1,72 (quin, J = 6,4 Hz, 2H), 1,44 (s, 9H).

4-(Cianoetil)-N-(15-oxo-4,7,10-trioxa-14-azonotriacont-24,26-diyn-1-il)benzamida (25):

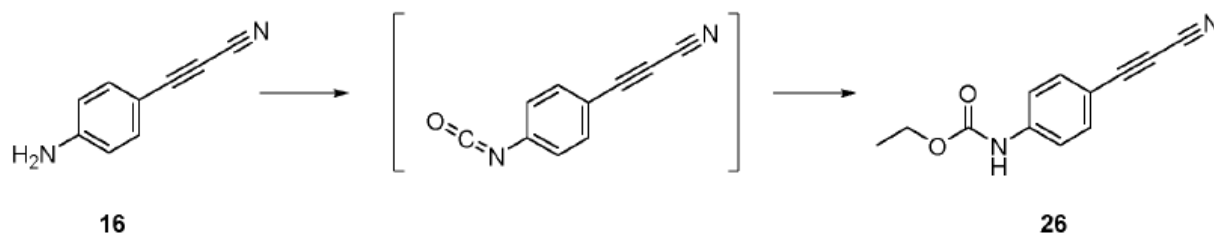


- 15 Fue suspendido el ácido 4-(2-cianoetil)benzoico (1 eq., 29,7 mg, 0,173 mmol) en DCM y fue agregado SOCl_2 (39,8 eq., 820 mg, 0,5 mL, 6,89 mmol). La mezcla se agitó a reflujo durante 1,5 h, se evaporó, se disolvió en DCM, y se añadió a la solución de N-(3-{2-[2-(3-aminopropoxi)etoxi]etoxi}propil)pentacos-10,12-diynamida (1 eq., 100 mg, 0,173 mmol) y TEA (4 eq., 70,2 mg, 0,0964 mL, 0,693 mmol) en DCM a -78°C . La mezcla resultante se agitó a t.a. durante 1h y se evaporó. El residuo fue purificado por cromatografía ultrarrápida (DCM/MeOH: de 10/0 a 9/1) para dar el producto deseado (35,4 mg, 0,0485 mmol, rendimiento del 28%) como un aceite amarillo.

^1H RMN (400MHz, CLOROFORMO-d) δ = 7,90 (d, J = 8,3 Hz, 2H), 7,67 (d, J = 8,3 Hz, 2H), 7,48 (s ancho, 1H), 6,18 (s ancho, 1H), 3,71-3,45 (m, 14H), 3,32 (t, J = 6,0 Hz, 2H), 2,23 (t, J = 6,8 Hz, 4H), 2,15 (t, J = 7,5 Hz, 2H), 1,90 (td, J = 6,0, 11,7 Hz, 2H), 1,73 (quin, J = 6,1 Hz, 2H), 1,65-1,42 (m, 6H), 1,41-1,32 (m, 4H), 1,32-1,19 (m, 22H), 0,88 (t, J = 6,8 Hz, 3H).

- 25 El compuesto 25 se puede utilizar para el método de marcaje (como el fotomarcaje) de acuerdo con la invención o para los compuestos de unión y/o inmovilización.

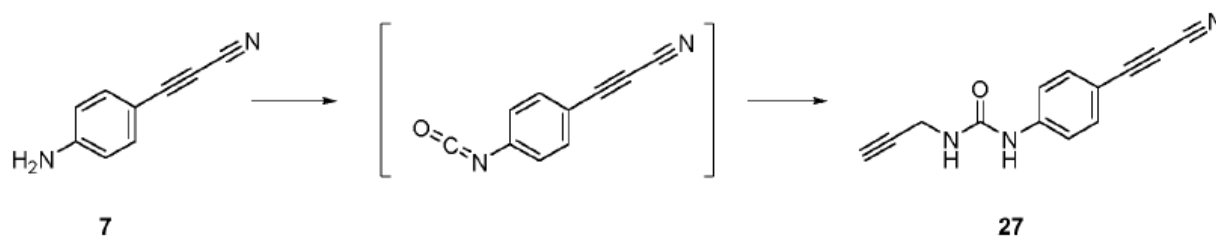
(4-(Cianoetil)fenil)carbamato de etilo (26):



5 A una solución de trifosgeno (1 eq., 49,5 mg, 27,8 μ l, 0,167 mmol) en DCM (4 ml) se agregó una solución de 3-(4-aminofenil) prop-2-inenitrilo (3 eq., 71,1 mg, 0,5 mmol) en DCM (1 ml). Luego se añadió gota a gota trietilamina (6 eq., 101 mg, 138 μ L, 1 mmol) en 1 mL de DCM. La mezcla se agitó durante 15 min permitiendo la formación del intermedio de isocianato y luego se añadió en forma de gotas etanol (0,1 mL). La mezcla de reacción se agitó durante 1h y luego se lavó con 2x5mL de agua y se evaporó. El residuo fue purificado mediante cromatografía ultrarrápida para dar (4-(cianoetnil) fenil)carbamato de etilo (102 mg, 0,48 mmol, 96% de rendimiento) como un sólido blanco.

10 ^1H RMN (400MHz, CLOROFORMO-d) δ = 7,56 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 7,46 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 6,79 (s ancho, 1H), 4,26 (q, J = 7,0 Hz, 2H), 1,33 (t, J = 7,0 Hz, 3H).

1-(4-(Cianoetnil)fenil)-3-(prop-2-in-1-il)urea (27):

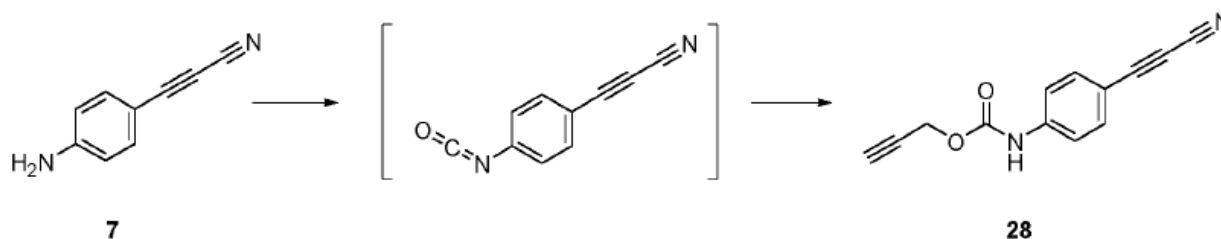


15 A una solución de trifosgeno (1 eq., 49,5 mg, 27,8 μ l, 0,167 mmol) en DCM (2 ml) se agregó una solución de 3-(4-aminofenil) prop-2-inenitrilo (3 eq., 71,1 mg, 0,5 mmol) en DCM (3 ml). Luego se añadió trietilamina (6 eq., 101 mg, 138 μ L, 1 mmol), la mezcla se agitó durante 5 min y luego se añadió propargilamina (4,69 eq., 43 mg, 50,1 μ L, 0,782 mmol) y trietilamina (2 eq., 33,7 mg, 46,3 μ L, 0,333 mmol) en 1 mL de DCM. La mezcla de la reacción fue agitada durante 1 h, entonces se lavó con 5mL de agua, se secó sobre MgSO_4 y se concentró. El residuo fue purificado por cromatografía ultrarrápida (gradiente de DCM/MeOH) para dar 1-(4-(cianoetnil)fenil)-3-(prop-2-in-1-il)urea (94,9 mg, 0,425 mmol, 85% rendimiento) como un sólido blanco.

20 ^1H RMN (400MHz, METANOL- d_4) δ = 7,60 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 7,52 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 4,00 (d, J = 2,4 Hz, 2H), 2,61 (t, J = 2,4 Hz, 1H).

El compuesto 27 se puede utilizar para la química click según la invención.

(4-(Cianoetnil)fenil)carbamato de prop-2-in-1-ilo (28):



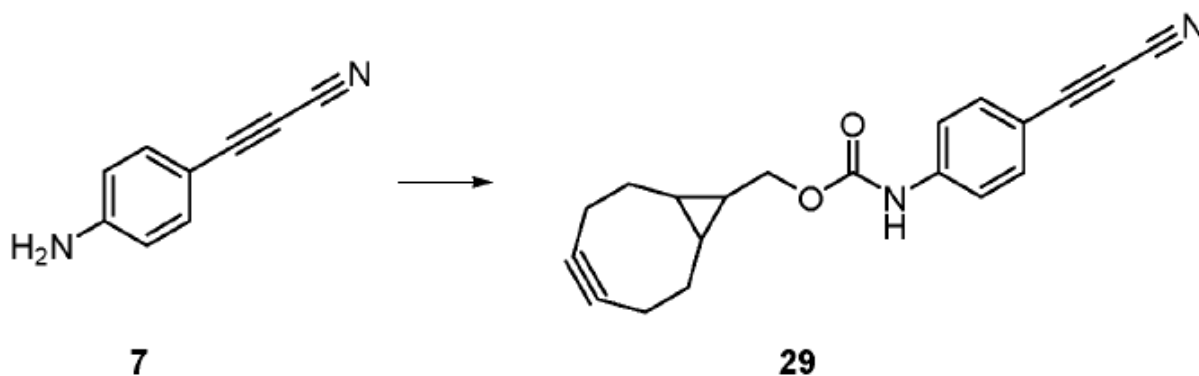
25 A una solución de trifosgeno (1 eq., 49,5 mg, 27,8 μ l, 0,167 mmol) en DCM (2 ml) se agregó una solución de 3-(4-aminofenil) prop-2-inenitrilo (3 eq., 71,1 mg, 0,5 mmol) en DCM (3 ml). Luego se añadió trietilamina (6 eq., 101 mg, 138 μ L, 1 mmol). La mezcla se agitó durante 5 min y luego se agregaron 2-propyn-1-ol (6 eq., 56,1 mg, 59,1 μ L, 1 mmol) y trietilamina (2 eq., 33,7 mg, 46,3 μ L, 0,333 mmol) en 1 mL de DCM. La mezcla de la reacción fue agitada durante 1 h, entonces se lavó con 5mL de agua, se secó sobre MgSO_4 y se concentró. El residuo fue purificado por cromatografía ultrarrápida (gradiente Ciclohexano/EtOAc) para dar (4-(cianoetnil) fenil) carbamato de prop-2-in-1-ilo (104 mg, 0,465 mmol, 93% rendimiento) como un sólido blanco.

30

^1H RMN (400MHz, CLOROFORMO-d) δ = 7,57 (d, J = 8,6 Hz, 2H), 7,48 (d, J = 8,6 Hz, 2H), 4,80 (d, J = 2,3 Hz, 2H), 2,54 (t, J = 2,3 Hz, 1H).

El compuesto 28 se puede utilizar para la química click según la invención.

(4-(Cianoetnil)fenil)carbamato de biciclo[6,1,0]no-4-in-9-ilmetilo (29):



5

10

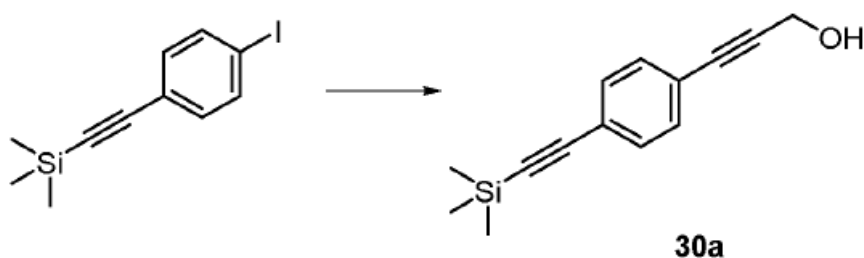
A una solución de trifosgeno (1 eq., 34,8 mg, 19,5 μl , 0,117 mmol) en DCM (4 ml) se agregó una solución de 3-(4-aminofenil)prop-2-inenitrilo (3 eq., 50 mg, 0,352 mmol) en DCM (1 ml). Luego se añadió trietilamina (6 eq., 71,2 mg, 97,8 μl , 0,703 mmol) gota a gota. La mezcla se agitó durante 5 min a t.a. y luego se añadió biciclo[6,1,0]non-4-in-9-ilmetanol (3 eq., 52,8 mg, 0,352 mmol) y trietilamina (2 eq., 23,7 mg, 32,6 μl , 0,234 mmol) en 1 mL de DCM. La mezcla de reacción se agitó a t.a. por 2 horas. Después de que la conversión completa fuera confirmada por HPLC la mezcla fue concentrada a un volumen de 1 mL y purificada por cromatografía ultrarrápida (gradiente de Ciclohexano/EtOAc) para dar (4-(cianoetnil) fenil) carbamato de biciclo[6,1,0]non-4-in-9-ilmetilo (68,3 mg, 0,215 mmol, 183 %) como un sólido blanco.

15

^1H RMN (400MHz, CLOROFORMO-d) δ = 7,55 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 7,47 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 7,09 (s ancho, 1H), 2,38-2,14 (m, 6H), 1,67-1,51 (m, 2H), 1,42 (quin, J = 8,7 Hz, 1H), 1,04-0,91 (m, 2H).

El compuesto 29 se puede utilizar para la química click (tal como click promovida por saturación) según la invención.

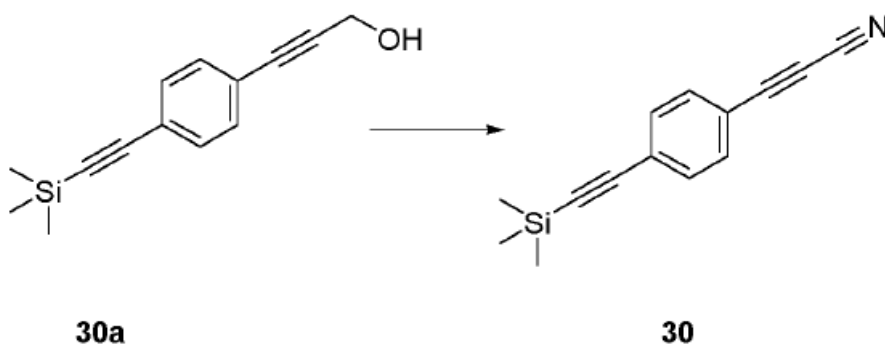
3-(4-((Trimetilsilil) etinil) fenil) prop-2-in-1-ol (30a):



20

El producto fue sintetizado según el procedimiento general B para el acoplamiento. Rendimiento: 99%. ^1H RMN (400MHz, CLOROFORMO-d) δ = 7,41 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 7,36 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 4,50 (d, J = 5,5 Hz, 2H), 1,89 (t, J = 5,5 Hz, 1H), 0,25 (s, 9H).

3-(4-((Trimetilsilil) etinil) fenil) propiolonitrilo (30):

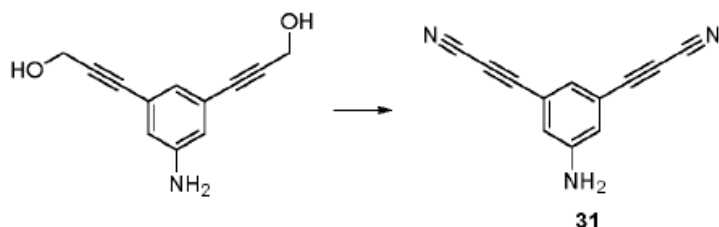


El producto fue sintetizado según el procedimiento general de MnO_2 -oxidación. Tiempo de reacción: 3 horas; rendimiento: 29%.

^1H RMN (400MHz, CLOROFORMO-d) δ = 7,55 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 7,48 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 0,27 (s, 9H).

^{13}C RMN (101MHz, CLOROFORMO-d) δ = 133,2, 132,2, 126,9, 117,1, 105,3, 103,4, 99,4, 82,3, 64,5, -0,3,

5 3,3'-(5-Amino-1,3-fenilen)dipropiolonitrilo (31):



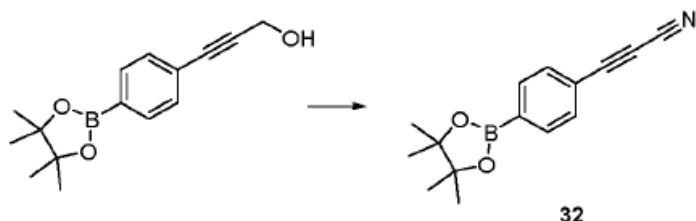
El producto fue sintetizado según el procedimiento general de MnO_2 -oxidación. Tiempo de reacción: 3 horas; rendimiento: 11%.

^1H RMN (400MHz, CLOROFORMO-d) δ = 7,20 (t, J = 1,3 Hz, 1H), 6,98 (d, J = 1,3 Hz, 2H), 4,02 (s ancho, 2H).

10 ^{13}C RMN (101MHz, CLOROFORMO-d) δ = 147,1, 127,5, 121,6, 119,5, 105,0, 81,0, 63,6.

El compuesto 31 se puede utilizar para el re-punteado (diAPN) según la invención.

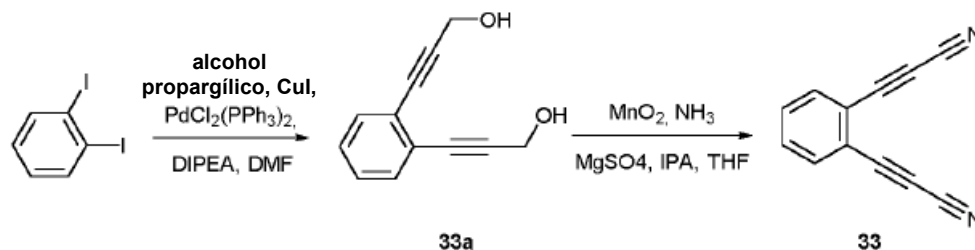
3-(4-(4,4,5,5-Tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenil)propiolonitrilo (32):



15 El producto fue sintetizado según el procedimiento general de MnO_2 -oxidación. Tiempo de reacción: 4 horas; rendimiento: 63%.

^1H RMN (400MHz, CLOROFORMO-d) δ = 7,84 (d, J = 8,2 Hz, 2H), 7,60 (d, J = 8,2 Hz, 2H), 1,36 (s, 12H).

3,3'-(1,2-Fenilen)dipropiolonitrilo (33):



33a: 3,3'-(1,2-Fenilen) bis (prop-2-in-1-ol).

20 A la solución desgasificada de 1,2-diyodobenceno (1 eq., 661 mg, 0,262 ml, 2 mmol) y alcohol propargílico (2,3 eq., 272 μl , 4,61 mmol) en amina butílica (15,8 ml), fue añadido $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (4%, 92,6 mg, 0,0801 mmol) y la masa de reacción obtenida se sometió a reflujo durante la noche. Los disolventes se evaporaron y el producto crudo obtenido fue purificado por cromatografía ultrarrápida (20 minutos de gradiente EtOAc/ciclohexano) para producir el compuesto 33a (150 mg, 0,8 mmol, 40%) como un sólido pardusco.

25 ^1H RMN (400 MHz, METANOL- d_4) δ 7,38-7,53 (m, 2H), 7,25-7,38 (m, 2H), 4,48 (s, 4H); ^{13}C RMN (101 MHz, METANOL- d_4) δ 135,6, 131,9, 129,2, 95,6, 86,6, 53,9; ESI-MS: $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{O}_2^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 187,1; encontrado 187,1.

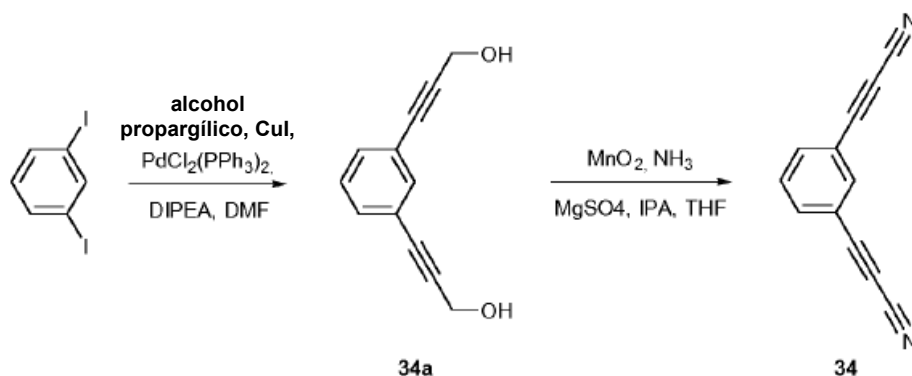
33: 3,3'-(1,2-Fenileno)dipropiolonitrilo.

El compuesto se obtuvo como el único producto del protocolo estándar de MnO₂-oxidación. Tiempo de reacción: 75 minutos. Sólido marrón, rendimiento: 42%.

¹H RMN (400 MHz, METANOL-d₄) δ 7,89 (dd, J = 3,30, 5,80 Hz, 2H), 7,73 (dd, J = 3,30, 5,80 Hz, 2H); ¹³C RMN (101 MHz, METANOL-d₄) δ 136,0, 133,5, 126,5, 105,5, 80,2, 67,2; GC-ESI-MS: C₁₂H₅N₂⁺ [M+H]⁺, 177,0; encontrado 177,0.

5

3,3'-(1,3-Fenilen)dipropiolonitrilo (34):



34a: 3,3'-(1,3-Fenilen)bis(prop-2-in-1-ol).

El mismo procedimiento que para la síntesis de 33a. Sólido pardusco, rendimiento: 55%.

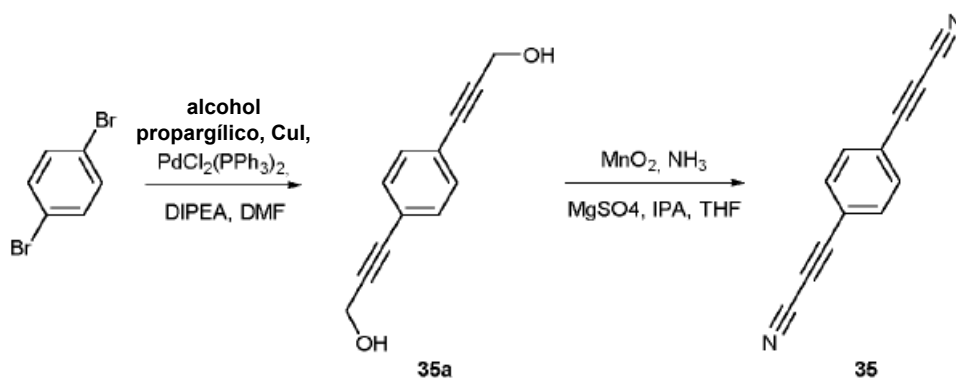
10 ¹H RMN (400 MHz, METANOL-d₄) δ 7,47 (s, 1H), 7,36-7,43 (m, 2H), 7,29-7,36 (m, 1H), 4,41 (s, 4H); ¹³C RMN (101 MHz, METANOL-d₄) δ 135,3, 132,5, 129,8, 124,8, 89,7, 84,5, 51,2; ESI-MS: C₁₂H₁₁O₂⁺ [M+H]⁺, 187,1; encontrado 187,0.

34: 3,3'-(1,3-Fenilen)dipropiolonitrilo.

15 El compuesto se obtuvo como el único producto del protocolo estándar de MnO₂-oxidación. Tiempo de reacción: 2 horas. Sólido marrón, rendimiento: 35%.

¹H RMN (400 MHz, METANOL-d₄) δ 8,10 (d, J = 1,50 Hz, 1H), 7,93 (dd, J = 1,50, 8,00 Hz, 1H), 7,63 (t, J = 8,00 Hz, 2H); ¹³C RMN (101 MHz, METANOL-d₄) δ 139,3, 137,8, 131,2, 120,0, 105,7, 81,7, 64,2; GC-ESI-MS: C₁₂H₅N₂⁺ [M+H]⁺, 177,0; encontrado 177,1.

3,3'-(1,4-Fenilen) dipropiolonitrilo (35):



20

35a: 3,3'-(1,4-Fenilen)bis(prop-2-in-1-ol).

El mismo procedimiento que para la síntesis de 33a, pero reflujo por 72 horas. Sólido pardusco, rendimiento: 35%.

¹H RMN (400 MHz, METANOL-d₄) δ 7,39 (s, 4H), 4,41 (s, 4H); ¹³C RMN (101 MHz, METANOL-d₄) δ 132,6, 124,3, 101,4, 90,8, 84,9, 51,2; ESI-MS: C₁₂H₁₁O₂⁺ [M+H]⁺, 187,1; encontrado 187,1.

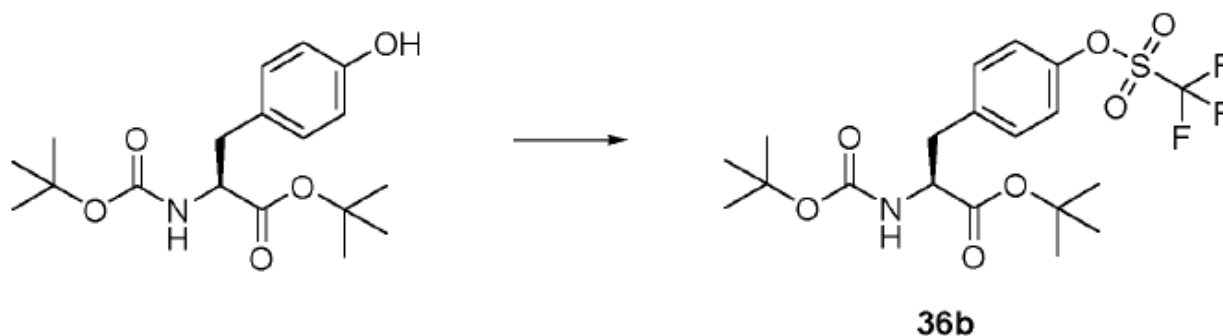
25 35: 3,3'-(1,4-Fenilen) dipropiolonitrilo.

El compuesto se obtuvo como el único producto del protocolo estándar MnO₂-oxidación. Tiempo de reacción: 2 horas. Sólido marrón, rendimiento: 19%.

¹H RMN (400 MHz, METANOL-d₄) δ 7,94 (s, 4H); ¹³C RMN (101 MHz, METANOL-d₄) δ 135,0, 121,6, 105,5, 82,0, 65,9; GC-ESI-MS: C₁₂H₅N₂⁺ [M+H]⁺, 177,0; encontrado 177,0.

5 Los compuestos 33-35 se pueden utilizar para el re-punteado (diAPN) según la invención.

(S)-2-((Terc-butoxicarbonil) amino)-3-(4-(((trifluorometil)sulfonil)fenil)propanoato de terc-butilo (36B):

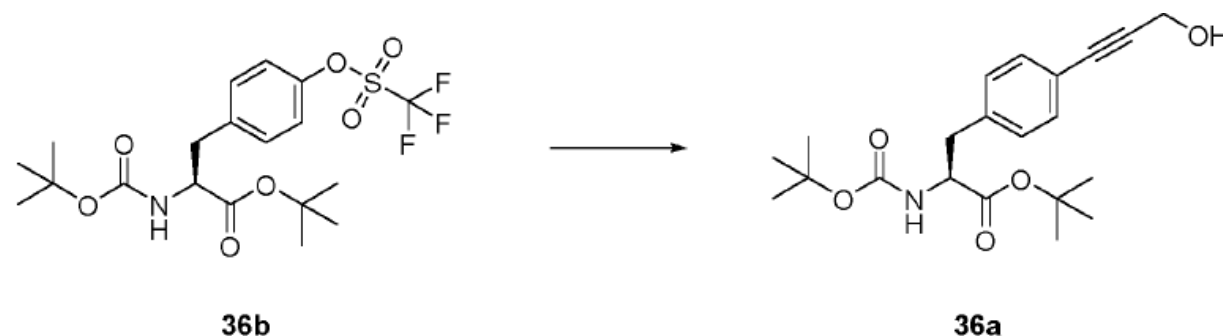


10 A una solución enfriada a 0°C de 2-[[((terc-butoxi)carbonil)amino]-3-(4-hidroxifenil)propanoato de terc-butilo (1 eq., 518 mg, 1,54 mmol) en piridina (2,5 ml), se añadió gota a gota anhídrido triflico (1,1 eq., 476 mg, 0,28 ml, 1,69 mmol) durante 20 minutos (utilizando prensatelas para jeringa). La solución oscura resultante se calentó hasta la temperatura ambiente, se vertió en agua (10 mL) y se extrajo con éster de etilo (15 mL). El extracto de éter se lavó secuencialmente con agua (5 mL), en HCl (2x5 mL), agua (5 mL), salmuera (5 mL), se secó sobre MgSO₄, y se evaporó para dar al producto objetivo (614 mg, 1,31 mmol, 85%) como un aceite de color rojo oscuro. El producto se utilizó en el siguiente paso sin más purificación.

15 ¹H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ 7,03-7,18 (m, 3H), 6,82-7,03 (m, 2H), 4,87 (d, J = 7,28 Hz, 1H), 4,24 (d, J = 7,03 Hz, 1H), 2,65-2,95 (m, 2H), 1,17 (s, 9H), 1,21 (s, 9H).

¹³C RMN (101 MHz, CLOROFORMO-d) δ 170,5, 148,5, 137,3, 131,3, 121,1, 120,3, 117,1, 82,5, 80,0, 54,7, 38,1, 28,3, 27,9.

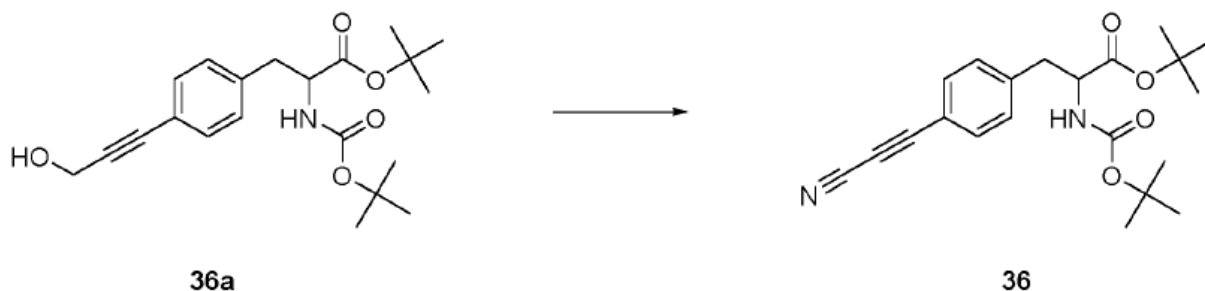
(S)-2-((Terc-butoxicarbonil) amino)-3-(4-(3-hidroxi-prop-1-in-1-il) fenil)propanoato de terc-butilo (36a):



20 A una solución de fenoltriflato (1 eq., 136 mg, 0,291 mmol) en morfolina (1 mL) fueron posteriormente agregados PdCl₂(PPh₃)₂ (5%, 10,2 mg, 0,0145 mmol), CuI (10%, 5,53 mg, 0,0291 mmol), y alcohol propargílico (2 eq., 32,6 mg, 0,0343 mL, 0,581 mmol). La mezcla de reacción obtenida se desgasificó y se calentó a 60°C durante 24 horas. La solución negra resultante se vertió en agua (10 mL), se extrajo con EtOAc (3x10 mL). Las capas orgánicas unidas se lavaron con HCl 1N (2x10 mL), agua (1x10 mL), se secaron sobre MgSO₄ y se evaporaron para dar el producto crudo, que después de la purificación por cromatografía ultrarrápida dio el producto objetivo (8,73 mg, 0,0232 mmol, 8%) como un sólido amarillento.

25 ¹H RMN (400 MHz, METANOL-d₄) δ 7,30-7,45 (m, J = 7,78 Hz, 2H), 7,14-7,30 (m, J = 8,03 Hz, 2H), 4,40 (s, 2H), 4,18-4,32 (m, 1H), 3,06 (dd, J = 6,27, 13,80 Hz, 1H), 2,91 (dd, J = 8,66, 13,68 Hz, 1H), 1,45-1,53 (m, 1H), 1,42 (d, J = 3,26 Hz, 19H).

2-((Terc-butoxicarbonil) amino)-3-(4-(cianoetil) fenil)propanoato de terc-butilo (36):



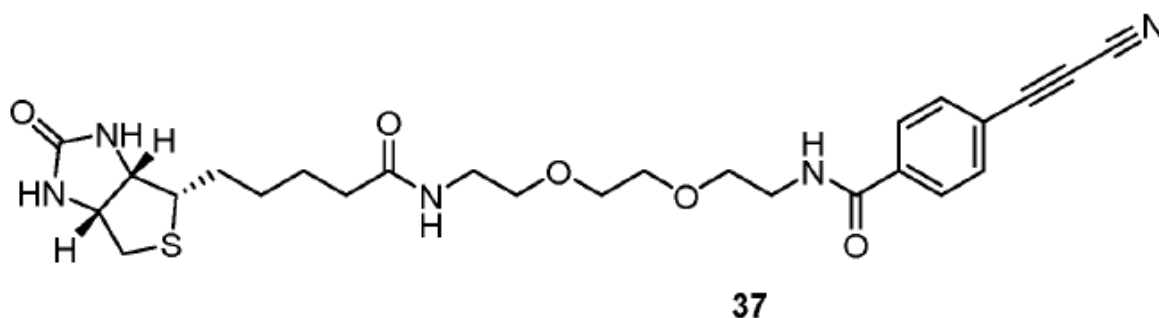
El producto fue sintetizado según el procedimiento general de MnO_2 -oxidación. Tiempo de reacción: 2 horas; rendimiento: 56%.

1H RMN (400MHz, CLOROFORMO-d) δ = 7,54 (d, J = 8,2 Hz, 2H), 7,24 (d, J = 8,2 Hz, 2H), 5,05 (d, J = 7,3 Hz, 1H), 4,46 (td, J = 6,1, 7,3 Hz, 1H), 3,14 (dd, J = 6,1, 13,7 Hz, 1H), 3,05 (dd, J = 6,1, 13,7 Hz, 1H), 1,42 (s, 9H), 1,41 (s, 9H).

^{13}C RMN (101MHz, CLOROFORMO-d) δ = 170,3, 154,9, 141,4, 133,4, 130,1, 115,9, 105,5, 82,9, 82,5, 79,9, 63,2, 54,5, 38,8, 28,3, 27,9.

El compuesto 36 se puede utilizar para la purificación y/o la inmovilización según la invención.

4-(Cianoetil)-N-(2-(2-(2-(5-((3aS,4S,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-diimidazol-4-il)etoxi)etoxi)etil)benzamida (37)

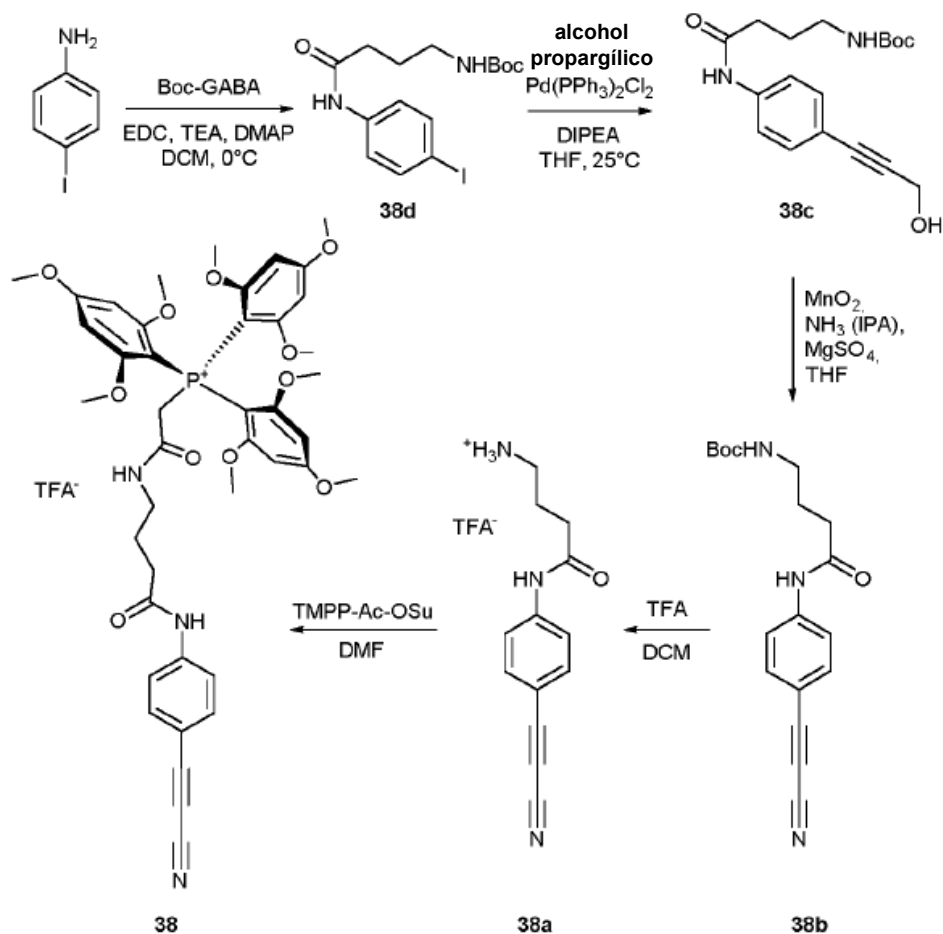


A la solución de N-(2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etil)-5-((3aS,4S,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanamida (1 eq., 222 mg, 0,593 mmol) en DMF seco (1 mL) fue añadido el 4-((4-(cianoetil)benzoil)oxi)-2,3,5,6-tetrafluorobencenosulfonato de sodio (1,2 eq., 300 mg, 0,712 mmol) y DIEA (5,1 eq., 391 mg, 0,5 mL, 3,03 mmol). La mezcla se agitó a t.a. durante 3 horas y luego se purificó por HPLC semi-preparativa para dar el producto deseado (68,8 mg, 0,13 mmol, 22% de rendimiento) como un aceite amarillo.

1H RMN (400MHz, METANOL-d₄) δ = 7,92 (d, J = 8,5 Hz, 2 H), 7,81 (d, J = 8,5 Hz, 2 H), 4,49 (dd, J = 4,8, 7,8 Hz, 1 H), 4,30 (dd, J = 4,5, 7,8 Hz, 1 H), 3,71-3,56 (m, 8 H), 3,54 (t, J = 5,5 Hz, 2 H), 3,34 (t, J = 5,5 Hz, 2 H), 3,24-3,14 (m, 1 H), 2,92 (dd, J = 4,8, 12,8 Hz, 1 H), 2,70 (d, J = 12,8 Hz, 1 H), 2,19 (t, J = 7,4 Hz, 2 H), 1,78-1,50 (m, 4 H), 1,48-1,35 (m, 2 H).

^{13}C RMN (101MHz, METANOL-d₄) δ = 176,3, 168,8, 166,2, 138,9, 135,0, 129,1, 121,5, 105,9, 83,1, 71,5, 71,4, 70,7, 70,6, 64,6, 63,5, 61,8, 57,1, 41,2, 40,4, 36,9, 29,9, 29,6, 27,0.

Trifluoroacetato de 2-((4-(4-(cianoetil)fenil)amino)-4-oxobutil)-amino)-2-oxoetil)tris(2,4,6-trimetoxifenil)fosfonio (38):



38d: (4-((4-Yodofenil)amino)-4-oxobutil)carbamato de terc-butilo.

A la solución enfriada a 0°C de Boc-GABA (1 eq., 0,928 g, 4,57 mmol), se añadieron TEA (3 eq., 1,39 g, 1,9 mL, 13,7 mmol) y DMAP (0,05 eq., 0,0279 g, 0,228 mmol) en DCM (11,7 mL), EDC (1 eq., 0,875 g, 4,57 mmol). La masa de reacción obtenida se agitó durante otros 10 minutos a 0°C, se retiró el baño de hielo, y se añadió p-yodoanilina (1 eq., 1 g, 4,57 mmol) y se dejó la reacción durante la noche a 25°C. La masa de reacción obtenida se lavó con HCl 1M (2x20 mL), agua (1x20 mL), y se secó sobre Na₂SO₄ para dar el compuesto 38d (1125 mg, 2,79 mmol, 61%), que se utilizó sin más purificación.

¹H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ 9,04 (s ancho, 1H), 7,58-7,72 (m, J = 8,50 Hz, 2H), 7,37-7,51 (m, J = 8,50 Hz, 2H), 4,81 (s ancho, 1H), 3,27 (m, 2H), 2,30-2,50 (m, 2H), 1,88 (m, 2H), 1,49 (s, 9H); ¹³C RMN (101 MHz, CLOROFORMO-d) δ 174,2, 157,4, 137,8, 120,9, 120,0, 87,3, 77,0, 33,1, 32,8, 28,4, 26,0; ESI-MS: C₁₅H₂₂N₂O₃⁺ [M+H]⁺, 405,0; encontrado 405,1.

38c: (4-((4-(3-Hidroxiprop-1-in-1-il) fenil)-amino)-4-oxobutil)carbamato de terc-butilo.

Sintetizado siguiendo el Protocolo B para el acoplamiento de Sonogashira. Sólido amarillento, rendimiento: 79%.

¹H RMN (400 MHz, METANOL-d₄) δ 7,54-7,58 (m, J = 8,50 Hz, 2H), 7,34-7,38 (m, J = 8,50 Hz, 2H), 4,40 (s, 2H), 3,13 (t, J = 6,90 Hz, 2H), 2,41 (t, J = 7,40 Hz, 2H), 1,81-1,89 (m, 2H), 1,44 (s, 9H); ¹³C RMN (101 MHz, METANOL-d₄) δ 174,0, 158,6, 140,1, 133,2, 120,8, 119,5, 88,3, 85,3, 80,1, 51,3, 40,9, 35,3, 28,8, 27,1; ESI-MS: C₁₈H₂₅N₂O₄⁺ [M+H]⁺, 332,1; encontrado 332,0.

38b: (4-((4-(Cianoetil) fenil) amino)-4-oxobutil)carbamato de terc-butilo.

Sintetizado utilizando el protocolo estándar de MnO₂-oxidación. Tiempo de reacción: 1 hora. Sólido blanco, rendimiento: 85%.

¹H RMN (400 MHz, METANOL-d₄) δ 7,61-7,65 (m, J = 8,80 Hz, 2H), 7,54-7,59 (m, J = 8,50 Hz, 2H), 3,04 (t, J = 6,85 Hz, 2H), 2,34 (t, J = 7,40 Hz, 2H), 1,74-1,81 (m, 2H), 1,34 (s, 9H); ¹³C RMN (101 MHz, METANOL-d₄) δ 174,3, 159,1,

143,8, 135,7, 120,8, 112,8, 106,3, 84,6, 62,7, 40,8, 35,3, 34,8, 28,8, 26,9; ESI-MS: $C_{18}H_{22}N_3O_3^+$ $[M+H]^+$, 328,1; encontrado 328,1.

38a: Trifluoroacetato de 4-((4-(Cianoetil) fenil) amino)-4-oxobutan-1-amino.

5 Se añadió una suspensión de 38b (1 eq., 62,8 mg, 0,192 mmol) en DCM (1 mL), TFA (20 eq., 285 μ L, 3,83 mmol) y la solución obtenida se agitó a 25°C durante 30 minutos. El producto objetivo 38a (sal de TFA, 65,0 mg, 0,19 mmol, 99%) fue obtenido después de la evaporación de la masa de la reacción y fue utilizado sin purificación adicional en el paso siguiente.

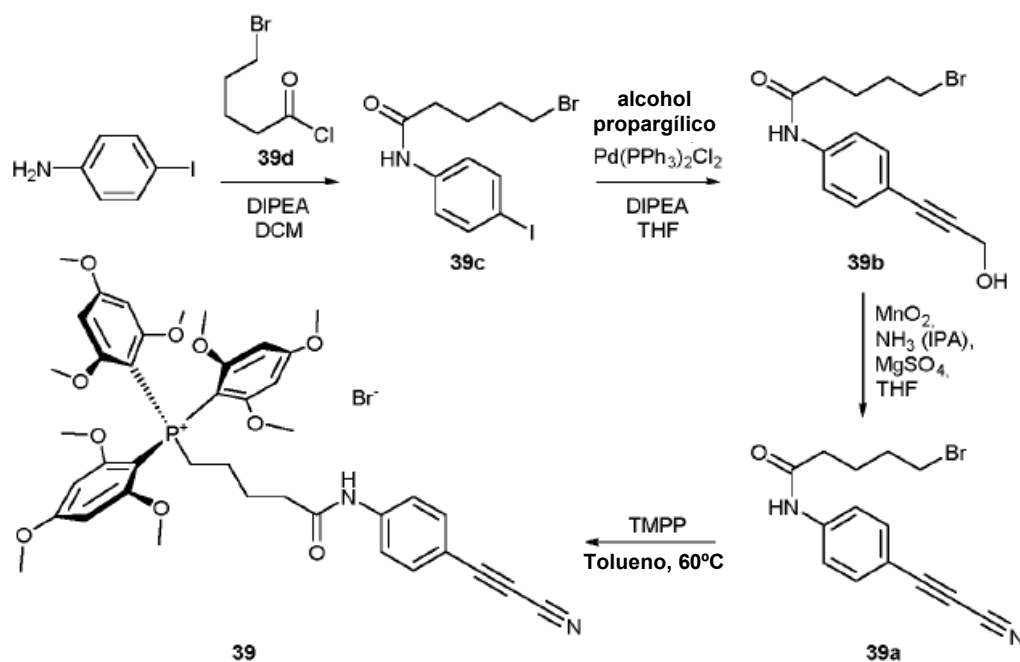
10 1H RMN (400 MHz, METANOL- d_4) δ 7,71-7,79 (m, J = 9,15 Hz, 2H), 7,63-7,70 (m, J = 9,15 Hz, 2H), 3,04 (t, J = 6,80 Hz, 2H), 2,6 (t, J = 7,05 Hz, 2H), 1,98-2,08 (m, 2H); ^{13}C RMN (101 MHz, METANOL- d_4) δ 173,1, 143,6, 135,7, 120,7, 112,9, 106,2, 84,5, 62,7, 40,4, 34,5, 24,0; ESI-MS: $C_{13}H_{14}N_3O^+$ $[M+H]^+$, 228,1; encontrado 228,1.

38: Trifluoroacetato de (2-((4-(4-(cianoetil)fenil)amino)-4-oxobutil)amino)-2-oxoetil) tris(2,4,6-trimetoxifenil)fosfonio.

15 A la solución de 38a (1 eq., 10,1 mg, 0,0296 mmol) en DMF (250 μ L), se añadió TEA (1 eq., 4 μ L, 0,0296 mmol). Se añadió TMPP-AC-OSu (1 eq., 22,7 mg, 0,0296 mmol) a la solución obtenida y la masa de reacción fue dejada durante 15 minutos a temperatura ambiente. El producto crudo fue purificado por HPLC para aislar el compuesto 38 (9,9 mg, 0,0126 mmol, 42%) como producto principal.

1H RMN (400 MHz, METANOL- d_4) δ 7,44-7,59 (m, 4H), 6,13 (d, J = 4,52 Hz, 6H), 3,75 (s, 9H), 3,50 (s, 18H), 3,00 (td, J = 7,91, 15,31 Hz, 2H), 2,26 (t, J = 6,90 Hz, 2H), 1,64-1,75 (m, 2H), 1,25-1,43 (m, 2H); ^{13}C RMN (101 MHz, METANOL- d_4) δ 174,2, 167,4, 167,4, 165,3, 143,6, 135,8, 120,6, 112,8, 106,3, 92,2 (d, J = 8 Hz), 84,5, 62,7, 56,5, 56,2, 37,5, 29,4 (d, J = 64 Hz), 27,9, 27,7, 24,9; ESI-HRMS: $C_{42}H_{47}N_3O_{11}P^+$ $[M]^+$, 800,29427; encontrado 800,29401.

20 Bromuro de (5-((4-(cianoetil) fenil) amino)-5-oxopentil) tris(2,4,6-trimetoxifenil) fosfonio (39):



39d: Cloruro de 5-bromopentanoilo.

25 La solución desgasificado del ácido 5-bromopentanoico (1 eq., 2,85 g, 15,7 mmol) y $SOCl_2$ (1 eq., 1,87 g, 1,14 ml, 15,7 mmol) en DCM (50 ml) se sometió a reflujo por 3 horas. La masa de reacción obtenida se evaporó bajo presión reducida para dar el compuesto 39d (3,11 g, 100%) como un aceite amarillento. El producto crudo fue utilizado en el paso siguiente sin purificación.

39c: 5-Bromo-N-(4-yodofenil)pentanamida.

30 La solución del compuesto 39d (1 eq., 3,11 g, 15,7 mmol) en DCM (50 mL) se vertió en una solución enfriada a -78°C de 4-yodoanilina (1 eq., 3,45 g, 15,7 mmol) y DIPEA (1 eq., 2,03 g, 2,6 mL, 15,7 mmol) en DCM (50 mL). Se permitió que la masa de la reacción obtenida se calentara a temperatura ambiente, se agitó por otros 30 min, se lavó con HCl 1N (2X25 mL), agua (1x25 mL), se secó sobre Na_2SO_4 y se evaporó para dar el compuesto 39c (5,60 g, 14,66 mmol, 93%) como un sólido marrón.

^1H RMN (400 MHz, METANOL- d_4) δ 7,62-7,66 (m, 2H), 7,38-7,43 (m, 2H), 3,50 (t, J = 6,53 Hz, 2H), 2,42 (t, J = 7,28 Hz, 2H), 1,81-1,98 (m, 4H), 1,37-1,42 (m, 1H); ^{13}C RMN (101 MHz, METANOL- d_4) δ 174,0, 140,5, 138,9, 123,1, 87,6, 36,9, 33,8, 33,4, 25,3; ESI-MS: $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{BrINO}^+ [\text{M}+\text{H}]^+$, 381,9; encontrado 381,8.

39b: 5-Bromo-N-(4-(3-hidroxi-prop-1-in-1-il) fenil) pentanamida:

- 5 Sintetizado siguiendo el protocolo A para el acoplamiento de Sonogashira. Sólido marrón, rendimiento: 92%. ^1H RMN (400 MHz, METANOL- d_4) δ 7,49-7,63 (m, J = 8,53 Hz, 2H), 7,32-7,43 (m, J = 8,53 Hz, 2H), 4,40 (s, 2H), 4,26 (s, 1H), 3,50 (t, J = 6,53 Hz, 2H), 2,43 (t, J = 7,15 Hz, 2H), 1,90-2,04 (m, 2H), 1,74-1,90 (m, 2H), 1,32 (s, 1H); ^{13}C RMN (101 MHz, METANOL- d_4) δ 173,9, 140,0, 133,1, 120,7, 119,6, 88,2, 85,2, 51,2, 36,8, 33,7, 33,3, 25,3; ESI-MS: $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{BrNO}^+ [\text{M}+\text{H}]^+$, 310,0; encontrado 310,0.

- 10 39a: 5-Bromo-N-(4-(cianoetilil) fenil) pentanamida.

Se añadieron una solución 2 M de NH_3 (4 eq., 94,8 mg, 5,56 mmol) en IPA y MgSO_4 anhidro (15 eq., 2511 mg, 20,9 mmol) a una solución agitada del compuesto 39b (1 eq., 431 mg, 1,39 mmol) en THF (3,42 mL). Se añadió MnO_2 activado (15 eq., 1814 mg, 20,9 mmol) a la solución y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas (controlado por TLC, sin alcohol inicial; NB: un tiempo de reacción demasiado largo da el producto de hidrólisis), diluido con DCM (13 mL). La mezcla se filtró, se lavó a fondo con DCM y los filtrados combinados se concentraron bajo presión reducida. El residuo sólido fue purificado por cromatografía ultrarrápida (EtOAc-ciclohexano, gradiente de 20 minutos de 0 a 100% de EtOAc) para dar el compuesto 39 como un sólido blanco (288 mg, 0,946 mmol, 68%).

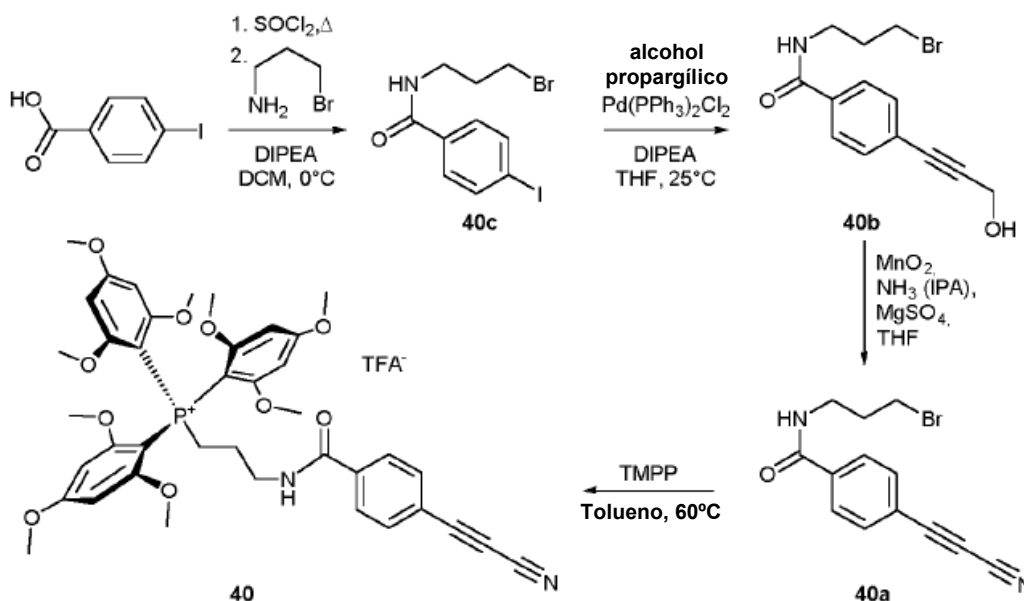
- 20 ^1H RMN (400 MHz, METANOL- d_4) δ 7,69-7,79 (m, J = 8,78 Hz, 2H), 7,59-7,69 (m, J = 8,78 Hz, 2H), 3,50 (t, J = 6,53 Hz, 2H), 1,79-1,99 (m, 4H), 1,26 (t, J = 7,15 Hz, 2H); ^{13}C RMN (101 MHz, METANOL- d_4) δ 174,3, 143,8, 135,7, 120,7, 112,8, 106,2, 101,4, 84,6, 37,0, 33,7, 33,4, 25,2; ESI-MS: $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{BrN}_2\text{O}^+ [\text{M}+\text{H}]^+$, 304,0; encontrado 304,0.

39: Bromuro de (5-((4-(cianoetilil) fenil) amino)-5-oxopentil) tris (2,4,6-trimetoxi-fenil) fosfonio.

- 25 El compuesto 39a (1 eq., 20 mg, 0,0655 mmol) y tris(2,4,6-trimetoxi-fenil)fosfano (TMPP, 1,2 eq., 41,9 mg, 0,0786 mmol) se disolvieron en tolueno seco (1 mL) y se agitaron durante la noche a temperatura ambiente. El compuesto 39 (sal de TFA, 22 mg, 39%) se obtuvo después de la HPLC de fase inversa como un sólido blanco.

^1H RMN (400 MHz, METANOL- d_4) δ 7,51-7,55 (m, 4H), 6,13 (d, J = 4,77 Hz, 6H), 3,75 (s, 9H), 3,50 (s, 18H), 3,00 (td, J = 6,90, 15,31 Hz, 2H), 2,26 (t, J = 6,90 Hz, 2H), 1,73 (m, 2H), 1,22-1,45 (m, 2H); ^{13}C RMN (101 MHz, METANOL- d_4) δ 174,2, 167,4, 165,3, 143,6, 135,8, 120,6, 112,8, 106,2, 93,6, 92,3, 92,2, 84,5, 62,7, 56,3, 37,5, 29,7, 27,7, 24,9; ESI-HRMS: $\text{C}_{41}\text{H}_{46}\text{N}_2\text{O}_{10}\text{P}^+ [\text{M}]^+$, 757,28846; encontrado 757,29552.

- 30 Trifluoroacetato de (4-(4-(cianoetilil)benzamido)butil) tris(2,4,6-trimetoxifenil)fosfonio (40):



40c: N-(4-Bromobutil)-4-yodobenzamida.

El ácido 4-yodobenzoico (1 eq., 1,45 g, 5,85 mmol) se calentó a 110°C en SOCl_2 (9 eq., 3,8 mL, 52,6 mmol) hasta su disolución completa (alrededor de 15 min). El exceso de SOCl_2 se eliminó al vacío y el sólido obtenido fue vertido en

DCM (15 mL), enfriado a -78°C y se añadió DIPEA (3,1 eq., 3 mL, 18,2 mmol) bajo agitación fuerte. Se añadió hidrobromuro de 3-bromopropilamina (1,5 eq., 1,90 g, 8,77 mmol) a la masa de reacción obtenida y se dejó agitando durante 5 minutos todavía a -78°C , se dejó que se calentara a temperatura ambiente, mientras se removía durante otros 20 minutos más. Se añadió acetato de etilo (100 mL) con HCl 1 M (5 mL), el sólido obtenido se filtró (producto), se lavó con agua y se secó para producir el compuesto 40c (2,09 g, 5,67 mmol, 97%) como un sólido blanco.

^1H RMN (400 MHz, METANOL- d_4) δ 7,85 (m, J = 8,40 Hz, 2H), 7,58 (m, J = 8,40 Hz, 2H), 3,48-3,56 (m, 4H), 2,12-2,23 (m, 2H); ^{13}C RMN (101 MHz, METANOL- d_4) δ 160,1, 139,2, 136,0, 132,8, 102,4, 50,1, 43,2, 23,0; ESI-MS: $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{BrINO}^+ [\text{M}+\text{H}]^+$, 367,9; encontrado 368,0.

40b: N-(4-Bromobutil)-4-(3-hidroxi-prop-1-in-1-il)benzamida.

10 Sintetizado siguiendo el Protocolo B para el acoplamiento de Sonogashira. Sólido marrón, rendimiento: 81%. ^1H RMN (400 MHz, METANOL- d_4) δ 7,73 (m, J = 8,40 Hz, 2H), 7,38 (m, J = 8,40 Hz, 2H), 4,37 (t, J = 5,30 Hz, 2H), 4,34 (s, 2H), 3,51 (t, J = 5,80 Hz, 2H), 1,92-1,98 (m, 2H); ^{13}C RMN (101 MHz, METANOL- d_4) δ 159,2, 134,2, 132,4, 128,2, 127,1, 91,2, 84,8, 67,2, 51,2, 43,3, 22,5; ESI-MS: $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{BrNO}_2^+ [\text{M}+\text{H}]^+$, 295,0; encontrado 295,0.

40a: N-(3-Bromopropil)-4-(cianoetnil)benzamida.

15 Sintetizado utilizando el protocolo estándar de MnO_2 -oxidación. Tiempo de reacción: 45 minutos. Sólido marrón, rendimiento: 52%.

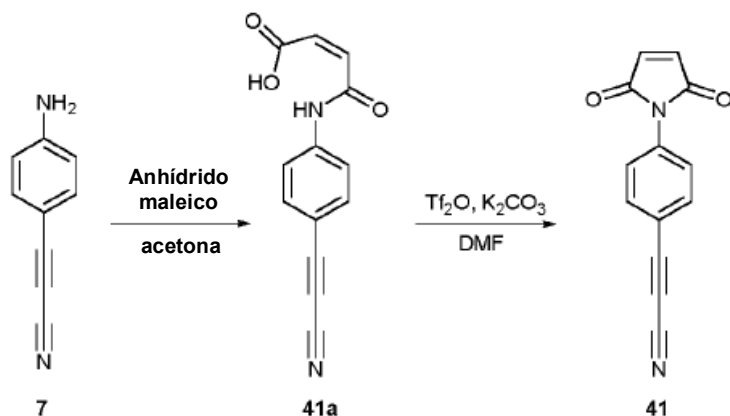
^1H RMN (400 MHz, METANOL- d_4) δ 7,90 (m, J = 8,50 Hz, 2H), 7,80 (m, J = 8,50 Hz, 2H), 3,42-3,55 (m, 2H), 3,25-3,35 (m, 2H), 2,13-2,23 (m, 2H), 1,92-1,98 (m, 2H); ^{13}C RMN (101 MHz, METANOL- d_4) δ 168,7, 138,8, 134,9, 128,9, 121,4, 105,8, 83,0, 67,3, 41,9, 39,8, 22,8; ESI-MS: $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{BrN}_2\text{O}^+ [\text{M}+\text{H}]^+$, 291,0; encontrado 291,2.

20 40: Trifluoroacetato de (4-(4-(cianoetnil)benzamido)butil) tris(2,4,6-trimetoxifenil)fosfonio.

El compuesto 40a (1 eq., 30 mg, 0,103 mmol) y tris(2,4,6-trimetoxifenil)fosfano (TMPP, 1 eq., 54,9 mg, 0,103 mmol) fueron disueltos en tolueno seco (2 mL). La solución obtenida se dejó durante la noche a temperatura ambiente. El precipitado fue filtrado, resolubilizado en DMSO, y purificado por HPLC para dar el compuesto 40 (35 mg, 0,0409 mmol, 40%) como un sólido blanco. ^1H RMN (400 MHz, METANOL- d_4) δ 7,75 (d, J = 8,50 Hz, 2H), 7,69 (d, J = 8,50 Hz, 2H), 6,16 (d, J = 4,70 Hz, 2H), 3,76 (s, 9H), 3,51 (s, 18H), 3,35 (t, J = 7,10 Hz, 2H), 2,98-3,10 (m, 2H), 1,53-1,64 (m, 2H); ^{13}C RMN (101 MHz, METANOL- d_4) δ 168,5, 167,5, 165,3, 138,7, 134,9, 128,8, 121,2, 105,8, 94,0, 92,9, 92,3, 82,9, 64,5, 56,5, 41,7, 27,8, 25,7; ESI-HRMS: $\text{C}_{40}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{O}_{10}\text{P}^+ [\text{M}]^+$, 743,22728; encontrado 743,23946.

Los compuestos 38-40 se pueden utilizar para la detección y/o el método de la separación según la invención.

3-(4-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)fenil)propionitrilo (41):



30

41a: Ácido (Z)-4-((4-(cianoetnil) fenil) amino)-4-oxobut-2-enoic.

A la solución del compuesto 7 (1 eq., 76,8 mg, 0,541 mmol) en acetona (2 mL), fue añadido anhídrido maleico (2 eq., 106 mg, 1,08 mmol). Se obtuvo un sólido amarillento después de aproximadamente 7 horas de agitación. La masa de la reacción fue evaporada y el exceso de anhídrido maleico y ácido maleico fue lavado con metanol. El compuesto 41a (127 mg, 0,53 mmol, 98%) se obtuvo como un sólido amarillento; no se necesitó más purificación.

35

^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12,90 (s ancho, 1H), 10,70 (s, 1H), 7,62-7,90 (m, 4H), 6,50 (d, J = 11,90 Hz, 1H), 6,34 (d, J = 11,90 Hz, 1H); ^{13}C RMN (101 MHz, DMSO- d_6) δ 166,8, 163,8, 142,4, 135,0, 131,7, 130,1, 119,3, 110,2, 105,6, 84,3, 61,9; ESI-MS: $\text{C}_{13}\text{H}_7\text{N}_2\text{O}_3^- [\text{M}-\text{H}]^-$, 239,0; encontrado 239,0.

41: 3-(4-(2,5-Dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il) fenil)-propionitrilo.

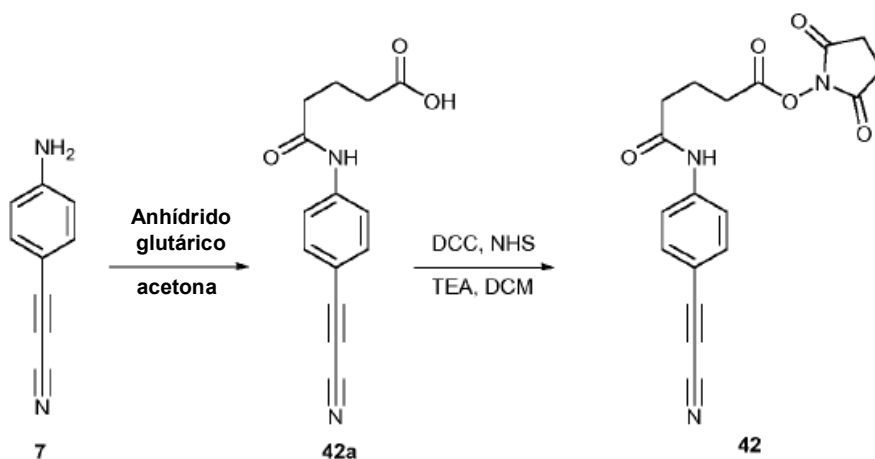
A la solución del compuesto 41a (1 eq., 75 mg, 0,312 mmol) en DMF seco (1,21 mL), se añadió anhídrido trifluoroacético (2 eq., 86,9 μ L, 0,624 mmol). La agitación continuó durante otros 5 minutos a temperatura ambiente y se añadió K_2CO_3 (3 eq., 129 mg, 0,937 mmol). La masa de la reacción se agitó por otros 60 minutos, después se purificó directamente por HPLC para dar el compuesto 41 (65,9 mg, 0,297 mmol, 95%) como un sólido levemente amarillo.

5

1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7,81 (m, J = 8,50 Hz, 2H), 7,52 (m, J = 8,50 Hz, 2H), 6,96 (s, 2H); ^{13}C RMN (101 MHz, DMSO- d_6) δ 169,0, 134,4, 134,0, 126,0, 117,3, 117,0, 82,2, 78,5, 62,3; ESI-MS: $C_{13}H_7N_2O_2^+$ [M+H] $^+$, 223,0; encontrado 229,9.

El compuesto 41 se puede utilizar para un método de bioconjugación según la invención.

10 5-((4-(Cianoetil)-fenil)-amino)-5-oxopentanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (42):



42a: Ácido 5-((4-(cianoetil) fenil) amino)-5-oxopentanoico.

A una solución del compuesto 7 (1 eq., 200 mg, 1,41 mmol) en acetona (1 mL), se añadió anhídrido glutárico (2 eq., 321 mg, 2,81 mmol). La solución obtenida se agitó durante 24 horas a temperatura ambiente. La acetona se evaporó, el producto crudo fue recristalizado a partir de IPA-ciclohexano para dar el compuesto 42a (324 mg, 1,27 mmol, 90%) como un sólido gris.

15

1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10,21 (s, 1H), 8,15 (s ancho, 1H), 7,60 (d, J = 8,72 Hz, 2H), 7,52 (d, J = 8,72 Hz, 2H), 2,52-2,62 (m, 4H), 2,22-2,32 (m, 2H); ^{13}C RMN (101 MHz, DMSO- d_6) δ 170,0, 168,5, 140,9, 134,2, 119,0, 111,9, 105,4, 84,1, 63,3, 30,1, 29,0, 21,2; ESI-MS: $C_{14}H_{11}N_2O_3^-$ [M-H] $^-$, 255,1; encontrado 255,1.

20 42: 5-((4-(Cianoetil) fenil)-amino)-5-oxopentanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo.

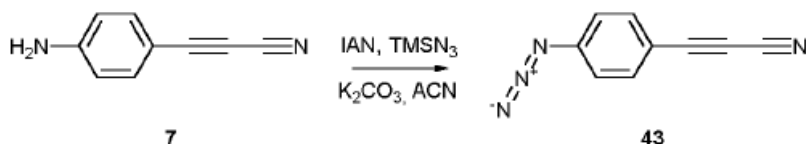
Se agregaron a una solución del compuesto 42a (1 eq., 18 mg, 0,0702 mmol) en DCM (1 mL) DCC (1,02 eq., 14,8 mg, 0,0716 mmol) y TEA (1 eq., 6,52 mg, 0,00895 mL, 0,0644 mmol). La masa de reacción obtenida se agitó durante 5 minutos, se añadió NHS (1 eq., 8,08 mg, 0,0702 mmol). La solución resultante se agitó durante otras 2 horas a temperatura ambiente. El producto crudo fue purificado por cromatografía ultrarrápida (Ciclohexano-EtOAc) para dar el compuesto 42 (6,45 mg, 0,0183 mmol, 26%) como un sólido blanco.

25

1H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ 8,27 (s ancho, 1H), 7,64 (d, J = 8,78 Hz, 2H), 7,57 (d, J = 8,78 Hz, 2H), 2,94 (s, 4H), 2,74 (t, J = 6,53 Hz, 2H), 2,52 (t, J = 6,90 Hz, 2H), 2,23 (m, 2H); ^{13}C RMN (101 MHz, CLOROFORMO-d) δ 170,3, 169,5, 168,2, 141,3, 134,6, 119,4, 112,4, 105,7, 83,2, 62,9, 35,6, 29,9, 25,7, 21,2; ESI-MS: $C_{18}H_{16}N_3O_5^+$ [M+H] $^+$, 353,1; encontrado 353,2.

30 El compuesto 42 se puede utilizar para un método de bioconjugación según la invención.

3-(4-Azidofenil) propionitrilo (43):



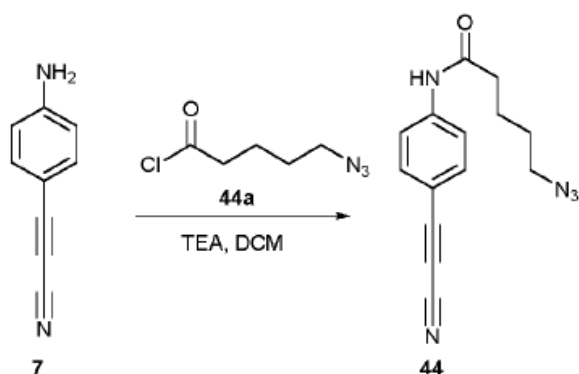
7

43

5 El compuesto 7 (1 eq., 151 mg, 1,07 mmol) se disolvió en acetonitrilo (2,34 mL) en un matraz de fondo redondo de 25 mL y se enfrió a 0°C en un baño de hielo. A esta mezcla agitada se añadió nitrito de isoamilo (IAN, 1,5 eq., 215 µL, 1,6 mmol) seguido de trimetilsilil azida (1,2 eq., 147 mg, 0,168 mL, 1,28 mmol) gota a gota. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 45 minutos. La mezcla de reacción se concentró en vacío y el producto crudo se resolubilizó en EtOAc, se lavó con agua, se secó y se evaporó para dar el compuesto 43 (177 mg, 1,06 mmol, 99%).

¹H RMN (400 MHz, ACETONITRILLO-d₃) δ 7,58-7,81 (m, J = 8,78 Hz, 2H), 7,11-7,26 (m, J = 8,78 Hz, 2H); ¹³C RMN (101 MHz, ACETONITRILLO-d₃) δ 144,9, 136,0, 120,4, 113,6, 105,9, 83,4, 62,9; GC-ESI-MS: C₉H₅N₄⁺ [M+H]⁺, 169,0; encontrado 169,0.

10 5-Azido-N-(4-(cianoetnil) fenil) pentanamida (44):



44a: Cloruro de 5-azidopentanoilo.

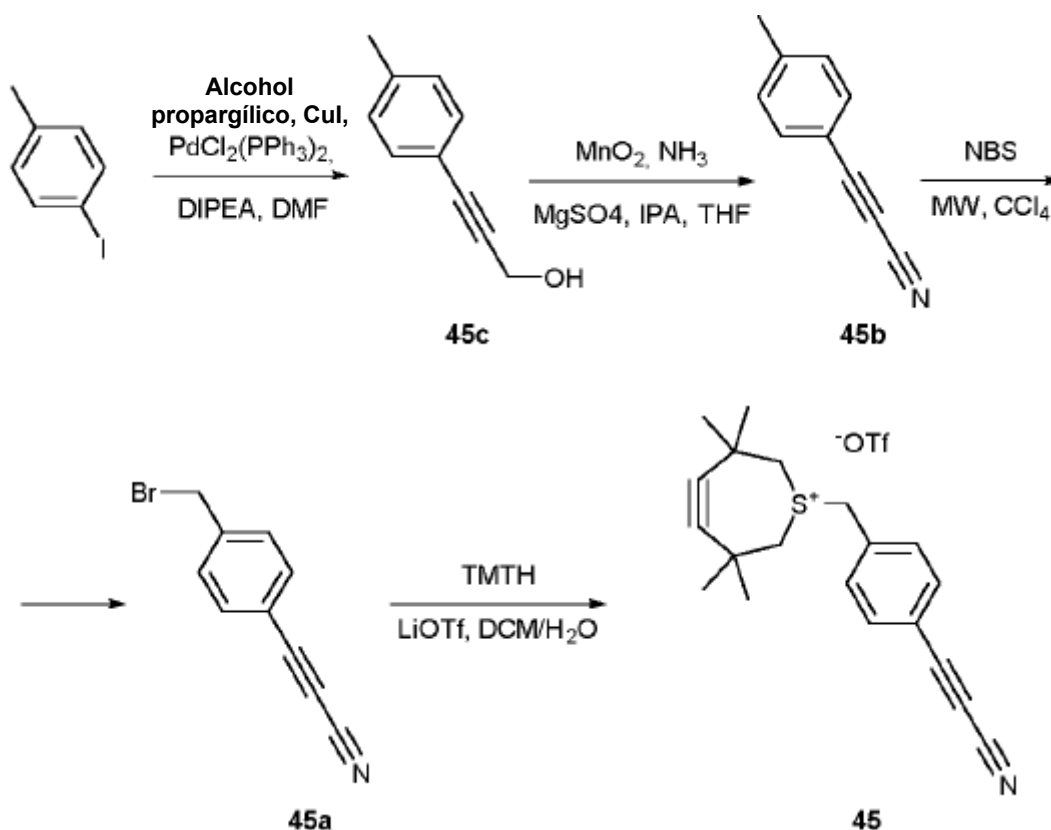
15 El ácido 5-azidopentanoico (1 eq., 1,1 g, 6,99 mmol) se sometió a reflujo en SOCl₂ (10 eq., 5,1 ml, 69,9 mmol) por 30 minutos. El excedente de SOCl₂ se eliminó al vacío y el sólido crudo obtenido fue utilizado en el paso siguiente sin purificación.

44: 5-Azido-N-(4-(cianoetnil) fenil) pentanamida.

20 El compuesto 7 (1 eq., 16,1 mg, 0,113 mmol) y TEA (1,5 eq., 24 µL, 0,17 mmol) se disolvieron en DCM (3 mL), se enfriaron a -78°C y se añadió el compuesto 44a (1,1 eq., 20,1 mg, 0,125 mmol) a la mezcla de reacción que luego se dejó calentar a temperatura ambiente mientras se agitaba durante 1 h más. La masa de reacción se lavó con HCl 1M (2x1 mL), agua (2 mL), se secó sobre Na₂SO₄, y se evaporó para dar el producto crudo, que fue purificado por cromatografía ultrarrápida para dar el compuesto 44 (25,5 mg, 0,101 mmol, 89%) como un sólido gris.

25 ¹H RMN (400 MHz, METANOL-d₄) δ 7,58-7,67 (m, J = 8,70 Hz, 2H), 7,40-7,58 (m, J = 8,70 Hz, 2H), 3,23-3,28 (m, 2H), 2,34 (t, J = 7,28 Hz, 2H), 1,61-1,72 (m, 2H), 1,49-1,61 (m, 2H); ¹³C RMN (101 MHz, METANOL-d₄) δ 173,0, 144,0, 135,7, 134,3, 120,7, 113,0, 106,2, 84,5, 40,4, 34,4, 28,8, 24,0; ESI-MS: C₁₄H₁₄N₅O⁺ [M+H]⁺, 268,1; encontrado 268,1.

Triflato de 1-[4-(cianoetnil)bencil]-3,3,6,6-tetrametil-4,5-didehidro-2,3,6,7-tetrahidrotiepinio (45):



45c: 3-(p-Tolil) prop-2-in-1-ol.

Sintetizado utilizando el protocolo A para el acoplamiento de Sonogashira. Sólido amarillento, rendimiento: 88%.

5 ¹H RMN (400 MHz, ACETONITRIL-O-d₃) δ 7,25-7,49 (m, J = 8,03 Hz, 2H), 7,04-7,25 (m, J = 8,03 Hz, 2H), 4,34 (d, J = 6,02 Hz, 2H), 3,31 (t, J = 6,02 Hz, 1H), 2,32 (s, 3H); ¹³C RMN (101 MHz, ACETONITRIL-O-d₃) δ 139,8, 132,4, 130,3, 120,8, 88,8, 85,1, 51,2, 21,5; ESI-MS: C₁₀H₁₁O⁺ [M+H]⁺, 146,1; encontrado 146,0.

45b: 3-(p-Tolil) propionitrilo.

El compuesto se obtuvo como el único producto del protocolo estándar MnO₂-oxidación. Tiempo de reacción: 3 horas. Sólido blanco, rendimiento: 67%.

10 ¹H RMN (400 MHz, METANOL-d₄) δ 7,37-7,59 (m, J = 8,03 Hz, 2H), 7,02-7,31 (m, J = 8,03 Hz, 2H), 2,29 (s, 3H); ¹³C RMN (101 MHz, METANOL-d₄) □ □ 143,2, 133,3, 129,5, 114,0, 104,8, 83,2, 61,3, 20,4; ESI-MS: C₁₀H₈N⁺ [M+H]⁺, 141,1; encontrado 141,0.

45a: 3-(4-(Bromometil) fenil) propionitrilo.

15 La solución desgasificada del compuesto 45b (1 eq., 68 mg, 0,482 mmol) en DCM (1 mL) fue irradiada por MW (100°C) durante 5 minutos. La mezcla de reacción se evaporó, el producto crudo fue purificado por HPLC preparativa para dar el compuesto 45a (42,4 mg, 0,193 mmol, 40%) como un sólido amarillento.

¹H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ 7,56-7,71 (m, J = 8,28 Hz, 2H), 7,40-7,49 (m, J = 8,28 Hz, 2H), 4,48 (s, 2H); ¹³C RMN (101 MHz, CLOROFORMO-d) □ □ 141,8, 133,9, 129,5, 117,5, 105,3, 82,3, 63,7, 31,8; GC-ESI-MS: C₁₀H₇BrN⁺ [M+H]⁺, 219,0; encontrado 219,0.

20 45: Triflato de 1-[4-(cianoetil)encil]-3,3,6,6-tetrametil-4,5-didehidro-2,3,6,7-tetrahidrotiepino.

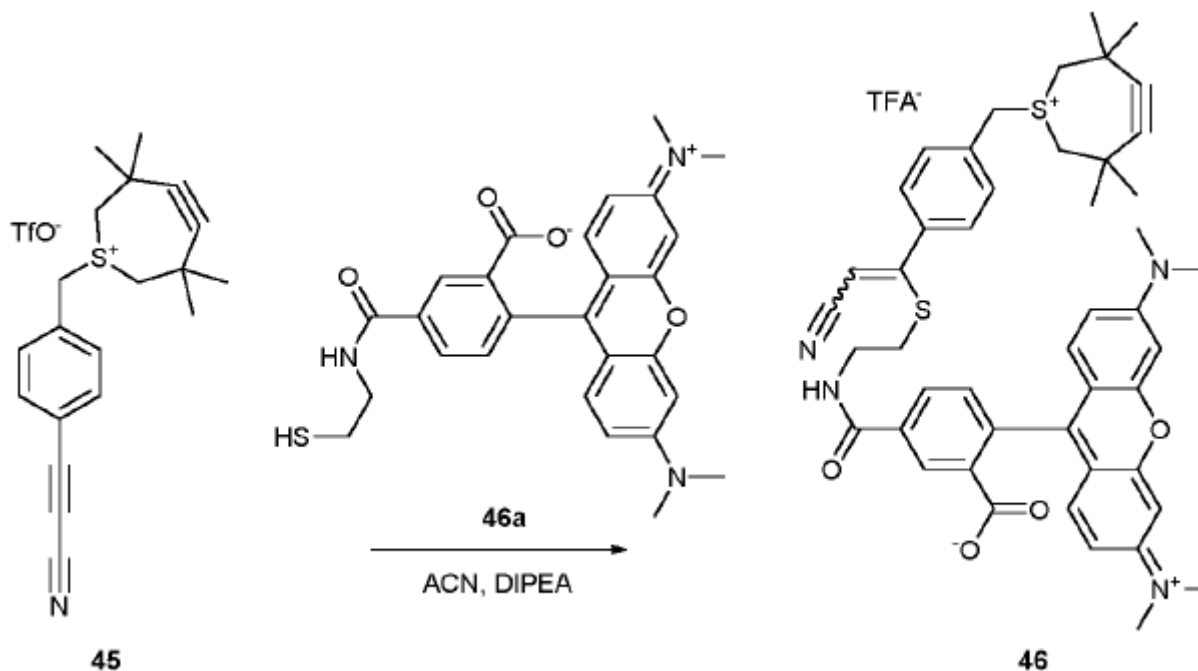
25 A una solución desgasificada de 45a (1 eq., 43,7 mg, 0,199 mmol) y TMTH (1,29 eq., 43 mg, 0,255 mmol; sintetizados después del procedimiento descrito anteriormente⁸³¹) en DCM (1,34 mL), fue añadida una solución de LiOTf (11,6 eq., 360 mg, 2,31 mmol) en H₂O destilada y desgasificada (0,668 mL). La mezcla bifásica obtenida se agitó vigorosamente durante 5 días a 25°C (desgasificación una vez al día). Se separaron dos fases, la orgánica fue lavada con DCM (5x2 mL). Las fracciones orgánicas unidas se evaporaron y el producto crudo fue purificado por HPLC para dar 45 (46,9 mg, 0,111 mmol, 56%) como un aceite incoloro (cristaliza lentamente a 0°C para producir un sólido blanco).

^1H RMN (400 MHz, CLOROFORMO- d) δ 7,65-7,73 (m, $J = 8,03$ Hz, 2H), 7,56-7,65 (m, $J = 8,03$ Hz, 2H), 5,07 (s, 2H), 4,12 (d, $J = 12,30$ Hz, 2H), 3,72 (d, $J = 12,30$ Hz, 2H), 1,36 (s, 6H), 1,30 (s, 6H); ^{13}C RMN (101 MHz, DMSO- d_6) δ 135,1, 133,6, 131,9, 117,8, 106,4, 105,8, 83,3, 63,6, 60,1, 43,2, 34,6, 26,4, 25,4; HR-ESI-MS: $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{NS}^+$ $[\text{M}]^+$, 308,1; encontrado 308,1.

5 Los compuestos 43-45 se pueden utilizar para una química click (tal como reacción click-azida) según la invención.

El compuesto 45 se puede utilizar para una química click promovida por saturación según la invención.

Trifluoroacetato de 1-({4-[1-{{2-({3-carboxilato-4-[6-(dimetilamino)-3-(dimetiliminiumil)-3H-xanten-9-il]fenil}formamido)etil]sulfanil}-2-cianoet-1-en-1-il]fenil}metil)-3,3,6,6-tetrametil-1-tiaciclohept-4-in-1-io (46):



10 46a: 2-(6-(Dimetilamino)-3-(dimetiliminio)-3H-xanten-9-il)-5-((2-mercaptoetil) carbamoyl)benzoato.

A una solución de TAMRA-5'-COOH (1 eq., 68,3 mg, 0,159 mmol) en DMF (0,228 mL), fueron añadidos posteriormente HATU (1 eq., 60,3 mg, 0,159 mmol), DIPEA (6 eq., 123 mg, 0,157 mL, 0,952 mmol) y dicloruro de cistamina (5 eq., 178 mg, 0,793 mmol); la masa de la solución obtenida se agitó durante la noche. Una solución de DTT (5 eq., 122 mg, 0,118 mL, 0,793 mmol) en DCM (0,911 mL) se añadió a la masa de reacción, la agitación continuó durante 2 horas. Los disolventes se evaporaron; la masa bruta obtenida fue purificada por HPLC para producir el compuesto 46a (33,5 mg, 0,0555 mmol, 35%) como un sólido de color violeta oscuro.

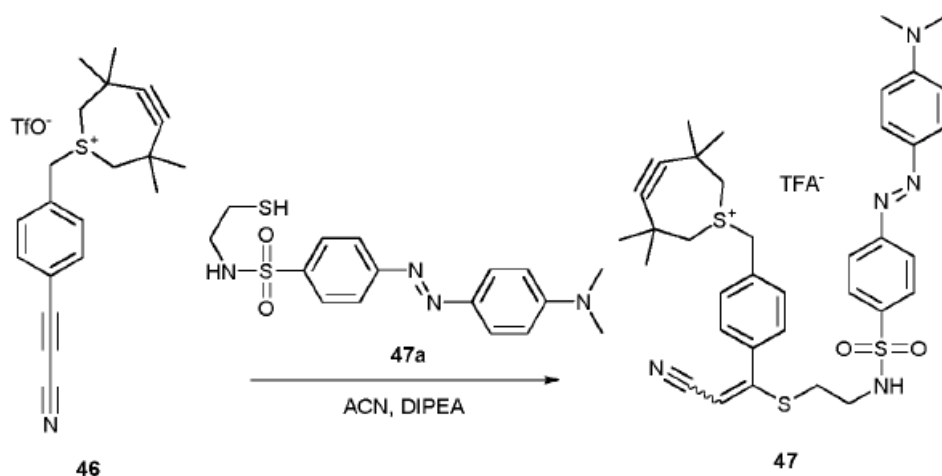
15 ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9,06 (t, $J = 5,4$ Hz, 1H), 8,70 (d, $J = 1,8$ Hz, 1H), 8,30 (dd, $J = 1,8, 8,0$ Hz, 1H), 7,59 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H), 7,08-7,02 (m, 4H), 6,95 (s, 2H), 3,00-3,42 (m, 2H), 3,26 (s, 12H), 2,72 (dt, $J = 6,8, 8,0$ Hz, 2H); ^{13}C RMN (101 MHz, DMSO- d_6) δ 166,0, 164,7, 156,8, 156,6, 135,9, 131,2, 130,6, 114,6, 96,3, 42,9, 40,5, 23,3; HR-ESI-MS: $\text{C}_{27}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$: 489,1722; encontrado 489,1723.

20 46: Trifluoroacetato de 1-({4-[(1Z)-1-{{2-({3-carboxilato-4-[6-(dimetilamino)-3-(dimetiliminiumil)-3H-xanten-9-il]fenil}formamido)etil]sulfanil}-2-cianoet-1-en-1-il]fenil}metil)-3,3,6,6-tetrametil-1-tiaciclohept-4-in-1-io (TAMRA-APN-TMTI).

Se mezcló una solución del compuesto 45 (1 eq., 6,74 mg, 0,016 mmol) en ACN (1 mL) con una solución del compuesto 46a (1 eq., 9,64 mg, 0,016 mmol) en DMF (1 mL). Entonces fue agregado DIPEA (5 eq., 132 μL , 0,08 mmol) y la masa de la reacción obtenida fue inyectada en HPLC después de 5 minutos de reacción para proporcionar el compuesto 46 (11,9 mg, 0,0149 mmol, 93%) como un sólido oscuro-violeta.

30 ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,98 (t, $J = 5,40$ Hz, 1H), 8,30 (d, $J = 8,28$ Hz, 1H), 8,10-8,20 (m, 1H), 7,85 (s, 1H), 7,57-7,69 (m, 4H), 6,97-7,15 (m, 5H), 6,07 (s, 1H), 4,85 (s, 2H), 2,81-2,90 (m, 4H), 3,28 (s ancho, 16H), 1,25 (s, 6H), 1,05 (s, 6H); ^{13}C RMN (101 MHz, DMSO- d_6)-no informativo (señales de baja resolución); HR-ESI-MS: $\text{C}_{47}\text{H}_{49}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}_2^+$, 797,31897; encontrado 797,32739.

1-({4-[2-Ciano-1-[(2-{4-[(E)-2-[4-(dimetilamino)fenil]diazen-1-il]bencenosulfonamido}etil)sulfanil]et-1-en-1-il]fenil]metil)-3,3,6,6-tetrametil-1-tiaciclohept-4-in-1-io (47, BHQ2-APN-TMTI):



47a: (E)-4-((4-(Dimetilamino)fenil)diazenil)-N-(2-mercaptoetil) bencenosulfonamida.

- 5 A una solución enfriada a 0°C de cloruro de Dabsilo (1 eq., 100 mg, 0,309 mmol) en ACN seco (3 mL), fueron añadidos posteriormente TEA (7 eq., 218 mg, 0,3 mL, 2,16 mmol) y dihidrocloruro de cistamina (5 eq., 347 mg, 1,54 mmol). Después de 2 horas de agitación, se añadió DTT (6 eq., 285 mg, 0,275 mL, 1,85 mmol) a la masa de reacción. La solución obtenida se agitó durante otras 2 horas, se evaporó y el producto crudo obtenido fue purificado por cromatografía ultrarrápida (ciclohexano-EtOAc) para producir 47a (105,9 mg, 94%) como un sólido anaranjado.

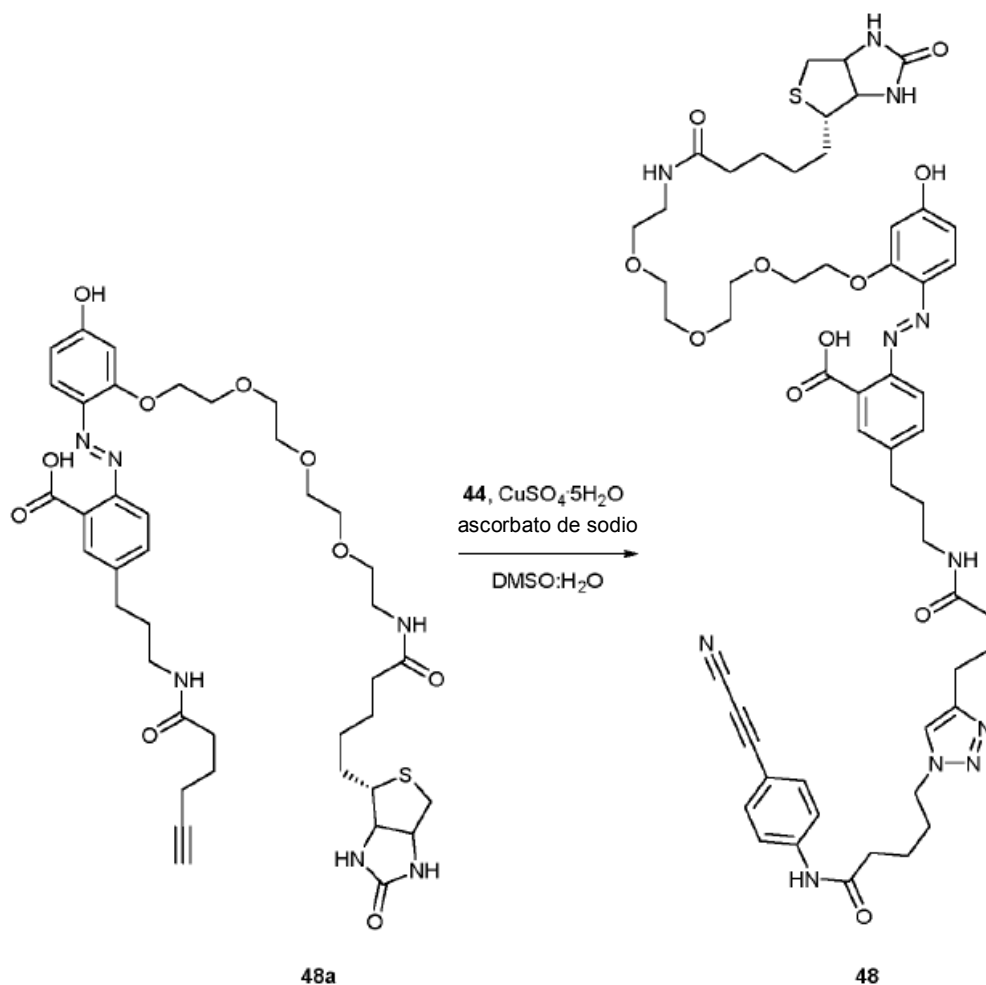
- 10 47: Trifluoroacetato de 1-({4-[(2-ciano-1-[(2-{4-[(E)-2-[4-(dimetilamino)fenil]diazen-1-il]bencenosulfonamido}etil)sulfanil]et-1-en-1-il]fenil]metil)-3,3,6,6-tetrametil-1-tiaciclohept-4-in-1-io.

El mismo procedimiento que para la síntesis del compuesto 46, Rendimiento: 94%.

- 15 ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8,03 (t, J = 4,89 Hz, 1H), 7,91 (d, J = 8,53 Hz, 2H), 7,80-7,87 (m, J = 9,04 Hz, 2H), 7,72-7,79 (m, J = 8,53 Hz, 2H), 7,68 (s, 4H), 6,87 (d, J = 9,04 Hz, 2H), 6,08 (s, 1H), 4,86 (s, 2H), 3,92 (d, J = 12,05 Hz, 2H), 3,84 (d, J = 12,30 Hz, 2H), 3,10 (s, 6H), 2,71-2,87 (m, 4H), 1,32 (s, 6H), 1,17 (s, 6H); ¹³C RMN (101 MHz, DMSO-d₆) δ 160,2, 158,6, 158,3, 155,1, 153,7, 143,1, 140,3, 136,8, 131,9, 131,3, 129,5, 128,2, 125,9, 122,8, 117,2, 112,1, 106,4, 99,4, 60,0, 43,3, 42,9, 34,5, 26,4, 25,3; HR-ESI-MS: C₃₆H₄₂N₅O₂S₃⁺, 672,24951; encontrado 672,25042.

Los compuestos 46-47 se pueden utilizar para la preparación de compuestos no accesibles por otros modos (TMTI).

- 20 5-(3-{4-[1-(4-[(2-Cianoet-1-in-1-il]fenil]carbamoil)butil)-1H-1,2,3-triazol-4-il]butanamido}propil)-2-[(E)-2-[4-hidroxi-2-(2-[2-[2-(2-{5-[(4S)-2-oxo-hexahidro-1H-tien[3,4-d]imidazolidin-4-il]pentanamido)etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]fenil]diazen-1-il]benzoico (48, APN-HAZA-biotina):



El compuesto 48 se puede utilizar para la purificación y/o la inmovilización según la invención.

48a: 2-(6-(Dimetilamino)-3-(dimetiliminio)-3H-xanten-9-il)-5-((2-mercaptoetil) carbamoil)benzoato.

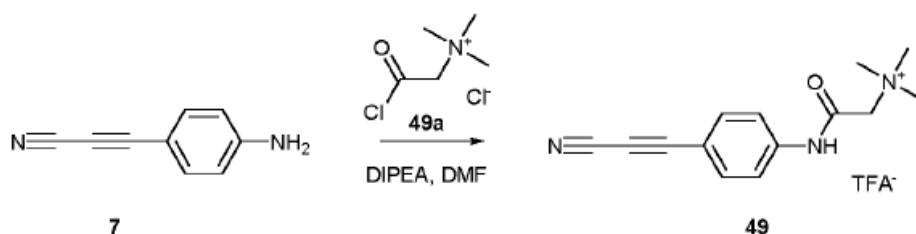
Este compuesto se sintetizó siguiendo el protocolo previamente mencionado.

- 5 48: 5-(3-{4-[1-(4-{[4-(2-cianoetil)fenil]carbamoyl}butil)-1H-1,2,3-triazol-4-il]butanamido}propil)-2-[(E)-2-[4-hidroxi-2-(2-{2-[2-(5-{(4S)-2-oxo-hexahidro-1H-tien[3,4-d]imidazolidin-4-il]pentanamido)etoxi]etoxi]etoxi]fenil]diazen-1-il]benzoico (APN-HAZA-biotina).

10 A una solución del compuesto 48a (1 eq., 10 mg, 0,0123 mmol) y 77 (1 eq., 3,12 mg, 0,0123 mmol) en DMSO (0,472 mL), se añadió una solución de ascorbato sódico (10 eq., 24,4 mg, 0,123 mmol) y CuSO₄ · 5H₂O (5 eq., 15,4 mg, 0,0617 mmol) en agua. La masa de reacción obtenida se desgaseó y se agitó durante la noche a 25°C. La masa de reacción fue purificada directamente por HPLC para dar el compuesto 48 (8,3 mg, 0,0078 mmol, 63%) como un sólido amarillo.

15 ¹H RMN (400 MHz, METANOL-d₄) δ 7,78 (s ancho, 2H), 7,72 (d, J = 8,28 Hz, 1H), 7,67 (s, 1H), 7,58 (d, J = 8,78 Hz, 2H), 7,50 (d, j = 8,78 Hz, 2H), 7,29 (d, J = 8,28 Hz, 1H), 7,25 (d, j = 8,53 Hz, 1H), 6,29 (d, j = 7,78 Hz, 1H), 3,70-3,81 (m, 8H), 3,62 (d, J = 4,77 Hz, 2H), 3,58 (d, J = 5,02 Hz, 2H), 3,48-3,53 (m, 2H), 3,41-3,48 (m, 2H), 3,01-3,07 (m, 6H), 2,89-3,00 (m, 10H), 2,78 (dd, J = 4,89, 12,93 Hz, 1H), 2,52-2,67 (m, 8H), 2,33 (t, J = 7,28 Hz, 2H), 2,09-2,19 (m, 2H), 1,81-1,91 (m, 4H), 1,65-1,78 (m, 2H), 1,52-1,63 (m, 2H), 1,42-1,52 (m, 1H), 1,23-1,31 (m, 1H); HR-ESI-MS: C₅₆H₆₇N₁₁O₁₁S, 1077,47422; encontrado 1077,45931.

Trifluoroacetato de 2-((4-(cianoetil) fenil) amino)-N,N,N-trimetil-2-oxoetan-1-amino (49):



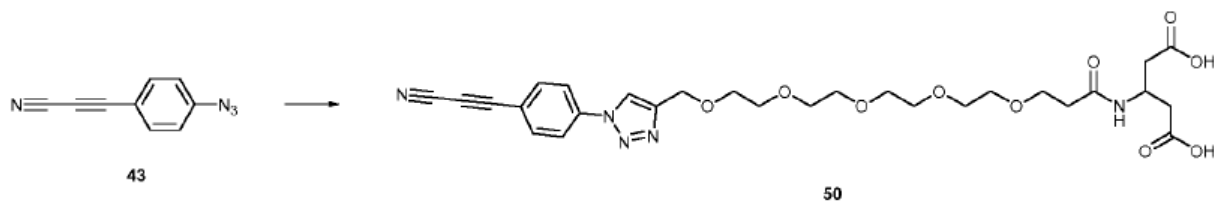
49a: 2-Cloro-N,N,N-trimetil-2-oxoetan-1-aminio.

Sintetizado como se describió anteriormente por Vassel y Skelly (10.1002/0471264180.os035.09).

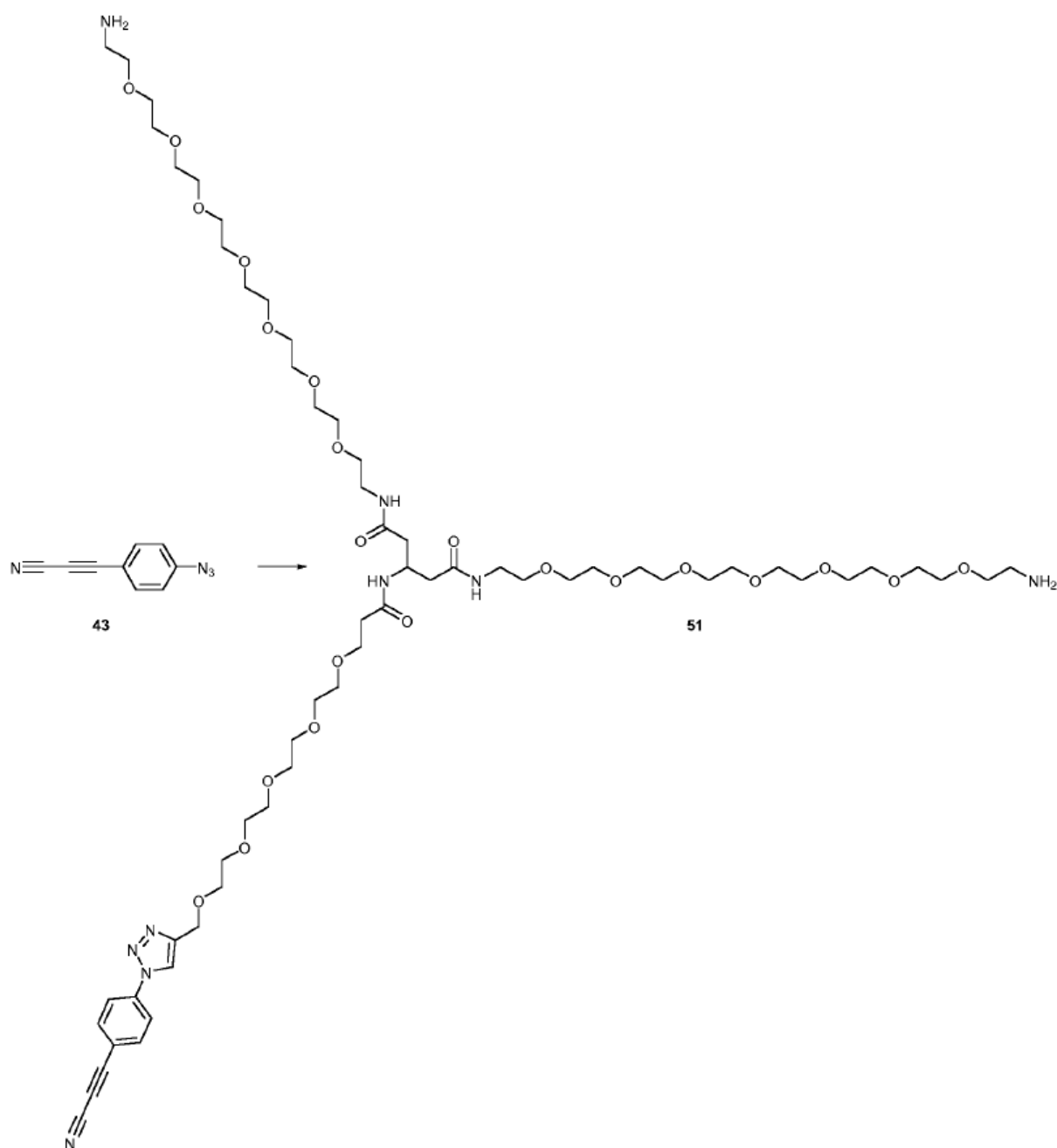
49: Trifluoroacetato de 2-((4-(cianoetil)fenil)amino)-N,N,N-trimetil-2-oxoetan-1-aminio.

- 5 A una solución de 3-(4-aminofenil)prop-2-inenitrilo (1 eq., 66,3 mg, 0,466 mmol) y DIPEA (1,1 eq., 66,3 mg, 0,0848 mL, 0,513 mmol) en DMF (1 mL), se agregó una solución enfriada a -20°C de cloruro de (2-cloro-2-oxoetil)trimetilazanio (1,1 eq., 88,3 mg, 0,513 mmol) en DMF (1 mL). La masa de reacción obtenida se agitó a 25°C durante 10 horas, se purificó por cromatografía RP-Flash para dar el compuesto 49 como un sólido amarillento (39 mg, 0,110 mmol, 24%).
- 10 ^1H RMN (400 MHz, ACETONITRIL- d_3) δ 11,14 (s ancho, 1H), 7,70-7,83 (m, $J = 8,78$ Hz, 2H), 7,56-7,70 (m, $J = 8,78$ Hz, 2H), 4,33 (s, 2H), 3,28 (s, 9H); ^{13}C RMN (101 MHz, ACETONITRIL- d_3) δ 163,5, 142,5, 135,8, 121,2, 113,5, 106,5, 84,4, 66,3, 63,1, 55,2; ESI-MS: $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}^+$ [M] $^+$, 242,13; encontrado 242,13.

Ácido 3-(1-(1-(4-(cianoetil)fenil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)-2,5,8,11,14-pentaoxaheptadecan-17-amido)pentandioico (50):



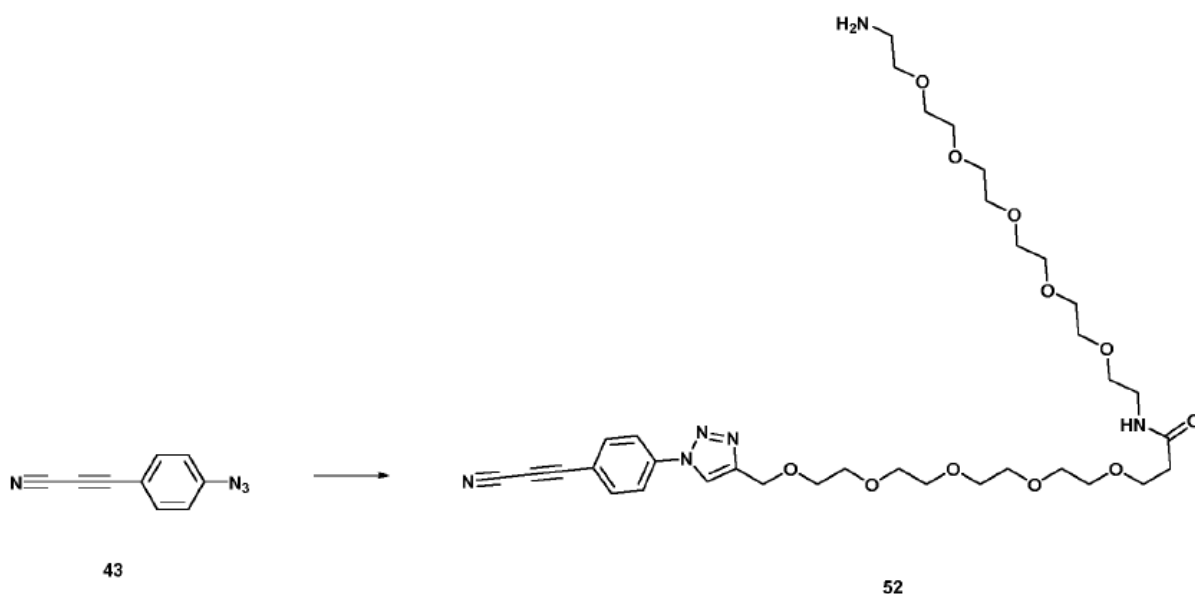
- 15 Se añadió una solución del compuesto 43 (1 eq., 5,65 mg, 0,0336 mmol) en DMSO (0,0331 mL), una solución de diácido-alquino (1 eq., 14,6 mg, 0,0336 mmol) en agua (0,0331 mL). Una solución de sulfato de cobre pentahidratado (0,1 eq., 0,839 mg, 0,00336 mmol) en la mínima cantidad de agua se añadió a la masa de reacción obtenida seguido de la adición de una solución de ascorbato sódico (0,5 eq., 3,33 mg, 0,0168 mmol) en la mínima cantidad de agua.
- 20 La adición se repitió después de 30 minutos hasta que terminó de desaparecer el material de partida (2 veces en total). El exceso de agua se evaporó a vacío (no se debe utilizar calentamiento, de lo contrario el producto de hidrólisis comienza a aparecer), la masa bruta obtenida fue purificada por HPLC después de la filtración de las sales de cobre a través de un filtro de jeringa para dar el compuesto 50 (11 mg, 0,01828 mmol, 54%) como un sólido blanco.
- 25 ^1H RMN (400 MHz, ACETONITRIL- d_3) δ 8,41 (s, 1H), 7,95-8,02 (m, 2H), 7,88-7,94 (m, 2H), 6,86 (d, $J = 7,78$ Hz, 1H), 4,71 (s, 2H), 4,49 (td, $J = 6,71, 8,41$ Hz, 1H), 3,68-3,76 (m, 3H), 3,49-3,68 (m, 21H), 2,53-2,64 (m, 5H), 1,97 (td, $J = 2,42, 4,96$ Hz, 15H); ^{13}C RMN (101 MHz, ACETONITRIL- d_3) δ 188,7, 173,3, 161,6, 146,5, 135,1, 131,3, 130,8, 122,5, 121,0, 117,9, 115,4, 64,2, 40,4, 39,5, 36,7, 30,6; ESI-MS: $\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{N}_5\text{O}_{10}^-$ [M-H] $^-$, 600,21; encontrado 600,23.
- 30 N1,N5-bis(23-amino-3,6,9,12,15,18,21-heptaoxatricosil)-3-(1-(1-(4-(cianoetil)fenil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)-2,5,8,11,14-pentaoxaheptadecan-17-amido)pentandiamida (51):



5 Se añadió una solución del compuesto 43 (1 eq., 1,64 mg, 0,00973 mmol) y PEG-Alquino (1 eq., 11 mg, 0,00973 mmol) en DMSO a una mezcla de DMSO (0,00958 mL) y agua (0,00958 mL). Una solución de sulfato de cobre pentahidratado (0,1 eq., 0,243 mg, 0,000973 mmol) en la mínima cantidad de agua se añadió a la masa de reacción obtenida seguido de la adición de una solución de ascorbato sódico (0,5 eq., 0,964 mg, 0,00487 mmol) en la mínima cantidad de agua. La masa de reacción fue filtrada y purificada por HPLC para dar el compuesto 51 (5 mg, 0,003839 mmol, 39%) como un líquido incoloro.

ESI-HRMS: C₆₀H₁₀₃N₉O₂₂, 1301,72177; encontrado 1301,72204.

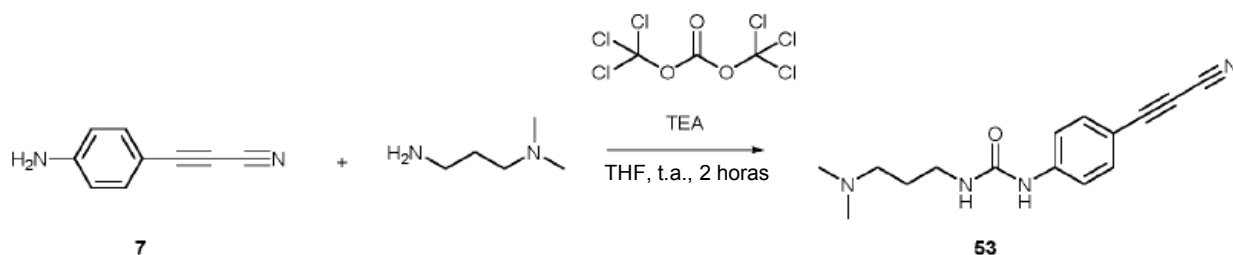
10 N-(17-amino-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadecil)-1-(1-(4-(cianoetnil)fenil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)-2,5,8,11,14-pentaoxaheptadecan-17-amida (52):



A una solución de 3-(4-azidofenil)prop-2-inenitrilo (1 eq., 14,9 mg, 0,0886 mmol) en DMSO (0,0872 mL), se añadió una solución de PEG-alkino (1 eq., 50,2 mg, 0,0886 mmol) en agua (0,0872 mL). A la mezcla obtenida se añadió una solución de sulfato de cobre pentahidratado (0,1 eq., 2,21 mg, 0,00886 mmol) en la mínima cantidad de agua seguido de la adición de una solución de ascorbato sódico (0,5 eq., 8,77 mg, 0,0443 mmol) en la mínima cantidad de agua. La adición de pentahidrato de sulfato de cobre (0,1 eq., 2,21 mg, 0,00886 mmol) y ascorbato sódico (0,5 eq., 8,77 mg, 0,0443 mmol) se repitió después de 30 minutos si la azida de partida todavía estaba presente. El exceso de agua se evaporó in vacuo, el producto crudo fue purificado por HPLC para dar el compuesto 52 (55 mg, 0,07485 mmol, 84%) como un aceite incoloro.

¹H RMN (400 MHz, ACETONITRILLO-*d*₃) δ 8,42 (s, 1H), 7,95-8,02 (m, J = 9,03 Hz, 2H), 7,86-7,95 (m, J = 8,78 Hz, 2H), 7,30 (s ancho, 2H), 7,19 (s ancho, 1H), 4,71 (s, 2H), 3,73-3,79 (m, 2H), 3,65-3,73 (m, 7H), 3,54-3,65 (m, 29H), 3,51 (t, J = 5,40 Hz, 2H), 3,34 (q, J = 5,35 Hz, 2H), 3,13 (d, J = 4,52 Hz, 2H), 2,37-2,46 (m, 2H), 1,92-2,01 (m, 5H); ¹³C RMN (126 MHz, CLOROFORMO-*d*) δ 177,5, 151,3, 144,6, 140,7, 140,7, 140,6, 127,2, 126,0, 125,9, 125,8, 122,4, 110,5, 87,2, 75,4, 75,3, 75,3, 75,2, 75,2, 75,1, 75,1, 75,1, 75,0, 74,9, 74,8, 74,8, 72,2, 71,9, 68,9, 68,5, 45,0, 44,2, 41,6; ESI-MS: C₃₅H₅₅N₆O₁₁⁺ [M+H]⁺, 735,39; encontrado 735,20.

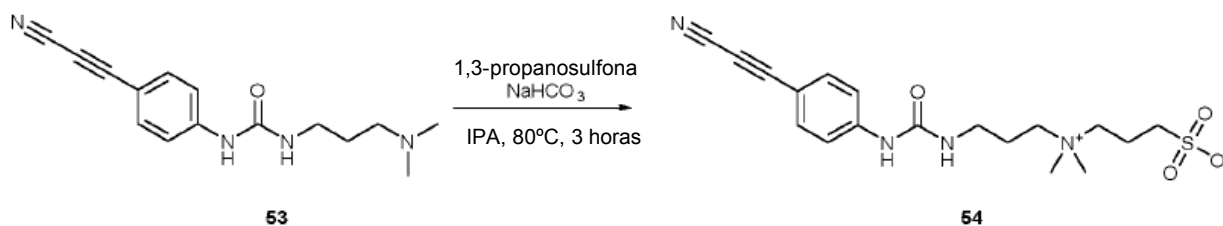
1-(4-(Cianoetnil)fenil)-3-(3-(dimetilamino)propil)urea (53):



A una solución de trifosgeno (1 eq., 56,3 mg, 31,6 μL, 0,19 mmol) en THF (0,404 μL) fue agregada una solución de 3-(4-aminofenil)prop-2-inenitrilo (3 eq., 80,9 mg, 0,569 mmol) en THF (0,404 μL). Luego se añadió trietilamina (6 eq., 115 mg, 158 μL, 1,14 mmol). La mezcla se agitó durante 5 min y luego se añadió 3-dimetilaminopropilamina (3 eq., 58,1 mg, 71,8 μL, 0,569 mmol) y trietilamina (2 eq., 38,4 mg, 52,7 μL, 0,379 mmol) en THF (0,404 μL). La mezcla de reacción se agitó durante 10 minutos y luego se concentró. El residuo obtenido fue purificado por HPLC para dar el compuesto 53 (47 mg, 0,1764 mmol, 93%) como un sólido blanco.

¹H RMN (400 MHz, METANOL-*d*₄) δ 7,45-7,50 (m, 2H), 7,41-7,45 (m, 2H), 3,23-3,25 (m, 1H), 3,04-3,11 (m, 2H), 2,80 (s, 6H), 1,77-1,91 (m, 2H); ¹³C RMN (101 MHz, METANOL-*d*₄) δ 156,5, 143,7, 134,4, 118,0, 109,3, 105,0, 83,7, 61,0, 55,2, 42,1, 35,9, 25,3; ESI-MS: C₁₅H₂₀N₄O⁺ [M+H]⁺, 271,16; encontrado 271,15.

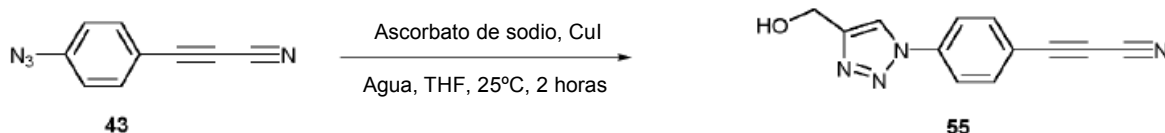
3-((3-(3-(4-(Cianoetnil)fenil) ureido) propilo) dimetilamonio) propano-1-sulfonato (54):



El compuesto 53 (1 eq., 27 mg, 0,0702 mmol) y 1,3-propanosulfona (1,1 eq., 9,44 mg, 0,00678 ml, 0,0773 mmol) fueron disueltos en IPA (0,5 ml) y sometidos a reflujo durante 3 h. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y el precipitado se filtró y se lavó con agua destilada fría para eliminar cualquier propanosulfona no reaccionada para dar el compuesto 54 (27 mg, 0,0688 mmol, 98%) como un sólido blanco.

^1H RMN (400 MHz, óxido de deuterio) δ 7,45-7,67 (m, 2H), 7,33 (s ancho, 2H), 3,61 (s ancho, 4H), 3,53 (s ancho, 1H), 3,39 (s ancho, 2H), 3,31 (s ancho, 2H), 3,25 (s ancho, 2H), 3,03 (s ancho, 7H), 2,89 (s ancho, 7H), 2,13 (s ancho, 1H), 1,89 (s ancho, 7H), 1,08 (s ancho, 2H); ESI-HRMS: $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}$, 392,15183; encontrado 392,15254. Los compuestos 49-54 se pueden utilizar para un método de conjugación según la invención; por ejemplo, para cambiar los parámetros ADME (agentes solubilizantes).

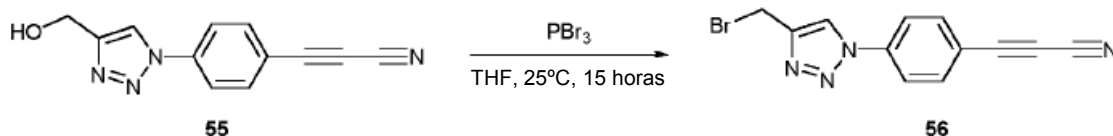
3-(4-(4-(Hidroximetil)-1H-1,2,3-triazol-1-il) fenil) propiononitrilo (55):



Fueron solubilizados 3-(4-azidofenil)prop-2-inenitrilo (1 eq., 300 mg, 1,78 mmol), 2-propin-1-ol (2 eq., 200 mg, 0,211 mL, 3,57 mmol) en THF (9 mL). A esta mezcla se añadió una solución de sulfato de cobre pentahidratado (10%, 44,5 mg, 0,178 mmol) en 1,5 mL de agua seguido de la solución de ascorbato sódico (0,5 eq., 176 mg, 0,892 mmol) en 1,5 mL de agua. La solución resultante se agitó durante 2h y luego se concentró en el evaporador rotatorio. El residuo se extrajo con DCM. La capa orgánica fue lavada con NH_4Cl (sat.) y agua, secada sobre MgSO_4 y después evaporada. El residuo se resolubilizó en DCM y el producto se filtró para dar el compuesto 55 (23,28 mg, 0,08108 mmol, 92%) como un sólido ligeramente amarillento.

^1H NMR (400 MHz, MeOD) δ 8,58 (s, 1H), 8,04 (d, $J = 7,4$ Hz, 2H), 7,93 (d, $J = 7,4$ Hz, 2H), 4,77 (s, 2H); ESI-MS: $\text{C}_{12}\text{H}_9\text{N}_4\text{O}^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 225,08; encontrado 225,05.

3-(4-(4-(Bromometil)-1H-1,2,3-triazol-1-il) fenil) propiononitrilo (56):



El compuesto 55 (1 eq., 19,8 mg, 0,0881 mmol) se disolvió en THF (1 mL) bajo nitrógeno a temperatura ambiente y se agregó 3-(4-(4-(bromometil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)fenil)prop-2-inenitrilo (23,3 mg, 0,0811 mmol, 92%). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15 horas. Los disolventes se evaporaron, el producto crudo fue purificado por HPLC para dar el compuesto 56 (23,3 mg, 0,0811 mmol, 92%) como un sólido blanco.

^1H RMN (400 MHz, ACETONITRIL- d_3) δ 8,44 (s, 1H), 7,78-8,03 (m, 5H), 4,74 (s, 2H); ^{13}C RMN (101 MHz, CLOROFORMO- d) δ 150,9, 144,3, 140,6, 140,5, 126,0, 125,9, 110,4, 87,1, 68,5, 27,0; ESI-MS: $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{BrN}_4^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 286,99; encontrado 287,08.

El compuesto 56 se puede utilizar para un método de bioconjugación según la invención.

Trifluoroacetato de 1-((1-[4-(cianoetil)fenil]-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)-3,3,6,6-tetrametil-4,5-dihidro-2,3,6,7-tetrahidrotiepinio (57):

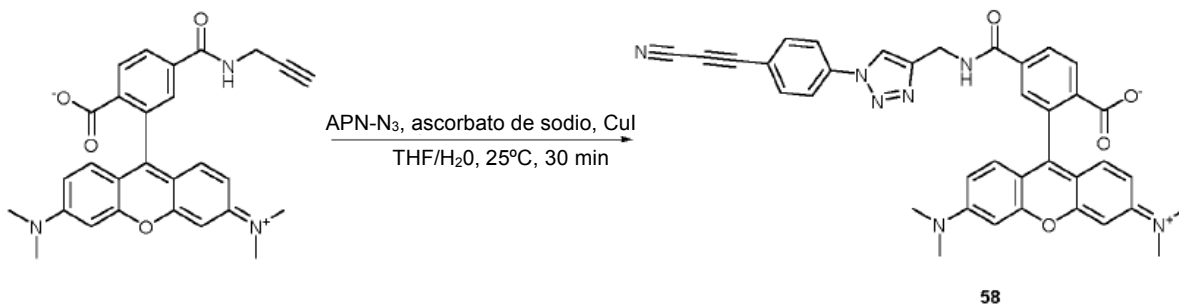


- 5 A una solución desgasificada de 3-[4-[4-(bromometil)-1H-1,2,3-triazol-1-il]fenil]prop-2-inenitrilo (1 eq., 19,6 mg, 0,0684 mmol) y TMTH (1,89 eq., 21,7 mg, 0,129 mmol) en DCM (0,982 mL), se añadió una solución de triflato de litio (10 eq., 106 mg, 0,684 mmol) en agua (0,982 mL). La mezcla bifásica obtenida se mezcló fuertemente durante 2 días a 25°C. Las fases fueron separadas, la fase orgánica se lavó con DCM (5x2 mL). Las fracciones orgánicas unidas se evaporaron y el producto crudo fue purificado por HPLC para dar el compuesto 57 (23,7 mg, 0,0451, 66%) como un sólido blanco.

ESI-HRMS: C₂₂H₂₃N₄S, 375,16434; encontrado 375,16497.

El compuesto 57 se puede utilizar para la química click (química click promovida por saturación) según la invención.

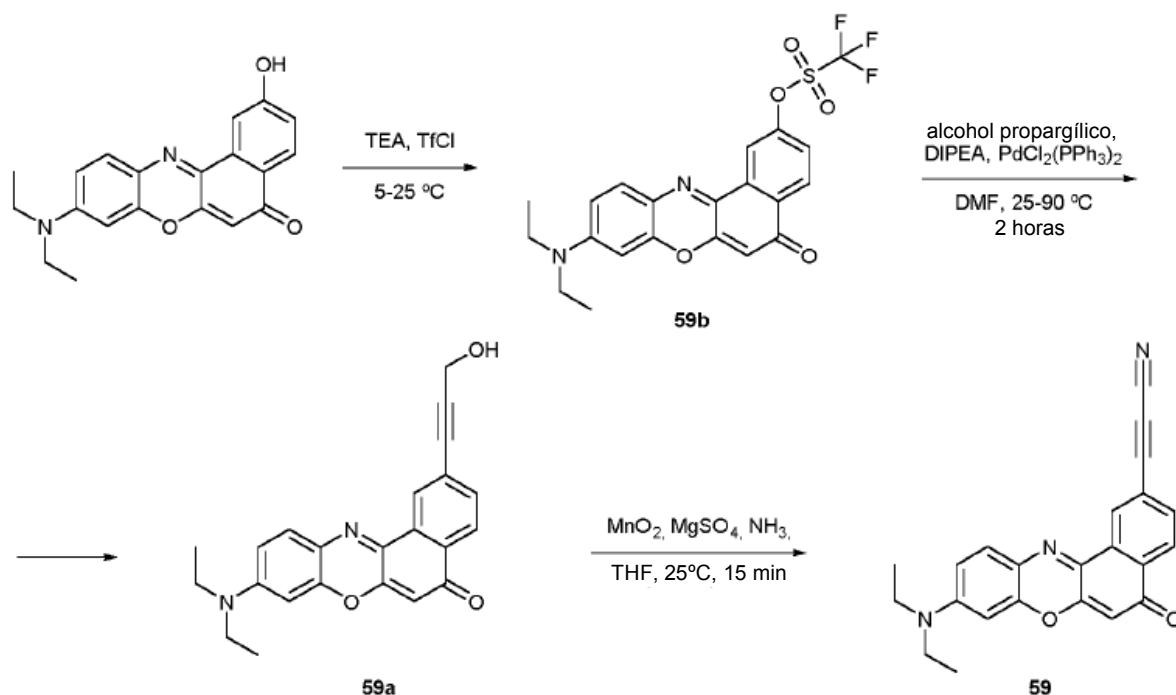
- 10 4-(((1-(4-(cianoetil)fenil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)carbamoil)-2-(6-(dimetilamino)-3-(dimetiliminio)-3H-xanten-9-il)benzoato (58):



- 15 Fueron solubilizados 2-[6-(dimetilamino)-3-(dimetiliminio)-3H-xanten-9-il]-4-[(prop-2-in-1-il)carbamoil]benzoato (1 eq., 52,8 mg, 0,113 mmol) y 3-(4-azidofenil)prop-2-inenitrilo (1 eq., 19 mg, 0,113 mmol) en THF (1 mL). Se añadió H₂O (1 mL) a la mezcla de reacción obtenida seguido de la adición de soluciones de pentahidrato de sulfato de cobre (10%, 2,82 mg, 0,0113 mmol) y ascorbato sódico (50%, 11,2 mg, 0,0565 mmol) en una cantidad mínima de agua (por separado). La mezcla de reacción obtenida se agitó durante otros 30 minutos, se evaporó y purificó por HPLC para dar el compuesto 58 (66,8 mg, 0,105 mmol, 93%) como un sólido de color violeta oscuro.

- 20 ¹H RMN (400 MHz, METANOL-d₄) δ 8,51 (s, 1H), 8,33 (d, J = 8,28 Hz, 1H), 8,16 (dd, J = 1,51, 8,28 Hz, 1H), 7,86-8,02 (m, 2H), 7,64-7,86 (m, 3H), 7,02-7,12 (m, 2H), 6,84-7,02 (m, 4H), 4,58-4,71 (m, 2H); ESI-HRMS: C₃₇H₂₉N₇O₄, 635,22811; encontrado 635,22861.

3-(9-(Dietilamino)-5-oxo-5H-benzo[a]fenoxazin-2-il)propionitrilo (59):



59b: Se disolvió 8-(dietilamino)-3-hidroxi-12H-10-oxa-5-azatetrafen-12-ona (1 eq., 65 mg, 0,194 mmol) en DCM seco (2 mL) y se enfrió a 5°C. Luego se añadió TEA (1,2 eq., 23,6 mg, 0,0324 mL, 0,233 mmol) seguido de la adición de TfCl (1,2 eq., 39,3 mg, 0,0249 mL, 0,233 mmol). La adición de Tf₂O fue repetida hasta la desaparición completa del material de partida. El disolvente se evaporó y el residuo se trató con agua. El precipitado se filtró y se lavó con agua y heptano para dar el producto deseado (76 mg, 0,163 mmol, 84%) como un sólido de color violeta oscuro.

ESI-HRMS: C₂₁H₁₇F₃N₂O₅S, 466,08103; encontrado 466,08221.

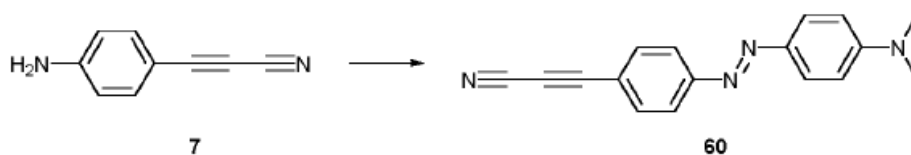
59a: Bajo una atmósfera inerte, se agregaron DIPEA (2 eq., 16,1 mg, 0,0206 mL, 0,124 mmol) y alcohol propargílico (1,5 eq., 5,23 mg, 0,00551 mL, 0,0933 mmol) a una solución de 59b (1 eq., 29 mg, 0,0622 mmol), PdCl₂(PPh₃)₂ (5%, 2,18 mg, 0,00311 mmol) y CuI (10%, 1,18 mg, 0,00622 mmol) en DMF (1 mL). Después de agitar durante 2 horas a 90°C, el disolvente se retiró bajo presión reducida. El producto crudo fue purificado por cromatografía ultrarrápida (DCM-MeOH de 100-0 a 80-20).

ESI-HRMS: C₂₃H₂₀N₂O₃, 372,14739; encontrado 372,14735.

59: A la solución de 59a (1 eq., 10 mg, 0,0269 mmol) en THF (0,121 mL) se añadió MgSO₄ (15 eq., 48,5 mg, 0,403 mmol), NH₃ (4 eq., 2 M, 0,0537 mL, 0,107 mmol) y MnO₂ (15 eq., 35 mg, 0,403 mmol). La mezcla de la reacción fue agitada a t.a. durante 15 minutos y fue seguida por HPLC. Después de terminar la reacción, la mezcla fue filtrada a través de Celite y lavada a fondo con THF. La evaporación del filtrado dio el producto crudo 59 (9,47 mg, 0,0258 mmol, 96%) que fue purificado por HPLC.

¹H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ 8,91 (s, 1H), 8,26 (d, J = 8,03 Hz, 1H), 7,79 (dd, J = 1,51, 8,03 Hz, 1H), 7,62 (d, J = 9,29 Hz, 1H), 6,74 (dd, J = 2,63, 9,16 Hz, 1H), 6,51 (d, J = 2,51 Hz, 1H), 6,35 (s, 1H), 5,31 (s, 2H), 3,49 (q, J = 7,11 Hz, 4H), 1,09-1,36 (m, 6H); ESI-HRMS: C₂₃H₁₇N₃O₂, 367,13208; encontrado 367,13145.

(E)-3-(4-((4-(dimetilamino) fenil) diazenilo) fenil) propionitrilo (60):

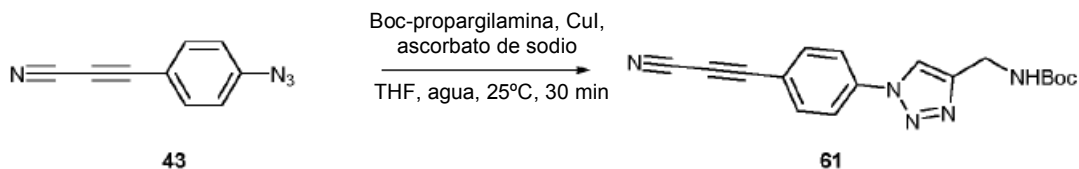


El compuesto 7 (1 eq., 167 mg, 1,17 mmol) se disolvió en acetonitrilo (2,58 mL). A esta mezcla agitada se añadió nitrito de isoamilo (1,5 eq., 206 mg, 0,237 mL, 1,76 mmol), la agitación continuó durante otros 2 minutos, luego se añadió dimetilanilina (1,1 eq., 156 mg, 0,165 mL, 1,29 mmol). La mezcla de reacción resultante se agitó durante la noche (se volvió roja), se evaporó y purificó por cromatografía ultrarrápida (DCM, primer pico) para dar el compuesto 60 (120 mg, 0,437 mmol, 37%) como un sólido rojo.

^1H RMN (400 MHz, CLOROFORMO- d) δ 7,91 (d, $J = 9,03$ Hz, 2H), 7,82-7,88 (m, $J = 8,53$ Hz, 2H), 7,62-7,77 (m, $J = 8,53$ Hz, 2H), 6,77 (d, $J = 9,03$ Hz, 2H), 3,08-3,18 (m, 6H); ^{13}C RMN (101 MHz, CLOROFORMO- d) δ 154,7, 153,2, 143,7, 134,4, 125,8, 122,5, 117,3, 111,6, 105,6, 83,3, 64,2, 40,3; ESI-HRMS: $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{N}_4$, 274,12185; encontrado 274,12247.

5 Los compuestos 58-60 se pueden utilizar para un método de detección según la invención.

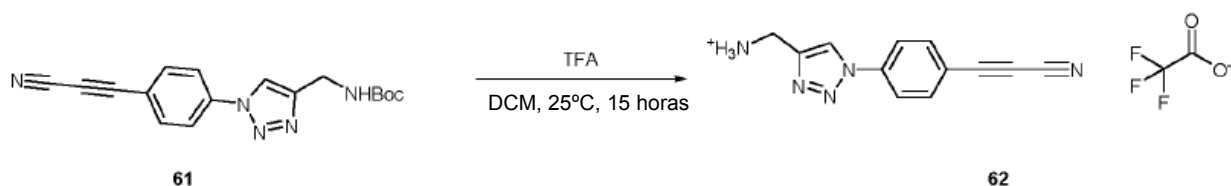
((1-(4-(Cianoetil)fenil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)carbamato de terc-butilo (61):



10 A una solución del compuesto 43 (1 eq., 51,5 mg, 0,306 mmol) y BOC-propargilamina (1 eq., 47,5 mg, 0,306 mmol) en THF (2 mL) fueron añadidos H_2O (1 mL) y una solución de CuSO_4 (10%, 4,89 mg, 0,0306 mmol) y ascorbato sódico (50%, 30,3 mg, 0,153 mmol) en agua (50 μL cada uno). La agitación continuó durante 10 minutos, fue agregada una porción más de CuSO_4 (el 10%, 4,89 mg, 0,0306 mmol) y ascorbato del sodio (50%, 30,3 mg, 0,153 mmol). Después de otros 15 minutos de agitación, se añadieron Et_2O (15 mL) y NH_4Cl (sat, 10 mL). La fase orgánica se lavó dos veces más con NH_4Cl (sat, 10 mL), se secó sobre MgSO_4 y se evaporó para dar el compuesto 61 (98 mg, 0,303 mmol, 99%) como un sólido amarillo. Se usó sin más purificación.

15 ^1H RMN (400 MHz, CLOROFORMO- d) δ 7,97 (s, 1H), 7,74-7,81 (m, $J = 8,78$ Hz, 2H), 7,67-7,74 (m, $J = 8,78$ Hz, 2H), 4,41 (d, $J = 6,02$ Hz, 2H), 1,32-1,41 (m, 9H); ^{13}C RMN (101 MHz, CLOROFORMO- d) δ 139,0, 135,1, 120,4, 117,8, 107,2, 105,1, 81,3, 64,5, 28,4; ESI-MS: $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{N}_5\text{O}_2^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 323,14; encontrado 323,13.

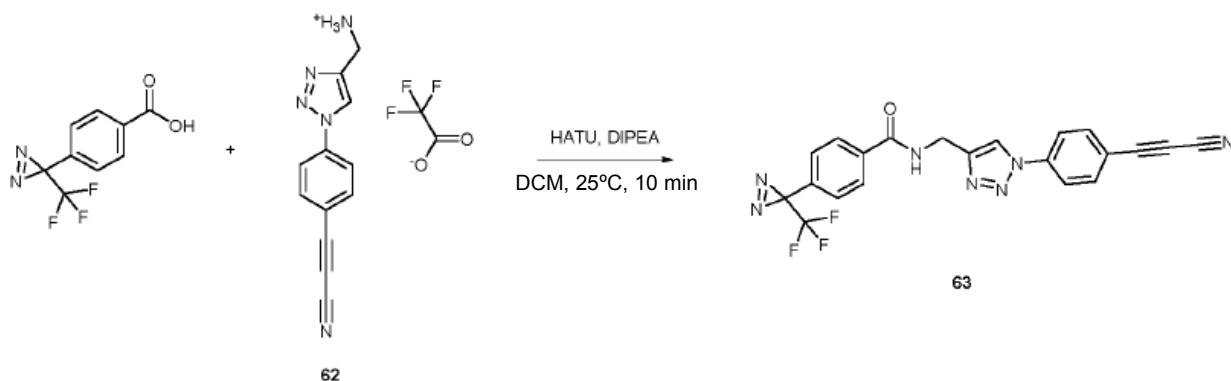
Trifluoroacetato de (1-(4-(cianoetil)fenil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metanaminio (62):



20 A una solución del compuesto 61 (1 eq., 21,5 mg, 0,0665 mmol) en DCM (1 mL) se añadió TFA (20 eq., 151 mg, 0,0988 mL, 1,33 mmol). La mezcla de reacción obtenida se dejó durante la noche a temperatura ambiente (o 2 horas a 37°C) para dar el producto específico (22,4 mg, 0,0665 mmol, 100%) después de la evaporación de todos los compuestos volátiles.

25 ^1H RMN (400 MHz, METANOL- d_4) δ 8,74 (s, 1H), 7,99-8,15 (m, 2H), 7,85-7,97 (m, 2H), 4,25-4,45 (m, 2H); ^{13}C RMN (101 MHz, METANOL- d_4) δ 141,2, 138,9, 135,2, 122,3, 120,3, 117,7, 104,4, 81,1, 62,9, 34,0; ESI-MS: $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{N}_5^+$ $[\text{M}]^+$, 227,09; encontrado 227,10.

N-((1-(4-(cianoetil)fenil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)-4-(3-(trifluorometil)-3H-diazirin-3-il)benzamida (63):



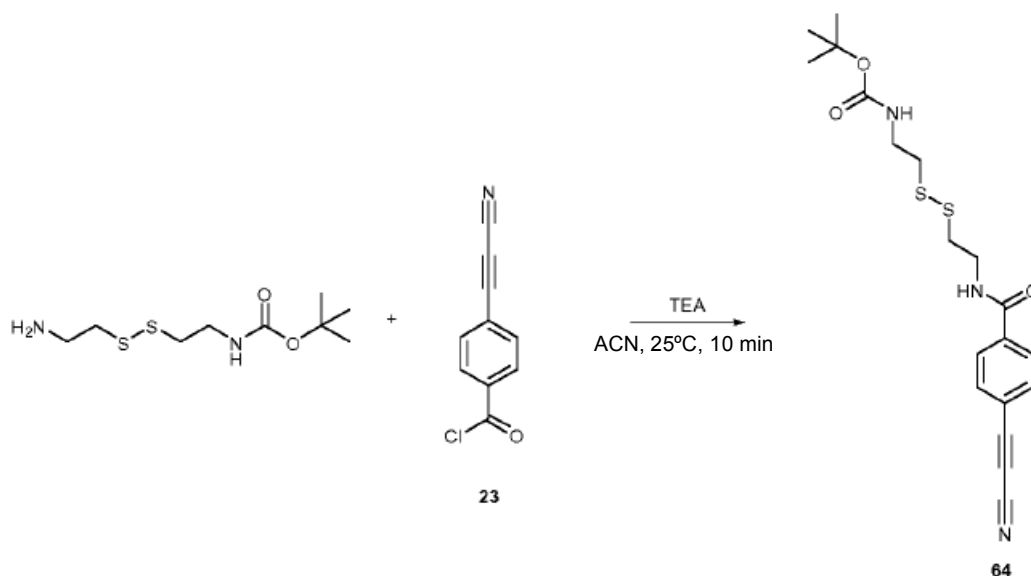
30 Una solución de ácido 4-[3-(trifluorometil)-3H-diazirin-3-il]benzoico (1 eq., 57,8 mg, 0,251 mmol), HATU (1 eq., 95,5 mg, 0,251 mmol), y DIPEA (3 eq., 97,4 mg, 0,125 mL, 0,753 mmol) en DMF (2 mL) se añadió al compuesto 62 (1

eq., 84,7 mg, 0,251 mmol). La masa de la reacción obtenida fue agitada durante 10 minutos y purificada por HPLC para dar el compuesto específico (76,5 mg, 0,176 mmol, 70%) como un sólido blanco.

ESI-HRMS: $C_{21}H_{12}F_3N_7O$, 435,10554; encontrado 435,10512.

5 El compuesto 63 se puede utilizar para un método de marcaje de acuerdo con la invención, tal como para el fotomarcaje de las proteínas.

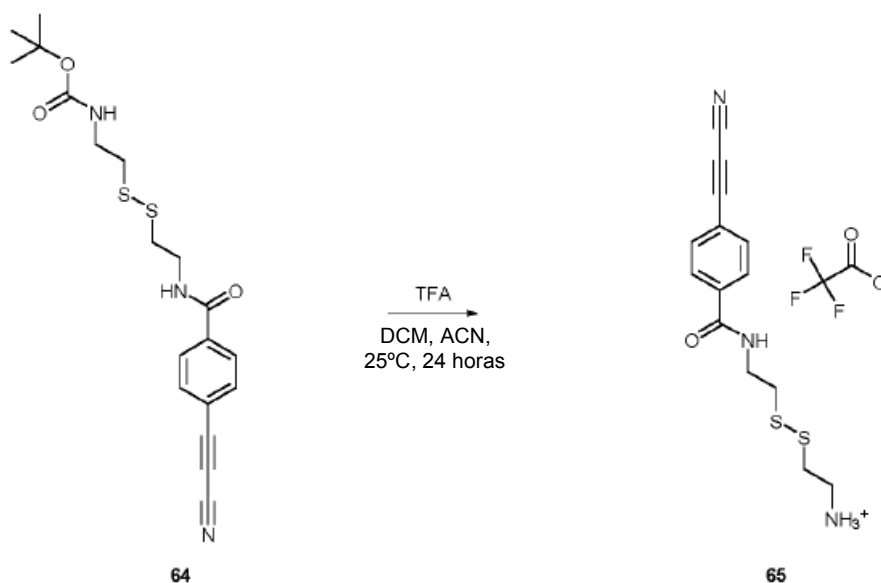
(2-((2-(4-(Cianoetil)benzamido)etil)disulfanil)etil)carbamato de terc-butilo (64):



10 A una solución del compuesto 23 (1 eq., 36 mg, 0,143 mmol) en ACN (1 mL) se añadió una solución de N-{2-[(2-aminoetil)disulfanil]etil}carbamato de terc-butilo (1 eq., 36 mg, 0,143 mmol) y DIPEA (2,12 eq., 39,1 mg, 0,05 mL, 0,303 mmol) en ACN (1 mL). La mezcla de la reacción obtenida fue dejada reposar durante 10 minutos, después los disolventes fueron evaporados y el producto crudo fue purificado por cromatografía ultrarrápida para dar el producto específico (29,3 mg, 0,0723 mmol, 51%) como un sólido amarillento.

15 1H RMN (400 MHz, METANOL- d_4) δ 7,74-7,84 (m, J = 8,53 Hz, 2H), 7,58-7,74 (m, J = 8,53 Hz, 2H), 3,60 (t, J = 6,78 Hz, 2H), 3,23-3,35 (m, 2H), 2,85 (t, J = 6,78 Hz, 2H), 2,71 (t, J = 6,90 Hz, 2H), 1,32 (s, 9H); ^{13}C RMN (101 MHz, METANOL- d_4) δ 167,3, 157,0, 137,3, 133,5, 127,5, 120,1, 104,4, 81,5, 78,8, 63,1, 39,3, 39,1, 37,8, 27,4, 26,6; ESI-MS: $C_{19}H_{24}N_3O_3S_2^+$ $[M+H]^+$, 406,12; encontrado 406,10.

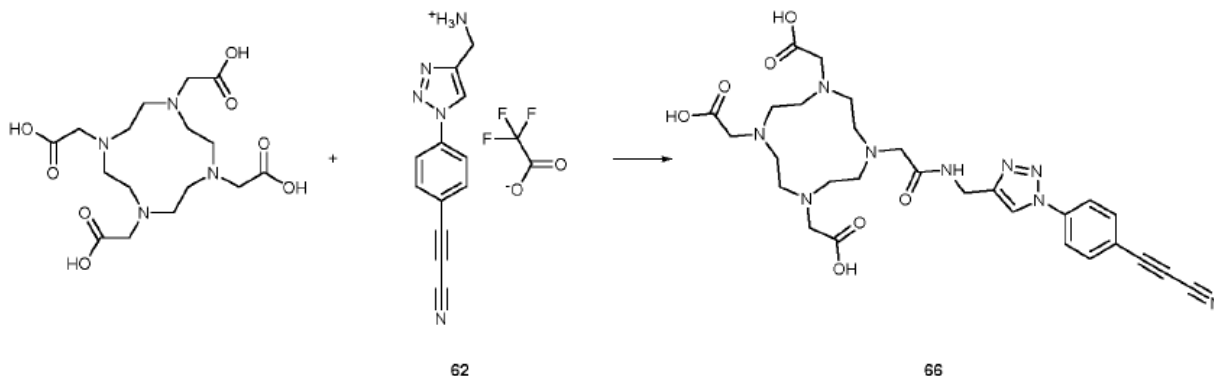
Trifluoroacetato de 2-((2-(4-(cianoetil)benzamido)etil)disulfanil)etan-1-amino (65):



A una solución del compuesto 64 (1 eq., 29,3 mg, 0,0723 mmol) en la mezcla ACN-DCM (1 mL de cada disolvente) se añadió TFA (10 eq., 82,4 mg, 0,0537 mL, 0,723 mmol). La mezcla de reacción obtenida se agitó durante 24 horas, y se evaporó para dar al compuesto específico 65 (30 mg, 0,0715 mmol, 99%) como un líquido incoloro.

ESI-HRMS: $C_{14}H_{16}N_3OS_2^+$, 306,07293; encontrado 306,07312.

5 Trifluoroacetato de 2-((2-(4-(cianoetil) benzamido) etil) disulfanil)etan-1-aminio (66):

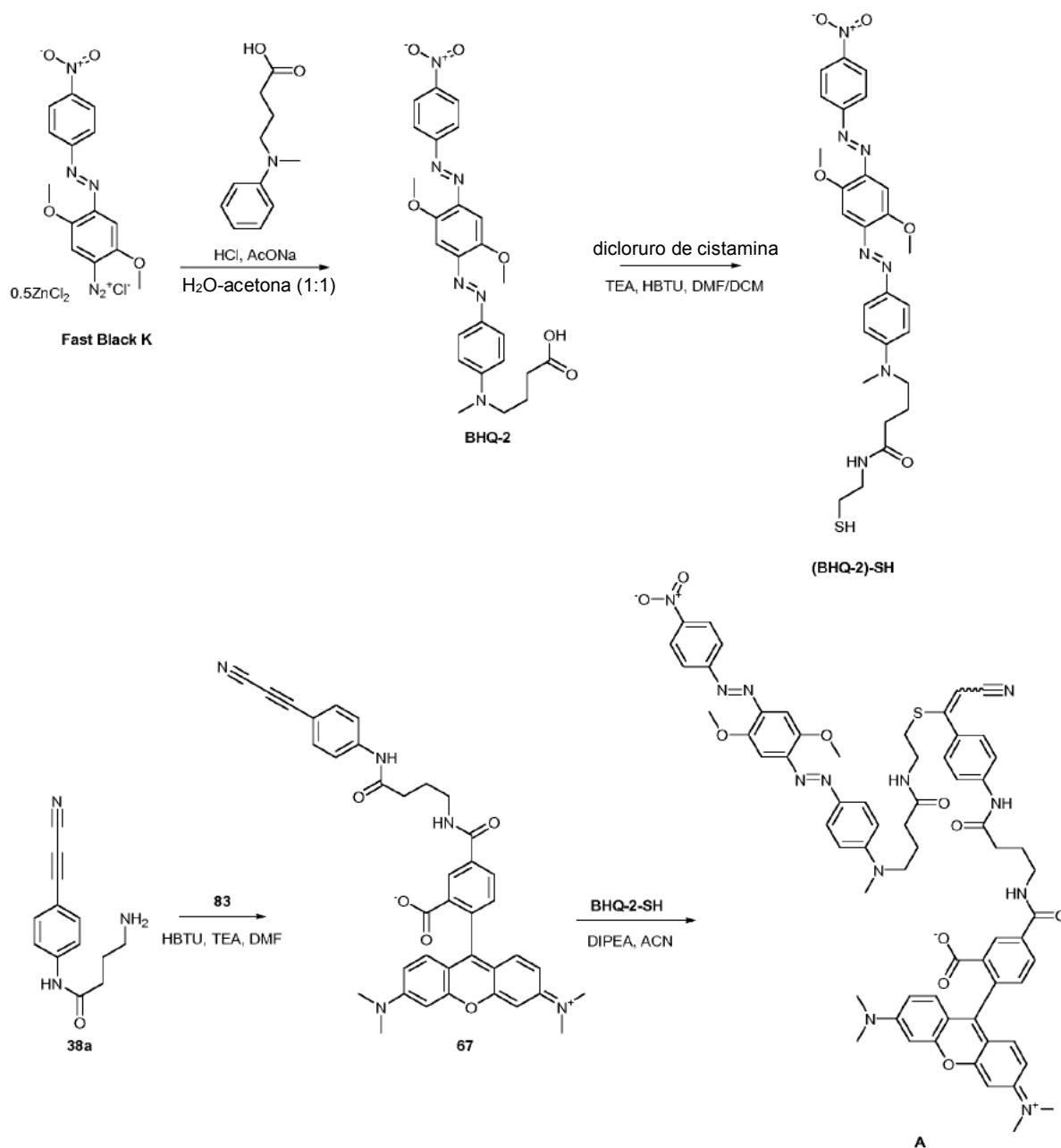


Una solución del compuesto 62 (0,567 eq., 10,1 mg, 0,0299 mmol) en MeOH (0,0881 mL) se añadió lentamente a una solución de ácido 2-[4,7,10-tris(carboximetil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1-il]acético (1 eq., 21,4 mg, 0,0528 mmol) en agua (0,661 mL). La mezcla se enfrió en hielo y el pH se ajustó a 5 usando DIPEA (25,2 eq., 172 mg, 0,22 mL, 1,33 mmol). Una solución acuosa de EDC (0,65 eq., 6,59 mg, 0,0344 mmol) se añadió en forma de gotas y se agitó durante 20 min con enfriamiento en hielo. El pH se elevó a 8 usando DIPEA y reaccionó durante 30 min a temperatura ambiente. El punto final de la reacción fue monitoreado usando HPLC.

ESI-HRMS: $C_{28}H_{35}N_9O_7^+$, 609,26594; encontrado 609,26417.

El compuesto 66 se puede utilizar como un agente quelante.

15 5-((4-(4-(2-Ciano-1-((2-(4-(4-((E)-(2,5-dimetoxi-4-((E)-(4-nitrofenil)diazenil)fenil)diazenil)fenil)-(metil)amino)butanamido)etil)tio)vinil)fenil)amino)-4-oxobutil)carbamoil)-2-(6-(dimetilamino)-3-(dimetiliminio)-3H-xanten-9-il)benzoato (A):



Ácido 4-((4-((E)-(2,5-dimetoxi-4-((E)-(4-nitrofenil)diazenil)fenil)diazenil)fenil)(metil)amino)-butanoico (BHQ-2).

La hemi-sal Fast Black K (cloruro de zinc) (grado práctico, ≈ 30% de contenido de colorante) (7,76 g) se suspendió en agua fría (150,0 mL, 0°C) y se agitó durante 20 minutos. La suspensión fue filtrada, y la solución roja fue agregada gota a gota a una mezcla fría (0°C) de ácido 4-(metil(fenil)amino)butanoico (1,33 g, 6,88 mmol), ácido clorhídrico concentrado (3,1 ml) y acetato de sodio (3,6 g, 43,90 mmol) en la mezcla de agua-acetona (1:1) (150,0 mL). La mezcla de reacción se agitó a 10°C durante 15 minutos y a temperatura ambiente durante 2 horas. Entonces, la reacción cruda fue extraída con acetato de etilo (3x150 mL) y las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄. El producto crudo fue purificado por cromatografía de columna en gel de sílice (100% EtOAc, luego 100% de DCM a DCM/MeOH (95:5)). Se obtuvo BHQ-2 (1,36 g, 39%) como un sólido violeta oscuro.

¹H NMR (400 MHz, METANOL-d₄) δ 8,31 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 8,00 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 7,86 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 7,45 (s, 1H), 7,40 (s, 1H), 6,77 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 4,05 (s, 3H), 4,00 (s, 3H), 3,5 (t, J = 7,1 Hz, 2H), 2,36 (t, J = 7,1 Hz, 2H), 1,98-1,90 (m, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, METANOL-d₄) δ 176,2, 157,1, 154,3, 153,0, 151,4, 149,0, 147,4, 145,0, 142,6, 126,9, 125,3, 124,2, 112,1, 101,7, 100,7, 57,2, 52,3, 39,0, 31,6, 22,9.

65b: 4-((4-((E)-(2,5-Dimetoxi-4-((E)-(4-nitrofenil)diazenil)fenil)diazenil)fenil)(metil)amino)-N-(2-mercaptoetil)butanamida ((BHQ-2)-SH).

5 Se disolvió BHQ-2 (1 eq., 92,2 mg, 0,182 mmol) en una mezcla de DMF (5 mL) y DCM (10 mL). Se añadieron TEA (6 eq., 152 µL, 1,09 mmol) y dicloruro de cistamina (5 eq., 204 mg, 0,91 mmol). La mezcla se enfrió a 0°C y se añadió HBTU (1 eq., 69 mg, 0,182 mmol). La solución se permitió alcanzar la temperatura ambiente y se agitó durante 15 horas. Cuando se alcanzó la conversión total, se agregó DTT (6 eq., 168 mg, 0,162 mL, 1,09 mmol). Después de que la mezcla resultante se agitó durante 10 minutos a temperatura ambiente, el producto crudo se diluyó con una solución de NaHCO₃ saturado (75 mL) y se extrajo con EtOAc (2X50 mL). Las capas orgánicas fueron combinadas, lavadas con agua (50 mL), salmuera (50 mL) y secadas sobre Na₂SO₄. El producto crudo fue purificado por cromatografía de columna en gel de sílice (DCM/MeOH de 100:0 a 95:5) para producir (BHQ-2)-SH (60,7 mg, 0,107 mmol, 59%) como un sólido violeta oscuro.

10 ¹H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ 8,33 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 8,0 (d, J = 9,1 Hz, 2H), 7,9 (d, J = 9,1 Hz, 2H), 7,42 (s, 1H), 7,42 (s, 1H), 6,75 (d, J = 9,00 Hz, 2H), 5,90 (t, J = 5,6 Hz, 1H), 4,06 (s, 3H), 4,01 (s, 3H), 3,49 (t, J = 7,4 Hz, 2H), 3,41 (dt, J = 6,2, 6,4 Hz, 2H), 2,64 (td, J = 6,4, 8,47 Hz, 2H), 2,24 (t, J = 7,4 Hz, 2H), 2,01-1,94 (m, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, CLOROFORMO-d) δ 172,2, 156,6, 153,8, 152,4, 151,1, 148,5, 147,0, 144,7, 142,3, 126,4, 124,9, 123,7, 111,6, 101,2, 100,3, 57,0, 56,9, 51,8, 42,5, 38,7, 33,4, 24,9, 23,0; HR-ESI-MS: C₂₇H₃₁N₇O₅S, 565,2107; encontrado 565,2105.

15 67: 5-((4-((4-(Cianoetil)fenil)amino)-4-oxobutil)carbamoil)-2-(6-(dimetilamino)-3-(dimetiliminio)-3H-xanten-9-il)benzoato.

20 A una solución desgasificada enfriada a 0°C de 62a (1 eq., 17,3 mg, 0,0507 mmol) y TAMRA-5'-COOH (1 eq., 21,8 mg, 0,0507 mmol) en DMF (1,4 mL), se añadió HBTU (1 eq., 19,2 mg) a 0°C. La masa de reacción obtenida se agitó durante 5 minutos y se añadió TEA. La masa de reacción se agitó durante 1 hora a 25°C, se evaporó y purificó por HPLC para producir el compuesto 65a (22 mg, 68%) como un sólido de color violeta oscuro.

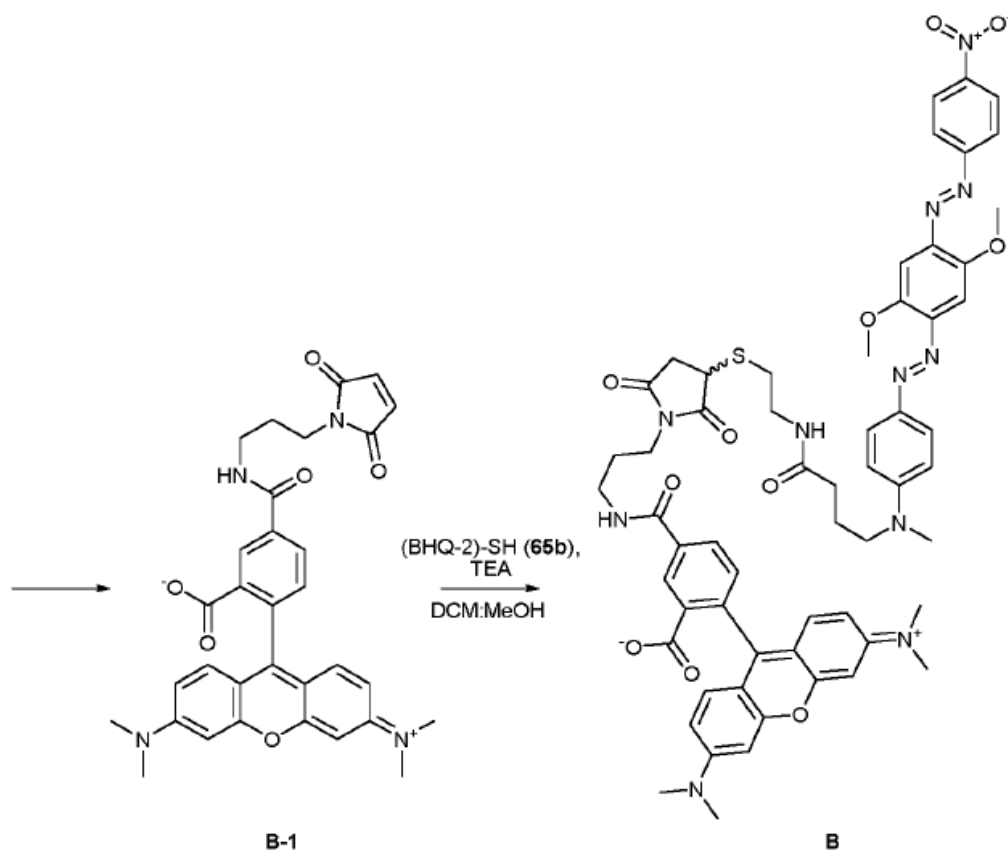
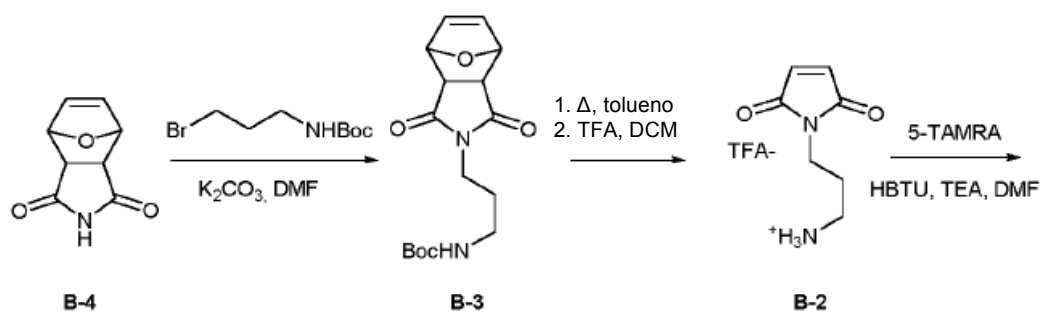
25 ¹H RMN (400 MHz, METANOL-d₄) δ 8,8 (s ancho, 1H), 8,7 (s, 1H), 8,08-8,16 (d, J = 8,2 Hz, 1H), 7,60-7,70 (d, J = 8,9 Hz, 2H), 7,49-7,58 (d, J = 8,9 Hz, 2H), 7,32-7,39 (d, J = 8,2, 1H), δ 7,01 (s, 4H), 6,93 (s, 2H), 3,48-3,58 (m, 2H), 3,26 (s, 12H), 2,44-2,54 (t, J = 7,17 Hz, 2H), 1,98-2,12 (m, 2H); ¹³C RMN (101 MHz, METANOL-d₄)-no informativo; HR-ESI-MS: 639,24817; encontrado 639,24310.

A: 5-((4-(2-Ciano-1-((2-(4-((E)-(2,5-dimetoxi-4-((E)-(4-nitrofenil)diazenil)fenil)diazenil)fenil)-(metil)amino)butanamido)etil)vinil)fenil)amino)-4-oxobutil)carbamoil)-2-(6-(dimetilamino)-3-(dimetiliminio)-3H-xanten-9-il)benzoato.

30 A una solución desgasificada de BHQ-SH (1,13 eq., 2 mg, 0,00354 mmol) en DCM (0,5 mL), se añadió una solución desgasificada del compuesto 67 (1 eq., 2 mg, 0,00313 mmol) en metanol (0,5 mL). Se añadió TEA (4,6 eq., 2 µL, 0,0144 mmol) y se dejó la masa de reacción obtenida durante la noche a 25°C. Los disolventes se evaporaron; el producto crudo fue solubilizado en DMSO (0,5 mL) y purificado por HPLC para dar BHQ-APN-TAMRA (A, 2,7 mg, 0,00225 mmol, 72%) como un sólido oscuro-violeta.

35 ¹H RMN (400 MHz, METANOL-d₄) δ 8,63 (d, J = 2,0 Hz, 1H), 8,34 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 8,22 (dd, J = 7,8, 2,0 Hz, 1H), 8,00 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 7,75 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 7,69 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 7,53 (d, j = 80 Hz, 1H), 7,39 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 7,34 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 6,75-6,86 (m, 8H), 5,48 (s, 1H), 4,02 (s, 3H), 3,92 (s, 3H), 3,58-3,63(m, 2H), 3,45-3,52 (m, 2H), 3,21 (s, 12H), 3,16 (t, J = 6,9 Hz, 2H), 3,08 (s, 3H), 2,71 (t, J = 6,5 Hz, 2H), 2,55 (t, J = 6,2 Hz, 2H), 2,22 (t, J = 6,9 Hz, 2H), 2,08-2,16 (m, 2H), 1,88-1,96 (m, 2H), 1,61 (s ancho, 1H); ¹³C RMN (101 MHz, METANOL-d₄)-no informativo; HR-ESI-MS: C₆₅H₆₅N₁₂O₁₀S⁺ [M+H]⁺, 1205,46618; encontrado 1205,46748.

40 5-((3-(3-((2-(4-((E)-(2,5-Dimetoxi-4-((E)-(4-nitrofenil)diazenil)fenil)diazenil)fenil)(metil)amino)butanamido)etil)-2,5-dioxopirrolidin-1-il)propil)carbamoil)-2-(6-(di-metilamino)-3-(dimetiliminio)-3H-xanten-9-il)benzoato (B):



B-4: 3a,4,7,7a-Tetrahydro-1H-4,7-epoxyisoindol-1,3(2H)-diona.

Este compuesto se sintetizó según el procedimiento descrito anteriormente.⁸⁴⁵

B-3: (3-(3aR,7aS)-1,3-dioxo-3a,4,7,7a-tetrahydro-1H-4,7-epoxyisoindol-2(3H)-il)carbamato de terc-butilo.

- 5 A la solución de B-4 (1 eq., 1,76 g, 10,7 mmol) y N-(3-bromopropil)carbamato de terc-butilo (2 eq., 5,07 g, 21,3 mmol) en DMF (20 mL), fue añadido K_2CO_3 (1,2 eq., 1,77 g, 12,8 mmol). La masa de reacción obtenida se calentó a 50°C durante 18 horas. La solución se dejó enfriar; un residuo sólido fue filtrado y lavado con DMF. Se evaporaron las fracciones orgánicas unidas, se añadió hexano (50 mL) a la masa de la mezcla obtenida. Las suspensiones obtenidas se agitaron durante otra hora, se filtró y se lavó con hexano para dar el compuesto B-3 (3,36 g, 10,4 mmol, 98%) como un sólido blanco.

^1H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ 6,49 (s, 2H), 5,23 (s, 2H), 3,52 (t, J = 6,5 Hz, 2H), 2,96-3,09 (m, 2H), 2,82 (s, 2H), 1,66-1,75 (m, 2H), 1,41 (s, 9H); ^{13}C RMN (101 MHz, CLOROFORMO-d) δ 176,5, 155,9, 136,5, 81,0, 79,3, 47,5, 37,1, 36,0, 28,4, 27,8.

B-2: 1-(3-Aminopropil)-1H-pirrol-2,5-diona (sal de TFA).

- 15 Una solución del compuesto 66c (1 eq., 243 mg, 0,754 mmol) en tolueno (25 ml) se sometió a reflujo durante 3 horas. El tolueno se evaporó; se resolvió el producto crudo blanco obtenido en DCM (5 mL) y se añadió TFA (0,5 mL). La agitación se continuó durante 2 horas hasta la desaparición completa del material de partida (controlado por

TLC). El disolvente se evaporó después de que la reacción se inactivara con metanol (3 mL). Se utilizó 1-(3-aminopropil)-1H-pirrol-2,5-diona (B-2, sal TFA, 190 mg, 94%) sin más purificación.

^1H RMN (400 MHz, METANOL- d_4) δ 6,76 (s, 2H), 3,52 (t, J = 6,7 Hz, 2H), 2,80-2,88 (m, 2H), 1,76-1,88 (m, 2H); ^{13}C RMN (101 MHz, METANOL- d_4) δ 170,6, 135,6, 38,5, 35,4, 28,0.

- 5 B-1: 2-(6-(Dimetilamino)-3-(dimetiliminio)-3H-xanten-9-il)-5-((3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propil)carbamoil)benzoato (TAMRA-maleimida):

A una solución de TAMRA-5'-COOH (1 eq., 71,5 mg, 0,166 mmol) en DMF (3,21 mL), se añadieron TEA (2,5 eq., 57,7 μL , 0,415 mmol) y HATU (1,12 eq., 70,7 mg, 0,186 mmol). La masa de reacción obtenida se agitó durante otros 5 minutos y se añadió B-2 (1 eq., 71,5 mg, 0,166 mmol). La agitación continuó durante 25 minutos y la masa de la reacción fue evaporada bajo presión reducida a un volumen de cerca de 1 mL, y la masa de la reacción fue purificada por HPLC preparativa para dar TAMRA-Maleimida (B-1, 34,8 mg, 0,0615 mmol, 37%) como un sólido rosado.

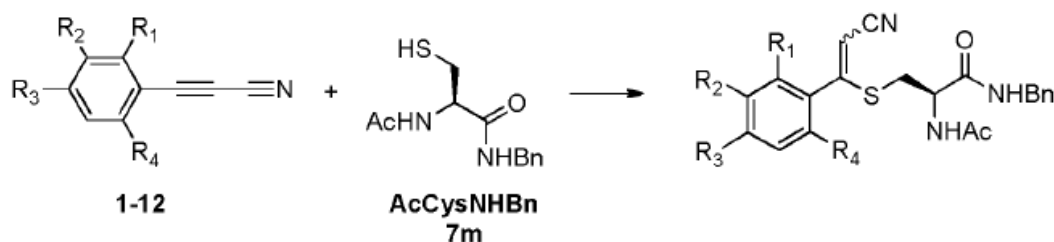
15 ^1H RMN (400 MHz, METANOL- d_4) δ 8,66 (d, J = 1,8 Hz, 1H), 8,14 (dd, J = 1,8, 8,0 Hz, 2H), 7,41 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 7,02 (d, J = 9,5 Hz, 1H), 6,92 (dd, J = 9,5, 2,2 Hz, 2H), 6,81 (d, J = 2,2 Hz, 2H), 6,72 (s, 2H), 3,52 (t, J = 6,8 Hz, 2H), 3,34 (t, J = 7,0 Hz, 2H), 3,17 (s, 12H), 1,80-1,90 (m, 2H); ^{13}C RMN (101 MHz, METANOL- d_4) δ 172,5, 168,2, 167,4, 160,6, 159,0, 158,9, 138,1, 137,7, 137,6, 135,5, 132,9, 132,3, 132,0, 131,4, 115,6, 114,8, 97,5, 82,4, 41,0, 38,6, 36,4, 29,3, HR-ESI-MS: $\text{C}_{32}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_6$, 566,21653; encontrado 566,21654.

20 B: 5-((3-(3-((2-(4-((4-((E)-(2,5-Dimetoxi-4-((E)-(4-nitrofenil)diazenil)fenil)diazenil)fenil)(metil)amino)butanamida)etil)tio)-2,5-dioxopirrolidin-1-il)propil)carbamoil)-2-(6-(dimetilamino)-3-(dimetiliminio)-3H-xanten-9-il)benzoato.

A una solución desgasificada de BHQ-SH (1,15 eq., 4,6 mg, 0,00812 mmol) en DCM (0,5 mL), se añadió una solución desgasificada de TAMRA-Maleimida (B-1) (1 eq., 4 mg, 0,00313 mmol) en metanol (0,5 mL). Se añadió TEA (5 eq., 5 μL , 0,0353 mmol) y se dejó reposar la masa de reacción obtenida durante la noche a 25°C. Los disolventes se evaporaron; el producto crudo fue solubilizado en DMSO (0,5 mL) y purificado por HPLC para dar el compuesto B (7 mg, 0,00621 mmol, 88%) como un sólido oscuro-violeta.

30 ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,91 (t, J = 6,1 Hz, 1H), 8,68 (s, 1H), 8,43 (d, J = 9,1 Hz, 2H), 8,31 (d, J = 8,9 Hz, 1H), 8,01-8,10 (m, 3H), 7,77 (d, J = 9,1 Hz, 2H), 7,60 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 7,39 (s, 1H), 7,33 (s, 1H), 6,99 (s, 3H), 6,89 (s, 1H), 6,85 (d, J = 9,1 Hz, 2H), 4,04 (dd, J = 3,9, 8,9 Hz, 1H), 3,98 (s, 3H), 3,92 (s, 3H), 3,41-3,45 (m, 2H), 3,27-3,38 (m, 6H), 3,23 (m, 12H), 3,06 (s, 3H), 2,85-2,95 (m, 1H), 2,72-2,81 (m, 1H), 2,52-2,56 (m, 2H), 2,17 (t, J = 7,3 Hz, 2H), 1,74-1,88 (m, 4H). HR-ESI-MS: $\text{C}_{59}\text{H}_{62}\text{N}_{11}\text{O}_{11}\text{S}^+$ [M+H] $^+$, 1132,43455; encontrado 1132,43384.

Ejemplo 2: Marcaje de un derivado de cisteína con un compuesto de 3-arylpropionitrilo



Procedimiento general

35 A un vial que contenía 985 μL de PBS (1x, pH 7,6), se añadieron posteriormente 5 μL de la solución madre de benzamida (10 mM en agua), 5 μL de la solución madre de arilpropionitrilo (1-12, 10 mM en DMSO) y 5 μL de solución madre de AcCysNHBn (7m, 10 mM en DMSO). Las alícuotas de la mezcla de la reacción (50 μL) fueron analizadas por HPLC (inyección en 0 y 30 minutos de reacción). Las áreas debajo de los picos de los materiales de partida y de los productos de la hidrólisis fueron normalizadas según el área del pico del estándar interno.

Resultados

40 Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 2 a continuación, que presenta la conversión de los compuestos 1-12 en 30 minutos en presencia del compuesto 7m a 50 μM de concentración de cada reactivo y 25°C. La reacción es extremadamente sensible a los impedimentos estéricos inducidos por sustituyentes en la posición orto respecto al grupo propionitrilo (entradas 1, 5, 8-9, 4) así como al efecto electrónico del sustituyente: los sustituyentes -I y -M aumentan (entradas 10 y 12), mientras que los sustituyentes +M disminuyen la reactividad del compuesto (entradas 45 3 y 7).

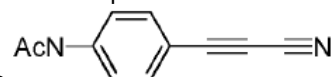
Tabla 2

Compuesto	Conversión	Compuesto	Conversión
1 o-OMe	10,1%	10 o-NO ₂	70,4%*
2 m-OMe	46,8%	12 p-CONHMe	85,5%
3 p-OMe	14,6%	11 p-NHAc	52,3%
5 o-NH ₂	10,8%	8 o-me	10,3%
6 m-NH ₂	42,0%	9 o,o'-diMe	2,3%**
7 p-NH ₂	7,4%	4 o,o'-diOMe	4,8%**

* Se observaron subproductos; ** conversión en 60 minutos.

Ejemplo 3: Estabilidad hidrolítica de un compuesto de 3-arylpropionitrilo y comparación con fenilmaleimida

A un vial que contenía 980 μ L de PBS (1x, pH 7,6), se añadieron posteriormente 10 μ L de una solución madre de



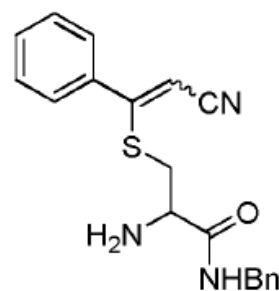
5 benzamida y 10 μ L de una solución madre de electrófilo (fenilmaleimida 1 o 11) para dar una concentración final de 1 mM (tanto estándar interno como electrófilo). Las alícuotas de la mezcla de reacción (50 μ L) fueron analizadas por HPLC durante 5 horas de hidrólisis (inyección cada 30 min). Las áreas debajo de los picos de los materiales de partida y los productos de la hidrólisis fueron normalizadas según el área del pico del estándar interno.

10 Los resultados obtenidos se presentan en las figuras 4 y 5. Una importante hidrólisis fue observada solamente para la fenilmaleimida 1 (PhMal, $k_{obs} = 7 \times 10^{-5} s^{-1}$). El compuesto 11 no mostró ningún cambio detectable en la concentración.

Ejemplo 4: Prueba de estabilidad

- Estabilidad del compuesto siguiente en diversas condiciones

15



20 Se preparó en DMSO una solución madre 100 mM del "producto de adición" y se almacenó a $-20^{\circ}C$. Se añadió 1 μ L de la solución madre a 999 μ L de las soluciones de trabajo para dar una concentración final de sustrato de 100 μ M. Se analizaron las alícuotas a 0, 30 y 60 min. Las áreas bajo los picos del material de partida se normalizaron según el área del pico del estándar interno (benzamida). Todas las mediciones se realizaron a $25^{\circ}C$. La tabla 3 a continuación muestra la conversión de "el producto de adición" en diferentes medios en una hora.

Tabla 3

Nº	Solución de trabajo	Conversión del "producto de adición" en 1 h
A	PhSH 100 mM en PBS (7,4):DMSO = 80:20	0,7%
B	H ₂ O ₂ 1 M	1,8%
C	HCl 1 M (pH = 0)	0,1%
D	NaOH 1 M (pH = 14)	3,4%

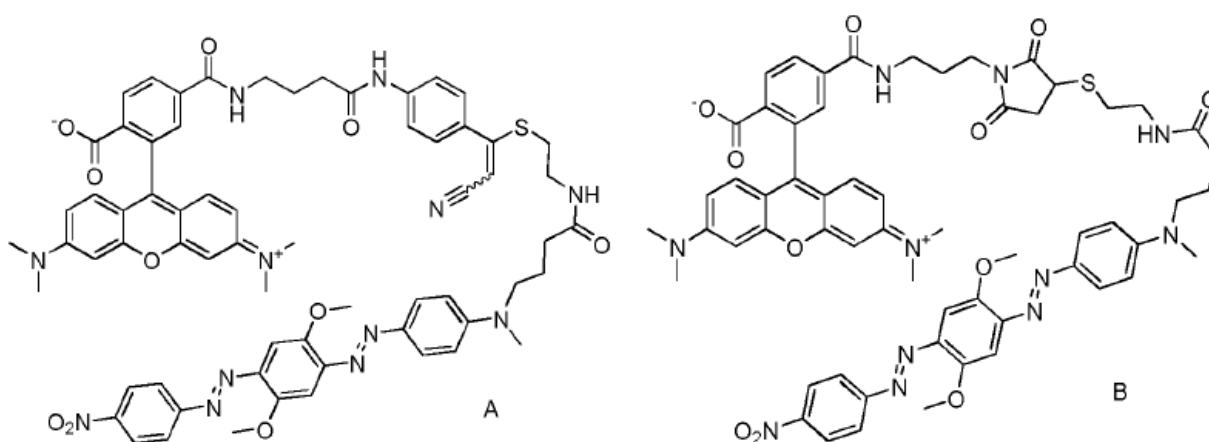
E	glutación reducido 1 M (GSH) en PBS (7,4)	0,4%
F	imidazol 1 M en PBS (7,4)	0,5%

Este experimento muestra claramente que el producto de adición es estable y sufre muy poca degradación en una amplia gama de condiciones, en particular, para el pH comprendido entre 0 y 14.

Además, casi no se observó ningún intercambio de tiol cuando el producto de adición se expuso durante 1 hora a un medio que comprendía un exceso de otro tiol, tal como el feniltiol o el glutatión.

- Prueba de estabilidad: comparación con maleimida

La estabilidad de los compuestos A (formados por el proceso según la invención) y B (compuesto de referencia) se estudió a continuación en diferentes condiciones biológicas.



10 Cultivo celular:

Se cultivaron células del ratón BNL CL.2 de hígado normal en el medio MEM de Dulbecco con 1g/l de glucosa (Eurobio, Les Ulis, Francia) suplementado con 10% de suero bovino fetal (Perbio, Brebieres, Francia), 2 mM de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina (Eurobio). Las células se mantuvieron en una atmósfera al 5% de CO₂ humidificada a 37°C.

15 Microscopía:

Veinticuatro horas antes del experimento, fueron sembradas 2,5 x10⁴ células BNL CL.2 por pocillo en placas cubreobjetos 8 pocillos con cámaras Lab-Tek II (Ref 155409, Nunc, Naperville, IL, EE.UU.). Las cantidades requeridas de las sondas A y B se diluyeron hasta 300 µL en medio completo de MEM para dar una concentración final de 1 µM y luego se añadieron a las células. Se utilizó una solución de 5 µg/ml de Hoechst 118 como marcador nuclear. Las células se observaron con un microscopio confocal Leica TSC SPEII después del lavado con medio MEM de Eagle al 10% de FBS sin rojo de fenol.

Citometría:

El día antes del experimento, se sembraron células BNL CL.2 en placas de 96 pocillos (Greiner Bio One, Frickenhausen, Alemania) a 2,0 x10⁴ células/pocillo en medio completo MEM de Dulbecco. Ambas sondas (A y B) se prepararon a concentraciones de 1 µM en MEM de Dulbecco completo y se añadieron a las células durante diferentes momentos (2, 6 y 24 horas). Después del lavado con PBS (Eurobio), 5 min de incubación con 40 µl de tripsina, y adición de 160 µl de PBS EDTA 5 mM, las células fueron analizadas por citometría de flujo en un citómetro de guayaba PCA-96 (Guava Technologies Merck Millipore, Billerica, MA, EE.UU.) con un láser verde.

En primer lugar, el compuesto A fue mucho más estable que el compuesto B en el plasma humano (ver Fig. 1). En segundo lugar, el compuesto A fue mucho más estable que el compuesto B in cellulo (ver Fig. 2).

Ejemplo 4: Selectividad hacia la fracción de tiol

El cribado para la selectividad se realizó sobre las bencilamidas de los aminoácidos no protegidos. Fueron preparadas en DMSO soluciones madre 100 mM de bencilamidas de aminoácidos (en forma de sales de TFA) y electrófilos (fenilpropionitrilo y fenilmaleimida) y almacenadas a -20°C. Se preparó una solución madre 100 mM de

5 benzamida (utilizada como patrón interno) en agua destilada y se almacenó a -20°C. Se realizaron análisis de mezclas de reacción con Shimadzu LC con la columna SunFire™ C18 de 5 µM 4,6 x150 mm (Waters). Los parámetros de HPLC fueron los siguientes: caudal 1 mL/min, gradiente de 5 a 95% de la fase móvil B de 0 a 20 min, seguido de 5 min a 95% de fase móvil y tiempo posterior de 5 min. La fase móvil A fue TFA al 0,05% en agua (mQ) (v/v), y la fase móvil B fue acetonitrilo (grado HPLC). Los datos se analizaron utilizando el software de análisis Shimadzu. Las señales se normalizaron según el área bajo el pico del estándar interno (benzamida). Las áreas bajo los picos de las bencilamidas del aminoácido se utilizaron para calcular su conversión durante la reacción.

10 Se añadieron 10 µL de la solución madre de la benzamida del aminoácido y 2,5 µL de la solución madre de benzamida en un vial que contenía 977,5 µL de PBS (1x, pH 7,6). La solución se agitó y se añadieron 10 µL de la solución madre del electrófilo para dar concentraciones finales de 1 mM de los reactivos y una concentración de benzamida 0,25 mM. Las alícuotas de la mezcla de reacción (50 µL) fueron analizadas por HPLC durante 1 hora de hidrólisis (inyecciones a 0, 30 y 60 min). Las áreas debajo de los picos de los materiales de partida y los productos de la hidrólisis fueron normalizados según el área del pico del estándar interno. En el caso del fenilpropionitrilo, ninguno de los modelos de aminoácidos dio más de una conversión del 1,6% (ver la tabla 3 a continuación).

15 Inversamente, cuando fue analizada la fenilmaleimida, algunas bencilamidas del aminoácido mostraron conversiones de hasta un 8,5%. Las masas de los aductos correspondientes fueron detectadas por espectrometría de masas (ESI-LCMS) en algunos casos (mostrado en negrita, tabla 4).

La tabla 4 a continuación presenta la conversión de bencilamidas en 1 hora en PBS (1X, pH 7,6) en presencia de fenilpropionitrilo (1).

20 Tabla 4

Benzamida de aminoácido	Conversión	Benzamida de aminoácido	Conversión
CysNHBn (7a)	98%	TyrNHBn (7g)	1,6%
GlyNHBn (7b)	0,2%	HisNHBn (7h)	0,6%
AlaNHBn (7c)	0,1%	GlnNHBn (7i)	0,1%
ValNHBn (7d)	0,7%	TrpNHBn (7j)	1,3%
SerNHBn (7e)	0,3%	ArgNHBn (7k)	0,4%
MetNHBn (7f)	0,1%	AspNHBn (7l)	0,6%

La tabla 5 a continuación presenta la conversión de bencilamidas en 1 hora en PBS (1X, pH 7,6) en presencia de fenilmaleimida. Los valores en negrita corresponden a aquellos para los cuales la masa del aducto correspondiente fue detectada por ESI-LCMS.

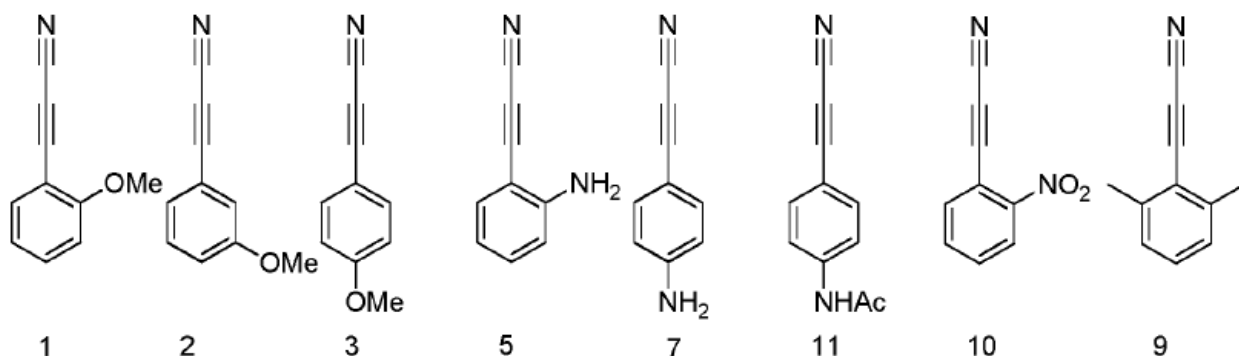
25 Tabla 5

Benzamida de aminoácido	Conversión	Benzamida de aminoácido	Conversión
CysNHBn (7a)	100%	TyrNHBn (7g)	2,4%
GlyNHBn (7b)	3,3%	HisNHBn (7h)	8,5%
AlaNHBn (7c)	0,2%	GlnNHBn (7i)	1,7%
ValNHBn (7d)	0,9%	TrpNHBn (7j)	1,0%
SerNHBn (7e)	2,8%	ArgNHBn (7k)	2,9%
MetNHBn (7f)	1,9%	AspNHBn (7l)	1,3%

En conclusión, la selectividad de los compuestos que llevan una fracción de fenilpropionitrilo respecto a la fracción de tiol en comparación con otras fracciones de tiol es claramente superior a la selectividad obtenida para los compuestos correspondientes, en donde la fracción de propionitrilo se sustituye por una fracción de maleimida.

30 Ejemplo 5: Pruebas de toxicidad

La toxicidad de los siguientes compuestos "enlazantes" de fórmula (II) fue estudiada por el ensayo MTT en líneas celulares HaCaT:



La citotoxicidad in vitro se midió utilizando un ensayo MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio). Los experimentos se realizaron en placas de 96 pocillos con células HaCaT cultivadas hasta confluencia en medios de cultivo celular (medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero de ternero fetal y glutamina 1 mM, 200 μ L por pocillo). Las células fueron incubadas con reactivo químico a diferentes concentraciones (de 100 μ M a 0,78 μ M por diluciones seriales 1/2) a 37°C durante 24 horas. Después de la incubación, el sobrenadante fue reemplazado por medio de cultivo recién preparado que contenía MTT (300 μ g/mL). Después de 2 horas de incubación a 37°C, el medio se retiró cuidadosamente y se añadieron 100 μ l de DMSO para disolver los cristales de formazán generados por la reducción inducida por enzimas mitocondriales del MTT. La absorbancia se midió a 595 nm utilizando un lector de microplacas (Biotek, Synergy HT). Las viabilidades celulares se expresaron como porcentaje de células de control no tratadas.

Los resultados de la prueba MTT se presentan en la figura 5, y muestran claramente que los compuestos de fórmula (II) no son tóxicos y, por lo tanto, pueden utilizarse, por ejemplo, para aplicaciones biológicas.

Ejemplo 6: Marcaje de la lisozona con un fenilpropionitrilo:

15 Marcaje de la digestión de tripsina de la lisozima

Se solubilizó 1 nmol de lisozima en NH_4HCO_3 (25 mM) y se redujo con 1 mM de TCEP a 57°C durante 1 hora. Una solución de APN-TMPP (1mM en DMSO) fue agregada a la proteína en un cociente molar de 1:200. Entonces, la proteína marcada fue sometida a proteólisis por tripsina porcina (Promega V5111). La muestra fue digerida con tripsina 1:100 (p/p) en bicarbonato de amonio 25 mM a 35°C durante la noche. Fueron realizados análisis de NanoLC-MS/MS para seguir la reacción. Las mezclas peptídicas resultantes fueron analizadas por nanoHPLC C18 de fase invertida en un sistema nanoACQUITY Ultra-Performance-LC (Waters, Milford, MA) acoplado a un espectrómetro de masas Q-TOF maXis (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania) equipado con una fuente nano-electrospray. La separación cromatográfica fue realizada en un nanoACQUITY Ultra-Performance-LC. Los péptidos se separaron en una columna ACQUITY UPLC® BEH130 C18 (Waters Corp.), 75 μ m x 200 mm, tamaño de partícula de 1,7 μ m. El sistema disolvente consistió en ácido fórmico al 0,1% en agua (disolvente A) y ácido fórmico al 0,1% en acetonitrilo (disolvente B). La recogida se realizó en una pre-columna de simetría C18 de 20 x 0,18 mm, 5 μ m (Waters Corp.) durante 3 minutos a 5 μ L/min con 99% de disolvente A y 1% de disolvente B. La elución se realizó a un caudal de 300 nL/min, utilizando un gradiente de 1-50% del disolvente B durante 30 minutos a 50°C seguido de un aumento rápido a 80% (5 minutos) del disolvente B. El sistema completo fue completamente controlado por Hystar 3,2 (Bruker Daltonics). El instrumento Q-TOF fue operado con los siguientes parámetros: la temperatura de la fuente se fijó en 200°C, el flujo de gas de secado fue de 4 l/h, y el voltaje nano-electrospray fue de 4kV. La calibración masiva del TOF se logró utilizando ES-TOF Tuning Mix (Agilent Technologies) en el intervalo de 50 a 2200 m/z en modo positivo. Para los experimentos de MS en tándem, el sistema se operó con conmutación automática entre los modos MS y MS/MS, ambos en el rango m/z [50-2200]. En MS, el tiempo de suma fue 0,2 s. En MS/MS, el tiempo de suma fue ponderado entre 0,2 s y 1,4 s en función de la intensidad del ion original. Los 2 péptidos más abundantes (umbral de intensidad 400 au), preferiblemente iones con dos, tres, cuatro o cinco cargas, fueron seleccionados en cada espectro MS para realizar un mayor aislamiento y fragmentación CID con 2 energías establecidas usando el perfil de energía de colisión. La fragmentación se realizó utilizando argón como gas de colisión. Los péptidos tripticos fueron secuenciados manualmente (de novo) para confirmar su secuencia y localizar la cisteína marcada por la sonda APN-TMPP. Los péptidos se identificaron utilizando cromatogramas de iones extraídos (EIC) basados en la masa monoisotópica de secuencias peptídicas calculadas.

La evaluación de la quimioselectividad de APN-TMPP fue llevada a cabo por un estudio de su reacción con digestión de tripsina en un cociente molar 200:1 de APN-TMPP (1 μ M) respecto a la proteína (aproximadamente 10:1 respecto a los restos de cisteína) a temperatura ambiente por una hora. Las mezclas peptídicas obtenidas sin y con derivatización química fueron analizadas por LC-MS/MS. Todos los péptidos que contenían cisteína detectables reaccionaron con una sonda y salieron después con retraso mientras que los péptidos sin cisteína no se vieron afectados. La eficacia del marcaje se evaluó basándose en la relación entre las intensidades de los péptidos marcados y no marcados por LC-MS. Más del 98% de los péptidos detectados estaban completamente marcados.

Los resultados de LC-MS muestran claramente que los péptidos que contienen cisteína tienen un mayor tiempo de retención debido a la adición del grupo hidrofóbico TMPP, mientras que el tiempo de retención de todos los demás péptidos no se modificó (tabla 6).

5 La tabla 6 a continuación muestra los resultados de los análisis LC-MS de la digestión con tripsina de la lisozima antes y después de la reacción con APN-TMPP.

Tabla 6

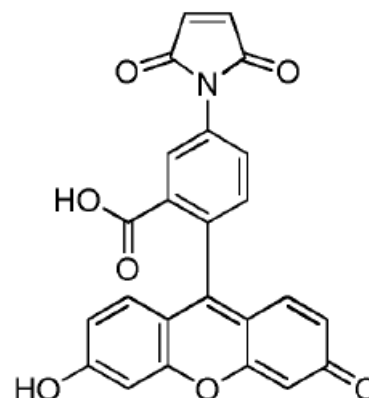
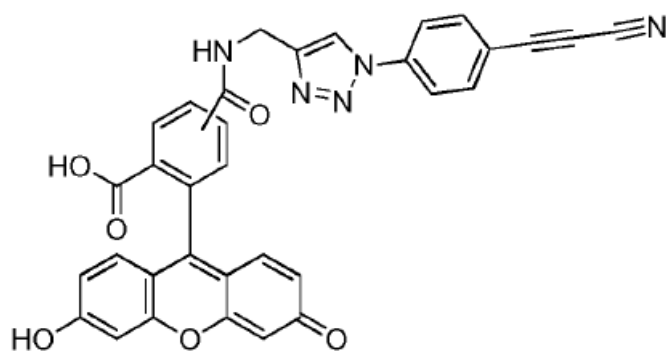
Secuencia peptídica ^[a]	Antes del marcaje		Después del marcaje		Δ TR (min)	Número de marcadores
	m/z (estado de carga)	TR (min)	m/z (estado de carga)	TR (min)		
²⁴ CELAAAMK ³¹	418,70 (+ 2)	13,9	545,89 (+ 3)	24,2	10,3	1
²⁴ CELAAAMoxK ³¹	426,70 (+ 2)	12,6	551,23 (+ 3)	23,7	11,1	1
⁴⁰ GYSLGNWVCAAK ⁵¹	634,81 (+ 2)	19,8	689,96 (+ 3)	25,3	5,5	1
⁸⁰ WWCNDGR ⁸⁸	468,69 (+ 2)	16,5	579,22 (+ 3)	25,7	9,2	1
⁹² NLCNIPCSALLSSDITASVNC ^{AK} ¹¹⁴	779,71 (+ 2)	23,7	949,20 (+ 5)	30,3	6,6	3
⁵² FESNFNTQATNR ⁶³	714,83 (+ 2)	13,5	714,83 (+ 2)	13,5	0	0
¹³⁵ GTDVQAWIR ¹⁴³	523,27 (+ 2)	17,3	523,27 (+ 2)	17,3	0	0
⁶⁴ NTDGSTDYGILQINSR ⁷⁹	585,28 (+ 2)	18,2	585,28 (+ 2)	18,2	0	0
¹¹⁶ IVSDGNGMNAWVAWR ¹³⁰	559,27 (+ 2)	20,9	559,27 (+ 2)	20,9	0	0

[a] los residuos de cisteína están en negrita.

Ejemplo 7: Marcaje del mutante CD38-CD375 y comparación con maleimida

10 a) Estabilidad del compuesto de fórmula (I) y de la maleimida correspondiente

Los siguientes compuestos fueron sintetizados:



15 Los estudios de estabilidad demostraron que el compuesto según la invención era estable durante 24 horas en PBS (tampón solución salina de fosfato). Comparativamente, el compuesto correspondiente, que comprendía una fracción de maleimida, fue degradado un 70% después de una hora en PBS.

Reacción con el mutante CD38

Ambos compuestos se hicieron reaccionar con una solución 2 μ M del mutante CD38-C375.

20 La electroforesis en gel, después de la purificación, mostró que se podía obtener una tasa de marcaje más alta con el compuesto usado en esta invención que con el compuesto correspondiente de maleimida. La figura 6 presenta la electroforesis de gel obtenida con el compuesto de la invención y la maleimida, antes y después de la purificación.

Ejemplo 8: Conjugación de Trastuzumab y TAMRA utilizando el compuesto 18

El esquema general del experimento se ilustra en la figura 7.

5 A la solución de Trastuzumab (100 uL, 10 mg/mL en tampón borato 50 mM, pH 8,5) se añadió 1,74 uL de la solución del compuesto 18 (10 mg/mL en DMSO). Después de la incubación durante 1h a 25°C, se añadieron 0,69 uL de TAMRA-SH (100 mM en DMSO). La mezcla se incubó a 25°C durante 16h y el conjugado fue purificado por cromatografía de exclusión por tamaños.

El experimento comparativo fue realizado usando N-hidroxisuccinamida éster del ácido 4-(N-maleimidometil)ciclohexanocarboxílico (SMCC) en vez del compuesto 18.

10 El análisis SDS-PAGE de los conjugados obtenidos (Figura 8) mostró que el compuesto 18 permitía niveles más altos de conjugación en comparación con el SMCC.

El análisis nativo de ESI-MS del conjugado preparado con 18 (Figura 9, Figura 10) mostró que, en promedio, se conjugaba una molécula de TAMRA por anticuerpo.

El análisis nativo de ESI-MS del conjugado preparado con SMCC (Figura 11, Figura 12) mostró una mezcla compleja de especies indistinguibles.

15 El experimento muestra que el compuesto 18 permite niveles más altos de conjugación y proporciona una población más limpia de conjugados en comparación con el SMCC generalmente aplicado.

Ejemplo 9: Conjugación directa del compuesto 58 respecto a Trastuzumab parcialmente reducido.

El esquema general del experimento se ilustra en la figura 13.

20 A la solución de Trastuzumab (100 uL, 10 mg/mL en PBS 50 mM, pH 7,4 con EDTA 10mM) se añadió la solución de TCEP (10 mM en agua, 1,1 ó 2,2 eq.). La mezcla se incubó a 37°C durante 2h y luego se añadió la solución del compuesto 58 (8,25 uL, 10 mM en DMSO). La mezcla se incubó a 25°C durante 16h y el conjugado fue purificado por cromatografía de exclusión por tamaños.

25 El análisis SDS-PAGE de los conjugados obtenidos (Figura 14) mostró que el compuesto 58 estaba covalentemente unido al anticuerpo. El análisis de ESI-MS demostró que, en promedio, 4 moléculas fueron conjugadas por el anticuerpo usando 2,2 eq. de TCEP.

Ejemplo 10: Re-punteado de los fragmentos de anticuerpos utilizando los compuestos 33 y 34.

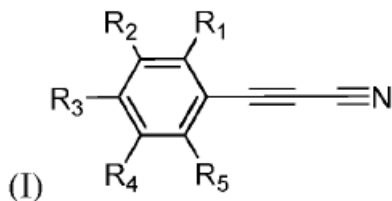
El esquema general del experimento se ilustra en la figura 15.

30 A la solución de Trastuzumab (100 uL, 10 mg/mL en PBS 50 mM, pH 7,4 con EDTA 10mM) se añadió la solución de TCEP (10 mM en agua, 5 eq.). La mezcla se incubó a 37°C durante 2h y luego se añadió la solución de 33 ó 34 (10 mM en DMSO, 15 eq.). La solución resultante se incubó durante 16 h a 25°C y luego se analizó por SDS-PAGE en condiciones de reducción.

El análisis de SDS-PAGE demostró que los fragmentos de anticuerpo fueron puenteado con éxito por los compuestos 33 y 34 (Figura 17).

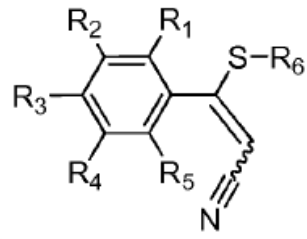
Reivindicaciones

1. Procedimiento para la preparación de un compuesto marcado que comprende un resto tiol, que comprende poner en contacto un compuesto que comprende un resto tiol con un compuesto de fórmula (I):



- 5 en donde cada uno de R₁ a R₅ se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en:
- átomos de hidrógeno,
 - grupos alquilo, alqueno o alquino, opcionalmente interrumpidos por al menos un heteroátomo seleccionado entre O, N y S,
 - grupos arilo,
- 10 - grupos alcoxi,
- átomos de halógeno,
 - grupos amino (-NRR'), en donde R y R' son independientemente átomos de hidrógeno, grupos alquilo, alqueno, alquino o arilo,
 - grupo hidroxilamina (-ONH₂),
- 15 - grupo de hidracina (-NH-NH₂),
- grupo nitro (-NO₂),
 - grupo azido (-N₃),
 - grupo diazonio (-N₂⁺),
 - grupo de maleimida,
- 20 - grupos alquil- o aril-carboxilo (-C(=O)OR),
- grupos alquil- o aril-carbonilo (-C(=O)R),
 - grupo hidroxilo (-OH),
 - grupo ácido borónico -B(OR'')₂, donde R'' es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo,
 - grupos fosfina o fosfonio,
- 25 - grupo isocianato (-N=C=O) o isotiocianato (-N=C=S),
- grupo clorosulfonilo (-SO₂Cl),
 - un grupo -O-C(=O)-C(N₂)-CF₃ o un grupo -C(=O)-C(N₂)-CF₃,
 - ésteres activados, tales como -C(=O)-NHS, ésteres perfluorados y acilureas,
 - un grupo -C≡C-C≡N,
- 30 - y
- grupos alquilo sustituidos con al menos uno de los grupos enumerados previamente,
- en donde al menos uno de R₁ a R₅ comprende un resto marcador que está unido opcionalmente al anillo fenilo a través de un grupo enlazador y, en el que dicho resto marcador se selecciona de un anticuerpo; un agente terapéutico; o una sonda fluorescente.

35 2. Un compuesto de fórmula (III):



(III)

donde R₁ a R₅ son como se describe en la reivindicación 1, y en donde R⁶ es una proteína.

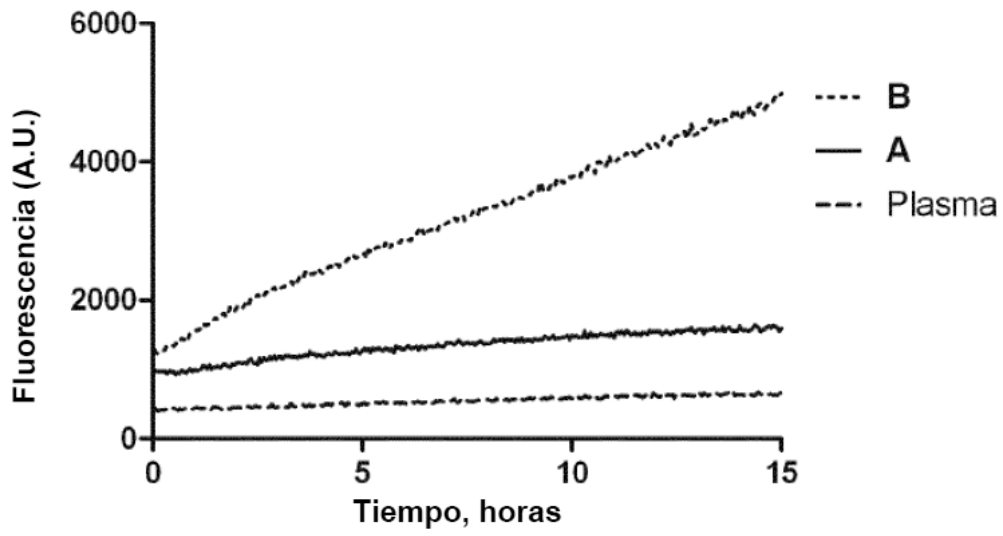


Figura 1

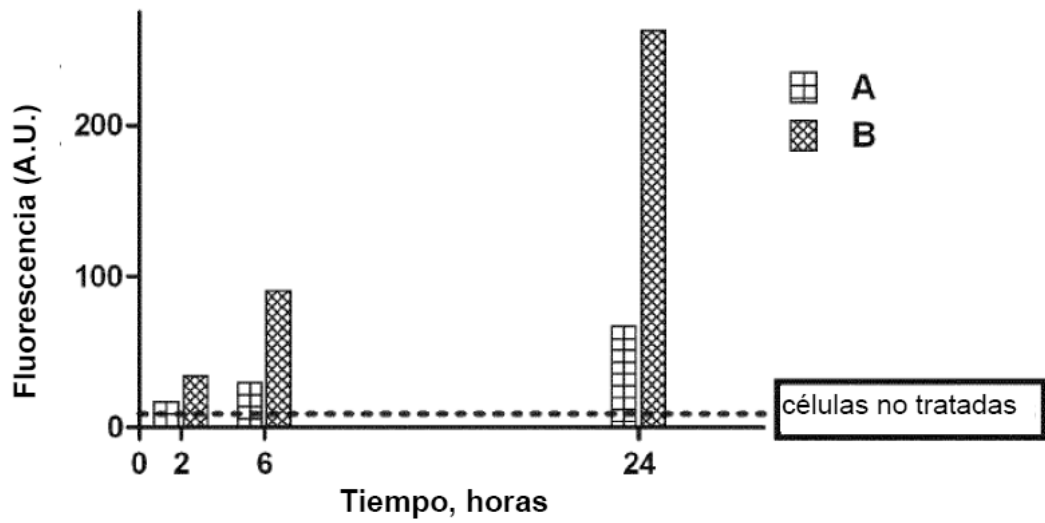


Figura 2a

Tiempo (horas)	2	6	24
Relación (B/A)	2,0	3,1	3,9

Figura 2b

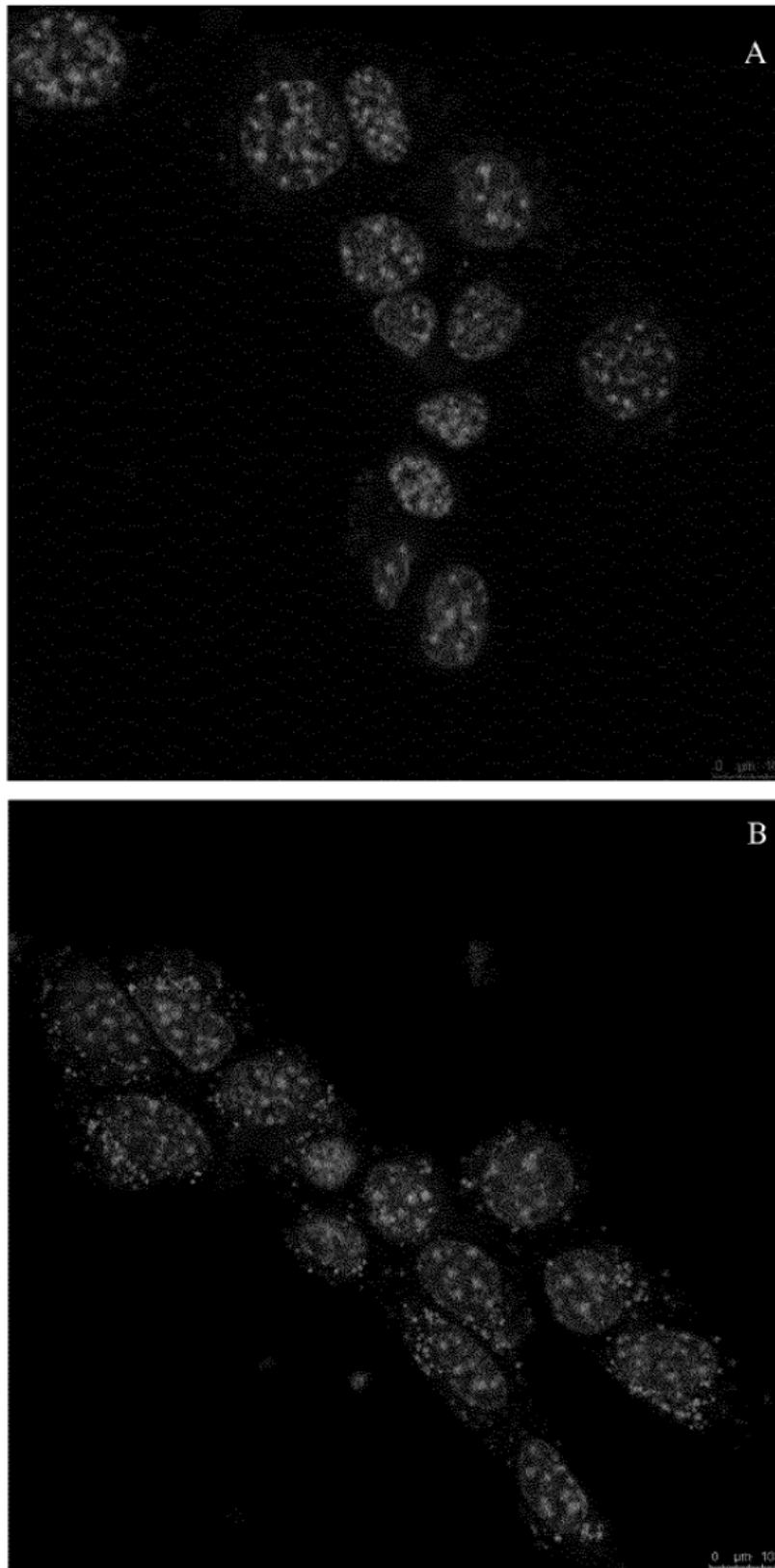


Figura 2c

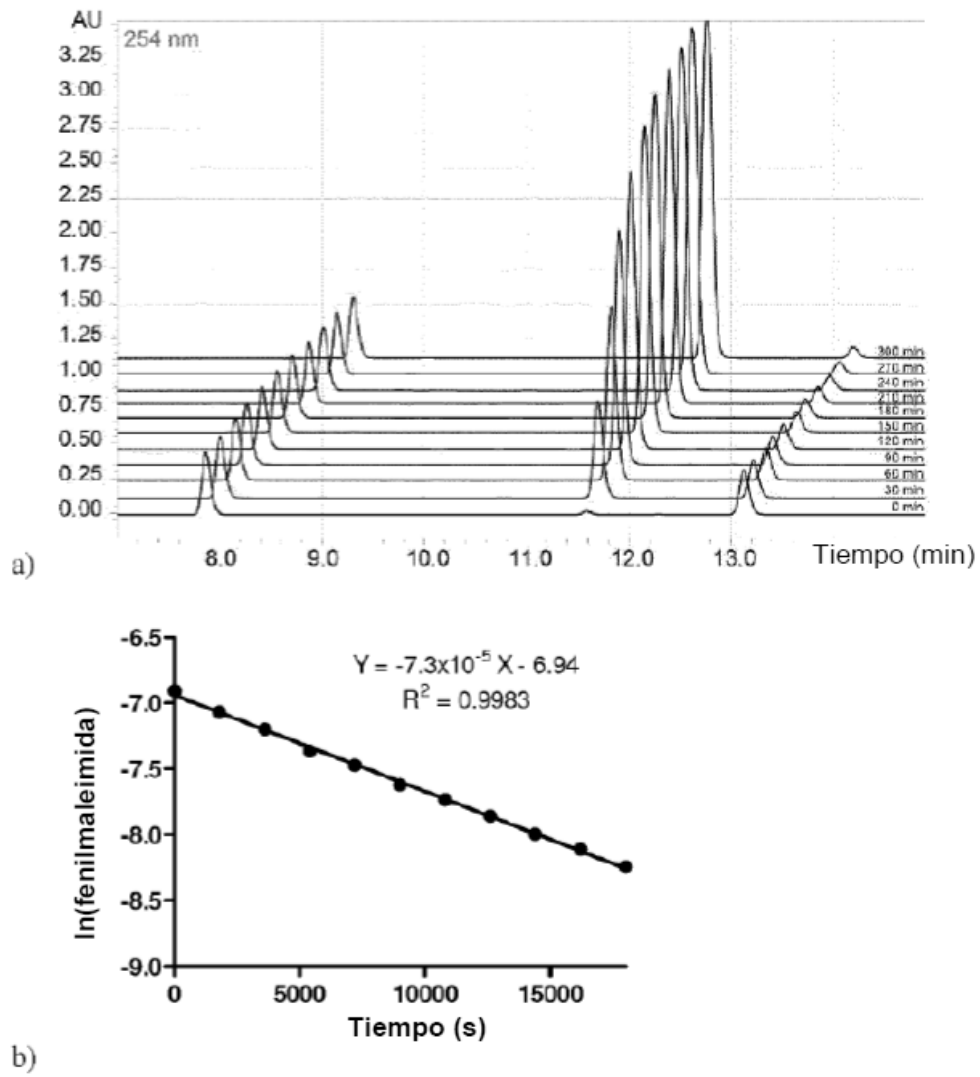


Figura 3

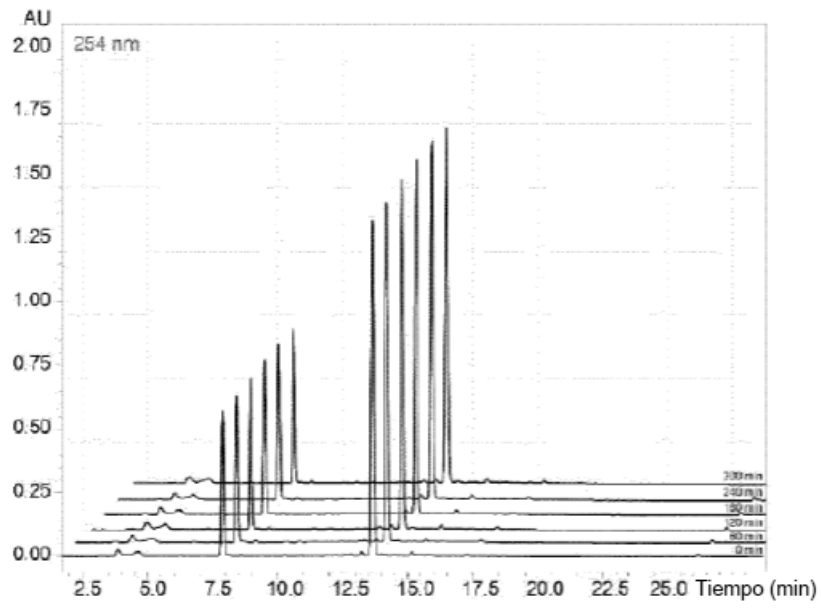


Figura 4

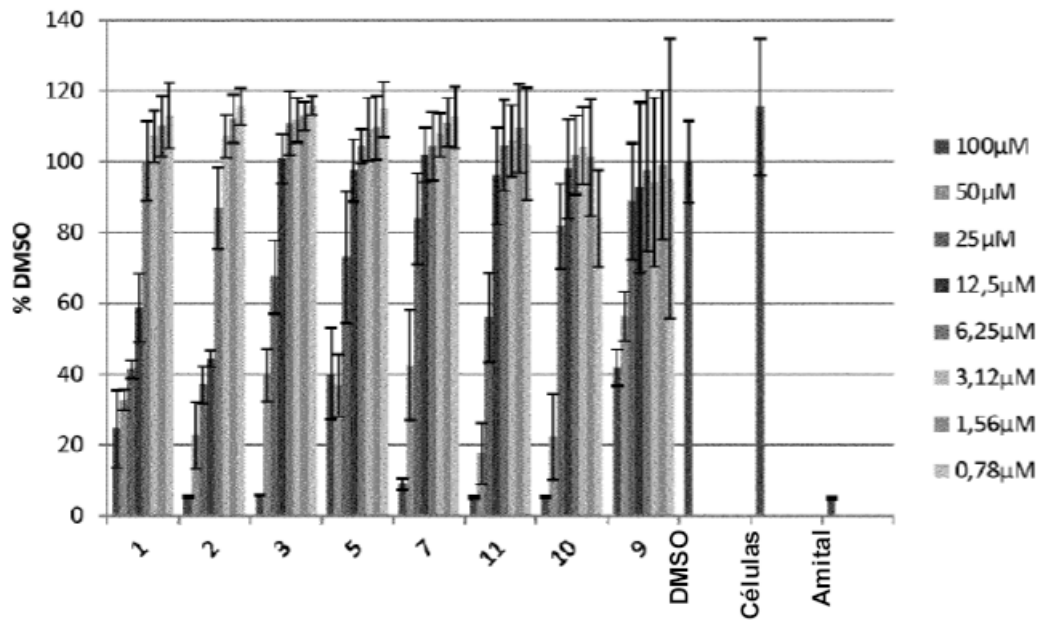
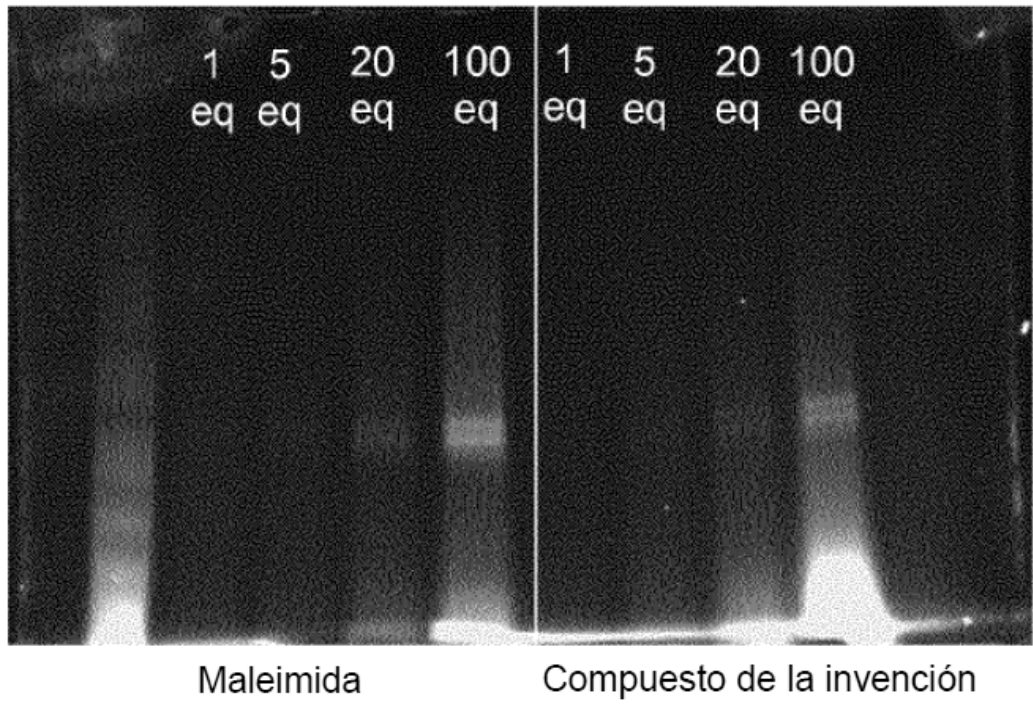
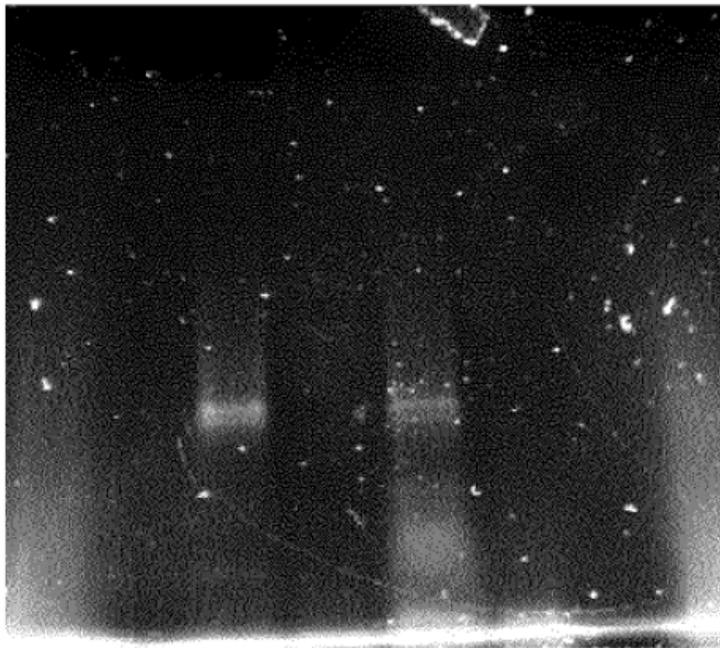


Figura 5

a)



b)



Maleimida

Compuesto de la invención

Figura 6

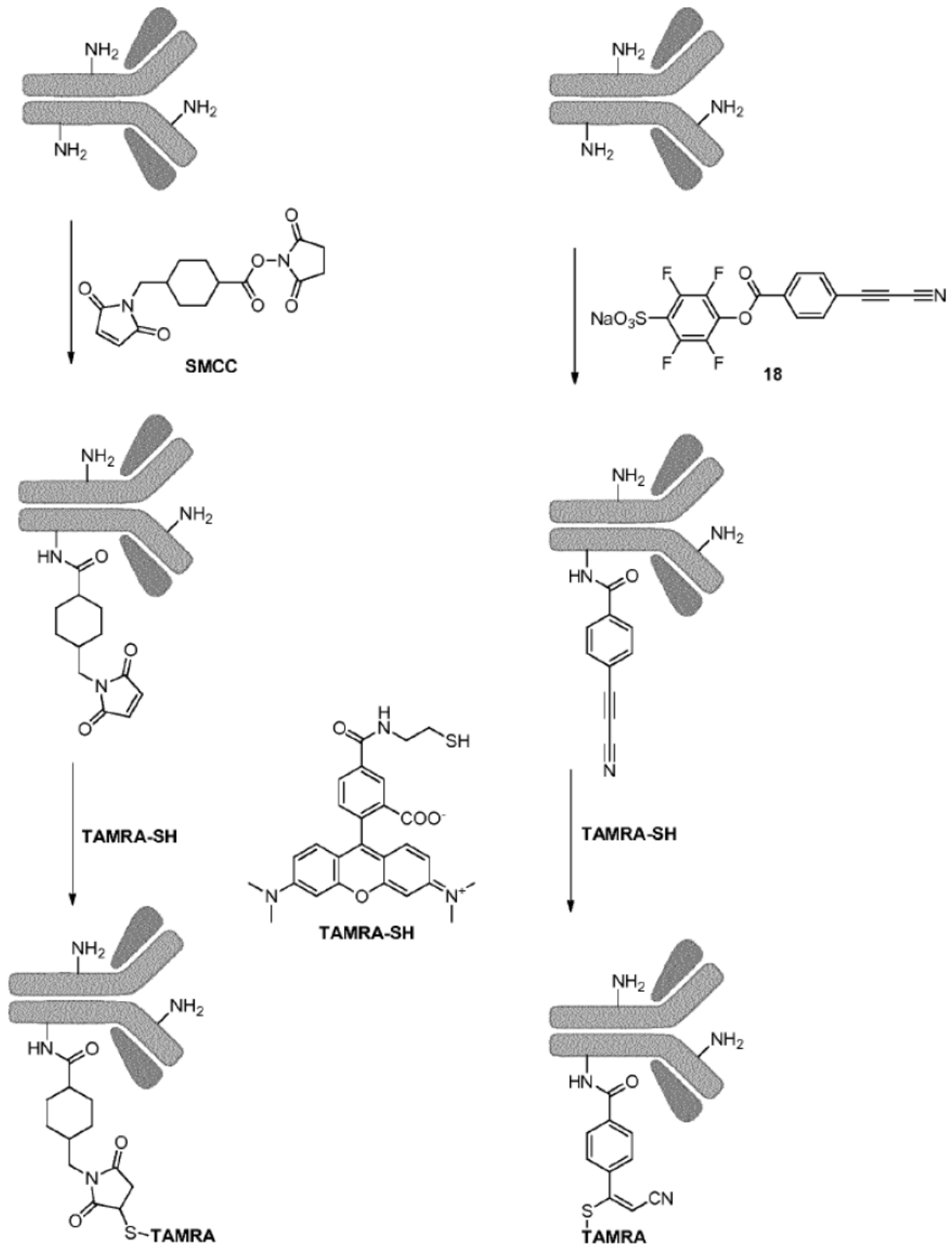


Figura 7

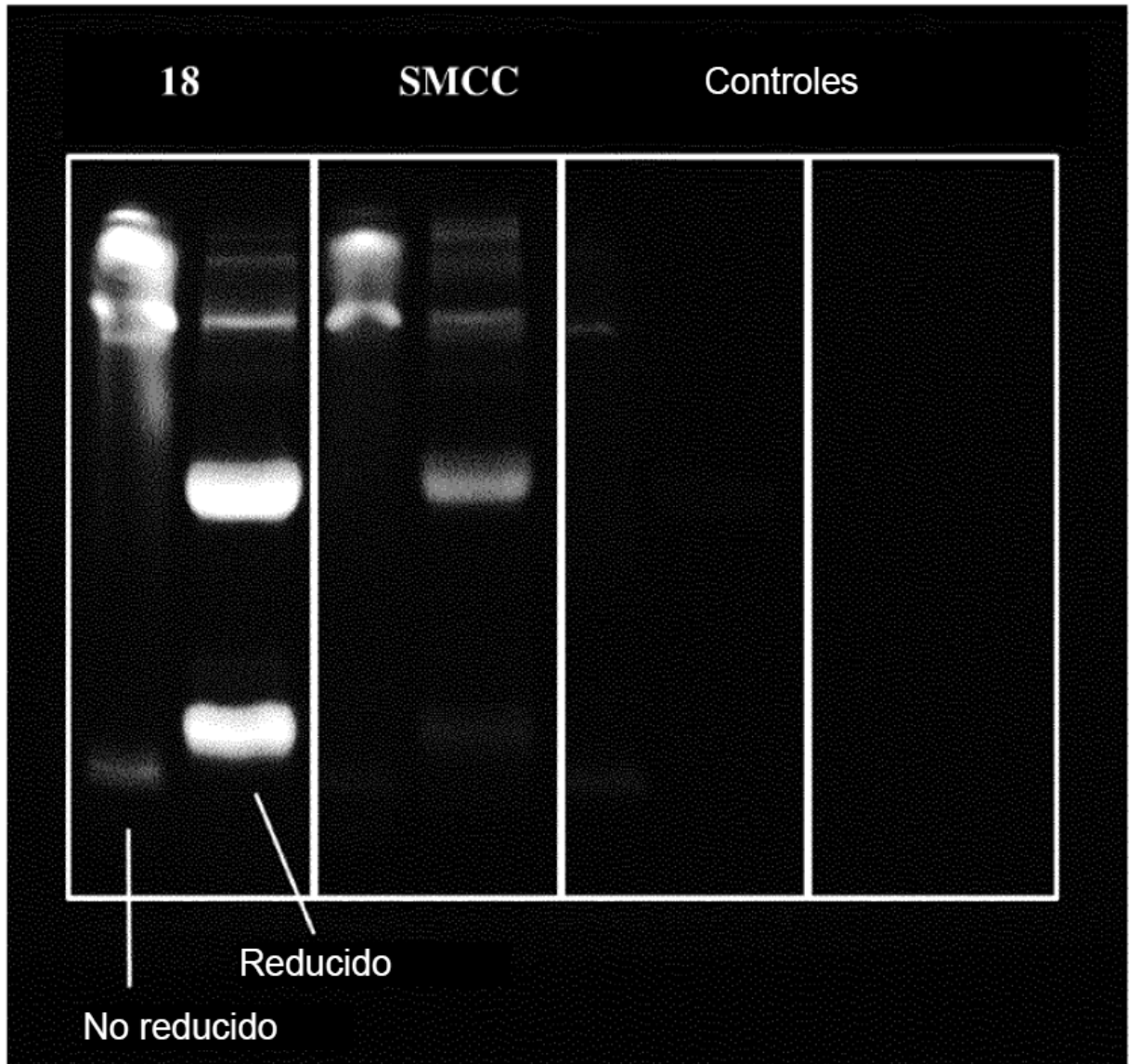


Figura 8

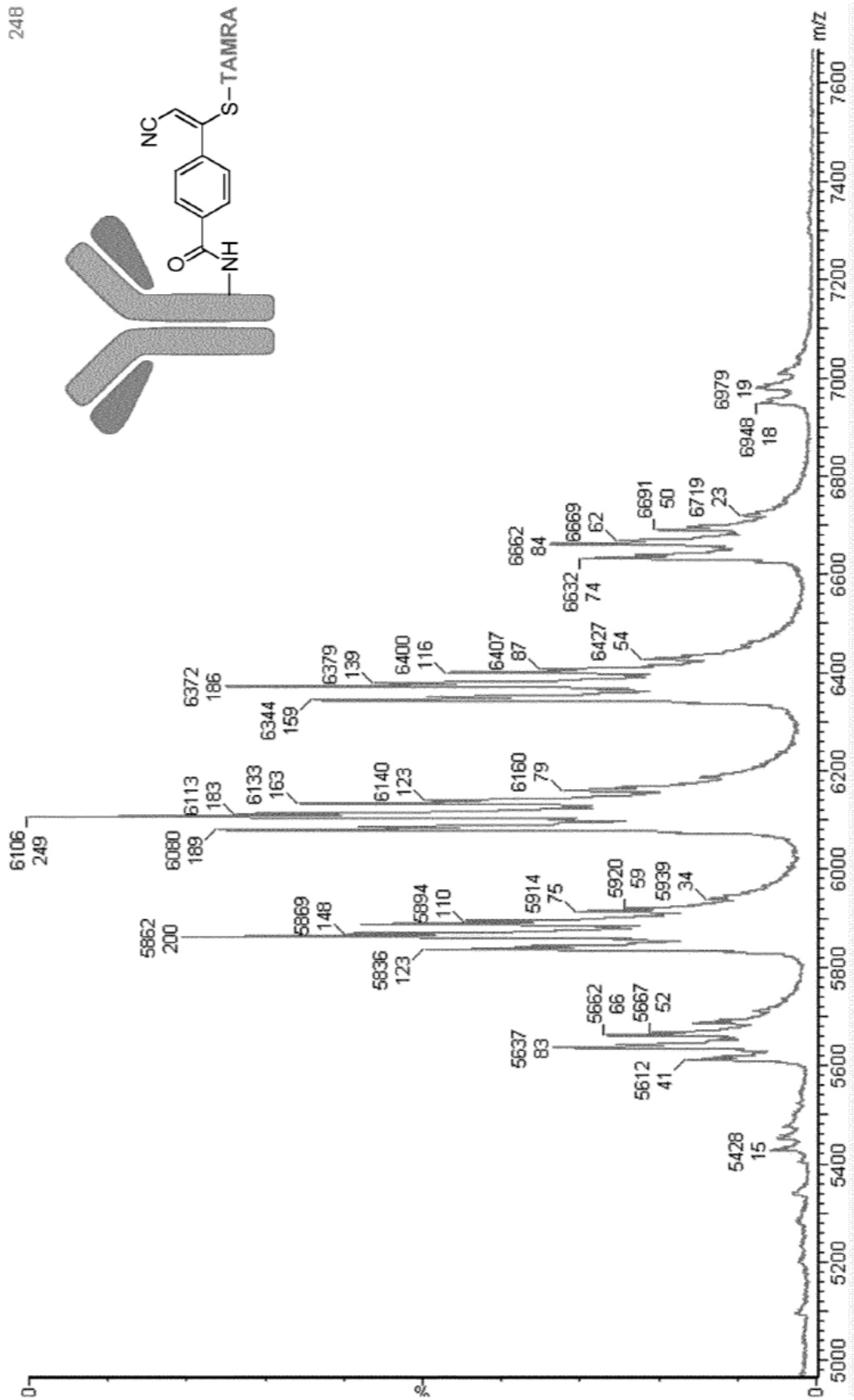


Figura 9

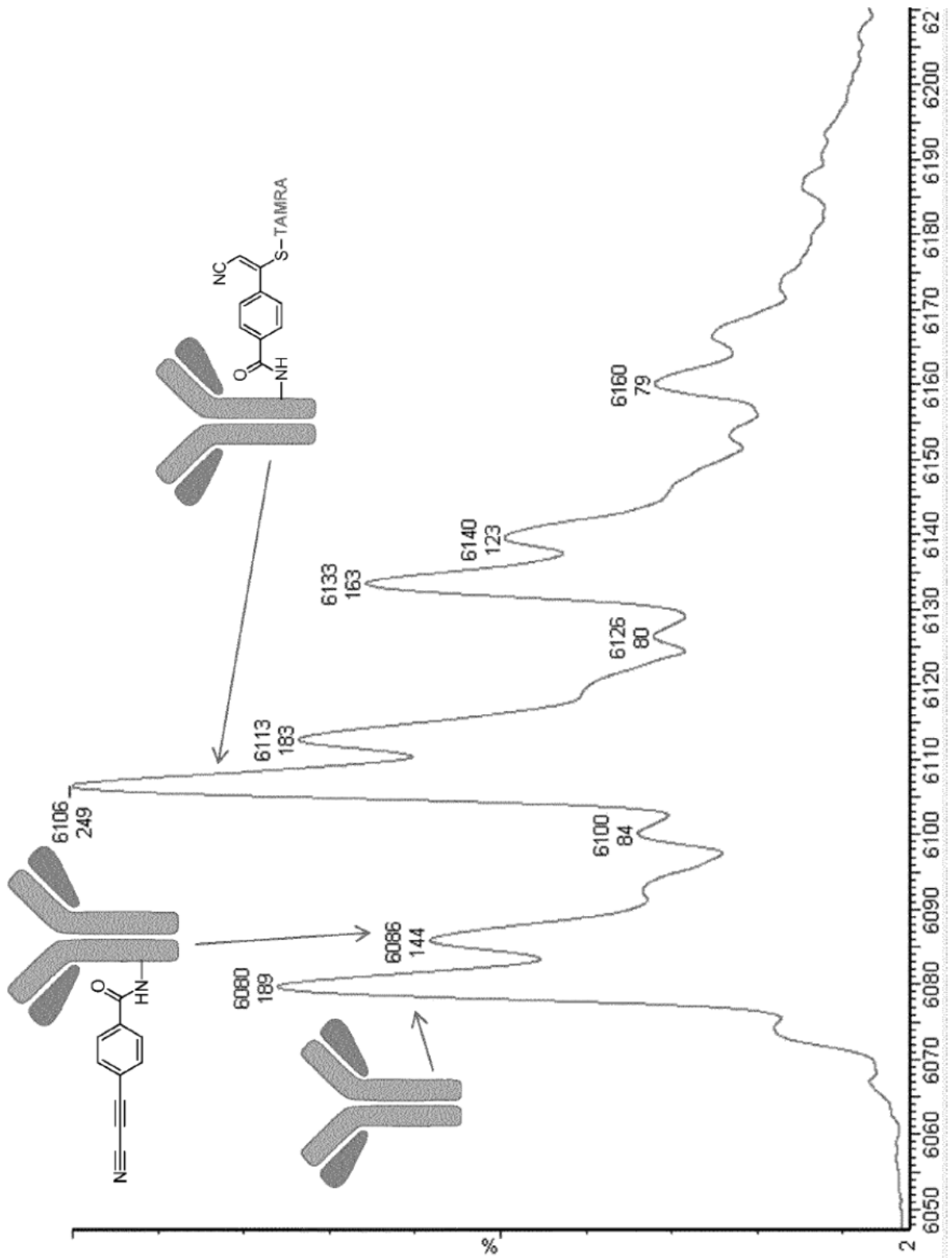


Figura 10

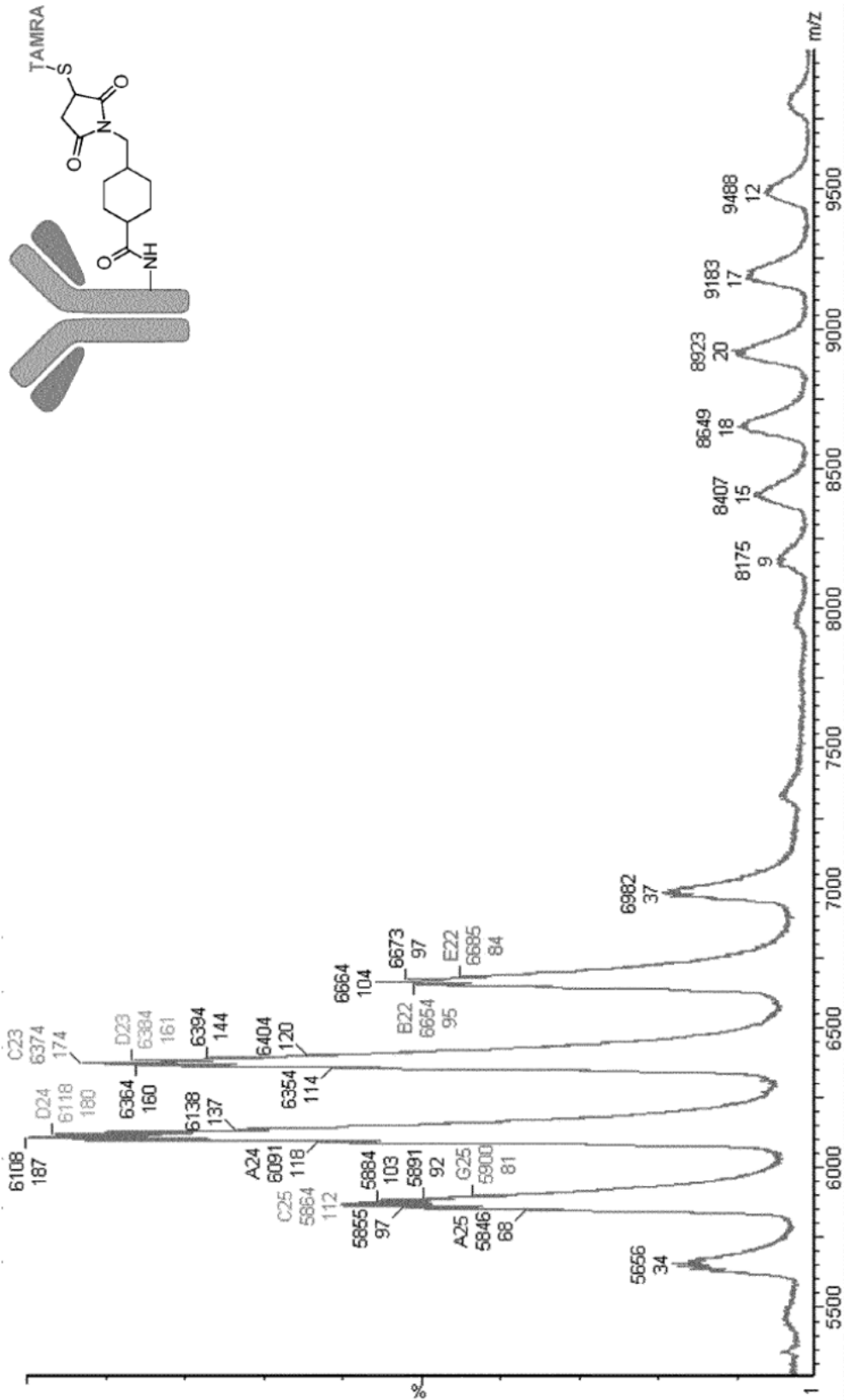


Figura 11

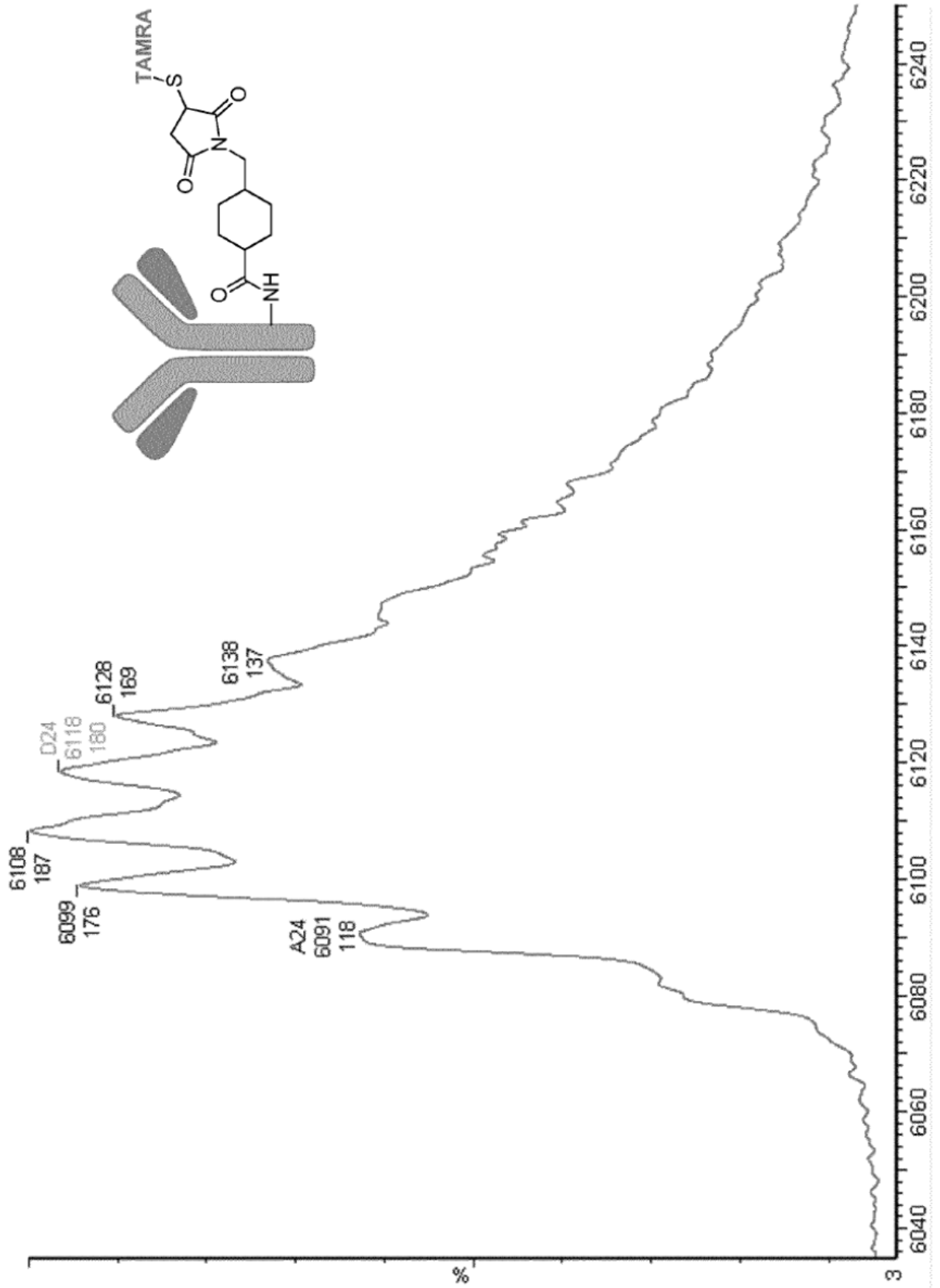


Figura 12

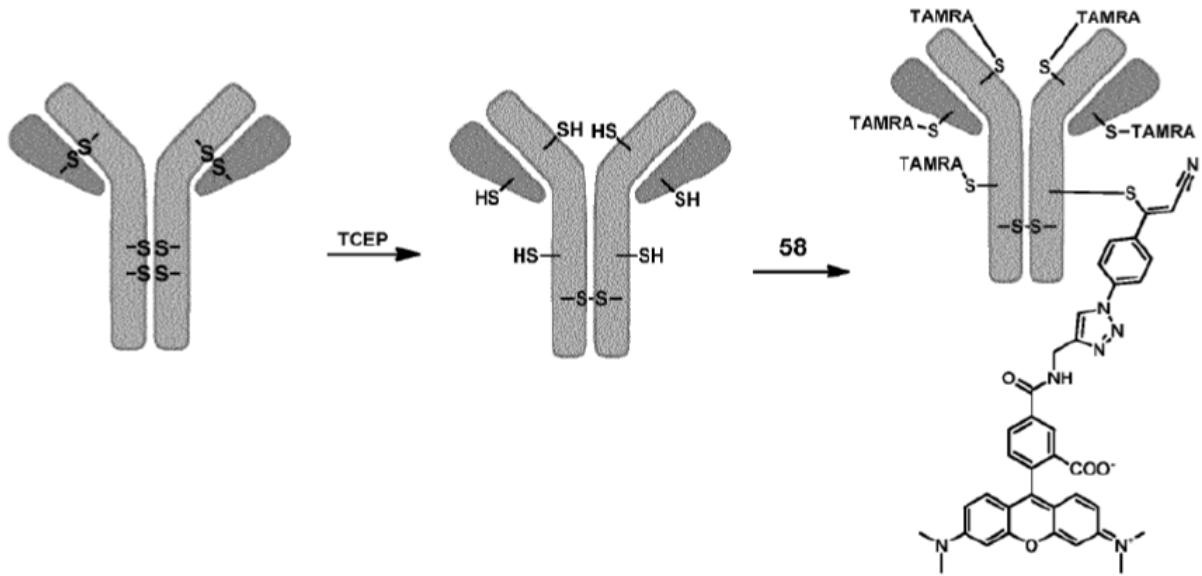


Figura 13

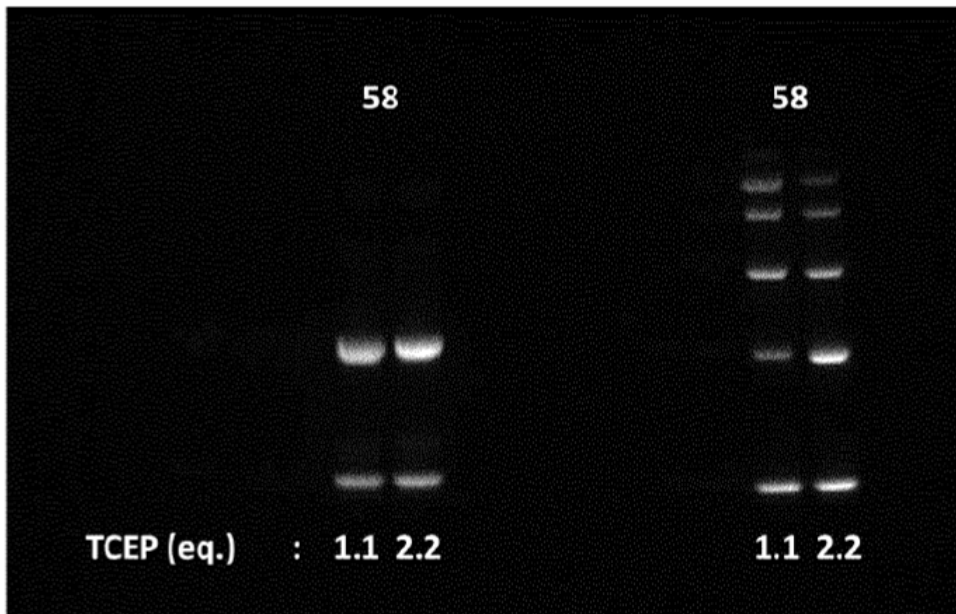


Figura 14

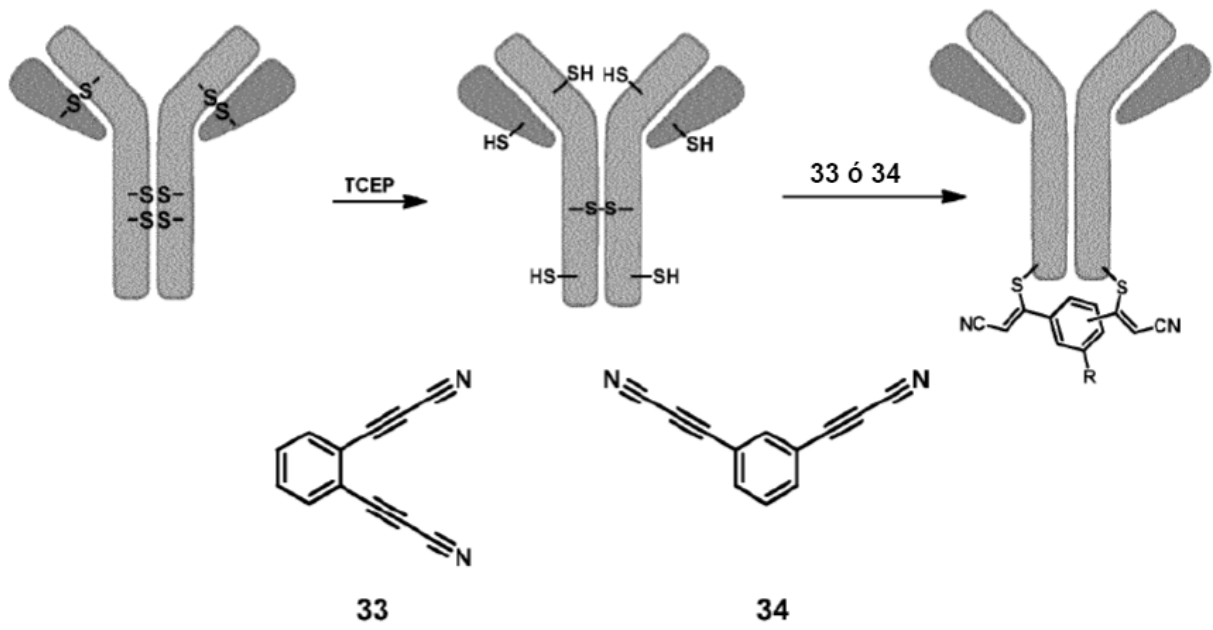


Figura 15

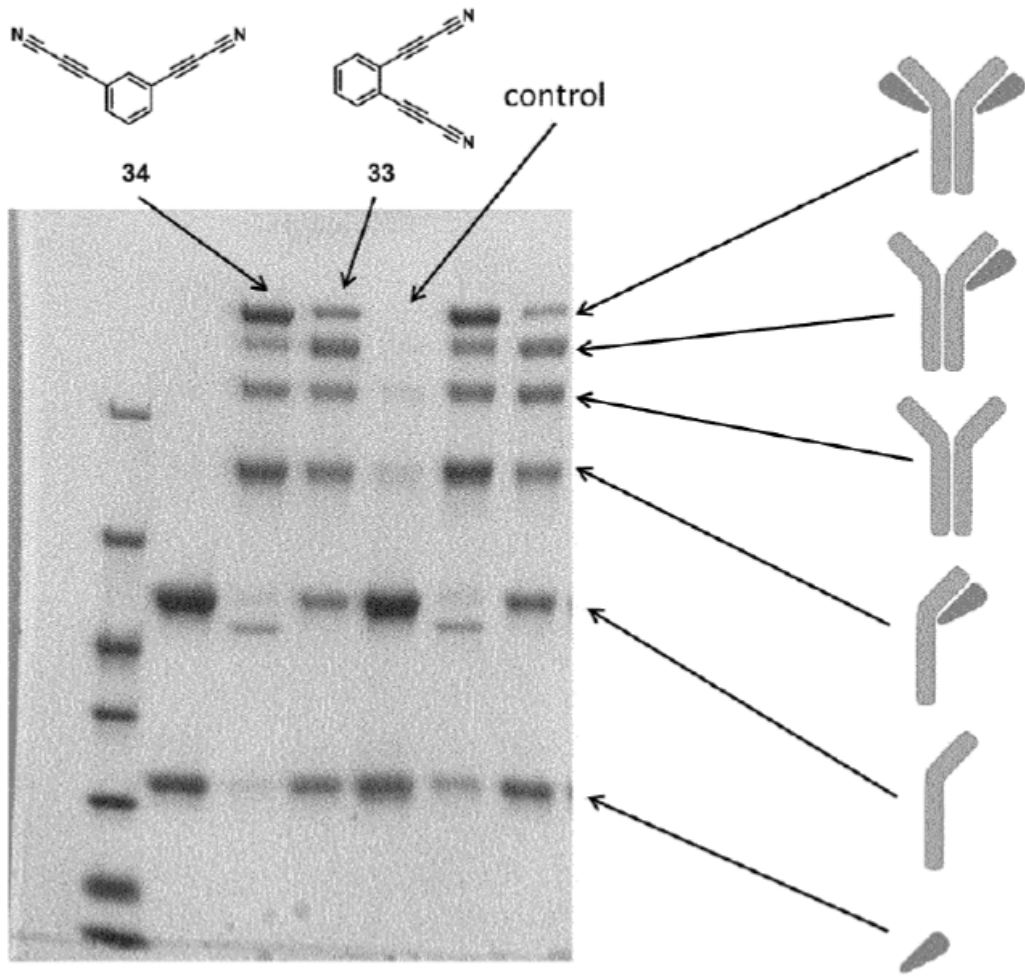


Figura 16