

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 721 098**

51 Int. Cl.:

C07D 401/10 (2006.01)

A61K 47/22 (2006.01)

A61K 31/4184 (2006.01)

B01D 15/38 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.10.2014 PCT/IB2014/064998**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.04.2015 WO15049651**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.10.2014 E 14786355 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.02.2019 EP 3052483**

54 Título: **Compuestos para cromatografía de afinidad**

30 Prioridad:

01.10.2013 US 201361885146 P
17.07.2014 US 201462025994 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.07.2019

73 Titular/es:

**GLAXOSMITHKLINE INTELLECTUAL PROPERTY
DEVELOPMENT LIMITED (100.0%)
980 Great West Road
Brentford, Middlesex TW8 9GS, GB**

72 Inventor/es:

**KUMPALUME, PETER;
SCHON, OLIVER;
DONAHUE, CHRISTINE PATRICIA;
EVINDAR, GHOTAS;
ISRAEL, DAVID I.;
PAOLELLA, DAVID;
KUAI, LETIAN y
PRABHU, NINAD V.**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 721 098 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 para cromatografía de afinidad

Campo de la invención

5 La presente divulgación se refiere a compuestos para su uso en cromatografía de afinidad, más en particular, a compuestos para su uso en purificación por afinidad de seroalbúmina, especialmente, seroalbúmina humana (HSA). Los compuestos también son útiles para extender la semivida de agentes terapéuticos, en particular, agentes peptídicos terapéuticos y moléculas pequeñas, tales como mediante conjugación al péptido terapéutico o molécula pequeña, que, tras su administración, se une a HSA, proporcionando, de este modo, una liberación prolongada del agente terapéutico.

Antecedentes de la técnica

10 Se han descrito moléculas pequeñas que se unen a seroalbúmina humana para su uso en la purificación de biomoléculas tales como albúminas de suero que incluyen seroalbúmina humana (HSA), anticuerpos y proteínas de fusión (véase, S. Subramanian, Dye-Ligand Affinity Chromatography: The Interaction of Cibacron Blue F3GA® With Proteins and Enzymes, CRC Critical Reviews in Biochemistry (1984) vol 16 (2), págs. 169 - 205; la Patente de EE.UU. N.º 4.722.896; la Patente de EE.UU. N.º 5.849.874; y la publicación PCT n.º WO 2012/020080 A2). De manera similar, se han descritos moléculas pequeñas que se unen a seroalbúmina humana que son útiles en la prolongación de la semivida de agentes terapéuticos que se han administrado mediante inyección, en particular, agentes peptídicos terapéuticos (véase, por ejemplo, L. Pollaro and C. Heinis, Strategies to Prolong the Plasma Residence Time of Peptide Drugs, Med. Chem. Commun. (2010) 1, 319-324).

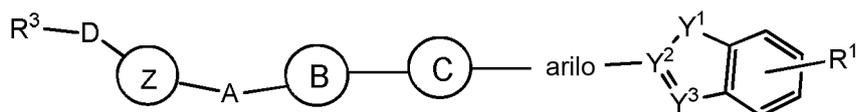
20 Existe la necesidad de compuestos mejorados adicionales que puedan usarse para purificar, separar y/o capturar tales biomoléculas lejos de otras biomoléculas y compuestos presentes en lisados celulares u otras mezclas líquidas y soluciones. Igualmente, existe la necesidad de compuestos adicionales que puedan usarse para aumentar de forma segura y eficaz la semivida de moléculas terapéuticas existentes, en particular, péptidos terapéuticos, polipéptidos y moléculas pequeñas, que cuando se administran a un sujeto entran en la circulación del sujeto.

Sumario de la invención

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un compuesto como se define en las reivindicaciones adjuntas. También se proporcionan composiciones farmacéuticas, una cromatografía de afinidad de fase sólida y procedimientos como se definen en las reivindicaciones adjuntas.

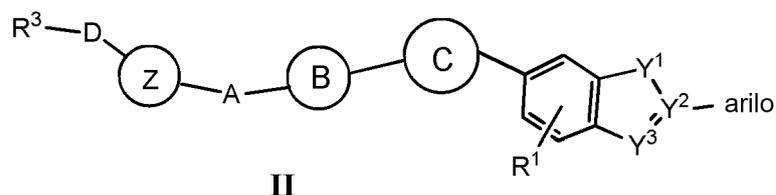
30 De forma más general, la presente divulgación presenta compuestos que son útiles como agentes de afinidad para purificar directamente una variedad de biomoléculas, tales como proteínas plasmáticas, incluidas albúminas de suero, en particular, seroalbúmina humana y proteínas de fusión de HSA. Otras biomoléculas que se pueden purificar incluyen inmunoglobulinas, fibrógeno, glicoproteínas de ácido α 1, etc; enzimas, incluidas amilasas, celulasas, fosfatasa alcalina intestinal de ternero (CIAP), lactato deshidrogenasa (LDH), etc.; y proteínas artificiales o dominios proteicos, incluidas proteínas o dominios marcados por afinidad (tales como con 6His, FLAG, GST, etc.), proteínas de fusión de Fc, anticuerpos de dominio, etc. Además, tales compuestos, cuando se conjugan a un agente terapéutico, en particular, un agente terapéutico peptídico, son útiles en extender la semivida de ese agente terapéutico en la sangre, tras su administración. Casos de la divulgación proporcionan nuevos quimiotipos que tienen alta afinidad y especificidad a HSA, incluidos sus fragmentos y variantes, tal como cuando se acoplan a agarosa u otro sustrato. Además, la tecnología de resina de afinidad tiene una selectividad significativamente superior que los ligandos disponibles en el mercado para la purificación de HSA y proteínas de fusión de HSA. La superior selectividad se consigue mediante la interacción específica de los compuestos de la divulgación con un sitio de unión en albúmina.

Casos de la divulgación son compuestos de fórmula I



I

45 o fórmula II



o a una sal de los mismos,

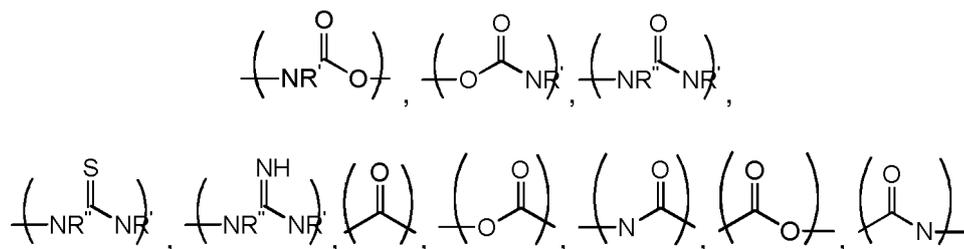
en la que R¹ es H, -Cl, -F, -Br, -I, -OH, -CN, -NO₂, alquilo C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, alquenilo C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, cicloalquilo, arilo o heteroarilo sustituido o sin sustituir;

5 R³ es -[(CH₂)₂E]_n(CH₂)₂NR'R'' y n es cualquier número entero de 0 a 30,

en el que R' y R'' son cada uno independientemente H, alquilo C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, alquenilo C₁-C₆ sustituido o sin sustituir o cicloalquilo sustituido o sin sustituir;

10 arilo es cualquier sustituyente de hidrocarburo o sustituyente de heteroarilo completamente o parcialmente aromático sustituido o sin sustituir; Y¹ e Y³ son independientemente C, O, N, NR² o S, en la que R² es H, alquilo C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, alquenilo C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, cicloalquilo, arilo o heteroarilo sustituido o sin sustituir; Y² es C o N;

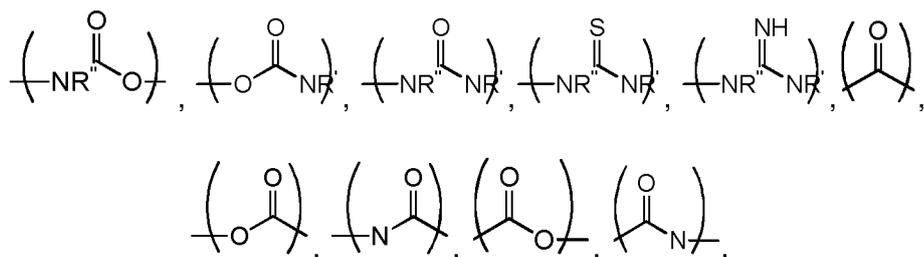
A y D son independientemente



15 amidina, tioamida o A y/o D está ausente, en la que R' es H, alquilo C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, alquenilo C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, cicloalquilo, arilo o heteroarilo sustituido o sin sustituir;

B es cicloalquilo C₄-C₉ sustituido o sin sustituir, heterocicloalquilo C₄-C₉ sustituido o sin sustituir que comprende N, O o S, heteroarilo sustituido o sin sustituir que comprende N, O, S o B está ausente;

C es cualquiera de



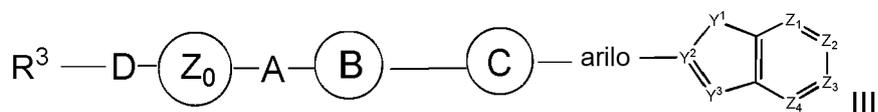
20 arilo, heteroarilo, amidina, tioamida o C está ausente,

en el que R' y/o R'' son cada uno independientemente H, alquilo C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, alquenilo C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, cicloalquilo, arilo o heteroarilo sustituido o sin sustituir;

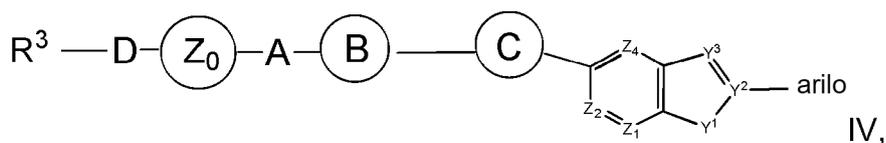
25 E es CH₂, O, NH o S, o E está ausente;

Z es arilo sustituido o sin sustituir, heteroarilo sustituido o sin sustituir que comprende N, O o S, o heteroarilo sustituido o sin sustituir que comprende N, O, S o Z está ausente

En otro aspecto, la divulgación proporciona compuestos de fórmula III



30 o fórmula IV



o a una sal de los mismos, en la que:

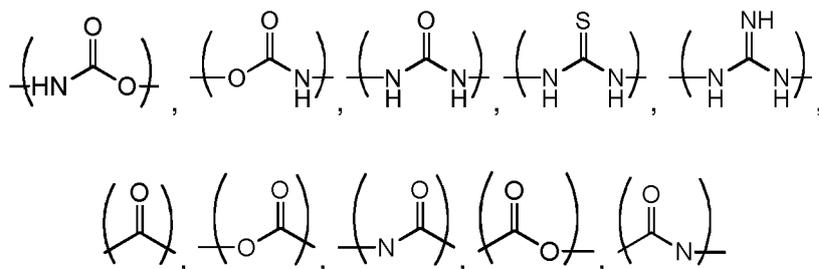
5 cada Z₁, Z₂, Z₃, y Z₄ se selecciona independientemente de N y CR¹ y no más de dos de Z₁, Z₂, Z₃, y Z₄ son N, y cada R¹ se selecciona independientemente de H, -Cl, -F, -Br, -I, -OH, -CN, -NO₂, alquilo C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, alcoxilo C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, alquenilo C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, cicloalquilo, arilo o heteroarilo sustituido o sin sustituir;

R³ es -[(CH₂)₂E]_n(CH₂)₂NR'R'' y n es cualquier número entero de 0 a 30, en el que R' y R'' son cada uno independientemente H, alquilo C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, alquenilo C₁-C₆ sustituido o sin sustituir o cicloalquilo sustituido o sin sustituir;

10 ario es cualquier sustituyente de hidrocarburo o sustituyente de heteroarilo completamente o parcialmente aromático sustituido o sin sustituir; Y¹ e Y³ son independientemente C, CR², O, N, NR² o S, en la que R² es H, alquilo C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, alquenilo C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, cicloalquilo, arilo o heteroarilo sustituido o sin sustituir;

Y² es C;

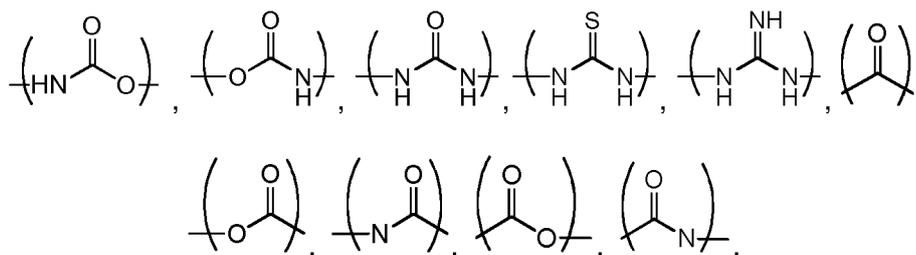
15 A y D son independientemente



amidina, tioamida o A y/o D está ausente;

20 B es cicloalquilo C₄-C₉ sustituido o sin sustituir, heterocicloalquilo C₄-C₉ sustituido o sin sustituir que comprende N, O o S, heteroarilo sustituido o sin sustituir que comprende N, O, S o B está ausente;

C es cualquiera de



25 arilo, heteroarilo, amidina, tioamida;

E es CH₂, O, NH o S, o E está ausente; y

Z es arilo sustituido o sin sustituir, heteroarilo sustituido o sin sustituir que comprende N, O o S, o heteroarilo sustituido o sin sustituir que comprende N, O, S o Z está ausente.

30 Como se desvela en el presente documento, los compuestos de fórmula I, fórmula II, fórmula III y fórmula IV puede estar unidos a una fase sólida para preparar una cromatografía de afinidad de fase sólida, que es útil para la separación de una proteína de interés de una solución acuosa que comprende la proteína y una o más impurezas. Por ejemplo, la fase sólida es agarosa. La proteína de interés puede comprender, por ejemplo, seroalbúmina humana. La solución acuosa puede ser: de un lisado celular, de un cultivo/caldo celular, aislada de un fluido corporal, por ejemplo, sangre o de otras mezclas. Por ejemplo, se puede usar material de agarosa de afinidad tal como se desvela en el presente documento para purificar, separar o capturar una variedad de biomoléculas a partir de lisados celulares y otras mezclas. Las biomoléculas que se pueden purificar, separar o capturar a partir de otras biomoléculas e impurezas en mezclas de solución líquido/acuosa son biomoléculas tales como proteínas plasmáticas que incluyen inmunoglobulinas de seroalbúminas, fibrógeno, glicoproteínas de ácido α₁, etc; enzimas que incluyen amilasas, celulasas, fosfatasa alcalina intestinal de ternero (CIAP), lactato deshidrogenasa (LDH), etc.; y proteínas artificiales o dominios proteicos que incluyen proteínas o dominios marcados por afinidad (tales como

con 6His, FLAG, GST, etc.), proteínas de fusión de HSA, proteínas de fusión de Fc, anticuerpos de dominio, etc.

- También se pueden usar compuestos como se describen en el presente documento para extender la semivida de agentes terapéuticos, en particular agentes terapéuticos peptídicos, polipeptídicos y de moléculas pequeñas. Normalmente, los péptidos se eliminan del torrente sanguíneo a los pocos minutos después de la administración intravenosa. Los riñones parecen filtrar completamente las moléculas por debajo de 5 kDa, mientras que los péptidos más grandes (por encima de -50-70 kDa) parecen retenerse y circular eficazmente. Sin embargo, se sabe que la eliminación renal de algunos péptidos puede reducirse mediante la unión a proteínas de membrana accesible o proteínas séricas. La semivida de moléculas en la circulación se expresa, en general, como semivida plasmática, definida como el tiempo que lleva en reducir la concentración de moléculas en circulación mediante eliminación a la mitad por el sistema (riñones, etc). Puesto que la eliminación de la sangre de moléculas administradas por vía intravenosa es casi siempre y procedimiento bifásico (la primera fase es una disminución rápida debido a la redistribución al tejido periférico), la segunda fase (reducción mediante eliminación por los riñones, etc.) es la parte de la reducción asociada con el término "semivida plasmática", también denominada comúnmente como "semivida de eliminación".
- De este modo, casos de la divulgación proporcionan compuestos de fórmula I o fórmula II tal como se describe en el presente documento, conjugados a un agente terapéutico, en particular, un agente terapéutico peptídico o polipeptídico, para su uso en la extensión de la semivida de eliminación o semivida plasmática del agente terapéutico en el torrente sanguíneo.

Breve descripción de los dibujos

- Los anteriores rasgos de la divulgación se entenderán mejor haciendo referencia a la siguiente descripción detallada, tomada con referencia con los dibujos adjuntos, en los que:

- La Figura 1 muestra un esquema de una reacción entre agarosa activada y compuestos como se describen en el presente documento para preparar perlas de agarosa conjugadas por afinidad.
- La Figura 2 muestra un gel de mini agarosa en el que perlas de agarosa de afinidad conjugadas con un compuesto de fórmula I como se ha descrito en el presente documento se usó para separar/purificar HSA de un lisado celular con adiciones de HSA.
- La Figura 3 muestra la especificidad de material de agarosa de afinidad conjugado con un compuesto de fórmula I para un péptido fusionado con HSA, en comparación con Mimetic Blue®.
- La Figura 4a muestra la comparación de la eficacia de distintas soluciones de tampón para eluir HSA de material de agarosa de afinidad como se describe en el presente documento.
- La Figura 4b muestra una representación gráfica de los resultados de la Figura 4a.
- La Figura 5 muestra una comparación del efecto de calor sobre unión de HSA a material de agarosa de afinidad conjugado con un compuesto de fórmula I frente a la unión de la misma biomolécula a Mimetic Blue®.

Descripción detallada de realizaciones específicas

- Definiciones. Tal como se usa en la presente descripción y en las reivindicaciones adjuntas, las siguientes expresiones tendrán los significados indicados, a menos que el contexto lo requiere de otro modo:

- DIPEA significa N,N-diisopropiletilamina y también se denomina como base de Hunig
- DMF significa N,N-dimetilformamida
- EDTA significa ácido de N, N-etilendiamina-N,N, N', N'-tetraacético
- HATU significa hexafluorofosfato de 1-[Bis(dimetilamino)metileno]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio 3-óxido
- h significa hora(s)
- HSA significa seroalbúmina humana
- Mimetic Blue® significa Mimetic Blue® SA HL P6XL de ProMetic BioSciences Ltd como se describe en ([www.prometicbiosciences.com/assets/files/app_notes/Mimetic%20Blue%20SA%20HL%20P6XL%20Appliation%20Note%20-%20Albumin-fusion%20protein%20protein%20\(091110\)%20v2\[1\].pdf](http://www.prometicbiosciences.com/assets/files/app_notes/Mimetic%20Blue%20SA%20HL%20P6XL%20Appliation%20Note%20-%20Albumin-fusion%20protein%20protein%20(091110)%20v2[1].pdf)), Mimetic Blue® SA HL min
- significa minuto(s) MSA significa albúmina de suero de ratón
- NP40 significa el detergente NP-40 de tipo Tergitol, también conocido como nonil fenoxipoliétoxiol
- DO significa densidad óptima, según se ha medido usando un espectrofotómetro
- DO₂₈₀ significa densidad óptima según se ha medido usando un espectrofotómetro a 280 nm PBS significa tampón fosfo salino
- agarosa activada por NHS de Pierce significa agarosa activada por N-hidroxisuccinimida, tal como de Thermo Scientific
- P6XL (Product Cod 3125), Nota de aplicación - Captura y purificación de proteína de fusión de albúmina recombinante que usa
- Mimetic Blue® SA HL P6XL.
- rpm significa revoluciones por minuto
- TA o ta significa temperatura ambiente
- RSA significa seroalbúmina de rata
- SDS significa dodecilsulfato de sodio

TFA (ácido trifluoroacético)

5 Como se describe en el presente documento, "alquilo" significa cualquier sustituyente de hidrocarburo alifático que sea un hidrocarburo de cadena lineal o de cadena ramificada o cíclico o una combinación del mismo, que está completamente saturado. Tal como se usa en el presente documento, alquilo también puede referirse a un hidrocarburo que está mono- o poli-insaturado o una combinación del mismo. Ejemplos de sustituyentes de hidrocarburo saturado incluyen, aunque no de forma limitante a los sustituyentes conocidos como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, t-butilo, isobutilo, sec-butilo, ciclohexilo, ciclohexilo sustituido, homólogos y posicional y estereoisómeros de, por ejemplo, pentilo, hexilo, heptilo sustituido o sin sustituir, sustituyentes de octilo y similares. Un sustituyente de alquilo, como se usa en el presente documento, incluye sustituyentes de alquilo que pueden tener uno o más enlaces dobles o triples.

Como se describe en el presente documento, "amino alquilo" significa un sustituyente de alquilo que tiene uno o más hidrógenos en el hidrocarburo sustituido con un sustituyente de amino, por ejemplo, -NH₂, -NHR, -NR₂, -N=R, =NR y similares.

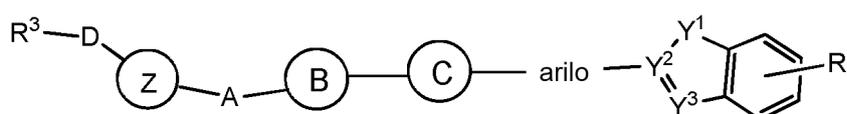
15 Como se describe en el presente documento, "amino alquilo sustituido o sin sustituir" significa que un sustituyente de amino alquilo puede ser -NH₂ (sin sustituir) o tener uno o más de los átomos de hidrógeno en el grupo amino sustituido con un sustituyente de carbono, tal como se describe por -NHR, -N=R, =NR y similares (sustituido).

20 Como se describe en el presente documento, "arilo" significa cualquier sustituyente de hidrocarburo aromático tal como benceno, naftaleno, fenantreno, pireno, benzo[a]antraceno, benzo[a]pireno, etc, por ejemplo, fenilo, naftilo, fenantrilo, etc. Como se usa en el presente documento, arilo también incluye heteroarilo", que incluye cualquier sustituyente heterocíclico completamente o parcialmente aromático. Los ejemplos incluyen, aunque no de forma limitativa, sustituyentes de pirrol, piridina, pirimidina, purina, pirano, furano, tiofeno, tiazol, indol, imidazol, tiomidazol, oxazol, azepina, tiopeno, tiazapina, quinolina, oxepina, oxadiazol.

25 Tal como se describe en el presente documento, "arilo sustituido o sin sustituir" significa cualquier sustituyente de arilo que no tiene otro sustituyente distinto a hidrógeno sobre el anillo aromático (fenilo, naftilo, fenantrilo, etc.) o un sustituyente de arilo en el que uno o más hidrógenos se sustituye con un sustituyente tal como carbono (alquilo, etc.), amina (amino, aminoalquilo, imino, nitro, nitroalquilo, etc.), azufre (tio, tioalquilo, sulfonato, sulfato, etc.), grupo oxo (carbonilo, aldehído, ácido, éster, éter, etc.), halógeno (cloro, fluoro, bromo, yodo), etc. Los ejemplos incluyen, aunque no de forma limitativa a sustituyentes de bencilo y sustituyentes de tolueno, fenol, anilina, benzonitrilo, acetofenona, benzaldehído, ácido benzoico, xileno y nitrobenzeno.

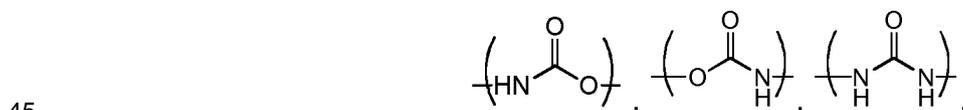
30 Como se describe en el presente documento, "heteroarilo sustituido o sin sustituir" significa cualquier sustituyente heteroarilo, como se ha descrito anteriormente, en el que uno o más hidrógenos en los anillos de carbono se sustituye con N, O o S.

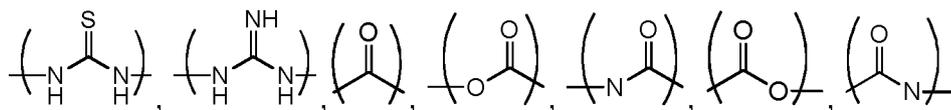
Casos de la divulgación proporcionan compuestos de fórmula I



I

35 o a una sal de los mismos, en la que: R¹ es H, -Cl, -F, -Br, -I, -OH, -CN, -NO₂, alquilo C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, alqueno C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, cicloalquilo, arilo o heteroarilo sustituido o sin sustituir; R³ es -[(CH₂)₂E]_n(CH₂)₂NR'R'' y n es cualquier número entero de 0 a 30, el que R' y R'' son cada uno independientemente H, alquilo C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, alqueno C₁-C₆ sustituido o sin sustituir o cicloalquilo sustituido o sin sustituir; ario es cualquier sustituyente de hidrocarburo o sustituyente de heteroarilo completamente o parcialmente aromático sustituido o sin sustituir; Y¹ e Y³ son independientemente C, O, N, NR² o S, en la que R² es H, alquilo C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, alqueno C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, cicloalquilo, arilo o heteroarilo sustituido o sin sustituir; Y² es C o N; A y D son independientemente

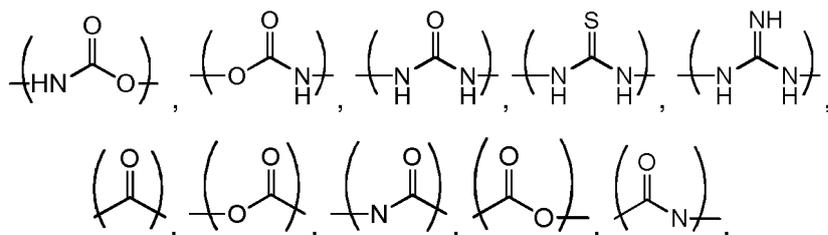




amidina, tioamida o A y/o D está ausente;

B es cicloalquilo C₄-C₉ sustituido o sin sustituir, heterocicloalquilo C₄-C₉ sustituido o sin sustituir que comprende N, O o S, heteroarilo sustituido o sin sustituir que comprende N, O, S o B está ausente;

5 C es cualquiera de



arilo, heteroarilo, amidina, tioamida;

E es CH₂, O, NH o S, o E está ausente;

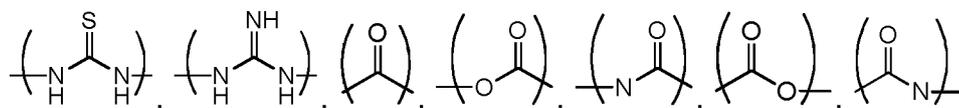
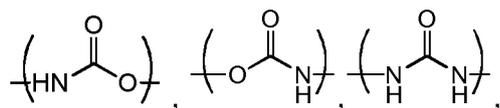
10 Z es arilo sustituido o sin sustituir, heteroarilo sustituido o sin sustituir que comprende N, O o S, o heteroarilo sustituido o sin sustituir que comprende N, O, S o Z está ausente. Algunos de los compuestos de Fórmula I son compuestos de la presente invención. Los compuestos de la presente invención se definen en las reivindicaciones adjuntas.

15 Casos relacionados proporcionan compuestos de fórmula I, en la que R¹ es H, -Cl, -F, -Br o -I; R³ es -[(CH₂)₂E]_n(CH₂)₂NR'R'' y n es cualquier número entero de 0 a 12, en el que R' y R'' son cada uno independientemente H, -CH₃, -CH₂CH₃, -CH(CH₃)₂, -CH₂CH(CH₃)₂, -(CH)_nCH₃ en la que n es 1, 2, 3, 4 o 5, o -C(CH₃)₃; arilo es un fenilo sustituido o sin sustituir, grupo tolilo, xililo, naftilo, bencilo, tienilo, indolilo, pirrolilo, piridinilo, pirimidinilo, purinilo, piranilo, furanilo, tiofenilo, tiazolilo, imidazolilo, tioimidazolilo, oxazolilo, azepinilo, tiopenilo, tiazapinilo, quinolinilo, oxepinilo u oxadiazolilo;

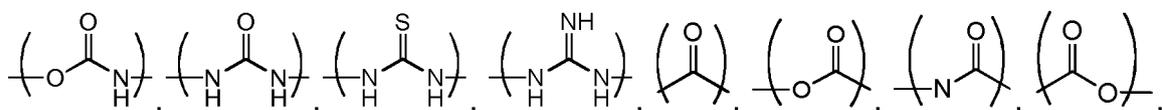
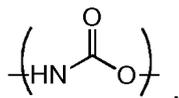
20 Y¹ e Y³ son independientemente C, O, N, NR² o S, en la que R² es H, -CH₃, -CH₂CH₃, -CH(CH₃)₂, -CH₂CH(CH₃)₂, -(CH)_nCH₃ en la que n es 1, 2, 3, 4 o 5, o -C(CH₃)₃;

Y² es C o N;

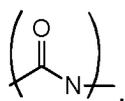
A y D son independientemente



25 amidina, tioamida o A y/o D está ausente; B es cicloalquilo C₄-C₉ sustituido o sin sustituir, heterocicloalquilo C₄-C₉ sustituido o sin sustituir que comprende N, heteroarilo sustituido o sin sustituir que comprende N, S u O o B está ausente; C es cualquiera de

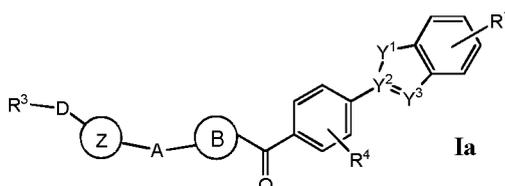


30

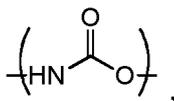


arilo, heteroarilo, amidina, tioamida o C está ausente; E es CH₂, O, NH o S, o E está ausente; Z es arilo sustituido o sin sustituir o heteroarilo sustituir o sin sustituir que comprende N, O o S, o Z está ausente; o a una sal de los mismos.

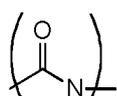
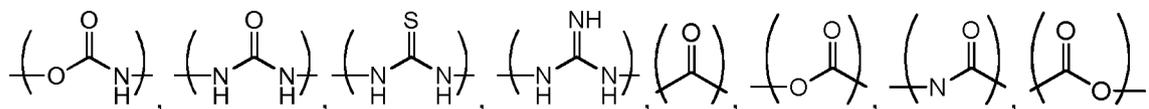
- 5 Determinados casos de la divulgación proporcionan compuestos de fórmula la como se muestra a continuación,



- 10 o a una sal de los mismos, en la que R¹ es H, -Cl, -F, -Br, -I, -OH, -CN, -NO₂, alquilo C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, alqueno C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, cicloalquilo, arilo o heteroarilo sustituido o sin sustituir; R³ es -[(CH₂)₂E]_n(CH₂)₂NR'R'' y n es cualquier número entero de 0 a 30, en el que R' y R'' son cada uno independientemente H, alquilo C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, alqueno C₁-C₆ sustituido o sin sustituir o cicloalquilo sustituido o sin sustituir; R⁴ es H, -Cl, -F, -Br, -I, -OH, -CN, -NO₂, alquilo C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, alqueno C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, cicloalquilo, arilo o heteroarilo sustituido o sin sustituir; Y¹ e Y³ son independientemente C, O, N, NR² o S, en la que R² es H, -CH₃, -CH₂CH₃, -CH(CH₃)₂, -CH₂CH(CH₃)₂, -(CH)_nCH₃ en la que n es 1, 2, 3, 4 o 5, o -C(CH₃)₃; Y² es C o N; A y D son independientemente



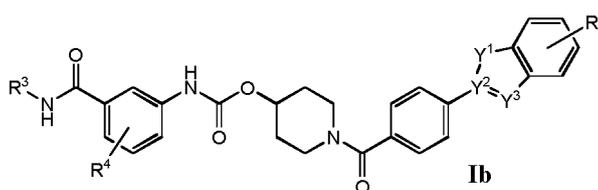
15



- 20 amidina, tioamida o A y/o D está ausente; B es cicloalquilo C₄-C₉ sustituido o sin sustituir, heterocicloalquilo C₄-C₉ sustituido o sin sustituir que comprende N, heteroarilo sustituir o sin sustituir que comprende N, S u O o B está ausente; E es CH₂, O, NH o S, o E está ausente; Z es arilo sustituido o sin sustituir o heteroarilo sustituir o sin sustituir que comprende N, O o S, o Z está ausente.

- 25 Casos relacionados proporcionan compuestos de fórmula la como se ha descrito anteriormente, en la que R¹ es H, -Cl, -F, -Br o -I, -OH, -CN, -NO₂, alquilo C₁-C₆ sustituido o sin sustituir; R² es H, -CH₃, -CH₂CH₃, -CH(CH₃)₂, -CH₂CH(CH₃)₂, -(CH)_nCH₃ en la que n es 1, 2, 3, 4 o 5, o -C(CH₃)₃; R³ es -[(CH₂)₂E]_n(CH₂)₂NR'R'' y n es cualquier número entero de 0 a 12; R⁴ es H, -Cl, -F, -Br, -I, -OH, -CN, -NO₂, alquilo C₁-C₆ sustituido o sin sustituir; e Y¹ e Y³ son independientemente C, O, N, NR² o S, en la que R² es H, alquilo C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, alqueno C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, cicloalquilo, arilo o heteroarilo sustituido o sin sustituir; e Y² es C o N; o a una sal de los mismos.

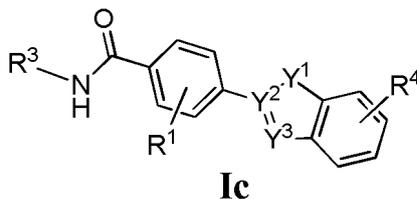
- 30 Aún en otros casos de la divulgación proporcionan compuestos de acuerdo con la fórmula lb como se muestra a continuación,



o a una sal de los mismos, en la que R¹ es H, -Cl, -F, -Br, -I, -OH, -CN, -NO₂, alquilo C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, alqueno C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, cicloalquilo, arilo o heteroarilo sustituido o sin sustituir; R³ es -
 5 [(CH₂)₂E]_n(CH₂)₂NR'R'' y n es cualquier número entero de 0 a 30, en el que R' y R'' son cada uno independientemente H, alquilo C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, alqueno C₁-C₆ sustituido o sin sustituir o cicloalquilo sustituido o sin sustituir y E es CH₂, O, NH o S, o E está ausente; R⁴ es H, -Cl, -F, -Br, -I, -OH, -CN, -NO₂, alquilo C₁-
 10 C₆ sustituido o sin sustituir, alqueno C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, cicloalquilo, arilo o heteroarilo sustituido o sin sustituir; e Y¹ e Y³ son independientemente C, O, N, NR² o S, en la que R² es H, alquilo C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, alqueno C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, cicloalquilo, arilo o heteroarilo sustituido o sin sustituir; e Y² es C o N.

Casos relacionados proporcionan compuestos de fórmula Ib tal como se ha descrito anteriormente, en la que R¹ es H, -Cl, -F, -Br o -I, -OH, -CN, -NO₂, alquilo C₁-C₆ sustituido o sin sustituir; R² es H, -CH₃, -CH₂CH₃, -CH(CH₃)₂, -
 15 CH₂CH(CH₃)₂, -(CH)_nCH₃ en la que n es 1, 2, 3, 4 o 5, o -C(CH₃)₃; R³ es -[(CH₂)₂E]_n(CH₂)₂NR'R'' y n es cualquier número entero de 0 a 12; R⁴ es H, -Cl, -F, -Br, -I, -OH, -CN, -NO₂, alquilo C₁-C₆ sustituido o sin sustituir; Y¹ e Y³ son independientemente C, O, N, NR² o S, en la que R² es H, alquilo C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, alqueno C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, cicloalquilo, arilo o heteroarilo sustituido o sin sustituir; e Y² es C o N; o a una sal de los mismos.

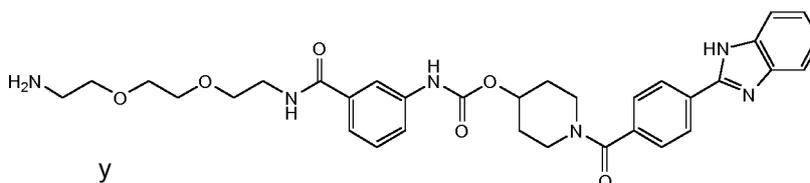
Otros casos proporcionan compuestos de fórmula Ic tal como se muestra a continuación

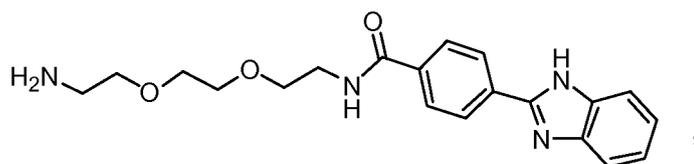


20 en la que R¹ es H, -Cl, -F, -Br, -I, -OH, -CN, -NO₂, alquilo C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, alqueno C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, cicloalquilo, arilo o heteroarilo sustituido o sin sustituir; R³ es -[(CH₂)₂E]_n(CH₂)₂NR'R'' y n es cualquier número entero de 0 a 30, en el que R' y R'' son cada uno independientemente H, alquilo C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, alqueno C₁-C₆ sustituido o sin sustituir o cicloalquilo sustituido o sin sustituir y E es CH₂, O, NH o S, o E está ausente; R⁴ es H, -Cl, -F, -Br, -I, -OH, -CN, -NO₂, alquilo C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, alqueno C₁-C₆
 25 sustituido o sin sustituir, cicloalquilo, arilo o heteroarilo sustituido o sin sustituir; Y¹ e Y³ son independientemente C, O, N, NR² o S, en la que R² es H, alquilo C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, alqueno C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, cicloalquilo, arilo o heteroarilo sustituido o sin sustituir; e Y² es C o N; o a una sal de los mismos.

Casos relacionados proporcionan compuestos de fórmula Ic tal como se ha descrito anteriormente, en la que R¹ es H, -Cl, -F, -Br o -I; R² es H, -CH₃, -CH₂CH₃, -CH(CH₃)₂, -CH₂CH(CH₃)₂, -(CH)_nCH₃ en la que n es 1, 2, 3, 4 o 5, o -
 30 C(CH₃)₃; R³ es -[(CH₂)₂E]_n(CH₂)₂NR'R'' y n es cualquier número entero de 0 a 12; e Y¹ e Y³ son independientemente C, O, NR² o S, en la que R² es H, alquilo C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, alqueno C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, cicloalquilo, arilo o heteroarilo sustituido o sin sustituir; e Y² es C o N; o a una sal de los mismos.

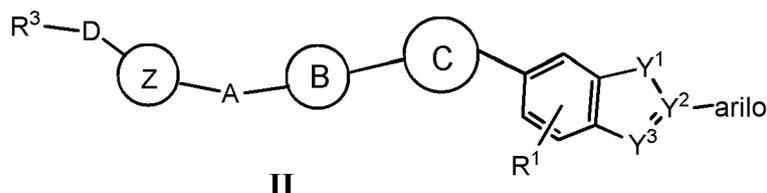
Aún en otros casos relacionados proporcionan compuestos de fórmula I que se seleccionan de,





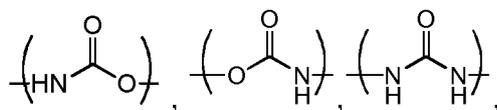
o a una sal de los mismos.

Otros casos de la divulgación proporcionan compuestos de fórmula II

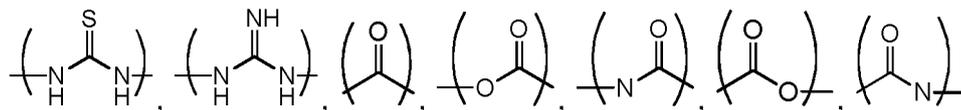


II

- 5 o a una sal de los mismos, en la que: R¹ es H, -Cl, -F, -Br, -I, -OH, -CN, -NO₂, alquilo C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, alqueno C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, cicloalquilo, arilo o heteroarilo sustituido o sin sustituir; R³ es -[(CH₂)₂E]_n(CH₂)₂NR'R'' y n es cualquier número entero de 0 a 30, en el que R' y R'' son cada uno independientemente H, alquilo C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, alqueno C₁-C₆ sustituido o sin sustituir o cicloalquilo sustituido o sin sustituir;
- 10 arilo es cualquier sustituyente de hidrocarburo o sustituyente de heteroarilo completamente o parcialmente aromático sustituido o sin sustituir; Y¹ e Y³ son independientemente C, O, N, NR² o S, en la que R² es H, alquilo C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, alqueno C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, cicloalquilo, arilo o heteroarilo sustituido o sin sustituir; e Y² es C o N;
- A y D son independientemente



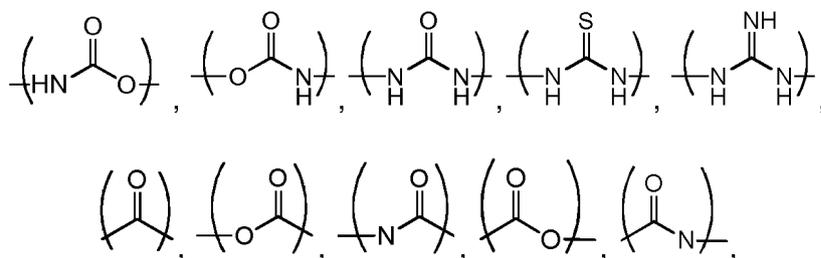
15



amidina, tioamida o A y/o D está ausente;

B es cicloalquilo C₄-C₉ sustituido o sin sustituir, heterocicloalquilo C₄-C₉ sustituido o sin sustituir que comprende N, O o S, heteroarilo sustituido o sin sustituir que comprende N, O, S o B está ausente;

20 C es cualquiera de



arilo, heteroarilo, amidina, tioamida o C está ausente;

E es CH₂, O, NH o S, o E está ausente;

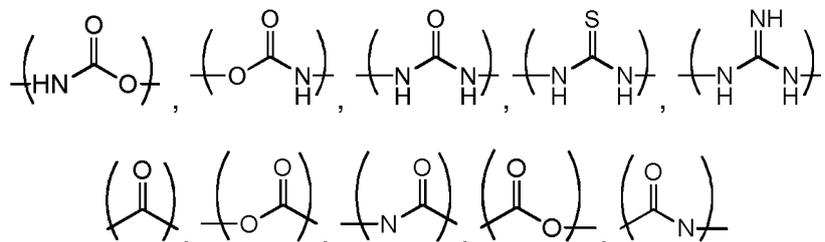
25 Z es arilo sustituido o sin sustituir, heteroalquilo sustituido o sin sustituir que comprende N, O o S, o heteroarilo sustituido o sin sustituir que comprende N, O, S o Z está ausente.

Casos relacionados proporcionan compuestos de fórmula II, en la que R¹ es H, -Cl, -F, -Br o -I; R³ es -[(CH₂)₂E]_n(CH₂)₂NR'R'' y n es cualquier número entero de 0 a 12, en el que R' y R'' son cada uno independientemente H, -CH₃, -CH₂CH₃, -CH(CH₃)₂, -CH₂CH(CH₃)₂, -(CH)_nCH₃ en la que n es 1, 2, 3, 4 o 5, o -C(CH₃)₃; arilo es un fenilo sustituido o sin sustituir, grupo toliilo, xililo, naftilo, bencilo, tienilo, indolilo, pirrolilo,

30

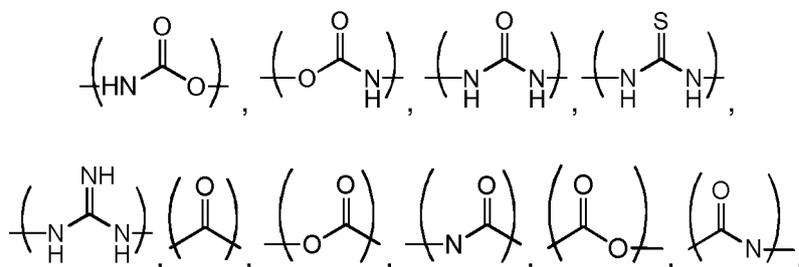
piridinilo, pirimidinilo, purinilo, piranilo, furanilo, tiofenilo, tiazolilo, imidazolilo, tioimidazolilo, oxazolilo, azepinilo, tiopenilo, tiazapinilo, quinolinilo, oxepinilo u oxadiazolilo; Y¹ e Y³ son independientemente C, O, N, NR² o S, en la que R² es H, -CH₃, -CH₂CH₃, -CH(CH₃)₂, -CH₂CH(CH₃)₂, -(CH)_nCH₃ en la que n es 1, 2, 3, 4 o 5, o -C(CH₃)₃; e Y² es C o N; A y D son independientemente

5



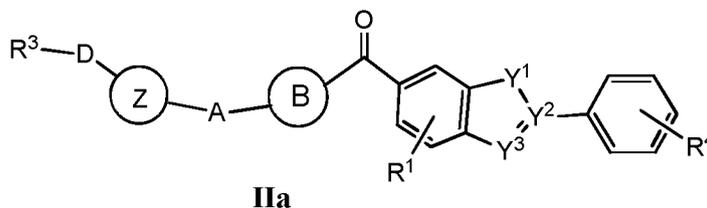
amidina, tioamida o A y/o D está ausente; B es cicloalquilo C₄-C₉ sustituido o sin sustituir, heterocicloalquilo C₄-C₉ sustituido o sin sustituir que comprende N, heteroarilo sustituido o sin sustituir que comprende N, S u O o B está ausente; C es cualquiera de

10



arilo, heteroarilo, amidina, tioamida o C está ausente; E es CH₂, O, NH o S, o E está ausente; Z es arilo sustituido o sin sustituir o heteroarilo sustituido o sin sustituir que comprende N, O o S, o Z está ausente; o a una sal de los mismos.

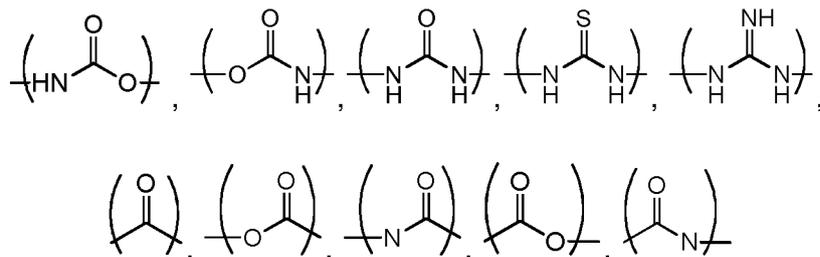
15 Otros casos proporcionan compuestos de fórmula IIa tal como se muestra a continuación,



20

o a una sal de los mismos, en la que R¹ es H, -Cl, -F, -Br, -I, -OH, -CN, -NO₂, alquilo C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, alqueno C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, cicloalquilo, arilo o heteroarilo sustituido o sin sustituir; R³ es -[(CH₂)₂E]_n(CH₂)₂NR'R'' y n es cualquier número entero de 0 a 30, el que R' y R'' son cada uno independientemente H, alquilo C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, alqueno C₁-C₆ sustituido o sin sustituir o cicloalquilo sustituido o sin sustituir; R⁴ es H, -Cl, -F, -Br, -I, -OH, -CN, -NO₂, alquilo C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, alqueno C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, cicloalquilo, arilo o heteroarilo sustituido o sin sustituir; Y¹ e Y³ son independientemente C, O, N, NR² o S, en la que R² es H, alquilo C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, alqueno C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, cicloalquilo, arilo o heteroarilo sustituido o sin sustituir; e Y² es C o N; A y D son independientemente

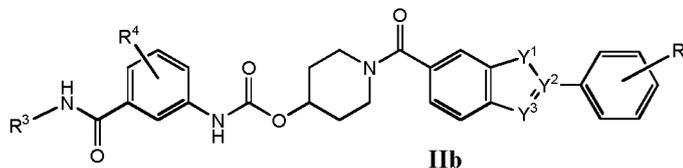
25



amidina, tioamida o A y/o D está ausente; B es cicloalquilo C₄-C₉ sustituido o sin sustituir, heterocicloalquilo C₄-C₉ sustituido o sin sustituir que comprende N, heteroarilo sustituido o sin sustituir que comprende N, S u O o B está ausente; E es CH₂, O, NH o S, o E está ausente; Z es arilo sustituido o sin sustituir o heteroarilo sustituido o sin

sustituir que comprende N, O o S, o Z está ausente.

Aún otros casos proporcionan compuestos de fórmula IIb tal como se muestra a continuación,

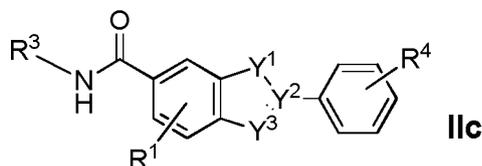


5 en la que R¹ es H, -Cl, -F, -Br, -I, -OH, -CN, -NO₂, alquilo C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, alqueno C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, cicloalquilo, arilo o heteroarilo sustituido o sin sustituir; R² es H, alquilo C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, alqueno C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, cicloalquilo, arilo o heteroarilo sustituido o sin sustituir; R³ es -[(CH₂)₂E]_n(CH₂)₂NR'R'' y n es cualquier número entero de 0 a 30, en el que R' y R'' son cada uno independientemente H, alquilo C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, alqueno C₁-C₆ sustituido o sin sustituir o cicloalquilo sustituido o sin sustituir; R⁴ es H, -Cl, -F, -Br, -I, -OH, -CN, -NO₂, alquilo C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, alqueno C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, cicloalquilo, arilo o heteroarilo sustituido o sin sustituir; Y¹ e Y³ son independientemente C, O, N, NR² o S, en la que R² es H, alquilo C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, alqueno C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, cicloalquilo, arilo o heteroarilo sustituido o sin sustituir; e Y² es C o N; E es CH₂, O, NH o S, o E está ausente.

; o a una sal de los mismos.

15 Casos relacionados proporcionan compuestos de fórmula IIb tal como se ha descrito anteriormente, en la que R¹ es H, -Cl, -F, -Br o -I; R² es H, -CH₃, -CH₂CH₃, -CH(CH₃)₂, -CH₂CH(CH₃)₂, -(CH)_nCH₃ en la que n es 1, 2, 3, 4 o 5, o -C(CH₃)₃; R³ es -[(CH₂)₂E]_n(CH₂)₂NR'R'' y n es cualquier número entero de 0 a 12; Y¹ e Y³ son independientemente C, O, N, NR² o S, en la que R² es H, alquilo C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, alqueno C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, cicloalquilo, arilo o heteroarilo sustituido o sin sustituir; e Y² es C o N; o a una sal de los mismos.

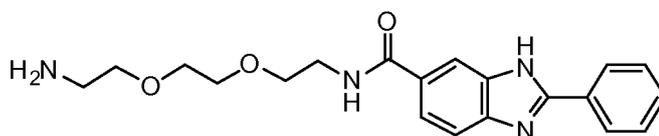
Otros casos relacionados proporcionan compuestos de fórmula IIc tal como se muestra a continuación:

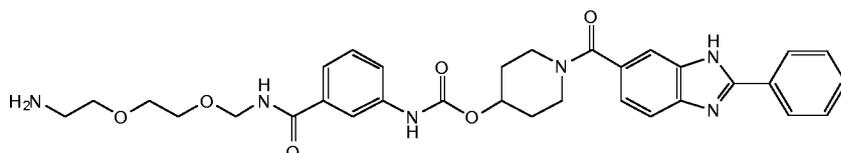


25 o a una sal de los mismos, en la que R¹ es H, -Cl, -F, -Br, -I, -OH, -CN, -NO₂, alquilo C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, alqueno C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, cicloalquilo, arilo o heteroarilo sustituido o sin sustituir; R² es H, alquilo C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, alqueno C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, cicloalquilo, arilo o heteroarilo sustituido o sin sustituir; R³ es -[(CH₂)₂E]_n(CH₂)₂NR'R'' y n es cualquier número entero de 0 a 30, en el que R' y R'' son cada uno independientemente H, alquilo C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, alqueno C₁-C₆ sustituido o sin sustituir o cicloalquilo sustituido o sin sustituir; R⁴ es H, -Cl, -F, -Br, -I, -OH, -CN, -NO₂, alquilo C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, alqueno C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, cicloalquilo, arilo o heteroarilo sustituido o sin sustituir; e Y¹ e Y³ son independientemente C, O, N, NR² o S, en la que R² es H, alquilo C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, alqueno C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, cicloalquilo, arilo o heteroarilo sustituido o sin sustituir; e Y² es C o N; E es CH₂, O, NH o S, o E está ausente.

35 Casos relacionados proporcionan compuestos de fórmula IIc, en la que R¹ es H, -Cl, -F, -Br o -I, -OH, -CN, -NO₂, alquilo C₁-C₆ sustituido o sin sustituir; R³ es -[(CH₂)₂E]_n(CH₂)₂NR'R'' y n es cualquier número entero de 0 a 12; R⁴ es H, -Cl, -F, -Br o -I, -OH, -CN, -NO₂, alquilo C₁-C₆ sustituido o sin sustituir; Y¹ e Y³ son independientemente C, O, N, NR² o S, en la que R² es H, -CH₃, -CH₂CH₃, -CH(CH₃)₂, -CH₂CH(CH₃)₂, -(CH)_nCH₃ en la que n es 1, 2, 3, 4 o 5, o -C(CH₃)₃; e Y² es C o N S; o a una sal de los mismos.

Aún otros casos relacionados proporcionan compuestos de fórmula II tal como se ha descrito anteriormente, en la que los compuestos se seleccionan de





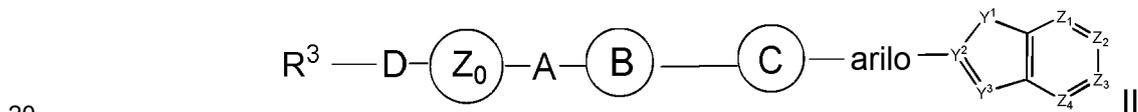
o a una sal de los mismos.

En casos particulares de los compuestos anteriormente descritos de fórmula I o II, cada uno de D, Z, A, y B está ausente.

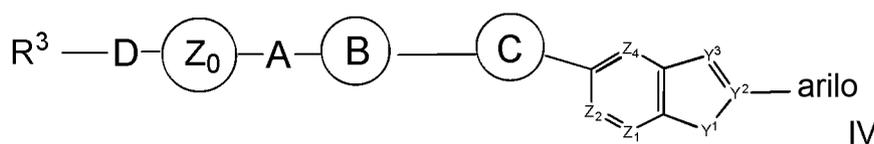
5 Otros casos proporcionan un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en:

- N-(2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etil)-2-fenil-1H-benzo[d]imidazol-6-carboxamida;
- N-(2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etil)-4-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)benzamida;
- 1-(4-(1H-benzo[d]imidazol-2-yl)benzoi)l)piperidin-4-il (3-((2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etil)carbamoil)fenil)carbamato;
- 1-(2-fenil-1H-benzo[d]imidazol-6-carbonil)piperidin-4-il (3-((2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etil)carbamoil)fenil)carbamato;
- 10 N-(2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etil)-2-(1'-(2-fenil-1H-benzo[d]imidazol-6-carbonil)-[4,4'-bipiperidin]-1-il)benzo[d]tiazol-6-carboxamida;
- N-(2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etil)-4-etil-2-(1'-(2-fenil-1H-benzo[d]imidazol-6-carbonil)-[4,4'-bipiperidin]-1-il)tiazol-5-carboxamida;
- 15 2-(1'-(4-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)benzoi)l)-[4,4'-bipiperidin]-1-il)-N-(2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etil)benzo[d]tiazol-6-carboxamida; y
- 2-(1'-(4-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)benzoi)l)-[4,4'-bipiperidin]-1-il)-N-(2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etil)-4-etiltiazolo-5-carboxamida, o una sal de los mismos.

En otro aspecto, la divulgación proporciona compuestos de fórmula III

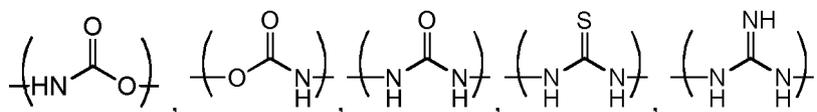


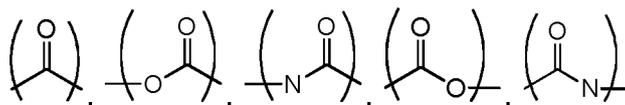
o fórmula IV



o a una sal de los mismos, en la que:

- 25 cada $Z_1, Z_2, Z_3,$ y Z_4 se selecciona independientemente de N y CR^1 y no más de dos de $Z_1, Z_2, Z_3,$ y Z_4 son N, y cada R^1 se selecciona independientemente de H, -Cl, -F, -Br, -I, -OH, -CN, -NO₂, alquilo C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, alcoxilo C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, alqueno C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, cicloalquilo, arilo o heteroarilo sustituido o sin sustituir;
- R^3 es $-[(CH_2)_2E]_n(CH_2)_2NR'R''$ y n es cualquier número entero de 0 a 30, en el que R' y R'' son cada uno independientemente H, alquilo C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, alqueno C₁-C₆ sustituido o sin sustituir o cicloalquilo sustituido o sin sustituir;
- 30 ario es cualquier sustituyente de hidrocarburo o sustituyente de heteroarilo completamente o parcialmente aromático sustituido o sin sustituir;
- Y^1 e Y^3 son independientemente C, $CR^2,$ O, N, NR^2 o S, en la que R^2 es H, alquilo C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, alqueno C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, cicloalquilo, arilo o heteroarilo sustituido o sin sustituir;
- 35 Y^2 es C;
- A y D son independientemente

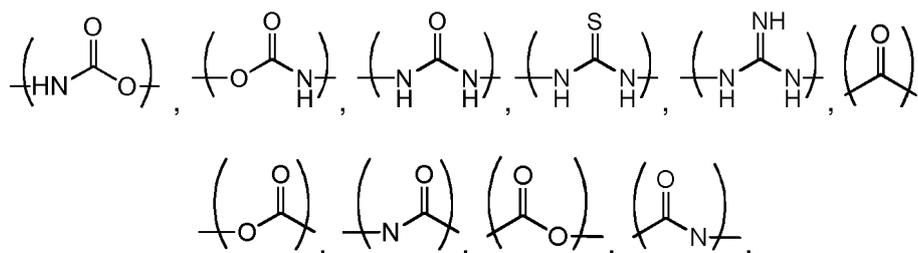




amidina, tioamida o A y/o D está ausente;

B es cicloalquilo C₄-C₉ sustituido o sin sustituir, heterocicloalquilo C₄-C₉ sustituido o sin sustituir que comprende N, O o S, heteroarilo sustituido o sin sustituir que comprende N, O, S o B está ausente;

C es cualquiera de



arilo, heteroarilo, amidina, tioamida;

E es CH₂, O, NH o S, o E está ausente; y

Z es arilo sustituido o sin sustituir, heteroalquilo sustituido o sin sustituir que comprende N, O o S, o heteroarilo sustituido o sin sustituir que comprende N, O, S o Z está ausente. En aún otros casos adicionales, la divulgación proporciona compuesto de acuerdo con fórmula III y fórmula IV, anteriormente, en la que cualquiera de Y¹, Y², Y³, arilo, C, B, A, Z₀(Z), D, R³ y/o E es como se define en cualquiera de los casos anteriores que describe compuestos de fórmula I y/o II. En un tal caso del compuesto de fórmula III o IV, cada uno de D, Z (o Z₀), A, y B está ausente.

Procedimientos sintéticos

Los compuestos descritos en el presente documento se preparan usando hexafluorofosfato de 1-[Bis(dimetilamino)metileno]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio 3-óxido (HATU) para generar un éster activos a partir de un ácido carboxílico sobre compuestos de partida, seguido por tratamiento con *N,N*-diisopropiletilamina (DIPEA, también conocido como base de Hunig) para formar enlaces amida. Disolventes útiles para las reacciones incluyen dimetilformamida (DMF) y otros disolventes orgánicos polares.

Cromatografía de afinidad

La cromatografía de afinidad se usa para separar una proteína de interés de una solución que comprende la proteína y una o más impurezas basada en la afinidad de la proteína de un ligando que está covalentemente unido a una fase sólida (columna de cromatografía, resina, matriz, perla, gel, etc: usadas indistintamente). Las proteínas en la solución con débil afinidad o falta de afinidad, para que el ligando fluya a través de la fase sólida impedida, dejando la proteína unida a la fase sólida. La proteína puede entonces eludirse de la fase sólida disminuyendo la afinidad de la proteína para el ligando. El ligando comprende los compuestos descritos en el presente documento.

El ligando de cromatografía de afinidad puede inmovilizarse sobre una fase sólida. Por "fase sólida" se refiere a una matriz no acuosa a la se puede adherir el ligando (por ejemplo, una columna, resina, matriz, perla, gel, etc), tal como se describe más adelante en el presente documento. Materiales y procedimientos ejemplares para cromatografía de afinidad de ligando se conocen en la técnica, por ejemplo, como se describe en el documento WO2011/012715. La fase sólida es, en general, una que comprende, por ejemplo, una superficie de vidrio, sílice, agarosa o poliestireno. La fase sólida puede ser una columna de purificación o una fase discontinua de partículas discretas. La fase sólida puede ser una columna de vidrio de poros controlada o una columna de ácido silícico. La fase sólida puede recubrirse con un reactivo (tal como glicerol) que está previsto para evitar la adherencia no específica de impurezas a la fase sólida. Por ejemplo, la fase sólida de afinidad puede ser agarosa.

Normalmente, el material a usar como matriz de afinidad es insoluble en el sistema en el que se encuentra la molécula diana. Normalmente, pero no siempre, la matriz insoluble es un sólido. Se han descrito y utilizado cientos de sustancias como matrices de afinidad, incluidas agarosa, celulosa, dextrano, poli(acrilamida), látex, vidrio de poro controlado. Soportes de afinidad útiles son aquellos con una elevada relación de área de superficie con respecto a volumen, grupos químicos que se modifican fácilmente para la unión covalente de ligandos, propiedades de unión no específica mínima, buenas características de flujo y estabilidad mecánica y química. Soportes porosos (también denominados resinas o geles) proporcionan, en general, las propiedades más útiles para la purificación de afinidad de proteínas. Estos tipos de soportes son normalmente resinas poliméricas a base de azúcar o acrilamida que se producen en solución (es decir, hidratadas) como perlas de 50-150 μm de diámetro. El formato perlado permite que estas resinas se suministren como suspensiones en húmedo que pueden dispensarse fácilmente para cargar y "empaquetar" columnas con perlas de resina de cualquier tamaño. Las perlas son lo suficientemente porosas y

grandes de modo que las biomoléculas (proteínas, etc.) puede fluir libremente en y a través de las perlas según puedan entre y alrededor de la superficie de las perlas. El ligando de afinidad está covalentemente unido al polímero de perla (superficies externas e internas) mediante diversos medios. El resultado es una matriz suelta en la cual pueden fluir libremente las moléculas de muestra pasada una alta área de superficie de ligando inmovilizado. Una de las matrices más ampliamente usadas para las técnicas de purificación de afinidad de proteínas es agarosa perlada reticulada (por ejemplo, disponible en densidades del 4 % y 6 %). Un lecho de resina de 1 ml es más del 90 % de agua en volumen. La agarosa perlada es buena para aplicaciones habituales pero se rompe fácilmente, haciéndolo adecuado para flujo de gravedad, centrifugación a baja velocidad y procedimientos de baja presión. La reticulación y/o endurecimiento químico adicional de resinas de agarosa perlada puede aumentar su capacidad para soportar presiones superiores pero también puede resultar en una capacidad de unión inferior. También se usan resinas a base de poliacrilamida como soportes para cromatografía de afinidad de columna. Tales resinas de poliacrilamida puede usarse en aplicaciones de presión media con una bomba peristáltica u otros sistemas de cromatografía líquida. Los soportes tanto de agarosa como poliacrilamida tienen bajas características de unión no específica.

Las partículas magnéticas son un tipo completamente distinto de soporte de afinidad de agarosa perlada y otras resinas porosas. Son mucho más pequeñas (normalmente 1-4 μm de diámetro) y sólidas (no porosas). Su pequeño tamaño proporciona la suficiente relación de área de superficie con respecto a volumen necesaria para una inmovilización de ligando eficaz y purificación de afinidad. Las perlas magnéticas se producen como partículas de óxido de hierro superparamagnéticas que se recubren covalentemente con derivados de silano. El recubrimiento convierte a las perlas inertes (es decir, para minimizar la unión no específica) y proporciona los grupos químicos particulares necesarios para unir el ligando de afinidad. La purificación de afinidad con partículas magnéticas no se realiza preferentemente en columna. En cambio, unos pocos microlitros de perlas se mezclan con varios cientos de microlitros de muestra como una suspensión suelta. Durante la mezcla, las perlas permanecen suspendidas en la solución de muestra, permitiendo que se produzcan las interacciones de afinidad con el ligando inmovilizado. Después de haber proporcionado un suficiente tiempo de unión, las perlas se recogen y separan de la muestra usando un potente imán. Normalmente, se llevan a cabo procedimientos de mesa en tubos de microcentrifugado y se usa pipeteo o decantación para retirar la muestra (o soluciones de lavado, etc.) mientras que las perlas magnéticas se mantienen en su lugar en la parte inferior o lado del tubo con un imán adecuado. Las ventajas de las partículas magnéticas sobre resinas porosas incluyen el hecho de que las perlas magnéticas muestra menos unión no específica que los soportes porosos, el hecho de que las perlas magnéticas se pueden usar para procedimientos de separación celular, y el hecho de que las perlas magnéticas son adecuadas para su automatización de alto rendimiento. Hay disponibles instrumentos de manipulación de muestras sofisticados y potentes para realizar ensayos y procedimientos de purificación mediante el uso de separaciones magnéticas.

El ligando de afinidad también puede acoplarse a polímeros, partículas magnéticas, perlas de látex, nanopartículas, macro-perlas, membranas, microplacas, superficies de matriz, varillas y un huésped de otros dispositivos que facilita la captura de biomoléculas específicas.

Las reacciones químicas que hacen posible la unión de ligando son conocidas en la técnica y están bien caracterizadas. Estas reacciones facilitan la unión de biomoléculas mediante sus grupos químicos comunes. Los tipos de funcionalidades usados, en general, para la unión incluyen componentes fácilmente reactivos tales como aminas primarias, sulfhidrilos, aldehídos y ácidos carboxílicos. Normalmente, la matriz de fase sólida se activa, en primer lugar, con un compuesto que es reactivo hacia uno o más de estos grupos funcionales. El complejo activado puede generar un enlace covalente entre el ligante y el soporte, dando como resultado la inmovilización de ligando.

Por ejemplo, varios soportes de agarosa perlada, acrilamida perlada y de afinidad de perlas magnéticas eficaces están disponibles en el mercado en formas activadas que están listas para su uso para acoplar muchos tipos distintos de ligandos. Estas químicas de activación y protocolos se han optimizado para asegurar un rendimiento de acoplamiento excelente y para generar enlaces covalentes estables que no lixiviarán fácilmente el ligando inmovilizado.

Una diana funcional común para inmovilizar moléculas es el grupo amina ($-\text{NH}_2$). Por ejemplo, ésteres de NHS son grupos activos formados mediante activación EDC de moléculas de carboxilato. Las resinas activadas por éster de NHS reaccionan con aminas primarias en condiciones ligeramente alcalinas (pH 7,2-8,5) para proporcionar enlaces amida estables. La reacción de inmovilización se lleva a cabo normalmente en tampón fosfato a pH 7,2-8,0 durante 0,5 a 4 horas a temperatura ambiente o 4 $^{\circ}\text{C}$. Los tampones de aminas primarias como Tris (TBS) no son compatibles puesto que compiten para la reacción; sin embargo, en algunos procedimientos, es útil añadir tampón de Tris o glicina al final de un procedimiento de conjugación para interrumpir (detener) la reacción. Otro procedimiento de acoplamiento de compuestos que contienen amina a resina de agarosa perlada implica una química denominada aminación reductiva. las aminas en el compuesto de ligado se conjugan con grupos aldehído del soporte, que están preparado mediante oxidación suave de la matriz de polisacáridos de agarosa. La reacción de inmovilización mediante el uso de aminación reductiva implica la formación de una base Schiff inicial entre el aldehído y grupos amina, que, a continuación, se reduce a una amina secundaria mediante la adición de cianoborohidruro de sodio (NaCNBH_3). Dependiendo del tipo y cantidad de ligando presente, una reacción de acoplamiento mediante el uso de aminación reductiva puede conseguir rendimientos de inmovilización superiores al 85 %. Otra estrategia reactiva de amina que se puede usar para la inmovilización es el anillo de azlactona. Esta es una resina única, tipo poliacrilamida resistente formada mediante copolimerización de acrilamida con azlactona. Una

amina primaria reaccionará con un grupo azlactona en un procedimiento de abertura de anillo que produce un enlace amida al final de un espaciado de cinco átomos. El grupo es reactivo espontáneamente con aminas; no se necesitan aditivos o catalizadores para conducir el procedimiento de acoplamiento. Añadir una cantidad del soporte a una muestra que contiene una molécula que contiene amina hace que se produzca la inmovilización en aproximadamente una hora. Otro procedimiento para inmovilizar ligandos de afinidad que contienen aminas es el uso de diimidazol de carbonilo (CDI) para activar hidroxilos sobre soportes de agarosa para formar carbamatos de imidazol reactivos. Este grupo reactivo está formado sobre el soporte en disolvente orgánico y se almacena como una suspensión en acetona para evitar la hidrólisis. La reacción del soporte en un tampón de acoplamiento acuoso con ligandos que contienen aminas primarias provoca la pérdida de los grupos imidazol y la formación de enlaces carbamato. El procedimiento de acoplamiento se produce a un pH básico (8,5-10) pero es una reacción más lenta con proteínas que la aminación reductiva o acoplamiento de azlactona. Las resinas activadas con CDI son particularmente útiles para inmovilizar péptidos y moléculas orgánicas pequeñas. La reacción también se puede realizar en disolvente orgánico para permitir el acoplamiento de ligandos insolubles en agua.

El ligando de afinidad también puede inmovilizarse mediante grupos funcionales distintos a solo aminas. En particular, se puede usar el grupo tiol (-SH) para dirigir las reacciones de acoplamiento lejos de los centros activos o sitios de unión sobre determinadas moléculas proteicas. Los grupos tiol (sulfhidrilos) pueden ser indígenas dentro de una molécula de ligando de afinidad o pueden añadirse mediante procedimientos de química sintética conocidos en la técnica.

Los procedimientos para acoplar grupo tiol que contiene ligando se conocen en la técnica. Por ejemplo, reactivos activados con maleimida reaccionan específicamente con grupos sulfhidrilo (-SH) en condiciones casi neutras (pH 6,5-7,5) para formar enlaces tioéter estables. La química de maleimida es la base de la mayoría de reticulantes y reactivos de etiquetado designados para la conjugación de grupos sulfhidrilo. El procedimiento es particularmente útil para acoplar tiol que contiene ligandos a microplacas de poliestireno activadas con maleimida; por ejemplo, para recubrir eficazmente la superficie de la placa con ligando. Soportes activados con yodoacetilo (por ejemplo, agarosa perlada o acrilamida con un grupo yodoacetilo el final de un brazo de espaciador largo) se pueden usar para hacer reaccionar con grupos sulfhidrilo del ligando de afinidad en condiciones fisiológicas a alcalinas (pH 7,2 a 9), dando como resultado enlaces tioéter estables. La inmovilización de sulfhidrilos se produce mediante el desplazamiento del átomo de yodo. Además, se pueden usar soportes que contienen disulfuro de piridilo para hacer reaccionar con grupos de sulfhidrilo de ligando de afinidad sobre una amplia gama de pH para formar enlaces disulfuro. Por tanto, los conjugados preparados usando esta química son escindibles con agentes reductores de disulfuros típicos, tales como ditiotreitil (DTT). Para esta aplicación, se puede modificar una resina activada con amina con un reticulante para hacer una resina activada para la inmovilización de sulfhidrilo reversible.

El compuesto de ligando de afinidad también puede contener, o modificarse para contener, cetonas de carbonilo o aldehídos en su estado nativo. Por ejemplo, se pueden crear glicoconjugados, como para glicoproteínas o glicolípidos, que contengan restos de azúcar que tengan hidroxilos sobre átomos de carbono adyacentes; estos cis-diolos pueden oxidarse con peryodato de sodio para crear aldehídos en sitios para su inmovilización covalente. Las resinas activadas con hidracida y compuestos se conjugarán con carbonilos de carbohidratos oxidados (azúcares) a pH de 5 a 7, dando como resultado la formación de enlaces de hidrazona. La química de hidracida es útil para etiquetar, inmovilizar o conjugar glicoconjugados a través de sitios de glicosilación.

El compuesto de ligando de afinidad también puede contener, o modificarse para permitir el acoplamiento a través de un grupo carboxilo mediante el uso de una reacción mediada por carbodiimida. Aunque un soporte no activado contiene un grupo reactivo que es espontáneamente reactivo con carboxilatos, los soportes de cromatografía que contienen aminas (o hidracidas) pueden usarse para formar enlaces amida con carboxilatos que se han activado con reticulante de carbodiimida soluble en agua. El reticulante de carbodiimida de EDC para EDC de reticulación carboxilo a amida y otras carbodiimidias son reticulantes de cero longitud; provocan la conjugación directa de carboxilatos (-COOH) a aminas primarias (-NH₂) sin volverse parte de la reticulación final (enlace amida) entre moléculas diana. Se puede lograr la inmovilización de ligando usando resina de agarosa de diaminodipropilamina (DADPA) como la amina primaria para esta reacción.

El acoplamiento también se puede conseguir mediante química de hidrógeno reactivo. Las moléculas de afinidad de ligando orgánicas pequeñas pueden tener estructuras que no contienen manipulaciones químicas disponibles para su inmovilización. Otras moléculas tienen grupos funcionales que tienen baja reactividad o están estéricamente impedidas. Sin embargo, algunos de estos compuestos tienen hidrógenos activos (o reemplazables) que se pueden condensar con formaldehído y una amina que usa la reacción de Mannich. Formalmente, la reacción de Mannich consiste en la condensación de formaldehído (u otro aldehído) con amoníaco y otro compuesto que contiene un hidrógeno activo. En lugar de utilizar amoníaco, esta reacción se puede realizar con aminas primarias o secundarias o incluso con amidas. La inmovilización de ligando se produce cuando se usa resina de agarosa de diaminodipropilamina (DADPA) como la amina primaria para esta reacción. La cromatografía de afinidad de fase sólida de ligando permite la separación de una muestra proteica basada en una interacción de unión altamente específica entre la proteína de interés y la fase sólida de ligando. Por lo tanto, la fase sólida comprende un ligando al cual la proteína de interés es capaz de fijarse reversiblemente, dependiendo de las condiciones de tampón.

El ligando de afinidad también puede inmovilizarse mediante otros enlaces covalentes, tales como enlaces éter

(incluido tioéter) y amida.

La unión de la proteína de interés a la fase sólida de ligando puede ser mediante cromatografía de columna. Por ejemplo, la fase sólida de ligado se forma en una columna, una muestra que contiene una proteína de interés se fluyen a través de la columna, la columna se lava con una o más soluciones de lavado, seguido por elución de la proteína de interés de la columna usando un tampón de elución.

La proteína de interés puede comprender proteínas plasmáticas, incluidas seroalbúmina (en particular, HSA humana), inmunoglobulina, fibrógeno, glicoproteínas de ácido $\alpha 1$, etc.; enzimas que incluyen amilasa, celulasa, fosfatasa alcalina intestinal de ternero (CIAP), lactato deshidrogenasa (LDH), etc.; y proteínas artificiales o dominios proteicos, en particular, proteínas de fusión de seroalbúmina, en especial, proteínas de fusión de HSA (por ejemplo, fusiones HSA-GLP1 tales como albiglutido), pero también incluidas proteínas o dominios marcados por afinidad (tales como con 6His, FLAG, GST, etc.), proteínas de fusión de Fc, anticuerpos de dominio, etc. que comprenden albúmina. Por ejemplo, la proteína de interés puede comprender seroalbúmina humana. Los compuestos descritos en el presente documento pueden mostrar unión específica a seroalbúmina humana y unión no específica a seroalbúmina de rata o ratón.

"Impureza" hace referencia a cualquier molécula extraña o indeseable que está presente en la muestra antes de la cromatografía de afinidad o después de la cromatografía de afinidad en el eluato de muestra. Pueden haber "impurezas de procedimiento" presentes. Estas son impurezas que están presente como resultado del procedimiento en la que se produce la proteína de interés. Por ejemplo, estas incluyen proteínas de célula huésped (HCP), ARN y ADN (por ejemplo, virus). "HCP" se refiere a proteínas, no relacionadas con la proteína de interés, producidas por la célula huésped durante el cultivo o fermentación celular, incluidas proteínas intracelulares y/o secretadas. Un ejemplo de una proteína de célula huésped es una proteasa, que puede provocar daños a la proteína de interés si aún está presentes durante y tras la purificación. Por ejemplo, si una proteasa permanece en la muestra que comprende la proteína de interés, puede crear sustancias o impurezas relacionadas con el producto que no estaban presentes. La presencia de proteasas puede provocar la desintegración de las proteínas de interés durante un tiempo durante el procedimiento de purificación y/o en la formulación final. La retirada de HCP, o niveles reducidos de HCP, por definición iguala la retirada o reducción de proteasas.

Las impurezas de procedimiento también incluyen componentes usados para cultivar células o para asegurar la expresión de la proteína de interés, por ejemplo, disolventes (por ejemplo, metanol usado para cultivar células de levadura), antibióticos, metotrexato (MTX), componentes de medio, floculantes, etc. También se incluyen moléculas que forman parte de la cromatografía de afinidad de fase sólida de ligando que pueden lixiviarse en la muestra durante etapas anteriores.

Las impurezas también incluyen "sustancias relacionadas con el producto" que incluyen proteínas que retienen su actividad pero son distintas en su estructura; e "impurezas relacionadas con el producto" que incluyen proteínas que han perdido su actividad debido a su diferencia en estructura. Estas variantes relacionadas con el producto incluyen, por ejemplo, especies de alto peso molecular (HMW), especies de bajo peso molecular (LMW), proteínas agregadas, precursores, proteínas degradadas, proteínas mal plegadas, proteínas unidas a bajo disulfuro, fragmentos y especies desamidadas.

Compuestos de Fórmula I II, III y IV como extensores de la semivida de agentes terapéuticos

Los compuestos de fórmula I, II, III o IV como se ha descrito en el presente documento pueden conjugarse, mediante interacciones covalentes o no covalentes, a agentes terapéuticos, que incluyen agentes terapéuticos peptídicos o polipeptídicos.

Tal como se usa en el presente documento, "agente terapéutico" se refiere a cualquier fármaco (por ejemplo, una molécula orgánica pequeña, un ácido nucleico, un polipéptido) que puede administrarse a un individuo para producir un efecto terapéutico o diagnóstico beneficioso mediante la unión a y/o alteración de la función de una molécula diana biológica en el individuo. Agentes terapéuticos potenciales incluyen exendinas, insulina, inhibidores de proteasas, hormonas, vasopresina, inmunoglobulina, buserelina, 9-desglicinamida, vasopresina de 8-arginina (DGAVP), AL-108, filómeros, osteocalcina, compuestos peptidomiméticos tales como miméticos de ApoA1 incluidos D-4F, terapéuticos a base de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos y cualquier otro péptido, compuesto polipeptídico o de molécula pequeña que puede conjugarse a los compuestos del presente documento. Materiales y procedimientos de conjugación adecuados se conocen en la técnica y se describen adicionalmente en los documentos WO2003/084469, WO2012/140647 y WO2014/106583, cuyo contenido se incorpora en el presente documento en su totalidad. Agentes terapéuticos adecuados se pueden administrar con compuestos de fórmula I, II, III o IV, mediante cualquier vía de administración adecuada que incluye vía oral, intravenosa, nasal, intraperitoneal, subcutánea y oral. El agente terapéutico o compuestos de fórmula I, II, III o IV se asocia a continuación con una proteína plasmática en la sangre, de modo que el complejo resultante actúa para extender la semivida plasmática del agente terapéutico. La proteína plasmática en la sangre puede ser albúmina. Por ejemplo, la proteína plasmática puede ser seroalbúmina humana. Los compuestos descritos en el presente documento pueden mostrar unión específica a seroalbúmina humana y unión no específica a seroalbúmina de rata o ratón.

Las frases, "semivida" (" $t_{1/2}$ ") y "semivida sérica", se refieren al tiempo que le toma a la concentración de suero (o plasma) del agente terapéutico conjugado de acuerdo con la divulgación para reducirse en el 50 %, *in vivo*, por ejemplo, debido a la degradación del agente terapéutico y/o eliminación o secuestro de la proteína de unión a antígeno mediante mecanismos naturales.

5 Medición de semivida

Semivida ($t_{1/2}$): se refiere al tiempo necesario para que la concentración del agente terapéutico conjugado alcance la mitad de su valor original. La semivida sérica de proteínas puede medirse mediante estudios farmacocinéticos.

Eliminación (CL): se refiere al volumen de plasma eliminado irreversiblemente de una proteína por unidad de tiempo. La eliminación se calcula como la dosis/AUC (AUC: es la área bajo la curva o área bajo la curva de tiempo de la concentración de fármaco plasmático). La eliminación también se puede calcular mediante la tasa de eliminación de fármaco dividida por la concentración plasmática del agente terapéutico conjugado (tasa de eliminación = $CL \cdot \text{concentración}$).

Tiempo de residencia medio (TRM): El tiempo promedio que el agente terapéutico conjugado reside en el organismo antes de eliminarse irreversiblemente. Calculado como $TRM = AUMC/AUC$.

Concentración de estado estable: La concentración de estado estable (C_{ee}) es la concentración alcanzada cuando la tasa de eliminación de fármaco es igual a la tasa de administración de fármaco como resultado de una administración de fármaco continuada. La C_{ee} fluctúa entre picos y niveles de punto mínimo y se mide en microgramos/ml. "Concentración de punto mínimo de estado estable de mediana" se refiere a la mediana del nivel de punto mínimo de la población del paciente en un tiempo dado.

20 Ejemplos

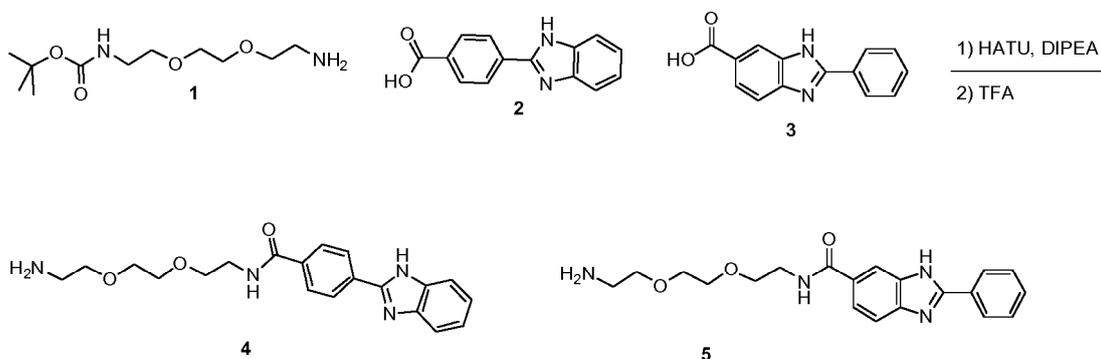
De los compuestos que se desvelan en las siguientes preparaciones y ejemplos, el compuesto 10 es un compuesto de la presente invención. Los compuestos restantes son compuestos de referencia.

Ejemplo 1 (para referencia): Preparación de N-(2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etil)-4-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)benzamida (compuesto 4) y N-(2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etil)-2-fenil-1H-benzo[d]imidazol-6-carboxamida (compuesto 5)

25 A una solución del ácido carboxílico deseado 1,0 equiv. 0,201 mmol) y HATU (92 mg, 0,242 mmol) en N,N-dimetilformamida (DMF) (3 ml) a ta se añadió DIPEA (0,106 ml, 0,604 mmol) y se agitó durante 10 minutos. A continuación, se añadió a la solución *terc*-butil (2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etil)carbamato (0,048 ml, 0,201 mmol) y la reacción se dejó en agitación a ta durante una noche. La reacción se diluyó con acetato de etilo (EtOAc) (100 ml) y se lavó con NH_4Cl (2 X 100 ml) y NaCl saturado (1 X 50 ml). La capa orgánica se secó sobre $MgSO_4$ y, a continuación, se evaporó a sequedad.

30 A una solución del material protegido con BOC (1,0 equiv, 0,201 mmol) en diclorometano (DCM) (3 ml) a ta se añadió TFA (0,465 ml, 6,03 mmol). La reacción se dejó en agitación a TA durante 1 hora. Se retiró el disolvente y exceso de TFA en condiciones de presión reducida y el resto obtenido se azeotropó con DCM dos veces. El material resultante se disolvió en DMF y, a continuación, se purificó mediante HPLC preparatoria.

35 El esquema 1 a continuación muestra la preparación de N-(2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etil)-4-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)benzamida (compuesto 4) y N-(2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etil)-2-fenil-1H-benzo[d]imidazol-6-carboxamida (compuesto 5) a partir de *terc*-butil (2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etil)carbamato (1) y ácido 4-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)benzoico (2) y ácido 2-fenil-1H-benzo[d]imidazol-6-carboxílico (3).



ESQUEMA 1

40 Ejemplo 2: Preparación de 1-(4-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)benzoil)piperidin-4-il (3-((2-(2-(2-

aminoetoxi)etoxi)etil)carbamoil)fenil)carbamato (compuesto **10**) y 1-(2-fenil-1H-benzo[d]imidazol-6-carbonil)piperidin-4-il (3-((2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etil)carbamoil)fenil)carbamato (compuesto **11**).

5 A una solución del ácido carboxílico deseado 1,0 equiv. 0,420 mmol) y HATU (160 mg, 0,420 mmol) en N,N-Dimetilformamida (DMF) (3 ml) a ta se añadió DIPEA (0,220 ml, 1,259 mmol) y se agitó durante 10 minutos. A la solución, a continuación se añadió metil 3-(((piperidin-4-iloxi)carbonil)amino)benzoato (compuesto **7**), 0,112 ml, 0,420 mmol) la reacción se dejó en agitación a ta durante una noche. La reacción se diluyó con EtOAc (100 ml) y se lavó con NH₄Cl (2 X 100 ml) y NaCl saturado (1 X 50 ml). La capa orgánica se secó sobre MgSO₄ y, a continuación, se evaporó a sequedad.

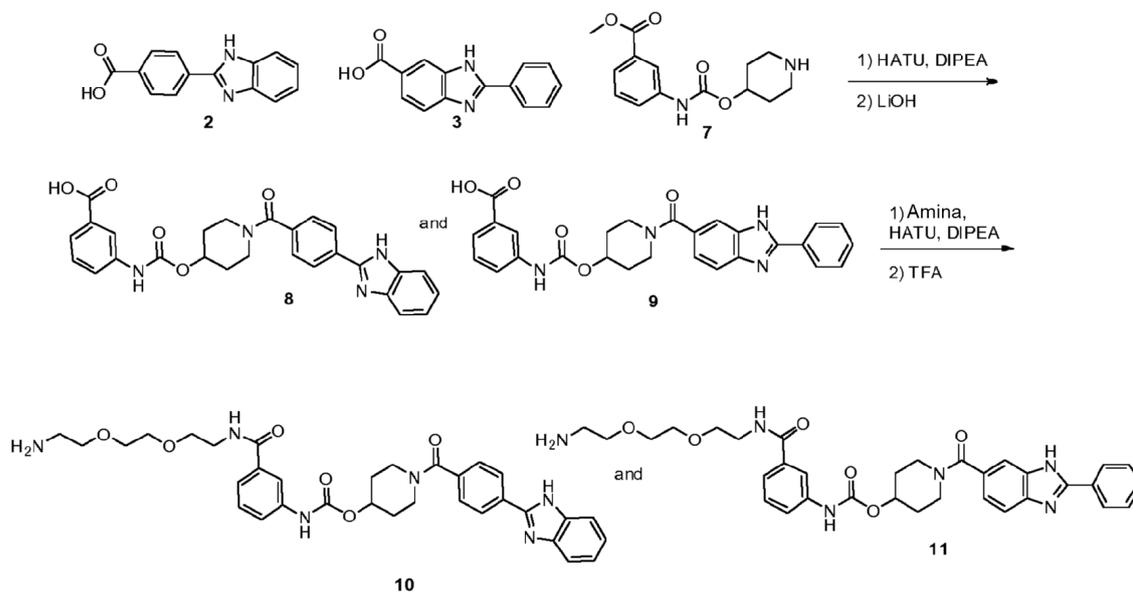
10 El producto resultante se usó como tal y se disolvió en tetrahidrofurano (THF) (4 ml) y metanol (1 ml). A esta solución se añadió LiOH (0,030 g, 1,260 mmol) en agua (1 ml). La reacción se dejó en agitación a ta durante una noche. El análisis LCMS mostró una conversión completa. A cada reacción se añadió 1N de HCl (5 ml), a continuación los disolventes se evaporación a sequedad. El material se llevó a la siguiente etapa como tal.

15 A continuación, al ácido carboxílico resultante (1,0 equiv. 0,420 mmol) y HATU (192 mg, 0,504 mmol) en N,N-dimetilformamida (DMF) (3 ml) se añadió DIPEA (0,220 ml, 1,260 mmol) y se agitó durante 10 minutos. A esta solución, se añadió, a continuación, *terc*-butil (2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etil)carbamato (compuesto **1**), (0,100 ml, 0,420 mmol) la reacción se dejó en agitación a ta durante una noche. La reacción se diluyó con EtOAc (100 ml) y se lavó con NH₄Cl (2 X 100 ml) y NaCl saturado (1 X 50 ml). La capa orgánica se secó sobre MgSO₄ y, a continuación, se evaporó a sequedad.

20 Al material protegido con BOC resultante (1,0 equiv. 0,360 mmol) en diclorometano (DCM) (3 ml) a ta se añadió TFA (0,969 ml, 12,58 mmol). La reacción se dejó en agitación a TA durante 1 hora. Se retiró el disolvente y exceso de TFA en condiciones de presión reducida y el resto obtenido se azeotropó con DCM dos veces. El material resultante se disolvió en DMF y, a continuación, se purificó mediante HPLC preparatoria.

25 El esquema 2 muestra la preparación de 1-(4-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)benzoil)piperidin-4-il (3-((2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etil)carbamoil)fenil)carbamato (compuesto **8**) y 1-(2-fenil-1H-benzo[d]imidazol-6-carbonil)piperidin-4-il (3-((2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etil)carbamoil)fenil)carbamato (compuesto **9**) a partir de ácido (2) 4-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)benzoico (3) ácido 2-fenil-1H-benzo[d]imidazol-6-carboxílico y (7) metil 3-(((piperidin-4-iloxi)carbonil)amino)benzoato. La mezcla de reacción de compuestos (**8**) y (**9**) se trató a continuación con LiOH como se describió para generar una mezcla de ácido 3-(((1-(4-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)benzoil)piperidin-4-il)oxi)carbonil)amino)benzoico (**10**) y ácido 3-(((1-(2-fenil-1H-benzo[d]imidazol-6-carbonil)piperidin-4-il)oxi)carbonil)amino)benzoico (**11**). A continuación, esta mezcla de productos se trató con *terc*-butil (2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etil)carbamato (**1**)1-[Bis(dimetolamino)metileno]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio 3-óxido hexafluorofosfato (HATU) y N,N-diisopropiletilamina (DIPEA) como se ha descrito, seguido por el tratamiento con ácido trifluoroacético /TFA para generar los productos de 1-(4-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)benzoil)piperidin-4-il (3-((2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etil)carbamoil)fenil)carbamato (**10**) y 1-(2-fenil-1H-benzo[d]imidazol-6-carbonil)piperidin-4-il (3-((2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etil)carbamoil)fenil)carbamato (**11**).

40 El esquema 2 a continuación muestra la preparación de carboxilatos **8** y **9** sobre dos etapas a partir de los ácidos 2 y 3, respectivamente. A continuación, los compuestos 8 y 9 se convirtieron, a continuación, en los productos finales deseados 1-(4-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)benzoil)piperidin-4-il (3-((2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etil)carbamoil)fenil)carbamato (**10**) y 1-(2-fenil-1H-benzo[d]imidazol-6-carbonil)piperidin-4-il (3-((2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etil)carbamoil)fenil)carbamato (**11**) sobre dos etapas.



ESQUEMA 2

Ejemplo 3 (para referencia): Preparación de N-(2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etil)-2-(1'-(2-fenil-1H-benzo[d]imidazol-6-carbonil)-[4,4'-bipiperidin]-1-il)benzo[d]tiazol-6-carboxamida (compuesto **19**); N-(2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etil)-4-etil-2-(1'-(2-fenil-1H-benzo[d]imidazol-6-carbonil)-[4,4'-bipiperidin]-1-il)tiazol-5-carboxamida (compuesto **20**); 2-(1'-(4-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)benzoil)-[4,4'-bipiperidin]-1-il)-N-(2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etil)benzo[d]tiazol-6-carboxamida (compuesto **21**); y 2-(1'-(4-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)benzoil)-[4,4'-bipiperidin]-1-il)-N-(2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etil)-4-etiltiazolo-5-carboxamida (compuesto **22**).

A una solución del ácido carboxílico deseado (por ejemplo, compuestos **2** y **3**) (1,0 equiv. 0,420 mmol) y HATU (160 mg, 0,420 mmol) en N,N-Dimetilformamida (DMF) (3 ml) a ta se añadió DIPEA (0,220 ml, 1,259 mmol) y se agitó durante 10 minutos. A continuación, se añadió a la solución *tert*-butil [4,4'-bipiperidina]-1-carboxilato (**12**) (0,108 ml, 0,420 mmol) y la reacción se dejó en agitación a ta durante una noche. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc (100 ml) y se lavó con NH₄Cl (2 X 100 ml) y NaCl saturado (1 X 50 ml). La capa orgánica se secó sobre MgSO₄ y, a continuación, se evaporó a sequedad. El material puro protegido con Boc se disolvió en material de diclorometano (DCM) (3 ml). A la solución se añadió TFA (0,971 ml, 12,60 mmol). La mezcla de reacción se dejó en agitación a TA durante 2 horas. Se retiró el disolvente y exceso de TFA en condiciones de presión reducida y el resto obtenido se azeotropó con DCM dos veces produciendo compuesto **13** y **14** en rendimiento cuantitativo.

Los compuestos tales como **17** y **18** se prepararon como se describe a continuación. A una solución del ácido carboxílico deseado (por ejemplo, compuestos **15** y **16**) (1,0 equiv. 0,420 mmol) y HATU (0,192 g, 0,504 mmol) en N,N-Dimetilformamida (DMF) (3 ml) a ta se añadió DIPEA (0,220 ml, 1,260 mmol) y la mezcla se agitó durante 10 minutos. A la mezcla de reacción, a continuación, se añadió *tert*-butil (2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etil)carbamato (**1**) (0,100 ml, 0,420 mmol) y la reacción se dejó en agitación a ta durante una noche. La reacción se diluyó con EtOAc (100 ml) y se lavó con NH₄Cl (2 X 100 ml) y NaCl saturado (1 X 50 ml). La capa orgánica (que contenía los compuestos **17** y **18**) se secó sobre MgSO₄ y, a continuación, se evaporó a sequedad.

Los ácidos carboxílicos protegidos con BOS resultantes (compuestos **17** y **18**) (1,0 equiv, 0,210 mmol) en N,N-Dimetilformamida (DMF) (3 ml) a ta se añadió DIPEA (1,5 ml, 0,315 mmol). A continuación, a la solución se añadió la amina deseada (por ejemplo, compuestos **13** y **14**) (1,0 equiv, 0,210 mmol) y la mezcla de reacción se calentó a 80 grados durante la noche. La reacción se diluyó con EtOAc (50 ml) y se lavó con NH₄Cl (2 X 50 ml) y NaCl saturado (1 X 50 ml). La capa orgánica (que contenía productos protegidos con BOC **19**, **20**, **21**, **22**) se secó sobre MgSO₄ y, a continuación, se evaporó a sequedad. El producto se llevó a la siguiente etapa sin necesidad de purificación. A una solución del material protegido con BOC deseado (por ejemplo, compuestos protegidos con BOS **19**, **20**, **21** y **22**) (1,0 equiv) en diclorometano (DCM) (3 ml) a ta se añadió TFA (0,809 ml, 10,50 mmol). La mezcla de reacción se dejó en agitación a TA durante 1 hora. Se retiró el disolvente y exceso de TFA en condiciones de presión reducida y el resto obtenido se azeotropó con DCM dos veces. Los productos finales (por ejemplo, compuestos **19**, **20**, **21** y **22**) se purificaron mediante HPLC prep.

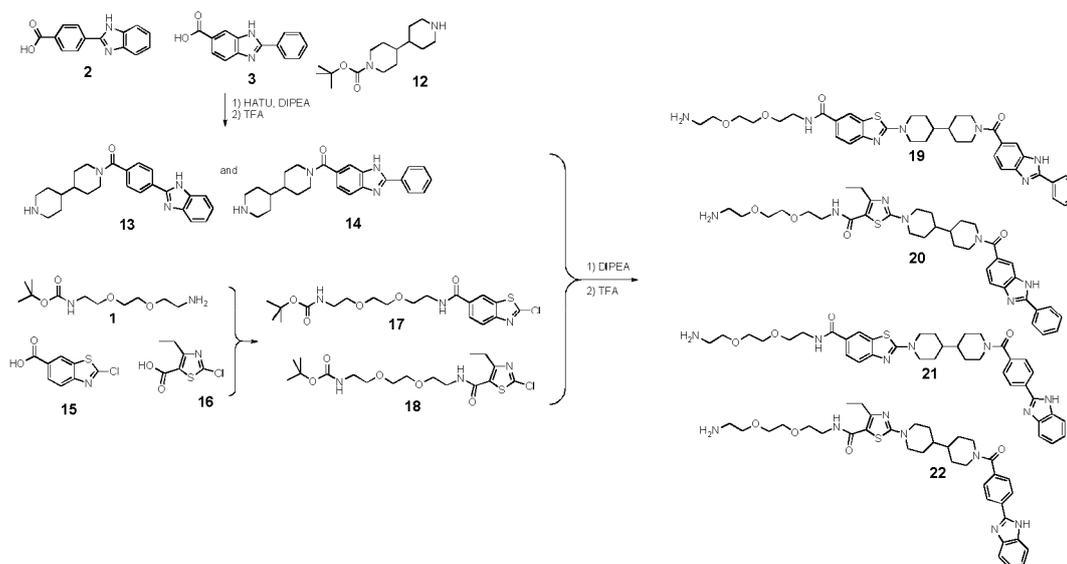
Esquema 3 (a continuación) describe la preparación de compuestos **19**, **20**, **21** y **22** en una síntesis de tres partes. En primer lugar, se preparan los compuestos **13** y **14** a partir del acoplamiento de los compuestos **12** con ácidos **2** y **3** seguido mediante desprotección de BOC con TFA para producir compuestos (4-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)fenil)([4,4'-bipiperidin]-1-il)metanona (**13**) y [4,4'-bipiperidin]-1-il(2-fenil-1H-benzo[d]imidazol-6-il)metanona (**14**) en

rendimientos cuantitativos.

Los compuestos **17** y **18** se prepararon mediante acoplamiento de diamina mono-prottegida **1**, con compuesto **15** (ácido 2-clorobenzo[d]tiazol-6-carboxílico) y compuesto **16** (ácido 2-cloro-4-etiltiazol-5-carboxílico) respectivamente.

Los compuestos **13** y **14** se hacen reaccionar, a continuación con los compuestos **17** y **18** (en presencia de base y calor para proporcionar producto final de protección de BOC que cuando se trata con TFA produjo los compuestos

- 5 deseados N-(2-(2-(2-aminoetoxi)etox)etil)-2-(1'-(2-fenil-1H-benzo[d]imidazol-6-carbonil)-[4,4'-bipiperidin]-1-il)benzo[d]tiazol-6-carboxamida (**19**); N-(2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etil)-4-etil-2-(1'-(2-fenil-1H-benzo[d]imidazol-6-carbonil)-[4,4'-bipiperidin]-1-il)tiazol-5-carboxamida (**20**); 2-(1'-(4-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)benzoil)-[4,4'-bipiperidin]-1-il)-N-(2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etil)benzo[d]tiazol-6-carboxamida (**21**); y 2-(1'-(4-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)benzoil)-[4,4'-bipiperidin]-1-il)-N-(2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etil)-4-etiltiazol-5-carboxamida (**22**) en rendimientos excelentes.



ESQUEMA 3

Ejemplos de afinidad

Ejemplo 4: Preparación de material de agarosa de afinidad

- 15 Agarosa activada de NHS de Pierce (agarosa activada con N-hidroxisuccinimida) (26 mg) se combinó con 400 µl de una solución de 100 µM de un compuesto de fórmula I o fórmula II tal como se describe en el presente documento, en tampón fosfato salino (PBS) a pH 7,5 a TA durante 1 h, seguido por adición 1M de Tris-HCl a pH 8,0 durante 30 min a TA. La mezcla resultante proporciona aproximadamente 200 µl de agarosa conjugada con compuesto. La Figura 1 muestra un esquema de la reacción y perlas de agarosa conjugadas.

Ejemplo 5: Purificación de afinidad/captura de biomoléculas

- 20 *A. Lisado celular con adiciones de seroalbúmina humana*

- Se preparó lisado celular mediante sonicación (células MCF7 en tampón PBS, 10^7 células se suspendieron en 500 µl de PBS y se sonicaron sobre hielo con una punta de micro-sonicación en un sonificador de Branson 450 (1 min a Rendimiento=4; Ciclo de trabajo=30 %) Una vez la solución se volvió transparente, se centrifugó a 13000 rpm durante 20 minutos para retirar los residuos, después de lo cual, se añadieron 700 µg de la proteína de lisado resultante (DO_{280}) con 10 µg de HSA en 100 µl de tampón PBS y esta mezcla se cargó, a continuación sobre 5 µl de perlas de agarosa de afinidad como se ha preparado en el Ejemplo 4. Como se muestra en la figura 2, las perlas de agarosa de afinidad cargadas con lisados celulares + HSA separaron/capturaron eficazmente la HSA a partir de los lisados celulares (comparar calles 6 y 7 (subrayadas con las calles 8 y 9 inmediatamente a la derecha, que representan de izquierda a derecha, respectivamente: HSA cargada sobre agarosa no conjugada a un compuesto como se describe en el presente documento y HSA en ausencia de lisado celular cargado sobre perlas de agarosa de afinidad).

B. Purificación de afinidad/captura de HSA mediante el uso de material de agarosa de afinidad en comparación con Mimetic Blue®.

La Figura 3 muestra la especificidad superior de material de agarosa de afinidad conjugado con un compuesto de

fórmula I tal como se describe en el presente documento para HSA, en comparación con Mimetic Blue® para HSA (cabe destacar calles 4 y 7 perla A etiquetada en comparación con calles 5 y 8 etiquetado mimético).

C. Elución de péptido fusionado con HSA purificado/capturado

5 Otro experimento comparó la capacidad de diversos tampones y soluciones en eluir HSA capturada a partir de material de agarosa de afinidad conjugado a un compuesto de fórmula I tal como se describe en el Ejemplo 4. En este experimento, seis puntas de finexus se empaquetaron con 5 uL de material de agarosa de afinidad tal como se describe en el presente documento. Cada punta recibió 20 ug de HSA como entrada. La HSA se dejó unir al material de agarosa de afinidad a TA durante 30 min, después de lo cual se recogió el flujo a través.

10 Cada punta se lavó dos veces con 50 uL de tampón de lavado (relaciones de PBS/H₂O de 100/0; 80/20; 60/40; 40/60; 20/80; y 0/100) durante 10 min, cada lavado. A continuación, se recogió la solución de lavado y se analizó mediante SDS-PAGE. (Cargado (2 % de entrada y fracciones recogidas en gel para las calles 2 y 3, respectivamente; cargado 13 % a gel, calles 4-15)

15 La cantidad de HSA en cada banda de gel se cuantificó con software FluoeChem. Como se puede observar en las calles 14 y 15 de la Figura 4a, se consiguió un 60 % de elución con dos lavados usando solo H₂O como el tampón de elución (punta 6). En general, el porcentaje de elución de HSA a partir del material de agarosa de afinidad descrito en el presente documento aumentó con resistencia iónica en disminución del tampón de elución (comparar punta 1, calles 4-5; punta 2, calles 6-7; punta 3, calles 8-9; punta 4, calles 10-11; punta 5, calles 12-13; y punta 6, calles 14-15 de la Figura 4a; véanse también los resultados, como se ilustran en la Figura 4b, en la que el lavado 1 y 2 se combinan y representan mediante sombreado oscuro y claro, respectivamente, en cada una de las calles de PBS a través de H₂O).

D. Efecto de calor sobre la estabilidad de material de agarosa de afinidad para capturar un péptido fundido a HSA en comparación con Mimetic Blue®

25 Se llevó a cabo otro experimento que comparaba el material de agarosa de afinidad con un compuesto de Fórmula I como se ha descrito en el Ejemplo 4 con Mimetic Blue® que se había expuesta al péptido fusionado con HSA descrito anteriormente de modo que se consiguió la capacidad máxima de unión, después de la cual el material de agarosa de afinidad más biomolécula, o mezclas de Mimetic Blue® más biomolécula se calentaron a 95 °C en PBSA (sin detergente) durante 10 min. Después del tratamiento térmico, se eluyó el péptido fusionado con HSA desde la mezcla de agarosa de afinidad/biomolécula o mezcla de Mimetic Blue®/biomolécula y las fracciones "eluidas" se analizaron y etiquetaron como "unidas".

30 Como se observa en la Figura 5, el material de agarosa de afinidad conjugado a un compuesto de Fórmula I como se describe en el Ejemplo 4 parece tener un mecanismo de acción/unión distinto a Mimetic Blue® (comparar unión de afinidad de calle 7 a unión de Mimetic Blue® de calle 10) en que la asociación de la biomolécula al material de agarosa de afinidad es rompible por calor, mientras que la asociación de la biomolécula a Mimetic Blue® no lo es.

35 Cabe destacar que los lisados celulares con adiciones de biomoléculas o las mezclas de biomoléculas en soluciones de tampón como se usa en los Ejemplos de 5A a 5D pueden eluirse con PBS (137 mM de NaCl, KCl 2,7 mM, 10 mM Na₂PO₄, 10 mM KH₂PO₄ a pH 7,4) o tampón RIPA (50 mM Tris, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, 1 % NP40, 0,5 % de NaDeoxicolato. 1 % de SDS a pH 8,0) u otro tampón de baja resistencia iónica. Las biomoléculas pueden eluirse de forma similar a partir del material de agarosa de afinidad mediante el uso de tampón de baja resistencia iónica/bajo en sal y pueden incluir eluirse con agua, como se ilustra en las Figuras 4a y 4b.

40 Extensión de semivida

Ejemplo 6: Los compuestos de Fórmula I, II, III y IV como extensores de la semivida de moléculas terapéuticas

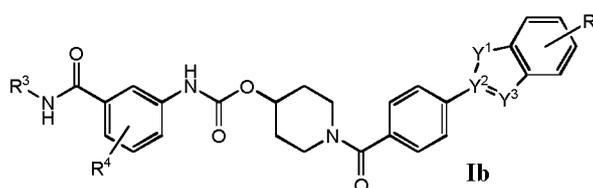
45 Los compuestos de fórmula I, II, III o IV como se ha descrito en el presente documento pueden conjugarse, mediante interacciones covalentes o no covalentes, a agentes terapéuticos, en particular, agentes terapéuticos de molécula pequeña que tienen un resto funcional capaz de conjugarse con compuestos de fórmula I, II, III o IV, incluidos agentes terapéuticos peptídicos o polipeptídicos y agentes terapéuticos de oligonucleótidos.

50 En determinados casos, los compuestos de fórmula I - IV se asocian con una proteína plasmática en la sangre, tal como seroalbúmina humana (HSA) para formar un conjugado de compuesto de afinidad/proteína sérica binario y esta conjugado de compuesto de afinidad/proteína sérica binario interactúa, a continuación, con el agente terapéutico, administrado, por ejemplo, por vía oral o intravenosa, una vez el agente terapéutico entra en la circulación, para formar un complejo ternario, de modo que el complejo ternario resultante actúa para prolongar eficazmente la semivida plasmática del agente terapéutico.

Los casos de la divulgación descritos anteriormente están previstos para ser meramente ejemplares; numerosas modificaciones y variaciones en los mismos serán evidentes para los expertos en la técnica.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula **Ib** como se muestra a continuación,



5 en la que R¹ es H, -Cl, -F, -Br, -I, -OH, -CN, -NO₂, alquilo C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, alqueno C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, cicloalquilo, arilo o heteroarilo sustituido o sin sustituir;

R³ es -[(CH₂)₂E]_n(CH₂)₂NR'R'' y n es cualquier número entero de 0 a 30,

en la que R' y R'' son cada uno independientemente H, alquilo C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, alqueno C₁-C₆ sustituido o sin sustituir o cicloalquilo sustituido o sin sustituir y E es CH₂, O, NH o S, o E está ausente;

10 R⁴ es H, -Cl, -F, -Br, -I, -OH, -CN, -NO₂, alquilo C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, alqueno C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, cicloalquilo, arilo o heteroarilo sustituido o sin sustituir;

Y¹ e Y³ son independientemente C, O, N, NR² o S, en la que R² es H, alquilo C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, alqueno C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, cicloalquilo, arilo o heteroarilo sustituido o sin sustituir; e Y² es C o N; o a una sal del mismo.

2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1

15 en el que

R¹ es H, -Cl, -F, -Br o -I, -OH, -CN, -NO₂, alquilo C₁-C₆ sustituido o sin sustituir;

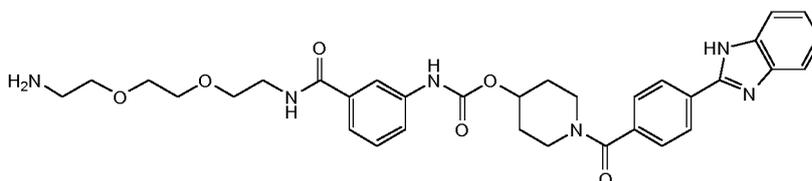
R³ es -[(CH₂)₂E]_n(CH₂)₂NR'R'' y n es cualquier número entero de 0 a 12;

R⁴ es H, -Cl, -F, -Br, -I, -OH, -CN, -NO₂, alquilo C₁-C₆ sustituido o sin sustituir;

20 Y¹ e Y³ son independientemente C, O, N, NR² o S, en la que R² es H, -CH₃, -CH₂CH₃, -CH(CH₃)₂, -CH₂CH(CH₃)₂, -(CH)_nCH₃ en la que n es 1, 2, 3, 4 o 5, o -C(CH₃)₃;

Y³ es C; o a una sal del mismo.

3. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 seleccionado de,



o a una sal del mismo.

25 4. Una composición farmacéutica que comprende un agente terapéutico y un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

5. Una cromatografía de afinidad de fase sólida que comprende un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

30 6. Un procedimiento de purificación de una proteína de interés mediante el uso de un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

Figura 1

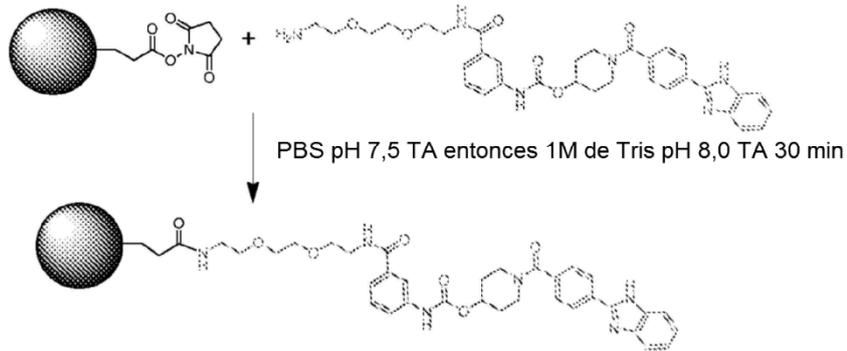


Figura 2

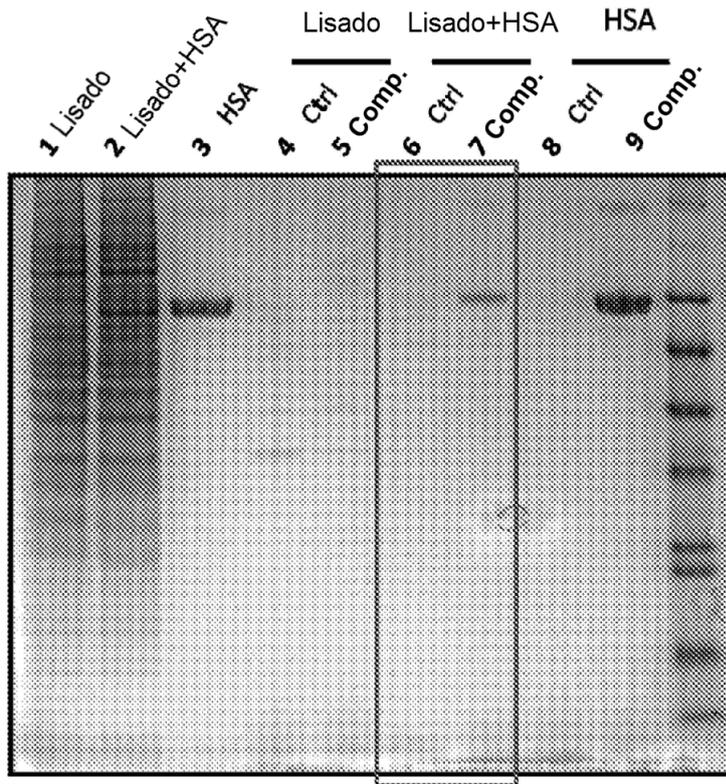


Figura 3

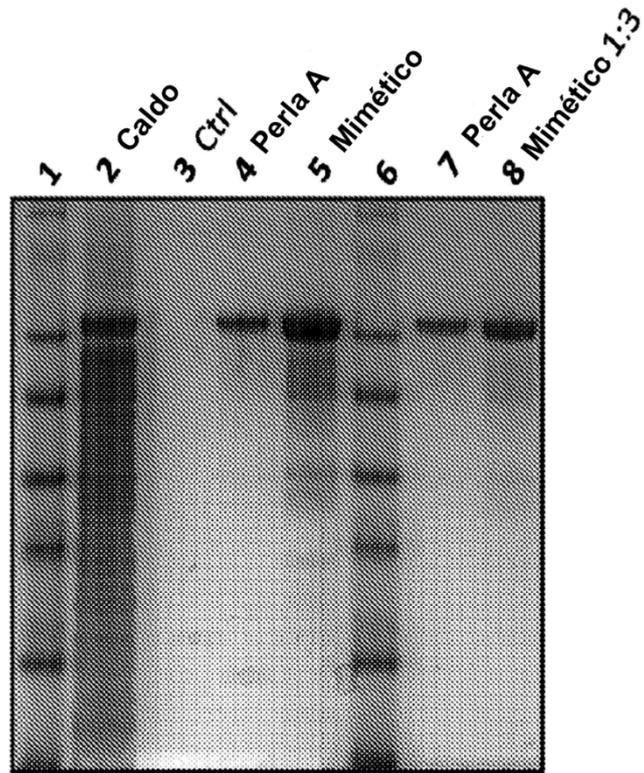


Figura 4a

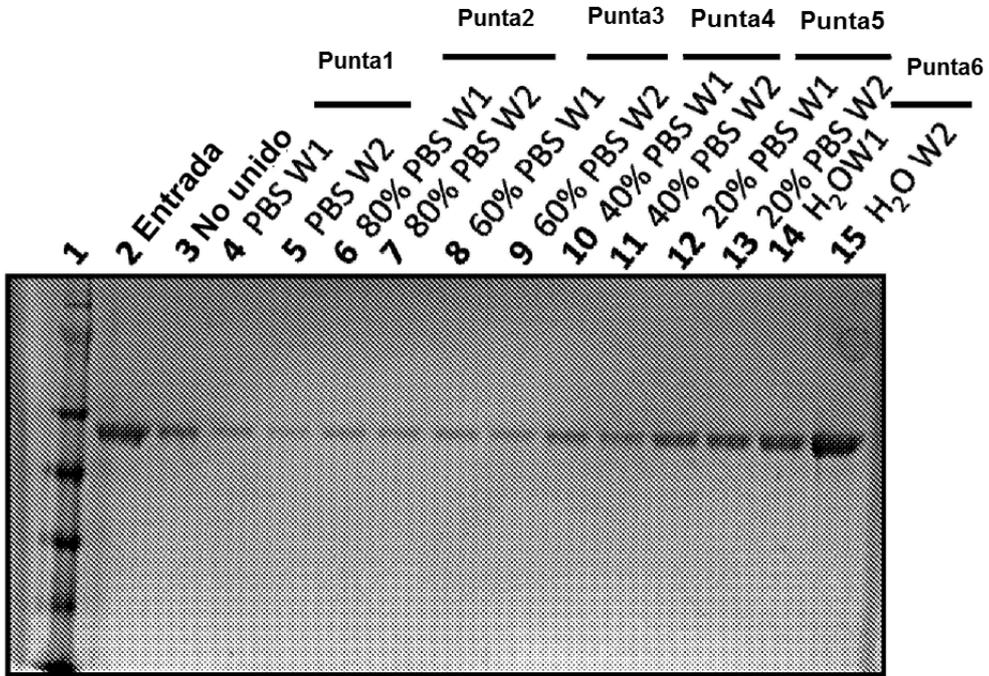


Figura 4b

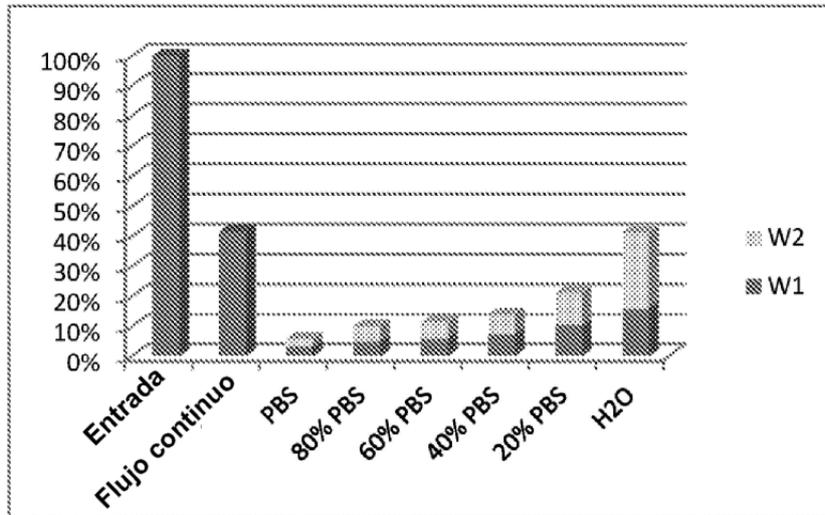


Figura 5

