

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 733 355**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01)
A61K 38/26 (2006.01)
A61K 31/553 (2006.01)
A61K 47/65 (2007.01)
A61K 47/60 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.01.2009 PCT/EP2009/051079**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.08.2009 WO09095479**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.01.2009 E 09706788 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2019 EP 2237799**

54 Título: **Profármaco que comprende un enlazador autoescindible**

30 Prioridad:

01.02.2008 EP 08150973
05.12.2008 EP 08170872

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.11.2019

73 Titular/es:

ASCENDIS PHARMA A/S (100.0%)
Tuborg Boulevard 12
2900 Hellerup, DK

72 Inventor/es:

CLEEMANN, FELIX;
HERSEL, ULRICH;
KADEN, SILVIA;
RAU, HARALD y
WEGGE, THOMAS

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 733 355 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

Profármaco que comprende un enlazador autoescindible

5 La presente invención se refiere a un profármaco o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo que consiste en un conjugado enlazador de fármaco D-L. La invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden dichos profármacos y a estos para uso como medicamentos.

Para potenciar las propiedades fisicoquímicas o farmacocinéticas de un fármaco in vivo, tal fármaco puede conjugarse con un portador.

10 Típicamente, los portadores en el suministro del fármaco se usan bien sea de forma no covalente, con el fármaco formulado fisicoquímicamente en una mezcla de solvente-portador, o mediante la unión covalente de un reactivo portador a uno de los grupos funcionales del fármaco.

15 Sin embargo, la metodología no covalente requiere una encapsulación de fármaco altamente eficiente para evitar la liberación descontrolada, de tipo por explosión del fármaco. La restricción de la difusión de una molécula de fármaco soluble en agua no unida requiere fuertes contactos de van der Waals, a menudo mediado por unidades estructurales hidrófobas. Muchos fármacos conformacionalmente sensibles, tales como las proteínas o los péptidos, se vuelven disfuncionales durante el proceso de encapsulación y/o durante el almacenamiento subsecuente del fármaco encapsulado. Además, tales fármacos que contienen amino experimentan fácilmente reacciones colaterales con productos de degradación del portador (véase, por ejemplo, D.H. Lee et al., J. Contr. Rel., 2003, 92, 291-299). Adicionalmente, la dependencia del mecanismo de liberación del fármaco tras la biodegradación puede causar variabilidad entre pacientes.

20 Alternativamente, los fármacos pueden conjugarse con un portador a través de enlaces covalentes. Esta metodología se aplica a diversas clases de moléculas, desde las llamadas moléculas pequeñas, desde productos naturales hasta proteínas más grandes. Los conjugados portadores de fármacos covalentes se pueden dividir en dos grupos. En primer lugar, los conjugados, donde el enlace covalente entre el portador y el fármaco está presente principalmente durante la acción del fármaco ("enlace covalente permanente"), es decir, un derivado del fármaco presenta sus efectos farmacológicos como es conocido por el fármaco como tal. En segundo lugar, el enlace covalente se escinde previamente en su mayor parte para liberar el fármaco como tal, que puede exhibir sus efectos farmacológicos conocidos. En este último caso, el conjugado portador de fármaco covalente se denomina profármaco enlazado al portador o profármaco portador.

30 Con el fin de asegurar la escisión del enlace covalente entre el portador y el fármaco, se requiere la eliminación fácil de dicho enlace in vivo para liberar el fármaco (activación del profármaco).

La activación del profármaco puede producirse por escisión enzimática o no enzimática del enlace entre el portador y la molécula del fármaco, o una combinación secuencial de ambos, es decir, una etapa enzimática seguida de un reordenamiento no enzimático.

35 La activación del profármaco inducida enzimáticamente se caracteriza porque puede producirse la escisión en un entorno in vitro libre de enzimas, tal como una solución reguladora acuosa, por ejemplo, de un éster o una amida, pero la tasa correspondiente de hidrólisis puede ser demasiado lenta y no terapéuticamente útil. En un entorno in-vivo, las esterasas o amidasas están típicamente presentes y las esterasas y amidasas pueden causar una aceleración catalítica significativa de la cinética de hidrólisis desde dos veces hasta varios órdenes de magnitud. Por lo tanto, la escisión está predominantemente controlada por la reacción enzimática.

40 Un inconveniente importante de la escisión predominantemente enzimática es la variabilidad entre pacientes. Los niveles de enzimas pueden diferir significativamente entre los individuos, lo que da como resultado una variación biológica de la activación del profármaco por la escisión enzimática. Los niveles de enzimas también pueden variar dependiendo del sitio de administración. Por ejemplo, se sabe que en el caso de la inyección subcutánea, ciertas áreas del cuerpo producen efectos terapéuticos más predecibles que otras. Para reducir este efecto impredecible, la escisión no enzimática o catálisis intramolecular es de particular interés.

Por lo tanto, se prefiere la escisión autocatalítica independiente de la enzima del portador y la unidad estructural biológicamente activa. En la mayoría de los casos, esto se logra mediante una unidad estructural enlazadora adecuadamente diseñada entre el portador y la unidad estructural biológicamente activa, que está unida directamente al grupo funcional de una unidad estructural biológicamente activa mediante un enlace covalente.

50 Los tipos de enlazadores específicos son conocidos en la técnica.

55 Y. Sohma et al., J. Med. Chem. 46 (2003), 4124-4135 describen profármacos basados en éster, en los que el portador es soluble en agua y la unidad estructural biológicamente activa se deriva del inhibidor de la proteasa de VIH-1 KNI-727. El enlazador utilizado se une a la unidad estructural biológicamente activa a través del grupo éster. El mecanismo de este sistema profármaco es la activación por ciclización por formación de imida cíclica para la escisión de enlaces éster.

Sin embargo, esto es desventajoso debido a la inestabilidad del grupo funcional éster. Adicionalmente, los grupos éster pueden ser direccionables de forma menos quimioselectiva para la conjugación del portador o enlazador y el fármaco.

5 A. J. Garman et al. (A. J. Garman, S.B. Kalindjan, FEBS Lett. 1987, 223 (2), 361-365, 1987) utilizan anhídrido maleico PEG5000 para la modificación reversible de grupos amino en el activador de plasminógeno de tipo tisular y la uroquinasa. La regeneración de la enzima funcional a partir del conjugado PEG-uPA después de la incubación a pH 7.4 de regulador por escisión del enlace de ácido maléico sigue una cinética de primer orden con una vida media de 6.1 h. Una desventaja del enlace ácido maléico es la falta de estabilidad del conjugado a valores de pH más bajos. Esto limita la aplicabilidad del enlace del ácido maléico a agentes biológicamente activos que son estables a valores de pH básicos (altos), ya que la purificación del conjugado polimérico del agente biológicamente activo se debe realizar bajo condiciones básicas (pH alto) para prevenir la escisión prematura del profármaco.

15 En el documento WO-A 2004/108070 se describe un sistema de profármacos con base en enlazador N,N-bis-(2-hidroxiethyl)glicina amida (bicina). En este sistema, dos moléculas portadoras de PEG están enlazadas a una molécula de bicina acoplada a un grupo amino de la molécula de fármaco. Las dos primeras etapas en la activación del profármaco son la escisión enzimática de los primeros enlaces que conectan ambas moléculas portadoras de PEG con los grupos hidroxilo del grupo activador de la bicina. Se describen diferentes enlaces entre PEG y bicina que dan como resultado diferentes cinéticas de activación de profármacos. La segunda etapa en la activación del profármaco es la escisión del segundo enlace que conecta el grupo activador de la bicina al grupo amino de la molécula de fármaco. La principal desventaja de este sistema es la conexión del polímero al enlazador de bicina que da como resultado una lenta tasa de hidrólisis de este segundo enlace amina de bicina ($t_{1/2} > 3$ h en regulador de fosfato). En consecuencia, la liberación de un profármaco intermedio modificado con bicina puede mostrar diferentes propiedades farmacocinéticas, inmunogénicas, toxicológicas y farmacodinámicas en comparación con la molécula de fármaco nativa original.

Otro sistema basado en bicina se describe en el documento WO-A 2006/136586.

25 Bundgaard et al. (Acta Pharm Nord, 1990, 2, 333-342) divulgan el uso potencial de derivados de ácido ftálmico como formas profármaco para aminas dentro de moléculas de fármaco. Al seguir las conversiones de los derivados del ácido ftálmico, se encontró que la reorganización procedió a través del desplazamiento nucleofílico del grupo bromo, y no produjo la liberación deseada de los compuestos que contienen amina. Estos resultados sugieren que los derivados del ácido ftálmico son químicamente y enzimáticamente demasiado estables para ser considerados como formas de profármacos para las aminas.

35 Gomes et al. (Molecules, 2007, 12, 2484-2506) divulgan diferentes estrategias que se exploraron con el fin de regenerar fármacos originales a partir de profármacos, a través de rutas de activación no enzimáticas y de dos etapas. Se describen estrategias no enzimáticas que incluyen fármacos activos como productos cíclicos obtenidos por el ataque nucleofílico de grupos hidroxilo a las funcionalidades de éster, amida e isocianato. Otras estrategias no enzimáticas comprenden los fármacos activos como los grupos salientes en las reacciones de eliminación por ciclización.

Por consiguiente, existe la necesidad de profármacos enlazados a portadores alternativos, en los que el enlazador permita que una escisión autocatalítica libere un fármaco en una forma no modificada sin que queden residuos procedentes del enlazador.

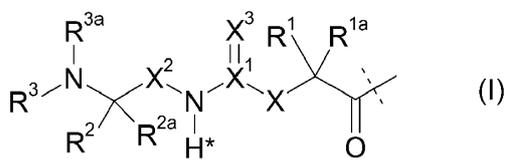
40 Por lo tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar tales conjugados de enlazador de fármaco, donde el enlazador está unido covalentemente a través de un enlace escindible a una unidad estructural biológicamente activa (que representa el fármaco después de la liberación), y donde el enlazador está además unido de manera covalente a través de un enlace permanente a un portador directamente o por medio de un espaciador para formar el profármaco enlazado al portador.

45 Este objetivo se logra mediante un profármaco o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de un fármaco D-H, el profármaco o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo que consiste en un conjugado enlazador de fármaco D-L, en donde

- D es una unidad estructural biológicamente activa que contiene nitrógeno del fármaco D-H; y

- L no muestra los efectos farmacológicos del fármaco D-H y representa una unidad estructural $-L^1-(L^2-Z)_{1-4}$, en donde

50 - L^1 está representado por la fórmula (I),



en donde la línea discontinua indica la unión al nitrógeno de la unidad estructural biológicamente activa a través de la formación de un enlace amida;

X es C(R⁴R^{4a}); N(R⁴); O; C(R⁴R^{4a})-C(R⁵R^{5a}); C(R⁵R^{5a})-C(R⁴R^{4a}); C(R⁴R^{4a})-N(R⁶); N(R⁶)-C(R⁴R^{4a}); C(R⁴R^{4a})-O; o O-C(R⁴R^{4a});

5 X¹ es C; o S(O);

X² es C(R⁷, R^{7a}); o C(R⁷, R^{7a})-C(R⁸, R^{8a});

X³ es O;

R¹, R^{1a}, R², R^{2a}, R³, R^{3a}, R⁴, R^{4a}, R⁵, R^{5a}, R⁶, R⁷, R^{7a}, R⁸, R^{8a} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H; y alquilo C₁₋₄;

10 alternativamente, una o más de las parejas R^{1a}/R^{4a}, R^{1a}/R^{5a}, R^{4a}/R^{5a}, R^{7a}/R^{8a} forman un enlace químico;

alternativamente, una o más de las parejas R¹/R^{1a}, R²/R^{2a}, R⁴/R^{4a}, R⁵/R^{5a}, R⁷/R^{7a}, R⁸/R^{8a} se unen junto con el átomo al que están unidos para formar un cicloalquilo C₃₋₇; o heterociclilo de 4 a 7 miembros;

alternativamente, una o más de las parejas R¹/R⁴, R¹/R⁵, R¹/R⁶, R⁴/R⁵, R⁴/R⁶, R⁷/R⁸, R²/R³ se unen con los átomos a los que están unidas para formar un anillo A;

15 alternativamente, R³/R^{3a} se unen junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos para formar un heterociclo de 4 a 7 miembros;

A se selecciona del grupo que consiste en fenilo; naftilo; indenilo; indanilo; tetralinilo; cicloalquilo C₃₋₁₀; Heterociclilo de 4 a 7 miembros; y heterobicyclilo de 9 a 11 miembros; y

en donde L¹ está opcionalmente sustituido adicionalmente,

20 en donde el uno o más sustituyentes opcionales adicionales se seleccionan independientemente del grupo que consiste en halógeno; CN; COOR⁹; OR⁹; C(O)R⁹; C(O)N(R⁹R^{9a}); S(O)₂N(R⁹R^{9a}); S(O)N(R⁹R^{9a}); S(O)₂R⁹; S(O)R⁹; N(R⁹)S(O)₂N(R^{9a}R^{9b}); SR⁹; N(R⁹R^{9a}); NO₂; OC(O)R⁹; N(R⁹)C(O)R^{9a}; N(R⁹)S(O)₂R^{9a}; N(R⁹)S(O)R^{9a}; N(R⁹)C(O)OR^{9a}; N(R⁹)C(O)N(R^{9a}R^{9b}); OC(O)N(R⁹R^{9a}); T; alquilo C₁₋₅₀; alqueno C₂₋₅₀; y alquino C₂₋₅₀, en donde T; alquilo C₁₋₅₀; alqueno C₂₋₅₀; y alquino C₂₋₅₀ están opcionalmente sustituidos con uno o más R¹⁰, que son el mismo o diferentes y

25 en donde alquilo C₁₋₅₀; alqueno C₂₋₅₀; y alquino C₂₋₅₀ son interrumpidos opcionalmente por uno o más grupos seleccionados del grupo que consiste en T; -C(O)O-; -O-; -C(O)-; -C(O)N(R¹¹)-; -S(O)₂N(R¹¹)-; -S(O)N(R¹¹)-; -S(O)₂-; -S(O)-; -N(R¹¹)S(O)₂N(R^{11a})-; -S-; -N(R¹¹)-; -OC(O)R¹¹; -N(R¹¹)C(O)-; -N(R¹¹)S(O)₂-; -N(R¹¹)S(O)-; -N(R¹¹)C(O)O-; -N(R¹¹)C(O)N(R^{11a})-; y -OC(O)N(R¹¹R^{11a}), en donde

30 R⁹, R^{9a}, R^{9b} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H; T; alquilo C₁₋₅₀; alqueno C₂₋₅₀; y alquino C₂₋₅₀, en donde T; alquilo C₁₋₅₀; alqueno C₂₋₅₀; y alquino C₂₋₅₀ están opcionalmente sustituidos con uno o más R¹⁰, que son el mismo o diferentes y en donde alquilo C₁₋₅₀; alqueno C₂₋₅₀; y alquino C₂₋₅₀ son interrumpidos opcionalmente por uno o más grupos seleccionados del grupo que consiste en T; -C(O)O-; -O-; -C(O)-; -C(O)N(R¹¹)-; -S(O)₂N(R¹¹)-; -S(O)N(R¹¹)-; -S(O)₂-; -S(O)-; -N(R¹¹)S(O)₂N(R^{11a})-; -S-; -OC(O)R¹¹; -N(R¹¹)C(O)-; -N(R¹¹)S(O)₂-; -N(R¹¹)S(O)-; -N(R¹¹)C(O)O-; -N(R¹¹)C(O)N(R^{11a})-; y -OC(O)N(R¹¹R^{11a});

35 T es fenilo; naftilo; indenilo; indanilo; tetralinilo; C₃₋₁₀cycloalkyl; heterociclilo de 4 a 7 miembros; o heterobicyclilo de 9 a 11 miembros, en donde T está opcionalmente sustituido con uno o más R¹⁰, que son el mismo o diferentes;

R¹⁰ es halógeno; CN; oxo (=O); COOR¹²; OR¹²; C(O)R¹²; C(O)N(R¹²R^{12a}); S(O)₂N(R¹²R^{12a}); S(O)N(R¹²R^{12a}); S(O)₂R¹²; S(O)R¹²; N(R¹²)S(O)₂N(R^{12a}R^{12b}); SR¹²; N(R¹²R^{12a}); NO₂; OC(O)R¹²; N(R¹²)C(O)R^{12a}; N(R¹²)S(O)₂R^{12a}; N(R¹²)S(O)R^{12a}; N(R¹²)C(O)OR^{12a}; N(R¹²)C(O)N(R^{12a}R^{12b}); OC(O)N(R¹²R^{12a}); o alquilo C₁₋₆, en donde alquilo C₁₋₆ está opcionalmente sustituido con uno o más halógeno, que son el mismo o diferentes;

40 R¹¹, R^{11a}, R¹², R^{12a}, R^{12b} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H; y alquilo C₁₋₆, en donde alquilo C₁₋₆ está opcionalmente sustituido con uno o más halógeno, que son el mismo o diferentes;

Con la condición de que el hidrógeno marcado con el asterisco en la fórmula (I) no sea reemplazado por L²-Z o un sustituyente de uno o más sustituyentes opcionales,

45 L² es un enlace químico simple o un espaciador; y

Z es un grupo portador, en donde el grupo portador es un polímero de al menos 500 Da o un grupo alquilo C₃₋₁₈.

Se descubrió sorprendentemente que el alcance de la activación por ciclización mediante la formación de imida cíclica se puede extender desde éster hasta incluso profármacos de amida enlazados al portador, a pesar de la estabilidad mucho mayor del enlace amida bajo condiciones acuosas. Se observó que las N,N'-biscarboxamidas enlazadas a una unidad estructural portadora de nucleófilos a través de un enlace amida y a la molécula de fármaco a través del

50

segundo enlace amida exhiben autohidrólisis en un rango que es útil para aplicaciones de profármacos. Además, se descubrió que se pueden diseñar enlazadores que incluyan un portador unido permanentemente al motivo N,N'biscarboxamida de tal manera que la formación de imida cíclica pueda emplearse como un principio de autoactivación en el diseño de profármacos amida enlazados al portador.

5 Ejemplos de tales productos de escisión cíclica preferidos son estructuras de anillo de succinimida o glutarimida sustituidas. El prerrequisito para tal activación de la ciclización es la presencia de un nucleófilo que contiene amina en la estructura del enlazador y otra unión amida que no es el enlace profármaco amida sino una unión amida sustituida con un átomo de hidrógeno.

10 En el caso de la escisión del profármaco activado con succinimida o glutarimida, el nucleófilo que contiene amina sirve como un grupo vecino para mejorar la nucleofilicidad del nitrógeno contenido en el enlace amida permanente que a su vez ataca al grupo carbonilo amida del profármaco y, consecuentemente induce acilación intramolecular de la unión amida permanente que genera el anillo imida cíclico.

15 Por lo tanto, las estructuras enlazadoras preferidas comprenden un enlace permanente a un portador, un nucleófilo que contiene amina y un enlace amida permanente con un hidrógeno unido al nitrógeno del enlace amida. Los profármacos enlazados al portador correspondientes comprenden un enlazador que contiene un enlace permanente a un portador, un nucleófilo que contiene una amina y dicho enlace amida permanente, y una unidad estructural biológicamente activa que contiene nitrógeno derivado del fármaco conjugado al enlazador por medio de un enlace amida escindible.

20 La figura 1 muestra un ejemplo de la escisión que da como resultado una imida cíclica. El nitrógeno de la unidad estructural biológicamente activa se muestra como hidrógeno que contiene amina, lo que da como resultado un fármaco que tiene un grupo funcional amina primario. Sin embargo, también, por ejemplo, una amina secundaria puede ser parte del fármaco. Por razones de simplificación, no se muestran de uno a cuatro sustituyentes obligatorios L²-Z, incluido el portador.

25 Las propiedades preferidas del profármaco están dadas por una vida media de hidrólisis en regulador acuoso a pH 7.4 y 37°C entre 1 h y 3 meses; tasas similares de hidrólisis bajo condiciones fisiológicas en regulador y plasma.

El profármaco de acuerdo con la presente invención puede mostrar una excelente correlación in vivo/in vitro de la escisión del enlazador, un alto grado de independencia de la enzima y puede almacenarse a un pH más bajo (escisión dependiente del pH).

En el sentido de la presente invención, los términos se usan como sigue.

30 La "unidad estructural D biológicamente activa" se refiere a la parte del conjugado enlazador de fármaco, que se produce después de la escisión en un fármaco D-H de actividad biológica conocida.

"Enlazador no activo" significa un enlazador que no muestra los efectos farmacológicos del fármaco derivado del agente biológicamente activo.

35 "Alquilo" significa una cadena de carbono de cadena lineal o ramificada. Cada hidrógeno de un carbono de alquilo puede ser reemplazado por un sustituyente.

40 "Alquilo C₁₋₄" significa una cadena de alquilo que tiene de 1 a 4 átomos de carbono, por ejemplo si está presente en el extremo de una molécula: metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, tert-butilo, o por ejemplo -CH₂-, -CH₂-CH₂-, -CH(CH₃)-, -CH₂-CH₂-CH₂-, -CH(C₂H₅)-, -C(CH₃)₂-, cuando dos unidades estructurales de una molécula están enlazadas por el grupo alquilo. Cada hidrógeno de un carbono de alquilo C₁₋₄ puede ser reemplazado por un sustituyente.

45 "Alquilo C₁₋₆" significa una cadena de alquilo que tiene 1-6 átomos de carbono, por ejemplo si está presente en el extremo de una molécula: alquilo C₁₋₄, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, tert-butilo, n-pentilo, n-hexilo, o por ejemplo -CH₂-, -CH₂-CH₂-, -CH(CH₃)-, -CH₂-CH₂-CH₂-, -CH(C₂H₅)-, -C(CH₃)₂-, cuando dos unidades estructurales de una molécula están enlazadas por el grupo alquilo. Cada hidrógeno de un carbono de alquilo C₁₋₆ puede ser reemplazado por un sustituyente.

Por consiguiente, "alquilo C₁₋₁₈" significa una cadena de alquilo que tiene de 1 a 18 átomos de carbono y "alquilo C₈₋₁₈" significa una cadena de alquilo que tiene de 8 a 18 átomos de carbono. Por consiguiente, "alquilo C₁₋₅₀" significa una cadena de alquilo que tiene de 1 a 50 átomos de carbono.

50 "Alquenilo C₂₋₅₀" significa una cadena de alquenilo ramificada o no ramificada que tiene de 2 a 50 átomos de carbono, por ejemplo si está presente al final de una molécula: -CH=CH₂, -CH=CH-CH₃, -CH₂-CH=CH₂, -CH=CH-CH₂-CH₃, -CH=CH-CH=CH₂, o por ejemplo -CH=CH-, o por ejemplo. -CH=CH-, cuando dos unidades estructurales de una molécula están enlazadas por el grupo alquenilo. Cada hidrógeno de un carbono de alquenilo C₂₋₅₀ puede reemplazarse por un sustituyente como se especifica más adelante. Por consiguiente, el término "alquenilo" se refiere

a una cadena de carbono con al menos un doble enlace carbono-carbono. Opcionalmente, pueden presentarse uno o más enlaces triples.

5 "Alquinilo C₂₋₅₀" significa una cadena de alquinilo ramificada o no ramificada que tiene de 2 a 50 átomos de carbono, por ejemplo si está presente al final de una molécula: -C≡CH, -CH₂-C≡CH, CH₂-CH₂-C≡CH, CH₂-C≡C-CH₃, o por ejemplo -C≡C- cuando dos unidades estructurales de una molécula están enlazados por el grupo alquinilo. Cada hidrógeno de un carbono de alquinilo C₂₋₅₀ puede reemplazarse por un sustituyente como se especifica además. Por consiguiente, el término "alquinilo" se refiere a una cadena de carbono con al menos un triple enlace carbono-carbono. Opcionalmente, pueden aparecer uno o más enlaces dobles.

10 "Cicloalquilo C₃₋₇" o "Anillo cicloalquilo C₃₋₇" significa una cadena de alquilo cíclica que tiene de 3 a 7 átomos de carbono, que puede tener dobles enlaces carbono-carbono que están al menos parcialmente saturados, por ejemplo, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, ciclohexenilo, cicloheptilo. Cada hidrógeno de un carbono cicloalquilo puede ser reemplazado por un sustituyente. El término "cicloalquilo C₃₋₇" o "anillo cicloalquilo C₃₋₇" también incluye biciclo puenteados como norbonano o norboneno. Por consiguiente, "cicloalquilo C₃₋₅" significa un cicloalquilo que tiene de 3 a 5 átomos de carbono.

15 Por consiguiente, "cicloalquilo C₃₋₁₀" significa un alquilo cíclico que tiene 3 a 10 átomos de carbono, por ejemplo cicloalquilo C₃₋₇, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, ciclohexenilo, cicloheptilo, ciclooctilo, ciclonoñilo, ciclodecilo. El término "cicloalquilo C₃₋₁₀" también incluye carbomono y biciclos al menos parcialmente saturados.

"Halógeno" significa flúor, cloro, bromo o yodo. Generalmente se prefiere que el halógeno sea flúor o cloro.

20 "Heterociclilo de 4 a 7 miembros" o "heterociclo de 4 a 7 miembros" significa un anillo con 4, 5, 6 o 7 átomos en el anillo que pueden contener hasta el número máximo de dobles enlaces (anillo aromático o no aromático que está completamente, parcialmente o sin saturar) en donde al menos un átomo del anillo hasta 4 átomos del anillo se reemplaza por un heteroátomo seleccionado del grupo que consiste en azufre (incluyendo -S(O)-, -S(O)₂-), oxígeno y nitrógeno (incluido =N(O)-) y en el que el anillo está enlazado al resto de la molécula a través de un átomo de carbono o nitrógeno. Los ejemplos para un heterociclo de 4 a 7 miembros son azetidina, oxetano, tietano, furano, tiofeno, pirrol, pirrolina, imidazol, imidazolina, pirazol, pirazolina, oxazol, oxazolina, isoxazol, isoxazolina, tiazol, tiazolina, isotiazol, isotiazolina, tiadiazol, tiadiazolina, tetrahidrofurano, tetrahidrotiofeno, pirrolidina, imidazolidina, pirazolidina, oxazolidina, isoxazolidina, tiazolidina, isotiazolidina, tiadiazolidina, sulfolano, pirano, dihidropirano, tetrahidropirano, piridina, piridazina, pirazina, pirimidina, piperazina, piperidina, morfolina, tetrazol, triazol, triazolidina, tetrazolidina, diazepano, azequina u homopiperazina.

30 "Heterobiciclilo de 9 a 11 miembros" o "heterobiclo de 9 a 11 miembros" significa un sistema heterocíclico de dos anillos con 9 a 11 átomos en el anillo, donde al menos un átomo del anillo es compartido por ambos anillos y que puede contener hasta el número máximo de dobles enlaces (anillo aromático o no aromático que está total, parcialmente o no saturado) en el que al menos un átomo del anillo hasta 6 átomos del anillo se reemplazan por un heteroátomo seleccionado del grupo que consiste en azufre (incluido -S(O)-, -S(O)₂-), oxígeno y nitrógeno (incluido =N(O)-) y en el que el anillo está enlazado al resto de la molécula a través de un átomo de carbono o nitrógeno. Ejemplos para un heterobiciclo de 9 a 11 miembros son indol, indolina, benzofurano, benzotiofeno, benzoxazol, bencisoxazol, benzotiazol, bencisotiazol, bencimidazol, bencimidazolina, quinolina, quinazolina, dihidroquinazolina, dihidroquinolina, tetrahidroquinolina, decahidroquinolina, isoquinolina, decahidroisoquinolina, tetrahidroisoquinolina, dihidroisoquinolina, benzazepina, purina o pteridina. El término heterobiciclo de 9 a 11 miembros también incluye estructuras espiro de dos anillos como 1,4-dioxa-8-azaspiro [4.5] decano o heterociclos de puente como 8-aza-biciclo [3.2.1] octano.

45 En el caso de que los compuestos de acuerdo con la fórmula (I) contienen uno o más grupos ácidos o básicos, la invención también comprende sus correspondientes sales farmacéuticamente o toxicológicamente aceptables, en particular sus sales farmacéuticamente utilizables. Por lo tanto, los compuestos de fórmula (I) que contienen grupos ácidos se pueden usar de acuerdo con la invención, por ejemplo, como sales de metales alcalinos, sales de metales alcalinotérreos o como sales de amonio. Ejemplos más precisos de tales sales incluyen sales de sodio, sales de potasio, sales de calcio, sales de magnesio o sales con amoníaco o aminas orgánicas tales como, por ejemplo, etilamina, etanolamina, trietanolamina o aminoácidos. Los compuestos de fórmula (I) que contienen uno o más grupos básicos, es decir, grupos que pueden estar protonados, pueden estar presentes y pueden usarse de acuerdo con la invención en forma de sus sales de adición con ácidos inorgánicos u orgánicos. Ejemplos de ácidos adecuados incluyen cloruro de hidrógeno, bromuro de hidrógeno, ácido fosfórico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido metanosulfónico, ácido p-toluensulfónico, ácidos naftalenodisulfónicos, ácido oxálico, ácido acético, ácido tartárico, ácido láctico, ácido salicílico, ácido benzoico, ácido fórmico, ácido propiónico, ácido pivalico, ácido dietiláctico, ácido malónico, ácido succínico, ácido pimélico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido málico, ácido sulfaminico, ácido fenilpropiónico, ácido glucónico, ácido ascórbico, ácido isonicotínico, ácido cítrico, ácido adípico, y otros ácidos conocidos por los expertos en la técnica. Si los compuestos de fórmula (I) contienen simultáneamente grupos ácidos y básicos en la molécula, la invención también incluye, además de las formas de sal mencionadas, sales internas o betaínas (zwitteriones). Las sales respectivas de acuerdo con la fórmula (I) se pueden obtener por métodos habituales que son conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, poniéndolos en contacto con un ácido o base orgánico o inorgánico en un disolvente o dispersante, o por Intercambio aniónico o intercambio catiónico con otras sales. La

presente invención también incluye todas las sales de los compuestos de fórmula (I) que, debido a su baja compatibilidad fisiológica, no son directamente adecuadas para su uso en productos farmacéuticos, pero pueden usarse, por ejemplo, como intermedios para reacciones químicas o para la preparación de sales farmacéuticamente aceptables.

- 5 El término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora como la EMEA (Europa) y/o la FDA (EE. UU.) y/o cualquier otra agencia reguladora nacional para uso en animales, preferiblemente en humanos.

- 10 "Composición farmacéutica" significa uno o más ingredientes activos y uno o más ingredientes inertes, así como cualquier producto que resulte, directa o indirectamente, de la combinación, complejación o agregación de cualquiera de los dos o más de los ingredientes, o de la disociación de uno o más de los ingredientes, o de otros tipos de reacciones o interacciones de uno o más de los ingredientes. Por consiguiente, las composiciones farmacéuticas de la presente invención abarcan cualquier composición fabricada mezclando un compuesto de la presente invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable (portador farmacéuticamente aceptable).

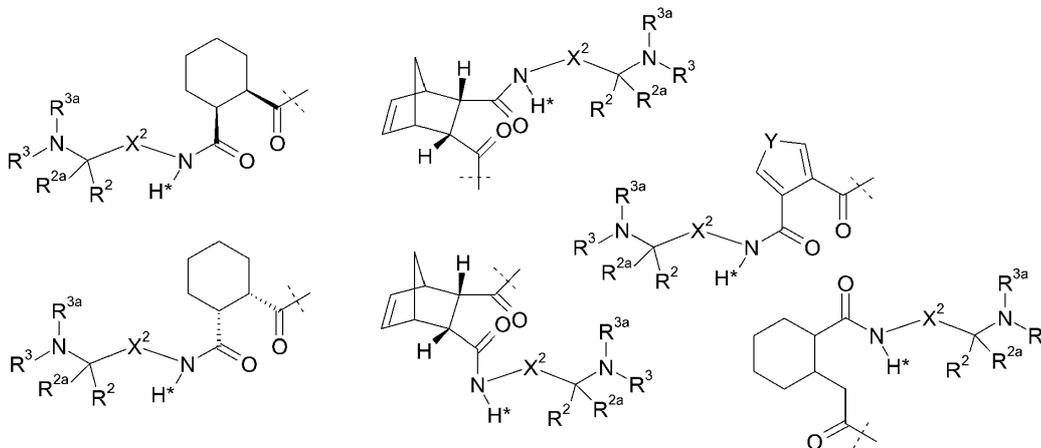
- 15 El término "excipiente" se refiere a un diluyente, adyuvante o vehículo con el que se administra el agente terapéutico. Tales excipientes farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluidos los derivados del petróleo, animales, vegetales o sintéticos, incluidos el aceite de cacahuete, el aceite de soja, el aceite mineral y el aceite de sésamo. El agua es un excipiente preferido cuando la composición farmacéutica se administra por vía oral. La solución salina y la dextrosa acuosa son excipientes preferidos cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. Las soluciones salinas y las soluciones acuosas de dextrosa y glicerol se emplean preferiblemente como excipientes líquidos para soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, sílica gel, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche descremada, glicerol, propileno, glicol, agua y etanol. La composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes reguladores del pH. Estas composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, tabletas, píldoras, cápsulas, polvos y formulaciones de liberación sostenida. La composición se puede formular como un supositorio, con aglutinantes y excipientes tradicionales, tales como los triglicéridos. La formulación oral puede incluir excipientes estándar tales como grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, celulosa, carbonato de magnesio, etc. Ejemplos de excipientes farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E.W. Martin. Tales composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente efectiva del agente terapéutico, preferiblemente en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de excipiente para proporcionar la forma de administración adecuada al paciente. La formulación debe adecuarse al modo de administración.

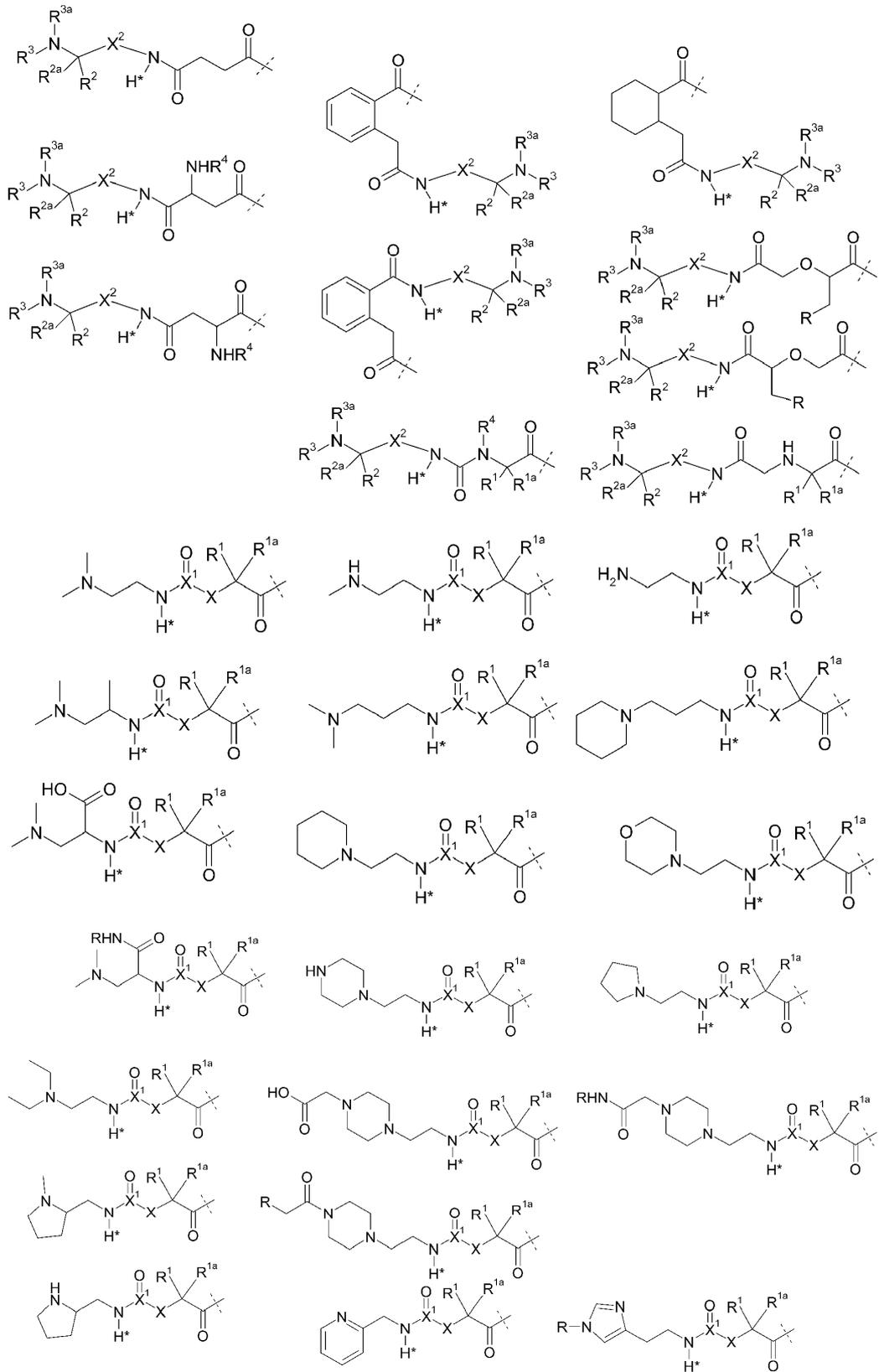
Opcionalmente, R⁴/R⁶ se unen junto con los átomos a los que están unidos para formar un heterociclilo saturado de 4 a 7 miembros.

Preferiblemente, X es N(R⁴), y X¹ es C.

- 35 Preferiblemente, X² es C(R⁷R^{7a}).

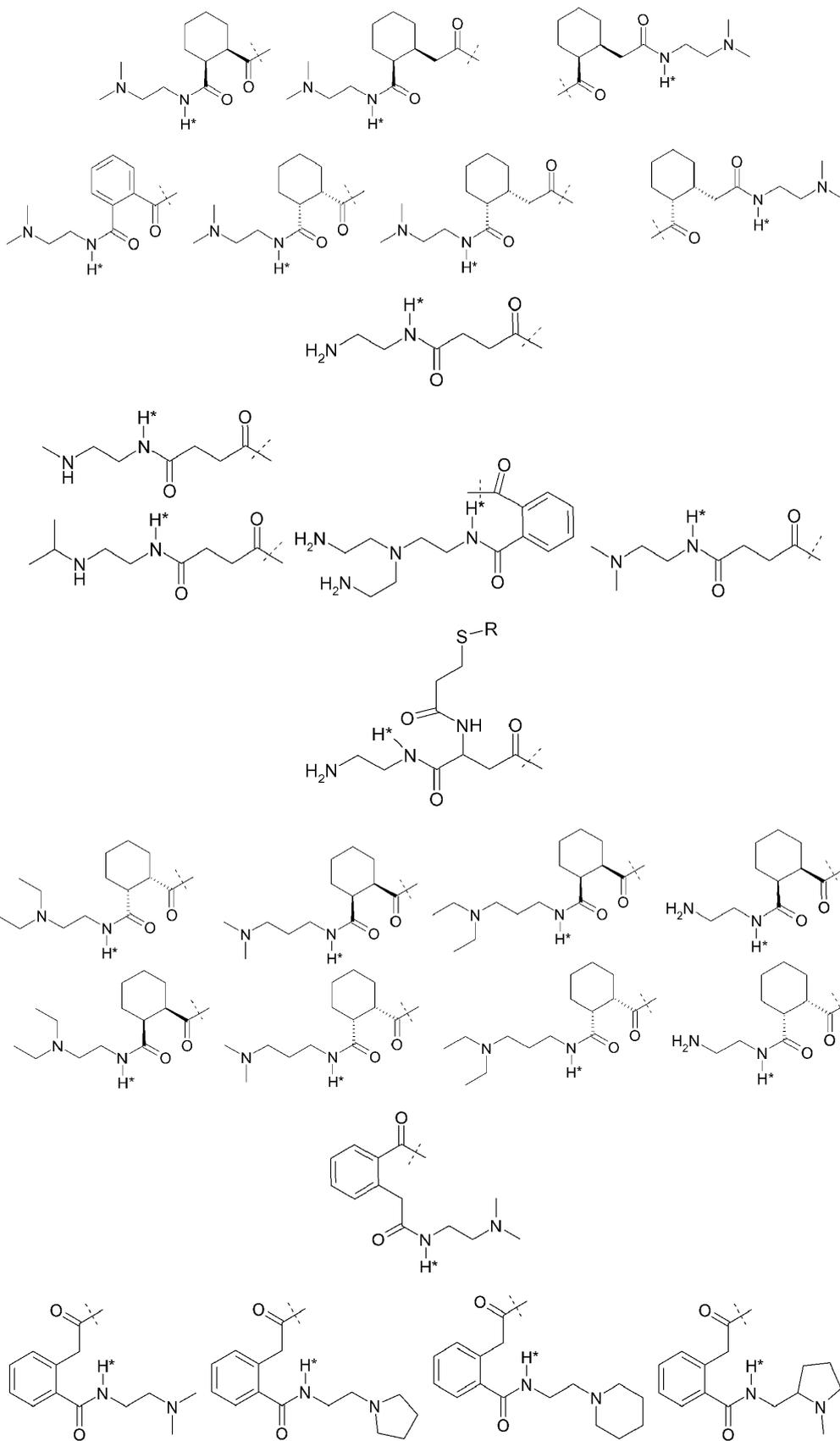
Preferiblemente, L¹ se selecciona del grupo que consiste en

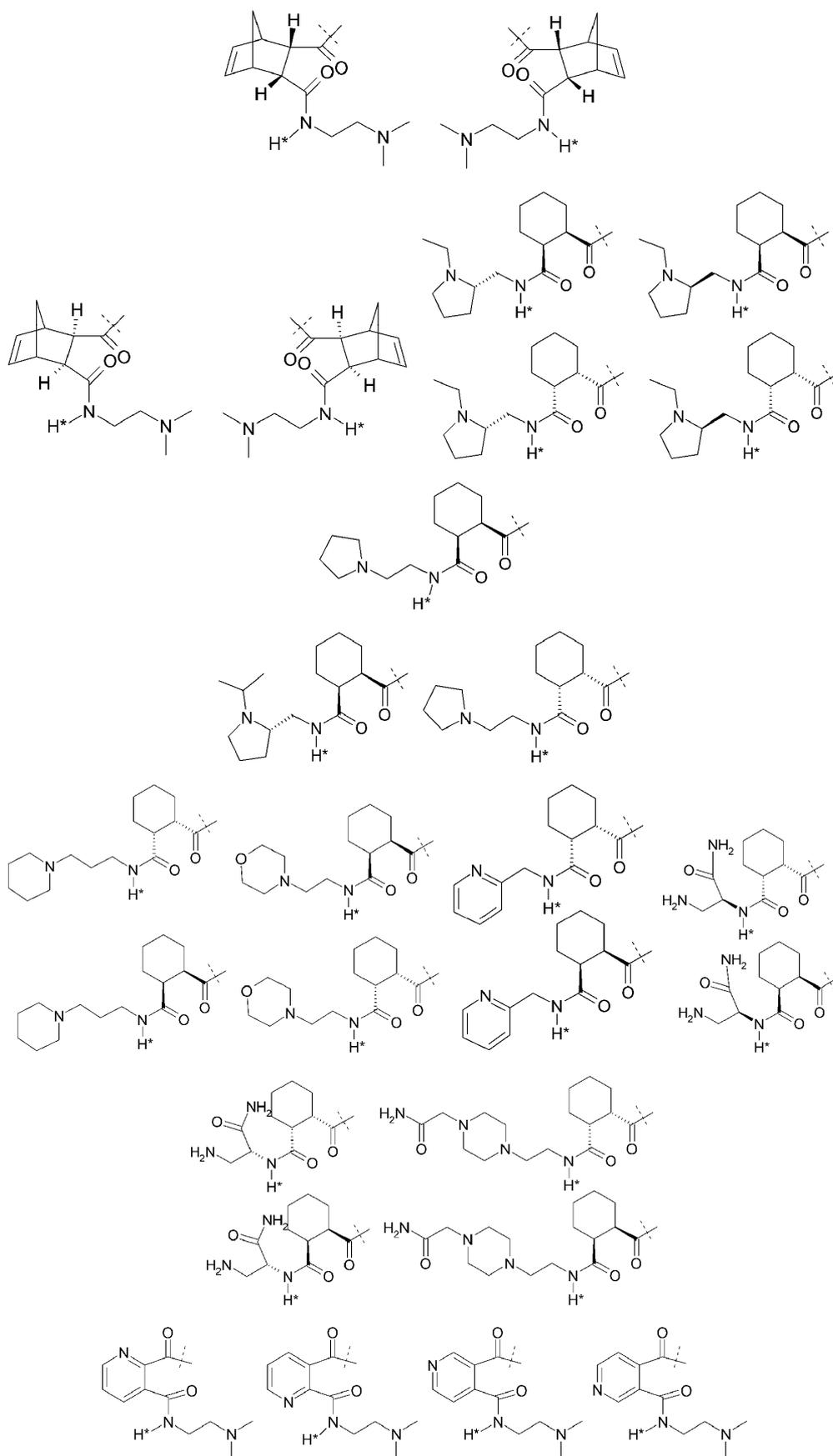


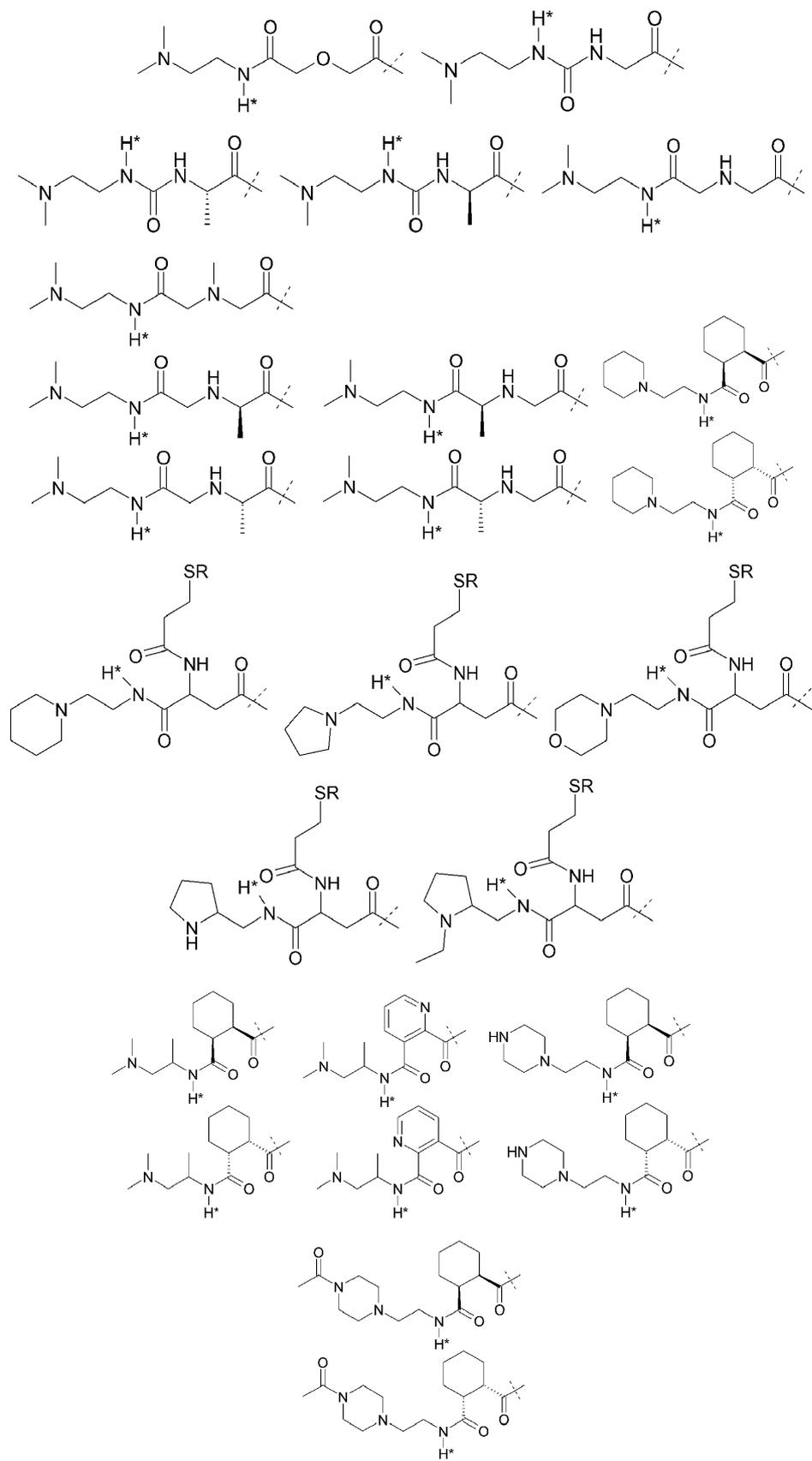


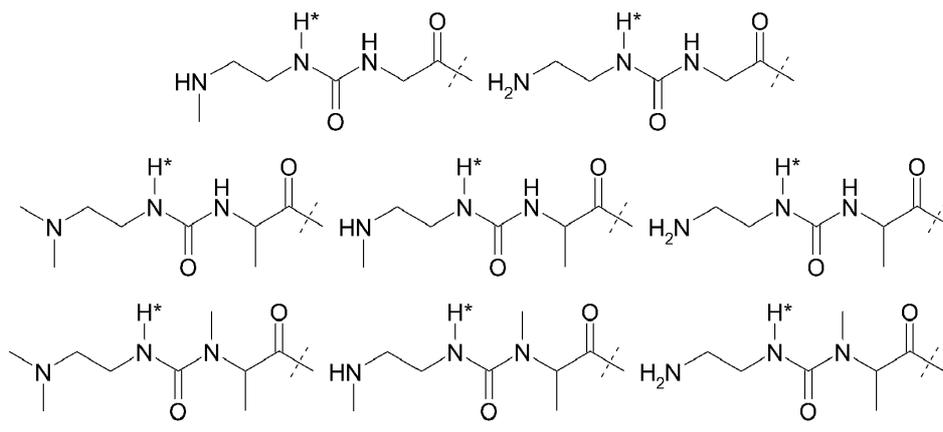
en donde R es H; o alquilo C₁₋₄; Y es NH; O; o S; y R¹, R^{1a}, R², R^{2a}, R³, R^{3a}, R⁴, X, X¹, X² tienen el significado indicado arriba.

Incluso más preferido, L¹ se selecciona del grupo que consiste en









en donde R tiene el significado como es indicado anteriormente.

- 5 Al menos un (hasta cuatro) hidrógeno es reemplazado por un grupo L²-Z. En caso de que más de un grupo L²-Z esté presente, cada L² y cada Z pueden seleccionarse independientemente. Preferiblemente, solo está presente un grupo L²-Z dando como resultado la fórmula D-L¹-L²-Z.

- 10 En general, L² se puede unir a L¹ en cualquier posición aparte de la sustitución del hidrógeno marcado con un asterisco en la fórmula (I). Preferiblemente, de uno a cuatro del hidrógeno dado por R, R¹ a R⁸ directamente o como hidrógeno del alquilo C₁₋₄ u otros grupos y anillos dados por la definición de R y R¹ a R⁸ se reemplazan por L²-Z.

Adicionalmente, L¹ puede estar opcionalmente sustituido adicionalmente. En general, cualquier sustituyente se puede usar en la medida en que el principio de escisión no se vea afectado.

- 15 El uno o más sustituyentes opcionales adicionales se seleccionan independientemente del grupo que consiste en halógeno; CN; COOR⁹; OR⁹; C(O)R⁹; C(O)N(R⁹R^{9a}); S(O)₂N(R⁹R^{9a}); S(O)N(R⁹R^{9a}); S(O)₂R⁹; S(O)R⁹; N(R⁹)S(O)₂N(R^{9a}R^{9b}); SR⁹; N(R⁹R^{9a}); NO₂; OC(O)R⁹; N(R⁹)C(O)R^{9a}; N(R⁹)S(O)₂R^{9a}; N(R⁹)S(O)R^{9a}; N(R⁹)C(O)OR^{9a}; N(R⁹)C(O)N(R^{9a}R^{9b}); OC(O)N(R⁹R^{9a}); T; alquilo C₁₋₅₀; alqueno C₂₋₅₀; y alquino C₂₋₅₀, en donde T; alquilo C₁₋₅₀; alqueno C₂₋₅₀; y alquino C₂₋₅₀ están opcionalmente sustituidos con uno o más R¹⁰, que son el mismo o diferentes y en los que alquilo C₁₋₅₀; alqueno C₂₋₅₀; y alquino C₂₋₅₀ están opcionalmente interrumpidos por uno o más grupos seleccionados del grupo que consiste en T, -C(O)O-; -O-; -C(O)-; -C(O)N(R¹¹)-; -S(O)₂N(R¹¹)-; -S(O)N(R¹¹)-; -S(O)₂-; -S(O)-; -N(R¹¹)S(O)₂N(R^{11a})-; -S-; -N(R¹¹)-; -OC(O)R¹¹; -N(R¹¹)C(O)-; -N(R¹¹)S(O)₂-; -N(R¹¹)S(O)-; -N(R¹¹)C(O)O-; -N(R¹¹)C(O)N(R^{11a})-; y -OC(O)N(R¹¹R^{11a});
- 20

- 25 R⁹, R^{9a}, R^{9b} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H; T; alquilo C₁₋₅₀; alqueno C₂₋₅₀; y alquino C₂₋₅₀, en donde T; alquilo C₁₋₅₀; alqueno C₂₋₅₀; y alquino C₂₋₅₀ están opcionalmente sustituidos con uno o más R¹⁰, que son iguales o diferentes y en los que alquilo C₁₋₅₀; alqueno C₂₋₅₀; y alquino C₂₋₅₀ están opcionalmente interrumpidos por uno o más grupos seleccionados del grupo que consiste en T, -C(O)O-; -O-; -C(O)-; -C(O)N(R¹¹)-; -S(O)₂N(R¹¹)-; -S(O)N(R¹¹)-; -S(O)₂-; -S(O)-; -N(R¹¹)S(O)₂N(R^{11a})-; -S-; -N(R¹¹)-; -OC(O)R¹¹; -N(R¹¹)C(O)-; -N(R¹¹)S(O)₂-; -N(R¹¹)S(O)-; -N(R¹¹)C(O)O-; -N(R¹¹)C(O)N(R^{11a})-; y -OC(O)N(R¹¹R^{11a});

T es fenilo; naftilo; indenilo; indanilo; tetralinilo; cicloalquilo C₃₋₁₀; Heterociclilo de 4 a 7 miembros; o heterobicyclilo de 9 a 11 miembros, en donde T está opcionalmente sustituido con uno o más R¹⁰, que son el mismo o diferentes;

- 30 R¹⁰ es halógeno; CN; oxo (=O); COOR¹²; OR¹²; C(O)R¹²; C(O)N(R¹²R^{12a}); S(O)₂N(R¹²R^{12a}); S(O)N(R¹²R^{12a}); S(O)₂R¹²; S(O)R¹²; N(R¹²)S(O)₂N(R^{12a}R^{12b}); SR¹²; N(R¹²R^{12a}); NO₂; OC(O)R¹²; N(R¹²)C(O)R^{12a}; N(R¹²)S(O)₂R^{12a}; N(R¹²)S(O)R^{12a}; N(R¹²)C(O)OR^{12a}; N(R¹²)C(O)N(R^{12a}R^{12b}); OC(O)N(R¹²R^{12a}); o alquilo C₁₋₆, en donde el alquilo C₁₋₆ está opcionalmente sustituido con uno o más halógenos, que son iguales o diferentes;

- 35 R¹¹, R^{11a}, R¹², R^{12a}, R^{12b} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H; y alquilo C₁₋₆, en donde el alquilo C₁₋₆ está opcionalmente sustituido con uno o más halógenos, que son iguales o diferentes.

El término "interrumpido" significa que entre dos carbonos se inserta un grupo o al final de la cadena de carbono entre el carbono y el hidrógeno.

L² es un enlace químico simple o un espaciador. En el caso de que L² sea un espaciador, se define preferiblemente como uno o más sustituyentes opcionales definidos anteriormente, siempre que L² esté sustituido con Z.

- 40 Por consiguiente, cuando L² es diferente a un enlace químico simple, L²-Z es COOR⁹; OR⁹; C(O)R⁹; C(O)N(R⁹R^{9a}); S(O)₂N(R⁹R^{9a}); S(O)N(R⁹R^{9a}); S(O)₂R⁹; S(O)R⁹; N(R⁹)S(O)₂N(R^{9a}R^{9b}); SR⁹; N(R⁹R^{9a}); OC(O)R⁹; N(R⁹)C(O)R^{9a}; N(R⁹)S(O)₂R^{9a}; N(R⁹)S(O)R^{9a}; N(R⁹)C(O)OR^{9a}; N(R⁹)C(O)N(R^{9a}R^{9b}); OC(O)N(R⁹R^{9a}); T; alquilo C₁₋₅₀; alqueno C₂₋₅₀; o alquino C₂₋₅₀, en donde T; alquilo C₁₋₅₀; alqueno C₂₋₅₀; y alquino C₂₋₅₀ están opcionalmente sustituidos con uno o más R¹⁰, que son el mismo o diferentes y en los que alquilo C₁₋₅₀; alqueno C₂₋₅₀; y alquino C₂₋₅₀ están opcionalmente

interrumpidos por uno o más grupos seleccionados del grupo que consiste en -T-, -C(O)O-; -O-; -C(O)-; -C(O)N(R^{11'})-; -S(O)₂N(R^{11'})-; -S(O)N(R^{11'})-; -S(O)₂-; -S(O)-; -N(R^{11'})S(O)₂N(R^{11a'})-; -S-; -N(R^{11'})-; -OC(O)R^{11'}; -N(R^{11'})C(O)-; -N(R^{11'})S(O)₂-; -N(R^{11'})S(O)-; -N(R^{11'})C(O)O-; -N(R^{11'})C(O)N(R^{11a'})-; y -OC(O)N(R^{11'}R^{11a'})-;

- 5 R^{9'}, R^{9a'}, R^{9b'} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H; Z; T; alquilo C₁₋₅₀; alqueno C₂₋₅₀; y alquino C₂₋₅₀, en donde T; alquilo C₁₋₅₀; alqueno C₂₋₅₀; y alquino C₂₋₅₀ están opcionalmente sustituidos con uno o más R^{10'}, que son el mismo o diferentes y en los que alquilo C₁₋₅₀; alqueno C₂₋₅₀; y alquino C₂₋₅₀ están opcionalmente interrumpidos por uno o más grupos seleccionados del grupo que consiste en T, -C(O)O-; -O-; -C(O)-; -C(O)N(R^{11'})-; -S(O)₂N(R^{11'})-; -S(O)N(R^{11'})-; -S(O)₂-; -S(O)-; -N(R^{11'})S(O)₂N(R^{11a'})-; -S-; -N(R^{11'})-; -OC(O)R^{11'}; -N(R^{11'})C(O)-; -N(R^{11'})S(O)₂-; -N(R^{11'})S(O)-; -N(R^{11'})C(O)O-; -N(R^{11'})C(O)N(R^{11a'})-; y -OC(O)N(R^{11'}R^{11a'})-;

- 10 T es fenilo; naftilo; indenilo; indanilo; tetralinilo; Cicloalquilo C₃₋₁₀; Heterociclilo de 4 a 7 miembros; o heterobicyclilo de 9 a 11 miembros, en donde T está opcionalmente sustituido con uno o más R^{10'}, que son el mismo o diferentes;

R^{10'} es Z; halógeno CN; oxo (=O); COOR^{12'}; OR^{12'}; C(O)R^{12'}; C(O)N(R^{12'}R^{12a'}); S(O)₂N(R^{12'}R^{12a'}); S(O)N(R^{12'}R^{12a'}); S(O)₂R^{12'}; S(O)R^{12'}; N(R^{12'})S(O)₂N(R^{12a'}R^{12b'}); SR^{12'}; N(R^{12'}R^{12a'}); NO₂; OC(O)R^{12'}; N(R^{12'})C(O)R^{12a'}; N(R^{12'})S(O)₂R^{12a'}; N(R^{12'})S(O)R^{12a'}; N(R^{12'})C(O)OR^{12a'}; N(R^{12'})C(O)N(R^{12a'}R^{12b'}); OC(O)N(R^{12'}R^{12a'}); o alquilo C₁₋₆, en donde el alquilo C₁₋₆ está opcionalmente sustituido con uno o más halógenos, que son el mismo o diferentes;

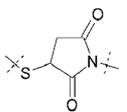
- 15 R^{11'}, R^{11a'}, R^{12'}, R^{12a'}, R^{12b'} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H; Z; y alquilo C₁₋₆, en donde el alquilo C₁₋₆ está opcionalmente sustituido con uno o más halógenos, que son el mismo o diferentes;

siempre que uno de R^{9'}, R^{9a'}, R^{9b'}, R^{10'}, R^{11'}, R^{11a'}, R^{12'}, R^{12a'}, R^{12b'} sea Z.

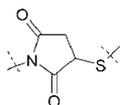
- 20 Más preferiblemente, L² es una cadena alquilo C₁₋₂₀, que está opcionalmente interrumpida por uno o más grupos seleccionados independientemente de -O-; y C(O)N(R^{3aa}); opcionalmente sustituido con uno o más grupos seleccionados independientemente de OH; y C(O)N(R^{3aa}R^{3aaa}); y en donde R^{3aa}, R^{3aaa} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H; y alquilo C₁₋₄.

Preferiblemente, L² tiene un peso molecular en el rango de 14 g/mol a 750 g/mol.

Preferiblemente, L² está unido a Z a través de un grupo terminal seleccionado de

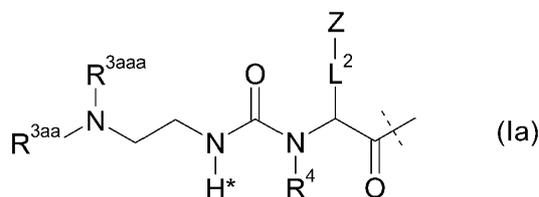
- 25  ;

y



En el caso de que L² tenga tal grupo terminal, se prefiere además que L² tenga un peso molecular en el rango de 14 g/mol a 500 g/mol calculado sin tal grupo terminal.

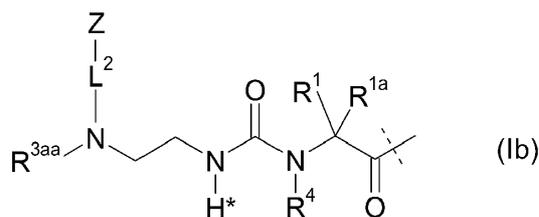
- 30 Preferiblemente, L está representada por la fórmula (Ia)



en donde R⁴, L² y Z tienen el significado indicado anteriormente, y en donde R^{3aa}, R^{3aaa} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H; y alquilo C₁₋₄; o se unen entre sí con el átomo de nitrógeno al que están unidos para formar un heterociclo de 4 a 7 miembros.

- 35 Preferiblemente, R⁴ es H; o metil.

Preferiblemente, L está representada por la fórmula (Ib)



en donde R^1 , R^{1a} , R^4 , L^2 y Z tienen el significado indicado anteriormente, y en la que R^{3aa} es H; o alquilo C_{1-4} .

Preferiblemente, R^4 es H; o metil.

Preferiblemente, R^1 en la fórmula (I) es L^2 -Z.

5 Preferiblemente, R^3 en la fórmula (I) es L^2 -Z.

Preferiblemente, R^3 , R^{3a} en la fórmula (I) se unen junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos para formar un heterociclo de 4 a 7 miembros, en el que el heterociclo está sustituido con L^2 -Z.

Preferiblemente, D-H es un agente bioactivo de molécula pequeña o un biopolímero.

10 Preferiblemente, D-H es un biopolímero seleccionado del grupo de biopolímeros que consiste en proteínas, polipéptidos, oligonucleótidos y ácidos nucleicos peptídicos.

"Oligonucleótidos" significa ya sea ADN, ARN, monocatenario o bicatenario, ARNip, miARN, aptámeros y cualquier modificación química de los mismos con preferiblemente de 2 a 1000 nucleótidos. Las modificaciones incluyen aquellas que proporcionan otros grupos químicos que incorporan carga adicional, polarizabilidad, enlaces de hidrógeno, interacción electrostática y fluxionalidad a las bases del ligando de ácido nucleico o al ligando de ácido nucleico en su totalidad. Tales modificaciones incluyen modificaciones en el azúcar en la posición 2', modificaciones en la pirimidina en la posición 5, modificaciones en la purina en la posición 8, modificaciones en las aminas exocíclicas, sustitución de la 4-tiouridina, sustitución del 5-bromo o 5-yodo-uracilo; modificaciones del esqueleto, metilaciones, combinaciones inusuales de emparejamiento de bases, tales como las isobases isocitidina e isoguanidina y similares. Las modificaciones también pueden incluir modificaciones de 3' y 5', tales como la limitación y el cambio de la estereoquímica.

Preferiblemente, DH es un polipéptido seleccionado del grupo de polipéptidos que consiste en ACTH, adenosina desaminasa, agalsidasa, alfa-1 antitripsina (AAT), inhibidor de alfa-1 proteinasa (API), alteplasa, amilinas (amilina, simlina), anistreplasa, ancrod serina proteasa, anticuerpos (monoclonales o policlonales, y fragmentos o fusiones), antitrombina III, antitripsinas, aprotinina, asparaginasa, atosiban, bifalina, bivalirudina, proteínas morfogénicas de hueso, inhibidores de la tripsina pancreática bovina (BPTI), fragmentos de cadherina, calcitonina (salmón), colagenasa, complemento inhibidor de la esterasa C1, conotoxinas, fragmentos del receptor de citoquinas, ADNasa, dinorfina A, endorfinas, enfuvirtida, encefalinas, eritropoyetinas, exendinas, factor VII, factor VIIa, factor VIII, factor VIIIa, factor IX, fibrinolisisina, factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), hormona de crecimiento que libera el péptido 2 (GHRP2), proteínas de fusión, hormonas estimulantes del folículo, gramicidina, grelina, desacilogrelina, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), galactosidasa, glucagón, péptidos de tipo glucagón, glucocerebrosidasa, factor estimulante de colonias de macrófagos de granulocitos (GM-CSF), proteínas de choque térmico humano (HSP), proteína activadora de fosfolipasa (PLAP), gonadotropina coriónica (hCG), hemoglobinas, vacunas de hepatitis B, hirudina, inhibidor de la serina proteasa humana, hialuronidasas, iduronidasa, inmunoglobulinas, vacunas contra la influenza, interleucinas (1 alfa, 1 beta, 2, 3, 4, 6, 10, 11, 12, 13, 21), antagonista del receptor IL-1 (rhIL-1ra), insulinas, factores de crecimiento similares a la insulina, proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina (rhIGFBP), interferones (alfa 2a, alfa 2b, alfa 2c, beta 1a, beta 1b, gamma 1a, gamma 1b), molécula de adhesión intracelular, factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), ligando de glicoproteína P-selectina (PSGL), factores de crecimiento de transformación, lactasa, leptina, leuprolida, levotiroxina, hormona luteinizante, vacuna de Lyme, péptidos natriuréticos (ANP, BNP, CNP y fragmentos), neuropéptido Y, pancrelipase, polipéptido pancreático, papaína, hormona paratiroidea, PDGF, pepsina, péptido YY, factor activador de plaquetas acetilhidrolasa (PAF-AH), prolactina, proteína C, timalfasina, octreotida, secretina, sermorelina, receptor del factor de necrosis tumoral soluble (TNFR), superóxido dismutasa (SOD), somatropinas (hormona del crecimiento), somatoprimina, somatostatina, estreptoquinasa, sucrasa, terlipresina, fragmento de toxina tetánica, tilactasa, trombinas, timosina, hormona estimulante de la tiroides, tiorotropina, factor de necrosis tumoral (TNF), Fc IgG del receptor de TNF, activador de plasminógeno tisular (tPA), TSH, uro dilatín, urato oxidasa, uroquinasa, vacunas, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), péptido intestinal vasoactivo, vasopresina, ziconotida, lectina y ricina.

Preferiblemente, las interleuquinas se seleccionan de 1 alfa, 1 beta, 2, 3, 4, 6, 10, 11, 12, 13 y 21.

Preferiblemente, los interferones se seleccionan de alfa 2a, alfa 2b, alfa 2c, beta 1a, beta 1b, gamma 1a y gamma 1b.

Preferiblemente, el péptido natriurético se selecciona del grupo que consiste en ANP, BNP, CNP y fragmentos de péptidos natriuréticos.

Preferiblemente, D-H es una proteína preparable por tecnologías de ADN recombinante.

5 Preferiblemente, D-H es una proteína seleccionada del grupo de proteínas que consiste en fragmentos de anticuerpo, proteínas de unión a antígeno de cadena simple, anticuerpos catalíticos y proteínas de fusión.

10 Preferiblemente, DH es un agente bioactivo de molécula pequeña seleccionado del grupo de agentes que consiste en agentes activos del sistema nervioso central, antiinfecciosos, antialérgicos, inmunomoduladores, antiobesidad, anticoagulantes, antidiabéticos, antineoplásicos, antibacterianos, antifúngicos, analgésicos, anticonceptivos, antiinflamatorios, esteroideos, vasodilatadores, vasoconstrictores y cardiovasculares con al menos un grupo amino primario o secundario.

15 Preferiblemente, DH es un agente bioactivo de molécula pequeña seleccionado del grupo de agentes que consiste en acarbosa, alaproclato, alendronato, amantadina, amikacina, amineptina, aminoglutetimida, amisulprida, amlodipina, amotosalen, amoxapina, amoxicilina, anfetamina, anfotericina B, ampicilina, amprenavir, amrinona, anileridina, apraclonidina, apramicina, articaína, atenolol, atomoxetina, avizafona, baclofeno, benazepril, benserazida, benzocaína, betaxolol, bleomicina, bromfenac, brofaromina, carvedilol, catina, catinona, carbutamida, cefalexina, clinafloxacin, ciprofloxacina, deferoxamina, delavirdina, desipramina, daunorubicina, dexmetilfenidato, diafenilsulfona, dizocilpina, dopamina, dobutamina, dorzolamida, doxorubicina, duloxetina, eflornitina, enalapril, epinefrina, epirubicina, ergolina, ertapenem, esmolol, enoxacina, etambutol, fenfluramina, fenoldopam, fenoterol, fingolimod, flecainida, fluvoxamina, fosamprenavir, frovatriptan, furosemida, fluoxetina, gabapentina, gatifloxacina, gemifloxacina, gentamicina, grepafloxacina, hexilcaína, hidralazina, hidroclorotiazida, icofungipeno, idarubicina, imiquimod, inversina, isoproterenol, isradipina, kanamicina A, ketamina, labetalol, lamivudina, levobunolol, levodopa, levotiroxina, lisinopril, lomefloxacina, loracarbef, maprotilina, mefloquina, melfalan, memantina, meropenem, mesalazina, mescalina, metildopa, metilendioximetanfetamina, metoprolol, milnacipran, mitoxantron, moxifloxacina, norepinefrina, norfloxacina, nortriptilina, neomicina B, nistatina, oseltamivir, ácido pamidróico, paroxetina, pazufloxacina, pemetrexed, perindopril, fenmetrazina, fenelzina, pregabalina, procaina, pseudoefedrina, protriptilina, reboxetina, ritodrina, sabarubicina, salbutamol, serotonina, sertralina, sitagliptina, sotalol, espectinomicina, sulfadiazina, sulfamerazina, sertralina, sulfalen, sulfametoxazol, tacrina, tamsulosina, terbutalina, timolol, tirofiban, tobramicina, tocainida, tosufloxacina, trandolapril, ácido tranexámico, tranilcipromina, trimetrexato, trovafloxacina, valaciclovir, valganciclovir, vancomicina, viomicina, viloxazina, y zalcitabina.

30 Z es un polímero de al menos 500 Da o un grupo alquilo C₈₋₁₈.

35 Preferiblemente, Z se selecciona del grupo de polímeros opcionalmente entrecruzados que consisten en poli(propilenglicol), poli(etilenglicol), dextrano, quitosano, ácido hialurónico, alginato, xilano, manano, carragenano, agarosa, celulosa, almidón, almidón hidroxialquílico, poli(alcoholes vinílicos), poli(oxazolininas), poli(anhídridos), poli(orto ésteres), poli(carbonatos), poli(uretanos), poli(ácidos acrílicos), poli(acrilamidas), poli(acrilatos), poli(metacrilatos), poli(organofofosfazenos), polioxazolina, poli(siloxanos), poli(amidas), poli(vinilpirrolidona), poli(cianoacrilatos), poli(ésteres), poli(iminocarbonatos), poli(aminoácidos), colágeno, gelatina, hidrogel y una proteína de plasma sanguíneo, y copolímeros de los mismos.

Preferiblemente, Z es una proteína.

Preferiblemente, Z es una proteína seleccionada del grupo que consiste en albúmina, transferrina e inmunoglobulina.

40 Preferiblemente, Z es un poli(etilenglicol) lineal o ramificado con un peso molecular de 2,000 Da a 150,000 Da.

Incluso más preferido es un profármaco de acuerdo con la presente invención, en el que D-H es un agonista del receptor de GLP-1; L¹ está representado por la fórmula (I) como se indicó anteriormente; y Z es un hidrogel. Incluso más preferiblemente, en la fórmula (I) X es N(R⁴), X¹ es C y X³ es O. Incluso más preferiblemente, L está representado por la fórmula (Ia) como se indicó anteriormente.

45 GLP-1 es una de las hormonas peptídicas intestinales que se liberan en el sistema circulatorio después de la ingesta de alimentos. Aumenta la liberación posprandial de insulina, cuando se absorben las nutrientes (especialmente los carbohidratos) y su nivel postprandial se eleva. El GLP-1 se asocia con los sitios receptores de GLP-1 ubicados en las células β pancreáticas y eleva los niveles de AMPc endógeno de una manera dependiente de la dosis. En islotes de rata aislados en presencia de niveles de glucosa normoglicémicos anteriores, el GLP-1 estimula la liberación de insulina. Un potencial terapéutico para GLP-1 en pacientes con diabetes tipo 2 se sugirió antes, debido a la profunda eficacia de este péptido insulínico para estimular la secreción de insulina cuando los niveles de glucosa están elevados y para dejar de hacerlo al regresar a la normoglucemia. El efecto antidiabetogénico de la amida del péptido 1 similar a glucagón (7-36) en sujetos normales y pacientes con diabetes mellitus se describe por ejemplo en N. Engl. J. Med. 326 (20): 1316-1322. Los estudios in vitro y los experimentos con animales sugieren que el GLP-1 mejora la sensibilidad a la insulina y tiene un efecto anabólico en las células β pancreáticas. En los humanos, también se informó que el GLP-1 suprime la secreción de glucagón, desacelera el vaciado gástrico e induce a la saciedad, lo que lleva a la pérdida de peso si se administra durante semanas y meses.

Se informa que la exendina-4 se asocia con receptores de GLP-1 localizados en células beta pancreáticas con una afinidad 2.5 veces mayor que la de GLP-1. En islotes de rata aislados y células beta en presencia de glucosa, la exendina aumenta la secreción de insulina de una manera dependiente de la dosis. La exendina-4 es un agonista de alta potencia y una exendina-(9-39)-amida truncada un antagonista en el receptor de la 1-(7-36)-amida del péptido similar a glucagón de células beta secretoras de insulina (véase J. Biol. Chem. 268 (26): 19650-19655). Los estudios en roedores diabéticos tipo 2 revelaron que la exendina-4 es 5530 veces más potente que el GLP-1 en la reducción de los niveles de glucosa en la sangre. Además, la duración de la acción de disminución de la glucosa después de una administración única de exendina-4 es significativamente más larga en comparación con el GLP-1 (véase, por ejemplo, Diabetes 48 (5): 1026-1034). La vida media plasmática de la exendina-4 en humanos se describió como de solo 26 minutos. La exendina-4 reduce el ayuno y la glucosa posprandial y disminuye la ingesta de energía en voluntarios sanos (véase, por ejemplo, Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 281 (1): E155-61).

Por consiguiente, en una realización aún más preferida, el agonista del receptor de GLP-1 es Exendin-4.

Los hidrogeles que se van a utilizar son conocidos en la técnica. Se pueden usar hidrogeles adecuados que se describen en el documento WO-A 2006/003014. Por consiguiente, un hidrogel puede definirse como una red polimérica tridimensional, hidrofílica o anfifílica capaz de absorber grandes cantidades de agua. Las redes están compuestas de homopolímeros o copolímeros, son insolubles debido a la presencia de entrecruzamientos químicos covalentes o físicos (interacciones iónicas, hidrófobas, entrelazamientos). Los entrecruzamientos proporcionan la estructura de red y la integridad física. Los hidrogeles exhiben una compatibilidad termodinámica con el agua que les permite hincharse en medios acuosos. Las cadenas de la red están conectadas de tal manera que existen poros y que una fracción sustancial de estos poros tienen dimensiones entre 1 nm y 1000 nm.

Otro objeto de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende el profármaco de la presente invención o una sal farmacéutica del mismo junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Aún otro objeto de la presente invención es un profármaco de la presente invención o una composición farmacéutica de la presente invención para uso como un medicamento.

También se divulga un método para tratar, controlar, retrasar o prevenir en un paciente mamífero que necesita el tratamiento de una o más condiciones que comprenden administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un profármaco de la presente invención o una composición farmacéutica de la presente invención. invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

También se divulga un profármaco precursor de fórmula Act-L, en donde L tiene el significado indicado anteriormente y Act es un grupo saliente.

Preferiblemente, Act es cloruro, bromuro, fluoruro, nitrofenoxi, imidazolilo, N-hidroxisuccinimidilo, N-hidroxibenzotriazolil, N-hidroxiabenzotriazolilo, pentafluorofenoxi, 2-tiooxo-tiazolidinilo, o N-hidroxisulfosuccinidinidilo.

Ejemplos

35 Materiales y métodos

Materiales: Cadena lateral protegida Exendin-4 (J. Eng et al., J. Biol. Chem. 1992, 267, 11, 7402-7405) en resina de amida de Rink, BNP-32a protegida de cadena lateral (humano, Cys10 y Cys26 intercambiados por Ala) en resina de clorotritilo, BNP-32b protegida de cadena lateral con grupo protector de cadena lateral ivDde en Lys14 (humano, Cys10 y Cys26 intercambiados por Ala) en resina de clorotritilo, y fragmento de factor de liberación de hormona de crecimiento humano protegido de cadena lateral amida (GRF (1-29)) en amida de Rink (cada uno sintetizado por Fmoc-strategy) se obtuvieron de Peptide Specialty Laboratories GmbH, Heidelberg, Alemania. Se usaron grupos protectores de cadena lateral estándar, excepto para Lys27 de Exendin-4 y Lys21 de GRF (1-29) donde se usaron grupos protectores de cadena lateral Mmt.

45 La metoxi poli(etilenglicol) maleimido-propionamida de 40 kDa (PEG40kDa-maleimida) se obtuvo de Chirotech Technology Ltd, Cambridge, Reino Unido.

La resina de cloruro de 2-clorotritilo, la resina de amida de Sieber y los aminoácidos fueron de Merck Biosciences GmbH, Schwalbach/Ts, Alemania, si no se indica otra cosa. Fmoc-D-homocisteína (Trt)-OH y ácido S-tritil-3-mercaptopropiónico (Trt-MPA) se obtuvieron de Bachem AG, Bubendorf, Suiza.

50 O-(N-Fmoc-2-aminoetil)-O'-(2-carboxietil)-undecaetilenglicol (Fmoc-Pop-OH) se obtuvo de Polypure AS, Oslo, Noruega.

La Fmoc-4-(2-aminoetil)-1-carboximetil-piperazina (Fmoc-Acp-OH) se adquirió de NeoMPS SA, Estrasburgo, Francia. El anhídrido cis-Ciclohexano-1,2-dicarboxílico se obtuvo de Alfa Aesar GmbH & Co KG, Karlsruhe, Alemania.

Todos los demás productos químicos fueron de Sigma-ALDRICH Chemie GmbH, Taufkirchen, Alemania. La síntesis en fase sólida se realizó en resina de cloruro de 2-clorotritilo con una carga de 1.3 mmol/g o resina de amida de Sieber

con una carga de 0.55 mmol/g. Las jeringas equipadas con fritas de polipropileno se utilizaron como recipientes de reacción.

La carga del primer aminoácido en resinas se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Desprotección de Fmoc:

- 5 Para la eliminación del grupo protector Fmoc, la resina se agitó con 2/2/96 (v/v/v) piperidina/DBU/DMF (dos veces, 10 min cada una) y se lavó con DMF (diez veces).

Desprotección de ivDde:

Para la eliminación del grupo protector ivDde, la resina se agitó con DMF 98/2 (v/v)/hidrato de hidracina (3 veces, 10 min cada una) y se lavó con DMF (diez veces).

- 10 Protección de Boc:

El terminal N de un péptido se protegió con boc agitando la resina con 30 eq (boc)₂O y 60 eq de piridina en DCM. Después de 1 h, la resina se lavó con DCM (10 veces).

Condición de acoplamiento estándar para ácidos:

- 15 El acoplamiento de los ácidos (ácidos alifáticos, Fmoc-aminoácidos) a los grupos amino libres en la resina se logró mediante la agitación de la resina con 3 eq de ácido, 3 eq de PyBOP y 6 eq de DIEA en relación con los grupos amino libres en la resina (calculada en base a la carga teórica de la resina) en DMF a temperatura ambiente. Después de 1 hora, la resina se lavó con DMF (10 veces).

Acoplamiento de ácido 3-maleimido propiónico:

- 20 El acoplamiento del ácido 3-maleimido propiónico a los grupos amino libres en la resina se logró agitando la resina con 2 eq de ácido, 2 eq de DIC y 2 eq de HOBt en relación con los grupos amino libres en DMF a temperatura ambiente. Después de 30 minutos, la resina se lavó con DMF (10 veces).

Protocolo estándar para la síntesis de ureas sobre resina:

- 25 La síntesis de ureas sobre resina se logró agitando la resina con 2.5 eq de bis(pentafluorofenil)carbonato, 5 eq de DIEA y 0.25 eq de DMAP en relación con los grupos amino libres en DCM/ACN 1/1 a temperatura ambiente. Después de 15 minutos, la resina se lavó con DMF (10 veces). Se disolvieron 5 eq de amina en DMF. La mezcla se añadió a la resina y se agitó durante 60 minutos a temperatura ambiente. La resina se lavó con DMF (10 veces).

Protocolo de escisión para la resina de amida de Sieber:

- 30 Una vez completada la síntesis, la resina se lavó con DCM (10 veces), se secó al vacío y se trató repetidamente (cinco veces en 15 minutos) con 97/2/1 (v/v) de DCM/TES/TFA. Los eluatos se combinaron, los compuestos volátiles se eliminaron bajo una corriente de nitrógeno y el producto se purificó por RP-HPLC. Las fracciones de HPLC que contenían el producto se combinaron y se liofilizaron.

Protocolo de escisión para la resina de cloruro de 2-clorotritilo:

- 35 Una vez completada la síntesis, la resina se lavó con DCM, se secó al vacío y se trató dos veces durante 30 minutos con 6/4 (v/v) de DCM/HFIP. Los eluatos se combinaron, los compuestos volátiles se eliminaron bajo una corriente de nitrógeno y el producto se purificó por RP-HPLC. Las fracciones de HPLC que contenían el producto se combinaron y se liofilizaron.

Protocolo de escisión para la resina de amida de Rink:

- 40 Una vez completada la síntesis, la resina se lavó con DCM, se secó al vacío y se trató con 2 ml de cóctel de escisión de TFA (TFA/TES/Agua/DTT 95/2/2/1) por 100 mg de resina durante 60 minutos a temperatura ambiente. Los volátiles se eliminaron bajo una corriente de nitrógeno. Los productos secundarios no polares y los grupos protectores se eliminaron precipitando el péptido del éter dietílico. El precipitado se secó al vacío y se disolvió en ACN/agua 1/1 y se purificó por RP-HPLC.

- 45 Los productos que contienen amina obtenidos como sales de TFA se convirtieron en las correspondientes sales de HCl utilizando una resina de intercambio iónico (Discovery DSC-SAX, Supelco, EE. UU.). Esta etapa se realizó en caso de que se esperara que el TFA residual interfiriera con, por ejemplo, unas reacciones de acoplamiento subsecuentes.

Purificación por RP-HPLC:

RP-HPLC se realizó en una columna de 100x20 o 100x40 mm C18 ReproSil-Pur 300 ODS-3 5µ (Dr. Maisch, Ammerbuch, Alemania) conectada a un sistema Waters 600 HPLC y un detector de absorbencia Waters 2487. Se usaron gradientes lineales de solución A (0.1% de TFA en H₂O) y solución B (0.1% de TFA en acetonitrilo). Las fracciones de HPLC que contenían el producto se liofilizaron.

- 5 Análisis: la espectrometría de masas por ionización por electroaspersión (ESI-MS) se realizó en un instrumento ESI ZQ 4000 de Waters y los espectros, si fuera necesario, fueron interpretados por el software MaxEnt de Waters.

La cromatografía de exclusión de tamaño (SEC) se realizó utilizando un sistema básico Amersham Bioscience AEKTA equipado con una columna Superdex200 10/300 (Amersham Bioscience/GE Healthcare), si no se indica otra cosa. Se utilizó fosfato de sodio 10 mM, NaCl 140 mM, pH 7.4, EDTA 3 mM como fase móvil

- 10 Para la cromatografía de intercambio catiónico, se equipó un sistema básico Amersham Bioscience AEKTA con una columna HR16/10 rellena con Fuente 15S (Amersham Bioscience/GE Healthcare).

La desalinización se realizó utilizando un sistema básico Amersham Bioscience AEKTA equipado con una columna Desalinizadora HiPrep 26/10 y ácido acético al 0.1% en agua como fase móvil.

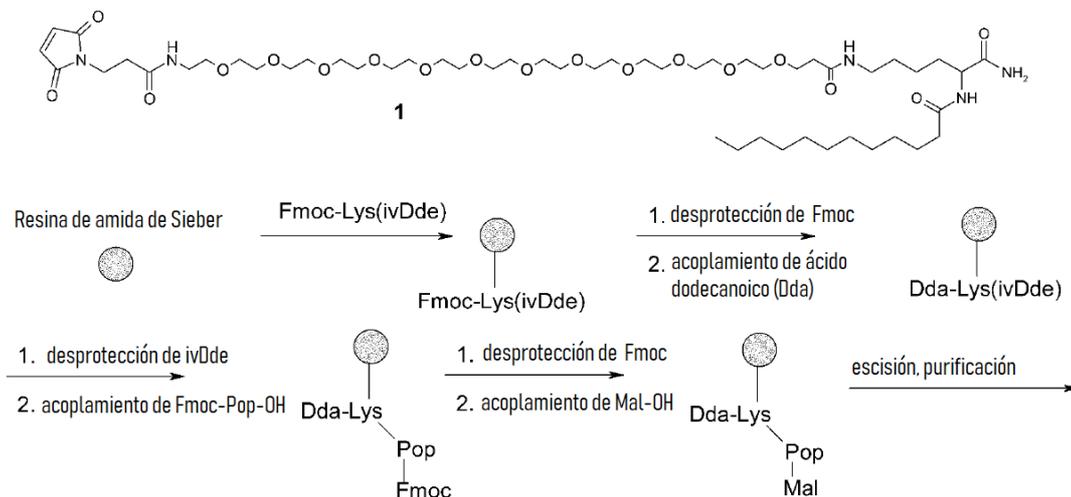
- 15 Hidrólisis del enlazador in vitro y liberación del fármaco: los compuestos se disolvieron en regulador A (fosfato de sodio 10 mM, NaCl 140 mM, pH 7.4, EDTA 3 mM) o regulador B (EDTA 3 mM Acetat 3 mM, pH 4.0), y la solución se filtró a través de un filtro de 0.2 µm y se incubó a 37 °C. Las muestras se tomaron a intervalos de tiempo y se analizaron por RP-HPLC a 215 nm y ESI-MS. Las señales UV que se correlacionaban con la molécula de fármaco liberada se integraron y se representaron en función del tiempo de incubación. En el caso de tiempos de retención idénticos de profármaco y fármaco, se usó la relación de señales de masa para determinar la cinética de liberación.

- 20 Para los conjugados de hidrogel, los compuestos se suspendieron en regulador A y se incubaron a 37 °C. Las muestras se tomaron después de la centrifugación de la suspensión y se analizaron por RP-HPLC a 215 nm. Las señales UV que se correlacionaban con la molécula de fármaco liberada se integraron y se representaron en función del tiempo de incubación.

Se aplicó un software de ajuste de curvas para estimar el medio tiempo de liberación correspondiente.

25 Ejemplo 1

Síntesis del portador de ácidos grasos (1)



- 30 1 se sintetizó en resina de amida sieber (477 mg, 0.262 mmol) por acoplamiento de Fmoc-Lys (ivDde)-OH, desprotección de fmoc, acoplamiento de ácido dodecanoico, desprotección de ivDde, acoplamiento de Fmoc-Pop-OH, desprotección de fmoc, acoplamiento del ácido 3-maleimido propiónico, escisión de la resina y purificación como se muestra arriba y se describe en "Materiales y métodos".

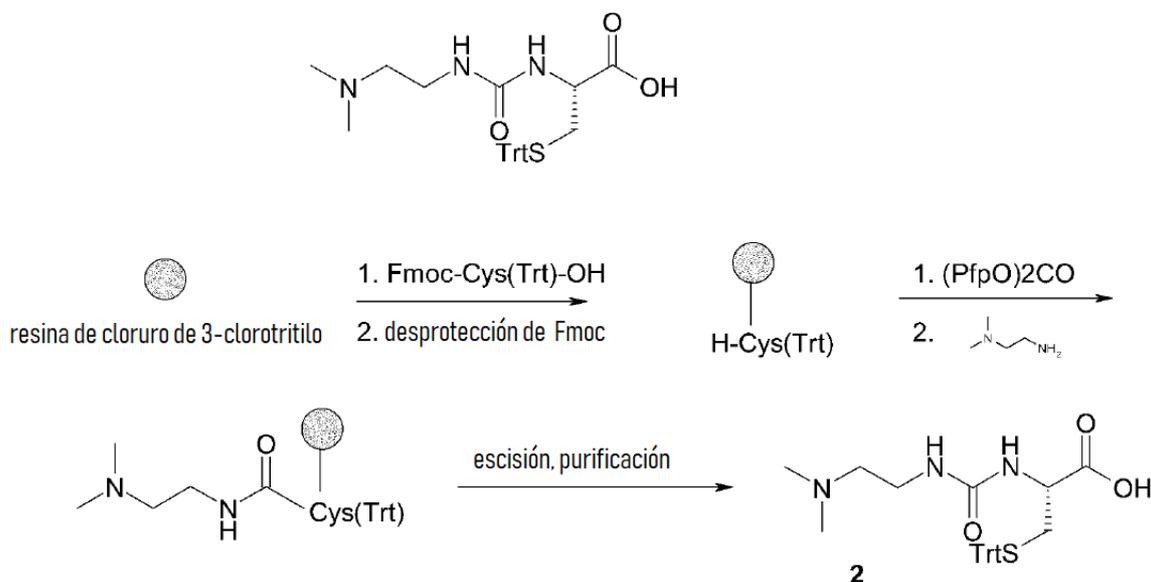
Rendimiento: 128 mg (0.119 mmol).

MS: m/z 1101.0 = [M+Na]⁺ (MW calculada = 1078.4 g/mol).

MS: m/z 1101.0 = $[M+Na]^+$ (MW calculada = 1078.4 g/mol).

Ejemplo 2

Síntesis de reactivo enlazador (2)



5

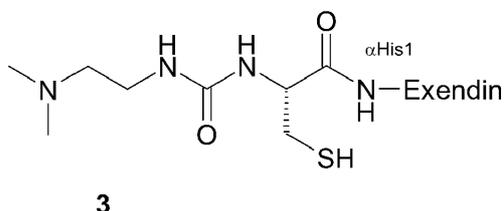
El reactivo enlazador 2 se sintetizó en resina de cloruro de 3-clorotritilo (300 mg, 0.39 mmol) cargando resina con Fmoc-Cys (Trt)-OH, desprotección de fmoc y formación de urea en resina utilizando N,N-dimetil-etilendiamina como amina, escisión de la resina como se muestra arriba y se describe en "Materiales y métodos". Para la separación por RP-HPLC, se usó HCl al 0.01% en agua como solución A y HCl al 0.01% en acetonitrilo se usó como solución B.

10 Rendimiento: 82 mg de sal HCl (0.16 mmol).

MS: m/z 478.2 = $[M+H]^+$ (MW calculada = 477.6 g/mol).

Ejemplo 3

Síntesis del intermedio enlazador de exendina-4 (3)



15

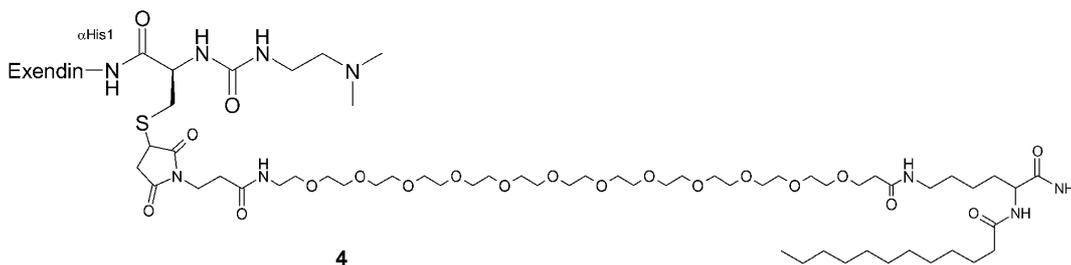
2 (14 mg, 0.027 mmol), PyBOP (14 mg, 0.027 mmol) y DIEA (17 μ l, 0.10 mmol) se disolvieron en 0.2 ml de DMF seco. La mezcla se añadió a 22 mg de Exendin-4 protegida con cadena lateral en resina (0.1 mmol/g, 2.2 μ mol) y se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente. La resina se lavó con DMF (10 veces) y DCM (10 veces). 3 se escindió de la resina y se purificó por RP-HPLC como se describe en "Materiales y métodos".

20 Rendimiento: 1.7 mg 3 como sal de TFA (0.38 μ mol).

MS: m/z 1468.7 = $[M + 3H]^{3+}$ (MW calculada = 4403 g/mol).

Ejemplo 4

Síntesis de conjugado de ácido graso-PEG-enlazador-Exendin-4 (4)

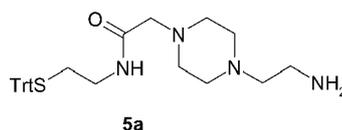


5 3 (1.7 mg, 0.38 μmol) y 1 (0.6 mg, 0.58 μmol) se disolvieron en 500 μl de acetonitrilo/agua 7/3 (v/v). Se añadieron 40 μl de regulador de fosfato 0.5 M (pH 7.4) y la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. El conjugado 4 se purificó por RP-HPLC.

MS: m/z 1828.7 = $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ (MW calculada = 5480 g/mol).

Ejemplo 5

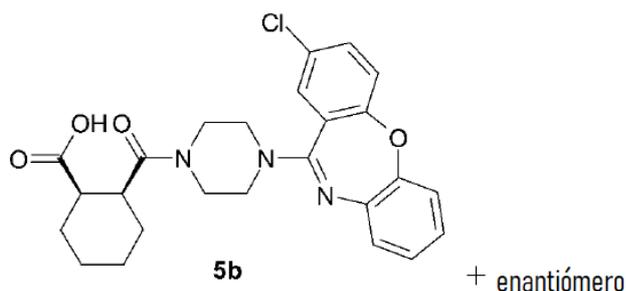
Síntesis del intermedio enlazador (5a)



10 Fmoc-Acp-OH \cdot 2 HCl (100 mg, 0.21 mmol) se suspendió en 400 μl de DMF/DMSO 1/1 (v/v). S-tritilcistamina \cdot HCl (75 mg, 0.21 mmol), PyBOP (109 mg, 0.21 mmol) y DIEA (146 μl , 0.86 mmol) y la mezcla se agitó durante 60 min a temperatura ambiente. El grupo Fmoc se eliminó agregando 75 μl de piperidina y 25 μl de DBU. Después de 15 minutos, la mezcla se hidrolizó y se acidificó (AcOH) y el compuesto se purificó por RP-HPLC. Después de la liofilización, se obtuvieron 98 mg (0.14 mmol, doble sal de TFA).

MS: m/z 511.6 = $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (MW calculada = 488.7 g/mol).

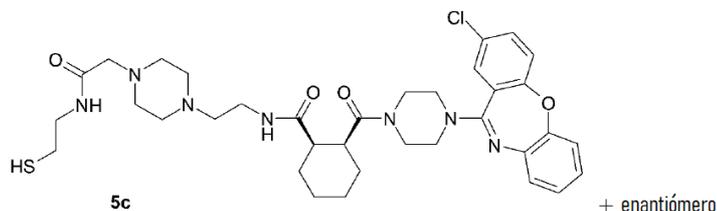
Síntesis de monoamida de amoxapina del ácido diacarboxílico cis-ciclohexano (5b)



20 La amoxapina (200 mg, 0.64 mmol) y el anhídrido cis-ciclohexano-1,2-dicarboxílico (108 mg, 0.70 mmol) se disolvieron en 700 μl de DMF seco. Se añadió piridina (130 μl , 1.6 mmol) y la mezcla se agitó durante 60 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se inactivó con 2 ml de acetonitrilo/ácido acético/agua (1/1/1) y se purificó por RP-HPLC. Después de la liofilización, se obtuvieron 344 mg (0.49 mmol, doble sal de TFA) de 5b.

MS: m/z 468.5 = $[\text{M}+\text{H}]^+$ (MW calculada = 468.0 g/mol).

25 Síntesis de conjugado enlazador-amoxapina (5c)



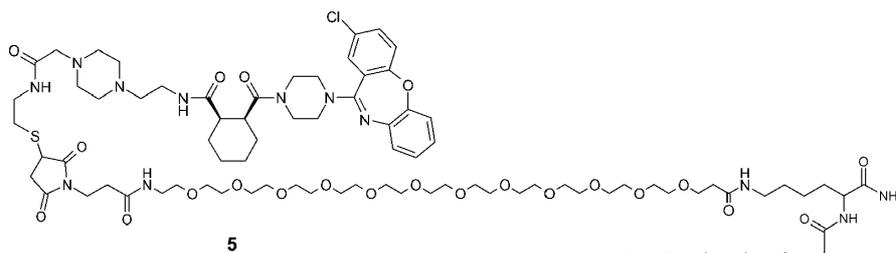
- 5b (7 mg, 0.010 mmol) se preactivó incubando con PyBOP (12.5 mg, 0.024 mmol) y DIEA (5 μ l, 0.03 mmol) en 200 μ l de DMF seco durante 45 minutos a temperatura ambiente. Se agregaron 5a (20 mg, 0.028 mmol) y DIEA (15 μ l, 0.09 mmol) y la mezcla se incubó durante 60 minutos más. La mezcla se inactivó con 0.5 ml de acetonitrilo/ácido acético/agua (1/1/1) y se purificó por RP-HPLC. Después de la liofilización, se obtuvieron 3 mg (0.0026 mmol, sal doble de TFA) de 5c.

MS: m/z 939.3 = [M+H]⁺ (MW calculada = 938.6 g/mol).

- 10 Para la desprotección de tritilo, el liofilizado se incubó en 1 ml de HFIP y 3 μ l de TES durante 30 min. La mezcla se evaporó y el tiol se purificó por RP-HPLC. Después de la liofilización, se obtuvieron 2 mg (2.2 μ mol, sal doble de TFA) de conjugado de amoxapina-enlazador 5c.

MS: m/z 697.1 = [M+H]⁺ (MW calculada = 696.3 g/mol).

Síntesis del conjugado ácido graso-PEG-amoxapina (5)

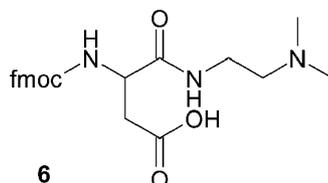


- 15 El conjugado de amoxapina-enlazador 5c (2 mg, 2.2 μ mol) y 1 (3.5 mg, 3.2 μ mol) se disolvieron en 900 μ l de acetonitrilo/agua 7/3 (v/v). Se añadieron 60 μ l de regulador de fosfato 0.5 M (pH 7,4) y la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. 5 se purificó por RP-HPLC.

MS: m/z 1774.9 = [M+H]⁺ (MW calculada = 1774.7 g/mol).

Ejemplo 6

- 20 Síntesis de reactivo enlazador (6)



- 25 Fmoc-Asp (tBu)-OH (411 mg, 1 mmol), HOBT (153 mg, 1 mmol) y DIC (160 μ l, 1 mmol) se disolvieron en 2 ml de DMF y se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente. Se añadió N,N-dimetiletilendiamina (160 μ l, 1.5 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. Se añadió ácido acético (300 μ l) y se purificó Fmoc-Asp (tBu)-NH-(CH₂)₂-N(CH₃)₂ mediante RP-HPLC.

Rendimiento: 220 mg (0.46 mmol)

MS Fmoc-Asp(tBu)-NH-(CH₂)₂-N(CH₃)₂: m/z 504.6 = [M+Na]⁺ (MW calculada = 481.6 g/mol).

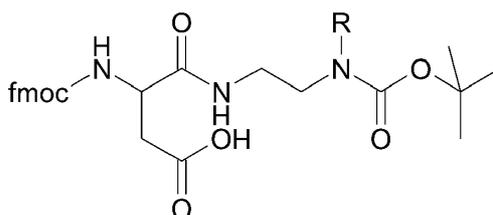
Fmoc-Asp(tBu)-NH-(CH₂)₂-N(CH₃)₂ (220 mg, 0.46 mmol) se disolvió en 3 ml de 98/2 (v/v) de TFA/TES. Después de 30 minutos, el disolvente se eliminó bajo una corriente de nitrógeno y 6 se purificaron por RP-HPLC utilizando HCl al 0.01% en agua como disolvente A y HCl al 0.01% en acetonitrilo como disolvente B.

Rendimiento: 146 mg (0.32 mmol, sal de HCl)

5 MS: m/z 426.5 = [M+H]⁺ (MW calculada = 425.5 g/mol).

Ejemplo 7

Síntesis de los reactivos enlazadores 7a y 7b



7a: R = H
7b: R = CH₃

10 Síntesis de 7a:

Fmoc-Asp (tBu)-OH (300 mg, 0.73 mmol), HOBT (1112 mg, 0.73 mmol) y DIC (117 µl, 0.73 mmol) se disolvieron en 2 ml de DMF y se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente. Se añadió boc-etilendiamina (230 mg, 1.44 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. Se añadió ácido acético (300 µl) y se purificó Fmoc-Asp(tBu)-NH-(CH₂)₂-NH-boc mediante RP-HPLC.

15 Rendimiento: 205 mg (0.37 mmol)

MS intermedio: m/z 576.6 = [M+Na]⁺ (MW calculada = 553.7 g/mol).

Fmoc-Asp (tBu)-NH- (CH₂)₂-NH-boc (205 mg, 0.37 mmol) se disolvió en 3 ml de 98/2 (v/v) de TFA/TES. Después de 30 minutos, el disolvente se eliminó en una corriente de nitrógeno y Fmoc-Asp (H)-NH- (CH₂)₂-NH₂ se purificó por RP-HPLC.

20 Rendimiento: 140 mg (0,27 mmol, sal de TFA)

Rendimiento: 140 mg (0.27 mmol, TFA salt)

MS intermedio: m/z 398.8 = [M+H]⁺ (MW calculada = 397.4 g/mol).

25 Se disolvió Fmoc-Asp(H)-NH-(CH₂)₂-NH₂ (140 mg, 0.27 mmol, sal de TFA) en 1 ml de DMF y DIEA (140 µl, 0.81 mmol) y se agregó boc₂O (100 mg, 0.46 mmol). La solución se agitó a temperatura ambiente durante 15 min y luego se acidificó con ácido acético (300 µl). 7a fue purificado por

RP-HPLC.

Rendimiento de 7a: 120 mg (0.24 mmol)

MS 7a: m/z 520.5 = [M+Na]⁺ (MW calculada = 497.6 g/mol).

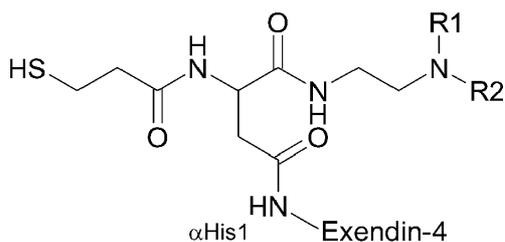
30 7b se sintetizó como se describió anteriormente, excepto por el uso de H₂N-(CH₂)₂-N(CH₃)-boc en lugar de boc-etilendiamina como amina en la priemra etapa.

Rendimiento 7b: 115 mg.

MS 7b: m/z 534.5 = [M+Na]⁺ (MW calculada = 511.6 g/mol).

Ejemplo 8

Síntesis de conjugados de Exendin-enlazador 8a, 8b y 8c



8a: R1 = H, R2 = H

8b: R1 = H, R2 = CH₃

8c: R1 = CH₃, R2 = CH₃

Síntesis de 8a:

- 5 7a (30 mg, 60 μmol), HOBt (9 mg, 60 μmol), DIEA (12 μl, 70 μmol) y DIC (10 μl, 63 μmol) se disolvieron en 200 μl de DMF y se agregaron inmediatamente al Exendin-4 protegido por cadena lateral en resina (40 mg, 4 μmol) y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. La resina se lavó diez veces con DMF y luego se incubó durante 5 minutos con 500 μl de anhídrido acético 1/1/2/piridina/DMF. La resina se lavó 10 veces con DMF y se eliminó el grupo fmoc. El ácido trt-mercaptopropiónico se acopló y se separó de la resina y se purificó por RP-HPLC.

Rendimiento: 3.6 mg

MS 8a: m/z 1108.5 = [M+4H]⁴⁺; 1477.8 = [M+3H]³⁺ (MW calculada = 4432 g/mol).

- 10 8b se sintetizó como se describe anteriormente para 8a, excepto por el uso de 7b en lugar de 7a.

Rendimiento: 3.5 mg

MS 8b: m/z 1112.5 = [M+4H]⁴⁺; 1482.5 = [M+3H]³⁺ (MW calculada = 4446 g/mol).

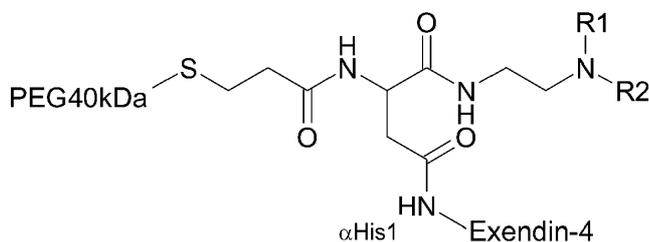
8c se sintetizó como se describió anteriormente para 8a, excepto por el uso de 6 en lugar de 7a.

Rendimiento: 3.2 mg

- 15 MS 8c: m/z 1116.2 = [M+4H]⁴⁺; 1487.8 = [M+3H]³⁺ (MW calculada = 4460 g/mol).

Ejemplo 9

Síntesis de los conjugados PEG40kDa-enlazador-Exendin 9a, 9b y 9c



9a: R1 = H, R2 = H

9b: R1 = H, R2 = CH₃

9c: R1 = CH₃, R2 = CH₃

- 20 Síntesis de 9a:

8a (3.6 mg) se disolvió en 300 μl de 2/1 de agua/acetonitrilo y se agregaron 50 mg de PEG40kDa-maleimida. Se añadieron 100 μl de regulador de fosfato de sodio 0.25 M a pH 7 y, después de 5 minutos, la solución se acidificó con 50 μl de ácido acético.

9a se purificó por cromatografía de intercambio iónico usando citrato de sodio 10 mM pH 3 como disolvente A y citrato de sodio 10 mM pH 3 y NaCl 1 M como disolvente B y un gradiente por etapas (0 a 40% de B). Las fracciones que contienen 9 se desalinizaron y liofilizaron:

Rendimiento: 14 mg

5 9b se sintetizó como se describe anteriormente, excepto por el uso de 8b.

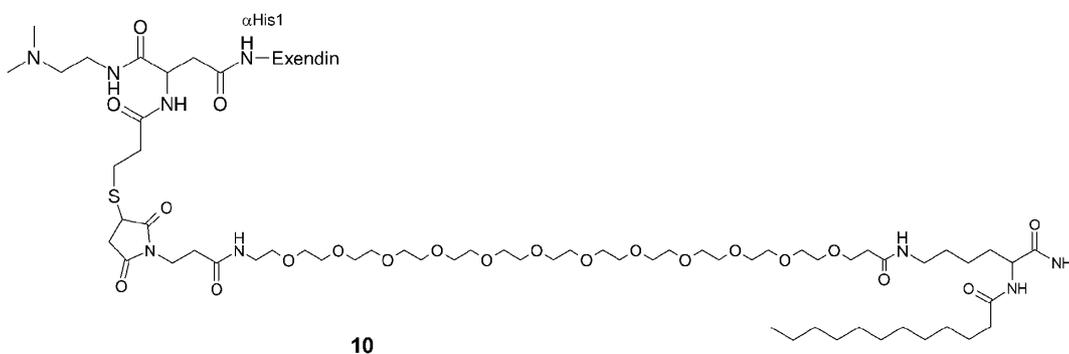
Rendimiento: 15 mg

9c se sintetizó como se describe anteriormente, excepto por el uso de 8c.

Rendimiento: 13 mg

Ejemplo 10

10 Síntesis del conjugado de ácido graso-enlazador-Exendin 10



15 8c (1 mg) se disolvió en 100 μ l de 1/1 de acetonitrilo/agua y se añadió 1 (1 mg) en 100 μ l de 3/1 de acetonitrilo/agua. Se añadieron 100 μ l de regulador de fosfato de sodio 0.25 M, la reacción se agitó durante 5 minutos, después de lo cual 10 se purificó por RP-HPLC.

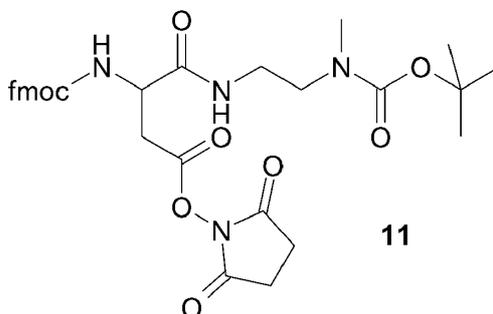
Rendimiento: 1.3 mg

MS 10: m/z 1385.9 = $[M+4H]^{4+}$; 1846.3 = $[M+3H]^{3+}$ (MW calculada = 5528.3 g/mol).

Ejemplo 11

Síntesis del reactivo enlazador activado por NHS 11

20



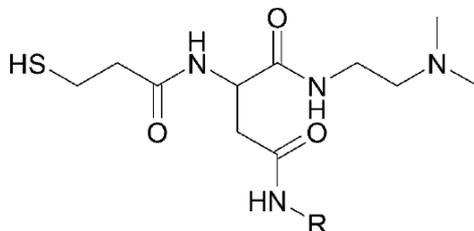
Se disolvieron 7b (20 mg, 40 μ mol), N,N'-diciclohexilcarbodiimida (10 mg, 48 μ mol) y NHS (8 mg, 70 μ mol) en 300 μ l de DCM seco y se agitaron a temperatura ambiente durante 1 h. El disolvente se eliminó en una corriente de nitrógeno y el 11 se purificó por RP-HPLC y se liofilizó.

25 Rendimiento: 22 mg (36 μ mol)

MS: m/z 631.5 = $[M+Na]^+$ (MW calculada = 608.7 g/mol).

Ejemplo 12

Síntesis de conjugado enlazador-exendin(fluoresceína) (12a) y conjugado enlazador-GRF (1-29) (fluoresceína) (12b)



12a: R = Exendin(ϵ K27-fluoresceína)

12b: R = GRF(1-29)(ϵ K21-fluoresceína)

- 5 6 (60 mg, 130 μ mol de sal de HCl), HOBt (20 mg, 130 μ mol), DIEA (40 μ l, 230 μ mol) y DIC (20 μ l, 126 μ mol) se disolvieron en 700 μ l de DMF y se agregaron inmediatamente al Exendin-4 protegido con cadena lateral en resina (120 mg, 12 μ mol) y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. La resina se lavó diez veces con DMF y luego se incubó durante 5 minutos con 1 ml de anhídrido acético/piridina/DMF 1/1/2 (v/v/v). La resina se lavó diez veces con DMF y se eliminó el grupo fmoc. El ácido trt-mercaptopropiónico se acopló de acuerdo con el método de acoplamiento estándar y la resina se lavó cinco veces con DMF y diez veces con DCM. El grupo protector Mmt de Lys27 se eliminó mediante incubación de resina cinco veces en 2 ml de 9/1 (v/v) de DCM/HFIP durante 5 min. La resina se lavó cinco veces con DCM y cinco veces con DMF y éster de 5,6-carboxi-fluoresceína-NHS (20 mg, 42 μ mol) y se agregó DIEA (20 μ l, 115 μ l) en 300 μ l de DMF a la resina y se incubaron durante 30 minutos. 12a se escindió de la resina y se purificó por RP-HPLC

Rendimiento: 12 mg

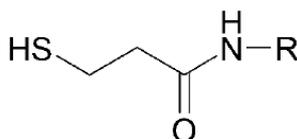
- 15 MS 12a: m/z 1205.9 = $[M+4H]^{4+}$; 1607.0 = $[M+3H]^{3+}$ (MW calculada = 4818.3 g/mol).

12b se sintetizó como se describe para 12a, excepto por el uso de GRF (1-29) en resina (120 mg, 12 μ mol).

Rendimiento: 11 mg

MS 12b: m/z 998.6 = $[M+4H]^{4+}$; 1330.5 = $[M+3H]^{3+}$ (MW calculada = 3989.6 g/mol).

Síntesis de mercaptopropionil-Exendin(fluoresceína) (12c) y mercaptopropionil-GRF (1-29) (fluoresceína) (12d)



12c: R = Exendin(ϵ K27-fluoresceína)

12d: R = GRF(1-29)(ϵ K21-fluoresceína)

- 20 El ácido trt-mercaptopropiónico se acopló de acuerdo con el método de acoplamiento estándar al Exendin-4 protegida con cadena lateral en resina (120 mg, 12 μ mol). La eliminación del grupo protector Mmt de Lys27 y 5,6-carboxi-fluoresceína-NHS éster se realizó como se describe para 12a. 12c se escindió de la resina y se purificó por RP-HPLC

Rendimiento: 13 mg

- 25 MS 12c: m/z 1545.6 = $[M+3H]^{3+}$ (MW calculada = 4633 g/mol).

12d se sintetizó como se describe para 12c, excepto por el uso de GRF (1-29) en resina (120 mg, 12 μ mol).

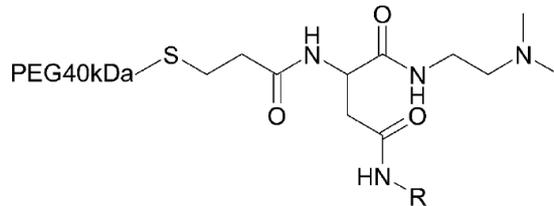
Rendimiento: 11 mg

MS 12d: m/z 1269.1 = [M+3H]³⁺ (MW calculada = 3804.3 g/mol).

Ejemplo 13

Síntesis del conjugado reversible PEG40kDa-enlazador-Exendin(Fluoresceína) (13a) y del conjugado reversible PEG40kDa-enlazador-GRF (1-29)(Fluoresceína) (13b)

5



13a: R = Exendin(εK27-fluoresceína)

13b: R = GRF(1-29)(εK21-fluoresceína)

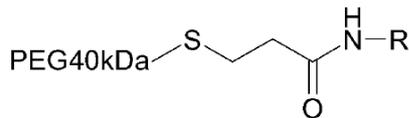
10 12a (12 mg) se disolvió en 500 µl de acetonitrilo/agua 1/1 y se agregaron 120 mg de PEG40kDa-maleimida en 1 ml de acetonitrilo/agua 1/1. Se añadieron 300 µl de regulador de fosfato de sodio 0.25 M a pH 7.0 y la solución se acidificó después de 10 minutos con 300 µl de ácido acético. 13a se purificó por cromatografía de intercambio catiónico, se desalinizó y luego se liofilizó.

Rendimiento: 51 mg

13b se sintetizó como se describe para 13a, excepto por el uso de 12b en lugar de 12a.

Rendimiento: 46 mg

15 Síntesis del conjugado permanente de PEG40kDa-Exendin(Fluoresceína) (13c) y del conjugado permanente de PEG40kDa-GRF (1-29)(Fluoresceína) (13d)



13c: R = Exendin(εK27-fluoresceína)

13d: R = GRF(1-29)(εK21-fluoresceína)

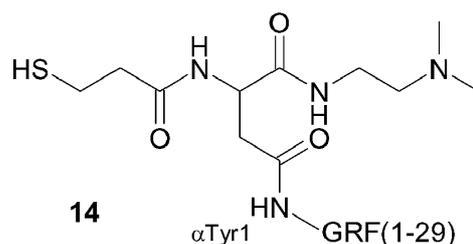
13c se sintetizó como se describe para 13a, excepto por el uso de 12c en lugar de 12a.

Rendimiento: 55 mg

20 13d se sintetizó como se describe para 13a, excepto por el uso de 12 en lugar de 12a. Rendimiento: 45 mg.

Ejemplo 14

Síntesis del conjugado enlazador-GRF (1-29) 14



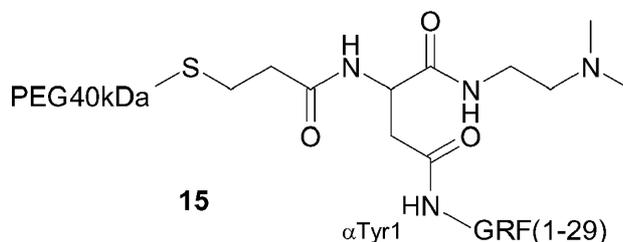
14 se sintetizó como se describe para 8c, excepto por el uso de resina GRF (1-29) protegida por cadena lateral.

Rendimiento: 10 mg

MS 14: m/z 908.2 = [M+4H]⁴⁺; 1211.2 = [M+3H]³⁺ (MW calculada = 3631.3 g/mol).

5 Ejemplo 15

Síntesis del conjugado PEG40kDa-enlazador-GRF (1-29) (15)

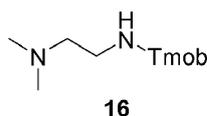


15 se sintetizó como se describe para 9c, excepto por el uso de citrato de sodio 14 y 10 mM, pH 4 como disolvente A y citrato de sodio 10 mM, pH 4 y cloruro de sodio 1 M como disolvente B para la cromatografía de intercambio catiónico.

Rendimiento: 11 mg

Ejemplo 16

Síntesis del intermedio enlazador 16



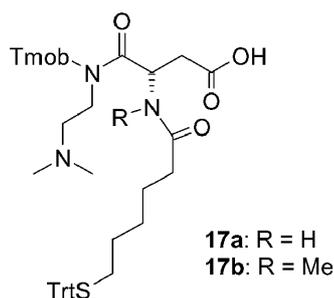
La N,N-dimetiletilendiamina (198 μ l, 1,8 mmol) y NaCNBH₃ (58 mg, 0,9 mmol) se disolvieron en metanol (5 ml) y se llevaron hasta pH 5,5 mediante la adición de AcOH (250 μ l). Se añadió una suspensión de 2,4,6,-trimetoxibenzaldehído (294 mg, 1,5 mmol) en EtOH (5 ml) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. Se añadió HCl 5 N (0,5 ml) y la mezcla se agitó durante 12 h más. El disolvente se eliminó bajo presión reducida; el residuo se disolvió en NaHCO₃ saturado y se extrajo 3x con DCM. Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre NaSO₄ y el disolvente se evaporó bajo presión reducida.

Rendimiento: 303 mg (1,13 mmol)

MS: m/z 269,3 = [M+H]⁺ (MW calculada = 268,4 g/mol)

Ejemplo 17

25 Síntesis del enlazador 17a y 17b



Síntesis del 17a:

5 Fmoc-Asp(OtBu)-OH (322 mg, 0.78 mmoles), diamina protegida con Tmob 16 (150 mg, 0.56 mmoles), HATU (255 mg, 0.67 mmoles) y DIEA (290 μ l, 1.68 mmoles) se disolvieron en DMF (1.5 ml). La mezcla se agitó durante 30 minutos, se acidificó con AcOH y se purificó por RP-HPLC.

Rendimiento: 463 mg (5.97 mmol, sal de TFA, aproximadamente 90% de pureza)

MS Fmoc-Asp(OtBu)-N(TMOB)CH₂CH₂N(CH₃)₂ : m/z 662.5 = [M+H]⁺ (MW calculada = 661.8 g/mol)

10 Fmoc-Asp(OtBu)-N(Tmob)CH₂CH₂N(CH₃)₂ (225 mg, 0.29 mmol) se disolvió en una solución de piperidina (50 μ l) y DBU (15 μ L) en DMF (1.5 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1.5 h. Se añadió AcOH y H-Asp(OtBu)-N(TMOB)CH₂CH₂N(CH₃)₂ se purificó mediante RP-HPLC.

Rendimiento: 114 mg (0.21 mmol, sal de TFA)

MS H-Asp(OtBu)-N(Tmob)CH₂CH₂N(CH₃)₂: m/z 462.4 = [M+Na]⁺ (MW calculada = 439.6 g/mol)

15 La sal de TFA de H-Asp(OtBu)-N(Tmob)CH₂CH₂N(CH₃)₂ (114 mg, 0.21 mmol) se disolvió en una NaHCO₃ saturado (10 ml) y se extrajo 3x con DCM (3x 10 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre NaSO₄ y el disolvente se eliminó bajo presión reducida. El residuo se disolvió en DMF (1.0 ml), se añadieron ácido 6-tritilmercaptohexanoico (121 mg, 0.31 mmol), HATU (118 mg, 0.31 mmol) y DIEA (108 μ l, 0.62 mmol). La mezcla se agitó durante 30 min. Se añadió AcOH (200 μ L) y TrtS(CH₂)₅CONH-Asp(OtBu)-N(Tmob)CH₂CH₂N(CH₃)₂ se purificó mediante RP-HPLC.

Rendimiento: 95 mg (0.10 mmol, sal de TFA)

MS TrtS(CH₂)₅CONH-Asp(OtBu)-N(Tmob)CH₂CH₂N(CH₃)₂: m/z 812.64 = [M+H]⁺ (MW calculada = 812.1 g/mol)

20 TrtS(CH₂)₅CONH-Asp(OtBu)-N(Tmob)CH₂CH₂N(CH₃)₂ (95 mg, 0.10 mmol) se disolvió en una mezcla 3: 1 de MeOH/H₂O (1.0 ml), se añadió LiOH (7.4 mg, 0.31 mmol) y la mezcla se agitó durante 5 horas a 60°C. Se añadió AcOH (100 μ l) y 17a se purificó por RP-HPLC.

Rendimiento: 64 mg (0.07 mmol, sal de TFA)

MS 17a: m/z 756.5 = [M + H] + (MW calculada = 756.0 g/mol)

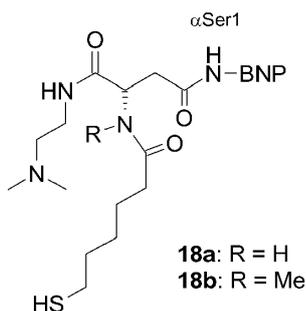
25 17b se sintetizó como se describió anteriormente, excepto por el uso de Fmoc-NMe-Asp(OtBu)-OH en lugar de Fmoc-Asp(OtBu)-OH en la primera etapa.

Rendimiento 17b: 16 mg (18 μ mol, sal de TFA)

MS 17b: m/z 770.5 = [M+H]⁺ (MW calculada = 770.0 g/mol)

Ejemplo 18

30 Síntesis de los conjugados enlazador-BNP 18a y 18b



Síntesis de 18a:

5 17a (8.0 mg, 0.01 mmol), PyBOP (5.2 mg, 10 μ mol) y DIEA (7 μ L, 40 μ mol) se disolvieron en DMF (400 μ L) y se agregaron inmediatamente a BNP-32a protegida por cadena lateral unida a resina (50 mg), 5 μ mol). Después de la incubación durante 2 horas a temperatura ambiente, la resina se lavó con 10x DMF, 10x DCM y se secó al vacío. El producto se escindió de la resina y se purificó por RP-HPLC.

Rendimiento: 10.6 mg

MS 18a: m/z 930.4 = [M+4H]⁴⁺; 1240.1 = [M+3H]³⁺ (MW calculada = 3717.2 g/mol)

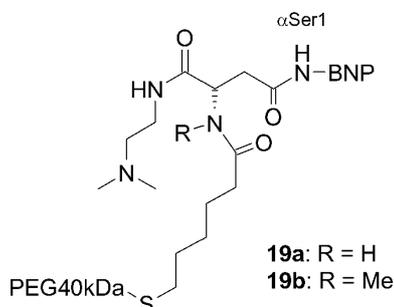
18b se sintetizó como se describió anteriormente, excepto por el uso de 17b en lugar de 17a.

10 Rendimiento: 4.7 mg

MS 18b: m/z 933.9 = [M+4H]⁴⁺; 1244.7 = [M+3H]³⁺ (MW calculada = 3731.0 g/mol)

Ejemplo 19

Síntesis de los conjugados PEG40kDa-enlazador-BNP 19a y 19b



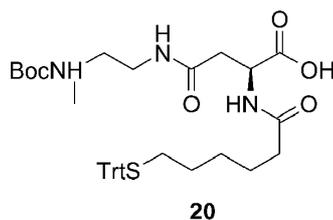
15 Se disolvió 18a (5.2 mg) en H₂O/acetonitrilo 1: 1 que contenía TFA al 0.1% (200 μ l). Se añadió una solución de PEG40kDa-maleimida (70 mg) en H₂O/acetonitrilo 1:1 (1.5 ml) y regulador de fosfato (30 μ L, pH 7.4, 0.5 M). La solución se incubó a temperatura ambiente, después de 5 minutos, se agregó AcOH (30 μ L). 19a se purificó por cromatografía de intercambio catiónico, se desalinizó y se liofilizó.

20 Rendimiento: 19.2 mg

19b se sintetizó como se describe para 19a, excepto por el uso de 18b en lugar de 18a.

Ejemplo 20

Síntesis del enlazador 20



Fmoc-Asp(OH) OtBu (100 mg, 0.24 mmol), H₂N-(CH₂)₂-N(CH₃)-boc (36 μ L, 0.20 mmol), HATU (92 mg, 0.24 mmol) y DIEA (105 μ L, 0.60 mmol) se disolvieron en 1 ml de DMF. La mezcla se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente, se acidificó con AcOH (100 μ l) y se purificó por HPLC.

5 Rendimiento: 91 mg (0.13 mmol)

MS Fmoc-Asp(NH(CH₂)₂N(CH₃)-boc)OtBu: 590.3 = [M+Na]⁺ (MW calculada = 567.7 g/mol)

Se disolvió Fmoc-Asp(NH(CH₂)₂N(CH₃)-boc)OtBu (91 mg, 0.13 mmol) en DMF (1,0 ml), se agregaron piperidina (50 μ l) y DBU (15 μ L) y la mezcla se agitó durante 45 min a temperatura ambiente. Se añadió AcOH (100 μ L) y NH₂-Asp(NH(CH₂)₂N(CH₃)-boc)OtBu se purificó mediante RP-HPLC.

10 Rendimiento: 39 mg (0,09 mmol, sal de TFA)

MS NH₂-Asp(NH(CH₂)₂N(CH₃)-boc)OtBu: m/z 368.1 = [M+Na]⁺ (MW calculada = 345.4 g/mol)

NH₂-Asp(NH(CH₂)₂N(CH₃)-boc)OtBu (36 mg, 0.09 mmol) se disolvió en DMF (0.5 ml), se agregaron ácido 6-tritilmercaptohexanoico (55 mg, 0.14 mmol), HATU (53 mg, 0.14 mmol) y DIEA (49 μ L, 0.28 mmol). La mezcla se agitó durante 45 min. Se añadió AcOH (100 μ l) y TrtS(CH₂)₅CONH-Asp(NH(CH₂)₂N(CH₃)-boc)OtBu se purificó por RP-HPLC.

15

Rendimiento: 41 mg (0.06 mmol)

MS TrtS(CH₂)₅CONH-Asp(NH(CH₂)₂N(CH₃)-boc)OtBu: m/z 740.6 = [M+Na]⁺ (MW calculada = 718.0 g/mol)

TrtS(CH₂)₅CONH-Asp(NH(CH₂)₂N(CH₃)-boc)OtBu (41 mg, 0.06 mmol) se disolvió en 1:1 dioxano/H₂O (1.0 ml), se agregó LiOH (4.1 mg, 0.17 mmol) y la mezcla se agitó a 60°C durante 1 h. Se añadió AcOH (50 μ l) y 20 se purificó por RP-HPLC.

20

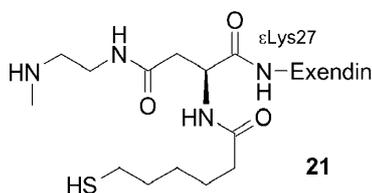
Rendimiento: 31 mg (0.05 mmol)

MS 20: m/z 684.5 = [M+Na]⁺ (MW calculada = 661.9 g/mol)

Ejemplo 21

Síntesis del conjugado enlazador-exendin 21

25



El exendin protegido por la cadena lateral unido a la resina (50 mg, 5 μ mol) con un grupo protector Mmt en Lys27 se protegió primero con boc en el terminal N (véase Materiales y Métodos) y luego se incubó cinco veces (5 min) con 2 ml de 9/1 (v/v) DCM/HFIP para eliminar el grupo protector Mmt de Lys27. 20 (6.6 mg, 10 μ mol), PyBOP (5.2 mg, 10 μ mol) y DIEA (7 μ L, 40 μ mol) se disolvieron en DMF (400 μ L) y se añadieron inmediatamente a la resina. Incubación durante 3 horas a temperatura ambiente, la resina se lavó con 10x DMF, 10x DCM y se secó al vacío. El producto se escindió de la resina y se purificó por RP-HPLC.

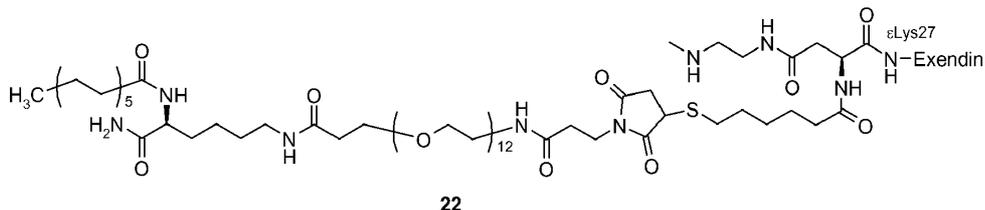
30

Rendimiento: 2.4 mg

MS 21: m/z 1497.2 = [M+3H]³⁺ (MW calculada = 4488.0 g/mol)

35 Ejemplo 22

Síntesis del conjugado de ácido graso-enlazador-exendin 22



21 (2.6 mg) se disolvieron en 200 μ l de 1/1 de acetonitrilo/agua y se añadió 1 (0.8 mg) en 400 μ l de 7/3 de acetonitrilo/agua. Se añadieron 100 μ l de regulador de fosfato de sodio 0.25 M, la reacción se agitó durante 5 minutos, después de lo cual se purificó 22 por RP-HPLC.

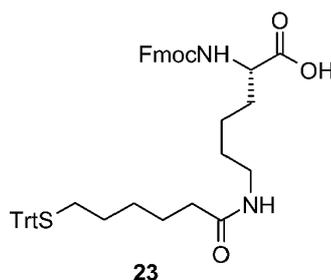
Rendimiento: 2.4 mg

MS 22: m/z 1388.3 = [M+4H]⁴⁺; 1857.1 = [M+3H]³⁺ (MW calculada = 5566.4 g/mol).

Ejemplo 23

Síntesis del precursor 23

10



El ácido 6-tritilmercaptohexanoico (200 mg, 0.51 mmoles), (PfpO)₂CO (202 mg, 0.51 mmoles) y colidina (340 μ l, 2.65 mmoles) se disolvieron en DMSO (1 ml) y se agitaron durante 30 min a temperatura ambiente. La mezcla se añadió a una solución de Fmoc-Lys-OH (170 mg, 0.46 mmol) en H₂O/piridina/tBuOH (3:3:1, 6 ml). La reacción se calentó a 60°C durante 2 h, se diluyó con EtOAc, se extrajo 2x con H₂SO₄ 0.1 M, 2x con salmuera y se secó sobre Na₂SO₄. El disolvente se evaporó bajo presión reducida y el residuo se purificó por RP-HPLC.

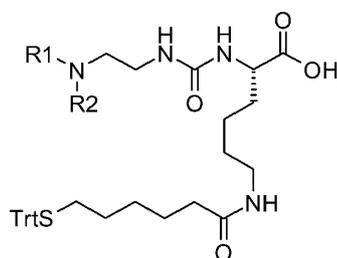
15

Rendimiento: 109 mg

MS 23: m/z 741.3 [M+H]⁺ (MW calculada = 741.0 g/mol)

Ejemplo 24

20 Síntesis del enlazador 24a-24c



24a: R1 = H, R2 = boc
24b: R1 = Me, R2 = boc
24c: R1 = R2 = Me

23 (186 mg, 0.25 mmol) y DIEA (160 μ l, 0.92 mmol) se disolvieron en DCM (2 ml), se añadieron a resina de cloruro de 2-clorotritilo (312 mg, 1.3 mmol/g) y se agitaron durante 45 minutos a temperatura ambiente. Se añadió MeOH (0.6 ml) y la resina se incubó durante otros 15 minutos. La resina se lavó con DCM (10x) y DMF (10x). La desprotección de Fmoc y la formación de urea se lograron de acuerdo con los procedimientos generales (véase Materiales y Métodos)

25

por reacción con N-boc-etilendiamina (57 μL , 0.34 mmol), el producto se escindió de la resina y se purificó por RP-HPLC.

Rendimiento: 14 mg

MS 24a: m/z 705.4 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 727.3 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (MW calculada = 704.9 g/mol)

- 5 24b se sintetizó como se describe para 24a, excepto por el uso de N-boc-N-metiletildiamina en lugar de N-boc-etildiamina.

Rendimiento: 21 mg

MS 24b: m/z 719.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 741.4 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (MW calculada = 719.0 g/mol)

- 10 24c se sintetizó como se describe para 24a, excepto por el uso de N,N-dimetiletildiamina en lugar de N-boc-etildiamina.

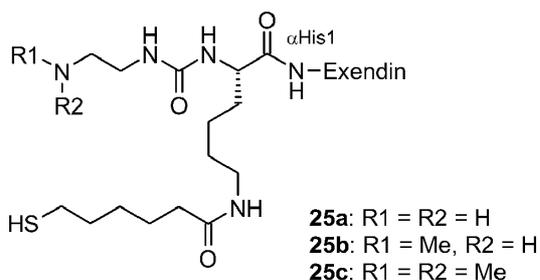
Rendimiento: 10 mg

MS 24c: m/z 633.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (MW calculada = 632.9 g/mol)

Ejemplo 25

Síntesis de conjugados de exendin-enlazador 25a-25c

15



- 20 24a (7.0 mg, 0.01 mmol), PyBOP (5.2 mg, 10 μmol) y DIEA (7 μL , 40 μmol) se disolvieron en DMF (250 μL), se añadieron inmediatamente al exendin protegido por cadena lateral unido a la resina (50 mg, 5 μmol) y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. La resina se lavó con DMF (10x), DCM (10x) y se secó al vacío. El producto se escindió de la resina y se purificó por RP-HPLC.

Rendimiento: 1.6 mg

MS 25a: m/z 1511.8 = $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ (MW calculada = 4530.8 g/mol)

25b se sintetizó como se describe para 25a, excepto por el uso de 24b en lugar de 24a.

Rendimiento: 4.3 mg

- 25 MS 25b: m/z 1516.3 = $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ (MW calculada = 4544.8 g/mol)

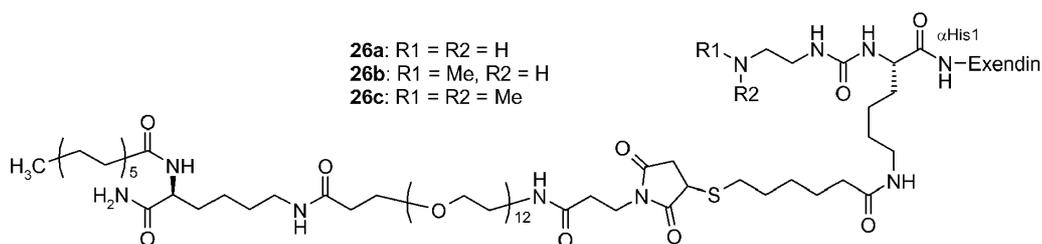
25c se sintetizó como se describe para 25a, excepto por el uso de 24c en lugar de 24a.

Rendimiento: 1.3 mg

MS 25c: m/z 1520.4 = $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ (MW calculada = 4558.8 g/mol)

Ejemplo 26

- 30 Síntesis de conjugados de ácidos grasos-enlazadores 26a-26c



25a (1,6 mg) se disolvió en 200 μ l de 1/1 de acetonitrilo/agua y se agregó 1 (0,11 mg) en 200 μ l de 7/3 de acetonitrilo/agua. Se añadieron 30 μ l de regulador de fosfato de sodio 0.25 M, la reacción se agitó durante 5 minutos, después de lo cual se purificó 26a por RP-HPLC.

5 MS 26a: m/z 1870.0 = [M+3H]³⁺ (MW calculada = 5609.2 g/mol).

26b se sintetizó como se describa para 26a excepto por el uso de 25b en lugar de 25a.

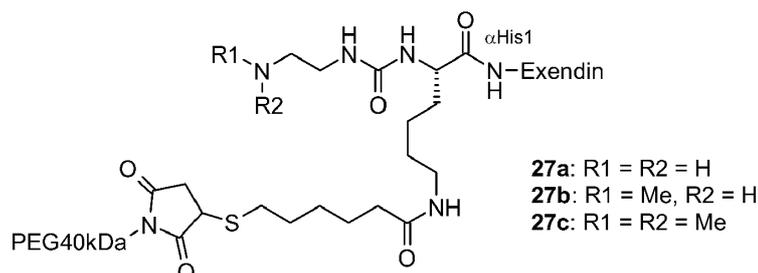
MS 26b: m/z 1875.9 = [M+3H]³⁺, 1406.7 = [M+4H]⁴⁺ (MW calculada = 5623.2 g/mol)

26c se sintetizó como se describa para 26a excepto por el uso de 25c en lugar de 25a.

MS 26c: m/z 1879.4 = [M+3H]³⁺, 1410.5 = [M+4H]⁴⁺ (MW calculada = 5637.2 g/mol)

10 Ejemplo 27

Síntesis de los conjugados 20KDa-PEG-enlazador-exendin 27a-27c



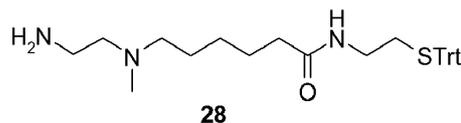
15 Se disolvió 25a (2,0 mg) en H₂O/MeCN 1:1 que contenía TFA al 0.1% (200 μ l). Se añadió una solución de PEG40KDa-maleimida (18 mg) en 1:1 H₂O/MeCN (1 ml) y regulador de fosfato (15 μ l, pH 7.4, 0.5 M). La solución se incubó a temperatura ambiente, después de 5 minutos, se agregó AcOH (20 μ l) y 27a se purificó por cromatografía de intercambio catiónico, se desalinizó y se liofilizó.

27b se sintetizó como se describa para 27a excepto por el uso de 25b en lugar de 25a.

27c se sintetizó como se describa para 27a excepto por el uso de 25c en lugar de 25a.

20 Ejemplo 28

Síntesis del enlazador 28:



25 Se disolvió cloruro de 6-bromohexanoilo (46 μ l, 0.31 mmol) en 0.2 ml de CH₂Cl₂ y se añadió a una solución de H₂N-CH₂-CH₂-STrt (100 mg, 0.28 mmol), DIEA (97 μ l, 0.56 mmol) en CH₂Cl₂ (0,8 ml). La mezcla se agitó durante 2 h a TA. La mezcla de reacción se acidificó con AcOH (50 μ l) y el disolvente se eliminó a vacío. El residuo se purificó en sílica gel (heptano/EtOAc = 1: 1) para obtener Br-(CH₂)₅-CONH-(CH₂)₂-STrt.

Rendimiento: 137 mg (0.276 mmol, 98 %)

MS Br-(CH₂)₅-CONH-(CH₂)₂-STrt: 518.9 = [M+Na]⁺, (MW calculada = 496.5 g/mol)

Se añadió N-Boc-etilendiamina (81 μ l, 0.51 mmol) a una solución de Br-(CH₂)₅-CONH-(CH₂)₂-STrt (230 mg, 0.46 mmol) y Na₂CO₃ (196 mg, 1.85 mmol) en DMF (0.8 ml). La mezcla de reacción se agitó durante 10 h a 70°C. Después de enfriar hasta TA, la mezcla se diluyó con 4 ml (MeCN/H₂O = 25:75, con 0.1% de TFA) y se purificó por RP-HPLC para obtener Boc-NH-(CH₂)₂-NH-(CH₂)₅-CONH-(CH₂)₂-STrt.

5 Rendimiento: 189 mg (0.27 mmol, 59%, sal de TFA)

MS Boc-NH-(CH₂)₂-NH-(CH₂)₅-CONH-(CH₂)₂-STrt: 576.5 = [M + H]⁺, (PM calculado = 575.5 g/mol)

10 Boc-NH-(CH₂)₂-NH-(CH₂)₅-CONH-(CH₂)₂-STrt (189 mg, 0.27 mmol) y HCHO (35% acuoso, 113 μ l) se disolvieron en MeCN (1.5 ml) y se añadió NaCNBH₃ (34 mg, 0.54 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 5 h a TA. Una vez completada la reacción (MS), la solución se diluyó con H₂O (5 ml) y se extrajo con CH₂Cl₂ (3 x 5 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y el disolvente se eliminó a vacío. El residuo se purificó por RP-HPLC para obtener Boc-NH-(CH₂)₂-N(CH₃)-(CH₂)₅-CONH-(CH₂)₂-STrt.

Rendimiento: 62.8 mg (0.11 mmol, 39 %)

MS Boc-NH-(CH₂)₂-N(CH₃)-(CH₂)₅-CONH-(CH₂)₂-STrt: 590.6 = [M+H]⁺, (MW calculada = 589.0 g/mol)

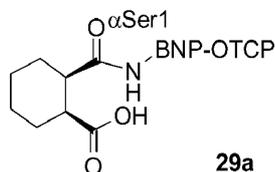
15 Boc-NH-(CH₂)₂-N(CH₃)-(CH₂)₅-CONH-(CH₂)₂-STrt (62.8 mg, 0.11 mmol) se disolvió en THF (6 ml) y se agregó HCl en dioxano (130 μ l, 4 M). La mezcla de reacción se agitó durante 12 h a TA. Se añadieron 200 μ l de HCl en dioxano y el disolvente se eliminó a vacío. El residuo se purificó por RP-HPLC para dar H₂N-(CH₂)₂-N(CH₃)-(CH₂)₅-CONH-(CH₂)₂-STrt y no se consumió el material de partida Boc-NH-(CH₂)₂-N(CH₃)-(CH₂)₅-CONH-(CH₂)₂-STrt.

Rendimiento: 32.8 mg (0.062 mmol, 44%, sal de HCl) 28 y 14.7 mg (0,025 mmol, 23%, sal de TFA) de material de partida

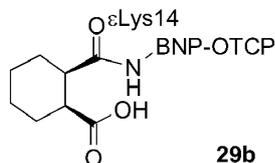
20 MS 28: 490.5 = [M+H]⁺, (MW calculada = 489.0 g/mol)

Ejemplo 29

Procedimiento general para la síntesis de precursores de BNP sustituidos con ácido carboxílico 29a y 29b



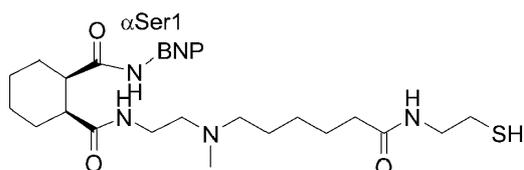
25 El anhídrido cis-ciclohexano-1,2-dicarboxílico (231 mg, 1.5 mmol) y la piridina (271 μ l, 2 mmol) se disolvieron en DCM (2 ml) y se agregaron a BNP-32a protegida por cadena lateral unida a resina (300 mg). Incubación durante 1 hora a temperatura ambiente, se lava con 10 x DCM y se seca al vacío.



30 La BNP-32b protegida por cadena lateral unida a la resina, que lleva un grupo protector ivDde en Lys14, primero se protegió con boc en el terminal N, se desprotegió en la posición Lys14 (véase Materiales y Métodos) y luego se hizo reaccionar con anhídrido cis-ciclohexano-1,2-dicarboxílico como se describe anteriormente para 29a.

Ejemplo 30

Síntesis de BNP-enlazador-tioles 30a y 30b.

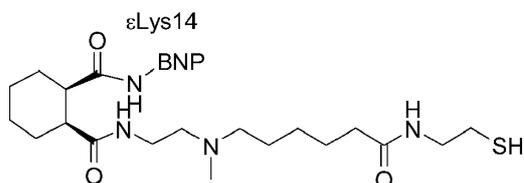


30a

5 $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_2-\text{N}(\text{CH}_3)-(\text{CH}_2)_5-\text{CONH}-(\text{CH}_2)_2-\text{Strt}$ 28 (5.2 mg, 0.01 mmol), PyBOP (5.2 mg, 0.01 mmol) y DIEA (7.0 μl , 0.04 mmol) se disolvieron en DMF (300 μl) y se añadieron a BNP 29a protegida por cadena lateral unida a la resina, (50 mg, 0.005 mmol). Incubación durante 2 horas a temperatura ambiente, la resina se lavó con DMF (10x), DCM (10x) y se secó al vacío. El producto se escindió de la resina y se purificó por RP-HPLC.

Rendimiento: 9.8 mg

MS 30a: m/z 947.6 = $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$, 1263.1 = $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ (MW calculada = 3786.3 g/mol)



30b

10 30b se sintetizó como se describió anteriormente, excepto por el uso del derivado de BNP 29b unido a la resina en lugar de 29a.

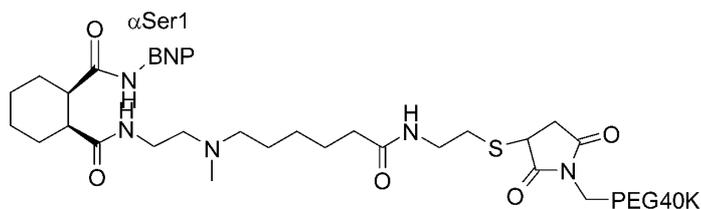
Rendimiento: 7.4 mg

MS 30b: m/z 947.5 = $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$, 1263.0 = $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ (MW calculada = 3786.3 g/mol)

Ejemplo 31

Síntesis de los conjugados 40KDa-PEG-enlazador-BNP 31a y 31b

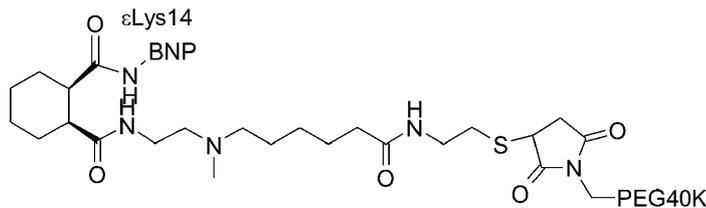
15



31a

20 Se disolvió 30a (4 mg) en $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ 1:1 que contenía TFA al 0.1% (200 μl). Se añadió una solución de PEG40KDa-maleimida (42.2 mg) en 1:1 $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ (1 ml) y regulador de fosfato (15 μl , pH 7.4, 0.5 M). La solución se incubó a temperatura ambiente, después de 5 minutos, se añadió AcOH (20 μl) y 31a se purificó por cromatografía de intercambio catiónico, se desalinizó y se liofilizó.

Rendimiento: 2.0 mg

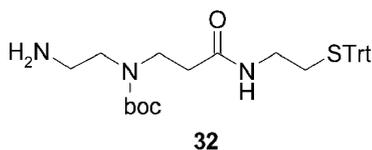


31b

31b se sintetizó como se describe para 31a, excepto por el uso de 30b en lugar de 30a. Rendimiento: 16.8 mg.

Ejemplo 32

Síntesis del enlazador 32



- 5 Se disolvió cloruro de 3-bromopropionilo (62.5 μ l, 0.62 mmol) en 0.5 ml de CH_2Cl_2 y se añadió a una solución de $\text{H}_2\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-STrt}$ (200 mg, 0.56 mmol), DIEA (196 μ l, 1.1 mmol) en CH_2Cl_2 (1 ml). La mezcla se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se acidificó con AcOH (100 μ l) y el disolvente se eliminó a vacío. El residuo se purificó sobre sílica gel (heptano/EtOAc = 1: 1) para obtener $\text{Br-(CH}_2)_2\text{CONH-(CH}_2)_2\text{-STrt}$.

Rendimiento: 223 mg (0.49 mmol, 87 %)

MS $\text{Br-(CH}_2)_2\text{CONH-(CH}_2)_2\text{-STrt}$: 478.7 = $[\text{M}+\text{Na}]^+$, (MW calculada = 454.7 g/mol)

- 10 Se añadieron sal de HCl de N-Alloc-etilendiamina (43.5 mg, 0.24 mmol) y DIEA (38 μ l, 0.22 mmol) a una solución de $\text{Br-(CH}_2)_2\text{CONH-(CH}_2)_2\text{-STrt}$ (100 mg, 0.22 mmol) y Na_2CO_3 (93 mg, 0.87 mmol) en DMF (1 ml). La mezcla de reacción se agitó durante 10 h a 70°C. Después de enfriar hasta temperatura ambiente, la mezcla de reacción se diluyó con 4 ml ($\text{MeCN/H}_2\text{O}$ = 25:75, con 0.1% de TFA) y se purificó por HPLC para obtener $\text{Alloc-NH-(CH}_2)_2\text{-NH-(CH}_2)_2\text{-CONH-(CH}_2)_2\text{-STrt}$.

- 15 Rendimiento: 61 mg (0,096 mmol, 44%, sal de TFA)

MS $\text{Alloc-NH-(CH}_2)_2\text{-NH-(CH}_2)_2\text{-CONH-(CH}_2)_2\text{-STrt}$: 540.8 = $[\text{M}+\text{Na}]^+$, (MW calculada = 517.8. g/mol)

- 20 Se disolvió $\text{Alloc-NH-(CH}_2)_2\text{-NH-(CH}_2)_2\text{-CONH-(CH}_2)_2\text{-STrt}$ (60.9 mg, 0.096 mmol) en CH_2Cl_2 y se añadió Boc_2O (42 mg, 0.19 mmol). La solución se agitó durante 20 horas a temperatura ambiente. Una vez completada, la reacción se detuvo mediante la adición de 70 μ l de AcOH y el disolvente se eliminó al vacío. El residuo se diluyó con 4 ml de $\text{MeCN/H}_2\text{O}$ (25:75, con 0.1% de TFA) y se purificó por RP-HPLC para dar $\text{Alloc-NH-(CH}_2)_2\text{-N(Boc)-(CH}_2)_2\text{-CONH-(CH}_2)_2\text{-STrt}$.

Rendimiento: 53.3 mg (0.086 mmol, 89 %)

MS $\text{Alloc-NH-(CH}_2)_2\text{-N(Boc)-(CH}_2)_2\text{-CONH-(CH}_2)_2\text{-STrt}$: 640.6 = $[\text{M}+\text{Na}]^+$, (MW calculada = 617.9. g/mol)

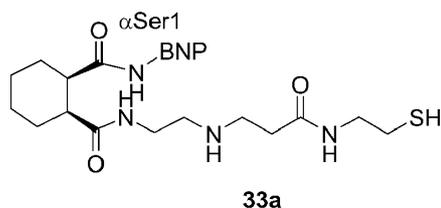
- 25 $\text{Alloc-NH-(CH}_2)_2\text{-N(Boc)-(CH}_2)_2\text{-CONH-(CH}_2)_2\text{-STrt}$ (48.3 mg, 0.078 mmol) se disolvió en THF, se agregaron formiato de trietilamonio (62 μ l) y $\text{Pd(PPh}_3)_4$ (16 mg). La solución se agitó durante 12 horas a temperatura ambiente y se monitorizó por MS. Después de completarse, el disolvente se eliminó al vacío. El residuo se disolvió en $\text{MeCN/H}_2\text{O}$ (50:50, con 0.1% de TFA) y se purificó por RP-HPLC para dar $\text{H}_2\text{N-(CH}_2)_2\text{-N(Boc)-(CH}_2)_2\text{-CONH-(CH}_2)_2\text{-STrt}$ (31).

Rendimiento: 20,1 mg (0,031 mmol, 40%, sal de TFA)

MS 31: 534.6 = $[\text{M}+\text{H}]^+$, 556.6 = $[\text{M}+\text{Na}]^+$, (MW calculada = 533.5 g/mol)

30 **Ejemplo 33**

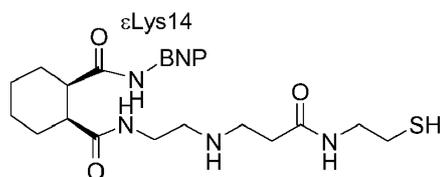
Síntesis de BNP-enlazador-tioles 33a y 33b



33a se sintetizó como se describe para 30a, excepto por el uso de 32 en lugar de 28.

- 35 Rendimiento: 8.0 mg

MS 33a: m/z 933.5 = $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$, 1244.3 = $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ (MW calculada = 3729.9 g/mol)

**33b**

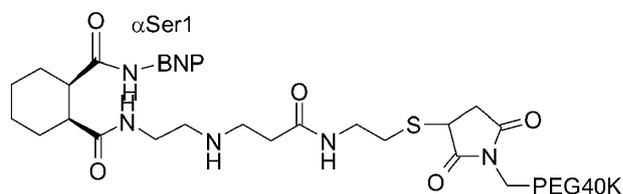
33b se sintetizó como se describe para 30b, excepto por el uso de 32 en lugar de 28.

Rendimiento: 5.0 mg

MS 33b: m/z 933.5 = $[M+4H]^{4+}$, 1244.3 = $[M+3H]^{3+}$ (MW calculada = 3715.9 g/mol)

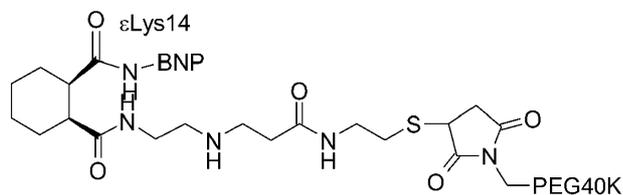
5 Ejemplo 34

Síntesis de los conjugados 40KDa-PEG-enlazador-BNP 34a y 34b

**34a**

- 10 Se disolvió 33a (4,3 mg) en $H_2O/MeCN$ 1:1 que contenía TFA al 0.1% (200 μ l). Se añadió una solución de PEG40KDa-maleimida (46.8 mg) en 1:1 $H_2O/MeCN$ (1 ml) y regulador de fosfato (20 μ l, pH 7.4, 0.5 M). La solución se incubó a temperatura ambiente, después de 5 minutos, se añadió AcOH (20 μ l) y 34a se purificó por cromatografía de intercambio catiónico, se desalinizó y se liofilizó.

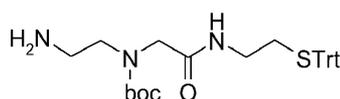
Rendimiento: 9.7 mg

**34b**

- 15 34b se sintetizó como se describe para 34a, excepto por el uso de 33b en lugar de 33a. Rendimiento: 11.5 mg.

Ejemplo 35

Síntesis del enlazador 35

**35**

- 20 Se disolvió bromuro de bromoacetilo (54 μ l, 0.62 mmol) en 0.5 ml de CH_2Cl_2 y se agregó a una solución de $H_2N-CH_2-CH_2-STrt$ (200 mg, 0.56 mmol) y DIEA (196 μ l, 1,1 mmol) en CH_2Cl_2 (1 ml). La mezcla se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se acidificó con AcOH (100 μ l) y el disolvente se eliminó a vacío. El residuo se purificó sobre sílica gel (heptano/EtOAc = 1:1) para obtener el producto $Br-CH_2-CONH-(CH_2)_2-STrt$.

Rendimiento: 245 mg (0.55 mmol, 99 %)

- 25 MS $Br-CH_2-CONH-(CH_2)_2-STrt$: 462.4 = $[M+Na]^+$, (MW calculada = 440.4 g/mol)

5 Se añadió sal de HCl N-Alloc-etilendiamina (45 mg, 0.25 mmol) y DIEA (79 μ l, 0.45 mmol) a una solución de Br-CH₂-CONH-(CH₂)₂-STrt (100 mg, 0.23 mmol) en DMF (1 ml). La mezcla de reacción se agitó durante 10 h a 70°C. Después de enfriar hasta temperatura ambiente, la mezcla de reacción se diluyó con H₂O/Et₂O (1: 1, 40 ml) y las capas se separaron. La capa acuosa se extrajo varias veces con Et₂O. Las capas orgánicas combinadas se secaron con MgSO₄, se filtraron y el disolvente se eliminó a vacío. El residuo se purificó sobre sílica gel (DCM/MeOH = 95: 5) para dar Alloc-NH-(CH₂)₂-NH-CH₂-CONH-(CH₂)₂-STrt.

Rendimiento: 94 mg (0.186 mmol, 82%, contiene DMF residual)

MS Alloc-NH-(CH₂)₂-NH-CH₂-CONH-(CH₂)₂-STrt: 526.8 = [M+Na]⁺, (MW calculada = 503.8. g/mol)

10 Se disolvió Alloc-NH-(CH₂)₂-NH-CH₂-CONH-(CH₂)₂-STrt (94 mg, 0.186 mmol, con DMF) en CH₂Cl₂ y se añadió Boc₂O (81 mg, 0.37 mmol). La solución se agitó durante 20 horas a temperatura ambiente. Una vez completada, la reacción se inactivó mediante la adición de 100 μ l de AcOH y el disolvente se eliminó al vacío. El residuo se diluyó con 4 ml de MeCN/H₂O (25:75, con 0.1% de TFA) y se purificó por RP-HPLC para dar Alloc-NH-(CH₂)₂-N(Boc)-CH₂-CONH-(CH₂)₂-STrt.

Rendimiento: 34.7 mg (0.057 mmol, 26 %)

15 MS Alloc-NH-(CH₂)₂-N(Boc)-CH₂-CONH-(CH₂)₂-STrt: 603.9 = [M+Na]⁺, (MW calculada = 603.9. g/mol)

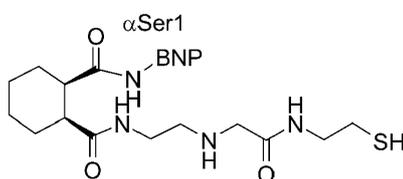
Alloc-NH-(CH₂)₂-N(Boc)-CH₂-CONH-(CH₂)₂-STrt (34.7 mg, 0.048 mmol) se disolvió en THF, se agregaron formiato de trietilamonio (38 μ l) y Pd(PPh₃)₄ (5 mg). La solución se agitó durante 12 horas a temperatura ambiente y se monitorizó por MS. Después de completarse, el disolvente se eliminó al vacío. El residuo se disolvió en MeCN/H₂O (50:50, con 0.1% de TFA) y se purificó por RP-HPLC para dar H₂N-(CH₂)₂-N(Boc)-CH₂-CONH-(CH₂)₂-STrt 35.

20 Rendimiento: 12.6 mg (0.019 mmol, 42%, sal de TFA)

MS 35: 520.1 = [M + H]⁺, 542.2 = [M + Na]⁺, (MW calculada = 519.2 g/mol)

Ejemplo 36

Síntesis de BNP-enlazador-tioles 36a y 36b

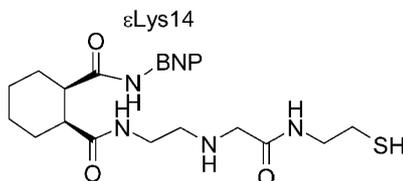


25 **36a**

36a se sintetizó como se describe para 30a, excepto por el uso de 35 en lugar de 28.

Rendimiento: 9.1 mg

MS 36a: m/z 930.0 = [M+4H]⁴⁺, 1239.6 = [M+3H]³⁺ (MW calculada = 3715.9 g/mol)



30 **36b**

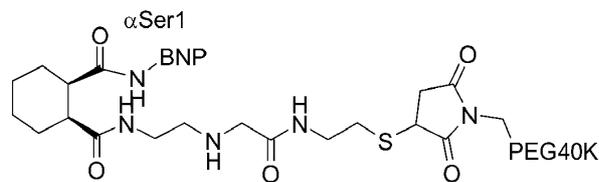
36b se sintetizó como se describe para 30b, excepto por el uso de 35 en lugar de 28.

Rendimiento: 8.0 mg

MS 36b: m/z 929.9 = [M+4H]⁴⁺, 1239.5 = [M+3H]³⁺ (MW calculada = 3715.9 g/mol)

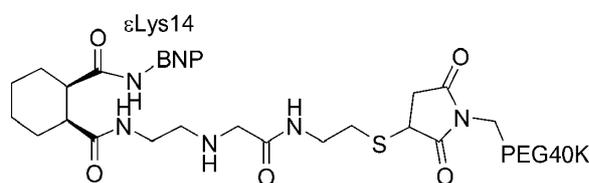
Ejemplo 37

Síntesis de los conjugados 40KDa-PEG-enlazador-BNP 37a y 37b

**37a**

5 36a (4.2 mg) se disolvió en H₂O/MeCN 1:1 que contenía TFA al 0.1% (200 μ l). Se añadió una solución de PEG40KDa-maleimida (68 mg) en H₂O/MeCN 1:1 (1 ml) y regulador de fosfato (20 μ l, pH 7.4, 0.5 M). La solución se incubó a temperatura ambiente, después de 5 minutos se añadió AcOH (20 μ l) y se purificó 37a mediante cromatografía de intercambio iónico, se desalinizó y se liofilizó.

Rendimiento: 16 mg

**37b**

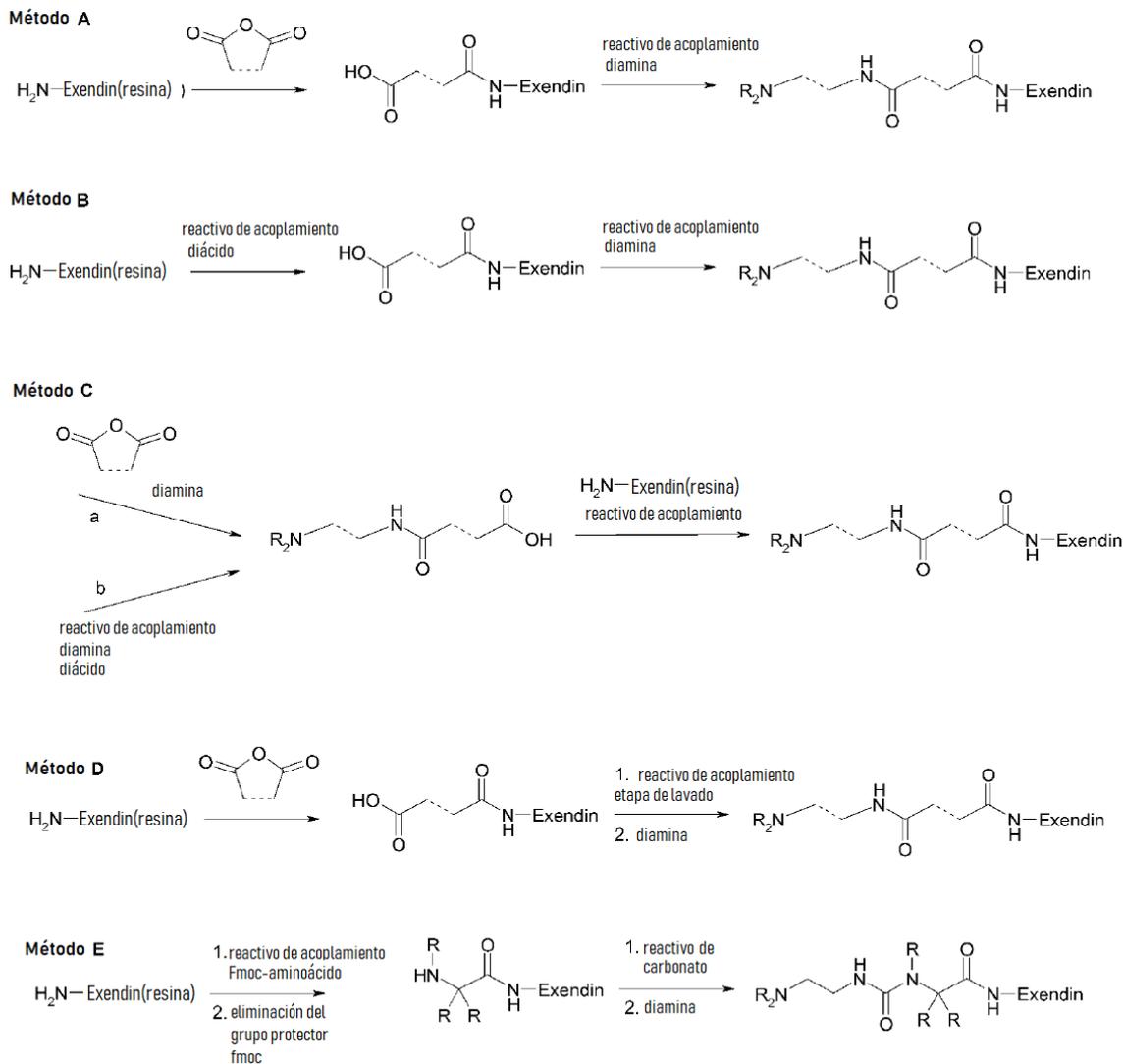
37b se sintetizó como se describe para 37a, excepto por el uso de 36b en lugar de 36a.

10 Rendimiento: 18.5 mg

Ejemplo 38

Síntesis de conjugados enlazador-exendin

Los conjugados enlazador-exendin se sintetizaron de acuerdo con el método de síntesis general A, B, C, D, E o F.



Método A

5 Síntesis: Se disolvieron anhídrido diácido (0.2 mmol) y piridina (0,2 mmol) en 0.3 ml de DMF seco. La mezcla se añadió al exendin-4 protegida con cadena lateral en resina (2 μ mol) y se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente. La resina se lavó con DMF (10 veces). PyBOP (0.1 mmol) y diamina (0.1 mmol) se disolvieron en 0.3 ml de DMF seco. La mezcla se añadió a la resina y se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente. La resina se lavó con DMF (10 veces). Los conjugados de exendin- enlazador se escindieron y se purificaron por RP-HPLC como se describe en "Materiales y métodos".

Método B

10 Síntesis: como se describe para el Método A, excepto que el anhídrido diácido y la piridina se reemplazan por diácido (0.2 mmol), HOBt (0.2 mmol), DIC (0.2 mmol) y colidina (0.4 mmol).

Método C

15 Síntesis. Se disolvió diamina (0.6 mmol) en 1 ml de DCM seco y se añadió anhídrido diácido (0.4 mmol). La mezcla se agitó durante 60 min a temperatura ambiente. Se eliminó el DCM, el residuo se disolvió en ACN/agua/ACOH y el aminoácido se purificó por RP-HPLC y se liofilizó.

El aminoácido (0.1 mmol), HOBt (0.1 mmol), DIC (0.1 mmol) y colidina (0.2 mmol) se disolvieron en 0.3 ml de DMF seco. La mezcla se añadió al exendin-4 en resina (2 μ mol) y se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente. La

resina se lavó con DMF (10 veces). Los conjugados de exendin- enlazador se escindieron y se purificaron por RP-HPLC como se describe en "Materiales y métodos".

Método D

- 5 Síntesis: Se disolvieron anhídrido diácido (0.2 mmol) y piridina (0.2 mmol) en 0.3 ml de DMF seco. La mezcla se añadió al exendin-4 en resina (2 μ mol) y se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente. La resina se lavó con DMF (10 veces). PyBOP (0.1 mmol), HOBt (0.1 mmol) y colidina (0.4 mmol) se disolvieron en 0.3 ml de DMF seco. La mezcla se añadió a la resina y se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente. La resina se lavó con DMF (10 veces). Se disolvieron diamina (0.1 mmol) y DIEA (0.3 mmol) en una mezcla de 0.4 ml de DMF y 0.4 ml de EtOH. La mezcla se añadió a la resina y se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente. La resina se lavó con DMF (10 veces).
- 10 Los conjugados de exendin- enlazador se escindieron y se purificaron por RP-HPLC como se describe en "Materiales y métodos".

Método E

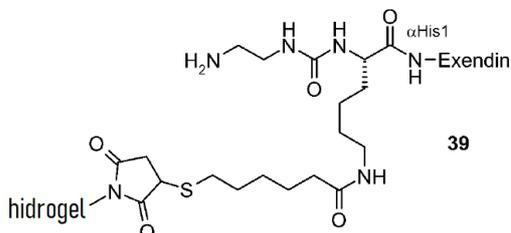
- 15 Síntesis: Se disolvieron aminoácidos Fmoc (0.1 mmol), PyBOP (0.1 mmol) y DIEA (0.2 mmol) en 0.3 ml de DMF seco. La mezcla se añadió al exendin-4 en resina (2 μ mol) y se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente. El grupo protector Fmoc se eliminó incubando la resina en DMF/piperidina 4/1 (v/v) durante 2 x 10 min. La resina se lavó con DMF (10 veces) y DCM (10 veces). Se disolvió cloroformiato de p-nitrofenilo (0.1 mmol) en 0.3 ml de THF seco y DIEA (0.2 mmol). La mezcla se añadió a la resina y se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente. La resina se lavó con DCM (10 veces). Se disolvió diamina (0.1 mmol) en 0.3 ml de DMF. La mezcla se añadió a la resina y se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente. La resina se lavó con DMF (10 veces).
- 20 Los conjugados de exendin-enlazador se escindieron y se purificaron por RP-HPLC como se describe en "Materiales y métodos".

Método F

- 25 Síntesis: como se describe para el Método A, seguido de desprotección de fmoc y acetilación: el grupo protector de Fmoc se eliminó incubando la resina en DMF/piperidina 4/1 (v/v) durante 2 x 10 min. La resina se lavó con DMF (10 veces). La acetilación se realizó incubando la resina con anhídrido acético/piridina/DMF 1/1/2 (v/v/v) durante 30 min. La resina se lavó con DMF (10 veces).
- Los conjugados de exendin- enlazador se escindieron y se purificaron por RP-HPLC como se describe en "Materiales y métodos".
- 30 En la Fig. 2 se dan detalles adicionales sobre números de compuestos, materiales de partida, método de síntesis, peso molecular (MW) y datos de MS.

Ejemplo 39

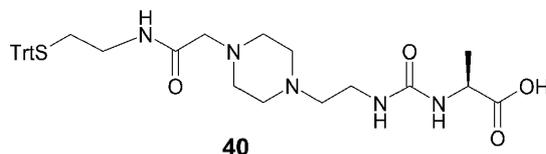
Síntesis de conjugados hidrogel-enlazador-exendin 39



- 35 Las micropartículas de hidrogel funcionalizadas con maleimida se sintetizaron como se describe en el documento EP 1 625 856 A1.
- 30 mg de micropartículas de hidrogel derivadas con maleimida (cargando 40 μ mol/g, 1.2 μ mol) se hicieron reaccionar con 6 mg de compuesto 25a (1.32 μ mol, 1.1 eq) en 600 μ l de 20/80 (v/v) de acetonitrilo/50 mM de fosfato (pH 7.4) durante 10 minutos para dar micropartículas de hidrogel cargadas con exendin-enlazador 39. El hidrogel 39 cargado se lavó 5 veces con 50/50 (v/v) de acetonitrilo/agua y tres veces con agua.
- 40

Ejemplo 40

Síntesis del enlazador 40



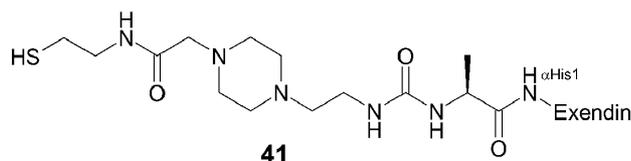
- 5 Se disolvieron Fmoc-Ala-OH (250 mg, 0.8 mmol) y DIEA (170 μ L, 1.0 mmol) en DCM (2 ml), se añadieron a resina de cloruro de 2-clorotritilo (312 mg, 1.3 mmol/g) y se agitaron durante 45 min a temperatura ambiente. Se añadió metanol (0.6 ml) y la resina se incubó durante otros 15 minutos. La resina se lavó con DCM (10x) y DMF (10x). La desprotección de Fmoc y la formación de urea se lograron de acuerdo con los procedimientos generales (véase Materiales y Métodos) por reacción con el intermediario enlazador 5a, el producto se escindió de la resina y se purificó por RP-HPLC.

Rendimiento: 53 mg

- 10 MS 40: m/z 604,4 [M+H]⁺ (MW calculada = 603,8 g/mol)

Ejemplo 41

Síntesis del conjugado de exendin-enlazador 41



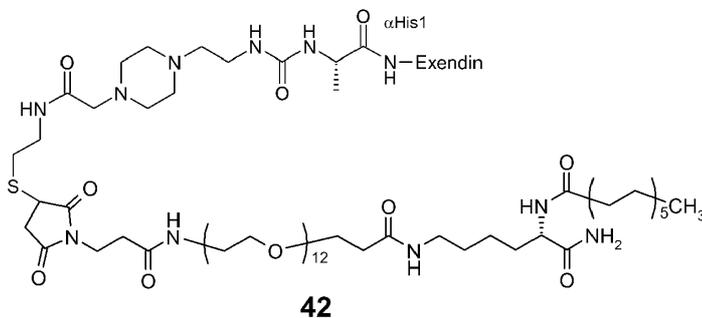
- 15 40 (sal de HCl, 14.0 mg, 0.02 mmol), PyBOP (10.2 mg, 0.02 mmol) y DIEA (17 μ L, 0.1 mmol) se disolvieron en DMF (300 μ L), se añadieron inmediatamente al exendin protegido con cadena lateral unido a la resina (100 mg, 10 μ mol) y se incubaron durante 4 horas a temperatura ambiente. La resina se lavó con DMF (10x), DCM (10x) y se secó al vacío. El producto se escindió de la resina y se purificó por RP-HPLC.

Rendimiento: 5.4 mg

- 20 MS 40: m/z 1510.9 = [M+3H]³⁺ (MW calculada = 4530.1 g/mol)

Ejemplo 42

Síntesis de conjugado ácido graso-enlazador 42

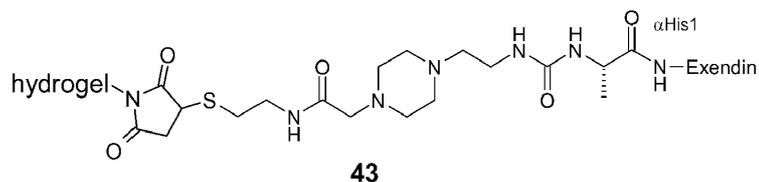


- 25 41 (1.6 mg) se disolvió en 200 μ l de 3/1 acetonitrilo/agua y 1 (0.11 mg) en 200 μ l de 3/1 acetonitrilo/agua. Se añadieron 30 μ l de regulador de fosfato de sodio 0.25 M, la reacción se agitó durante 5 minutos, después de lo cual se purificó 42 por RP-HPLC.

MS 42: m/z 1870.2 = [M+3H]³⁺ (MW calculada = 5608.4 g/mol).

Ejemplo 43

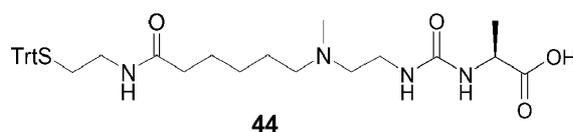
- 30 Síntesis del conjugado hidrogel-enlazador-exendin 43



43 se sintetizó como se describe en 39, excepto por el uso de 41 en lugar de 25a.

Ejemplo 44

5 Síntesis del enlazador 44



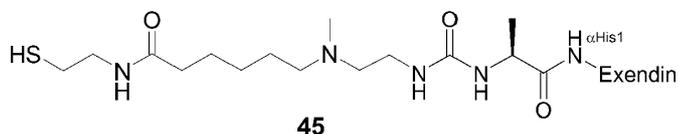
44 se sintetizó como se describe para 40, excepto por el uso de 28 en lugar de 5a.

Rendimiento: 74 mg.

10 MS 44: m/z 605,4 [M+H]⁺ (MW calculada = 604,8 g/mol)

Ejemplo 45

Síntesis del conjugado de exendin-enlazador 45



15 45 se sintetizó como se describe en 41, excepto por el uso de 44 en lugar de 40.

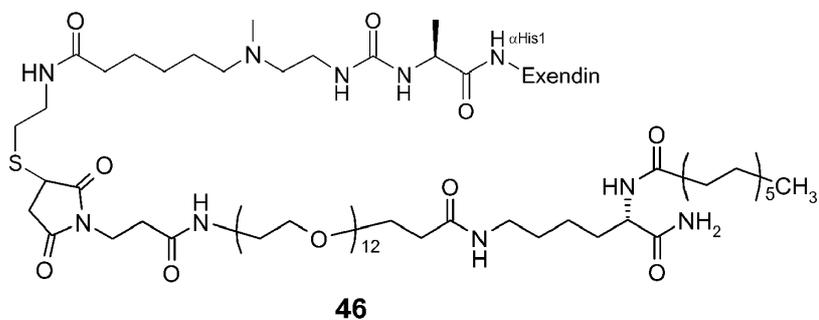
Rendimiento: 6.0 mg

MS 45: m/z 1511.3 = [M+3H]³⁺ (MW calculada = 4531.1 g/mol)

Ejemplo 46

Síntesis de conjugado de ácido graso-enlazador 46

20

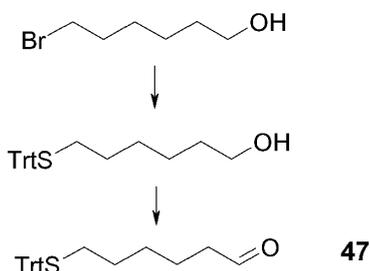


46 se sintetizó como se describe en 42, excepto por el uso de 45 en lugar de 41.

MS 46: m/z 1870.5 = [M+3H]³⁺ (MW calculada = 5609,5 g/mol).

Ejemplo 47

Síntesis del intermedio enlazador 47



5 El tritilsulfuro (247 mg, 0.89 mmol) se suspendió en 1 ml de DMSO. Se añadieron DBU (152 μ l, 1.02 mmol) y 6-bromohexan-1-ol (173 mg, 0.96) y la mezcla se agitó durante 5 minutos a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se disolvió en 20 ml de acetato de etilo y se lavó con H_2SO_4 1 N(2x) y salmuera (3x). La capa orgánica se secó (Na_2SO_4) y los compuestos volátiles se eliminaron al vacío. El producto se purificó por cromatografía instantánea sobre sílica (heptano/AcOEt 1/1).

Rendimiento: 283 mg (S-tritil)-6-mercaptohexan-1-ol

10 Se disolvió (S-tritil)-6-mercaptohexan-1-ol (466 mg, 1.24 mmol) en 3.5 ml de DCM, 0.5 ml de DMSO y 0.6 ml de NEt_3 , y se enfrió en un baño de hielo. Se suspendió SO_3 -piridina (408 mg, 2.57 mmol) en 0.5 ml de DMSO y se añadió a la mezcla de reacción. Se retiró el baño de hielo y la reacción se agitó durante 60 minutos a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se disolvió en 20 ml de Et_2O y se extrajo con H_2SO_4 1 N(2x) y salmuera (3x). La capa orgánica se secó (Na_2SO_4) y los compuestos volátiles se eliminaron al vacío. El producto se purificó por cromatografía instantánea sobre sílica (heptano/AcOEt 1/1).

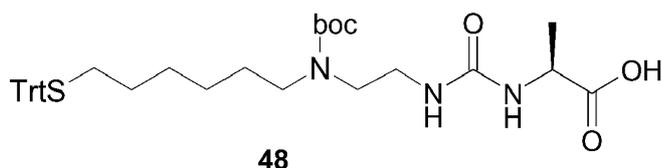
Rendimiento: 390 mg de (S-tritil)-6-mercaptohexan-1-ol 47

MS 47: m/z 243,1 = $[Trt]^+$, 413.1 = $[M+K]^+$ (MW calculada = 374.4 g/mol)

Ejemplo 48

Síntesis del enlazador 48

20



25 Se disolvieron Fmoc-Ala-OH (250 mg, 0.8 mmol) y DIEA (170 μ L, 1.0 mmol) en DCM (2 ml), se añadieron a resina de cloruro de 2-clorotritilo (312 mg, 1,3 mmol/g) y se agitaron durante 45 min a temperatura ambiente. Se añadió metanol (0.6 ml) y la resina se incubó durante otros 15 minutos. La resina se lavó con DCM (10x) y DMF (10x). La desprotección de Fmoc y la formación de urea se lograron de acuerdo con los procedimientos generales (véase Materiales y Métodos) por reacción con etilendiamina. Para la alquilación reductiva se disolvieron 47 (299 mg, 0.8 mmol) y $Na(OAc)_3BH$ (340 mg, 1.6 mmol) en 0.5 ml de DMF, 0.5 ml de MeOH y 10 μ L de AcOH, se agregaron a la resina y se agitaron durante 2 horas a temperatura ambiente. La resina se lavó con DMF (10x) y DCM (10x). La protección de Boc se realizó agitando la resina en una solución de anhídrido de boc (218 mg, 1.0 mmol) y DIEA (170 μ l, 1.0 mmol) en DCM. La resina se lavó con DCM (10x) y el producto se escindió de la resina y se purificó por RP-HPLC.

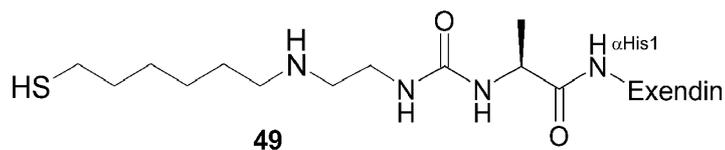
Rendimiento: 34 mg.

MS 48: m/z 634.2 $[M+H]^+$ (MW calculada = 633.9 g/mol)

Ejemplo 49

Síntesis del conjugado de exendin-enlazador 49

35



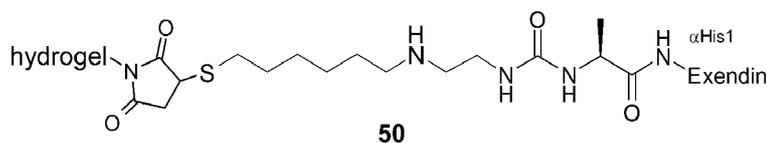
49 se sintetizó como se describe en 41, excepto por el uso de 48 en lugar de 40.

Rendimiento: 4.8 mg

MS 49: m/z 1487.3 = [M+3H]³⁺ (MW calculada = 4460.0 g/mol)

5 Ejemplo 50

Síntesis del conjugado hidrogel-enlazador-exendin 50



50 se sintetizó como se describe en 39, excepto por el uso de 49 en lugar de 25a.

10 Ejemplo 51

Cinética de liberación in vitro.

La liberación de la molécula de fármaco de 38a a 38z, 38aa a 38ab, 4, 5, 9a, 9b, 9c, 10, 13a, 15, 19a, 19b, 22, 26a a 26c, 31a, 31b, 34a, 34b, 37a, 37b 42, 43, 46 y 50 se efectuó mediante hidrólisis en regulador a pH 7.4 y 37 °C o pH 4 y 37 °C como se describe en "Materiales y métodos".

Compuesto	t _{1/2} regulador A (pH 7.4)	t _{1/2} regulador B (pH 4.0)
38a	< 1h	13 h
38b	20 h	72 d
38c	>3 m	> 3m
38d	58 d	n.d.
38e	41 d	n. d.
38f	23 h	114 d
38g	19 d	ninguno
38h	47 d	ninguno
38i	69 h	108 d
38j	16 d	n.d.
38k	40 min	6 d
38l	16 h	n.d.
38m	17 h	66 d

ES 2 733 355 T3

Compuesto	t _{1/2} regulador A (pH 7.4)	t _{1/2} regulador B (pH 4.0)
38n	18 d	n.d.
38o	11-12 h	22 d
38p	26 d	178 d
38q	26 d	210 d
38r	26 h	47 d
38s	80 min	80h
38t	96 min	67 h
38u	51 d	Ninguno
38v	47 d	Ninguno
38w	8 d	3,2 a
38x	72 d	n.d.
38y	11-14 h	105 d
38z	11 d	1,6 a
38aa	40 h	65 d
38ab	20 h	20 d
38ac	14h	n.d.
38ad	18h	n.d.
4	15 d	n.d.
5	22 h	n.d.
9a	340 h	n.d
9b	360 h	n.d
9c	120 h	n.d
10	130 h	n.d
13a	120 h	n.d
13b	160 h	n.d.
15	160 h	n.d

Compuesto	t _{1/2} regulador A (pH 7.4)	t _{1/2} regulador B (pH 4.0)
19a	31h	n.d.
19b	18h	n.d.
22	40d	n.d.
26a	34d	n.d.
26b	40d	n.d.
26c	18d	n.d.
31a	22h	n.d.
31b	95h	n.d.
34a	42h	n.d.
34b	205h	n.d.
37a	138h	n.d.
37b	639h	n.d.
42	10d	n.d.
43	17d	n.d.
46	13d	n.d.
50	35d	n.d.

Ejemplo 52

Cinética de liberación in vivo - correlación in vitro/in vivo

5 La cinética de liberación in vivo se determinó comparando la farmacocinética de 13a con la farmacocinética de 13c y 13b con 13d, respectivamente, después de la inyección intravenosa en la rata. Los estudios en animales se realizaron en Heidelberg Pharma AG, Heidelberg, Alemania.

10 13a (27 mg) se disolvió en 3.5 ml de PBS y se inyectaron por vía intravenosa 500 µl de la solución resultante en seis ratas. Se utilizaron ratas SD macho con aproximadamente 270 g de peso. Se extrajeron muestras de sangre a t = 0, 2 h, 24 h, 32 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h y 168 h, se preparó plasma y se analizó el plasma para determinar la fluorescencia de la fluoresceína usando un espectrómetro LS 50B de Perkin-Elmer.

La farmacocinética de 13c se determinó como se describe para 13a. La farmacocinética de 13b y 13d se determinó como se describe para 13a, excepto por el uso de 20 mg de 13b y 13d cada uno en 2.5 ml de PBS y cuatro ratas.

15 La vida media de la hidrólisis del enlazador se calculó a partir de la relación de fluorescencia de 13a en comparación con la fluorescencia de 13c y 13b en comparación con 13d, respectivamente, en los puntos temporales respectivos. Se determinó que la semivida de la hidrólisis del enlazador in vivo era de 115 h y 160 h para 13a y 13b, respectivamente, lo que está en excelente correlación con la semivida de la hidrólisis del enlazador in vitro de 120 h y 160 h para 13a y 13b, respectivamente.

La Fig. 3 muestra los datos de escisión del enlazador in vivo e in vitro de 13b, en donde la cinética de escisión in vivo (triángulos) e in vitro (diamantes) se muestra mediante representación semilogarítmica.

Abreviaturas:

	Acp	4-(2-aminoetil)-1-carboximetil-piperazina
	AcOH	ácido acético
	Boc	t-butiloxicarbonilo
5	Dab	ácido 2,4-diaminobutírico
	DBU	1,3-diazabicyclo [5.4.0]undeceno
	DCM	Diclorometano
	Dda	ácido dodecanoico
	DIC	diisopropilcarbodiimida
10	DIEA	diisopropiletilamina
	DMAP	dimetilamino-piridina
	DMF	N,N-dimetilformamida
	DMSO	dimetilsulfóxido
	EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
15	eq	equivalente estequiométrico
	Fmoc	9-fluorenilmetoxicarbonilo
	HATU	hexafluorofosfato de O-(7-Azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio
	HFIP	hexafluoroisopropanol
	HEPES	N-(2-hidroxi-etil) piperazin-N'-(ácido 2-etanosulfónico)
20	HOBt	N-hidroxibenzotriazol
	ivDde	1-(4,4-dimetil-2,6-dioxo-ciclohexiliden)-3-metilbutilo
	LCMS	cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas
	Mal	3-maleimido propionilo
	Mmt	4-metoxitritilo
25	MS	Espectro de masas
	MW	Masa molecular
	n.d.	no determinado
	PfpOH	pentafluorofenol
	PyBOP	Hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris-pirrolidin-fosfonio
30	RP-HPLC	cromatografía líquida de alto rendimiento en fase reversa
	TA	Temperatura ambiente
	SEC	Cromatografía de exclusión por tamaño
	Suc	Succinimidopropionilo
	TCP	Resina de cloruro de 2-clorotritilo
35	TES	trietilsilano
	TMOB	2,4,6-trimetoxibencilo
	TFA	Ácido trifluoroacético

THF tetrahidrofurano

UV ultravioleta

VIS visual

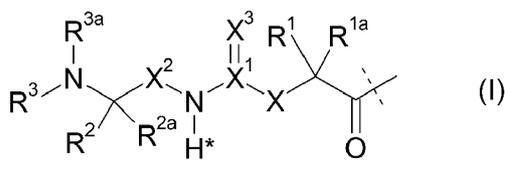
REIVINDICACIONES

1. Un profármaco o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de un fármaco D-H, el profármaco o su sal farmacéuticamente aceptable que consiste en un conjugado enlazador de fármaco D-L, en donde

- D es una unidad estructural biológicamente activa que contiene nitrógeno del fármaco D-H; y

5 - L no muestra los efectos farmacológicos del fármaco D-H y representa una unidad estructural $-L^1-(L^2-Z)_{1-4}$, en donde

- L^1 está representado por la fórmula (I),



en donde la línea discontinua indica la unión al nitrógeno de la unidad estructural biológicamente activa a través de la formación de un enlace amida;

10 X es $C(R^4R^{4a})$; $N(R^4)$; O; $C(R^4R^{4a})-C(R^5R^{5a})$; $C(R^5R^{5a})-C(R^4R^{4a})$; $C(R^4R^{4a})-N(R^6)$; $N(R^6)-C(R^4R^{4a})$; $C(R^4R^{4a})-O$; o $O-C(R^4R^{4a})$;

X^1 es C; o S(O);

X^2 es $C(R^7, R^{7a})$; o $C(R^7, R^{7a})-C(R^8, R^{8a})$;

X^3 es O;

15 $R^1, R^{1a}, R^2, R^{2a}, R^3, R^{3a}, R^4, R^{4a}, R^5, R^{5a}, R^6, R^7, R^{7a}, R^8, R^{8a}$ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H; y alquilo C_{1-4} ;

alternativamente, una o más de las parejas $R^{1a}/R^{4a}, R^{1a}/R^{5a}, R^{4a}/R^{5a}, R^{7a}/R^{8a}$ forman un enlace químico;

alternativamente, una o más de las parejas $R^1/R^{1a}, R^2/R^{2a}, R^4/R^{4a}, R^5/R^{5a}, R^7/R^{7a}, R^8/R^{8a}$ se unen junto con el átomo al que están unidos para formar un cicloalquilo C_{3-7} ; o heterociclilo de 4 a 7 miembros;

20 alternativamente, una o más de las parejas $R^1/R^4, R^1/R^5, R^1/R^6, R^4/R^5, R^4/R^6, R^7/R^8, R^2/R^3$ se unen con los átomos a los que están unidas para formar un anillo A;

alternativamente, R^3/R^{3a} se unen junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos para formar un heterociclo de 4 a 7 miembros;

25 A se selecciona del grupo que consiste en fenilo; naftilo; indenilo; indanilo; tetralinilo; cicloalquilo C_{3-10} ; Heterociclilo de 4 a 7 miembros; y heterobicyclilo de 9 a 11 miembros; y

en donde L^1 está opcionalmente sustituido adicionalmente,

en donde el uno o más sustituyentes opcionales adicionales se seleccionan independientemente del grupo que consiste en halógeno; CN; $COOR^9$; OR^9 ; $C(O)R^9$; $C(O)N(R^9R^{9a})$; $S(O)_2N(R^9R^{9a})$; $S(O)N(R^9R^{9a})$; $S(O)_2R^9$; $S(O)R^9$;

30 $N(R^9)S(O)_2N(R^9aR^{9b})$; SR^9 ; $N(R^9R^{9a})$; NO_2 ; $OC(O)R^9$; $N(R^9)C(O)R^{9a}$; $N(R^9)S(O)_2R^{9a}$; $N(R^9)S(O)R^{9a}$; $N(R^9)C(O)OR^{9a}$; $N(R^9)C(O)N(R^9aR^{9b})$; $OC(O)N(R^9R^{9a})$; T; alquilo C_{1-50} ; alqueno C_{2-50} ; y alquino C_{2-50} , en donde T; alquilo C_{1-50} ;

alqueno C_{2-50} ; y alquino C_{2-50} están opcionalmente sustituidos con uno o más R^{10} , que son el mismo o diferentes y en donde alquilo C_{1-50} ; alqueno C_{2-50} ; y alquino C_{2-50} son interrumpidos opcionalmente por uno o más grupos seleccionados del grupo que consiste en T; $-C(O)O-$; $-O-$; $-C(O)-$; $C(O)N(R^{11})-$; $-S(O)_2N(R^{11})-$; $-S(O)N(R^{11})-$; $-S(O)_2-$; $-S(O)-$; $-N(R^{11})S(O)_2N(R^{11a})-$; $-S-$; $N(R^{11})$; $-OC(O)R^{11}$; $-N(R^{11})C(O)-$; $-N(R^{11})S(O)_2-$; $-N(R^{11})S(O)-$; $-N(R^{11})C(O)O-$;

35 $N(R^{11})C(O)N(R^{11a})-$; y $-OC(O)N(R^{11}R^{11a})$, en donde R^9, R^{9a}, R^{9b} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H; T; alquilo C_{1-50} ; alqueno C_{2-50} ; y alquino C_{2-50} , en donde T; alquilo C_{1-50} ; alqueno C_{2-50} ; y alquino C_{2-50} están opcionalmente sustituidos con uno o más R^{10} , que son el mismo o diferentes y en donde alquilo C_{1-50} ;

alqueno C_{2-50} ; y alquino C_{2-50} son interrumpidos opcionalmente por uno o más grupos seleccionados del grupo que consiste en T; $-C(O)O-$; $-O-$; $-C(O)-$; $-C(O)N(R^{11})-$; $-S(O)_2N(R^{11})-$; $-S(O)N(R^{11})-$; $-S(O)_2-$; $-S(O)-$; $-N(R^{11})S(O)_2N(R^{11a})-$; $-S-$; $-N(R^{11})-$; $-OC(O)R^{11}$; $-N(R^{11})C(O)-$; $-N(R^{11})S(O)_2-$; $-N(R^{11})S(O)-$; $-N(R^{11})C(O)O-$; y $-OC(O)N(R^{11}R^{11a})-$;

40 $OC(O)N(R^{11}R^{11a})-$;

T es fenilo; naftilo; indenilo; indanilo; tetralinilo; cicloalquilo C_{3-10} ; heterociclilo de 4 a 7 miembros; o heterobicyclilo de 9 a 11 miembros, en donde T está opcionalmente sustituido con uno o más R^{10} , que son el mismo o diferentes;

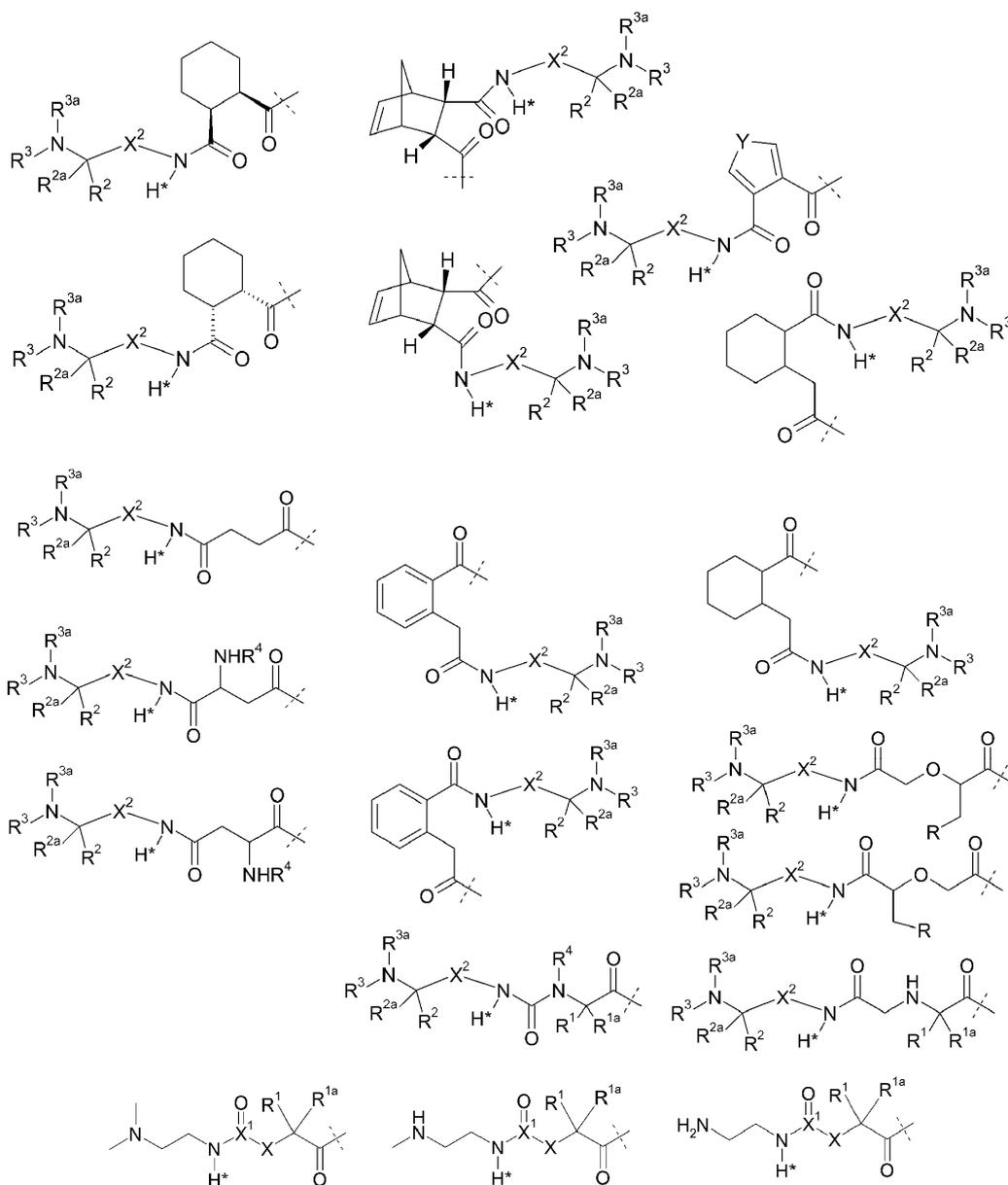
R¹⁰ es halógeno; CN; oxo (=O); COOR¹²; OR¹²; C(O)R¹²; C(O)N(R^{12a}R^{12b}); S(O)₂N(R^{12a}R^{12b}); S(O)N(R^{12a}R^{12b}); S(O)₂R¹²; S(O)R¹²; N(R¹²)S(O)₂N(R^{12a}R^{12b}); SR¹²; N(R^{12a}R^{12b}); NO₂; OC(O)R¹²; N(R¹²)C(O)R^{12a}; N(R¹²)S(O)₂R^{12a}; N(R¹²)S(O)R^{12a}; N(R¹²)C(O)OR^{12a}; N(R¹²)C(O)N(R^{12a}R^{12b}); OC(O)N(R^{12a}R^{12b}); o alquilo C₁₋₆, en donde alquilo C₁₋₆ está opcionalmente sustituido con uno o más halógeno, que son el mismo o diferentes;

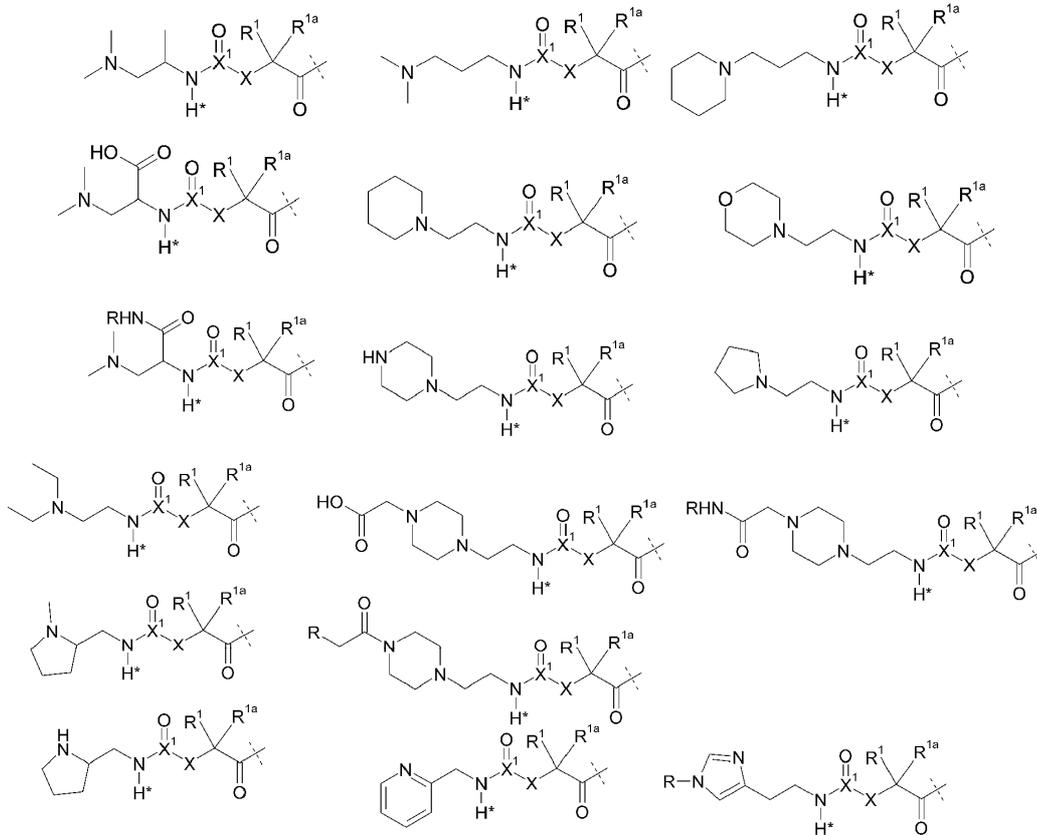
- 5 R¹¹, R^{11a}, R¹², R^{12a}, R^{12b} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H; y alquilo C₁₋₆, en donde alquilo C₁₋₆ está opcionalmente sustituido con uno o más halógeno, que son el mismo o diferentes.

con la condición de que el hidrógeno marcado con el asterisco en la fórmula (I) no sea reemplazado por L²-Z o un sustituyente de uno o más sustituyentes opcionales; L² es un enlace químico simple o un espaciador; y

Z es un grupo portador, en donde el grupo portador es un polímero de al menos 500 Da o un grupo alquilo C₈₋₁₈.

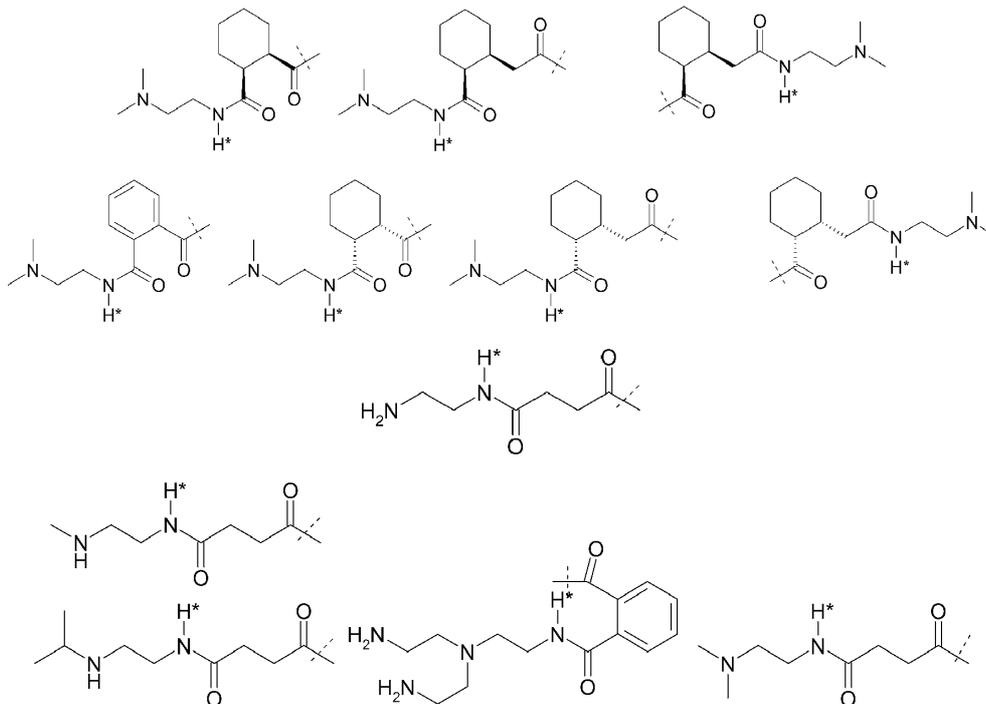
- 10 2. El profármaco de la reivindicación 1, en donde X es N(R⁴) y X¹ es C.
 3. El profármaco de la reivindicación 1 o 2, en donde X² es C(R^{7a}R^{7b}).
 4. El profármaco de la reivindicación 1, en donde L¹ se selecciona del grupo que consiste en

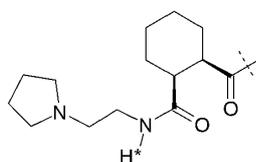
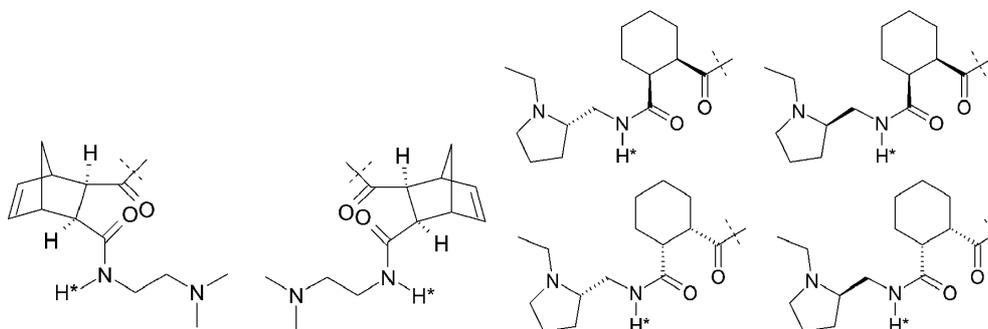
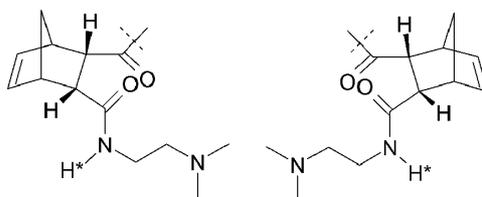
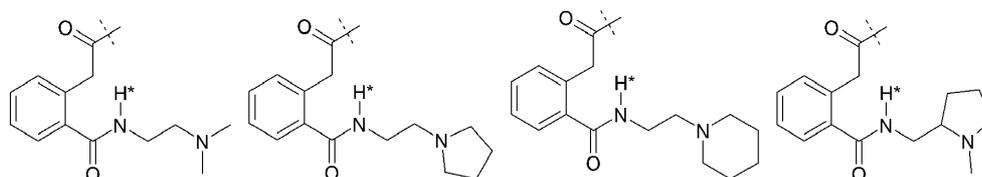
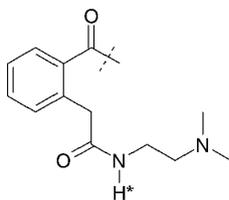
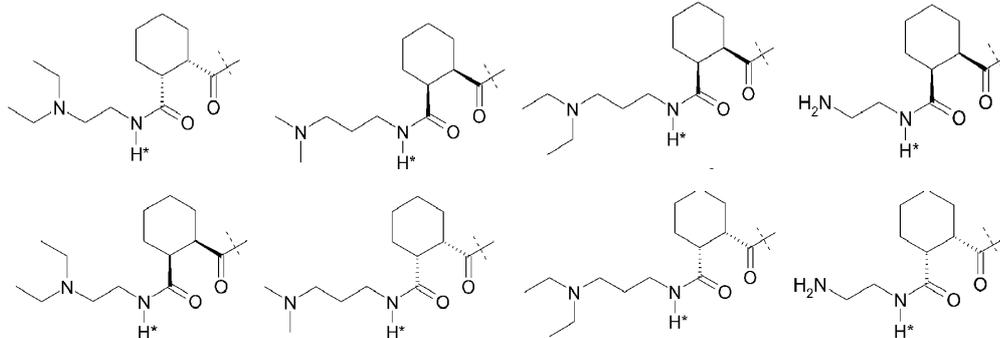
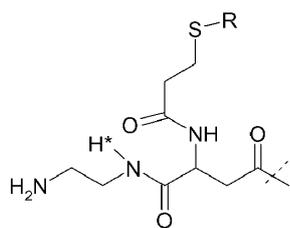


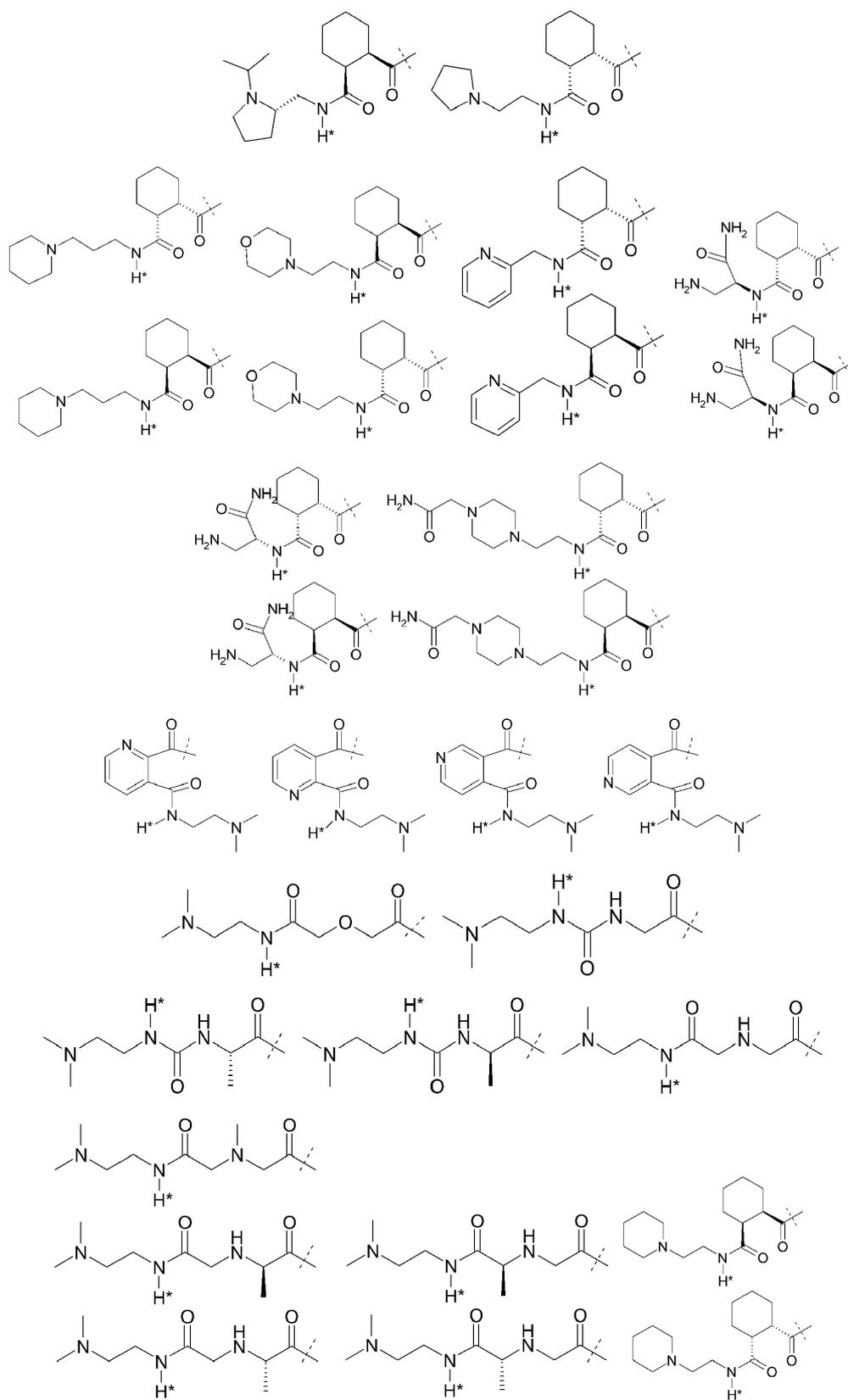


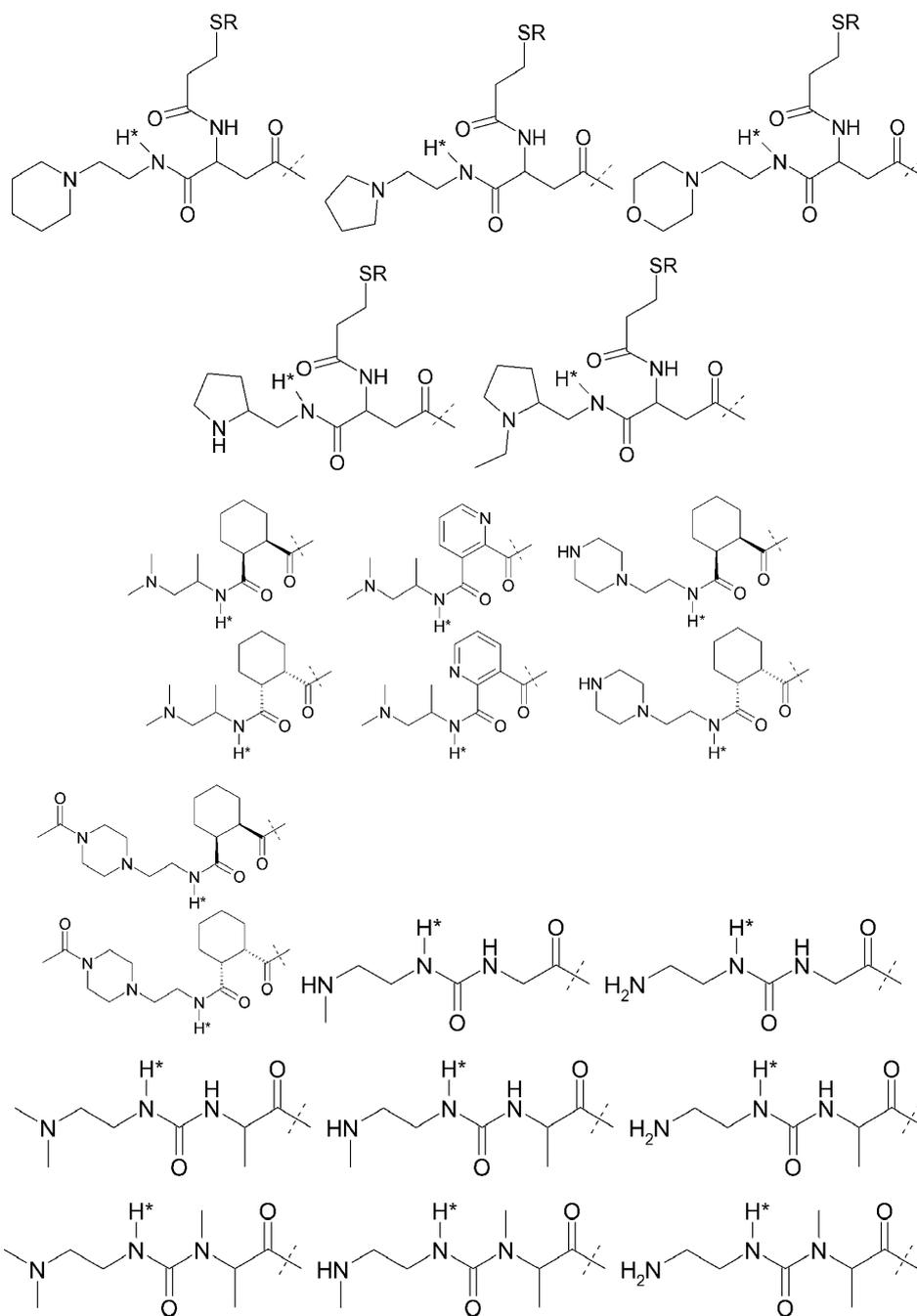
5 en donde R es H; o alquilo C₁₋₄; Y es NH; O; o S; y R¹, R^{1a}, R², R^{2a}, R³, R^{3a}, R⁴, X, X¹, X² tienen el significado indicado en la reivindicación 1.

5. El profármaco de la reivindicación 1, en donde L¹ se selecciona del grupo que consiste en









en donde R es H; o alquilo C₁₋₄.

5 6. El profármaco de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde L² es un enlace químico simple.

7. El profármaco de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde L²-Z es COOR⁹; OR⁹; C(O)R⁹; C(O)N(R⁹R^{9a}); S(O)₂N(R⁹R^{9a}); S(O)N(R⁹R^{9a}); S(O)₂R⁹; S(O)R⁹; N(R⁹)S(O)₂N(R^{9a}R^{9b}); SR⁹; N(R⁹R^{9a}); OC(O)R⁹; N(R⁹)C(O)R^{9a}; N(R⁹)S(O)₂R^{9a}; N(R⁹)S(O)R^{9a}; N(R⁹)C(O)OR^{9a}; N(R⁹)C(O)N(R^{9a}R^{9b}); OC(O)N(R⁹R^{9a}); T; alquilo C₁₋₅₀; alqueno C₂₋₅₀; o alquino C₂₋₅₀, en donde T; alquilo C₁₋₅₀; alqueno C₂₋₅₀; y alquino C₂₋₅₀ están opcionalmente sustituidos con uno o más R¹⁰, que son el mismo o diferentes y en donde alquilo C₁₋₅₀; alqueno C₂₋₅₀; y alquino C₂₋₅₀ son interrumpidos opcionalmente por uno o más grupos seleccionados del grupo que consiste en -T-, -C(O)O-, -O-, -C(O)-, -C(O)N(R¹¹)-; -S(O)₂N(R¹¹)-; -S(O)N(R¹¹)-; -S(O)₂-; -S(O)-; -N(R¹¹)S(O)₂N(R^{11a})-; -S-; -N(R¹¹)-; -OC(O)R¹¹-; -N(R¹¹)C(O)-; -N(R¹¹)S(O)₂-; -N(R¹¹)S(O)-; -N(R¹¹)C(O)O-; -N(R¹¹)C(O)N(R^{11a})-; y -OC(O)N(R¹¹R^{11a});

10 R⁹, R^{9a}, R^{9b} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H; Z; T; alquilo C₁₋₅₀; alqueno C₂₋₅₀; y alquino C₂₋₅₀, en donde T; alquilo C₁₋₅₀; alqueno C₂₋₅₀; y alquino C₂₋₅₀ están opcionalmente sustituidos con uno o más R¹⁰, que son el mismo o diferentes y en donde alquilo C₁₋₅₀; alqueno C₂₋₅₀; y alquino C₂₋₅₀ son interrumpidos

opcionalmente por uno o más grupos seleccionados del grupo que consiste en T, -C(O)O-; -O-; -C(O)-; -C(O)N(R¹¹)-; -S(O)₂N(R¹¹)-; -S(O)N(R¹¹)-; -S(O)₂-; -S(O)-; -N(R¹¹)S(O)₂N(R^{11a})-; -S-; -N(R¹¹)-; -OC(O)R¹¹; -N(R¹¹)C(O)-; -N(R¹¹)S(O)₂-; -N(R¹¹)S(O)-; -N(R¹¹)C(O)O-; -N(R¹¹)C(O)N(R^{11a})-; y -OC(O)N(R¹¹R^{11a});

5 T es fenilo; naftilo; indenilo; indanilo; tetralinilo; cicloalquilo C₃₋₁₀; heterociclilo de 4 a 7 miembros; o heterobicyclilo de 9 a 11 miembros, en donde T está opcionalmente sustituido con uno o más R¹⁰, que son el mismo o diferentes;

R¹⁰ es Z; halógeno; CN; oxo (=O); COOR¹²; OR¹²; C(O)R¹²; C(O)N(R¹²R^{12a}); S(O)₂N(R¹²R^{12a}); S(O)N(R¹²R^{12a}); S(O)₂R¹²; S(O)R¹²; N(R¹²)S(O)₂N(R^{12a}R^{12b}); SR¹²; N(R¹²R^{12a}); NO₂; OC(O)R¹²; N(R¹²)C(O)R^{12a}; N(R¹²)S(O)₂R^{12a}; N(R¹²)S(O)R^{12a}; N(R¹²)C(O)OR^{12a}; N(R¹²)C(O)N(R^{12a}R^{12b}); OC(O)N(R¹²R^{12a}); o alquilo C₁₋₆, en donde alquilo C₁₋₆ está opcionalmente sustituido con uno o más halógeno, que son el mismo o diferentes;

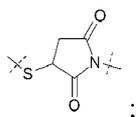
10 R¹¹, R^{11a}, R¹², R^{12a}, R^{12b} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H; Z; y alquilo C₁₋₆, en donde alquilo C₁₋₆ está opcionalmente sustituido con uno o más halógeno, que son el mismo o diferentes;

con la condición de que uno de R⁹, R^{9a}, R^{9b}, R¹⁰, R¹¹, R^{11a}, R¹², R^{12a}, R^{12b} sea Z.

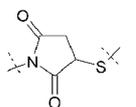
15 8. El profármaco de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o 7, en donde L² es una cadena de alquilo C₁₋₂₀, que está opcionalmente interrumpida por uno o más grupos seleccionados independientemente de -O-; y C(O)N(R^{3aa}); opcionalmente sustituido con uno o más grupos seleccionados independientemente de OH; y C C(O)N(R^{3aa}R^{3aaa}); y en donde R^{3aa}, R^{3aaa} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H; y alquilo C₁₋₄.

9. El profármaco de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, 7 u 8, en donde L² tiene un peso molecular en el rango de 14 g/mol a 750 g/mol.

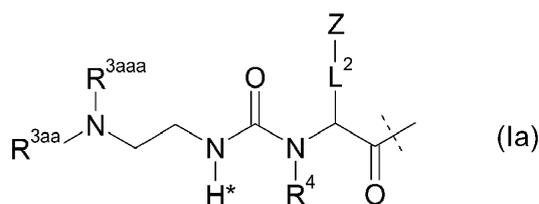
20 10. El profármaco de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o 7 a 9, en donde L² está unido a Z a través de un grupo terminal seleccionado de



y

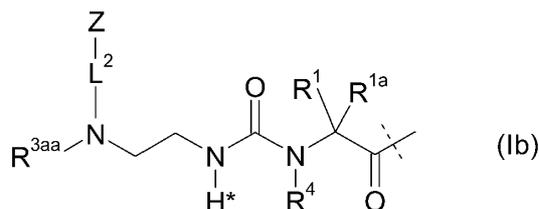


11. El profármaco de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde L está representado por la fórmula (Ia)



25 en donde R⁴, L² y Z tienen el significado indicado en la reivindicación 1, y en donde R^{3aa}, R^{3aaa} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H; y alquilo C₁₋₄; o se unen entre sí con el átomo de nitrógeno al que están unidos para formar un heterociclo de 4 a 7 miembros.

12. El profármaco de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde L está representado por la fórmula (Ib)



30 en donde R¹, R^{1a}, R⁴, L² y Z tienen el significado indicado en la reivindicación 1, y en donde R^{3aa} es H; o alquilo C₁₋₄.

13. El profármaco de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde R¹ en la fórmula (I) es L²-Z.

14. El profármaco de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que R³ en la fórmula (I) es L²-Z.
15. El profármaco de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde R³, R^{3a} en la fórmula (I) se unen junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos para formar un heterociclo de 4 a 7 miembros y en donde el heterociclo está sustituido con L²-Z.
- 5 16. El profármaco de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en donde D-H es un agente bioactivo de molécula pequeña o un biopolímero.
17. El profármaco de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en donde D-H es un biopolímero seleccionado del grupo que consiste en proteínas, polipéptidos, oligonucleótidos y ácidos nucleicos peptídicos.
- 10 18. El profármaco de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en donde D-H es un polipéptido seleccionado del grupo de polipéptidos que consiste en ACTH, adenosina desaminasa, agalsidasa, alfa-1 antitripsina, inhibidor de alfa-1 proteinasa, alteplasa, amilina, simlina, anistreplasa, ancrod serina proteasa, anticuerpos, antitrombina III, antitripsinas, aprotinina, asparaginasas, atosiban, bifalina, bivalirudina, proteínas óseas morfogénicas, inhibidor de la tripsina pancreática bovina, fragmentos de cadherina, calcitonina de salmón, colagenasa, inhibidor de la esterasa del complemento C1, conotoxinas, fragmentos del receptor de citoquinas, ADNasa, dinorfina A, endorfinas, enfuvirtida, encefalinas, eritropoyetinas, exendinas, factor VII, factor VIIa, factor VIII, factor VIIIa, factor IX, fibrinolisisina, factor de crecimiento de fibroblastos, péptido liberador de hormona de crecimiento 2, proteínas de fusión, hormonas foliculares, gramicidina, grelina, desacil-grelina, factor estimulante de colonias de granulocitos, galactosidasa, glucagón, péptidos similares al glucagón, glucocerebrosidasa, factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos, proteínas de choque térmico humano, proteína activadora de fosfolipasa, gonadotropina coriónica, hemoglobinas, vacunas contra la hepatitis B, hirudina, inhibidor de la serina proteasa humana, hialuronidasas, iduronidasas, inmunoglobulinas, vacunas contra la influenza, interleucinas, antagonistas del receptor IL-1, insulinas, factores de crecimiento similares a la insulina, proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina, interferones, molécula de adhesión intracelular, factor de crecimiento de queratinocitos, ligando de glicoproteína P-selectina, factores de crecimiento transformantes, lactasa, leptina, leuprolida, levotiroxina, hormona luteinizante, vacuna de Lyme, péptidos natriuréticos, neuropéptido Y, pancrelipasa, polipéptido pancreático, papaína, hormona paratiroidea, PDGF, pepsina, péptido YY, acetilhidrolasa del factor activador de plaquetas, prolactina, proteína C, timalfasina, octreotida, secretina, sermorelina, receptor del factor de necrosis tumoral soluble, superóxido dismutasa, somatropinas, somatoprim, somatostatina, estreptoquinasa, sacarosa, terlipresina, fragmento de toxina tetánica, tilactasa, trombinas, timosina, hormona estimulante de la tiroides, tirotropina, factor de necrosis tumoral, Fc IgG del receptor de TNF, activador plasminógeno tisular, TSH, urodilatin, urato oxidasa, uroquinasa, vacunas, factor de crecimiento endotelial vascular, péptido intestinal vasoactivo, vasopresina, ziconotida, lectina y ricina.
- 15 19. El profármaco de la reivindicación 18, en donde las interleucinas se seleccionan de 1 alfa, 1 beta, 2, 3, 4, 6, 10, 11, 12, 13 y 21.
- 20 20. El profármaco de la reivindicación 18, en donde los interferones se seleccionan de alfa 2a, alfa 2b, alfa 2c, beta 1a, beta 1b, gamma 1a y gamma 1b.
- 25 21. El profármaco de la reivindicación 18, en donde el péptido natriurético se selecciona del grupo que consiste en ANP, BNP, CNP y fragmentos de péptidos natriuréticos.
- 30 22. El profármaco de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, en donde D-H es una proteína que se puede preparar mediante tecnologías de ADN recombinante.
- 35 23. El profármaco de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 o 22, en donde D-H es una proteína seleccionada del grupo de proteínas que consiste en fragmentos de anticuerpo, proteínas de unión a antígeno de cadena simple, anticuerpos catalíticos y proteínas de fusión.
- 40 24. El profármaco de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en donde DH es un agente bioactivo de molécula pequeña seleccionado del grupo de agentes que consiste en agentes activos del sistema nervioso central, antiinfecciosos, antialérgicos, inmunomoduladores, antiobesidad, anticoagulantes, agentes antidiabéticos, antineoplásicos, antibacterianos, antifúngicos, analgésicos, anticonceptivos, antiinflamatorios, esteroideos, vasodilatadores, vasoconstrictores y cardiovasculares con al menos un grupo amino primario o secundario.
- 45 25. El profármaco de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 y 24, en donde DH es un agente bioactivo de molécula pequeña seleccionado del grupo de agentes que consiste en acarbosa, alaproclato, alendronato, amantadina, amikacina, amineptina, aminoglutetimida, amisulprida, amlodipina, amotosalen, amoxapina, amoxicilina, anfetamina, anfotericina B, ampicilina, amprenavir, amrinona, anileridina, apraclonidina, apramicina, articaína, atenolol, atomoxetina, avizafona, baclofeno, benazepril, benserazida, benzocaína, betaxolol, bleomicina, bromfenac, brofaromina, carvedilol, catina, catinona, carbutamida, cefalexina, clinafloxacina, ciprofloxacina, deferoxamina, delavirdina, desipramina, daunorubicina, dexmetilfenidato, diafenilsulfona, dizocilpina, dopamina, dobutamina, dorzolamida, doxorubicina, duloxetina, eflornitina, enalapril, epinefrina, epirubicina, ergolina, ertapenem, esmolol, enoxacina, etambutol, fenfluramina, fenoldopam, fenoterol, fingolimod, flecainida, fluvoxamina, fosamprenavir, frovatriptan, furosemida, fluoxetina, gabapentina, gatifloxacina, gemifloxacina, gentamicina, grepafloxacina,
- 50 55

- hexilcaína, hidralazina, hidroclorotiazida, icofungipeno, idarubicina, imiquimod, inversina, isoproterenol, isradipina, kanamicina A, ketamina, labetalol, lamivudina, levobunolol, levodopa, levotiroxina, lisinopril, lomefloxacina, loracarbef, maprotilina, mefloquina, melfalan, memantina, meropenem, mesalazina, mescalina, metildopa, metilendioximetanfetamina, metoprolol, milnacipran, mitoxantron, moxifloxacina, norepinefrina, norfloxacina, nortriptilina, neomicina B, nistatina, oseltamivir, ácido pamidrónico, paroxetina, pazufloxacina, pemetrexed, perindopril, fenmetrazina, fenelzina, pregabalina, procaina, pseudoefedrina, protriptilina, reboxetina, ritodrina, sabarubicina, salbutamol, serotonina, sertralina, sitagliptina, sotalol, espectinomocina, sulfadiazina, sulfamerazina, sertralina, sulfalen, sulfametoxazol, tacrina, tamsulosina, terbutalina, timolol, tirofiban, tobramicina, tocainida, tosufloxacin, trandolapril, ácido tranexámico, tranilcipromina, trimetrexato, trovafloxacina, valaciclovir, valganciclovir, vancomicina, viomicina, viloxazina, y zalcitabina.
26. El profármaco de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25, en donde Z se selecciona del grupo de polímeros opcionalmente entrecruzados que consisten en poli(propilenglicol), poli(etilenglicol), dextrano, quitosán, ácido hialurónico, alginato, xilano, manano, carragenina, agarosa, celulosa, almidón, almidón hidroxialquilo, poli(alcoholes vinílicos), poli(oxazolininas), poli(anhídridos), poli(ortoésteres), poli(carbonatos), poli(uretanos), poli(ácidos acrílicos), poli(acrilamidas), poli(acrilatos), poli(metacrilatos), poli(organofofosfazenos), polioxazolina, poli(siloxanos), poli(amidas), poli(vinilpirrolidona), poli(cianoacrilatos), poli(ésteres), poli(iminocarbonatos), poli(aminoácidos), colágeno, gelatina, hidrogel y una proteína del plasma sanguíneo, y copolímeros de los mismos.
27. El profármaco de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26, en donde Z es una proteína.
28. El profármaco de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 27, en donde Z es una proteína seleccionada del grupo que consiste en albúmina, transferrina e inmunoglobulina.
29. El profármaco de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25, en donde Z es un poli(etilenglicol) lineal o ramificado con un peso molecular de 2,000 Da a 150,000 Da.
30. El profármaco de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29, en donde D-H es un agonista del receptor de GLP-1; L¹ está representado por la fórmula (I) como se indica en la reivindicación 1; y Z es un hidrogel.
31. El profármaco de la reivindicación 30, en donde el agonista del receptor GLP-1 es Exendin-4.
32. El profármaco de la reivindicación 30 o 31, en donde en la fórmula (I) X es N(R⁴) y X¹ es C.
33. El profármaco de cualquiera de las reivindicaciones 30 a 32, en donde L está representado por la fórmula (Ia) como se indica en la reivindicación 11 o L está representado por la fórmula (Ib) como se indica en la reivindicación 12.
34. Una composición farmacéutica que comprende el profármaco de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 33 o una sal farmacéutica del mismo junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable.
35. El profármaco de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 33 o la composición farmacéutica de la reivindicación 34 para uso como un medicamento.

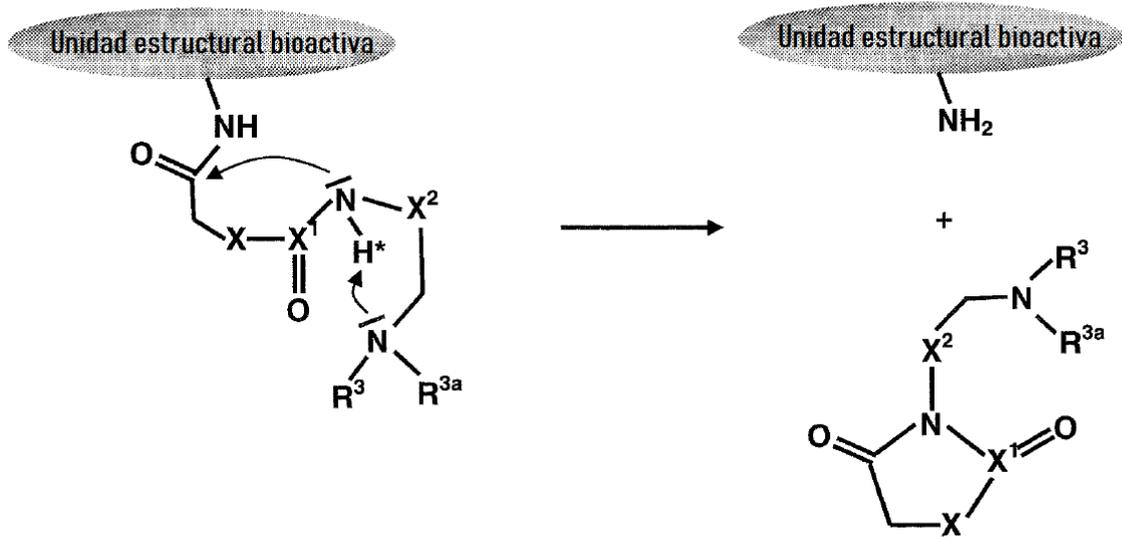


Fig. 1

Compuesto	Estructura	Materiales de partida	Método de síntesis	MW (calc.) (g/mol)	m/z (ESI-MS) $[M+3H]^+$
38a			A	4404	1469.4
38b			A	4410	1471.5
38c			A	4410	1471.5
38d			A	4328	1443.8

Fig. 2

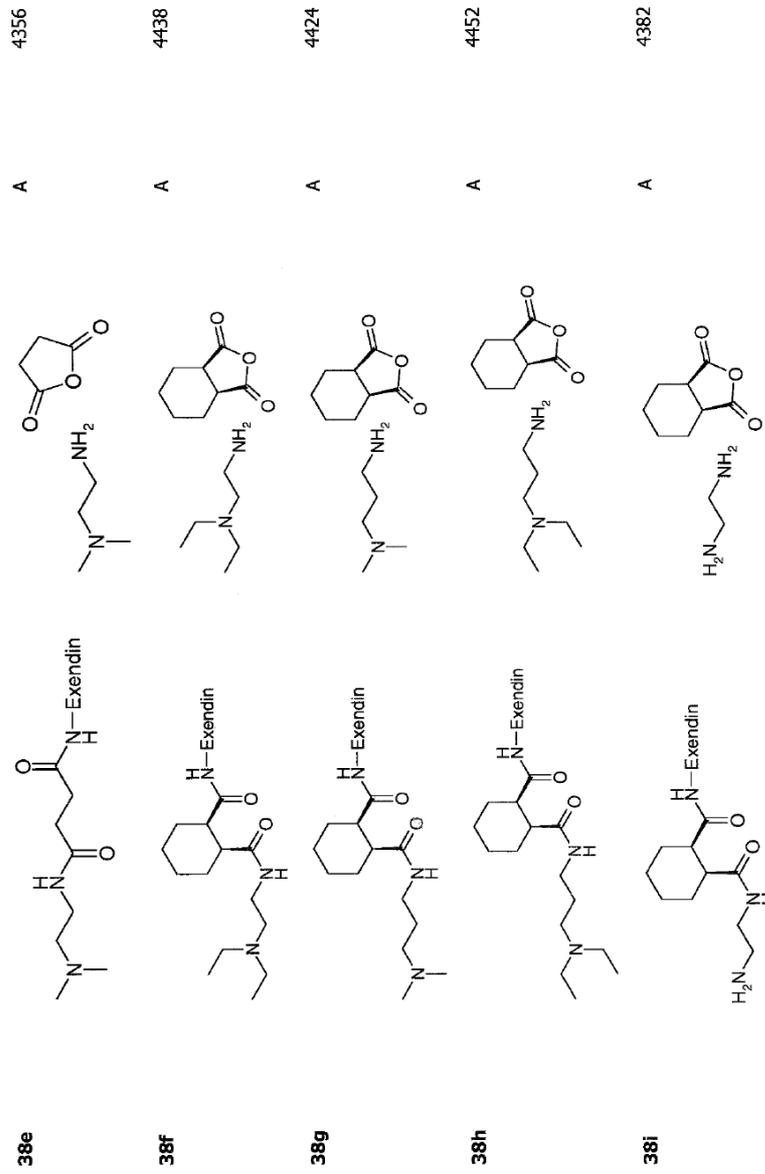


Fig. 2 (continuación)

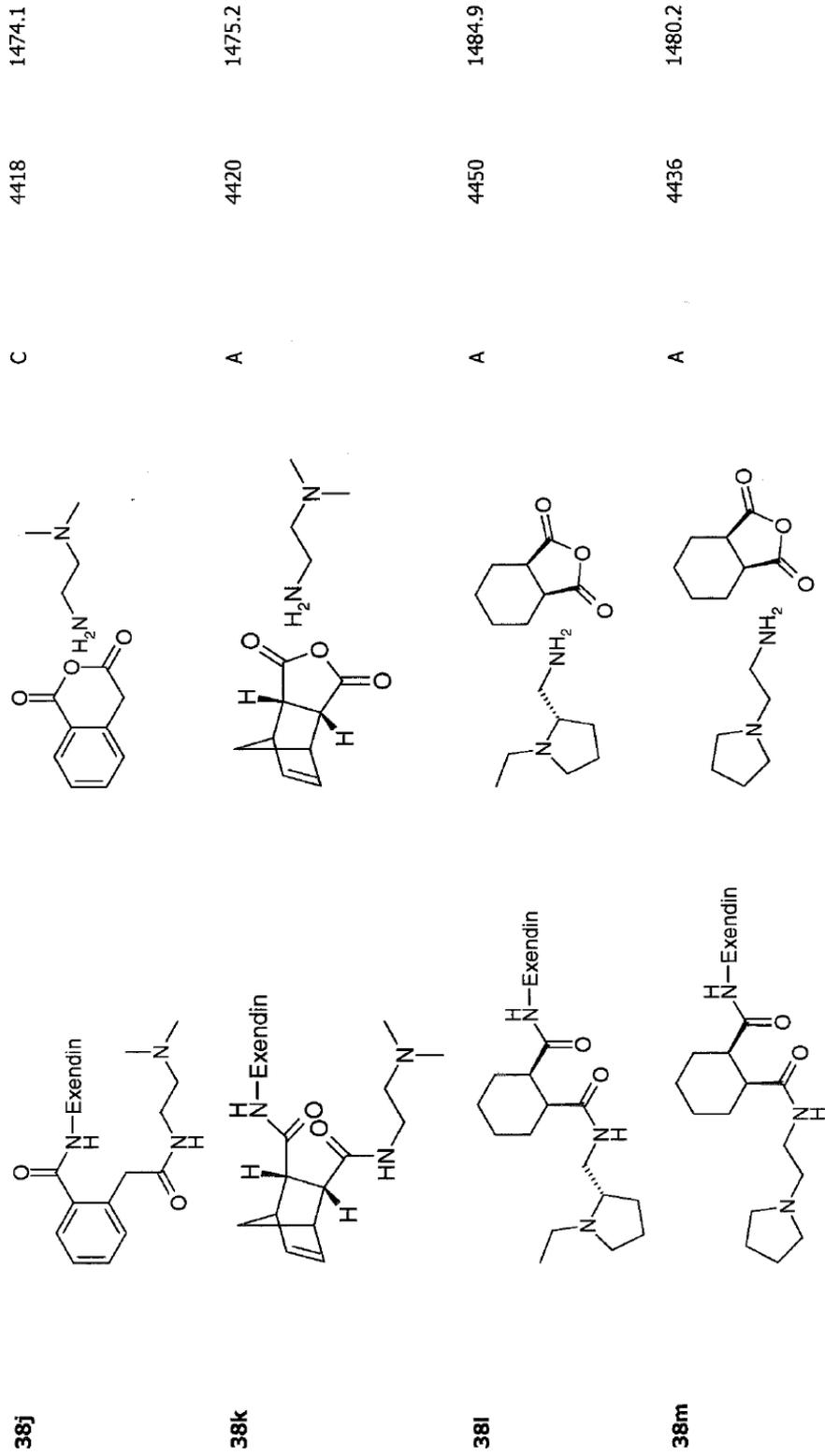


Fig. 2 (continuación)

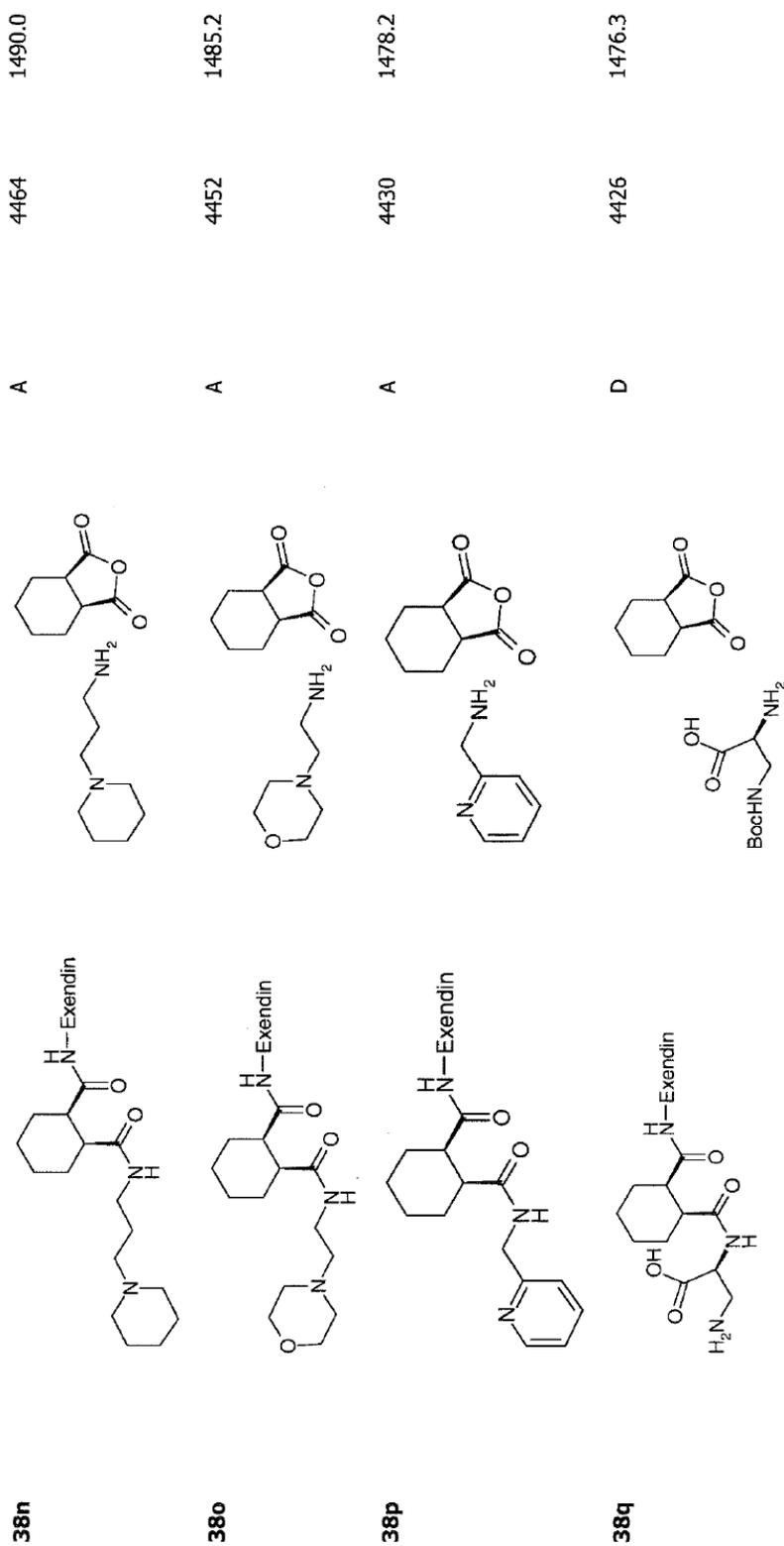
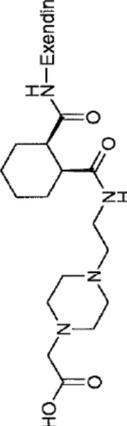
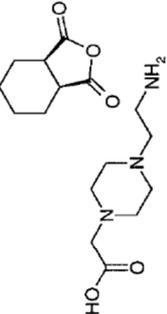
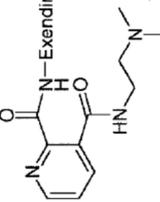
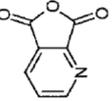
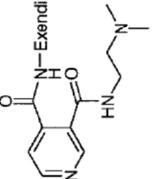
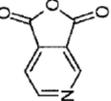
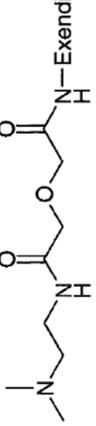
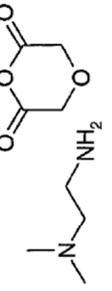
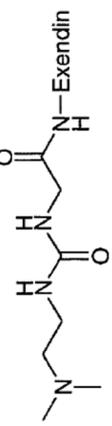
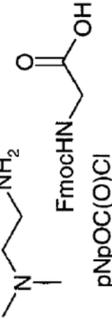
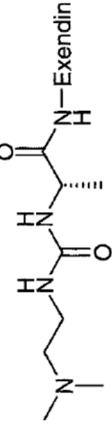
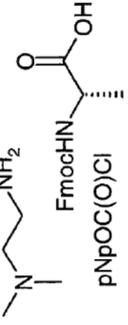


Fig. 2 (continuación)

38f			D	4509	1504.1
38s			A	4421	1476.1
38t			A	4421	1475.4
38u			A	4388	1464.4
38v			E	4357	1453.9
38w			E	4371	1458.7

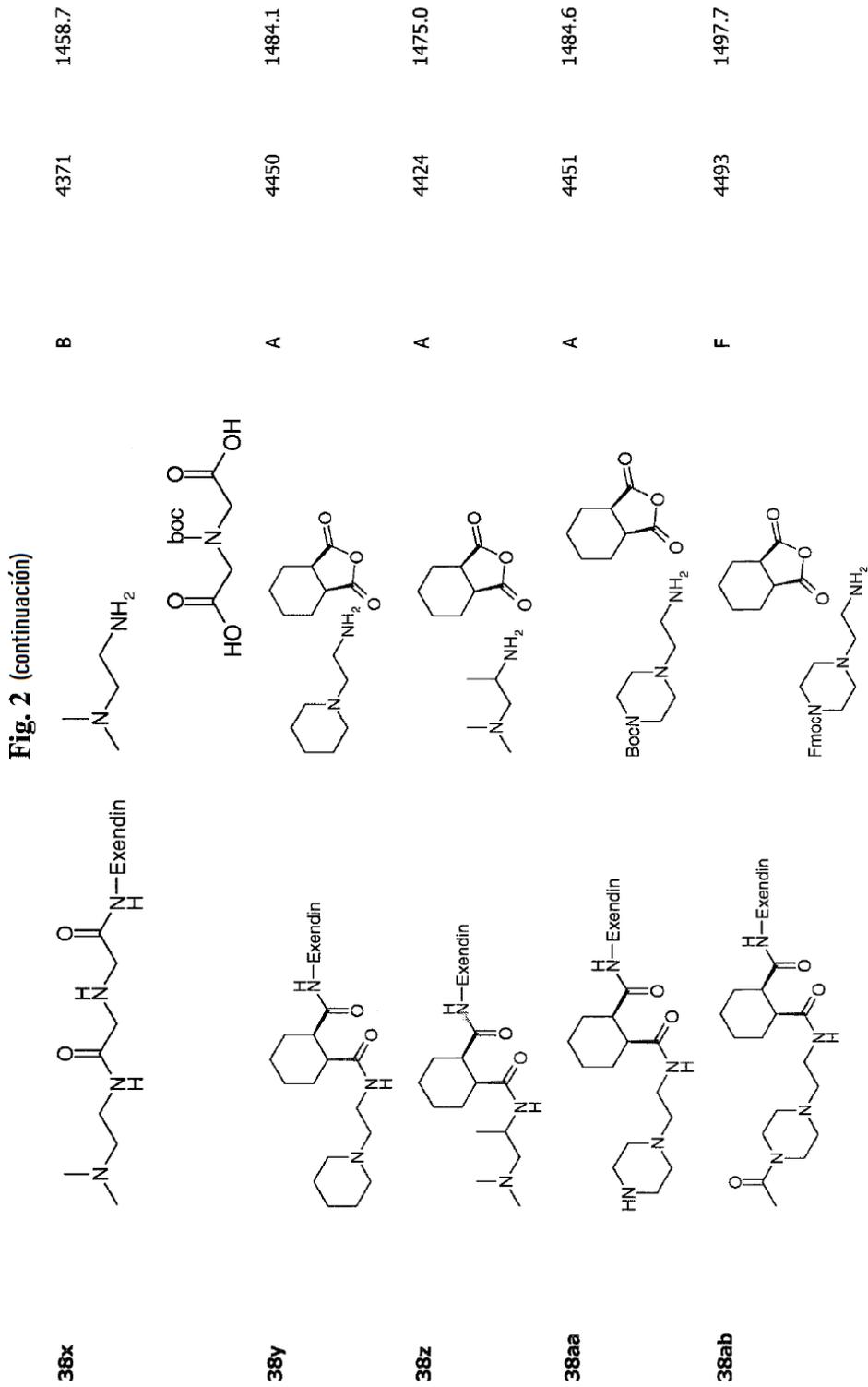


Fig. 2 (continuación)

Fig. 2 (continuación)

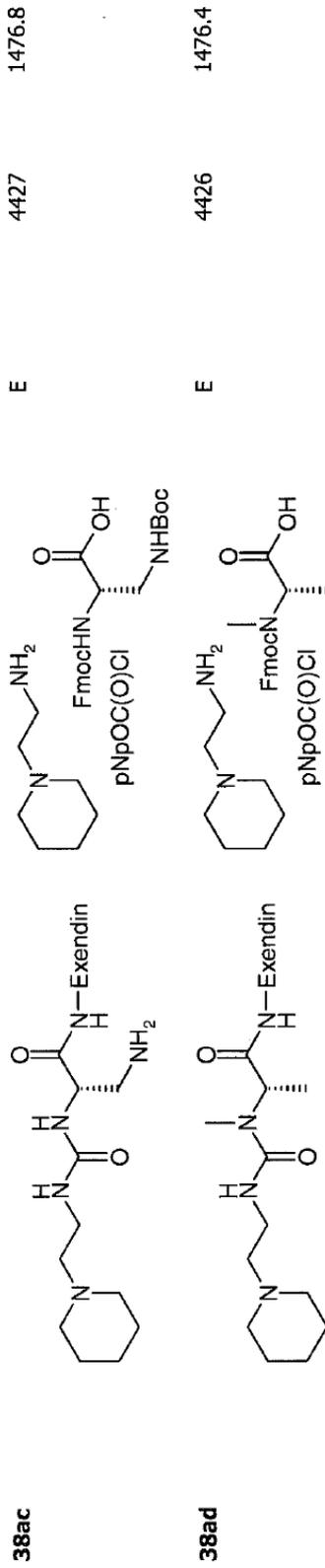


Fig. 2 (continuación)

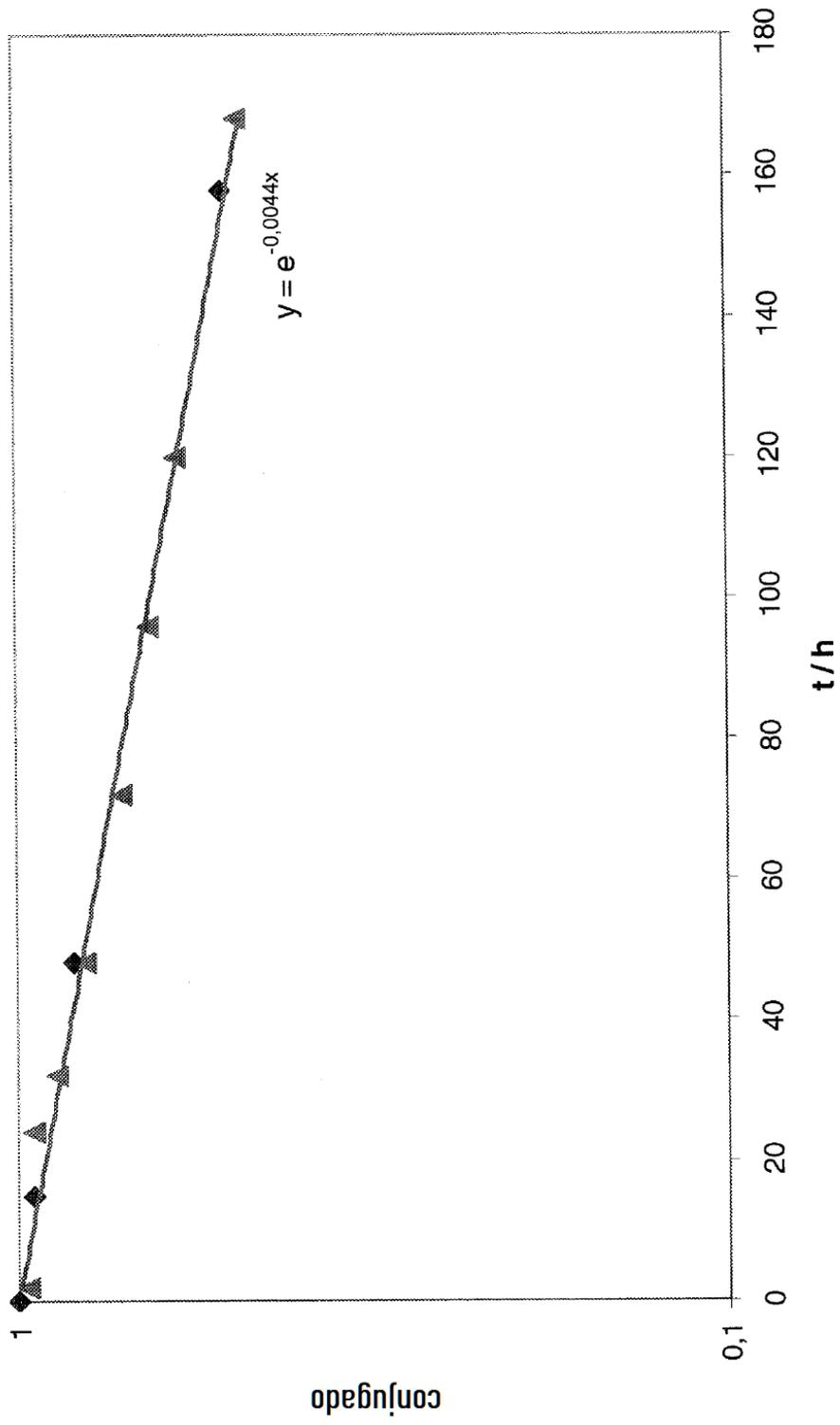


Fig. 3