

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 017 008**

51 Int. Cl.:

A61K 47/68 (2007.01)
A61K 31/7084 (2006.01)
A61K 47/65 (2007.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
C07H 21/02 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.09.2019** **PCT/JP2019/035198**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **12.03.2020** **WO20050406**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.09.2019** **E 19857433 (7)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.01.2025** **EP 3848054**

54 Título: **Conjugados de anticuerpo-fármaco de derivados de dinucleótidos cíclicos**

30 Prioridad:

06.09.2018 JP 2018167369

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.05.2025

73 Titular/es:

DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED (100.00%)
3-5-1, Nihonbashi Honcho, Chuo-ku
Tokyo 103-8426, JP

72 Inventor/es:

TSUDA, TOSHIFUMI;
TABUCHI, TOSHIKI;
WATANABE, HIDEAKI;
KOBAYASHI, HIROYUKI;
ISHIZAKI, MASAYUKI;
HARA, KYOKO;
WADA, TEIJI y
ARAI, MASAMI

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

Observaciones:

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

ES 3 017 008 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

Conjugados de anticuerpo-fármaco de derivados de dinucleótidos cíclicos

Campo técnico

La presente invención se refiere a un conjugado de anticuerpo-fármaco formado conjugando derivados de dinucleótidos cíclicos novedosos con actividad agonista de STING y anticuerpos contra células diana mediante un conector, un agonista de STING que comprende el conjugado de anticuerpo-fármaco, una composición farmacéutica que contiene el conjugado de anticuerpo-fármaco, y un agente antitumoral que comprende el conjugado de anticuerpo-fármaco.

Antecedentes de la técnica

STING ("Stimulator of Interferon Genes", estimulador de genes del interferón) es una proteína adaptadora transmembrana situada en el retículo endoplásmico (bibliografía no relacionada con patentes 1). El STING actúa como una molécula central para la estimulación inmunitaria innata en mamíferos y desempeña un papel en la primera línea de defensa contra la invasión de patógenos, tales como bacterias y virus. Se sabe que la activación de STING se produce por una señal emitida cuando una pluralidad de detectores citoplasmáticos de ADN detectan un ADN exógeno o endógeno. Entre los detectores citoplasmáticos de ADN, se prevé que la cGAS (GMP-AMP sintasa cíclica) sea un importante detector de ADN. Cuando cGAS detecta un ADN, se produce un dinucleótido cíclico (2',3'-cGAMP), y este 2',3'-cGAMP se une directamente a STING para activarlo (bibliografía no relacionada con patentes 2). El STING activado se desplaza al aparato de Golgi y estimula la autofosforilación de la TBK1 (cinasa de unión a Tank 1). La TBK-1 activada a través de la autofosforilación activa tanto la vía de transcripción de IRF3 ("interferon regulatory factor 3", factor 3 regulador de interferón) (bibliografía no relacionada con patentes 3) como la vía de transcripción de NFκB (bibliografía no relacionada con patentes 4), aumentando la producción de proteínas inflamatorias llamadas interferones y citocinas (de tipo IIFN (interferón), IL-6 (interleucina-6), TNF-α ("Tumor Necrosis Factor-α", factor de necrosis tumoral-α)). Estas proteínas activan el sistema inmunitario adaptativo, incluidos los linfocitos T, a través de complejas cascadas que destruyen los agentes patógenos y las células cancerosas.

Estudios recientes han demostrado que STING estimula no sólo la defensa del hospedador frente a microorganismos, sino también la inmunidad antitumoral. Por ejemplo, los tumores inmunogénicos trasplantados a ratones deficientes en STING crecen más rápidamente que los trasplantados a ratones de tipo salvaje y a ratones deficientes en TRIF (dominio del receptor Toll/interleucina-1 (IL-1) que contiene un adaptador inductor de interferón-β). A diferencia de los ratones deficientes en TLR ("Toll-like receptor", receptor similar a Toll), MyD88 ("myeloid differentiation primary response 88", respuesta primaria de diferenciación mieloide-88) y MAVS ("mitochondrial antiviral-signaling protein", proteína de transducción de señales antivíricas mitocondrial), el cebado espontáneo de linfocitos T CD8⁺ contra tumores también desapareció en ratones deficientes en STING. Esto sugiere que la vía de STING que se activa por la detección citoplasmática del ADN participa en el control del crecimiento tumoral (bibliografía no relacionada con patentes 5). Además, otros estudios han demostrado que STING es necesario para el efecto antitumoral en radioterapia (bibliografía no relacionada con patentes 6) y la terapia con anticuerpos anti-CD47 (bibliografía no relacionada con patentes 7). El ADN derivado de células tumorales destruidas tras ser tratadas con radiación o un anticuerpo anti-CD47 se desplaza al citoplasma de las células dendríticas para activar la vía de cGAS-STING y, a continuación, induce la producción de IFN para activar la inmunidad adaptativa a través de la inmunidad innata. Estos estudios sugieren que el cebado cruzado a través de células dendríticas activadas por la vía STING es importante para causar inmunidad adaptativa contra los tumores.

Se ha demostrado que el compuesto de molécula pequeña flavonoide DMXAA, que se conoce como agente disruptor vascular, induce la producción de IFN de tipo I en macrófagos y, por tanto, tiene una potente actividad antitumoral en modelos tumorales de ratón (bibliografía no relacionada con patentes 8). Se preveía que el DMXAA sirviera como fármaco inmunoterapéutico para el cáncer de pulmón no microcítico debido al efecto antitumoral superior en los estudios preclínicos; sin embargo, el DMXAA fracasó en los ensayos clínicos (literatura no patente 9). Un estudio reciente ha revelado que el DMXAA es un agonista específico del STING de ratón y que no presenta reactividad cruzada interespecie con el STING humano, por lo que es incapaz de unirse a ella (bibliografía no relacionada con patentes 10). Después de todo, el DMXAA resultó ineficaz en humanos; sin embargo, estudios con modelos de ratón han sugerido que los fármacos de molécula pequeña son capaces de potenciar la inmunidad antitumoral cebando eficazmente los linfocitos T CD8⁺ a través de STING.

Se ha demostrado que cuando un dinucleótido cíclico ("cyclic dinucleotide", CDN), otro compuesto de molécula pequeña, se administra a ratones portadores de tumores, potencia la respuesta inmunitaria antitumoral mediada por STING para inhibir significativamente el crecimiento tumoral, mejorando la tasa de supervivencia de los ratones (bibliografía no relacionada con patentes 11). Los CDN se clasifican en CDN bacterianos con dos enlaces fosfato 3'-5' canónicos (GMP-dicíclico, AMP-dicíclico, 3',3'-cGAMP) y CDN no canónicos, de enlace mixto, con un enlace fosfato 2'-5' (2',3'-cGAMP), que son producidos por la cGAS de mamíferos. Un estudio reciente ha demostrado que los CDN de enlace mixto en lugar de los CDN canónicos son capaces de activar universalmente diferentes tipos de STING (bibliografía no relacionada con patentes 12).

Los CDN de tipo natural son rápidamente descompuestos por nucleasas en la sangre como la mayoría de las moléculas de ácido nucleico y, por lo tanto, no pueden administrarse en la forma original. Por lo tanto, se han desarrollado compuestos de molécula pequeña sintetizados que tienen actividad agonista de STING *in vivo* (por ejemplo, literaturas de patentes 1 a 26).

- 5 El agonista de STING MIW-815 (llamado también ADU-S100, ML RR-S2 CDA o ML-RR-CDA-2Na⁺), que es un agente antitumoral actualmente en ensayos clínicos, se administra directamente en un tumor. Tal procedimiento de administración directa de un agonista de STING en un tumor sólo permite la administración del fármaco en una región restringida de un tumor y tiene dificultades para administrar directamente el fármaco a cada tumor distante que ha metastatizado, limitando desventajosamente el tipo de tumores tratables. Aunque la bibliografía no relacionada con
- 10 patentes 13 divulga que el efecto antitumoral fue exhibido a través de la administración de ML RR-S2 CDA, el examen se hizo sólo sobre la administración intratumoral, y el efecto antitumoral a través de la administración sistémica (por ejemplo, administración intravenosa) no se demuestra. La bibliografía no relacionada con patentes 14 divulga que el efecto antitumoral se exhibió mediante la administración intravenosa del agonista de STING SB 11285 a modelos tumorales de ratón, pero no aclara qué estructura tiene específicamente el compuesto SB 11285. La bibliografía de
- 15 patentes 14 describe un conjugado que incluye un compuesto inmunoestimulador, una construcción de anticuerpo y un conector, pero no describe ningún ejemplo específico de un conjugado que utilice un agonista de STING como compuesto inmunoestimulador. La bibliografía de patentes 26 describe un conjugado formado por la conjugación de un CDN que tiene una estructura específica y un anticuerpo a través de un conector, pero no describe la administración del conjugado *in vivo* en los ejemplos y, por lo tanto, no se ha confirmado el efecto antitumoral del conjugado. La
- 20 bibliografía de patentes 27 describe composiciones de conjugados que comprenden compuestos inmunoestimuladores y procedimientos de preparación y uso de los conjugados, incluidos procedimientos para tratar trastornos, tales como el cáncer.

Lista de citas

Bibliografía de patentes

- 25 Bibliografía de patentes 1: WO 2014/099824
Bibliografía de patentes 2: WO2014/179335
Bibliografía de patentes 3: WO2014/189805
Bibliografía de patentes 4: WO2014/189806
Bibliografía de patentes 5: WO2015/074145
- 30 Bibliografía de patentes 6: WO2015/185565
Bibliografía de patentes 7: WO2016/096714
Bibliografía de patentes 8: WO2016/012305
Bibliografía de patentes 9: WO2016/145102
Bibliografía de patentes 10: WO2017/027646
- 35 Bibliografía de patentes 11: WO2017/027645
Bibliografía de patentes 12: WO2017/075477
Bibliografía de patentes 13: WO2017/093933
Bibliografía de patentes 14: WO2017/100305
Bibliografía de patentes 15: WO2017/123669
- 40 Bibliografía de patentes 16: WO2017/161349
Bibliografía de patentes 17: WO2017/175147
Bibliografía de patentes 18: WO2017/175156
Bibliografía de patentes 19: WO2018/009466
Bibliografía de patentes 20: WO2018/045204
- 45 Bibliografía de patentes 21: WO2018/060323
Bibliografía de patentes 22: WO2018/067423

Bibliografía de patentes 23: WO2018/065360

Bibliografía de patentes 24: WO2014/093936

Bibliografía de patentes 25: WO2018/009648

Bibliografía de patentes 26: WO2018/100558

5 Bibliografía de patentes 27: WO2018/140831

Bibliografía no relacionada con patentes

Bibliografía no relacionada con patentes 1: Nature, 2008, 455, 674-678

Bibliografía no relacionada con patentes 2: Mol. Cell, 2013, 51, 226-235

Bibliografía no relacionada con patentes 3: Science, 2015a, 347, aaa2630

10 Bibliografía no relacionada con patentes 4: J. Virol., 2014, 88, 5328-5341

Bibliografía no relacionada con patentes 5: Immunity, 2014, 41, 830-842

Bibliografía no relacionada con patentes 6: Immunity, 2014, 41, 830-842

Bibliografía no relacionada con patentes 7: Nat. Med., 2015, 21, 1209-1215

Bibliografía no relacionada con patentes 8: J. Immunol., 1994, 153, 4684-4693

15 Bibliografía no relacionada con patentes 9: J. Clin. Oncol., 2011, 29, 2965-2971

Bibliografía no relacionada con patentes 10: J. Immunol., 2013, 190, 5216-5225

Bibliografía no relacionada con patentes 11: Sci. Rep., 2016, 6, 19049

Bibliografía no relacionada con patentes 12: Mol. Cell, 2015, 59, 891-903

Bibliografía no relacionada con patentes 13: Cell Rep., 2015, 11, 1018-1030

20 Bibliografía no relacionada con patentes 14: AACR Tumor Immunology and Immunotherapy, 2017, Poster n.º A25

Sumario de la invención

Problema técnico

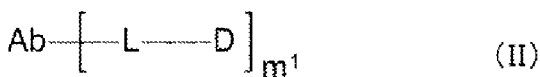
25 Se desea el desarrollo de derivados de CDN con un esqueleto novedoso que tenga actividad agonista de STING y que aumente la producción de proteínas inflamatorias, tales como interferones y citocinas, para activar células inmunitarias; y agentes terapéuticos y/o procedimientos terapéuticos que usen los derivados de CDN novedosos para enfermedades asociadas con la actividad agonista de STING, por ejemplo, enfermedades tratables con activación inmunitaria (por ejemplo, cáncer). También se desean conjugados de anticuerpo-fármaco que se formen conjugando el derivado de CDN novedoso y un anticuerpo contra las células diana mediante un conector, y que permitan la administración sistémica y sean capaces de administrar el agonista de STING específicamente a las células y órganos diana (por ejemplo, focos tumorales); y agentes terapéuticos y/o procedimientos terapéuticos que utilicen los conjugados de anticuerpo-fármaco para enfermedades asociadas con la actividad agonista de STING, por ejemplo, enfermedades tratables con activación inmunitaria (por ejemplo, cáncer).

Solución al problema

35 Para resolver los problemas anteriores, los presentes inventores idearon derivados de CDN novedosos que tienen un sustituyente tricíclico fusionado y descubrieron que los derivados de CDN novedosos tienen una potente actividad agonista de STING y presentan una potente actividad antitumoral. Además, los presentes inventores idearon conjugados de anticuerpo-fármaco formados conjugando los presentes derivados de CDN novedosos y un anticuerpo mediante un conector y descubrieron que los conjugados de anticuerpo-fármaco cuando se administran sistémicamente presentan efecto antitumoral en tumores que expresan un antígeno, completando así la presente invención.

Específicamente, la presente invención se refiere a lo siguiente.

[1] Un conjugado de anticuerpo-fármaco representado por la fórmula (II):



en la que:

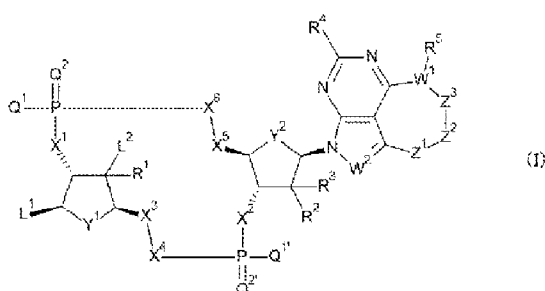
m^1 está en el intervalo de 1 a 10;

Ab representa un anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo, en el que un glucano del anticuerpo está opcionalmente remodelado;

L representa un conector que une Ab y D;

Ab se une directamente desde un residuo de aminoácido de Ab a L, u opcionalmente se une a través de un glucano o glucano remodelado de Ab a L; y

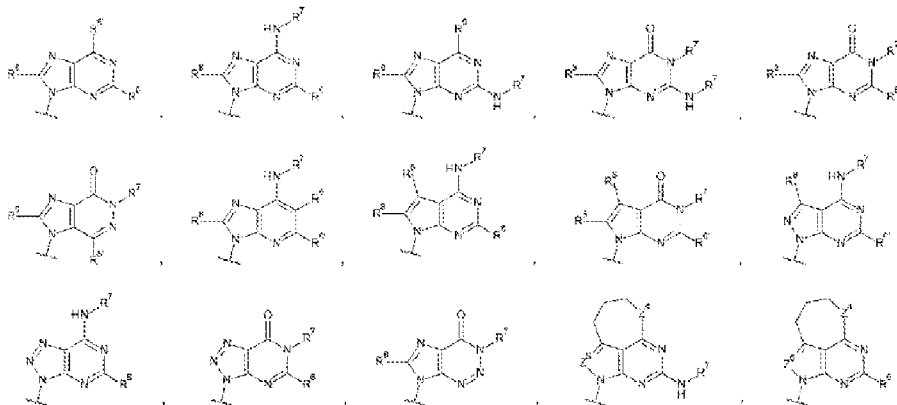
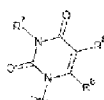
D representa un compuesto representado por la fórmula (I):



en la que:

L se une a cualquier grupo -NH₂ o hidroxilo incluido en L¹ o L²;

L^1 representa un grupo seleccionado del grupo que consiste en las siguientes fórmulas:

 y 

y está opcionalmente sustituido en cualquier posición con uno a tres grupos seleccionados del grupo que consiste en un grupo hidroxilo, $-NH_2$, un grupo 2-hidroxiacetilaminometilo y un grupo 2-[(2-hidroxiacetil)amino]etilo.

en las que:

R⁶ y R^{6'} representan cada uno independientemente un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, un grupo hidroxilo, -NH₂, un grupo alquilo C1-C6, un grupo alqueno C2-C6 o un grupo alquino C2-C6;

R⁷ y R⁷ representan cada uno independientemente un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C1-C6, en el que el grupo alquilo C1-C6 está opcionalmente sustituido con uno o dos sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en un átomo de halógeno y un grupo oxo;

R⁸ y R⁸ representan cada uno independientemente un átomo de hidrógeno o un átomo de halógeno;

Z⁴ representa -CH₂-, -NH- o un átomo de oxígeno; y

Z⁵ representa un átomo de nitrógeno o -CH=;

L² representa un grupo seleccionado entre (i) y (ii):

5 (i) cuando se une a L, L² representa -NHR', un grupo hidroxialquilo C1-C6, o un grupo aminoalquilo C1-C6, en el que R' representa un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C1-C6, un grupo alquenilo C2-C6, un grupo alquinilo C2-C6 o un grupo cicloalquilo C3-C6, y el grupo alquilo C1-C6, el grupo alquenilo C2-C6 o el grupo alquinilo C2-C6 está opcionalmente sustituido con uno a seis átomos de halógeno; y

10 (ii) cuando no se une a L, L² representa un átomo de hidrógeno o un átomo de halógeno;

Q¹ y Q¹ representan cada uno independientemente un grupo hidroxil, un grupo tiol o un grupo borano (BH₃);

Q² y Q² representan cada uno independientemente un átomo de oxígeno o un átomo de azufre;

X¹ y X² representan cada uno independientemente un átomo de oxígeno, un átomo de azufre o -CH₂-;

15 Y¹ e Y² representan cada uno un átomo de oxígeno o -CH₂-;

X³ y X⁴ representan un grupo seleccionado entre (iii) y (iv):

(iii) cuando Y¹ es un átomo de oxígeno, X³-X⁴ representa -CH₂-O-, -CH₂-S-, -CH₂-CH₂- o -CH₂-CF₂-; y

(iv) cuando Y¹ es -CH₂-, X³-X⁴ representa -O-CH₂-;

20 X⁵ y X⁶ representan un grupo seleccionado entre (v) y (vi):

(v) cuando Y² es un átomo de oxígeno, X⁵-X⁶ representa -CH₂-O-, -CH₂-S-, -CH₂-CH₂- o -CH₂-CF₂-; y

(vi) cuando Y² es -CH₂-, X⁵-X⁶ representa -O-CH₂-;

25 R¹, R² y R³ representan cada uno independientemente un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, -OR', -OC(=O)R', -N₃, -NHR', -NR'R'' o -NHC(=O)R', en los que R' es como se ha definido anteriormente, y R'' representa un grupo alquilo C1-C6, un grupo alquenilo C2-C6, un grupo alquinilo C2-C6 o un grupo cicloalquilo C3-C6;

W¹ representa un átomo de nitrógeno, un átomo de oxígeno, un átomo de azufre o -CH-;

W² representa un átomo de nitrógeno o -CH=;

30 R⁴ representa un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno o -NH₂;

R⁵ representa un grupo seleccionado entre (vii) y (x):

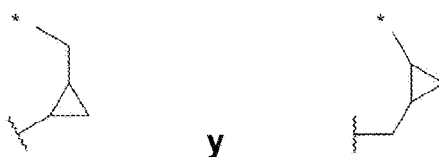
(vii) cuando W¹ es un átomo de nitrógeno, R⁵ representa un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C1-C6, un grupo hidroxialquilo C1-C6 o un grupo aminoalquilo C1-C6;

(viii) cuando W¹ es un átomo de oxígeno, R⁵ está ausente;

35 (ix) cuando W¹ es un átomo de azufre, R⁵ está ausente; y

(x) cuando W¹ es -CH-, R⁵ representa un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, un grupo hidroxil, -NH₂ o un grupo alquilo C1-C6;

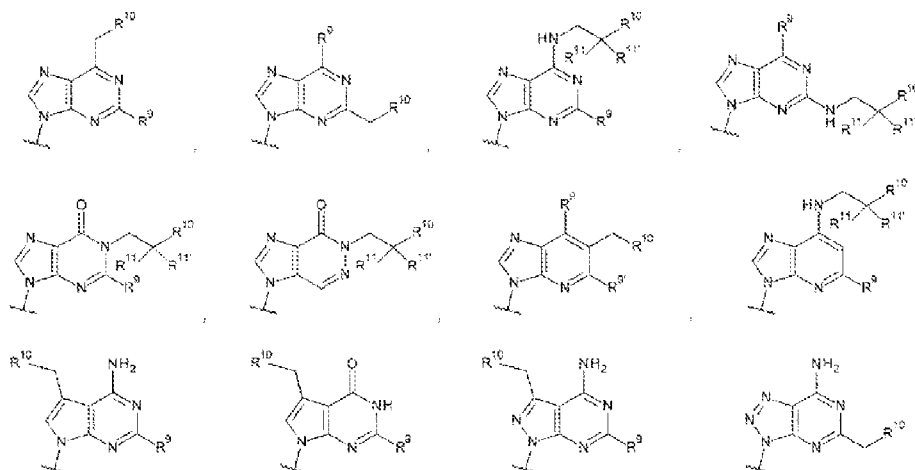
40 Z¹-Z²-Z³ juntos representan -CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-R''', -CH=CH-CH₂-, -CH=CX-CH₂-, -CX=CH-CH₂-, -CX=CX-CH₂-, -C(=O)-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-C(=O)-, -CH₂-CH(CH₃)-CH₂- o -CH₂-CH₂-CH(CH₃)-, en los que R''' representa -O- o -CH₂-CH₂- y X representa un átomo de halógeno, o un grupo representado por una de las siguientes fórmulas:

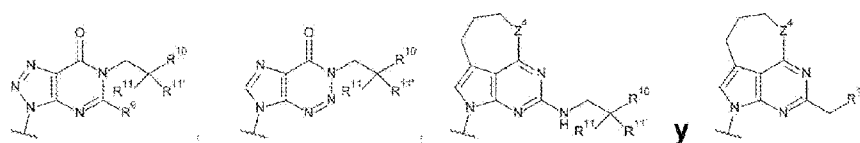


en las que:

cada asterisco indica unión a W^1 , y cada línea ondulada indica unión al átomo de carbono de $=C-$;

- [2] El conjugado de anticuerpo-fármaco según [1], en el que W^1 es un átomo de nitrógeno;
- [3] El conjugado de anticuerpo-fármaco según [2], en el que W^1 es un átomo de nitrógeno, y R^5 es un átomo de hidrógeno;
- [4] El conjugado de anticuerpo-fármaco según [1], en el que W^1 es un átomo de oxígeno;
- [5] El conjugado de anticuerpo-fármaco según [1], en el que W^1 es un átomo de azufre;
- [6] El conjugado de anticuerpo-fármaco según [1], en el que W^1 es $-CH_2-$;
- [7] El conjugado de anticuerpo-fármaco según [6], en el que W^1 es $-CH_2-$, y R^5 es un átomo de hidrógeno;
- [8] El conjugado de anticuerpo-fármaco según uno cualquiera de [1] a [7], en el que Z^1 , Z^2 y Z^3 forman conjuntamente $-CH_2-CH_2-CH_2-$ o $-CH=CH-CH_2-$;
- [9] El conjugado de anticuerpo-fármaco según uno cualquiera de [1] a [7], en el que Z^1 , Z^2 y Z^3 forman conjuntamente $-CH_2-CH(CH_3)-CH_2-$ o $-CH_2-CH_2-CH(CH_3)-$;
- [10] El conjugado de anticuerpo-fármaco según uno cualquiera de [1] a [7], en el que Z^1 , Z^2 y Z^3 forman conjuntamente $-CH_2-CH_2-R'''$ -, en el que R''' representa $-O-$ o $-CH_2-CH_2-$;
- [11] El conjugado de anticuerpo-fármaco según uno cualquiera de [1] a [10], en el que W^2 es $-CH=$;
- [12] El conjugado de anticuerpo-fármaco según uno cualquiera de [1] a [10], en el que W^2 es un átomo de nitrógeno;
- [13] El conjugado de anticuerpo-fármaco según uno cualquiera de [1] a [12], en el que R^4 representa un átomo de hidrógeno;
- [14] El conjugado de anticuerpo-fármaco según uno cualquiera de [1] a [12], en el que R^4 representa un átomo de flúor;
- [15] El conjugado de anticuerpo-fármaco según uno cualquiera de [1] a [14], en el que R^8 y R^8 en L^1 son cada uno independientemente un átomo de hidrógeno;
- [16] El conjugado de anticuerpo-fármaco según uno cualquiera de [1] a [15], en el que L^1 es un grupo seleccionado del grupo que consiste en las siguientes fórmulas:





en las que:

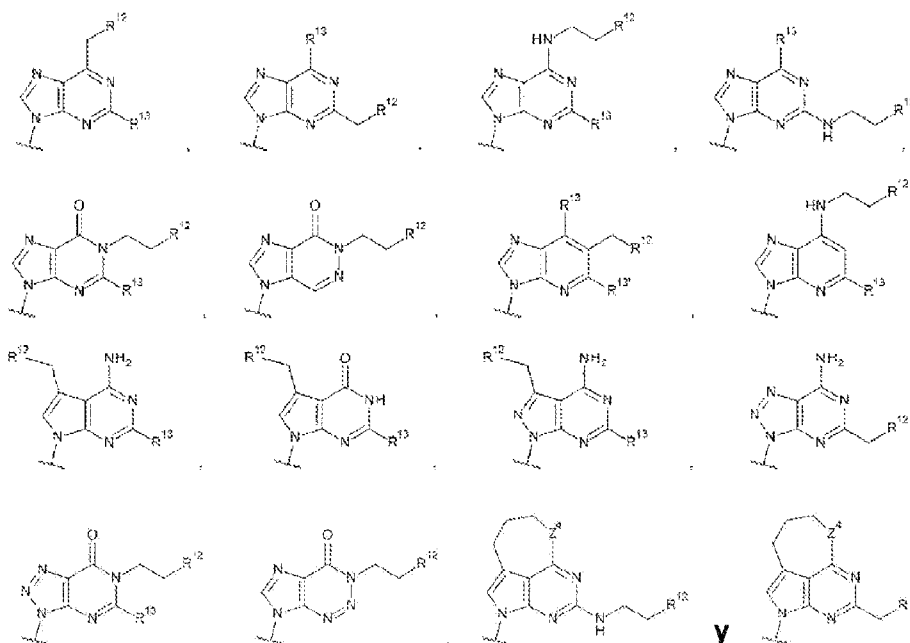
R^9 y R^9 representan cada uno un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, un grupo hidroxilo o $-NH_2$;

5 R^{10} representa un grupo hidroxilo, $-NH_2$, $-NHC(=O)CH_2OH$, $-CH_2NHC(=O)CH_2OH$, $-CH_2CH_2NHC(=O)CH_2OH$, un grupo hidroxialquilo C1-C3 o un grupo aminoalquilo C1-C3;

R^{11} y $R^{11'}$ representan cada uno independientemente un átomo de hidrógeno, un átomo de flúor o un grupo metilo, o R^{11} y $R^{11'}$ se enlazan para formar ciclopropano; y

Z^4 representa $-CH_2-$, $-NH-$ o un átomo de oxígeno;

10 [17] El conjugado de anticuerpo-fármaco según uno cualquiera de [1] a [15], en el que L^1 es un grupo seleccionado del grupo que consiste en las siguientes fórmulas:



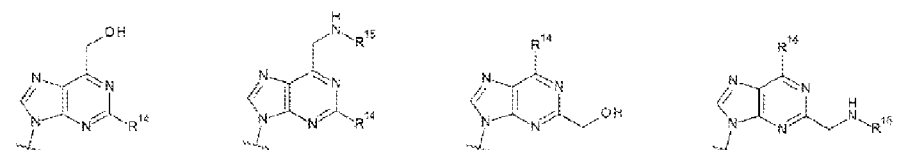
15 en las que:

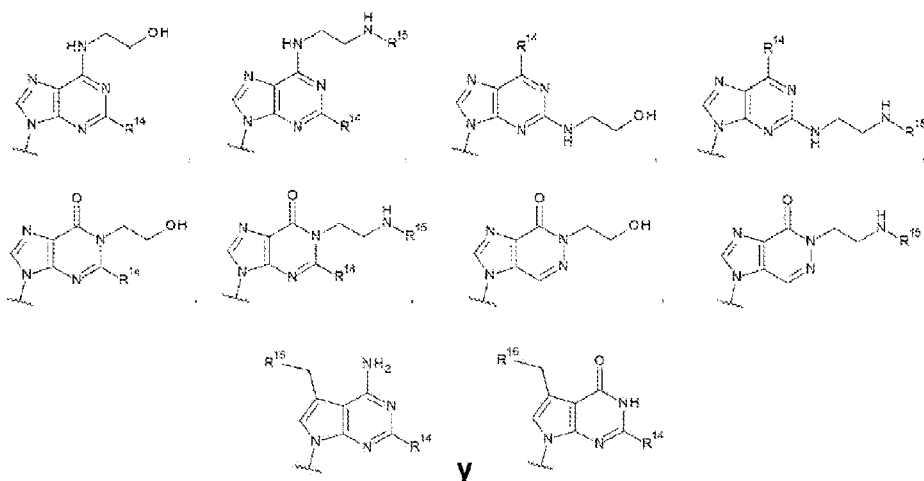
R^{13} y $R^{13'}$ representan cada uno independientemente un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo o $-NH_2$;

R^{12} representa un grupo hidroxilo, $-NH_2$, $-CH_2OH$, $-NHC(=O)CH_2OH$, $-CH_2NHC(=O)CH_2OH$ o $-CH_2CH_2NHC(=O)CH_2OH$; y

Z^4 es como se ha definido anteriormente;

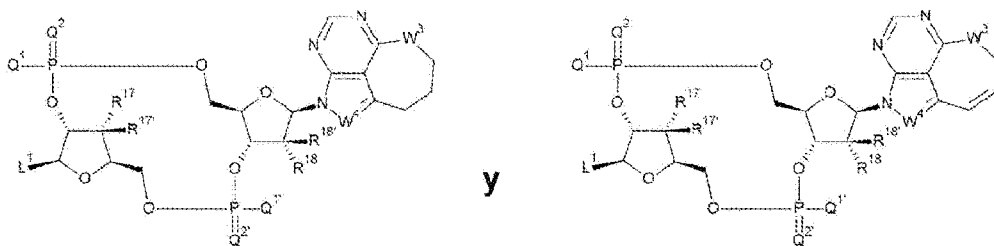
20 [18] El conjugado de anticuerpo-fármaco según uno cualquiera de [1] a [15], en el que L^1 es un grupo seleccionado del grupo que consiste en las siguientes fórmulas:





en las que:

- 5 R^{14} representa un átomo de hidrógeno o $-NH_2$;
 R^{15} representa un átomo de hidrógeno o $-C(=O)CH_2OH$; y
 R^{16} representa un grupo hidroxilo, $-NH_2$, $-CH_2OH$, $-CH_2CH_2OH$, $-CH_2NH_2$ o $-CH_2CH_2NH_2$;
- [19] El conjugado de anticuerpo-fármaco según uno cualquiera de [1] a [18], en el que L^2 se une a L y representa $-NH_2$, $-CH_2NH_2$ o $-CH_2OH$;
- 10 [20] El conjugado de anticuerpo-fármaco según uno cualquiera de [1] a [18], en el que L^2 no se une a L y representa un átomo de hidrógeno o un átomo de flúor;
- [21] El conjugado de anticuerpo-fármaco según uno cualquiera de [1] a [20], en el que Q^1 y $Q^{1'}$ representan cada uno independientemente un grupo hidroxilo o un grupo tiol;
- 15 [22] El conjugado de anticuerpo-fármaco según uno cualquiera de [1] a [21], en el que X^1 y X^2 representan cada uno un átomo de oxígeno;
- [23] El conjugado de anticuerpo-fármaco según uno cualquiera de [1] a [22], en el que Y^1 e Y^2 representan cada uno un átomo de oxígeno;
- [24] El conjugado de anticuerpo-fármaco según uno cualquiera de [1] a [23], en el que X^3 y X^4 representan $-CH_2-O-$;
- 20 [25] El conjugado de anticuerpo-fármaco según uno cualquiera de [1] a [24], en el que X^5 y X^6 representan $-CH_2-O-$;
- [26] El conjugado de anticuerpo-fármaco según uno cualquiera de [1] a [25], en el que R^1 , R^2 , y R^3 son cada uno independientemente un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo o un átomo de flúor;
- 25 [27] El conjugado de anticuerpo-fármaco según uno cualquiera de [1] a [26], en el que D se representa con una de las dos fórmulas siguientes:



en las que:

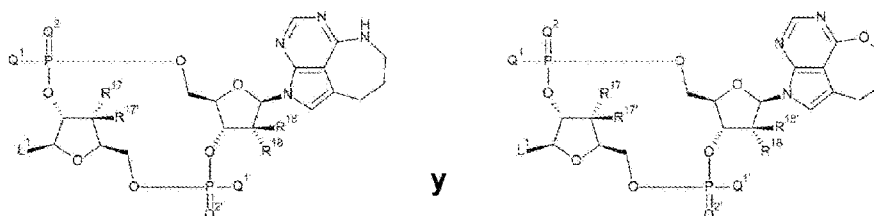
L^1 , Q^1 , $Q^{1'}$, Q^2 y $Q^{2'}$ son como se han definido anteriormente;

R^{17} , $R^{17'}$, R^{18} y $R^{18'}$ representan cada uno independientemente un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, un grupo hidroxilo o $-NH_2$;

W^3 representa $-NH-$, un átomo de oxígeno, un átomo de azufre o $-CH_2-$; y

W^4 representa $-CH=$ o un átomo de nitrógeno;

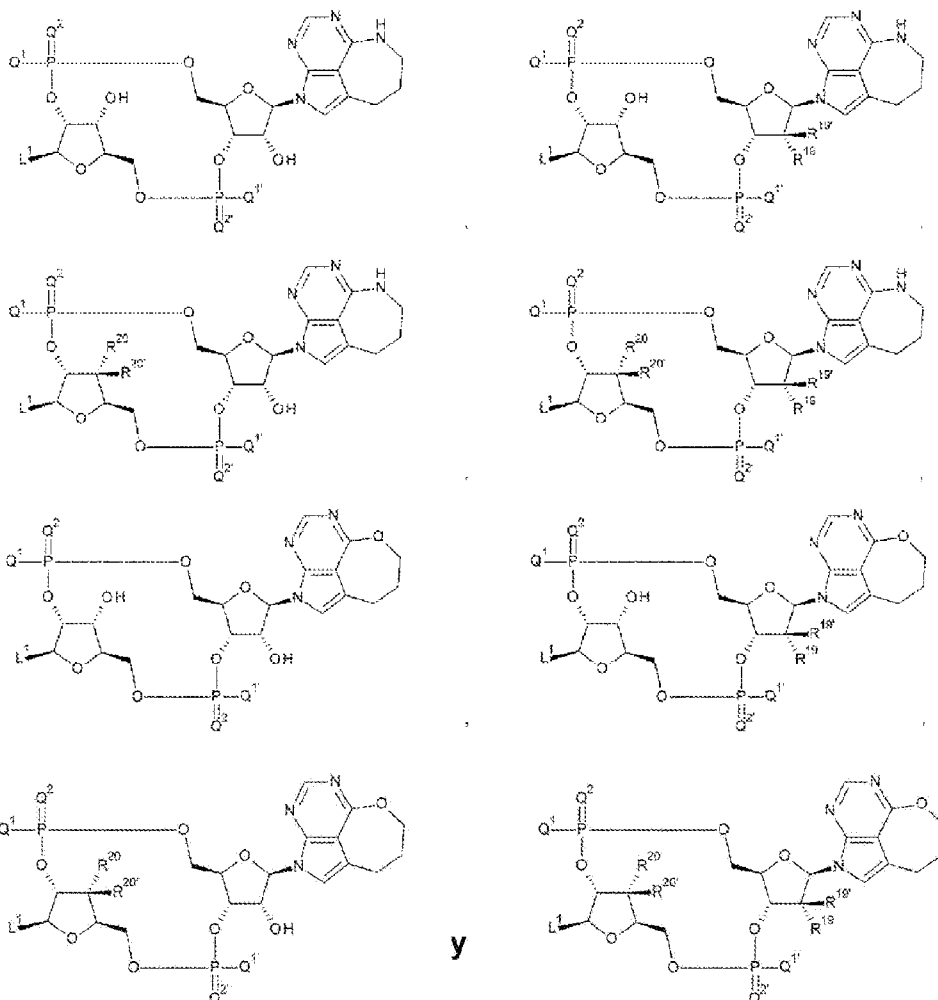
- 5 [28] El conjugado de anticuerpo-fármaco según [27], en el que D se representa con una de las dos fórmulas siguientes:



en las que:

L^1 , Q^1 , Q^1' , Q^2 , Q^2' , R^{17} , $R^{17'}$, R^{18} y $R^{18'}$ son como se han definido anteriormente;

- 10 [29] El conjugado de anticuerpo-fármaco según [27] o [28], en el que D se representa con una cualquiera de las ocho fórmulas siguientes:



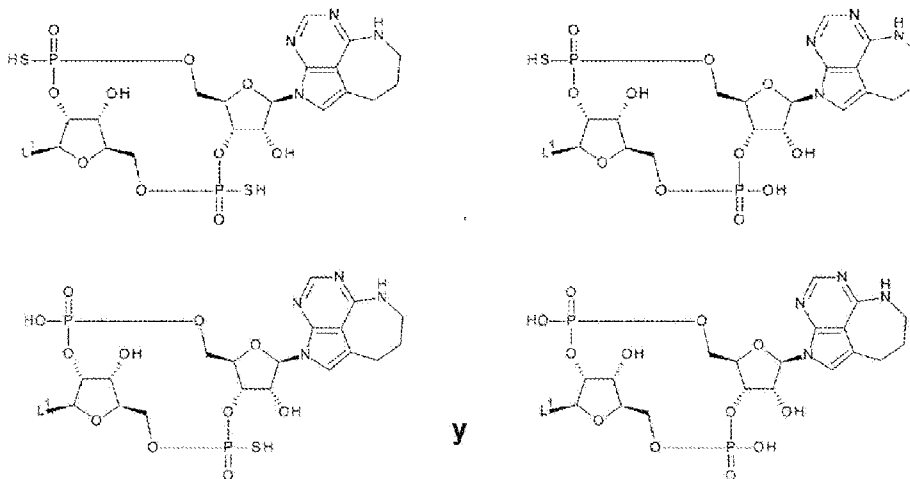
15

en las que:

L^1 , Q^1 , Q^1' , Q^2 y Q^2' son como se ha definido anteriormente; y

R^{19} , $R^{19'}$, R^{20} y $R^{20'}$ representan cada uno independientemente un átomo de hidrógeno o un átomo de flúor;

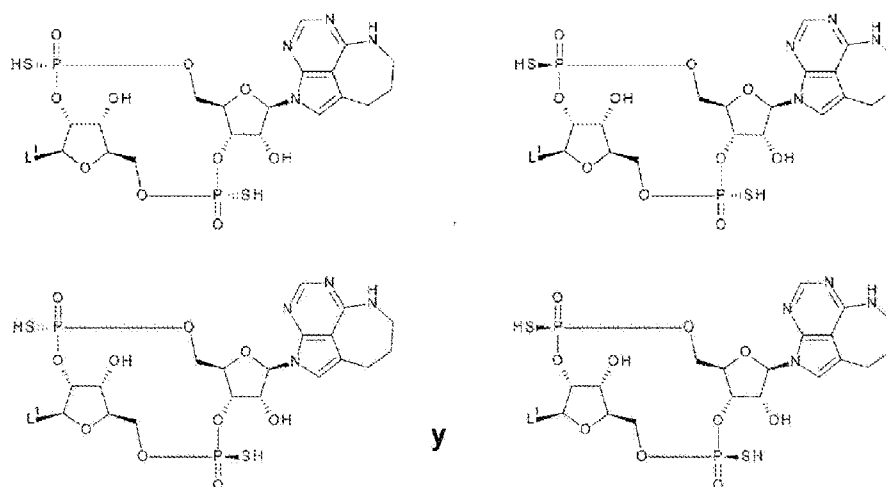
[30] El conjugado de anticuerpo-fármaco según uno cualquiera de [27] a [29], en el que D se representa con una cualquiera de las cuatro fórmulas siguientes:



en las que:

L^1 es como se ha definido anteriormente;

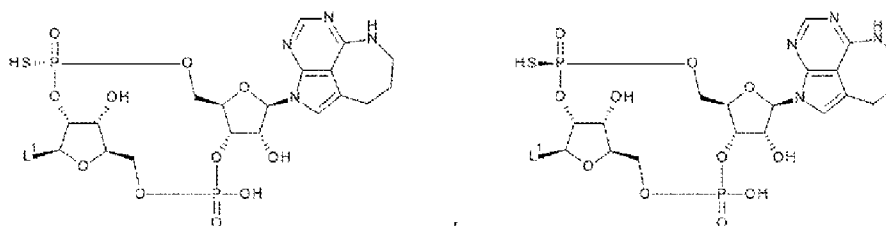
[31] El conjugado de anticuerpo-fármaco según uno cualquiera de [27] a [30], en el que D se representa con una cualquiera de las cuatro fórmulas siguientes:

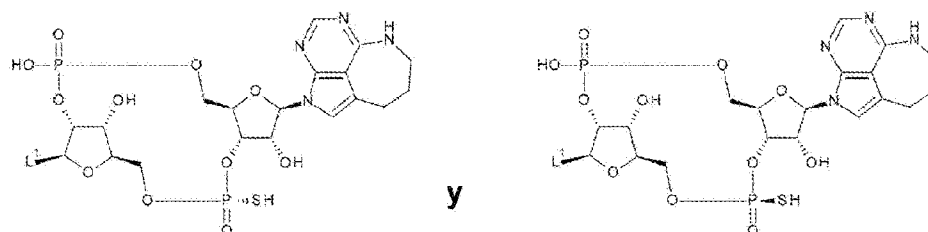


en las que:

L^1 es como se ha definido anteriormente;

[32] El conjugado de anticuerpo-fármaco según uno cualquiera de [27] a [30], en el que D se representa con una cualquiera de las cuatro fórmulas siguientes:

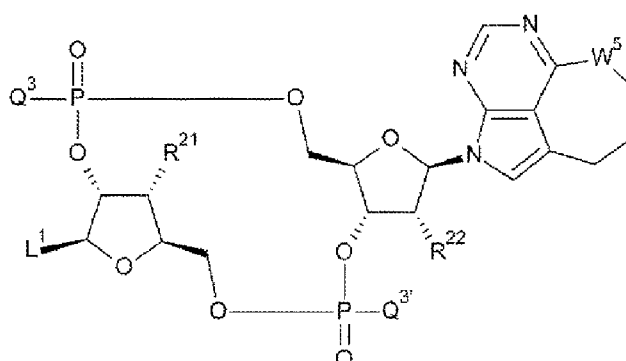




en las que:

L¹ es como se ha definido anteriormente;

5 [33] El conjugado de anticuerpo-fármaco según uno cualquiera de [1] a [26], en el que D se representa con la siguiente fórmula:



en la que:

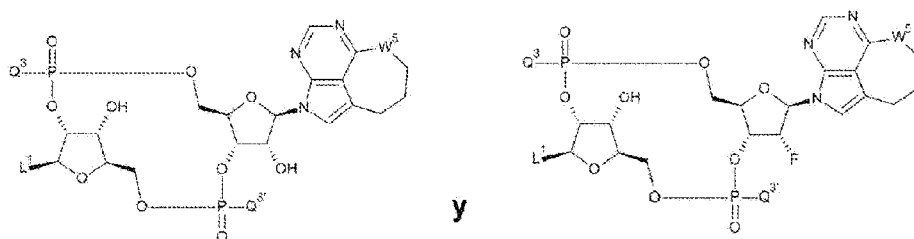
L¹ es como se ha definido anteriormente;

Q³ y Q^{3'} representan cada uno independientemente un grupo hidroxilo o un grupo tiol;

10 R²¹ y R²² representan cada uno independientemente un grupo hidroxilo o un átomo de flúor; y

W⁵ representa -NH- o un átomo de azufre;

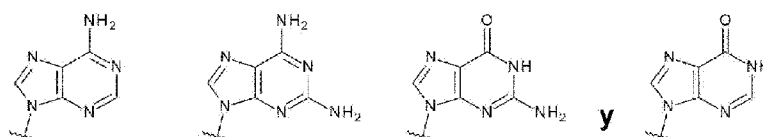
[34] El conjugado de anticuerpo-fármaco según [33], en el que D se representa con una de las dos fórmulas siguientes:



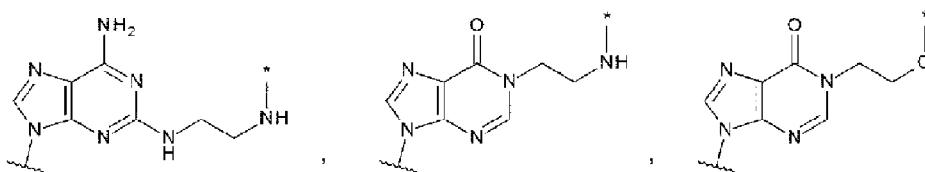
15 en las que:

L¹, Q³, Q^{3'} y W⁵ son como se han definido anteriormente;

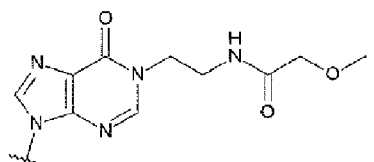
[35] El conjugado de anticuerpo-fármaco según uno cualquiera de [1] a [34], en el que L¹ se representa con una cualquiera de las cuatro fórmulas siguientes:



[36] El conjugado de anticuerpo-fármaco según uno cualquiera de [1] a [34], en el que L¹ se representa con una cualquiera de las cuatro fórmulas siguientes:



y

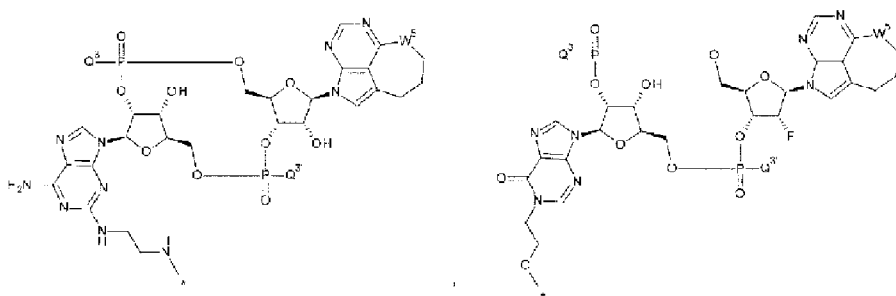


5

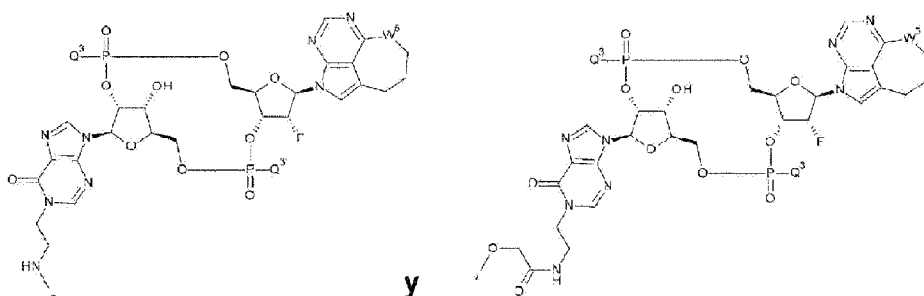
en las que:

cada asterisco indica unión a L;

[37] El conjugado de anticuerpo-fármaco según uno cualquiera de [33], [34] y [36], en el que D se representa con una cualquiera de las cuatro fórmulas siguientes:



10



y

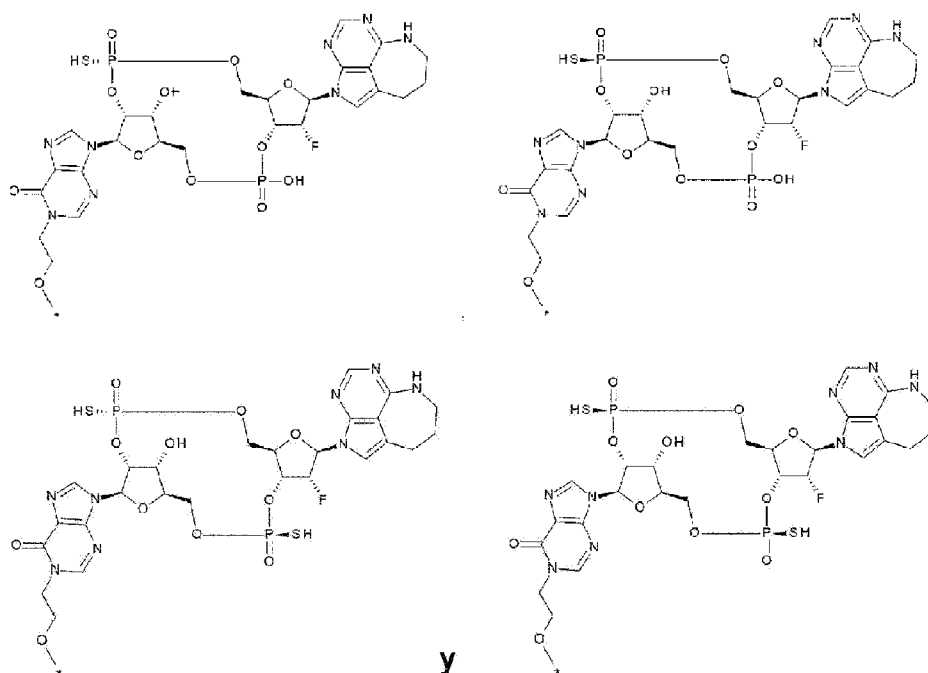
en las que:

cada asterisco indica unión a L; y

Q³, Q^{3'} y W⁵ son como se han definido anteriormente;

15

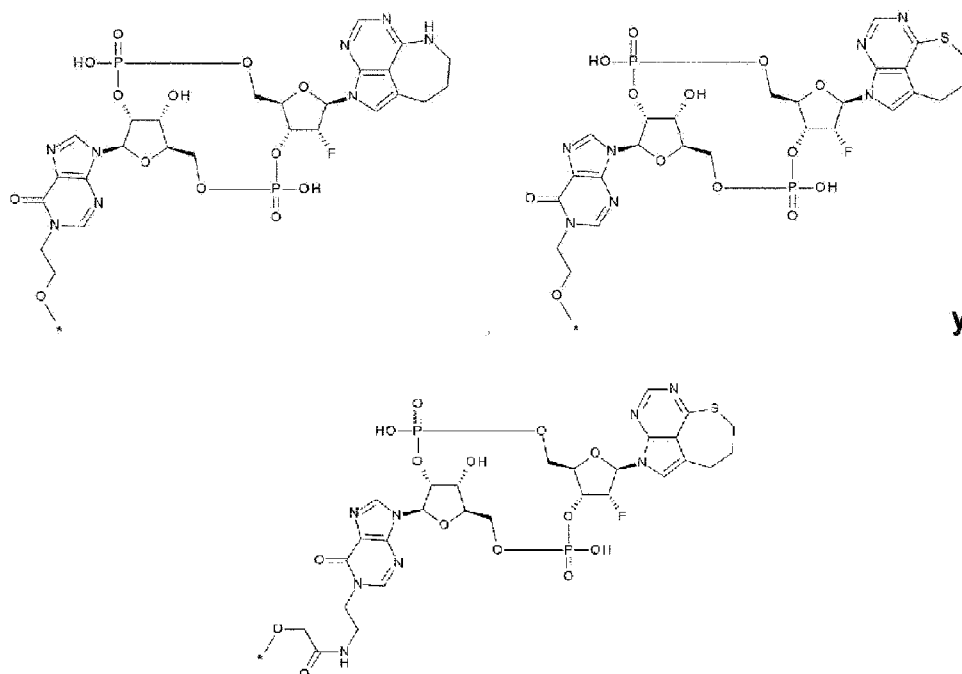
[38] El conjugado de anticuerpo-fármaco según uno cualquiera de [33], [34], [36] y [37], en el que D se representa con una cualquiera de las cuatro fórmulas siguientes:



en las que:

cada asterisco indica unión a L;

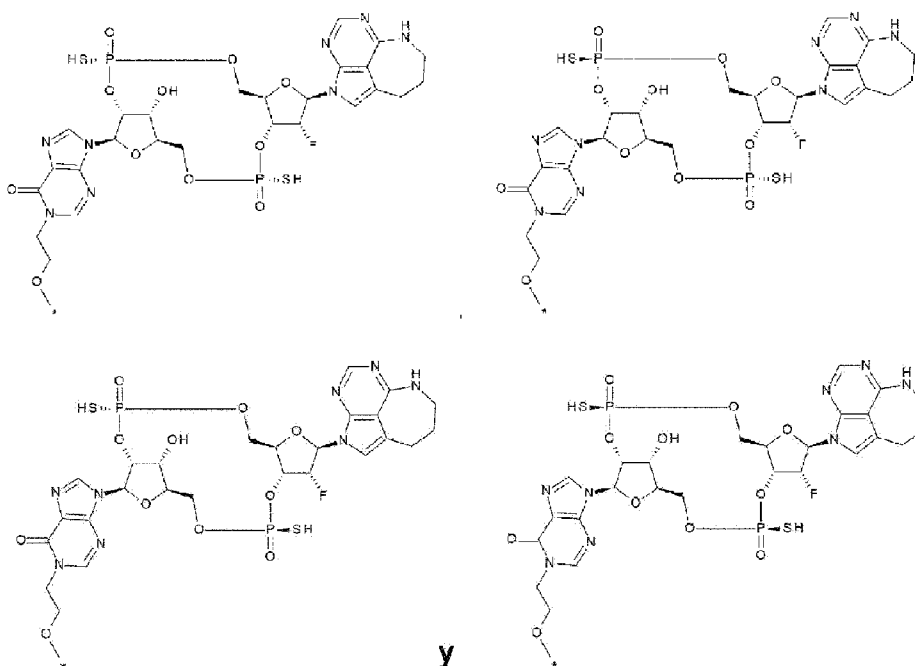
- 5 [39] El conjugado de anticuerpo-fármaco según uno cualquiera de [33], [34], [36] y [37], en el que D se representa con una cualquiera de las tres fórmulas siguientes:



en las que:

cada asterisco indica unión a L;

- 10 [40] El conjugado de anticuerpo-fármaco según uno cualquiera de [33], [34], [36] y [37], en el que D se representa con una cualquiera de las cuatro fórmulas siguientes:



en las que:

cada asterisco indica unión a L;

- 5 [41] El conjugado de anticuerpo-fármaco según uno cualquiera de [1] a [40], en el que el conector L se representa con -Lb-La-Lp-Lc-*, en el que:

el asterisco indica unión al fármaco D;

Lp representa un conector que consiste en una secuencia de aminoácidos escindible en una célula diana, o está ausente;

- 10 La representa uno cualquiera seleccionado del grupo siguiente:

-C(=O)-(CH₂CH₂)^{n²}-C(=O)-,

-C(=O)-(CH₂CH₂)^{n²}-CH₂-C(=O)-,

-C(=O)-(CH₂CH₂)^{n²}-C(=O)-NH-(CH₂CH₂)^{n³}-C(=O)-,

-C(=O)-(CH₂CH₂)^{n²}-C(=O)-NH-(CH₂CH₂)^{n³}-CH₂-C(=O)-,

- 15 -C(=O)-(CH₂CH₂)^{n²}-C(=O)-NH-(CH₂CH₂O)^{n³}-CH₂-C(=O)-,

-(CH₂)^{n⁴}-O-C(=O)- y

-(CH₂)^{n⁹}-C(=O)-, en los que:

n² representa un número entero de 1 a 3, n³ representa un número entero de 1 a 5, n⁴ representa un número entero de 0 a 2, y n⁹ representa un número entero de 2 a 7;

- 20 Lb representa un espaciador que une La y un glucano o glucano remodelado de Ab o un espaciador que une La y un residuo de cisteína de Ab; y

Lc representa -NH-CH₂-, -NH-grupo fenilo-CH₂-O(C=O)-, o -NH-grupo heteroarilo-CH₂-O(C=O)-, o está ausente;

[42] El conjugado de anticuerpo-fármaco según [41], en el que Lc está ausente;

- 25 [43] El conjugado de anticuerpo-fármaco según [41], en el que Lc es -NH-CH₂-;

[44] El conjugado de anticuerpo-fármaco según uno cualquiera de [41] a [43], en el que Lp representa uno cualquiera seleccionado del grupo que consiste en:

-GGVA-, -VA-, -GGFG-, -FG-, -GGPI-, -PI-, -GGVCit-, -VCit-, -GGVK-, -VK-, -GGFCit-, -FCit-, -GGFM-, -FM-, -GGLM-, -LM-, -GGICit- e -ICit-;

[45] El conjugado de anticuerpo-fármaco según [44], en el que Lp es uno cualquiera de -GGVA-, -VA-, -GGFG-, -FG-, -GGVCit-, -VCit-, -GGFCit- y -FCit-;

5 [46] El conjugado de anticuerpo-fármaco según uno cualquiera de [41] a [43], en el que Lp es uno cualquiera de -GGFG-, -GGPI-, -GGVA-, -GGFM-, -GGVCit-, -GGFCit-, -GGICit-, -GGPL-, -GGAQ- y -GGPP-;

[47] El conjugado de anticuerpo-fármaco según [46], en el que Lp es -GGFG- o -GGPI-;

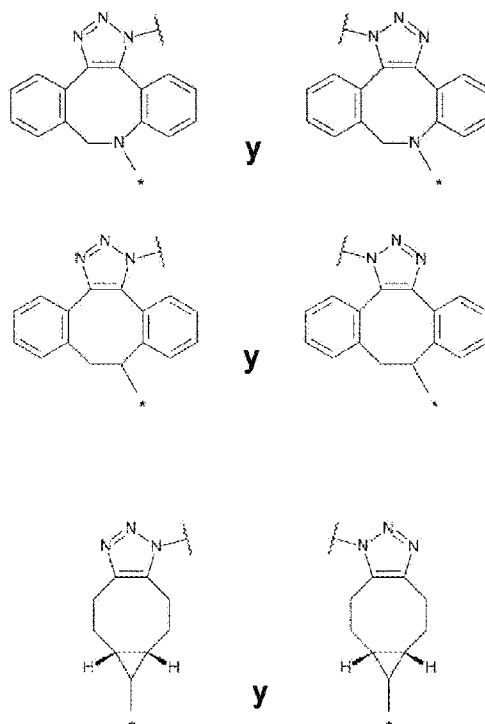
[48] El conjugado de anticuerpo-fármaco según uno cualquiera de [41] a [47], en el que La representa uno cualquiera seleccionado del grupo que consiste en:

10 $-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-$,
 $-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2O)_3-CH_2-C(=O)-$,
 $-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2O)_4-CH_2-C(=O)-$,

y

$-(CH_2)_5-C(=O)-$;

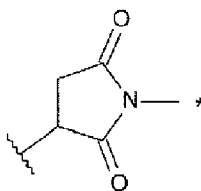
15 [49] El conjugado de anticuerpo-fármaco según uno cualquiera de [41] a [48], en el que Lb se representa con una cualquiera de las siguientes fórmulas:



y

20 en las que, en las fórmulas estructurales para Lb mostradas anteriormente, cada asterisco indica unión a La, y cada línea ondulada indica unión a un glucano o glucano remodelado de Ab;

[50] El conjugado de anticuerpo-fármaco según uno cualquiera de [41] a [48], en el que Lb es -(succinimid-3-il-N)-, en el que -(succinimid-3-il-N)- representa la siguiente fórmula estructural:



en la que el asterisco indica unión a La, y la línea ondulada indica unión a una cadena lateral de un residuo de cisteína del anticuerpo mediante la formación de tioéter;

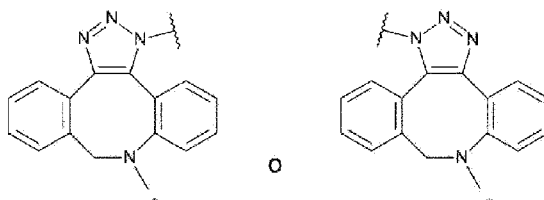
5 [51] El conjugado de anticuerpo-fármaco según uno cualquiera de [41] y [46] a [49], en el que el conector L se representa con -Lb-La-Lp-Lc-*, en el que:

el asterisco indica unión al fármaco D;

Lp es -GGFG- o -GGPI-;

La representa -C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-;

Lb representa la fórmula siguiente:



10 en la que, en las fórmulas estructurales para Lb mostradas anteriormente, cada asterisco indica unión a La, y cada línea ondulada indica unión a un glucano o glucano remodelado de Ab; y

Lc representa -NH-CH₂-;

15 [52] El conjugado de anticuerpo-fármaco según uno cualquiera de [1] a [51], en el que el número promedio de moléculas de fármaco conjugado por molécula de anticuerpo en el conjugado de anticuerpo-fármaco está en el intervalo de 1 a 10;

[53] El conjugado de anticuerpo-fármaco según [52], en el que el número promedio de moléculas de fármaco conjugado por molécula de anticuerpo en el conjugado de anticuerpo-fármaco está en el intervalo de 1 a 5;

20 [54] El conjugado de anticuerpo-fármaco según uno cualquiera de [1] a [53], en el que el anticuerpo se une a través de un glucano de unión a Asn297 del anticuerpo (glucano N297) a L;

[55] El conjugado de anticuerpo-fármaco según [54], en el que el glucano N297 es un glucano remodelado;

[56] El conjugado de anticuerpo-fármaco según [54] o [55], en el que el glucano N297 es N297-(Fuc)MSG1 o N297-(Fuc)SG;

25 [57] El conjugado de anticuerpo-fármaco según uno cualquiera de [1] a [56], en el que el anticuerpo es un anticuerpo anti-HER2, un anticuerpo anti-HER3, un anticuerpo anti-DLL3, un anticuerpo anti-FAP, un anticuerpo anti-CDH11, un anticuerpo anti-CDH6, un anticuerpo anti-A33, un anticuerpo anti-CanAg, un anticuerpo anti-CD19, un anticuerpo anti-CD20, un anticuerpo anti-CD22, un anticuerpo anti-CD30, un anticuerpo anti-CD33, un anticuerpo anti-CD56, un anticuerpo anti-CD70, un anticuerpo anti-CD98, un anticuerpo anti-TROP2, un anticuerpo anti-CEA, un anticuerpo anti-Cripto, un anticuerpo anti-EphA2, un anticuerpo anti-G250, un anticuerpo anti-MUC1, un anticuerpo anti-GPNMB, un anticuerpo contra la integrina, un anticuerpo anti-PSMA, un anticuerpo contra la tenascina-C, un anticuerpo anti-SLC44A4, un anticuerpo contra la mesotelina, un anticuerpo anti-ENPP3, un anticuerpo anti-CD47, un anticuerpo anti-EGFR, un anticuerpo anti-GPR20 o un anticuerpo anti-DR5, o un fragmento de unión al antígeno del anticuerpo;

35 [58] El conjugado de anticuerpo-fármaco según [57], en el que el anticuerpo es un anticuerpo anti-HER2 o un fragmento de unión al antígeno del anticuerpo;

[59] El conjugado de anticuerpo-fármaco según [58], en el que el anticuerpo es un anticuerpo que comprende una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 y una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2 o un

fragmento de unión al antígeno del anticuerpo, o un anticuerpo que comprende una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 y una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 3 o un fragmento de unión al antígeno del anticuerpo;

5 [60] El conjugado de anticuerpo-fármaco según [58], en el que el anticuerpo es un anticuerpo que comprende una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 28 y una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 29 o un fragmento de unión al antígeno del anticuerpo, o un anticuerpo que comprende una cadena ligera que
10 consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 28 y una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 30 o un fragmento de unión al antígeno del anticuerpo;

[61] El conjugado de anticuerpo-fármaco según [57], en el que el anticuerpo es un anticuerpo que comprende una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 31 y una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 32 o un
15 fragmento de unión al antígeno del anticuerpo, un anticuerpo que comprende una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 33 y una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 34 o un fragmento de unión al antígeno del anticuerpo, o un anticuerpo que comprende una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 35 y una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos
20 representada por SEQ ID NO: 36 o un fragmento de unión al antígeno del anticuerpo;

[62] Un agonista de STING que comprende el conjugado de anticuerpo-fármaco según uno cualquiera de [1] a [61];

[63] Una composición farmacéutica que comprende el conjugado de anticuerpo-fármaco según uno cualquiera de [1] a [61];

25 [64] Un agente antitumoral que comprende el conjugado de anticuerpo-fármaco según uno cualquiera de [1] a [61];

[65] El conjugado de anticuerpo-fármaco según [1] a [61], el agonista de STING según [62], la composición farmacéutica según [63] o el agente antitumoral según [64] para su uso en el tratamiento del cáncer;

30 [66] El conjugado de anticuerpo-fármaco, el agonista de STING, la composición farmacéutica o el agente antitumoral para uso según [65], en el que el cáncer es cáncer de pulmón, cáncer de riñón, cáncer urotelial, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, glioblastoma multiforme, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de mama, melanoma, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer gástrico, cáncer de esófago, cáncer de endometrio, cáncer de testículo, cáncer de cuello uterino, coriocarcinoma placentario, glioblastoma multiforme, tumor cerebral, cáncer de cabeza y cuello, cáncer tiroideo, mesotelioma, tumor del estroma
35 gastrointestinal ("gastrointestinal stromal tumor", GIST), cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares, cáncer suprarrenal, carcinoma de células escamosas, leucemia, linfoma maligno, plasmacitoma, mieloma o sarcoma.

Efectos ventajosos de la invención

40 La presente invención utiliza derivados de CDN novedosos. Los derivados de CDN novedosos tienen una potente actividad agonista de STING y presentan una elevada actividad antitumoral. La presente invención proporciona conjugados de anticuerpo-derivados de CDN novedosos que permiten la administración sistémica y presentan efecto antitumoral en tumores que expresan un antígeno.

Breve descripción de los dibujos

45 [Figura 1] La figura 1 muestra esquemáticamente una forma de fármaco conjugado obtenida a partir de un anticuerpo con glucano remodelado de tipo SG (la molécula de (II) en A de la figura 1), y una forma de fármaco conjugado obtenida a partir de un anticuerpo con glucano remodelado de tipo MSG (la molécula de (II) en B de la figura 1), siendo cada una de ellas la forma de fármaco conjugado de la presente invención (la molécula de (II)). (a) indica el fármaco D, (b) indica el conector L, (c) indica un conector PEG (L(PEG)), y (d) indica el glucano N297, en el que cada círculo blanco representa NeuAc(Sia), cada hexágono blanco representa Man, cada hexágono negro representa GlcNAc, cada rombo blanco representa Gal, y cada triángulo invertido blanco representa Fuc. Cada pentágono blanco representa un anillo de triazol formado por reacción entre un alquino derivado del conector L y un grupo azida derivado de un conector PEG. Cada forma de Y representa el anticuerpo Ab. Cada conector PEG se une al grupo carboxilo en la posición 2 de un ácido siálico situado en un extremo no reductor a través de un enlace amida. A menos que se indique lo contrario, esta forma de
50 ilustración se aplica en toda la presente memoria descriptiva.

[Figura 2] La figura 2 muestra diagramas esquemáticos que ilustran las estructuras de un anticuerpo (Fuc α 1,6)GlcNAc (la molécula de (III) en A de la figura 2), un anticuerpo con glucano remodelado de tipo SG

(la molécula de (IV) en B de la figura 2), y un anticuerpo con glucano remodelado de tipo MSG (la molécula de (IV) en C de la figura 2), siendo cada uno de ellos un intermedio de producción para la forma de fármaco conjugado de la presente invención. En cada uno de los diagramas, la forma en Y representa el anticuerpo Ab, como en la figura 1. El indicador (e) en A de la figura 2 indica el glucano N297 que consiste en un disacárido en el que la posición 1 de Fuc y la posición 6 de GlcNAc se unen mediante un enlace α -glucosídico. En B y C de la figura 2, (d) indica el glucano N297 como en la figura 1, y (f) indica un conector PEG que tiene un grupo azida, en el que se muestra, en un extremo, un grupo azida que se va a someter a unión con el conector L. El modo de unión de cada conector PEG que tiene un grupo azida es el mismo que el de los conectores PEG de la figura 1.

[Figura 3] La figura 3 muestra diagramas esquemáticos que ilustran las etapas para la producción de un anticuerpo con glucano remodelado de tipo SG y un anticuerpo con glucano remodelado de tipo MSG a partir de un anticuerpo producido en células animales. Como en la figura 2, las moléculas (III) y (IV) de los diagramas representan un anticuerpo (Fuc α 1,6)GlcNAc y un anticuerpo con glucano remodelado de tipo SG o un anticuerpo con glucano remodelado de tipo MSG, respectivamente. La molécula de (V) es un anticuerpo producido en células animales, y una mezcla de moléculas con glucanos N297 heterogéneos. La figura 3A ilustra la etapa de producción de moléculas homogéneas de (Fuc α 1,6)GlcNAc-anticuerpo (III) tratando los N297 glucanos heterogéneos de (V) con hidrolasa, tal como EndoS. La figura 3B ilustra la etapa de producción del anticuerpo con glucano remodelado de tipo SG de (IV) sometiendo el GlcNAc del glucano N297 del anticuerpo (III) a transglucosilación con moléculas donantes de glucano de tipo SG utilizando una glucosiltransferasa, tal como una EndoS con mutación D233Q/Q303L. La figura 3C ilustra la etapa de producción del anticuerpo con glucano remodelado de tipo GMS de (IV) sometiendo al anticuerpo (III) a transglucosilación con moléculas donantes de glucanos de tipo GMS de la misma manera que en la figura 3B. Cada una de la molécula donante de glucano de tipo SG y la molécula donante de glucano de tipo MSG que se utilizarán en este caso es una molécula tal que un ácido siálico en su extremo no reductor se modifica con un conector PEG que tiene un grupo azida, y un ácido siálico en cada extremo no reductor de un anticuerpo con glucano remodelado N297 de tipo SG o de un anticuerpo con glucano remodelado N297 de tipo MSG que se producirá se modifica de la misma manera que se muestra en las figuras 2B y 2C.

[Figura 4] La figura 4 muestra las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera (SEQ ID NO: 1) y la cadena pesada (SEQ ID NO: 2) del trastuzumab.

[Figura 5] La figura 5 muestra las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera (SEQ ID NO: 1) y la cadena pesada (SEQ ID NO: 3) de un anticuerpo anti-HER2 modificado.

[Figura 6] La figura 6 muestra las secuencias de aminoácidos de (a) el STING humano de tipo salvaje, (b) el STING humano con mutación REF (R232H), y (c) el STING humano con mutación HAQ (R71H, G230A, R293Q).

[Figura 7] La figura 7 demuestra el efecto antitumoral de la administración intratumoral de derivados de CDN. En cada gráfico, la línea con cuadrados negros corresponde a un grupo con vehículo, la línea con cuadrados blancos a un grupo con administración del compuesto n.º 6a, la línea con triángulos invertidos blancos a un grupo con administración del compuesto n.º 8b, y la línea con círculos blancos a un grupo con administración del compuesto n.º 9b. El eje vertical representa el volumen tumoral (mm³) y el eje horizontal representa los días tras el trasplante tumoral.

[Figura 8] La figura 8 demuestra el efecto antitumoral de la administración intravenosa del conjugado de anticuerpo anti-HER2-CDN (1) y del conjugado de anticuerpo anti-LPS-CDN (1). En cada gráfico, la línea con cuadrados negros corresponde a un grupo con vehículo, la línea con triángulos blancos a un grupo con administración del conjugado de anticuerpo anti-HER2-CDN (1), que se formó conjugando el compuesto del ejemplo 8b con un anticuerpo anti-HER2 modificado producido en el ejemplo de referencia 1, y la línea con triángulos negros a un grupo con administración del conjugado de anticuerpo anti-LPS-CDN (1), que se formó de forma similar conjugando el compuesto del ejemplo 8b con un anticuerpo anti-LPS modificado producido en el ejemplo de referencia 2. El eje vertical representa el volumen tumoral (mm³) y el eje horizontal representa los días tras el trasplante tumoral.

[Figura 9] La figura 9 demuestra el efecto antitumoral de la administración intravenosa de los conjugados de anticuerpo anti-HER2-CDN (2) y (3). En el gráfico, la línea con cuadrados negros corresponde a un grupo con vehículo, la línea con cuadrados blancos a un grupo con administración de conjugado de anticuerpo anti-HER2-CDN (2), y la línea con triángulos blancos a un grupo con administración del conjugado de anticuerpo anti-HER2-CDN (3). El eje vertical representa el volumen tumoral (mm³) y el eje horizontal representa los días tras el trasplante tumoral.

[Figura 10] La figura 10 muestra el efecto antitumoral de la administración intravenosa del conjugado de anticuerpo anti-HER2-CDN (19). En el gráfico, la línea con cuadrados negros corresponde a un grupo con vehículo, y la línea con triángulos blancos a un grupo con administración del conjugado de anticuerpo anti-HER2-CDN (19). En el conjugado de anticuerpo anti-HER2-CDN (19), se conjuga un fármaco-conector con

el anticuerpo mediante conjugación de cisteína. El eje vertical representa el volumen tumoral (mm^3) y el eje horizontal representa los días tras el trasplante tumoral.

[Figura 11] La figura 11 demuestra el efecto antitumoral de la administración intravenosa de los conjugados de anticuerpo anti-HER2-CDN (1) y (9) a (12). En el gráfico, la línea con cuadrados negros corresponde a un grupo con vehículo, la línea con triángulos blancos a un grupo con administración de conjugado de anticuerpo anti-HER2-CDN (9), la línea con triángulos invertidos blancos a un grupo con administración del conjugado de anticuerpo anti-HER2-CDN (10), la línea con rombos blancos a un grupo con administración del conjugado de anticuerpo anti-HER2-CDN (11), la línea con círculos blancos a un grupo con administración del conjugado de anticuerpo anti-HER2-CDN (12), y la línea con cuadrados blancos a un grupo con administración del conjugado de anticuerpo anti-HER2-CDN (1). En cada uno de los conjugados de anticuerpo anti-HER2-CDN (9), (10), (11), (12) y (1), el compuesto del ejemplo 8b se conjuga mediante un conector, y los conectores son diferentes entre sí. El eje vertical representa el volumen tumoral (mm^3) y el eje horizontal representa los días tras el trasplante tumoral.

[Figura 12] La figura 12 demuestra el efecto antitumoral de la administración intravenosa del conjugado de anticuerpo anti-HER2 2-CDN (1), el anticuerpo anti-HER2 2, y el compuesto n.º 8b. En el gráfico, la línea con cuadrados negros corresponde a un grupo con vehículo, la línea con triángulos blancos a un grupo con administración de 60 μg del conjugado de anticuerpo anti-HER2 2-CDN (1), la línea con triángulos negros invertidos a un grupo con administración de 59 μg de anticuerpo 2 anti-HER2, y la línea con círculos negros a un grupo con administración de 1,2 μg del compuesto n.º 8b. Cada dosis del anticuerpo anti-HER2 2 y del compuesto n.º 8b es el equivalente del componente correspondiente que constituye el conjugado de anticuerpo anti-HER2 2-CDN (1). El eje vertical representa el volumen tumoral (mm^3) y el eje horizontal representa los días tras el trasplante tumoral.

[Figura 13] La figura 13 (a) demuestra el efecto antitumoral de la administración intravenosa de los conjugados de anticuerpo anti-HER2 2-CDN (2) y (3). La figura 13 (b) muestra el efecto antitumoral de la administración intravenosa de los conjugados de anticuerpo anti-HER2 2-CDN (4), (5), (7) y (8). La figura 13 (c) muestra el efecto antitumoral de la administración intravenosa del conjugado de anticuerpo anti-HER2 2-CDN (6). En cada gráfico, la línea con cuadrados negros corresponde a un grupo con vehículo, y cada línea con símbolos blancos a un grupo con administración a un sujeto evaluado de los conjugados de anticuerpo anti-HER2 2-CDN (2) a (8). El eje vertical representa el volumen tumoral (mm^3) y el eje horizontal representa los días tras el trasplante tumoral.

[Figura 14] La figura 14 demuestra el efecto antitumoral de la administración intravenosa de los conjugados de anticuerpos anti-HER2 2-CDN (9) y (10). En el gráfico, la línea con cuadrados negros corresponde a un grupo con vehículo, la línea con triángulos blancos a un grupo con administración del conjugado de anticuerpo anti-HER2 2-CDN (9), y la línea con círculos blancos a un grupo con administración del conjugado de anticuerpo anti-HER2 2-CDN (10). Los conjugados de anticuerpo anti-HER2 2-CDN (9) y (10) son conjugados de anticuerpo-CDN que utilizan un anticuerpo con glucano remodelado de tipo MSG, con un número promedio de moléculas de fármaco conjugado de aproximadamente 2. El eje vertical representa el volumen tumoral (mm^3) y el eje horizontal representa los días tras el trasplante tumoral.

[Figura 15] La figura 15 demuestra el efecto antitumoral de la administración intravenosa de un anticuerpo anti-EphA2 y un conjugado de anticuerpo anti-EphA2-CDN (1). En el gráfico, la línea con cuadrados negros corresponde a un grupo con un vehículo, la línea con círculos blancos a un grupo con administración de un anticuerpo anti-EphA2, y la línea con triángulos blancos a un grupo con administración del conjugado de anticuerpo anti-EphA2-CDN (1). El eje vertical representa el volumen tumoral (mm^3) y el eje horizontal representa los días tras el trasplante tumoral.

[Figura 16] La figura 16 demuestra el efecto antitumoral de la administración intravenosa de un anticuerpo anti-CD33 y un conjugado de anticuerpo anti-CD33-CDN (1). En el gráfico, la línea con cuadrados negros corresponde a un grupo con un vehículo, la línea con círculos blancos a un grupo con administración de un anticuerpo anti-CD33, y la línea con triángulos blancos a un grupo con administración del conjugado de anticuerpo anti-CD33-CDN (1). El eje vertical representa el volumen tumoral (mm^3) y el eje horizontal representa los días tras el trasplante tumoral.

[Figura 17] La figura 17 muestra las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera (SEQ ID NO: 28) y la cadena pesada (SEQ ID NO: 29) del pertuzumab.

[Figura 18] La figura 18 muestra las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera (SEQ ID NO: 28) y la cadena pesada (SEQ ID NO: 30) del anticuerpo anti-HER2 modificado 2.

[Figura 19] La figura 19 muestra las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera (SEQ ID NO: 31) y la cadena pesada (SEQ ID NO: 32) de un anticuerpo anti-CD33.

[Figura 20] La figura 20 muestra las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera (SEQ ID NO: 33) y la cadena pesada (SEQ ID NO: 34) de un anticuerpo anti-EphA2.

[Figura 21] La figura 21 muestra las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera (SEQ ID NO: 35) y la cadena pesada (SEQ ID NO: 36) de un anticuerpo anti-CDH6.

[Figura 22] La figura 22 demuestra el efecto antitumoral de la administración intravenosa de los conjugados de anticuerpos anti-HER2 2-CDN (11) y (12). En el gráfico, la línea con cuadrados negros corresponde a un grupo con vehículo, la línea con triángulos blancos a un grupo con administración del conjugado de anticuerpo anti-HER2 2-CDN (11), y la línea con círculos blancos a un grupo con administración del conjugado de anticuerpo anti-HER2 2-CDN (12).

Descripción de las realizaciones

La presente invención se refiere a conjugados de anticuerpo-fármaco que comprenden derivados de CDN novedosos que tienen actividad agonista de STING y al uso de los mismos. Los derivados de CDN novedosos tienen actividad agonista de STING y activan las células inmunitarias para inducir la producción de interferones y citocinas. Los derivados de CDN novedosos ejercen un efecto antitumoral a través de la activación de las células inmunitarias. Los derivados de CDN novedosos pueden unirse a un anticuerpo capaz de reconocer y unirse a células diana (por ejemplo, células tumorales o inmunitarias) mediante cualquier conector y administrarse sistémicamente.

STING (Stimulator of Interferon Genes) es una proteína adaptadora transmembrana localizada en el retículo endoplásmico. Se sabe que STING presenta polimorfismo congénito con alta frecuencia (PLoS One, octubre de 2013, 21, 8(10), e77846). Las formas mutadas de STING conocidas son, por ejemplo, la mutación R232H, que es una mutación del aminoácido en la posición 232 de arginina (R) a histidina (H), y la mutación HAQ, que es una mutación de arginina (R) en la posición 71 a histidina (H), glicina (G) en la posición 230 a alanina (A), y arginina (R) en la posición 293 a glutamina (Q). Se sabe que tales polimorfos de STING causan diferencias en la intensidad de la respuesta inducida por la estimulación agonista de STING, tales como los niveles de producción de citocinas (Genes and Immunity, 2011, 12, 263-269). Por lo tanto, la posesión de actividades contra diferentes tipos de STING es deseable para una acción estable de un agonista de STING en seres humanos.

En el presente documento, "cáncer", "carcinoma" y "tumor" se utilizan con el mismo significado.

En la presente invención, "actividad de activación inmunitaria" se refiere a causar de alguna forma la activación de células inmunitarias implicadas en la inmunidad antitumoral, tales como monocitos, macrófagos, células dendríticas, linfocitos T, linfocitos B, células NK y neutrófilos, por ejemplo, provocando cualquier cambio estructural o funcional en las células inmunitarias, incluida la producción de citocinas y quimiocinas, el aumento de la expresión de marcadores inmunoestimuladores, la disminución de la expresión de marcadores inmunosupresores, la alteración del sistema de transducción de señales intracelular, tal como la fosforilación, y la alteración de la expresión génica. El significado de la expresión también abarca el fenómeno de que las células tumorales provocan un cambio para inducir la inmunidad antitumoral, tal como la inducción de la producción de citocinas y quimiocinas que inducen la activación o migración de células inmunitarias, el aumento de la sensibilidad a las células inmunitarias, etc.

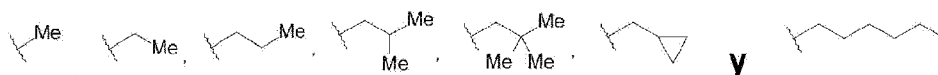
En la presente invención, "efecto antitumoral" se refiere a inducir la disminución o regresión de un tumor por la influencia directa o indirecta de un fármaco sobre las células tumorales. Por efecto antitumoral se entiende, por ejemplo, causar la reducción del número de células tumorales, daños en las células tumorales o la regresión del tumor, por ejemplo, mediante el fenómeno de que un fármaco causa directamente los daños en las células tumorales, de que las células tumorales activan la inmunidad antitumoral a través de la estimulación por un fármaco, o de que un fármaco administrado a una célula tumoral, por ejemplo, se libera hacia el exterior de la célula y activa la inmunidad antitumoral alrededor de la célula tumoral.

En la presente invención, "actividad citotóxica" se refiere a causar un cambio patológico de alguna forma a las células, que causa, específicamente, no sólo un daño directo, sino también cualquier daño estructural o funcional a las células, tal como ruptura del ADN, formación de dímeros de nucleótidos, ruptura de cromosomas, daños en el aparato mitótico y disminución de la actividad de enzimas.

En la presente invención, las "células" incluyen células en animales y células cultivadas.

En el presente documento, "átomo de halógeno", se refiere a un átomo de flúor, un átomo de cloro, un átomo de bromo o un átomo de yodo.

En el presente documento, "grupo alquilo C1-C6" se refiere a un grupo alquilo lineal o ramificado que tiene de uno a seis átomos de carbono. Un "grupo alquilo C1-C6" puede incluir ciclopropano en el grupo alquilo, a menos que el número total de átomos de carbono sea superior a seis. Algunos ejemplos de "grupo alquilo C1-C6" pueden incluir las siguientes estructuras:



en las que cada línea ondulada indica una posición de sustitución.

En el presente documento, "grupo alquenilo C2-C6" se refiere a un grupo alquenilo lineal o ramificado que tiene de dos a seis átomos de carbono.

En el presente documento, "grupo alquinilo C2-C6" se refiere a un grupo alquinilo lineal o ramificado que tiene de dos a seis átomos de carbono.

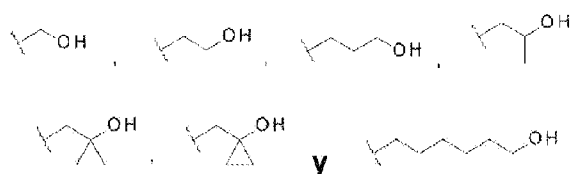
- 5 En el presente documento, "grupo cicloalquilo C3-C6" se refiere a un grupo hidrocarburo cíclico saturado que tiene de tres a seis átomos de carbono. Un "grupo cicloalquilo C3-C6" puede estar sustituido por una pluralidad de grupos alquilo, a menos que el número total de átomos de carbono sea superior a seis. Algunos ejemplos de "grupo cicloalquilo C3-C6" pueden incluir las siguientes estructuras:



- 10 en las que cada línea ondulada indica una posición de sustitución.

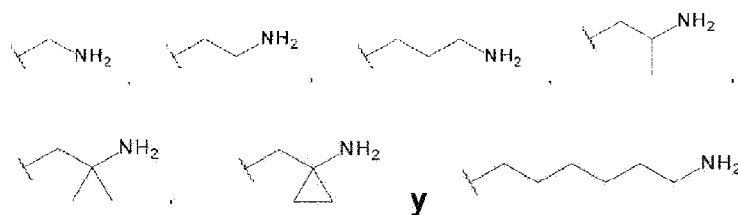
En el presente documento, "grupo hidroxialquilo C1-C6" se refiere a un grupo alquilo en el que un grupo alquilo lineal o ramificado que tiene de uno a seis átomos de carbono está sustituido con uno o dos grupos hidroxilo en cualquier posición. Un "grupo hidroxialquilo C1-C6" puede incluir ciclopropano en el grupo alquilo, a menos que el número total de átomos de carbono sea superior a seis. Algunos ejemplos de "grupo hidroxialquilo C1-C6" pueden incluir las siguientes estructuras:

- 15



en las que cada línea ondulada indica una posición de sustitución.

- 20 En la presente invención, "grupo aminoalquilo C1-C6" se refiere a un grupo alquilo en el que un grupo alquilo lineal o ramificado que tiene de uno a seis átomos de carbono está sustituido con uno o dos grupos amino en cualquier posición. Un "grupo aminoalquilo C1-C6" puede incluir ciclopropano en el grupo alquilo, a menos que el número total de átomos de carbono sea superior a seis. Algunos ejemplos de "grupo aminoalquilo C1-C6" pueden incluir las siguientes estructuras:

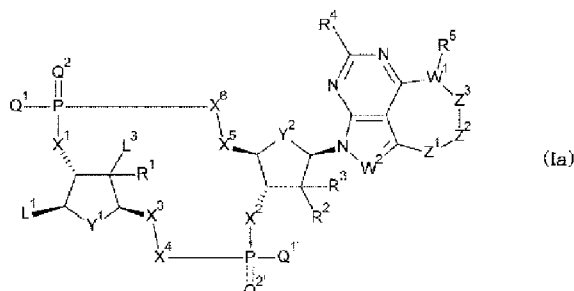


- 25

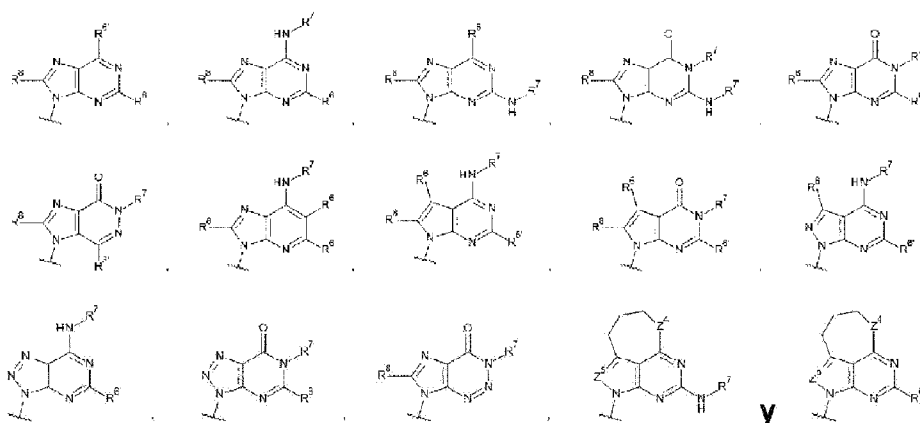
en las que cada línea ondulada indica una posición de sustitución.

<1. Derivado de CDN novedoso>

El derivado de CDN novedoso tiene una estructura representada por la fórmula (Ia):



- 30 L¹ representa un grupo seleccionado del grupo que consiste en las siguientes fórmulas:



y opcionalmente sustituido en cualquier posición con uno a tres grupos seleccionados del grupo que consiste en un grupo hidroxilo, -NH₂, un grupo 2-hidroxiacetilaminometilo y un grupo 2-[(2-hidroxiacetil)amino]etilo,

en las que:

R⁶ y R^{6'} representan cada uno independientemente un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, un grupo hidroxilo, -NH₂, un grupo alquilo C1-C6, un grupo alquenilo C2-C6 o un grupo alquinilo C2-C6;

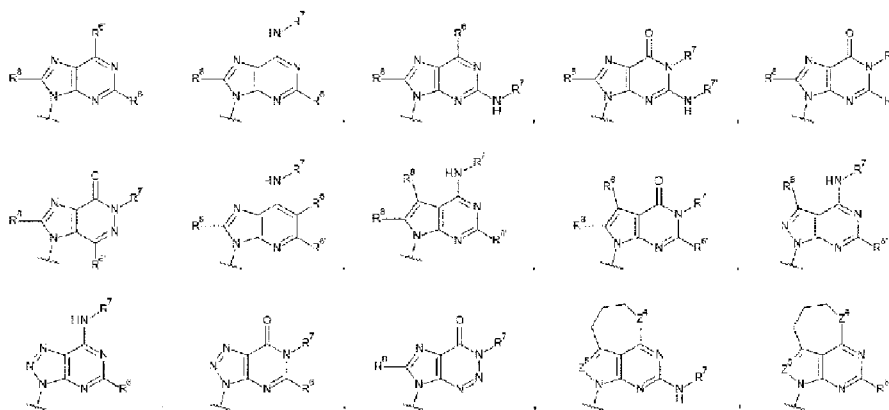
R⁷ y R^{7'} representan cada uno independientemente un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C1-C6, en el que el grupo alquilo C1-C6 está opcionalmente sustituido con uno o dos sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en un átomo de halógeno y un grupo oxo;

R⁸ y R^{8'} representan cada uno independientemente un átomo de hidrógeno o un átomo de halógeno;

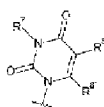
Z⁴ representa -CH₂-, -NH- o un átomo de oxígeno; y

Z⁵ representa un átomo de nitrógeno o -CH=.

L¹ representa un grupo seleccionado del grupo que consiste en las siguientes fórmulas:



y



y está opcionalmente sustituido en cualquier posición con uno a tres grupos seleccionados del grupo que consiste en un grupo hidroxilo, -NH₂, un grupo 2-hidroxiacetilaminometilo y un grupo 2-[(2-hidroxiacetil)amino]etilo,

en las que:

R⁶ y R^{6'} representan cada uno independientemente un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, un grupo hidroxilo, -NH₂, un grupo alquilo C1-C6, un grupo alquenilo C2-C6 o un grupo alquinilo C2-C6;

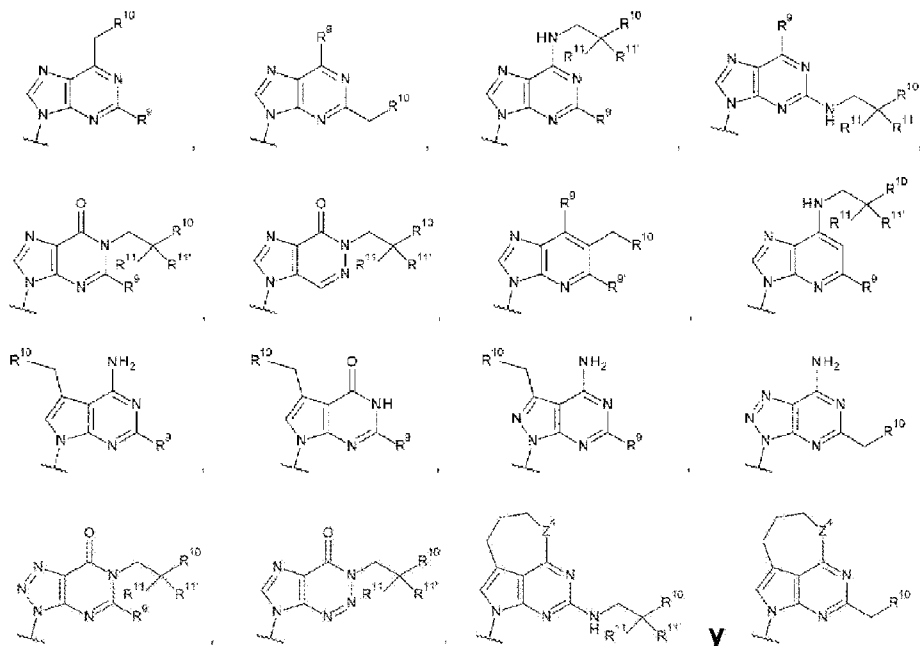
R⁷ y R^{7'} representan cada uno independientemente un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C1-C6, en el que el grupo alquilo C1-C6 está opcionalmente sustituido con uno o dos sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en un átomo de halógeno y un grupo oxo;

R⁸ y R^{8'} representan cada uno independientemente un átomo de hidrógeno o un átomo de halógeno;

5 Z⁴ representa -CH₂-, -NH- o un átomo de oxígeno; y

Z⁵ representa un átomo de nitrógeno o -CH=.

L^1 es preferentemente un grupo seleccionado del grupo que consiste en las siguientes fórmulas:



en las que:

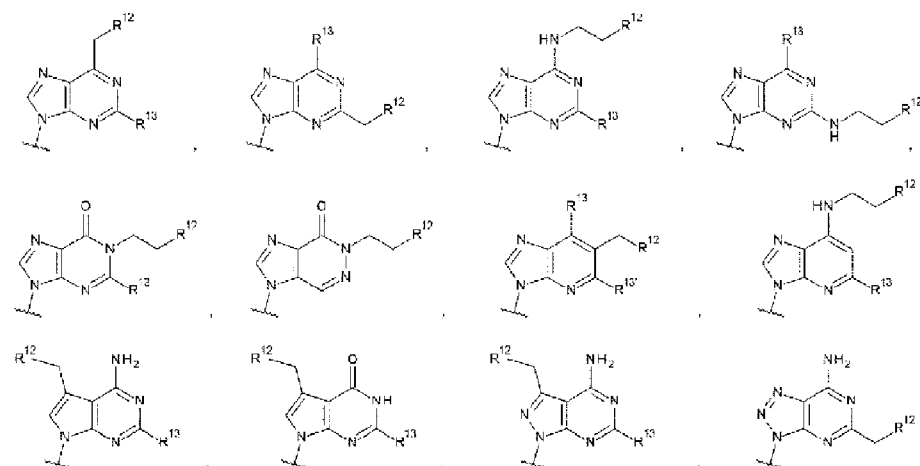
R⁹ y R^{9'} representan cada uno un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, un grupo hidroxilo o -NH₂;

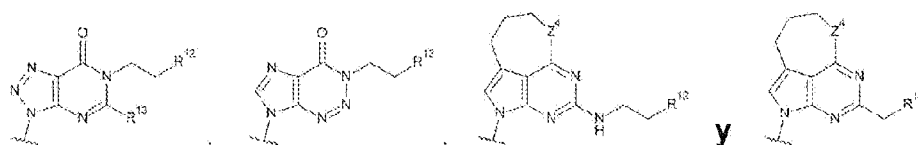
15 R¹⁰ representa un grupo hidroxilo, -NH₂, -NHC(=O)CH₂OH, -CH₂NHC(=O)CH₂OH, -CH₂CH₂NHC(=O)CH₂OH, un grupo hidroxialquilo C1-C3 o un grupo aminoalquilo C1-C3;

R¹¹ y R^{11'} representan cada uno independientemente un átomo de hidrógeno, un átomo de flúor o un grupo metilo, o R¹¹ y R^{11'} se enlazan para formar ciclopropano; y

Z⁴ representa -CH₂-, -NH- o un átomo de oxígeno.

L^1 es preferentemente un grupo seleccionado del grupo que consiste en las siguientes fórmulas:





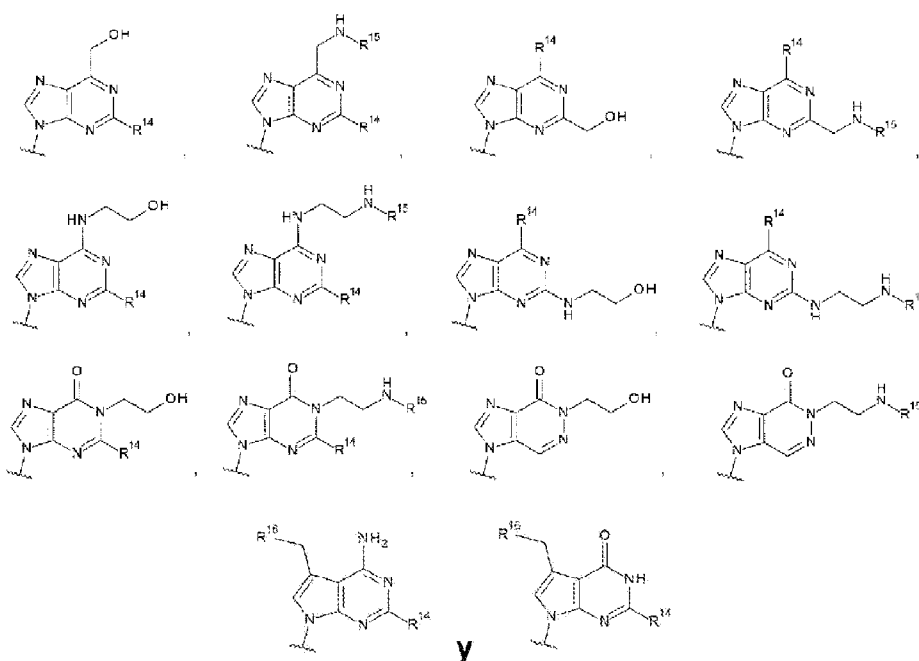
en las que:

R^{13} y $R^{13'}$ representan cada uno independientemente un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo o $-NH_2$;

R^{12} representa un grupo hidroxilo, $-NH_2$, $-CH_2OH$, $-NHC(=O)CH_2OH$, $-CH_2NHC(=O)CH_2OH$ o $-CH_2CH_2NHC(=O)CH_2OH$; y

Z^4 es como se ha definido anteriormente.

Además, L^1 es preferentemente un grupo seleccionado del grupo que consiste en las siguientes fórmulas:



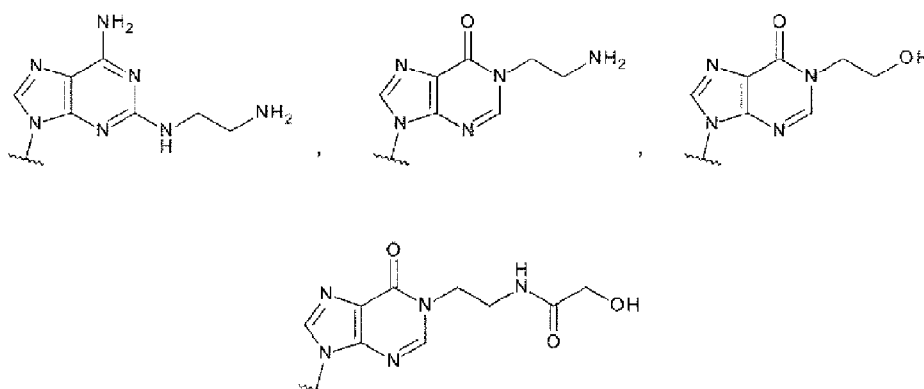
en las que:

R^{14} representa un átomo de hidrógeno o $-NH_2$;

R^{15} representa un átomo de hidrógeno o $-C(=O)CH_2OH$; y

R^{16} representa un grupo hidroxilo, $-NH_2$, $-CH_2OH$, $-CH_2CH_2OH$, $-CH_2NH_2$ o $-CH_2CH_2NH_2$.

L^1 es más preferentemente un grupo seleccionado del grupo que consiste en las siguientes fórmulas:



L³ se selecciona de un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, -NH₂, un grupo hidroxialquilo C1-C3, y un grupo aminoalquilo C1-C3.

Q¹ y Q^{1'} representan cada uno independientemente un grupo hidroxil, un grupo tiol o un grupo borano (BH₃). Q¹ es preferentemente un grupo hidroxil o un grupo tiol. Q^{1'} es preferentemente un grupo hidroxil o un grupo tiol. Más preferentemente, la combinación de Q¹ y Q^{1'} es tal que Q¹ y Q^{1'} son cada uno un grupo tiol, o tal que Q¹ y Q^{1'} son cada uno un grupo hidroxil.

Q² y Q^{2'} representan cada uno independientemente un átomo de oxígeno o un átomo de azufre. Preferentemente, Q² y Q^{2'} son cada uno un átomo de oxígeno, o cada uno un átomo de azufre.

La combinación de Q¹ y Q² es preferentemente tal que Q¹ es un grupo tiol y Q² es un átomo de oxígeno, o Q¹ es un grupo tiol y Q² es un átomo de azufre.

La combinación de Q^{1'} y Q² es preferentemente tal que Q^{1'} es un grupo tiol y Q² es un átomo de oxígeno, o tal que Q^{1'} es un grupo hidroxil y Q² es un átomo de oxígeno, o tal que Q^{1'} es un grupo tiol y Q² es un átomo de azufre.

X¹ y X² representan cada uno independientemente un átomo de oxígeno, un átomo de azufre o -CH₂-. X¹ es preferentemente un átomo de oxígeno. X² es preferentemente un átomo de oxígeno. Más preferentemente, X¹ y X² son cada uno un átomo de oxígeno.

Y¹ e Y² representan cada uno un átomo de oxígeno o -CH₂-. Y¹ es preferentemente un átomo de oxígeno. Y² es preferentemente un átomo de oxígeno. Más preferentemente, Y¹ e Y² son cada uno un átomo de oxígeno.

X³ y X⁴ representan un grupo seleccionado de (iii) y (iv):

(iii) cuando Y¹ es un átomo de oxígeno, X³-X⁴ representa -CH₂-O-, -CH₂-S-, -CH₂-CH₂- o -CH₂-CF₂-; y

(iv) cuando Y¹ es -CH₂-, X³-X⁴ representa -O-CH₂-.

X³ y X⁴ son preferentemente -CH₂-O- en (iii).

X⁵ y X⁶ representan un grupo seleccionado entre (v) y (vi):

(v) cuando Y² es un átomo de oxígeno, X⁵-X⁶ representa -CH₂-O-, -CH₂-S-, -CH₂-CH₂- o -CH₂-CF₂-; y

(vi) cuando Y² es -CH₂-, X⁵-X⁶ representa -O-CH₂-.

X⁵ y X⁶ son preferentemente -CH₂-O- en (v).

R¹, R² y R³ representan cada uno independientemente un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, -OR', -OC(=O)R', -N₃, -NHR', -NR'R'' o -NHC(=O)R', en los que R' representa un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C1-C6, un grupo alqueno C2-C6, un grupo alquino C2-C6 o un grupo cicloalquilo C3-C6, estando el grupo alquilo C1-C6, el grupo alqueno C2-C6 o el grupo alquino C2-C6 opcionalmente sustituido con uno a seis átomos de halógeno, y R'' representa un grupo alquilo C1-C6, un grupo alqueno C2-C6, un grupo alquino C2-C6 o un grupo cicloalquilo C3-C6.

R¹ es preferentemente un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxil o un átomo de flúor.

R² es preferentemente un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxil o un átomo de flúor.

R³ es preferentemente un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxil o un átomo de flúor.

W¹ representa un átomo de nitrógeno, un átomo de oxígeno, un átomo de azufre o -CH-.

R⁵ representa un grupo seleccionado de (vii) a (x):

(vii) cuando W¹ es un átomo de nitrógeno, R⁵ representa un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C1-C6, un grupo hidroxialquilo C1-C6 o un grupo aminoalquilo C1-C6;

(viii) cuando W¹ es un átomo de oxígeno, R⁵ está ausente;

(ix) cuando W¹ es un átomo de azufre, R⁵ está ausente; y

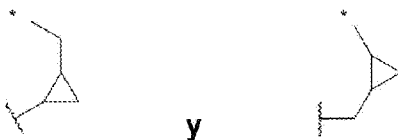
(x) cuando W¹ es -CH-, R⁵ representa un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, un grupo hidroxil, -NH₂ o un grupo alquilo C1-C6.

Cuando W¹ es un átomo de nitrógeno, R⁵ es preferentemente un átomo de hidrógeno. Cuando W¹ es -CH-, R⁵ es preferentemente un átomo de hidrógeno.

W² representa un átomo de nitrógeno o -CH=. W² es preferentemente -CH=.

R⁴ representa un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno o -NH₂. R⁴ es preferentemente un átomo de hidrógeno.

Z¹-Z²-Z³ juntos representan -CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-R^{'''}-, -CH=CH-CH₂-, -CH=CH-CH₂-, -CX=CH-CH₂-, -CX=CH-CH₂-, -C(=O)-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-C(=O)-, -CH₂-CH(CH₃)-CH₂- o -CH₂-CH₂-CH(CH₃)-, en los que R^{'''} representa -O- o -CH₂-CH₂- y X representa un átomo de halógeno, o un grupo representado por una de las siguientes fórmulas:



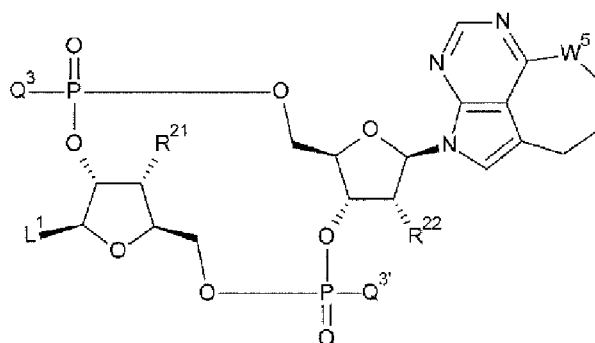
5

en las que:

cada asterisco indica unión a W¹, y cada línea ondulada indica unión al átomo de carbono de =C-.

Z¹, Z², y Z³ forman preferentemente juntos -CH₂-CH₂-CH₂-, -CH=CH-CH₂-, -CH₂-CH(CH₃)-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH(CH₃)- o -CH₂-CH₂-R^{'''}-, en los que R^{'''} representa -O- o -CH₂-CH₂-.

10 El derivado de CDN novedoso tiene preferentemente una estructura representada por la siguiente fórmula:



L¹ es como se ha definido anteriormente.

Q³ y Q^{3'} representan cada uno independientemente un grupo hidroxilo o un grupo tiol. Preferentemente, Q³ y Q^{3'} son cada uno un grupo tiol.

15 R²¹ y R²² representan cada uno independientemente un grupo hidroxilo o un átomo de flúor. R²¹ es preferentemente un grupo hidroxilo. R²² es preferentemente un átomo de flúor.

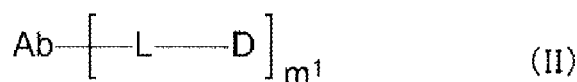
W⁵ representa -NH- o un átomo de azufre.

Los procedimientos para producir el derivado de CDN novedoso se describen más adelante en <3. Procedimientos de producción>.

20 <2. Conjugado de anticuerpo-fármaco>

El derivado de CDN novedoso puede administrarse directamente al tejido diana (por ejemplo, administración intratumoral), o administrarse en forma de un conjugado de anticuerpo-fármaco, en el que el derivado de CDN está unido a un anticuerpo capaz de reconocer y unirse a células diana (por ejemplo, células tumorales o células inmunitarias) a través de cualquier conector.

25 El conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente invención se representa con la fórmula (II):



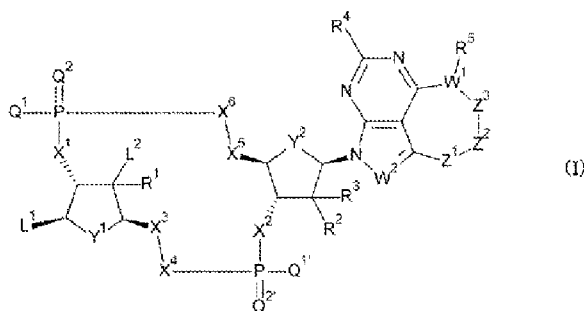
m¹ representa el número de moléculas de fármaco conjugado por molécula de anticuerpo en el conjugado de anticuerpo-fármaco; Ab representa un anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo; L representa un conector que une Ab y D; D representa el derivado de CDN novedoso descrito anteriormente (en el presente documento, cuando se utiliza como parte de un conjugado de anticuerpo-fármaco, el derivado de CDN novedoso también se denomina "fármaco", simplemente).

30

El fármaco D es un compuesto que tiene una actividad para activar células inmunitarias, específicamente, actividad agonista de STING. Cuando una parte o la totalidad del conector se escinde en una célula diana (por ejemplo, una célula tumoral o una célula inmunitaria), el fármaco D de la estructura original se libera para ejercer un efecto de

activación inmunitaria. La función prevista se ejerce aumentando la sensibilidad de la célula diana a las células inmunitarias o activando las células inmunitarias a través de la célula diana. La función prevista no se limita a una función concreta, siempre que pueda ser cualquier función relacionada con la actividad agonista de STING. Sin embargo, su actividad es preferentemente antitumoral. Es decir, el fármaco D unido a un anticuerpo dirigido al tumor (por ejemplo, un anticuerpo anti-HER2) a través de cualquier conector se administra a las células o tejidos diana, donde una parte o la totalidad del conector se escinde, y el fármaco D ejerce un efecto antitumoral a través de la mejora de la sensibilidad de las células diana a las células inmunitarias o la activación de las células inmunitarias a través de las células diana (por ejemplo, la producción de interferones o citocinas).

El fármaco D que se va a conjugar con el conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente invención se representa con la fórmula (I):



en la que:

L se une a cualquier grupo $-NH_2$ o hidroxilo incluido en L^1 o L^2 ;

L^1 es como se especifica en <1. Derivado de CDN novedoso> anterior;

L^2 representa un grupo seleccionado entre (i) y (ii):

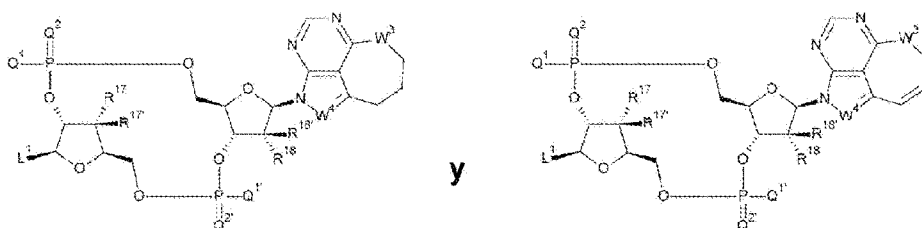
(i) cuando se une a L, L^2 representa $-NHR^1$, un grupo hidroxialquilo C1-C6, o un grupo aminoalquilo C1-C6, en el que R^1 representa un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C1-C6, un grupo alquenilo C2-C6, un grupo alquinilo C2-C6 o un grupo cicloalquilo C3-C6, y el grupo alquilo C1-C6, el grupo alquenilo C2-C6 o el grupo alquinilo C2-C6 está opcionalmente sustituido con uno a seis átomos de halógeno; y

(ii) cuando no se une a L, L^2 representa un átomo de hidrógeno o un átomo de halógeno;

Q^1 , Q^1' , Q^2 , Q^2' , X^1 , X^2 , X^3 , X^4 , X^5 , X^6 , Y^1 , Y^2 , R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , W^1 , W^2 , Z^1 , Z^2 y Z^3 son como se especifica en <1. Derivado de CDN> anterior.

Cuando se une a L, L^2 es preferentemente $-NH_2$, $-CH_2NH_2$ o $-CH_2OH$. Cuando no se une a L, L^2 es preferentemente un átomo de hidrógeno o un átomo de flúor.

El fármaco D que se utilizará para el derivado de CDN novedoso o el conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente invención está representado preferentemente por una de las dos fórmulas siguientes:



en las que:

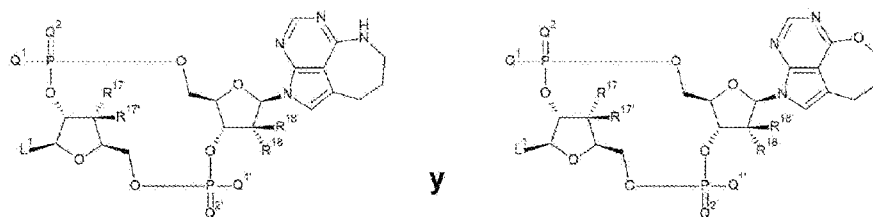
L^1 , Q^1 , Q^1' , Q^2 y Q^2' son como se han definido anteriormente;

R^{17} , $R^{17'}$, R^{18} y $R^{18'}$ representan cada uno independientemente un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, un grupo hidroxilo o $-NH_2$;

W^3 representa $-NH-$, un átomo de oxígeno, un átomo de azufre o $-CH_2-$; y

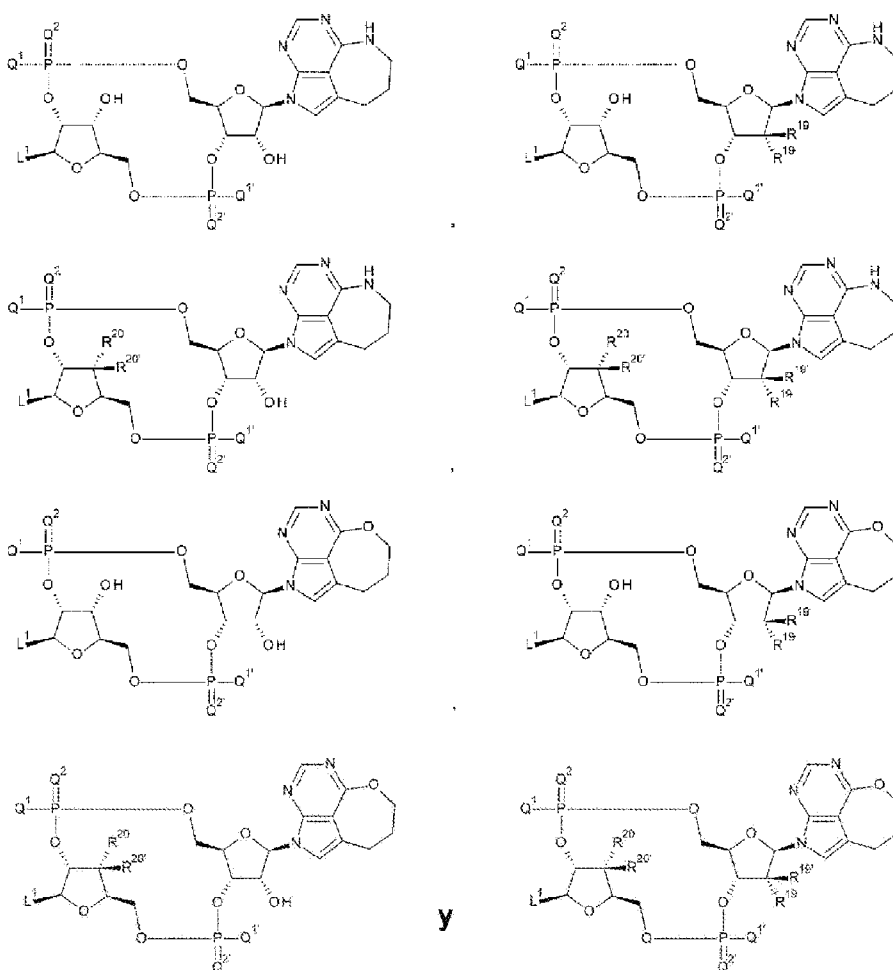
W^4 representa $-CH=$ o un átomo de nitrógeno.

El fármaco D que se utilizará para el derivado de CDN novedoso o el conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente invención está representado preferentemente por una de las dos fórmulas siguientes:



en las que L¹, Q¹, Q^{1'}, Q², Q^{2'}, R¹⁷, R^{17'}, R¹⁸ y R^{18'} son como se han definido anteriormente.

- 5 El fármaco D que se utilizará para el derivado de CDN novedoso o el conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente invención está representado preferentemente por una cualquiera de las ocho fórmulas siguientes:



10

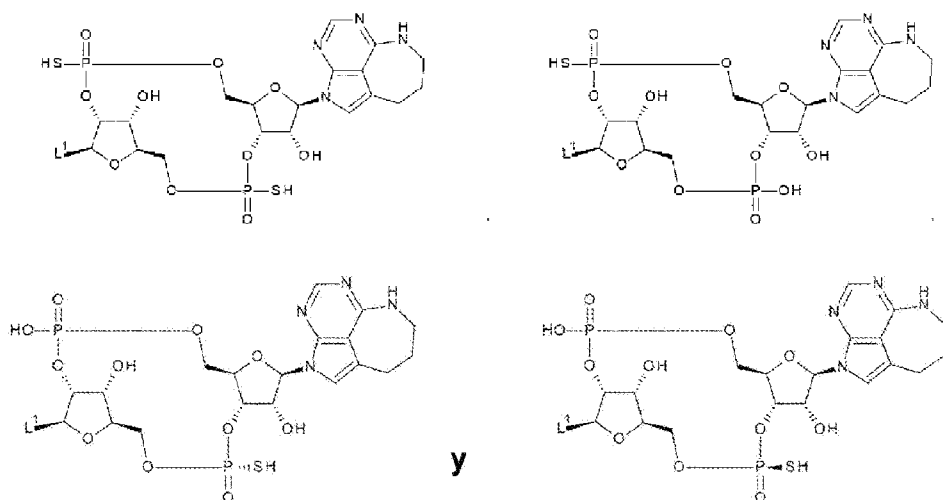
en las que:

L¹, Q¹, Q^{1'}, Q² y Q^{2'} son como se ha definido anteriormente; y

R¹⁹, R^{19'}, R²⁰ y R^{20'} representan cada uno independientemente un átomo de hidrógeno o un átomo de flúor.

15

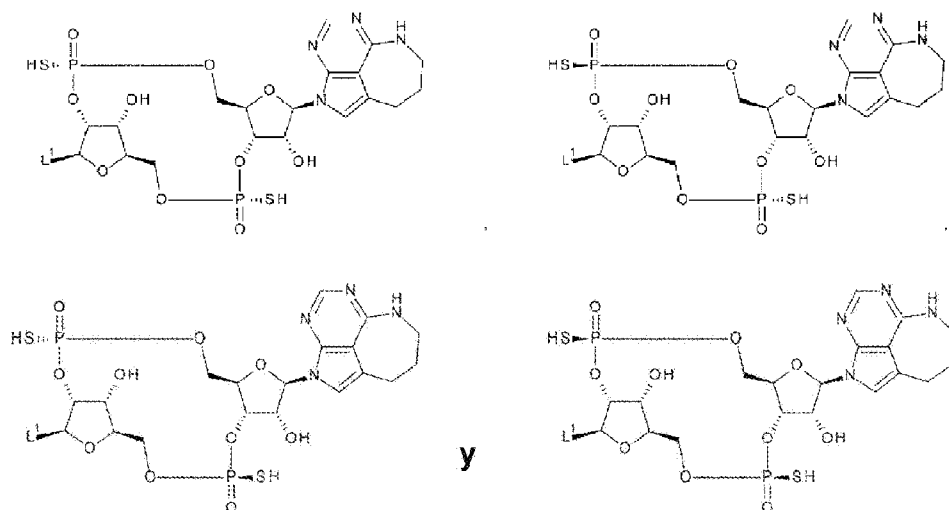
El fármaco D que se utilizará para el derivado de CDN novedoso o el conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente invención está representado preferentemente por una cualquiera de las cuatro fórmulas siguientes:



en las que:

L¹ es como se ha definido anteriormente.

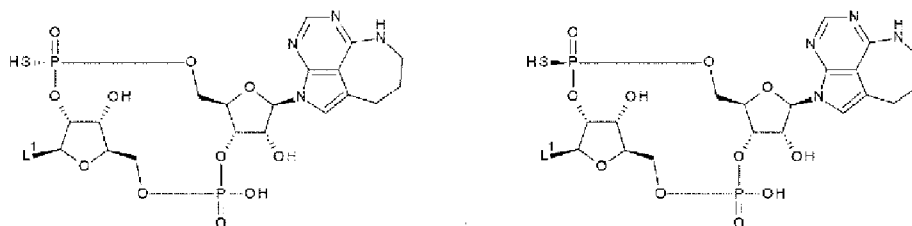
- 5 Además, el fármaco D que se va a utilizar para el derivado de CDN novedoso o el conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente invención está representado preferentemente por una cualquiera de las cuatro fórmulas siguientes:

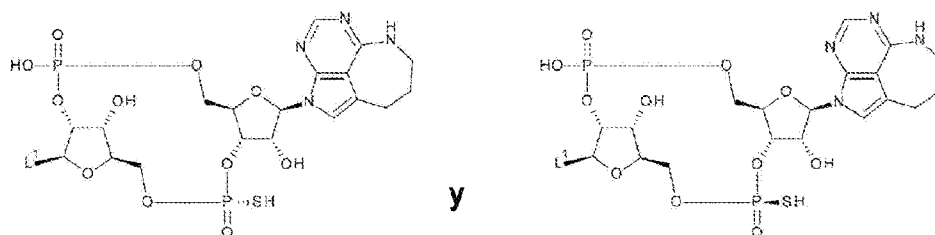


en las que:

- 10 L¹ es como se ha definido anteriormente.

El fármaco D que se utilizará para el derivado de CDN novedoso o el conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente invención está representado preferentemente por una cualquiera de las cuatro fórmulas siguientes:

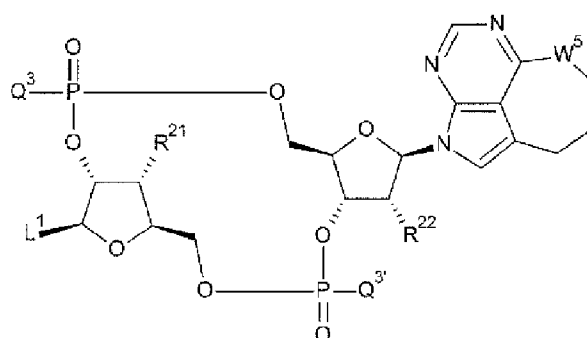




en las que:

L¹ es como se ha definido anteriormente.

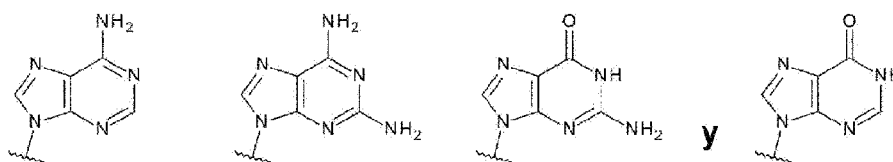
- 5 El fármaco D que se utilizará para el derivado de CDN novedoso o el conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente invención está representado preferentemente por la siguiente fórmula:



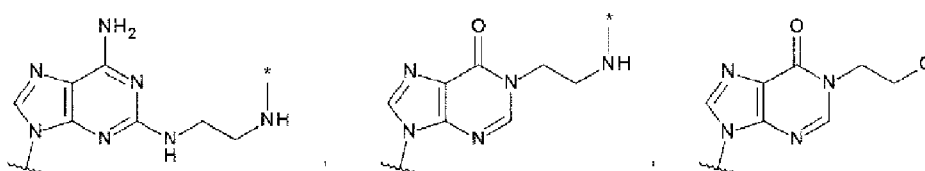
en la que:

L¹, Q³, Q^{3'}, R²¹, R²² y W⁵ son como se especifica en <1. Derivado de CDN> anterior.

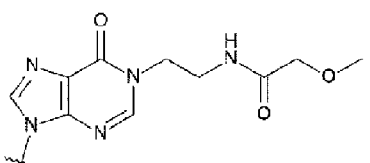
- 10 En el fármaco D que se va a utilizar para el derivado de CDN novedoso o el conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente invención, L¹ está representado preferentemente por uno cualquiera de los siguientes:



En el fármaco D que se utilizará para el derivado de CDN novedoso o el conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente invención, L¹ se representa preferentemente por una cualquiera de las cuatro fórmulas siguientes:



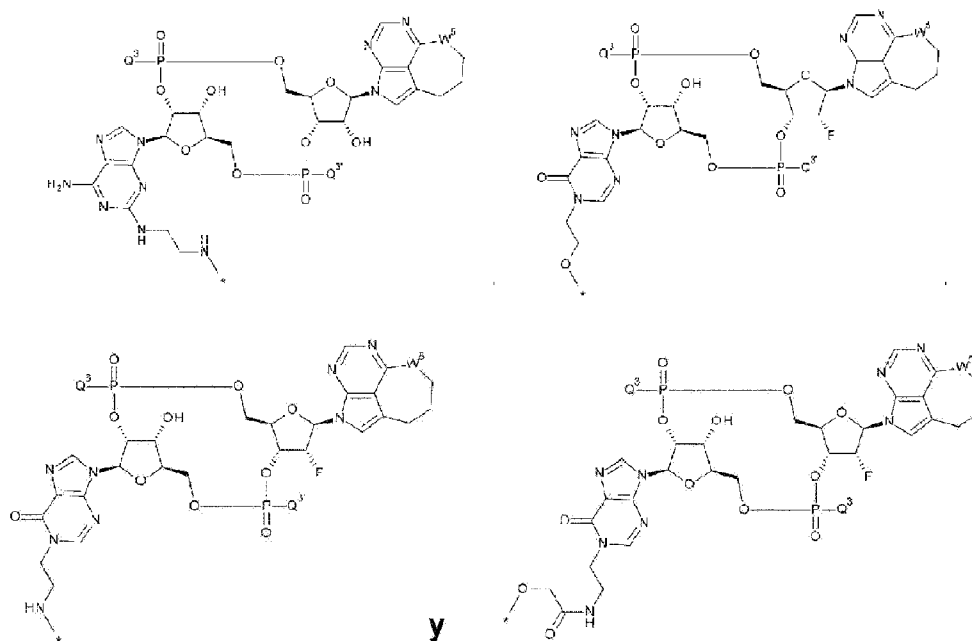
- 15 y



en las que:

cada asterisco indica unión a L.

El fármaco D que se utilizará para el derivado de CDN novedoso o el conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente invención está representado preferentemente por una cualquiera de las cuatro fórmulas siguientes:



5 en las que:

cada asterisco indica unión a L; y

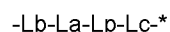
Q³, Q³', y W⁵ son como se especifica en <1. Derivado de CDN> anterior.

<2.1. Estructura del conector>

10 Se describirá la estructura del conector para conjugar el fármaco con un anticuerpo en el conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente invención. El conector que se utilizará para el conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente invención no se limita a un conector concreto, siempre que sea cualquier conector que los expertos en la materia entiendan como un conector que une un anticuerpo y un fármaco. Algunos ejemplos del conector que se puede utilizar para el conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente invención pueden incluir conectores descritos en Protein Cell, 2018, 9(1): 33-46, Pharm. Res., 2015, 32: 3526-3540, e Int. J. Mol. Sci., 2016, 17, 561. El conector puede ser un conector que se escinde *in vivo*, o un conector que no se escinde *in vivo*, pero preferentemente es un conector que se escinde *in vivo*.

Algunos ejemplos del conector a utilizar para el conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente invención pueden incluir un conector que une un fármaco a un glucano o glucano remodelado en la parte Fc de un anticuerpo (en lo sucesivo, denominado a veces "conjugación de glucano") (por ejemplo, descrito en el documento WO 2018/003983) y un conector que une un fármaco a cualquier residuo de aminoácido (por ejemplo, un residuo de cisteína o un residuo de lisina) de un anticuerpo (por ejemplo, descrito en el documento WO 2014/057687). Algunos ejemplos de modos del conector que une un fármaco a cualquier residuo de aminoácido de un anticuerpo pueden incluir la unión al grupo sulfhidrilo (grupo SH) de la cisteína en Ab mediante un enlace tioéter (en lo sucesivo, denominado a veces "conjugación con cisteína"), y la unión al grupo amino (grupo NH₂) de la lisina en Ab mediante un enlace amida (en lo sucesivo, denominado a veces "conjugación con lisina"), y el conector se encuentra preferentemente en el modo de conjugación con cisteína.

El conector L preferido en la presente invención se representa con la siguiente fórmula:



en la que:

30 el asterisco indica unión a cualquier grupo amino o grupo hidroxil incluido en L¹ o L² del fármaco D.

En primer lugar, se describirá Lp.

Lp representa un conector que consiste en una secuencia de aminoácidos escindible *in vivo* o en una célula diana (en lo sucesivo, denominado a veces conector peptídico), o está ausente.

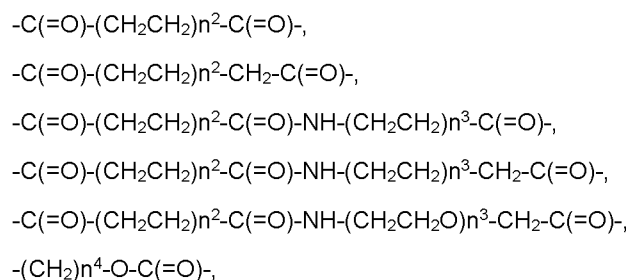
El Lp se escinde, por ejemplo, mediante la acción de una enzima, tal como la peptidasa y la esterasa. El Lp es un péptido compuesto de dos a siete (preferentemente de dos a cuatro) aminoácidos. El Lp forma un enlace amida en el extremo N con el grupo carbonilo del extremo derecho de La, y forma un enlace amida en el extremo C con un grupo amino (-NH-) de Lc. El enlace amida en el lado C-terminal de la Lp es escindido por una enzima, tal como la peptidasa.

- 5 Los aminoácidos que constituyen el Lp no se limitan a aminoácidos concretos, y, por ejemplo, son L- o D-aminoácidos, y preferentemente son L-aminoácidos. Los aminoácidos pueden ser no sólo α -aminoácidos, sino que pueden incluir un aminoácido con estructura, por ejemplo, de β -alanina, ácido ε -aminocaproico o ácido γ -aminobutírico, y pueden incluir además un aminoácido no natural, tal como un aminoácido N-metilado. La secuencia de aminoácidos del Lp no se limita a una secuencia de aminoácidos concreta, y algunos ejemplos de aminoácidos que constituyen el Lp pueden
- 10 ser glicina (Gly; G), valina (Val; V), alanina (Ala; A), fenilalanina (Phe; F), ácido glutámico (Glu; E), isoleucina (Ile; I), prolina (Pro; P), citrulina (Cit), leucina (Leu; L), metionina (Met; M), serina (Ser; S), lisina (Lys; K) y ácido aspártico (Asp; D). Entre ellos se prefieren la glicina (Gly; G), la valina (Val; V), la alanina (Ala; A), la fenilalanina (Phe; F) y la citrulina (Cit). Cualquiera de estos aminoácidos puede aparecer varias veces, y el Lp tiene una secuencia de aminoácidos que incluye aminoácidos seleccionados libremente. El patrón de liberación del fármaco puede controlarse
- 15 mediante el tipo de aminoácido.

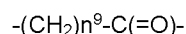
Algunos ejemplos específicos de Lp pueden incluir -GGVA-, -VA-, -GGFG-, -FG-, -GGPI-, -PI-, -GGVCit-, -VCit-, -GGVK-, -VK-, -GGFCit-, -FCit-, -GGFM-, -FM-, -GGLM-, -LM-, -GGICit- e -ICit-. El conector Lp es preferentemente -GGVA-, -VA-, -GGFG-, -FG-, -GGVCit-, -VCit-, -GGFCit- o -FCit-. El conector Lp es más preferentemente -GGVA-, -GGFG o -GGVCit-. El conector Lp es preferentemente -GGFG- o -GGPI-.

- 20 A continuación, se describirá La.

La representa uno cualquiera seleccionado del grupo que consiste en lo siguiente:



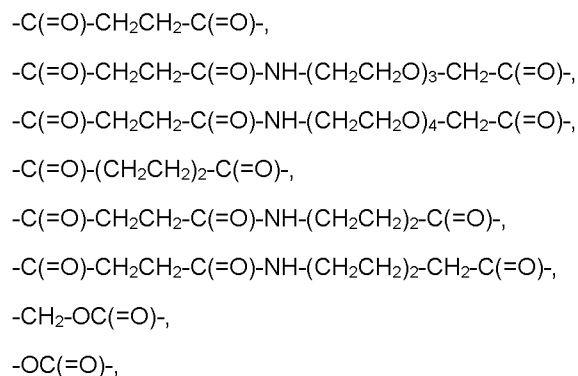
y



- 30 en los que:

n^2 representa un número entero de 1 a 3 (preferentemente 1 o 2), n^3 representa un número entero de 1 a 5 (preferentemente un número entero de 2 a 5, más preferentemente 3 o 4), n^4 representa un número entero de 0 a 2 (preferentemente 0 o 1), y n^9 representa un número entero de 2 a 7 (preferentemente un número entero de 2 a 5, más preferentemente 2, 3 o 5).

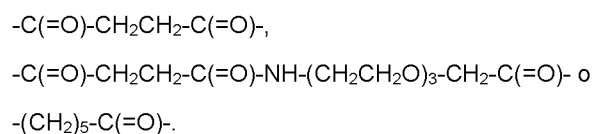
- 35 La representa preferentemente uno cualquiera seleccionado del grupo que consiste en lo siguiente:



y

- 45 $-(CH_2)_5-C(=O)-$.

La es más preferentemente:



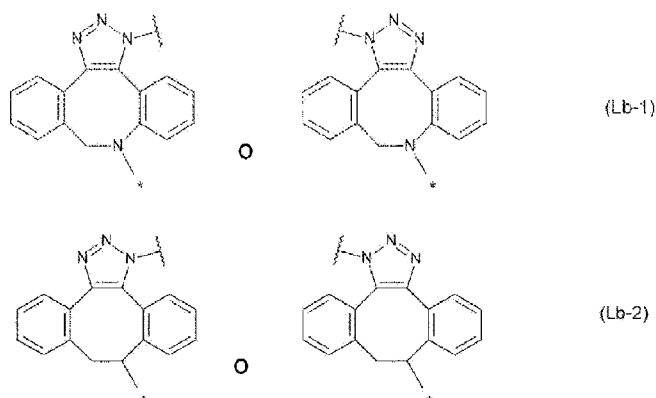
La es aún más preferentemente $-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$.

5 A continuación, se describirá Lb.

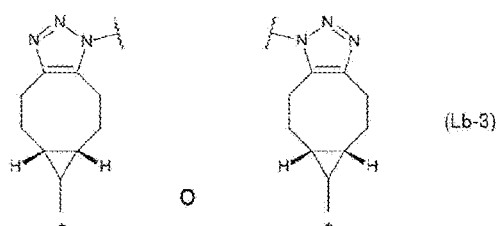
Lb representa un espaciador que se utilizará para el conector de la conjugación de glucano (en el presente documento, también denominado "espaciador para el conector de la conjugación de glucano"), o un espaciador que se utilizará para la conjugación de cisteína (en el presente documento, también denominado "espaciador para el conector de la conjugación de cisteína").

10 <Cuando Lb es un "espaciador para el conector de la conjugación de glucano">

Cuando Lb es un "espaciador para el conector de la conjugación de glucano", algunos ejemplos de Lb pueden incluir un espaciador representado por la siguiente fórmula:



o,



15

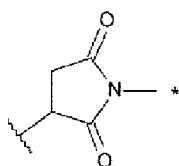
En cada fórmula estructural mostrada anteriormente, cada asterisco (*) indica unión a $-\text{C}(=\text{O})-$ o $-\text{CH}_2-$ en el extremo izquierdo de La, y cada línea ondulada indica unión a un glucano o glucano remodelado de Ab.

20 Cuando se selecciona cualquiera de Lb-1, Lb-2, y Lb-3 para Lb, el sitio de anillo de triazol proporciona estructuras de isómeros geométricos, y los restos de Lb incluyen una de las dos estructuras o una mezcla de las mismas. El conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente invención es capaz de unir una pluralidad de moléculas de fármaco a una molécula de anticuerpo. Cuando una pluralidad de moléculas de fármaco se va a unir a una molécula de anticuerpo, se deduce que hay una pluralidad de restos Lb (por ejemplo, véase el diagrama esquemático (1e) de un conjugado de anticuerpo-fármaco mostrado en el esquema E descrito más adelante en <3. Procedimientos de producción>). Cuando se selecciona cualquiera de Lb-1, Lb-2 y Lb-3 para Lb y está presente una pluralidad de restos Lb por molécula de anticuerpo (por ejemplo, cuando m^2 , que se describe más adelante, es 1 o 2), el sitio de anillo de triazol en cada resto Lb proporciona estructuras de isómeros geométricos, y los restos Lb incluyen una de las dos estructuras o una mezcla de las mismas.

25

<Cuando Lb es un "espaciador para el conector de la conjugación de cisteína">

30 Cuando Lb es un "espaciador para el conector de la conjugación de cisteína", los ejemplos de Lb pueden incluir $-(\text{succinimid-3-il-N})-$. En la presente invención, $-(\text{succinimid-3-il-N})-$ tiene una estructura representada por la siguiente fórmula:



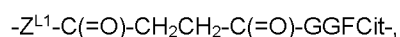
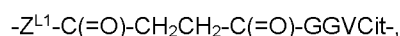
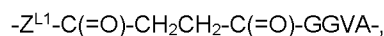
En la fórmula estructural mostrada anteriormente, el asterisco indica unión a La, y la línea ondulada indica unión a una cadena lateral de un residuo de cisteína de un anticuerpo mediante la formación de tioéter.

A continuación, se describirá Lc.

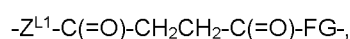
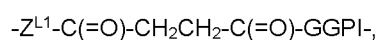
- 5 Lc representa -NH-CH₂-, -NH-grupo fenilo-CH₂-O(C=O)-, -NH-grupo heteroarilo-CH₂-O(C=O)- o está ausente. En este caso, el grupo fenilo es preferentemente un grupo 1,4-fenilo, y el grupo heteroarilo es preferentemente un grupo 2,5-piridilo, un grupo 3,6-piridilo, un grupo 2,5-pirimidilo o un grupo 2,5-tienilo. Lc es preferentemente -NH-CH₂- o está ausente.

Un conector L más preferido en la presente invención es,

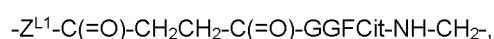
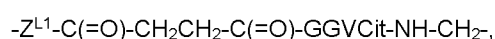
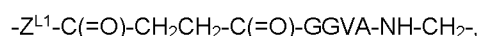
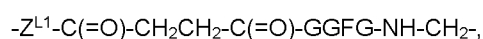
- 10 cuando el modo de unión del fármaco y el anticuerpo es la "conjugación de glucano",



- 15 $-Z^{L1}-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGICit-,$

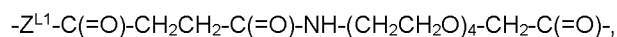


- 20 $-Z^{L1}-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-VA-,$

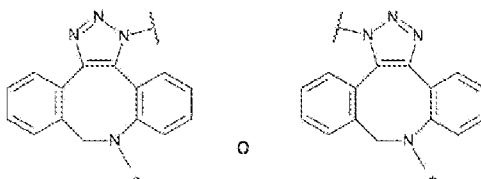


- 25 $-Z^{L1}-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2O)_3-CH_2-C(=O)-,$

o

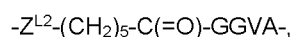
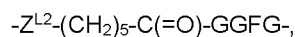


en la que Z^{L1} representa la siguiente fórmula estructural para Lb:



- 30 o,

cuando el modo de unión del fármaco y el anticuerpo es la "conjugación de cisteína",

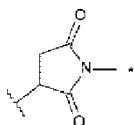


- Z^{L2}-(CH₂)₅-C(=O)-GGVCit-,
- Z^{L2}-(CH₂)₅-C(=O)-GGFCit-,
- Z^{L2}-(CH₂)₅-C(=O)-GGICit-,
- Z^{L2}-(CH₂)₅-C(=O)-GGFM-,
- 5 -Z^{L2}-(CH₂)₅-C(=O)-GGPI-,
- Z^{L2}-(CH₂)₅-C(=O)-GGLM-,
- Z^{L2}-(CH₂)₅-C(=O)-FG-,
- Z^{L2}-(CH₂)₅-C(=O)-VA-,
- Z^{L2}-(CH₂)₅-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-,
- 10 -Z^{L2}-(CH₂)₅-C(=O)-GGVA-NH-CH₂-,
- Z^{L2}-(CH₂)₅-C(=O)-GGVCit-NH-CH₂-,
- Z^{L2}-(CH₂)₅-C(=O)-GGFCit-NH-CH₂-,
- Z^{L2}-(CH₂)₅-C(=O)-NH-(CH₂CH₂O)₃-CH₂-C(=O)-,

o

- 15 -Z^{L2}-(CH₂)₅-C(=O)-NH-(CH₂CH₂O)₄-CH₂-C(=O)-,

en las que Z^{L2} representa -(succinimida-3-il-N)- representado por la siguiente fórmula estructural para Lb:



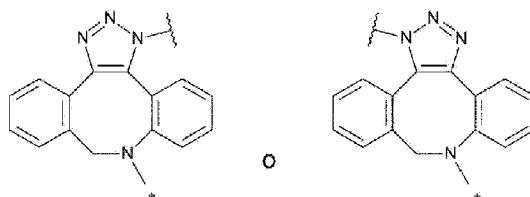
Un conector L más preferido en la presente invención es tal que el modo de unión del fármaco y el anticuerpo es la "conjugación de glucano", y el conector L es:

- 20 -Z^{L1}-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-,

o

- Z^{L1}-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-GGPI-NH-CH₂-,

en los que Z^{L1} representa la siguiente fórmula estructural para Lb:



25 El extremo derecho en cada uno de "conector preferido L" y "conector más preferido L" se une a cualquier -NH₂ o grupo hidroxilo incluido en L¹ o L² en la fórmula (I).

<2.2. Anticuerpos y modificación de sus glucanos>

<2.2.1 Anticuerpo>

30 En el presente documento, "gen" se refiere a nucleótidos que incluyen una secuencia de nucleótidos que codifica aminoácidos de una proteína, o una secuencia de nucleótidos que codifica aminoácidos de una proteína, o una cadena complementaria de la misma, y el significado de "gen" abarca, por ejemplo, un polinucleótido, un oligonucleótido, ADN, ARNm, ADNc y ARN como secuencia de nucleótidos que incluye una secuencia de nucleótidos que codifica aminoácidos de una proteína o una cadena complementaria de la misma.

En el presente documento, "nucleótidos", "polinucleótido" y "secuencia de nucleótidos" tienen el mismo significado que el de "ácido nucleico", y el significado de "nucleótidos" o "secuencia de nucleótidos" abarca, por ejemplo, un ADN, un ARN, una sonda, un oligonucleótido, un polinucleótido y un cebador.

En el presente documento, "polipéptido", "péptido" y "proteína" se utilizan indistintamente.

- 5 En el presente documento, un "fragmento funcional de un anticuerpo" también se denomina "fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo", y significa un fragmento parcial de un anticuerpo con actividad de unión a un antígeno, y algunos ejemplos del mismo pueden incluir Fab, F(ab')₂, Fv, scFv, diacuerpos, anticuerpos lineales y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo. Además, el significado de un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo abarca Fab', un fragmento monovalente de una región variable de un anticuerpo obtenido
- 10 tratando F(ab')₂ en condiciones reductoras. Sin embargo, no hay limitación a esas moléculas y cualquier molécula que tenga capacidad de unión a un antígeno es aceptable. Estos fragmentos de unión a antígenos incluyen no sólo los obtenidos tratando una molécula de longitud completa de una proteína de anticuerpo con una enzima apropiada, sino también proteínas producidas en células hospedadoras apropiadas utilizando un gen de anticuerpo modificado por ingeniería genética.

- 15 El concepto de fragmento funcional de la presente invención incluye un fragmento funcional que conserva asparagina (Asn297) bien conservada para ser modificada con un glucano unido a N y los aminoácidos alrededor de Asn297 en la región Fc de cadena pesada de IgG, y tiene actividad de unión a un antígeno.

- El anticuerpo que se va a utilizar para el conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente invención se refiere a una inmunoglobulina, y es una molécula que incluye un sitio de unión al antígeno que se une inmunoespecíficamente a un
- 20 antígeno. El anticuerpo que se utilizará para la presente invención puede ser de cualquier clase de IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY, y se prefiere IgG. La subclase puede ser cualquiera de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2, y se prefieren IgG1, IgG2 e IgG4 (incluidos los anticuerpos con mutaciones que afectan a las actividades de ADCC y ADCP en la región Fc de una cadena pesada de IgG).

- Si se usa IgG1 como isotipo del anticuerpo usado para la presente invención, la función efectora puede ajustarse
- 25 sustituyendo una parte de los residuos de aminoácidos en la región constante (véanse los documentos WO 88/07089, WO 94/28027, WO 94/29351). Algunos ejemplos de mutantes de IgG1 pueden incluir aquellos con mutación LALA en IgG1 (IgG1-L234A, L235A). Las L234A, L235A indican la sustitución de leucina por alanina en las posiciones 234 y 235 especificadas por la numeración del Índice EU (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 63, n.º 1 (15 de mayo de 1969), págs. 78-85).

- 30 El anticuerpo puede derivarse de cualquier especie, y los ejemplos preferidos del origen pueden incluir un ser humano, una rata, un ratón y un conejo. Si el anticuerpo se deriva de una especie distinta de la humana, se prefiere el anticuerpo quimérico o humanizado obtenidos mediante una técnica bien conocida. El anticuerpo de la presente invención puede ser un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal, y es preferentemente un anticuerpo monoclonal. Algunos ejemplos de anticuerpos monoclonales pueden incluir anticuerpos monoclonales derivados de animales no humanos, tales como anticuerpos de rata, anticuerpos de ratón y anticuerpos de conejo; anticuerpos quiméricos; anticuerpos
- 35 humanizados; anticuerpos humanos; fragmentos funcionales de los mismos; y formas modificadas de los mismos.

El anticuerpo es preferentemente un anticuerpo que se dirige a células tumorales o células inmunitarias. El anticuerpo es más preferentemente un anticuerpo que se dirige a células tumorales.

- Si se usa un anticuerpo dirigido a células tumorales, se prefiere que el anticuerpo tenga una o más propiedades de
- 40 una propiedad de ser capaz de reconocer células tumorales, una propiedad de ser capaz de unirse a células tumorales, una propiedad de ser incorporado internalizado en células tumorales, y una propiedad de causar daños a las células tumorales. El fármaco que se va a conjugar con un anticuerpo a través de un conector tiene actividad agonista de STING. El fármaco utilizado en la presente invención induce el interferón mediante la activación de la transducción de señales del factor regulador del interferón-3 (IRF3). Por lo tanto, si se utiliza un anticuerpo dirigido a células tumorales
- 45 para el conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente invención, el conjugado de anticuerpo-fármaco, después de ser administrado al organismo, se traslada a un tumor y se incorpora en las células de los tumores, y la porción del conector se escinde por peptidasa o similar y se libera la porción del fármaco. Se infiere que la porción de fármaco liberada activa la inmunidad antitumoral y ejerce un efecto antitumoral a través de la actividad agonista de STING.

- La capacidad de unión del anticuerpo a células tumorales puede confirmarse usando citometría de flujo. La
- 50 incorporación del anticuerpo a las células tumorales puede confirmarse empleando (1) un ensayo para la visualización de un anticuerpo incorporado en las células con un microscopio de fluorescencia con un anticuerpo secundario (marcado con fluorescencia) que se une al anticuerpo terapéutico (Cell Death and Differentiation (2008), 15, 751-761), (2) un ensayo para la medición de la intensidad de la fluorescencia incorporada en las células con un anticuerpo secundario (marcado con fluorescencia) que se une al anticuerpo terapéutico (Molecular Biology of the Cell, vol. 15, 5268-5282, diciembre de 2004), o (3) un ensayo de Mab-ZAP que emplea una inmunotoxina que se une al anticuerpo
- 55 terapéutico, en el que la toxina se libera tras incorporarse a las células para inhibir el crecimiento celular (Bio Techniques, 28: 162-165, enero de 2000). Como inmunotoxina, puede utilizarse una proteína compleja recombinante de un dominio catalítico de la toxina diftérica y proteína G.

En la presente invención, "alta capacidad de internalización" se refiere a la situación en la que la tasa de supervivencia de células que expresan el antígeno diana (por ejemplo, células que expresan HER2 si se usa un anticuerpo anti-HER2) con la adición de un anticuerpo de interés y un anticuerpo anti-IgG de ratón o rata marcado con saporina (representado como una tasa relativa a la tasa de supervivencia celular sin adición del anticuerpo como el 100 %) es preferentemente el 70 % o menos, y más preferentemente el 60 % o menos.

Si se utiliza un anticuerpo dirigido a células tumorales para el conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente invención, se prefiere, pero no es esencial, que el propio anticuerpo tenga efecto antitumoral. Es preferible que el anticuerpo que se va a utilizar para el conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente invención tenga una característica de internalización, que implica la migración al interior de las células tumorales.

La actividad antitumoral del fármaco o conjugado de anticuerpo-fármaco se refiere a la actividad citotóxica o efecto anticelular contra células tumorales, o a la regresión del volumen tumoral. La actividad antitumoral puede confirmarse mediante cualquier sistema conocido de evaluación *in vitro* o *in vivo*.

La actividad de activación inmunitaria del fármaco y del conjugado de anticuerpo-fármaco se refiere a la potenciación de la sensibilidad de las células tumorales frente a las células inmunitarias o a la activación de las células inmunitarias a través de las células tumorales. La actividad de activación inmunitaria puede confirmarse mediante cualquier sistema conocido de evaluación *in vitro* o *in vivo*.

Algunos ejemplos del anticuerpo que se va a utilizar en la presente invención pueden incluir un anticuerpo anti-HER2, un anticuerpo anti-HER3, un anticuerpo anti-DLL3, un anticuerpo anti-FAP, un anticuerpo anti-CDH11, un anticuerpo anti-CDH6, un anticuerpo anti-A33, un anticuerpo anti-CanAg, un anticuerpo anti-CD19, un anticuerpo anti-CD20, un anticuerpo anti-CD22, un anticuerpo anti-CD30, un anticuerpo anti-CD33, un anticuerpo anti-CD56, un anticuerpo anti-CD70, un anticuerpo anti-CD98, un anticuerpo anti-TROP2, un anticuerpo anti-CEA, un anticuerpo anti-Cripto, un anticuerpo anti-EphA2, un anticuerpo anti-G250, un anticuerpo anti-MUC1, un anticuerpo anti-GPNMB, un anticuerpo contra la integrina, un anticuerpo anti-PSMA, un anticuerpo contra la tenascina-C, un anticuerpo anti-SLC44A4, un anticuerpo contra la mesotelina, un anticuerpo anti-ENPP3, un anticuerpo anti-CD47, un anticuerpo anti-EGFR, un anticuerpo anti-GPR20 y un anticuerpo anti-DR5. El anticuerpo utilizado en la presente invención es preferentemente un anticuerpo anti-HER2 (por ejemplo, trastuzumab o pertuzumab), un anticuerpo anti-CDH6, un anticuerpo anti-CD33 o un anticuerpo anti-EphA2, y más preferentemente un anticuerpo anti-HER2.

El anticuerpo utilizado en la presente invención puede obtenerse utilizando un procedimiento llevado a cabo habitualmente en la técnica, que comprende inmunizar a un animal con un antígeno polipeptídico y recoger y purificar un anticuerpo producido en el organismo. El origen del antígeno no se limita a los seres humanos, y los animales pueden inmunizarse con un antígeno derivado de animales no humanos, tales como un ratón y una rata. En este caso, la reactividad cruzada del anticuerpo resultante que se une al antígeno heterólogo con el antígeno humano correspondiente puede analizarse para detectar un anticuerpo aplicable a una enfermedad humana.

Como alternativa, un anticuerpo monoclonal puede obtenerse a partir de un hibridoma establecido fusionando una célula productora de anticuerpos que produce un anticuerpo contra el antígeno con una célula de mieloma de acuerdo con un procedimiento conocido en la técnica (por ejemplo, Kohler y Milstein, *Nature* (1975), 256, págs. 495-497, Kennett, R. ed., *Monoclonal Antibodies*, págs. 365-367, Plenum Press, N.Y. (1980)).

El antígeno puede obtenerse mediante ingeniería genética para permitir que las células hospedadoras produzcan un gen que codifique la proteína del antígeno.

El anticuerpo humanizado de la presente invención puede obtenerse de acuerdo con un procedimiento conocido (por ejemplo, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 81, 6851-6855, (1984), *Nature* (1986), 321, págs. 522-525, documento WO 90/07861).

Por ejemplo, puede obtenerse un anticuerpo anti-HER2 (documento US 5821337, documento WO 2004/008099, etc.), un anticuerpo anti-CD33 (documento WO 2014/057687, etc.), un anticuerpo anti-CD70 (documento WO 2004/073656, etc.), un anticuerpo anti-EphA2 (documento WO 2009/028639, etc.) y un anticuerpo anti-CDH6 (documento WO 2018/212136, etc.) de acuerdo con un procedimiento conocido.

Por ejemplo, es deseable que el anticuerpo anti-HER2 usado en la presente invención tenga cualquiera de las siguientes propiedades, pero el anticuerpo anti-HER2 no está limitado a las mismas.

(1) Un anticuerpo anti-HER2 con las siguientes propiedades:

(a) ser capaz de unirse específicamente a HER2; y [0198]

(b) tener actividad de internalización en células HER2 mediante unión a HER2.

(2) El anticuerpo según (1), capaz de unirse al dominio extracelular de HER2.

(3) El anticuerpo según (1) o (2), que es un anticuerpo monoclonal.

(4) El anticuerpo según uno cualquiera de (1) a (3), que tiene actividades o actividad de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC).

(5) El anticuerpo según uno cualquiera de (1) a (4), que es un anticuerpo monoclonal de ratón, un anticuerpo monoclonal quimérico o un anticuerpo monoclonal humanizado.

5 (6) El anticuerpo según uno cualquiera de (1) a (3), en el que la región constante de cadena pesada es una región constante de cadena pesada de IgG1 humana, e incluye una mutación que causa la disminución de las actividades de ADCC y ADCP.

10 (7) El anticuerpo según uno cualquiera de (1) a (4), que es un anticuerpo monoclonal humanizado que incluye una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2 y una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1.

(8) El anticuerpo según (5), en el que la región constante de cadena pesada es una región constante de cadena pesada de IgG1 humana, y la leucina se sustituye por alanina en las posiciones 234 y 235 especificadas por la numeración del índice EU.

15 (9) El anticuerpo según (8), que es un anticuerpo monoclonal humanizado que incluye una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 3 y una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1.

(10) El anticuerpo según uno cualquiera de (1) a (4), que es un anticuerpo monoclonal humanizado que incluye una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 29 y una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 28.

20 (11) El anticuerpo según uno cualquiera de (1) a (4), que es un anticuerpo monoclonal humanizado que incluye una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 30 y una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 28.

(12) El anticuerpo según uno cualquiera de (1) a (11), en el que se suprimen uno o dos aminoácidos en el extremo carboxilo de la cadena pesada.

25 (13) Un anticuerpo obtenido utilizando un procedimiento para producir el anticuerpo según uno cualquiera de (1) a (12), comprendiendo el procedimiento las etapas de cultivar una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que contiene un polinucleótido que codifica el anticuerpo; y recoger el anticuerpo diana de un cultivo obtenido de la etapa del cultivo.

<2.2.2 Remodelación de glucanos del anticuerpo>

30 Recientemente se ha notificado un procedimiento para remodelar glucanos heterogéneos de un anticuerpo mediante reacción enzimática para introducir glucanos homogéneos que tienen un grupo funcional (ACS Chem. Biol., 2012, 7, 110-122, ACS Med. Chem. Lett., 2016, 7, 1005-1008). Se ha intentado utilizar esta técnica de remodelación de glucanos para introducir un fármaco en un sitio específico y sintetizar un ADC homogéneo (Bioconjugate Chem., 2015, 26, 2233-2242, Angew. Chem. Int. Ed., 2016, 55, 2361-2367, documento US 2016361436).

35 La remodelación de glucanos utiliza en primer lugar hidrolasa para escindir los glucanos heterogéneos añadidos a una proteína (por ejemplo, un anticuerpo), dejando un solo GlcNAc en cada extremo, preparando un resto de proteína homogénea que incluye GlcNAc añadido a la misma (en lo sucesivo, denominado "aceptor"). Posteriormente, se proporciona cualquier glucano preparado por separado (en lo sucesivo, denominado "donante"), y el aceptor y el donante se unen mediante el uso de glucosiltransferasa. De este modo, se puede sintetizar una glucoproteína homogénea con cualquier estructura de glucanos.

40 En la presente invención, un "glucano" se refiere a una unidad estructural de dos o más monosacáridos unidos entre sí mediante enlaces glucosídicos. Los monosacáridos y glucanos específicos se expresan a veces con abreviaturas como "GlcNAc-" y "SG-". Cuando se utiliza cualquiera de estas abreviaturas en una fórmula estructural, la abreviatura se muestra con la intención de que un átomo de oxígeno o un átomo de nitrógeno implicado en un enlace glucosídico en el extremo reductor a otra unidad estructural no se incluya en la abreviatura que indica el glucano, a menos que se defina concretamente.

45 En la presente invención, cada monosacárido como unidad básica de un glucano se expresa por conveniencia con la definición de que, en la estructura de anillo, la posición de un átomo de carbono que se une a un átomo de oxígeno que constituye el anillo y que se une directamente a un grupo hidroxilo (o a un átomo de oxígeno implicado en un enlace glucosídico) es la posición 1 (posición 2 sólo para ácidos siálicos), a menos que se especifique lo contrario. Los nombres de los compuestos de los ejemplos se proporcionan teniendo en cuenta la estructura química completa, y esa regla no se aplica necesariamente.

50

Cuando un glucano se expresa como un signo (por ejemplo, SG, MSG, GlcNAc) en la presente invención, se pretende que el signo, a menos que se defina de otro modo, incluya los átomos de carbono que van hasta el extremo reductor y no incluya N u O implicados en un enlace N- u O-glucosídico.

El conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente invención se representa con la siguiente fórmula:



en la que el anticuerpo Ab o un fragmento funcional del anticuerpo se une desde una cadena lateral de un residuo de aminoácido del mismo (por ejemplo, cisteína, lisina) directamente a L, o se une a través de un glucano o glucano remodelado de Ab a L.

10 Los glucanos en Ab utilizados en la presente invención son glucanos enlazados a N o glucanos enlazados a O, y preferentemente glucanos enlazados a N.

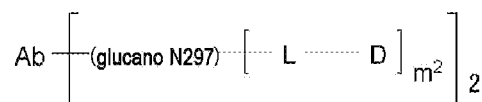
Los glucanos enlazados a N y los glucanos enlazados a O se unen a una cadena lateral de aminoácidos de un anticuerpo a través de un enlace N-glucosídico y un enlace O-glucosídico, respectivamente.

El Ab utilizado en la presente invención es IgG, y preferentemente IgG1, IgG2 o IgG4.

15 La IgG incluye un glucano enlazado a N bien conservado en un residuo de asparagina en la posición 297 de la región Fc de la cadena pesada (en lo sucesivo, denominado "Asn297 o N297"), y se sabe que el glucano enlazado a N contribuye a la actividad, la cinética, etcétera, de la molécula de anticuerpo (Eon-Duval, A. *et al.*, *Biotechnol. Prog.*, 2012, 28, 608-622, Sanglier-Cianferani, S., *Anal. Chem.*, 2013, 85, 715-736).

20 La secuencia de aminoácidos en la región constante de la IgG está bien conservada, y cada uno de los aminoácidos se ha especificado mediante la numeración del índice EU en un informe de Edelman *et al.* (*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 63, 78-85, (1969)). Por ejemplo, Asn297, a la que se le añade un glucano enlazado a N en la región Fc, corresponde a la posición 297 especificada por la numeración del índice EU, y cada aminoácido se especifica de forma distintiva para su expresión por medio de la numeración del índice EU, incluso si la posición real del aminoácido ha variado por fragmentación de la molécula o supresión de una región.

25 La siguiente fórmula ilustra un caso en el que el conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente invención se une a través del glucano N297 de un anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo a L.



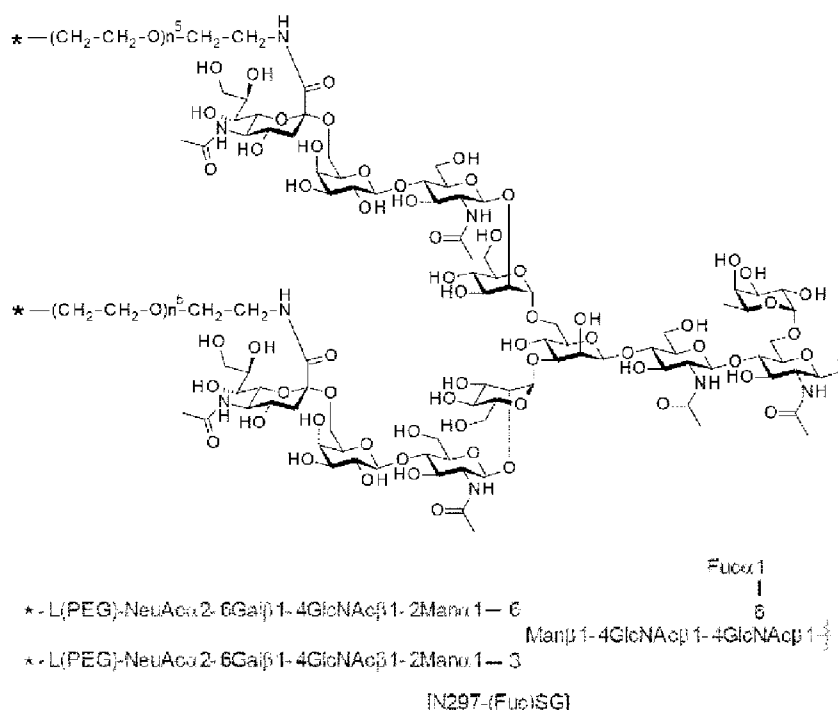
El anticuerpo que tiene un glucano remodelado se denomina anticuerpo con glucano remodelado.

30 El SGP (α 2,6-SGP), abreviatura de sialilglucopéptido, es un glucopéptido enlazado a N representativo. El SGP puede separarse/purificarse de la yema de un huevo de gallina, por ejemplo, de acuerdo con un procedimiento descrito en el documento WO 2011/027868. Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. y FUSHIMI Pharmaceutical Co., Ltd. comercializan productos purificados de SGP. En el presente documento, el resto glucano del SGP se expresa como SG, y un glucano formado mediante la supresión de un resto GlcNAc en el extremo reductor del SG se expresa como SG(10). El SG(10) puede prepararse mediante hidrólisis enzimática de SGP, por ejemplo, con referencia a un informe de Umekawa *et al.* (*Biochim. Biophys. Acta*, 2010, 1800, 1203-1209). Como alternativa, puede adquirirse SG(10) en Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. o en FUSHIMI Pharmaceutical Co., Ltd.

En el presente documento, una estructura de glucano formada suprimiendo un ácido siálico en un extremo no reductor sólo en cualquiera de las cadenas ramificadas de β -Man en SG(10) se expresa como MSG(9), y una estructura que incluye un ácido siálico sólo en el glucano 1-3 de las cadenas ramificadas se expresa como MSG1, y una estructura que incluye un ácido siálico sólo en el glucano 1-6 de las cadenas ramificadas se expresa como MSG2.

40 El glucano remodelado utilizado en la presente invención es N297-(Fuc)SG, N297-(Fuc)MSG1, N297-(Fuc)MSG2, o una mezcla de N297-(Fuc)MSG1 y N297-(Fuc)MSG2, preferentemente N297-(Fuc)SG, N297-(Fuc)MSG1 o N297-(Fuc)MSG2, y más preferentemente N297-(Fuc)SG o N297-(Fuc)MSG1.

El N297-(Fuc)SG se representa con la siguiente fórmula estructural o fórmula de secuencia:

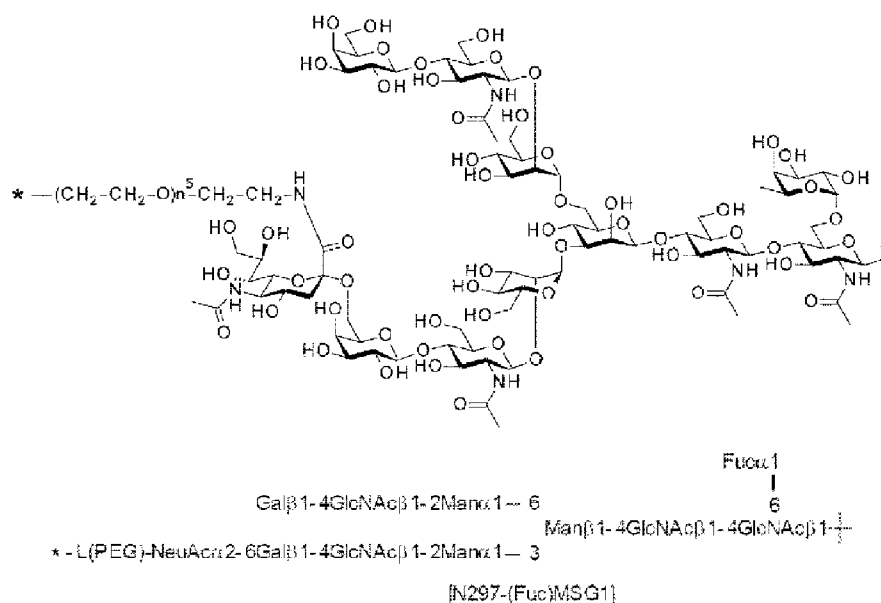


En las fórmulas, cada línea ondulada indica unión a Asn297 del anticuerpo;

- 5 L(PEG) representa $-(\text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{O})^n - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{NH}-$, en el que el grupo amino del extremo derecho indica unión amida al grupo carboxilo en la posición 2 de un ácido siálico en el extremo no reductor en cada una de las cadenas 1-3 y 1-6 de las cadenas ramificadas de β -Man en el glucano N297, y cada asterisco indica unión al conector L, en concreto, un átomo de nitrógeno en la posición 1 o 3 del anillo de 1,2,3-triazol de Lb en el conector L; y

n^5 es un número entero de 2 a 10, y preferentemente un número entero de 2 a 5.

- 10 N297-(Fuc)MSG1 se representa con la siguiente fórmula estructural o fórmula de secuencia:



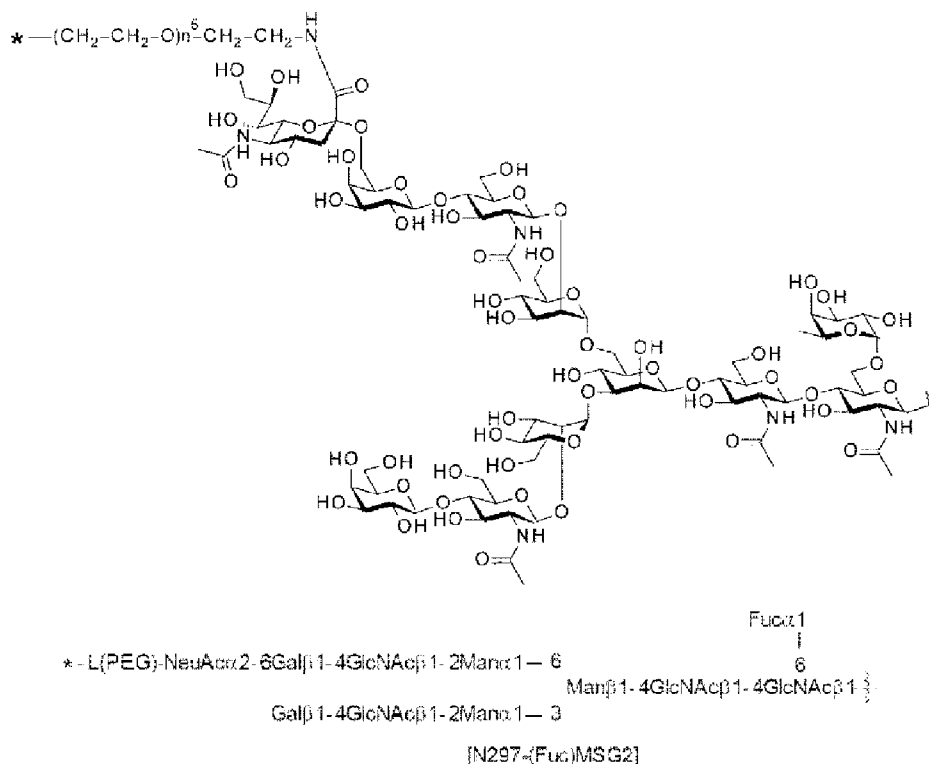
En las fórmulas, cada línea ondulada indica unión al Asn297 del anticuerpo;

- 15 L(PEG) representa $-(\text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{O})^n - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{NH}-$, en el que el grupo amino en el extremo derecho indica unión amida al grupo carboxilo en la posición 2 de un ácido siálico en el extremo no reductor en la cadena 1-3 de las cadenas ramificadas de β -Man en el glucano N297;

cada asterisco indica unión al conector L, en particular, un átomo de nitrógeno en la posición 1 o 3 del anillo de 1,2,3-triazol de Lb en el conector L; y

n^5 es un número entero de 2 a 10, y preferentemente un número entero de 2 a 5.

N297-(Fuc)MSG2 se representa con la siguiente fórmula estructural o fórmula de secuencia:



En las fórmulas, cada línea ondulada indica unión al Asn297 del anticuerpo;

L(PEG) representa $-(\text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{O})^{n^5} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{NH}-$, en el que el grupo amino en el extremo derecho indica unión amida al grupo carboxilo en la posición 2 de un ácido siálico en el extremo no reductor en la cadena 1-6 de las cadenas ramificadas de β -Man en el glucano N297, y cada asterisco indica unión al conector L, en concreto, un átomo de nitrógeno en la posición 1 o 3 del anillo 1,2,3-triazol de Lb en el conector L; y

n^5 es un número entero de 2 a 10, y preferentemente un número entero de 2 a 5.

Si el glucano N297 del anticuerpo en el conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente invención es N297-(Fuc)SG, el conjugado de anticuerpo-fármaco es una molécula a la que se han conjugado cuatro moléculas de conector L y cuatro moléculas de fármaco D ($m^2 = 2$) ya que el anticuerpo es un dímero.

Si el glucano N297 del anticuerpo en el conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente invención es N297-(Fuc)MSG1, N297-(Fuc)MSG2, o una mezcla de los mismos, el conjugado de anticuerpo-fármaco es una molécula a la que se han conjugado dos moléculas de conector L y dos moléculas de fármaco D ($m^2 = 1$) ya que el anticuerpo es un dímero (véase la figura 1).

El glucano N297 es preferentemente N297-(Fuc)SG, N297-(Fuc)MSG1 o N297-(Fuc)MSG2, y más preferentemente N297-(Fuc)SG.

Si el glucano N297 del anticuerpo en el conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente invención es N297-(Fuc)SG, N297-(Fuc)MSG1 o N297-(Fuc)MSG2, puede obtenerse un ADC altamente homogéneo.

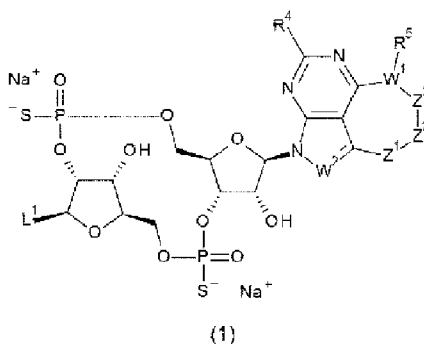
<3. Procedimientos de producción>

Se describirán procedimientos representativos para producir el derivado de CDN novedoso usado en la presente invención o intermedios de producción del mismo. En los párrafos siguientes, los números de compuesto que aparecen en las fórmulas de reacción se utilizan para identificar cada compuesto. En concreto, se mencionarán como "compuesto de fórmula (1)", "compuesto (1)", etc. Los compuestos con otros números se expresarán de la misma manera.

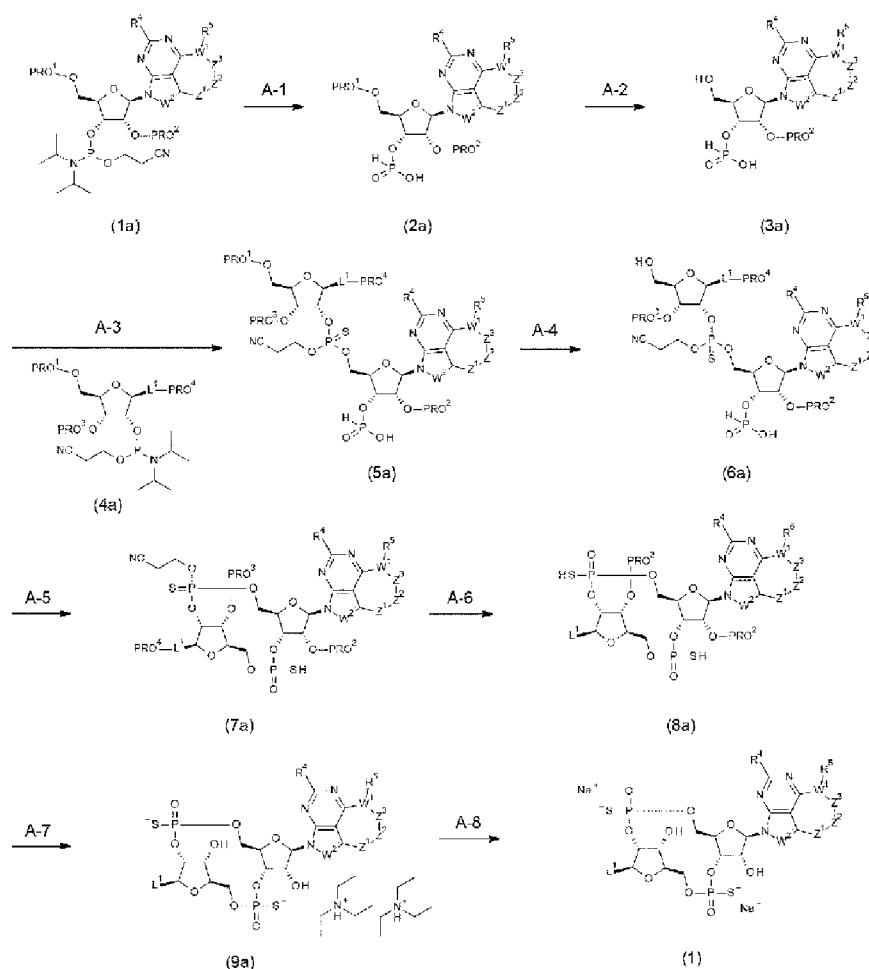
En el esquema A al esquema E siguientes, los sustituyentes R^1 a R^5 , L^1 , L^2 , W^1 , W^2 y Z^1 a Z^3 son sinónimos de los anteriores. Los sustituyentes R^a , R^c , R^e y R^g representan cada uno una cadena lateral de un α -aminoácido natural. Algunos ejemplos pueden ser un grupo metilo, un grupo isopropilo, un grupo sec-butilo, un grupo isobutilo y un grupo bencilo. PRO^1 representa un grupo protector para un alcohol primario. PRO^1 es preferentemente un grupo 4,4'-dimetoxitritilo o un grupo 4-metoxitritilo. PRO^2 , PRO^3 , PRO^4 y PRO^8 representan cada uno un grupo protector para un alcohol secundario. Preferentemente, PRO^2 , PRO^3 , PRO^4 y PRO^8 son cada uno un grupo terc-butildimetilsililo, un grupo triisopropilsililoximetilo, un grupo benzoilo, un grupo 2-nitrobencilo o un grupo 4-metoxitetrahidropiran-4-ilo. PRO^6 representa un grupo protector para un ácido carboxílico. PRO^6 es preferentemente un grupo terc-butilo o un grupo bencilo. PRO^5 y PRO^9 representan cada uno un grupo protector para una amina. PRO^5 es preferentemente un grupo terc-butiloxycarbonilo, un grupo 9-fluorenilmetiloxycarbonilo, un grupo aliloxycarbonilo, un grupo 2,2,2-tricloroetoxycarbonilo o un grupo benciloxycarbonilo, y PRO^9 es preferentemente un grupo 9-fluorenilmetiloxycarbonilo o un grupo 2-(trimetilsilil)etoxycarbonilo. PRO^4 representa un grupo protector para un alcohol o una amina. PRO^4 es preferentemente un grupo terc-butildimetilsililo, o un grupo benzoilo para un alcohol, y preferentemente un grupo 2-(trimetilsilil)etoxycarbonilo, un grupo aliloxycarbonilo, o un grupo terc-butiloxycarbonilo para una amina. Q^a representa un átomo de oxígeno o un átomo de azufre, y Q^b representa un grupo hidroxilo o un grupo tiol. Q^a y Q^b representan cada uno independientemente un átomo de oxígeno (O^-) o un átomo de azufre (S^-) cargados negativamente. R^x y R^y representan cada uno independientemente un átomo de halógeno o $-O-PRO^2$. n representa un número entero de 1 a 3.

Esquema A

El derivado de CDN utilizado en la presente invención representado por (1) puede producirse de acuerdo con el esquema A descrito a continuación.



El presente procedimiento de producción es un procedimiento para producir el compuesto representado por la fórmula general (1). La síntesis en un único reactor es aplicable a partir de las etapas A-1 a A-5 del presente procedimiento de producción, y esto puede realizarse con referencia a un informe de Gaffney *et al.* (Org. Lett., 2010, 12, 3269-3271).



(Etapa A-1)

Esta etapa es una etapa de producción del compuesto de fórmula (2a) realizando secuencialmente una reacción de hidrólisis del compuesto de fórmula (1a) y eliminando un grupo cianoetilo del producto resultante usando una técnica conocida de química orgánica.

La reacción de hidrólisis se llevó a cabo tratando el compuesto (1a) en un disolvente (acetonitrilo, tetrahydrofurano, N,N-dimetilformamida o un disolvente mixto de los mismos) con agua y un ácido (trifluoroacetato de piridina, 4,5-dicianoimidazol, 1H-tetrazol, etc.) a una temperatura comprendida entre -10 °C y el punto de ebullición del disolvente utilizado para la reacción, preferentemente entre 15 °C y 35 °C. La cantidad de moles de agua utilizada fue de 2 mol a una cantidad excesiva de moles, preferentemente de 2 mol a 10 mol, por 1 mol de compuesto (1a), y la del ácido utilizado fue de 1 mol a una cantidad excesiva de moles, preferentemente de 1 mol a 5 mol, por 1 mol de compuesto (1a). El tiempo de reacción es de 1 minuto a 3 horas, y preferentemente de 5 minutos a 30 minutos. A esta mezcla de reacción se le añadió a continuación una base (terc-butilamina, etc.) para retirar el grupo cianoetilo. La cantidad de moles de la base utilizada fue una cantidad excesiva de moles, preferentemente de 30 mol a 50 mol, por 1 mol de compuesto (1a). El tiempo de reacción es de 5 minutos a 6 horas, y preferentemente de 15 minutos a 1 hora. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida para obtener un producto bruto (2a). El producto bruto (2a) puede utilizarse en la etapa siguiente sin purificación.

(Etapa A-2)

Esta etapa es una etapa de producción del compuesto de fórmula (3a) mediante la eliminación de un grupo protector para un grupo hidroxilo del compuesto de fórmula (2a) usando una técnica conocida de química orgánica. Antes de iniciar la reacción de esta etapa, la forma bruta de fórmula (2a) se destiló azeotrópicamente de una a tres veces con acetonitrilo, según sea necesario, para su secado.

Cuando PRO¹ es un grupo 4,4'-dimetoxitritilo, el grupo 4,4'-dimetoxitritilo se eliminó tratando el compuesto (2a) en un disolvente (diclorometano, cloroformo, dicloroetano, etc.) con agua y un ácido (ácido dicloroacético, ácido trifluoroacético, etc.) a una temperatura comprendida entre -10 °C y el punto de ebullición del disolvente utilizado para la reacción, preferentemente entre 15 °C y 35 °C. La cantidad de moles de agua utilizada fue una cantidad excesiva de moles, preferentemente de 10 mol a 20 mol, por 1 mol de compuesto (2a), y el ácido se diluyó con el disolvente

utilizado para la reacción hasta una concentración del 1 % al 50 % (v/v), preferentemente del 5 % al 10 % (v/v), y se utilizó una cantidad excesiva de moles, preferentemente de 5 mol a 15 mol, de la solución diluida. El tiempo de reacción es de 1 minuto a 3 horas, y preferentemente de 5 minutos a 30 minutos. Se añadió piridina a la mezcla de reacción para inactivarla. La cantidad de moles de piridina utilizada fue una cantidad suficiente para neutralizar el ácido utilizado, preferentemente de 2 mol a 10 mol, por 1 mol del ácido. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida para obtener un producto bruto (3a). El producto bruto (3a) se destiló azeotrópicamente de tres a cinco veces con acetonitrilo deshidratado. No se retiró todo el acetonitrilo tras la última destilación azeotrópica, y así se obtuvo una solución en acetonitrilo 0,01 M a 1 M del compuesto (3a). La solución de acetonitrilo obtenida se utilizó directamente en la etapa siguiente.

10 (Etapa A-3)

Esta etapa es una etapa de producción del compuesto de fórmula (5a) realizando secuencialmente una reacción de acoplamiento del compuesto de fórmula (3a) con el compuesto de fórmula (4a) y una reacción de sulfuración de la forma acoplada resultante usando una técnica conocida de química orgánica.

15 Antes del inicio de la reacción de esta etapa, el compuesto (4a) se destiló azeotrópicamente de tres a cinco veces con acetonitrilo deshidratado. No se retiró todo el acetonitrilo tras la última destilación azeotrópica, y así se preparó una solución en acetonitrilo 0,01 M a 1 M del compuesto (4a). A esta solución se le añadió un agente desecante (los tamices moleculares 3A o los tamices moleculares 4A en polvo o en gránulos), y la solución se almacenó hasta su uso en una atmósfera de nitrógeno o argón.

20 Se realizó una reacción de acoplamiento añadiendo el compuesto (4a) secado azeotrópicamente a la solución de acetonitrilo del compuesto (3a) a una temperatura de 5 °C a 35 °C. El tiempo de reacción es de 1 minuto a 24 horas, y preferentemente de 5 minutos a 6 horas. A continuación, se añadió a esta mezcla de reacción un agente sulfurante (N,N-dimetil-N'-(3-sulfaniliden-3H-1,2,4-ditiazol-5-il)metanoimidamida, 3H-1,2-benzoditiol-3-ona, etc.) para llevar a cabo una reacción de sulfuración. La cantidad de moles del agente sulfurante utilizado fue de 1 mol a 5 mol, preferentemente de 1 mol a 2 mol, por 1 mol de compuesto (3a). El tiempo de reacción es de 5 minutos a 24 horas, y preferentemente de 30 minutos a 6 horas. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida para obtener un producto bruto (5a). El producto bruto (5a) obtenido se utilizó directamente en la etapa siguiente.

(Etapa A-4)

Esta etapa es una etapa de producción del compuesto de fórmula (6a) mediante la eliminación de un grupo protector para un grupo hidroxilo del compuesto de fórmula (5a) usando una técnica conocida de química orgánica.

30 Cuando PRO¹ es un grupo 4,4'-dimetoxitritilo, el grupo 4,4'-dimetoxitritilo se eliminó tratando el compuesto del compuesto (5a) en un disolvente (diclorometano, cloroformo, dicloroetano, etc.) con agua y un ácido (ácido dicloroacético, ácido trifluoroacético, etc.) a una temperatura comprendida entre -10 °C y el punto de ebullición del disolvente utilizado para la reacción, preferentemente entre 15 °C y 35 °C. La cantidad de moles de agua utilizada fue una cantidad excesiva de moles, preferentemente de 10 a 20 mol, por 1 mol de compuesto (5a), y el ácido se diluyó con el disolvente utilizado para la reacción hasta una concentración del 1 % al 50 % (v/v), preferentemente del 5 % al 35 10 % (v/v), y se utilizó una cantidad excesiva de moles, preferentemente de 5 mol a 15 mol, de la solución diluida. El tiempo de reacción es de 1 minuto a 3 horas, y preferentemente de 5 minutos a 30 minutos. Se añadió piridina a la mezcla de reacción para inactivarla. La cantidad de moles de piridina utilizada fue una cantidad suficiente para neutralizar el ácido utilizado, preferentemente de 10 mol a 200 mol, por 1 mol del ácido. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida para obtener un producto bruto (6a). El producto bruto (6a) obtenido se utilizó directamente en la etapa siguiente.

(Etapa A-5)

45 Esta etapa es una etapa de producción del compuesto de fórmula (7a) realizando secuencialmente una reacción de ciclación y una reacción de sulfuración del compuesto de fórmula (6a) usando una técnica conocida de química orgánica.

El compuesto (6a) se disolvió en piridina, y el producto resultante se concentró a presión reducida para preparar una solución de piridina de 0,01 M a 0,5 M. Se realizó una reacción de ciclación añadiendo un agente de deshidratación-condensación (2-cloro-5,5-dimetil-1,3,2λ⁵-dioxafosfinan-2-ona, etc.) a esta solución en piridina a una temperatura de 5 °C a 35 °C. La cantidad de moles del agente de deshidratación-condensación utilizado fue de 1 mol a una cantidad 50 excesiva de moles, preferentemente de 3 mol a 5 mol, por 1 mol del compuesto (6a). El tiempo de reacción es de 1 minuto a 6 horas, y preferentemente de 5 minutos a 1 hora. A continuación, se llevó a cabo una reacción de sulfuración añadiendo agua y un agente sulfurante (3H-1,2-benzoditiol-3-ona, N,N-dimetil-N'-(3-sulfaniliden-3H-1,2,4-ditiazol-5-il)metanoimidamida, etc.) a esta mezcla de reacción. La cantidad de moles de agua utilizada fue una cantidad excesiva de moles, preferentemente de 30 mol a 50 mol, por 1 mol de compuesto (6a), y la del agente sulfurante utilizado fue de 1 mol a 5 mol, preferentemente de 1 mol a 2 mol, por 1 mol de compuesto (6a). El tiempo de reacción es de 5 55 minutos a 12 horas, y preferentemente de 30 minutos a 3 horas. La mezcla de reacción se añadió a una solución acuosa (de 0,1 M a 1 M) de hidrogenocarbonato de sodio, y el producto resultante se agitó durante un periodo de tiempo de 15 minutos a 24 horas para su inactivación. Tras someter la mezcla de reacción a extracción de una a cinco

veces con un disolvente orgánico (acetato de etilo, éter dietílico, tolueno o una mezcla de ambos), se reunieron los extractos y se secaron sobre una sal anhidra (sulfato de sodio anhidro o sulfato de magnesio anhidro). El agente desecante se eliminó por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [diclorometano/metanol, acetato de etilo/metanol, hexano/acetato de etilo, etc.], cromatografía en columna de gel de sílice C18 [tampón/acetonitrilo], o una combinación de las mismas para obtener el compuesto (7a) en forma de una mezcla de dos o más diastereómeros o dos o más diastereómeros puros. Aunque en muchos casos se obtienen dos diastereómeros en esta etapa, también pueden obtenerse uno o dos diastereómeros para algunos tipos de materias primas (1a) y (4a). Incluso cuando el compuesto (7a) obtenido está en forma de una mezcla de una pluralidad de diastereómeros, la mezcla puede utilizarse en la etapa siguiente sin más purificación.

(Etapa A-6)

Esta etapa es una etapa de producción del compuesto de fórmula (8a) eliminando simultáneamente un grupo cianoetilo y todos los grupos protectores de acilo del compuesto de fórmula (7a) usando una técnica conocida de química orgánica. Esta etapa se realizó en autoclave o en un tubo protector, según fuera necesario.

Cuando PRO⁴ es un grupo benzoilo, el grupo cianoetilo y el grupo benzoilo se eliminaron tratando el compuesto del compuesto (7a) en un disolvente (metanol, etanol, tetrahidrofurano, o un disolvente mixto de los mismos) con amoníaco líquido al 28 % (v/v) a una temperatura de entre 5 °C y el punto de ebullición del disolvente usado para la reacción. La cantidad de moles de amoníaco utilizada fue una cantidad excesiva de moles, preferentemente de 300 mol a 3000 mol, por 1 mol de compuesto (7a). El tiempo de reacción es de 30 minutos a 96 horas, y preferentemente de 2 horas a 48 horas. La mezcla de reacción se concentró, según fue necesario, y el residuo se purificó por HPLC preparativa [tampón/acetonitrilo, tampón/metanol, etc.], cromatografía en columna de gel de sílice C18 [tampón/acetonitrilo, tampón/metanol, etc.], o una combinación de las mismas, para obtener el compuesto (8a). Aunque el compuesto (8a) obtenido esté en forma de una mezcla de diastereómeros, la mezcla puede utilizarse en la etapa siguiente sin más purificación. En esta etapa, el compuesto (8a) puede utilizarse en la etapa siguiente sin purificación.

(Etapa A-7)

Esta etapa es una etapa de producción del compuesto de fórmula (9a) mediante la eliminación simultánea de todos los grupos protectores de sililo del compuesto de fórmula (8a) usando una técnica conocida de química orgánica.

Cuando PRO² y PRO³ son cada uno un grupo terc-butildimetilsililo, los grupos terc-butildimetilsililo se eliminan tratando directamente el compuesto (8a) con trifluorhidrato de trietilamina a una temperatura de 5 °C a 100 °C, preferentemente de 35 °C a 60 °C. La cantidad de moles de trifluorhidrato de trietilamina utilizada fue una cantidad excesiva de moles, preferentemente de 100 a 200 mol, por 1 mol de compuesto (8a). El tiempo de reacción es de 30 minutos a 24 horas, y preferentemente de 2 horas a 12 horas. Después de enfriar la mezcla de reacción hasta la temperatura ambiente, se vertió en pequeñas porciones una solución mixta enfriada en hielo de 3:1 a 10:1 (v/v) de una solución acuosa 1 M de hidrogenocarbonato de trietilamonio y trietilamina en la mezcla de reacción para inactivarla. Según sea necesario, la mezcla de reacción puede verse en una solución mixta enfriada con hielo de una solución acuosa 1 M de hidrogenocarbonato de trietilamonio y trietilamina. En este caso, el recipiente de reacción se lava con acetonitrilo y agua. La cantidad de moles de trietilamina que se va a utilizar es una cantidad suficiente para cambiar la condición de la mezcla de reacción a una condición débilmente básica, preferentemente aproximadamente 2 mol, por 1 mol de trifluorhidrato de trietilamina. Después de destilar a presión reducida el componente de disolvente orgánico de la mezcla de reacción, la solución acuosa restante se purificó por HPLC preparativa [tampón/acetonitrilo, tampón/metanol, etc.], cromatografía en columna de gel de sílice C18 [tampón/acetonitrilo, tampón/metanol, etc.], o una combinación de las mismas, para obtener el compuesto (9a) en forma de un único diastereómero.

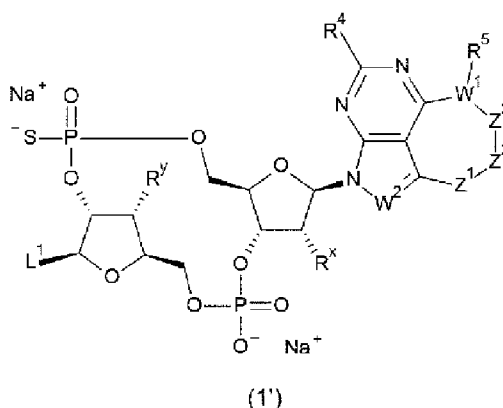
(Etapa A-8)

Esta etapa es una etapa de producción del compuesto de fórmula (1) por intercambio iónico del compuesto de fórmula (9a) usando una técnica conocida de química orgánica.

Se suspendió una resina de intercambio catiónico (resina BT AG (R) 50W-X2, malla 100-200, de tipo hidrógeno) en agua pura, y se rellenó con ella un cartucho de columna vacío. La cantidad de resina de intercambio catiónico utilizada fue de 10 a 50 veces mayor que la del compuesto (9a) en proporción ponderal. Después de dejar fluir gravitacionalmente hacia abajo la parte excesiva de agua pura, se dejó fluir gravitacionalmente hacia abajo un volumen de columna de 3 × de solución acuosa 1 M de hidróxido de sodio y, a continuación, se dejó fluir gravitacionalmente hacia abajo un volumen de columna de 6 × de agua pura. El compuesto (9a) se disolvió en un volumen de aproximadamente 3 × columna de agua pura, y se cargó en la columna. Si el compuesto se disuelve mal en agua pura, puede utilizarse una mezcla con una pequeña cantidad de un disolvente orgánico (acetonitrilo, metanol, etc.). La solución que se dejó fluir gravitacionalmente hacia abajo se separó y recogió, y a continuación se eluyó de nuevo con un volumen de columna de 6 × de agua pura, y las fracciones se separaron y recogieron. Las fracciones que contenían el producto deseado se reunieron y liofilizaron para dar el compuesto (1) en forma de un único diastereómero.

Esquema A'

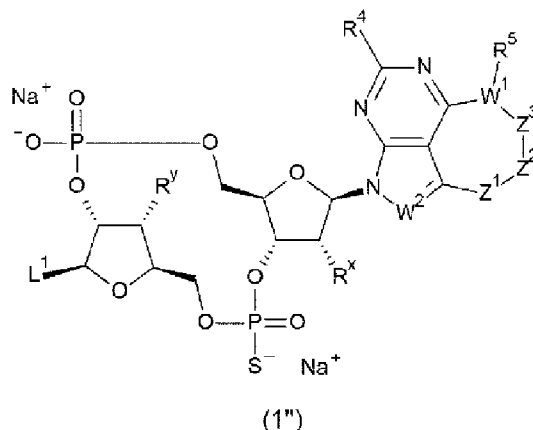
El derivado de CDN utilizado en la presente invención representado por (1') puede producirse de acuerdo con el esquema A' descrito a continuación.



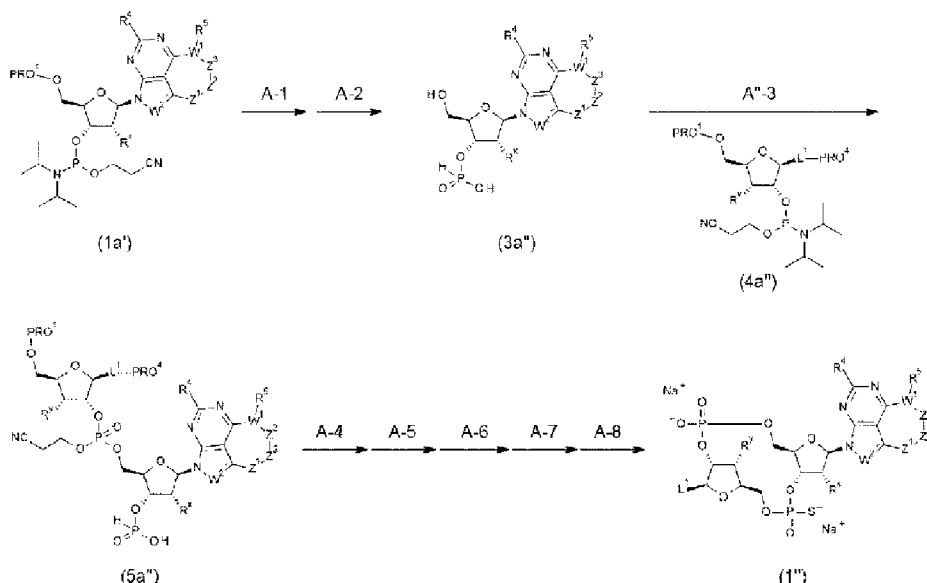
acetato de etilo/metanol, hexano/acetato de etilo, etc.], cromatografía en columna de gel de sílice C18 [tampón/acetonitrilo], o una combinación de las mismas, para obtener el compuesto (7a').

Esquema A''

El derivado de CDN utilizado en la presente invención representado por (1'') puede producirse de acuerdo con el esquema A'' descrito a continuación.



El presente procedimiento de producción es un procedimiento para producir el compuesto representado por la fórmula general (1''), siendo el procedimiento una forma parcialmente modificada del esquema A. Específicamente, el compuesto de fórmula general (1'') puede producirse con sustitución de la etapa A-3 del esquema A por la etapa A''-3 mostrada a continuación. Cuando los sustituyentes R^x y R^y son cada uno un átomo de halógeno, puede omitirse la etapa A-7.



(Etapa A''-3)

Esta etapa es una etapa de producción del compuesto de fórmula (5a'') realizando secuencialmente una reacción de acoplamiento del compuesto de fórmula (3a'') con el compuesto de fórmula (4a'') y una reacción de oxidación de la forma acoplada resultante usando una técnica conocida de química orgánica.

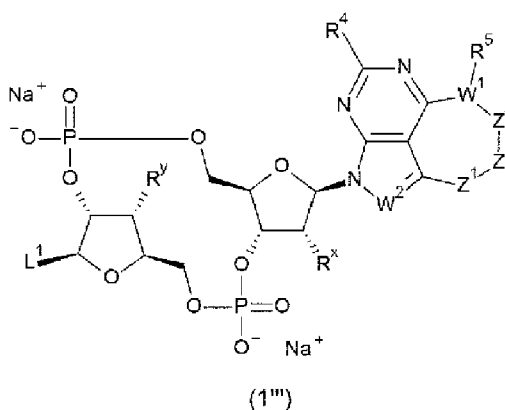
Antes del inicio de la reacción de esta etapa, el compuesto (4a'') se destiló azeotrópicamente de tres a cinco veces con acetonitrilo deshidratado. No se retiró todo el acetonitrilo tras el último procedimiento azeotrópico, y así se preparó una solución en acetonitrilo 0,01 M a 1 M del compuesto (4a''). A esta solución se le añadió un agente desecante (los tamices moleculares 3A o los tamices moleculares 4A en polvo o en gránulos), y la solución se almacenó hasta su uso en una atmósfera de nitrógeno o argón.

Se realizó una reacción de acoplamiento añadiendo la solución en acetonitrilo del compuesto secado azeotrópicamente (4a'') a la solución de acetonitrilo del compuesto (3a'') a una temperatura de 5 °C a 35 °C. El tiempo de reacción es de 1 minuto a 24 horas, y preferentemente de 5 minutos a 6 horas. A esta mezcla de reacción se le

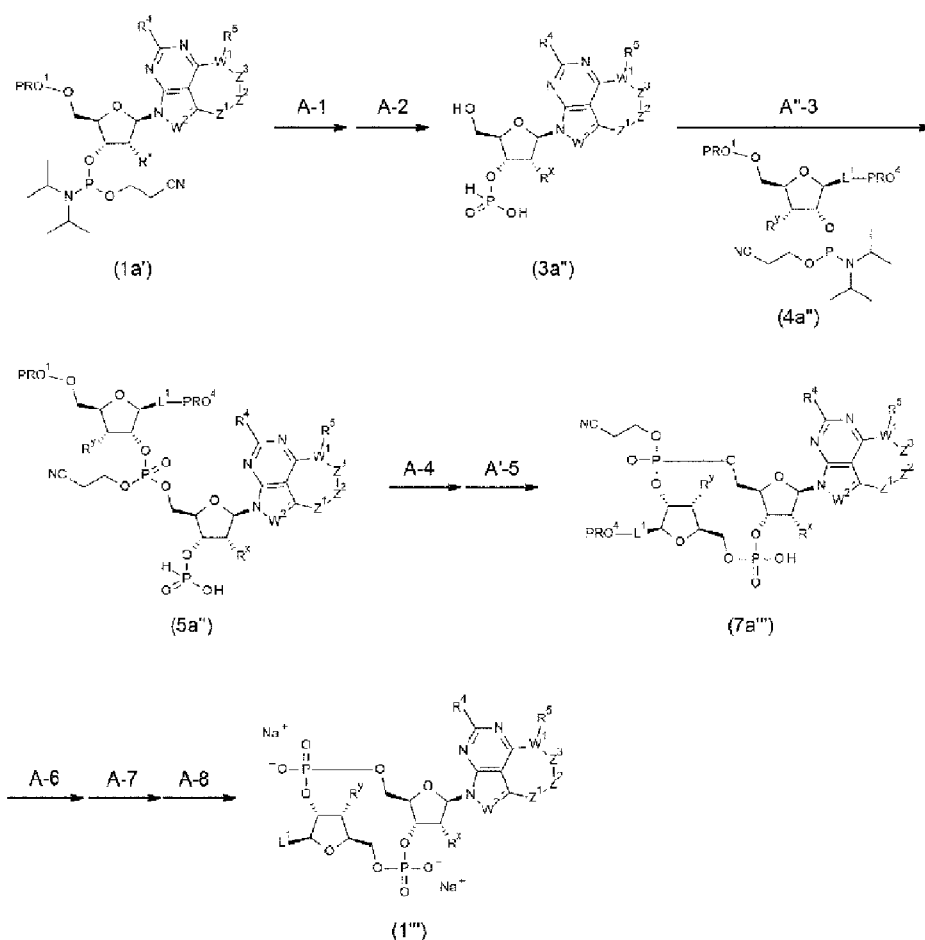
añadió a continuación un agente oxidante (hidroperóxido de terc-butilo, etc.) para llevar a cabo una reacción de oxidación. La cantidad de moles del agente oxidante utilizado fue de 1 mol a 5 mol, preferentemente de 2 mol a 3 mol, por 1 mol de compuesto (3a"). El tiempo de reacción es de 5 minutos a 24 horas, y preferentemente de 30 minutos a 6 horas. Se añadió una solución acuosa saturada de tiosulfato de sodio a la mezcla de reacción, y el producto resultante se agitó durante un periodo de tiempo comprendido entre 10 minutos y 12 horas para su inactivación. Después de someter la mezcla de reacción a extracción de una a cinco veces con un disolvente orgánico (un disolvente mixto de diclorometano y metanol, etc.), se reunieron los extractos y se secaron sobre una sal anhidra (sulfato de sodio anhidro o sulfato de magnesio anhidro). El agente desecante se eliminó por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida para obtener un producto bruto (5a"). El producto bruto (5a") obtenido se envió directamente a la etapa siguiente.

Esquema A'''

El derivado de CDN utilizado en la presente invención representado por (1''') puede producirse de acuerdo con el esquema A''' descrito a continuación.

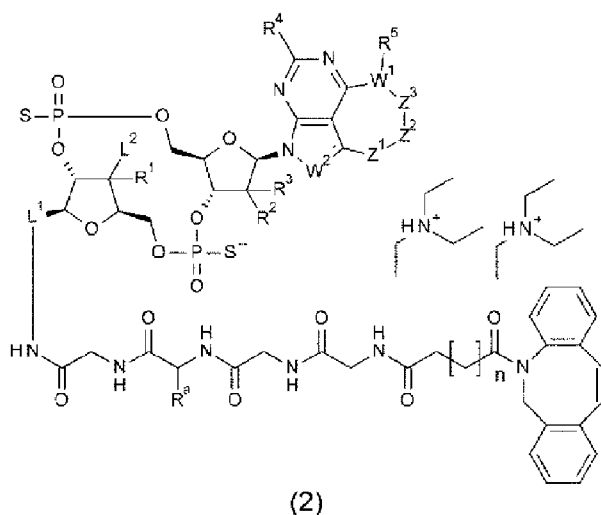


El presente procedimiento de producción es un procedimiento para producir el compuesto representado por la fórmula general (1'''), siendo el procedimiento una forma parcialmente modificada del esquema A. Específicamente, el compuesto de fórmula general (1''') puede producirse sustituyendo la etapa A-3 y la etapa A-5 del esquema A respectivamente por la etapa A'-3 y la etapa A'-5. Cuando los sustituyentes R^x y R^y son cada uno un átomo de halógeno, puede omitirse la etapa A-7.

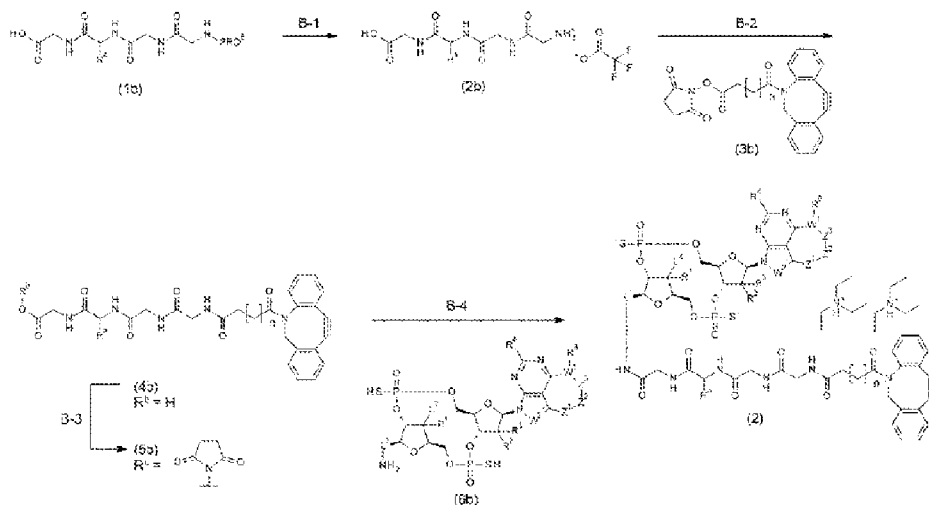


Esquema B: Precursor del conjugado (conjugación con glucano)

El precursor del conjugado representado por (2) puede producirse de acuerdo con el esquema B descrito a continuación.



El presente procedimiento de producción es un procedimiento para producir el precursor del conjugado (2) cuando L¹ está sustituido con -NH₂ en cualquier posición.



(Etapa B-1)

Esta etapa es una etapa de producción del compuesto de fórmula (2b) mediante la eliminación de un grupo protector del compuesto de fórmula (1b) usando una técnica conocida de química orgánica.

- 5 Cuando PRO⁵ es un grupo terc-butiloxycarbonilo, el grupo protector se eliminó tratando el compuesto (1b) en un disolvente (diclorometano, dioxano, acetonitrilo, acetato de etilo, tetrahidrofurano, o una mezcla de estos disolventes) con ácido trifluoroacético a una temperatura comprendida entre -10 °C y el punto de ebullición del disolvente utilizado para la reacción, preferentemente entre 15 °C y 35 °C. La cantidad de moles de ácido trifluoroacético utilizada fue una cantidad excesiva de moles, preferentemente de 20 mol a 50 mol, por 1 mol de compuesto (1b). El tiempo de reacción es de 5 minutos a 24 horas, y preferentemente de 30 minutos a 6 horas. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida, se suspendió en tolueno y la suspensión resultante se concentró de nuevo a presión reducida. Este procedimiento se repitió de dos a cinco veces. Se añadió un disolvente (éter dietílico, éter diisopropílico, hexano, diclorometano, acetato de etilo, o una mezcla de disolventes de los mismos) para fabricar una pasta, y el sólido se recogió por filtración para obtener un producto bruto (2b). El producto bruto (2b) se utilizó en la etapa siguiente sin más purificación.
- 10
- 15

(Etapa B-2)

Esta etapa es una etapa de producción del compuesto de fórmula (4b) realizando una amidación del compuesto de fórmula (2b) con el compuesto de fórmula (3b) usando una técnica conocida de química orgánica.

- 20 La amidación se realizó haciendo reaccionar el compuesto (2b) en un disolvente (N,N-dimetilformamida, N-metilpirrolidona, N,N-dimetilacetamida, acetonitrilo, etc.) con una base (triethylamina, N,N-diisopropiletilamina, etc.) y el compuesto (3b) a una temperatura de 5 °C a 35 °C. La cantidad de moles de la base utilizada fue de 1 mol a 5 mol por 1 mol de compuesto (2b), y la del compuesto (3b) utilizada fue de 0,5 mol a 1,5 mol por 1 mol de compuesto (2b). El tiempo de reacción es de 10 minutos a 72 horas, y preferentemente de 1 hora a 24 horas. La mezcla de reacción se vertió en una mezcla de dos capas de un disolvente orgánico (diclorometano, cloroformo, acetato de etilo, metanol, o una mezcla de disolventes de los mismos) y agua o una solución acuosa ácida (ácido clorhídrico 0,1 a 1 M, solución acuosa de ácido cítrico, etc.), y el producto resultante se sometió a extracción de una a cinco veces con el disolvente orgánico. Los extractos se reunieron, se lavaron con salmuera y se separaron sobre una sal anhidra (sulfato de sodio anhidro o sulfato magnésico anhidro). El agente desecante se eliminó por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida. Como alternativa, la mezcla de reacción puede concentrarse directamente a presión reducida, omitiendo el procedimiento de separación de líquidos, y utilizarse en la posterior purificación en columna de gel de sílice. El residuo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [diclorometano/metanol, acetato de etilo/metanol, etc.] para obtener el compuesto (4b). Según sea necesario, la pureza del compuesto (4b) puede aumentarse disolviendo el compuesto (4b) en un buen disolvente (acetato de etilo, acetonitrilo, diclorometano, metanol, o una mezcla de disolventes de los mismos), volviendo a precipitar el compuesto (4b) con la adición de un mal disolvente (éter dietílico, éter diisopropílico, hexano, etc.), y recogiendo el sólido por filtración.
- 25
- 30
- 35

(Etapa B-3)

Esta etapa es una etapa de producción del compuesto de fórmula (5b) realizando la esterificación del compuesto de fórmula (4b) usando una técnica conocida de química orgánica.

- 40 La esterificación se llevó a cabo haciendo reaccionar el compuesto (4b) en un disolvente (N,N-dimetilformamida, N,N-dimetilacetamida, N-metilpirrolidona, acetonitrilo, etc.) con N-hidroxisuccinimida y un agente condensador (clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida, etc.) a una temperatura de 5 °C a 35 °C. La cantidad de moles de N-hidroxisuccinimida utilizada y la del agente condensador utilizado fueron cada una de 1 mol a 3 mol por 1 mol de

compuesto (4b). El tiempo de reacción es de 30 minutos a 72 horas, y preferentemente de 2 horas a 24 horas. La mezcla de reacción se diluyó con un disolvente orgánico (diclorometano, cloroformo, acetato de etilo o una mezcla de ambos) y se lavó de tres a cinco veces con agua helada. La capa orgánica se secó con una sal anhidra (sulfato de sodio anhidro o sulfato de magnesio anhidro). El agente desecante se eliminó por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida para obtener un producto bruto (5b). Según sea necesario, el compuesto (5b) obtenido puede purificarse mediante cromatografía en columna de gel de sílice C18 [sólo acetonitrilo]. La pureza del compuesto (5b) obtenido puede aumentarse disolviendo el compuesto (5b) en un buen disolvente (acetato de etilo, acetonitrilo, diclorometano o una mezcla de ellos), volviendo a precipitar el compuesto (5b) con la adición de un mal disolvente (éter dietílico, éter diisopropílico, hexano, etc.) y recogiendo el sólido por filtración.

(Etapa B-4)

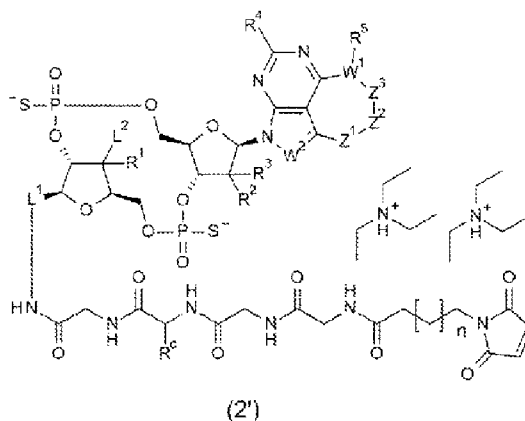
Esta etapa es una etapa de producción del compuesto de fórmula (2) realizando una reacción de condensación del compuesto de fórmula (5b) con el compuesto de fórmula (6b) usando una técnica conocida de química orgánica.

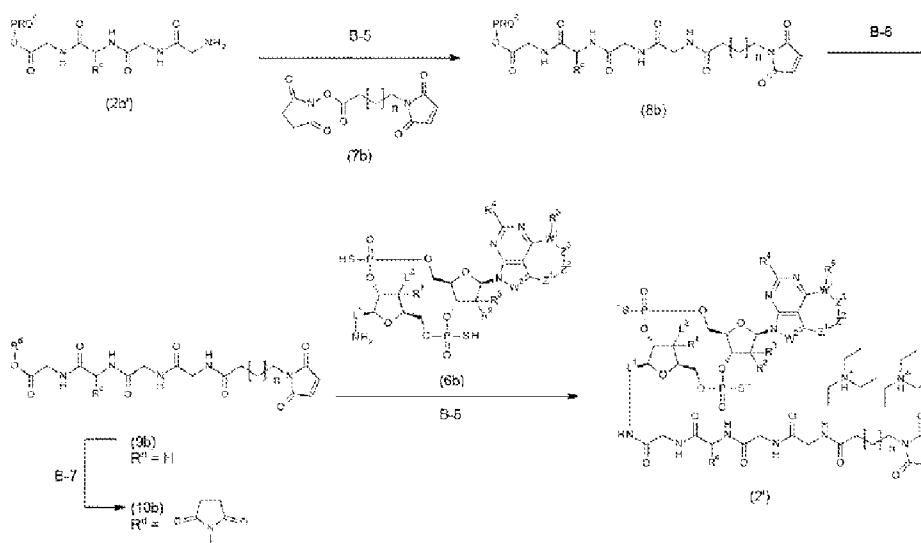
Se llevó a cabo una reacción de condensación haciendo reaccionar el compuesto (6b) en un disolvente (N,N-dimetilformamida, N,N-dimetilacetamida, N-metilpirrolidona, acetonitrilo, etc.) con una base (triethylamina, N,N-diisopropyletilamina, etc.) y el compuesto (5b) a una temperatura de -10 °C a 100 °C, preferentemente de 15 °C a 35 °C. La cantidad de moles de la base utilizada fue de 2 mol a 5 mol por 1 mol de compuesto (6b), y la del compuesto (5b) utilizada fue de 1 mol a 2 mol por 1 mol de compuesto (6b). El tiempo de reacción es de 5 minutos a 24 horas, y preferentemente de 1 hora a 6 horas. Se añadió bencilamina a la mezcla de reacción para inactivarla. La cantidad de moles de bencilamina utilizada fue de 4 mol a 10 mol por 1 mol de compuesto (6b). La mezcla de reacción se concentró parcialmente a presión reducida, según fue necesario, y la solución restante se purificó por HPLC preparativa [tampón/acetonitrilo, tampón/metanol, etc.], cromatografía en columna de gel de sílice C18 [tampón/acetonitrilo, tampón/metanol, etc.], o una combinación de las mismas para obtener el compuesto (2).

Esquema B': Precursor del conjugado (conjugación con cisteína)

Esquema B'

El precursor del conjugado representado por (2') puede producirse de acuerdo con el esquema B' descrito a continuación.





(Etapa B-5)

Esta etapa es una etapa de producción del compuesto de fórmula (8b) realizando una amidación del compuesto de fórmula (2b') con el compuesto de fórmula (7b) usando una técnica conocida de química orgánica. El compuesto (8b) se obtuvo de acuerdo con el procedimiento descrito en la etapa B-2 del esquema B, excepto que no se utilizó ninguna base.

(Etapa B-6)

Esta etapa es una etapa de producción del compuesto de fórmula (9b) mediante la eliminación de un grupo protector del compuesto de fórmula (8b) usando una técnica conocida de química orgánica. El compuesto (9b) se obtuvo de acuerdo con el procedimiento descrito en la etapa B-1 del esquema B, excepto que cuando PRO⁶ es un grupo terc-butilo, se usó una cromatografía en columna de gel de sílice [diclorometano/metanol] en el procedimiento de purificación.

(Etapa B-7)

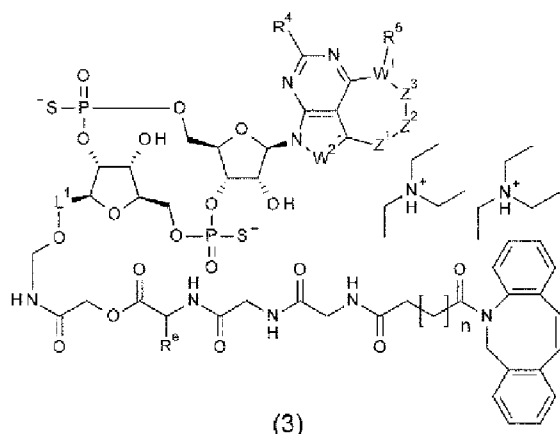
Esta etapa es una etapa de producción del compuesto de fórmula (10b) realizando la esterificación del compuesto de fórmula (9b) usando una técnica conocida de química orgánica. El compuesto (10b) se obtuvo de acuerdo con el procedimiento descrito en la etapa B-3 del esquema B.

(Etapa B-8)

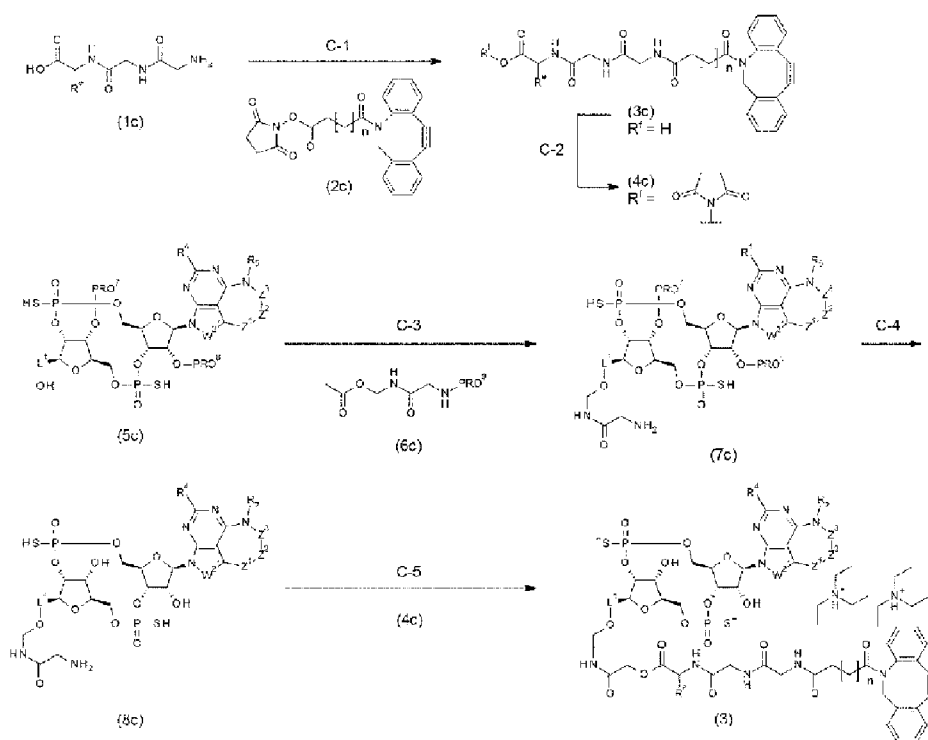
Esta etapa es una etapa de producción del compuesto de fórmula (2') realizando una reacción de condensación del compuesto de fórmula (6b) con el compuesto de fórmula (10b) usando una técnica conocida de química orgánica. El compuesto (2') se obtuvo de acuerdo con el procedimiento descrito en la etapa B-4 del esquema B.

Esquema C

El precursor del conjugado representado por (3) puede producirse de acuerdo con el esquema C descrito a continuación.



El presente procedimiento de producción es un procedimiento para producir el precursor del conjugado (3) cuando L¹ está sustituido con un grupo hidroxilo en cualquier posición.



(Etapa C-1)

- 5 Esta etapa es una etapa de producción del compuesto de fórmula (3c) realizando una amidación del compuesto de fórmula (1c) con el compuesto de fórmula (2c) usando una técnica conocida de química orgánica. El compuesto (3c) se obtuvo de acuerdo con el procedimiento descrito en la etapa B-2 del esquema B.

(Etapa C-2)

- 10 Esta etapa es una etapa de producción del compuesto de fórmula (4c) realizando la esterificación del compuesto de fórmula (3c) usando una técnica conocida de química orgánica. El compuesto (4c) se obtuvo de acuerdo con el procedimiento descrito en la etapa B-3 del esquema B.

(Etapa C-3)

- 15 Esta etapa es una etapa de producción del compuesto de fórmula (7c) realizando secuencialmente una reacción de acoplamiento (aminometilación) del compuesto de fórmula (5c) con el compuesto de fórmula (6c) y una desprotección de la forma acoplada resultante usando una técnica conocida de química orgánica.

- 20 Cuando PRO⁹ es un grupo 9-fluorenilmetiloxycarbonilo, la aminometilación se realizó haciendo reaccionar el compuesto (5c) en tetrahidrofurano con el compuesto (6c) y un ácido (ácido p-toluenosulfónico, etc.) a una temperatura de 5 °C a 35 °C. La cantidad de moles de compuesto (6c) utilizada fue de 1 mol a 20 mol, preferentemente de 2 mol a 10 mol, por 1 mol de compuesto (5c), y la del ácido utilizado fue de 0,05 mol a una cantidad excesiva de moles, preferentemente de 0,1 mol a 3 mol, por 1 mol de compuesto (5c). El tiempo de reacción es de 30 minutos a 72 horas, y preferentemente de 2 horas a 24 horas. Posteriormente, se procedió a la desprotección añadiendo una base (1,8-diazabicyclo[5.4.0]-7-undeceno, etc.) a la mezcla de reacción. Cuando la mezcla de reacción contiene una suspensión, puede añadirse además un disolvente (N,N-dimetilformamida, etc.) para disolver la suspensión, según sea necesario, antes de la reacción. La cantidad de moles de la base utilizada fue una cantidad excesiva de moles, preferentemente de 5 mol a 20 mol, por 1 mol de compuesto (5c). El tiempo de reacción es de 10 minutos a 24 horas, y preferentemente de 2 horas a 12 horas. Se añadió agua a la mezcla de reacción, y el producto resultante se purificó directamente mediante cromatografía en columna de gel de sílice C18 [tampón/acetonitrilo, etc.] para obtener el compuesto (7c).

(Etapa C-4)

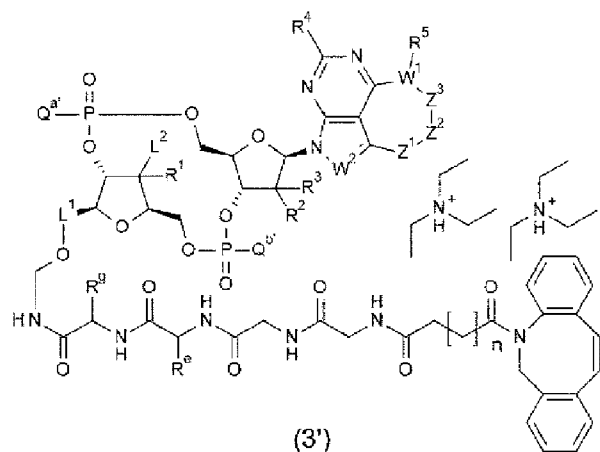
- 30 Esta etapa es una etapa de producción del compuesto de fórmula (8c) mediante la eliminación de los grupos protectores del compuesto de fórmula (7c) usando una técnica conocida de química orgánica. Cuando PRO⁷ y PRO⁸ son cada uno un grupo terc-butildimetilsililo, se obtuvo el compuesto (8c) de acuerdo con el procedimiento descrito en la etapa A-7 del esquema A.

(Etapa C-5)

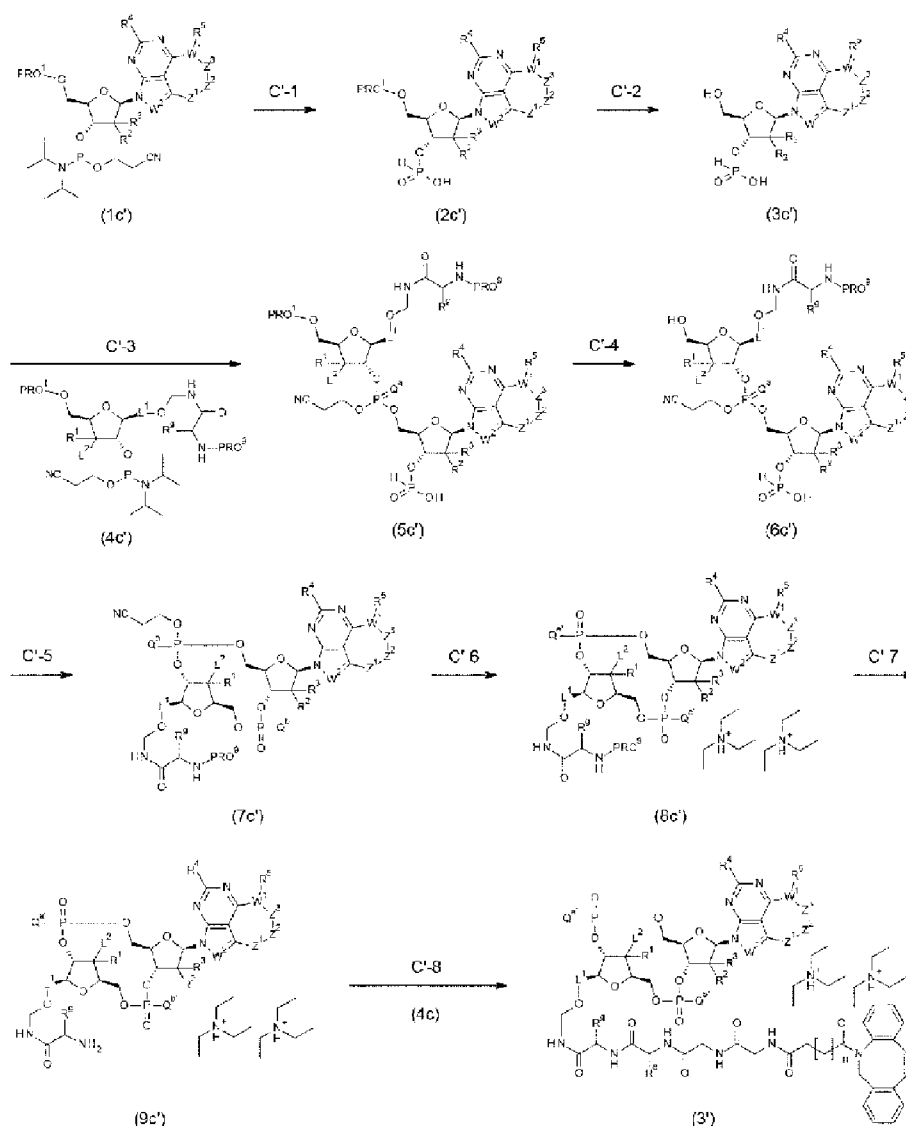
Esta etapa es una etapa de producción del compuesto de fórmula (3) realizando una reacción de condensación del compuesto de fórmula (8c) con el compuesto de fórmula (4c) usando una técnica conocida de química orgánica. El compuesto (3) se obtuvo de acuerdo con el procedimiento descrito en la etapa B-4 del esquema B.

5 Esquema C'

El precursor del conjugado de la presente invención representado por (3') puede producirse de acuerdo con el esquema C' descrito a continuación.



- 10 El presente procedimiento de producción es un procedimiento para producir precursor del conjugado (3') cuando L¹ está sustituido con un grupo hidroxilo en cualquier posición.



(Etapa C'-1)

Esta etapa es una etapa de producción del compuesto de fórmula (2c') realizando secuencialmente una reacción de hidrólisis del compuesto de fórmula (1c') y la eliminación de un grupo cianoetilo del producto resultante usando una

(Etapa C'-2)

Esta etapa es una etapa de producción del compuesto de fórmula (3c') mediante la eliminación de un grupo protector para un grupo hidroxilo del compuesto (2c') usando una técnica conocida de química orgánica. El compuesto (3c') se

(Etapa C'-3)

Esta etapa es una etapa de producción del compuesto de fórmula (5c') realizando secuencialmente una reacción de acoplamiento del compuesto de fórmula (3c') con el compuesto de fórmula (4c') y una reacción de sulfuración o reacción de oxidación de la forma acoplada resultante usando una técnica conocida de química orgánica. El

(Etapa C'-4)

Esta etapa es una etapa de producción del compuesto de fórmula (6c') mediante la eliminación de un grupo protector para un grupo hidroxilo del compuesto de fórmula (5c') usando una técnica conocida de química orgánica. El compuesto

(Etapa C'-5)

Esta etapa es una etapa de producción del compuesto de fórmula (7c') realizando secuencialmente una reacción de ciclación del compuesto de fórmula (6c') y una reacción de sulfuración o reacción de oxidación del producto resultante usando una técnica conocida de química orgánica. El compuesto (7c') se obtuvo de acuerdo con el procedimiento descrito en la etapa A-5 del esquema A o en la etapa A'-5 del esquema A'.

(Etapa C'-6)

Esta etapa es una etapa de producción del compuesto de fórmula (8c') eliminando simultáneamente un grupo cianoetilo y todos los grupos protectores de acilo del compuesto de fórmula (7c') usando una técnica conocida de química orgánica. El compuesto (8c') se obtuvo de acuerdo con el procedimiento descrito en la etapa A-6 del esquema A.

(Etapa C'-7)

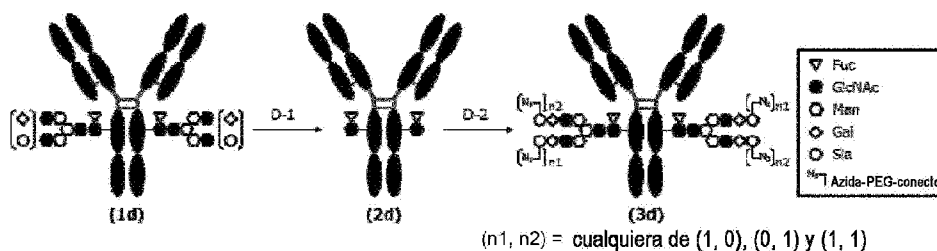
Esta etapa es una etapa de producción del compuesto de fórmula (9c') mediante la eliminación simultánea de todos los grupos protectores de sililo del compuesto de fórmula (8c') usando una técnica conocida de química orgánica. Cuando PRO⁹ es un grupo 2-(trimetilsilil)etoxicarbonilo, el grupo 2-(trimetilsilil)etoxicarbonilo se eliminó tratando el compuesto (8c') con una solución en tetrahidrofurano de fluoruro de tetrabutilamonio a una temperatura de 5 °C a 100 °C, preferentemente de 35 °C a 60 °C. La cantidad de moles de fluoruro de tetrabutilamonio utilizada fue una cantidad excesiva de moles, preferentemente de 10 a 30 mol, por 1 mol de compuesto (8c'). El tiempo de reacción es de 1 hora a 48 horas, y preferentemente de 4 horas a 24 horas. Después de diluir la mezcla de reacción añadiéndole tampón, se destiló el componente de disolvente orgánico a presión reducida, según fuera necesario. El residuo se purificó por HPLC preparativa [tampón/acetonitrilo, tampón/metanol, etc.], cromatografía en columna de gel de sílice C18 [tampón/acetonitrilo, tampón/metanol, etc.], o una combinación de las mismas, para obtener el compuesto (9c').

(Etapa C'-8)

Esta etapa es una etapa de producción del compuesto de fórmula (3') realizando una reacción de condensación del compuesto de fórmula (9c') con el compuesto de fórmula (4c) usando una técnica conocida de química orgánica. El compuesto (3') se obtuvo de acuerdo con el procedimiento descrito en la etapa B-4 del esquema B.

Esquema D: Producción de anticuerpos con glucanos remodelados

Los anticuerpos con glucanos remodelados pueden producirse utilizando un procedimiento mostrado en la siguiente fórmula, por ejemplo, basándose en un procedimiento descrito en el documento WO 2018/003983.



(Etapa D-1)

Esta etapa es una etapa de producción de un anticuerpo con glucano truncado escindiendo hidrolíticamente el enlace glucosídico en GlcNAc β 1-4GlcNAc de la estructura de quitobiosa en un extremo reductor del glucano enlazado a N que se une a asparagina en la posición 297 de la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo diana (glucano enlazado a N297) usando una reacción enzimática conocida.

El anticuerpo deseado (1d) (10 mg/ml) en tampón (por ejemplo, tampón fosfato) se sometió a una reacción de hidrólisis del enlace glucosídico entre GlcNAc β 1 y 4GlcNAc en la estructura de quitobiosa en un extremo reductor usando una hidrolasa, tal como la enzima EndoS de tipo salvaje, a una temperatura de 0 °C a 40 °C. El tiempo de reacción es de 10 minutos a 72 horas, y preferentemente de 1 hora a 6 horas. La cantidad de la enzima EndoS de tipo salvaje utilizada fue de 0,1 a 10 mg, preferentemente de 0,1 a 3 mg, por 100 mg de anticuerpo (1d). Una vez completada la reacción, el producto resultante se purificó mediante cromatografía de afinidad (HiTrap rProtein A FF (5 ml) (producido por GE Healthcare)) y/o una columna de hidroxapatita (cartucho Bio-Scale Mini CHT de tipo I (5 ml) (producido por Bio-Rad Laboratories, Inc.)) para obtener el anticuerpo (Fuc α 1,6)GlcNAc (2d).

(Etapa D-2)

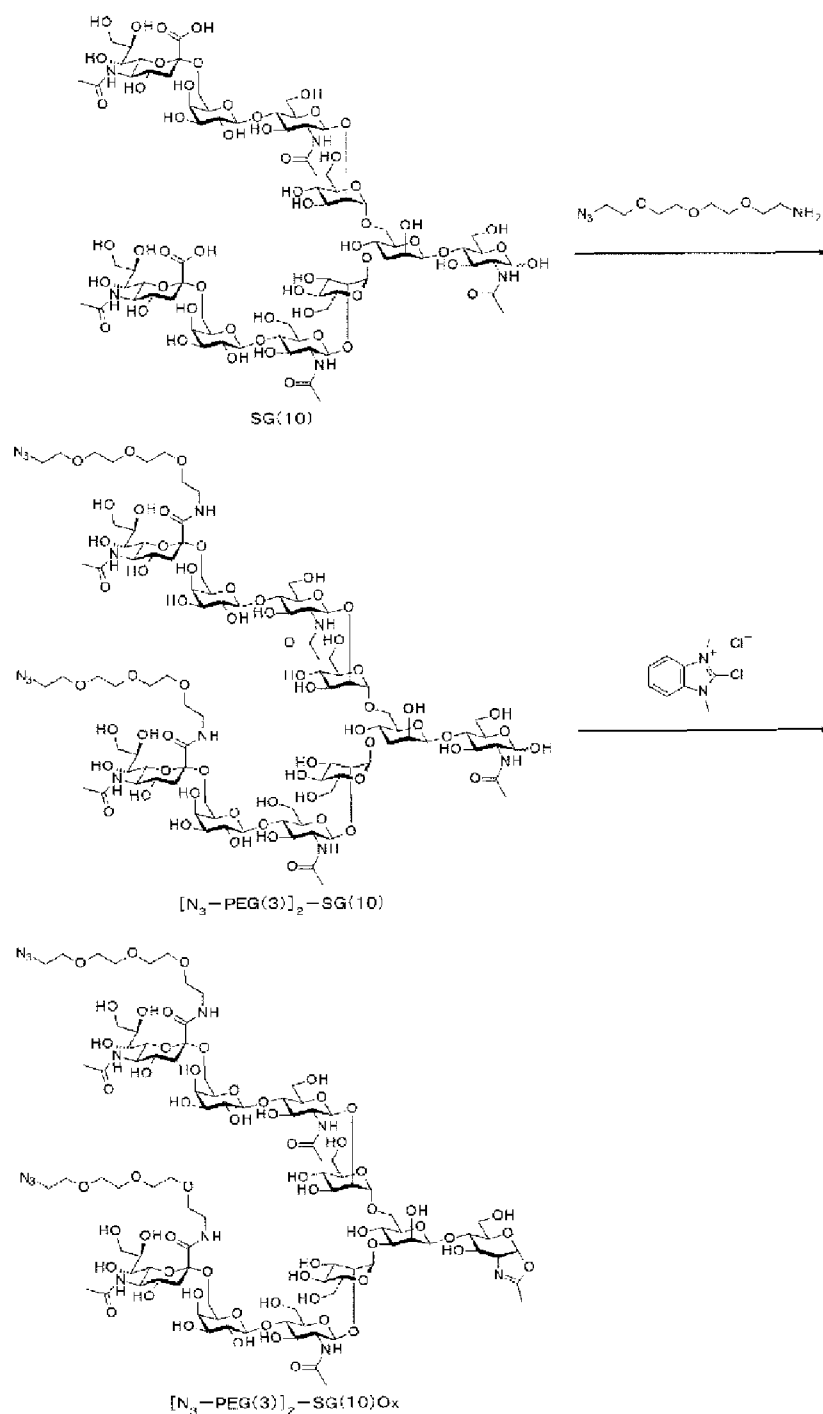
Esta etapa es una etapa de producción de un anticuerpo con glucano remodelado (3d) uniendo una forma de oxazolina de glucano de tipo SG o MSG (MSG1, MSG2) (en lo sucesivo, denominada "forma de oxazolina de glucano con azida")

que tiene un conector PEG que incluye un grupo azida al anticuerpo (2d) (Fucα1,6)GlcNAc obtenido en la etapa D-1 utilizando una reacción enzimática conocida.

- 5 El anticuerpo (2d) en tampón (por ejemplo, tampón fosfato) se sometió a una reacción de transglucosilación por reacción con una forma de oxazolina de glucano con azida en presencia de glucosiltransferasa, tal como EndoS (D233Q/Q303L), a una temperatura de 0 °C a 40 °C. El tiempo de reacción es de 10 minutos a 72 horas, y preferentemente de 1 hora a 6 horas. La cantidad de la enzima EndoS (D233Q/Q303L) utilizada fue de 1 a 10 mg, preferentemente de 1 a 3 mg, por 100 mg del anticuerpo, y la de la forma de oxazolina de glucano con azida utilizada fue de 2 equivalentes a un equivalente excesivo, preferentemente de 4 equivalentes a 20 equivalentes. Una vez completada la reacción, el producto resultante se purificó mediante cromatografía de afinidad (HiTrap rProtein A FF (5 ml) (fabricado por GE Healthcare)) y/o una columna de hidroxipatita (cartucho Bio-Scale Mini CHT de tipo I (5 ml) (fabricado por Bio-Rad Laboratories, Inc.)) para obtener el anticuerpo con glucano remodelado (3d).

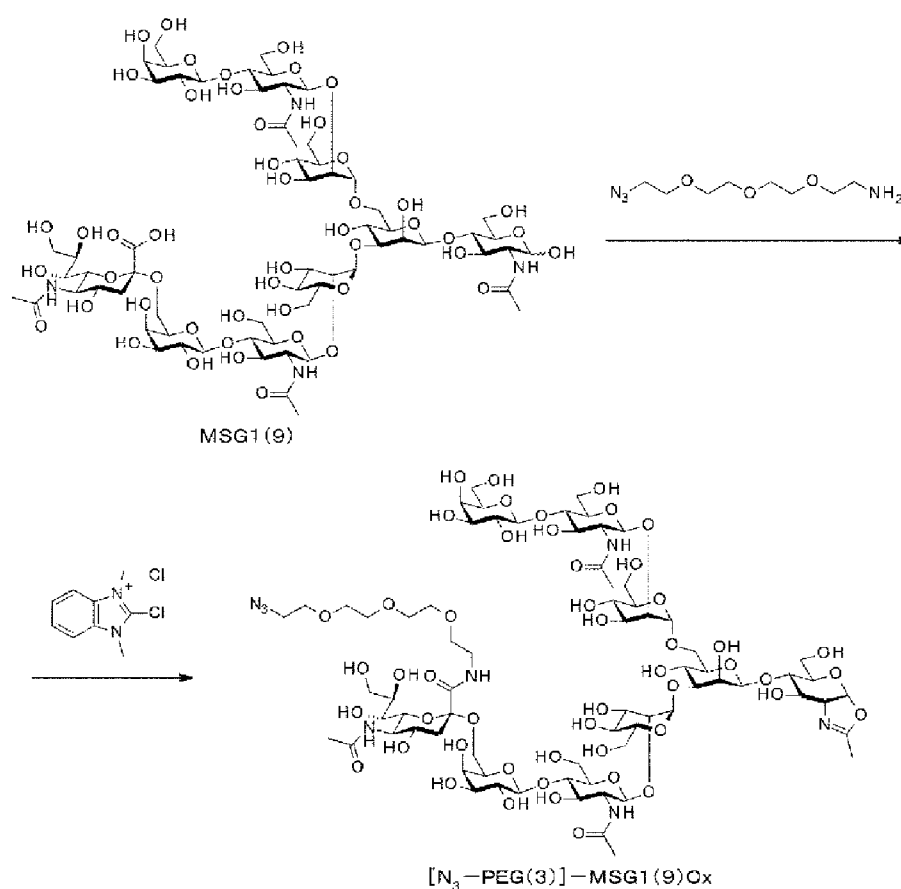
En la preparación del anticuerpo con glucano remodelado, la concentración de una solución acuosa de un anticuerpo, la medición de la concentración y el intercambio de tampón pueden realizarse de acuerdo con los procedimientos comunes A a C descritos más adelante.

- 15 Se sintetizó una forma de oxazolina de glucano con azida de tipo SG basándose en un procedimiento descrito en el documento WO 2018/003983. A modo de ejemplo, un procedimiento para sintetizar $[N_3\text{-PEG}(3)]_2\text{-SG}(10)\text{-Ox}$ (compuesto 1-10 descrito en el documento WO 2018/003983) se muestra en la siguiente fórmula:

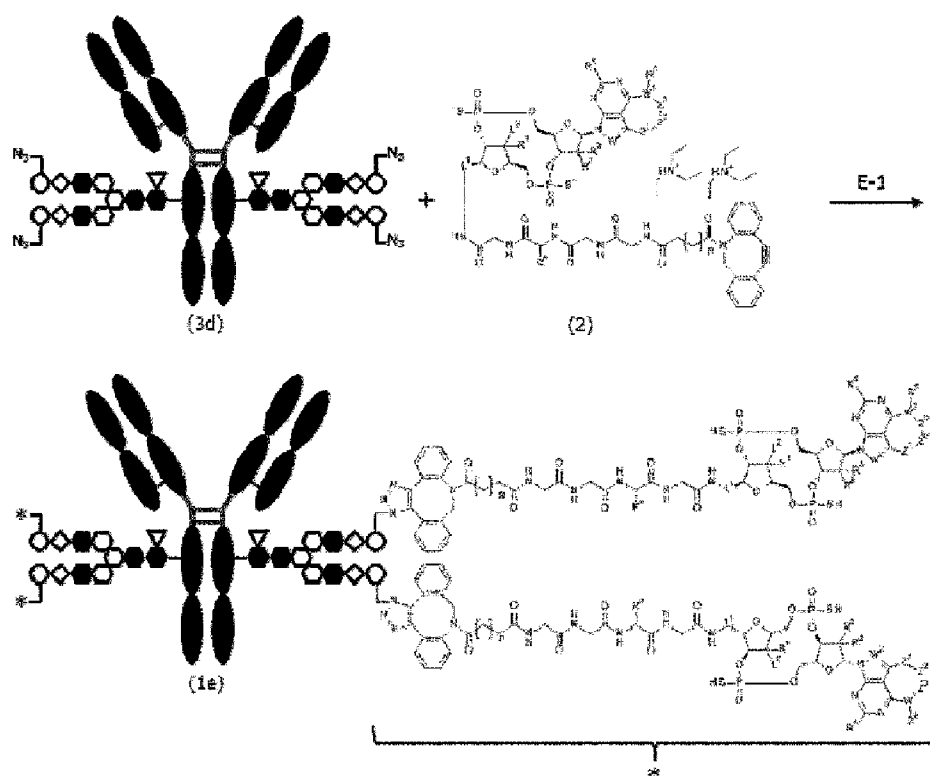


De manera similar, se sintetizó una forma de oxazolina de glucano con azida de tipo MSG basándose en un procedimiento descrito en el documento WO 2018/003983. A modo de ejemplo, un procedimiento para sintetizar [N₃-PEG(3)]-MSG1(9)-Ox (compuesto 1-11 descrito en el documento WO 2018/003983) se muestra en la siguiente fórmula:

5



Esquema E: Conjugación de anticuerpo y fármaco (conjugación con glucano 1)



En la fórmula, los dos asteriscos (*) en el lado izquierdo del conjugado de anticuerpo-fármaco (1e) indican el resto fármaco-conector especificado por el asterisco en el lado derecho.

El presente procedimiento de producción es un procedimiento para producir un conjugado de anticuerpo-fármaco (1e) mediante la unión de anticuerpos con glucano remodelado (3d) obtenido en la etapa D-2 del esquema D y el precursor del conjugado (2) obtenido en la etapa B-4 del esquema B mediante una reacción de SPAAC ("strain-promoted azide-alkyne cycloaddition", cicloadición de azida-alqueno estimulada por tensión: J. Am. Chem. Soc., 2004, 126, 15046-15047).

(Etapa E-1)

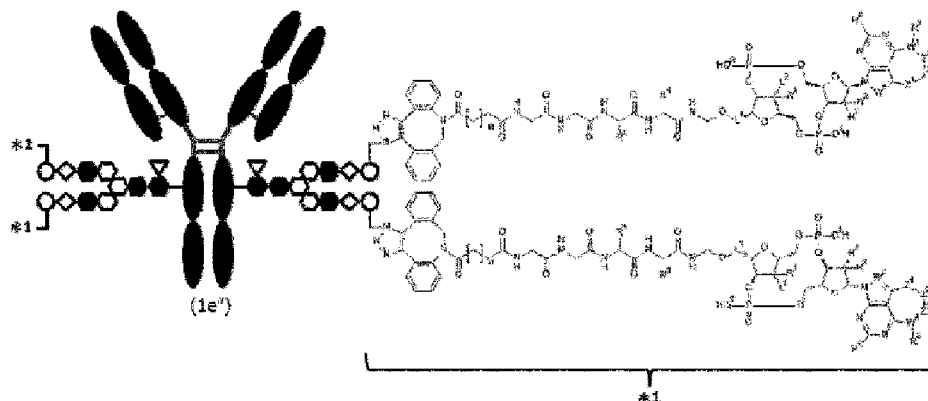
La reacción SPAAC se realizó mezclando una solución tampón (tampón fosfato, tampón acetato, tampón borato, etc.) de anticuerpos con glucano remodelado (3d) y una solución del precursor del conjugado (2) disuelto en un disolvente apropiado (dimetilsulfóxido, N,N-dimetilformamida, N,N-dimetilacetamida, N-metilpirrolidona, propilenglicol, o un disolvente mixto de los mismos). La cantidad de moles del precursor del conjugado (2) es de 2 mol a una cantidad excesiva de moles, preferentemente de 4 mol a 30 mol, por 1 mol de anticuerpo (3d) con un glucano remodelado, y la proporción del disolvente orgánico es preferentemente del 1 % al 200 % (v/v) sobre la solución tampón del anticuerpo. La temperatura de reacción es de 0 °C a 37 °C, y preferentemente de 15 °C a 25 °C, y el tiempo de reacción es de 1 hora a 150 horas, y preferentemente de 6 horas a 72 horas. El pH de la mezcla de reacción es preferentemente de 5 a 9. La mezcla de reacción se purificó de acuerdo con un procedimiento descrito más adelante en el procedimiento común D para obtener el conjugado de anticuerpo-fármaco (1e).

Esquema E': Conjugación de anticuerpo y fármaco (conjugación con cisteína)

El conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente invención con conjugación de cisteína puede producirse, por ejemplo, basándose en un procedimiento descrito en el documento WO 2014/057687, usando un anticuerpo diana preparado, por ejemplo, de acuerdo con el ejemplo de referencia 1 y el precursor del conjugado (2') que tiene un grupo maleimida obtenido en la etapa B-8 del esquema B'.

Esquema E'': Conjugación de anticuerpo y fármaco (conjugación con glucano 2)

Con la sustitución del precursor del conjugado (2) por el precursor del conjugado (3') obtenido en la etapa C'-8 del esquema C', se obtuvo el conjugado de anticuerpo-fármaco (1e'') mostrado en la siguiente fórmula:



En la fórmula, los dos asteriscos (*) en el lado izquierdo del conjugado de anticuerpo-fármaco (1e'') indican el resto fármaco-conector especificado por el asterisco en el lado derecho.

Los conjugados de anticuerpo-fármaco pueden identificarse entre sí mediante intercambio de tampón, purificación, medición de la concentración de anticuerpo y medición del número promedio de moléculas de fármaco conjugado por molécula de anticuerpo de acuerdo con los procedimientos comunes D a G descritos más adelante.

Procedimiento común A: Concentración de una solución acuosa de anticuerpo

Se introdujo una solución de un anticuerpo o conjugado de anticuerpo-fármaco en un dispositivo de filtro de ultracentrifuga Amicon (R) (50.000 NMWL, Merck Millipore Ltd.), y la solución de un anticuerpo o conjugado de anticuerpo-fármaco se concentró mediante un procedimiento de centrifugación (centrifugación de 2000 G a 4000 G durante 5 a 20 minutos) usando una centrífuga (Allegra X-15R, Beckman Coulter, Inc.).

Procedimiento común B: Medición de la concentración de anticuerpo

La medición de la concentración de anticuerpo se realizó utilizando un aparato de medición UV (Nanodrop 1000, Thermo Fisher Scientific) de acuerdo con un procedimiento especificado por el fabricante. Para la medición, se emplearon coeficientes de absorción de 280 nm, que son diferentes entre los anticuerpos (de 1,3 ml mg⁻¹ cm⁻¹ a 1,8 ml mg⁻¹ cm⁻¹).

Procedimiento común C: Intercambio de tampón para el anticuerpo

Se añadió un tampón (solución salina tamponada con fosfato (pH 6,0), tampón fosfato (pH 6,0), etc.) a una solución acuosa de un anticuerpo, y el producto resultante se concentró de acuerdo con el procedimiento descrito en el procedimiento común A. Este procedimiento se realizó varias veces, y la concentración de anticuerpo se midió entonces de acuerdo con el procedimiento descrito en el procedimiento común B. A esta solución tampón de anticuerpo se le añadió convenientemente un tampón [solución salina tamponada con fosfato (pH 6,0), tampón fosfato (pH 6,0), etc.] para preparar una solución tampón de anticuerpo con una concentración prevista (por ejemplo, aproximadamente 10 mg/ml).

Procedimiento común D: Purificación del conjugado de anticuerpo-fármaco (cromatografía de filtración en gel)

Se equilibró una columna NAP (NAP-5, NAP-10, NAP-25 (producida por GE Healthcare)) con tampón acetato (tampón acetato 10 mM, sorbitol al 5 %, pH 5,5; en el presente documento, denominado ABS) u otro tampón apropiado. Esta columna NAP se cargó con una mezcla de reacción de un conjugado de anticuerpo-fármaco, y se dejó fluir gravitacionalmente un tampón en una cantidad especificada por el fabricante para separar y recoger una fracción de anticuerpo. La columna NAP se cargó de nuevo con esta fracción y se dejó fluir gravitacionalmente un tampón en una cantidad especificada por el fabricante para separar y recoger una fracción de anticuerpos. Este procedimiento se repitió dos o tres veces en total para obtener el conjugado de anticuerpo-fármaco con un fármaco-conector no unido, habiéndose eliminado el dimetilsulfóxido y el propilenglicol. Según fuera necesario, se ajustó la concentración de la solución del conjugado de anticuerpo-fármaco mediante los procedimientos comunes A y C.

Procedimiento común E: Medición de la concentración de anticuerpo y del número promedio de moléculas de fármaco conjugado por molécula de anticuerpo en el conjugado de anticuerpo-fármaco (procedimiento con UV)

La concentración de un fármaco conjugado en un conjugado de anticuerpo-fármaco puede calcularse midiendo la absorbancia de una solución acuosa del conjugado de anticuerpo-fármaco a dos longitudes de onda de 280 nm y 260 nm (en ocasiones se usa una longitud de onda distinta de 260 nm) usando un absorciómetro (espectrómetro UV/VIS Lambda 25, PerkinElmer, Inc.), seguido de la realización del cálculo que se muestra a continuación. La absorbancia total a cualquier longitud de onda es igual a la suma de las absorbancias de todas las especies químicas absorbentes de luz presentes en el sistema (aditividad de la absorbancia), y, por lo tanto, con la suposición de que los coeficientes de absorción molar del anticuerpo y del fármaco no cambian antes y después de la conjugación entre el anticuerpo y el fármaco, la concentración de anticuerpo y la concentración de fármaco en el conjugado de anticuerpo-fármaco se expresan mediante las siguientes expresiones:

$$A_{280} = A_{D,280} + A_{A,280} = \epsilon_{D,280}C_D + \epsilon_{A,280}C_A \quad \text{Expresión (I)}$$

$$A_{260} = A_{D,260} + A_{A,260} = \epsilon_{D,260}C_D + \epsilon_{A,260}C_A \quad \text{Expresión (II)}$$

en las que A_{280} indica la absorbancia de una solución acuosa del conjugado de anticuerpo-fármaco a 280 nm, A_{260} indica la absorbancia de una solución acuosa del conjugado de anticuerpo-fármaco a 260 nm, $A_{A,280}$ indica la absorbancia del anticuerpo a 280 nm, $A_{A,260}$ indica la absorbancia del anticuerpo a 260 nm, $A_{D,280}$ indica la absorbancia del precursor del conjugado a 280 nm, $A_{D,260}$ indica la absorbancia del precursor del conjugado a 260 nm, $\epsilon_{A,280}$ indica el coeficiente de absorción molar del anticuerpo a 280 nm, $\epsilon_{A,260}$ indica el coeficiente de absorción molar de un anticuerpo a 260 nm, $\epsilon_{D,280}$ indica el coeficiente de absorción molar del precursor del conjugado a 280 nm, $\epsilon_{D,260}$ indica el coeficiente de absorción molar del precursor del conjugado a 260 nm, C_A indica la concentración de anticuerpo del conjugado de anticuerpo-fármaco, y C_D indica la concentración de fármaco del conjugado de anticuerpo-fármaco. Para $\epsilon_{A,280}$, $\epsilon_{A,260}$, $\epsilon_{D,280}$ y $\epsilon_{D,260}$ en lo anterior, se utilizan valores preparados de antemano (estimaciones basadas en cálculos o valores medidos). Por ejemplo, $\epsilon_{A,280}$ puede estimarse a partir de la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo utilizando un procedimiento de cálculo conocido (Protein Science, 1995, vol. 4, 2411-2423). Para $\epsilon_{A,260}$, se utilizaron valores calculados a partir de un valor medido obtenido por medición UV de un anticuerpo y una estimación para $\epsilon_{A,280}$. En los ejemplos, se utilizaron $\epsilon_{A,280} = 215380$ y $\epsilon_{A,260} = 110117$ como coeficientes de absorción molar de un anticuerpo anti-HER2 modificado. Se utilizaron $\epsilon_{A,280} = 227300$ y $\epsilon_{A,260} = 110710$ como coeficientes de absorción molar de un anticuerpo anti-LPS modificado. $\epsilon_{D,280}$ y $\epsilon_{D,260}$ pueden obtenerse basándose en la ley de Lambert-Beer (Absorbancia = Molaridad $\times$ Coeficiente de absorción molar $\times$ Longitud de paso óptico de la celda) midiendo la absorbancia de una solución en la que se disuelve un precursor del conjugado que se va a utilizar a una molaridad determinada. El coeficiente de absorción molar de un precursor del conjugado de los ejemplos se obtuvo cada vez en la medición UV. C_A y C_D pueden determinarse midiendo A_{280} y A_{260} de una solución acuosa de un conjugado de anticuerpo-fármaco y sustituyéndolos en las expresiones (I) y (II) para resolver las ecuaciones simultáneas. Además, el número promedio de moléculas de fármaco conjugado por molécula de anticuerpo puede determinarse dividiendo C_D por C_A .

Procedimiento común F: Medición de la concentración de anticuerpo y del número promedio de moléculas de fármaco conjugado por molécula de anticuerpo en el conjugado de anticuerpo-fármaco (cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa: RP-HPLC)

Además del procedimiento común E descrito anteriormente, el análisis de cromatografía líquida de alta resolución usando el siguiente procedimiento puede determinar la concentración de anticuerpo y el número promedio de moléculas de fármaco conjugado por molécula de anticuerpo en un conjugado de anticuerpo-fármaco.

[F-1. Preparación de la muestra para el análisis por HPLC (reducción del conjugado de anticuerpo-fármaco)].

Se mezcló una solución de un conjugado de anticuerpo-fármaco (aproximadamente 1 mg/ml, 60 µl) con una solución acuosa de ditioneitol (DTT) (100 mM, 15 µl). La mezcla se incubó a 37 °C durante 30 minutos para romper el enlace disulfuro entre la cadena L y la cadena H del conjugado de anticuerpo-fármaco. Esta mezcla de reacción se utilizó directamente para el análisis por HPLC.

5 [F-2. Análisis por HPLC]

Las condiciones de análisis representativas son las siguientes.

Sistema HPLC: Sistema HPLC Agilent 1290 (Agilent Technologies)

Detector: absorciómetro ultravioleta (longitud de onda de medición: 280 nm)

Columna: Acquity BEH Phenyl (2,1 × 50 mm, 1,7 µm, fabricada por Waters Corporation)

10 Temperatura de la columna: 75 °C

Caudal: 0,8 ml/min

Volumen de inyección de la muestra: 10 µl

Fase móvil A: Solución acuosa de ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1 %/alcohol isopropílico al 15 %

Fase móvil B: Solución en acetonitrilo de TFA al 0,075 %/alcohol isopropílico al 15 %

15 Programa de gradientes (fase móvil B): del 14 %-36 % (0 min-15 min), del 36 %-80 % (15-17 min), del 80 %-14 % (17 min-17,1 min), del 14 %-14 % (17,1 min-23 min)

[F-3. Análisis de los datos]

20 [F-3-1] En comparación con la cadena L (L0) y la cadena H (H0) de un anticuerpo sin ninguna molécula de fármaco conjugado, una cadena H con una molécula o moléculas de fármaco conjugado (cadena H con una molécula de fármaco conjugado: H1, cadena H con dos moléculas de fármaco conjugado: H2) tiene una hidrofobicidad que aumenta en proporción al número de moléculas de fármaco conjugado y proporciona un tiempo de retención prolongado, por lo que L0, H0, H1 y H2 eluyen en este orden, en principio. Mediante la comparación del tiempo de retención de cada uno de L0 y H0, cada pico detectado puede asignarse a cualquiera de L0, H0, H1 y H2.

25 [F-3-2] Puesto que cada fármaco-conector absorbe UV, los valores del área de pico se corrigieron usando la siguiente expresión con los coeficientes de absorción molar de una cadena H y un fármaco-conector según el número de moléculas de fármaco-conector conjugadas.

[Expresión 1]

Área del pico de la cadena H corregida

$$= \frac{\text{Coeficiente de absorción molar de la cadena H}}{\text{Coeficiente de absorción molar de la cadena H} + \text{Número de moléculas de fármaco conjugado} \times \text{Coeficiente de absorción molar del fármaco-conector}}$$

30 En este caso, se usaron estimaciones calculadas usando el procedimiento de cálculo conocido descrito en el procedimiento común E para los coeficientes de absorción molar (280 nm) de la cadena L y la cadena H para cada anticuerpo. Para un anticuerpo anti-HER2 modificado, se utilizaron 26213 y 81478 como coeficiente de absorción molar de la cadena L y coeficiente de absorción molar de la cadena H, respectivamente. Para un anticuerpo anti-LPS modificado, se utilizaron de forma similar 27703 y 85948 como coeficiente de absorción molar de la cadena L y coeficiente de absorción molar de la cadena H, respectivamente. Para el coeficiente de absorción molar (280 nm) del fármaco-conector, se utilizó un valor medido para el precursor del conjugado en el caso de la conjugación mediante reacción SPAAC y, en el caso de la conjugación con cisteína, un valor medido para un compuesto en el que el grupo maleimida se había convertido en tioéter succinimida mediante la reacción del precursor del conjugado con mercaptoetanol o N-acetilcisteína.

40 [F-3-3] La relación del área de pico (%) de cada cadena con respecto al total de valores del área de pico corregidos se calculó utilizando la siguiente expresión:

[Expresión 2]

$$\text{Relación del área del pico de la cadena H (\%HPA}_i\text{)} = \frac{\text{HPA}_i}{\text{HPA}_0 + \text{HPA}_1 + \text{HPA}_2} \times 100$$

45 [F-3-4] El número promedio de moléculas de fármaco conjugado por molécula de anticuerpo (DAR) en un conjugado de anticuerpo-fármaco se calculó utilizando la siguiente expresión:

[Expresión 3]

$$\text{Número promedio de moléculas de fármaco conjugado (DAR)} = \frac{0 \times \%HPA_0 + 1 \times \%HPA_1 + 2 \times \%HPA_2}{100} \times 2$$

[F-3-5] La concentración de anticuerpo en un conjugado de anticuerpo-fármaco se calculó utilizando la siguiente expresión:

[Expresión 4]

$$5 \quad \text{Concentración de anticuerpo [mg/ml]} = \frac{\text{Absorbancia del complejo de anticuerpo-fármaco} \times \text{Relación de dilución} \times \text{Peso molecular del anticuerpo}}{\text{Coeficiente de absorción molar del anticuerpo} + \text{Número de moléculas de fármaco conjugado} \times \text{Coeficiente de absorción molar del fármaco-conector}}$$

- En este caso, se utilizó un valor medido para una solución acuosa de un conjugado de anticuerpo-fármaco para la absorbancia (280 nm) del complejo de anticuerpo-fármaco. La relación de dilución indica cuántas veces se diluyó una solución acuosa de un conjugado de anticuerpo-fármaco en la medición de la absorbancia, y normalmente se aplica una dilución cuádruple. Para el coeficiente de absorción molar (280 nm) del anticuerpo, se utilizó una estimación calculada mediante el procedimiento de cálculo conocido descrito en el procedimiento común E. Para el número promedio de moléculas de fármaco conjugado, se utilizó un valor obtenido en [F-3-4]. Para el coeficiente de absorción molar (280 nm) del fármaco-conector, se utilizó un valor medido para un precursor del conjugado en el caso de la conjugación mediante reacción SPAAC y, en el caso de la conjugación con cisteína, se utilizó un valor medido para un compuesto en el que el grupo maleimida se había convertido en tioéter succinimida mediante la reacción del fármaco-conector con mercaptoetanol o N-acetilcisteína.

Procedimiento común G: Medición de la concentración de anticuerpo y del número promedio de moléculas de fármaco conjugado por molécula de anticuerpo en el conjugado de anticuerpo-fármaco (cromatografía líquida de alto rendimiento de interacción hidrofóbica): HI-HPLC)

- Además de los procedimientos comunes E y F descritos anteriormente, el análisis de cromatografía líquida de alta resolución usando el siguiente procedimiento puede determinar la concentración de anticuerpo y el número promedio de moléculas de fármaco conjugado por molécula de anticuerpo en un conjugado de anticuerpo-fármaco.

[G-1. Preparación de la muestra para el análisis por HPLC]

- Se utilizó directamente una solución de un conjugado de anticuerpo-fármaco (aproximadamente 1 mg/ml, 60 µl) para el análisis por HPLC.

[G-2. Análisis por HPLC]

Las condiciones de análisis representativas son las dos siguientes.

Sistema HPLC: SHIMADZU CBM-20A (Shimadzu Corporation)

Detector: absorciómetro ultravioleta (longitud de onda de medición: 280 nm)

- Columna: TSK-gel Butil-NPR (4,6 × 100 mm, 2,5 µm, producida por Tosoh Corporation)

Temperatura de la columna: temperatura constante en torno a 25 °C

Fase móvil A: Tampón fosfato 25 mM que contenía sulfato de amonio 1,5 M (pH = 7,0)

Fase móvil B: Tampón fosfato 25 mM (pH = 7,0)/alcohol isopropílico (3:1)

Caudal: 0,8 ml/min

- Volumen de inyección de la muestra: 15 µl

Programa de gradientes (fase móvil B): del 10 %-15 % (0 min-5 min), del 15 %-65 % (5 min-20 min)

o

Sistema HPLC: SHIMADZU CBM-20A (Shimadzu Corporation)

Detector: absorciómetro ultravioleta (longitud de onda de medición: 280 nm)

- Columna: PolyPROPYLA (4,6 × 100 mm, 3 µm, 1500 angstroms, producida por PolyLC Inc.)

Temperatura de la columna: temperatura constante en torno a 40 °C

Fase móvil A: Tampón fosfato 20 mM que contenía sulfato de amonio 1,5 M (pH = 7,4)

Fase móvil B: Tampón fosfato 20 mM (pH = 7,4)

Caudal: 0,8 ml/min

Volumen de inyección de la muestra: 15 µl

Programa de gradientes (fase móvil B): del 40 %-80 % (0 min -20 min)

[G-3. Análisis de los datos]

- 5 [G-3-1] La hidrofobicidad aumenta en proporción al número de moléculas de fármaco conjugadas con una molécula de anticuerpo y se da un tiempo de retención prolongado, y, por lo tanto, en el caso de conjugación mediante reacción SPAAC, los productos con DAR = 0, DAR = 2 y DAR = 4 eluyen en este orden, en principio. Mediante la comparación del tiempo de retención de un producto con DAR = 0, cada pico detectado puede asignarse a uno de los productos con DAR = 2 y al que tiene DAR = 4. Para algunos tipos de anticuerpos o fármaco-conector, pueden detectarse picos para un producto con DAR = 1 y otro con DAR = 3. El DAR de un pico detectado se estima en algunos casos fraccionando el pico mediante HPLC y midiendo después el espectro de masas.

[G-3-2] Puesto que cada fármaco-conector absorbe UV, los valores del área de pico se corrigieron usando la siguiente expresión con los coeficientes de absorción molar de un anticuerpo y fármaco-conector según el número de moléculas de fármaco-conector conjugadas:

- 15 [Expresión 5]

Área del pico del anticuerpo corregida (WPA_i)
= Área del pico

$$\times \frac{\text{Coeficiente de absorción molar del anticuerpo}}{\text{Coeficiente de absorción molar del anticuerpo} + \text{Número de moléculas de fármaco conjugado} \times \text{Coeficiente de absorción molar del fármaco-conector}}$$

- 20 En este caso se utilizaron estimaciones calculadas mediante el procedimiento de cálculo conocido descrito en el procedimiento común E para el coeficiente de absorción molar (280 nm) del anticuerpo. Para el coeficiente de absorción molar (280 nm) del fármaco-conector, se utilizó un valor medido para el precursor del conjugado.

[G-3-3] La relación del área de pico (%) de un anticuerpo con respecto al total de valores del área de pico corregidos se calculó utilizando la siguiente expresión:

[Expresión 6]

- 25
$$\text{Relación del área del pico del anticuerpo (\%WPA}_i\text{)} = \frac{WPA_i}{WPA_0 + WPA_1 + WPA_2 + WPA_3 + WPA_4} \times 100$$

[G-3-4] El número promedio de moléculas de fármaco conjugado por molécula de anticuerpo en un conjugado de anticuerpo-fármaco se calculó utilizando la siguiente expresión:

[Expresión 7]

- 30
$$\text{Número promedio de moléculas de fármaco conjugado (DAR)} = \frac{0 \times \%WPA_0 + 1 \times \%WPA_1 + 2 \times \%WPA_2 + 3 \times \%WPA_3 + 4 \times \%WPA_4}{100}$$

[G-3-5] La concentración de anticuerpo en un conjugado de anticuerpo-fármaco se calculó usando la expresión mostrada en [F-3-5]. A continuación, se utilizó un valor obtenido en [G-3-4] para el número promedio de moléculas de fármaco conjugado.

- 35 Pueden existir estereoisómeros, isómeros ópticos debidos a un átomo de carbono asimétrico, isómeros geométricos, tautómeros o isómeros ópticos, tales como formas d, formas l, y atropisómeros para el derivado de CDN novedoso y el conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente invención, y un intermedio de producción de cualquiera de ellos. Estos isómeros, isómeros ópticos y mezclas de ellos están todos incluidos en la presente invención.

- 40 El número de moléculas de fármaco conjugado por molécula de anticuerpo es un factor importante que tiene influencia en la eficacia y seguridad para el conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente invención. Los conjugados de anticuerpo-fármaco se producen con condiciones de reacción, tales como las cantidades de materias primas y reactivos que deben reaccionar, especificadas para obtener un número constante de moléculas de fármaco conjugado; sin embargo, a diferencia de la reacción química de compuestos de molécula pequeña, normalmente se obtiene una mezcla con diferentes números de moléculas de fármaco conjugado. El número de moléculas de fármaco conjugado por molécula de anticuerpo se especifica como el valor promedio, es decir, el número promedio de moléculas de fármaco conjugado (DAR). El número de moléculas derivadas de dinucleótidos cíclicos conjugadas a una molécula de anticuerpo es controlable, y pueden conjugarse de 1 a 10 moléculas derivadas de dinucleótidos cíclicos con respecto al número promedio de moléculas de fármaco conjugadas por molécula de anticuerpo, pero preferentemente el número es de uno a ocho, y más preferentemente de uno a cinco.

Cuando el anticuerpo Ab se une a través de un glucano remodelado del anticuerpo Ab a L en el conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente invención, el número de moléculas de fármaco conjugado por molécula de anticuerpo en el conjugado de anticuerpo-fármaco, m^2 , es un número entero de 1 o 2. Cuando el glucano es N297 y el glucano es N297-(Fuc)SG, m^2 es 2 y DAR está en el intervalo de 3 a 5 (preferentemente, en el intervalo de 3,2 a 4,8, más preferentemente, en el intervalo de 3,5 a 4,2). Cuando el glucano N297 es N297-(Fuc)MSG1, N297-(Fuc)MSG2 o una mezcla de N297-(Fuc)MSG1 y N297-(Fuc)MSG2, m^2 es 1 y DAR está en el intervalo de 1 a 3 (preferentemente, en el intervalo de 1,0 a 2,5, más preferentemente, en el intervalo de 1,2 a 2,2).

Los expertos en la materia pueden diseñar reacciones para conjugar un número requerido de moléculas de fármaco a cada molécula de anticuerpo basándose en la descripción de los ejemplos de la presente solicitud, y obtener un anticuerpo con un número controlado de moléculas derivadas de dinucleótidos cíclicos conjugadas.

El derivado de CDN y el conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente invención, y un intermedio de producción de cualquiera de ellos, pueden absorber humedad, permitir la adhesión de agua adsorbida o convertirse en un hidrato cuando se dejan en reposo el aire atmosférico o se recristalizan. Tales compuestos y sales que contienen agua también se incluyen en la presente invención.

El derivado de CDN y el conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente invención, y un intermedio de producción de cualquiera de ellos, pueden convertirse cada uno en una sal farmacéuticamente aceptable, según se desee, cuando tienen un grupo básico, tal como un grupo amino. Algunos ejemplos de tales sales pueden incluir sales de haluro de hidrógeno, tales como clorhidratos y yodhidratos; sales de ácidos inorgánicos, tales como nitratos, percloratos, sulfatos y fosfatos; alcanosulfonatos inferiores, tales como metanosulfonatos, trifluorometanosulfonatos y etanosulfonatos; arilsulfonatos, tales como bencenosulfonatos y p-toluenosulfonatos; sales de ácidos orgánicos, tales como formiatos, acetatos, malatos, fumaratos, succinatos, citratos, tartratos, oxalatos y maleatos; y sales de aminoácidos, tales como ornitinas, glutamatos y aspartatos.

Debido a que el derivado de CDN o el conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente invención incluye un grupo fosfato y/o un grupo tiofosfato en la estructura, puede formarse generalmente una sal de adición de bases. Cuando un intermedio de producción del mismo incluye un grupo ácido, tal como un grupo carboxi, puede formarse generalmente, de manera similar, una sal de adición de bases. Algunos ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables pueden incluir sales de metales alcalinos, tales como sales de sodio, sales de potasio y sales de litio; sales de metales alcalinotérreos, tales como sales de calcio y sales de magnesio; sales inorgánicas, tales como sales de amonio; y sales de aminas orgánicas, tales como sales de dibencilamina, sales de morfina, sales de ésteres alquílicos de fenilglicina, sales de etilendiamina, sales de N-metilglucamina, sales de dietilamina, sales de trietilamina, sales de ciclohexilamina, sales de dicitclohexilamina, sales de N,N'-dibencilendiamina, sales de dietanolamina, sales de N-bencil-N-(2-feniletoxi)amina, sales de piperazina, sales de tetrametilamonio y sales de tris(hidroximetil)aminometano.

El derivado de CDN y el conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente invención, y un intermedio de producción de cualquiera de ellos, pueden existir cada uno en forma de hidrato, por ejemplo, formado por absorción de la humedad del aire. El solvato no está limitado a un solvato en particular, siempre que sea cualquier solvato farmacéuticamente aceptable. En concreto, se prefieren los hidratos, los solvatos de etanol y los solvatos de 2-propanol. El derivado de CDN y el conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente invención, y un intermedio de producción de cualquiera de ellos, pueden estar cada uno en la forma de N-óxido cuando un átomo de nitrógeno está presente en los mismos. Estos solvatos y formas de N-óxido se incluyen en el alcance de la presente invención. El derivado de CDN y el conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente invención, y un intermedio de producción de cualquiera de ellos, pueden estar cada uno en la forma de sulfóxido cuando un átomo de azufre está presente en los mismos. Estos solvatos y formas de sulfóxido se incluyen en el alcance de la presente invención.

La presente invención incluye compuestos marcados con diversos isótopos radiactivos o no radiactivos. El derivado de CDN y el conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente invención, y un intermedio de producción de cualquiera de ellos, pueden contener, cada uno, uno o más átomos constituyentes con proporciones no naturales de isótopos atómicos. Algunos ejemplos de isótopos atómicos pueden ser el deuterio (2H), el tritio (3H), el yodo-125 (125I) y el carbono-14 (14C). El compuesto de la presente invención puede radiomarcarse con un isótopo radiactivo, tal como tritio (3H), yodo-125 (125I) y carbono-14 (14C). El compuesto radiomarcado es útil como agente terapéutico o profiláctico, como reactivo para la investigación, por ejemplo, como reactivo de ensayo, y como agente de diagnóstico, por ejemplo, como agente de diagnóstico para la obtención de imágenes *in vivo*. Las variantes isotópicas del conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente invención están todas incluidas en el alcance de la presente invención, independientemente de si son radiactivas o no.

<4. Medicina>

El derivado de CDN o el conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente invención presenta actividad inmunitaria antitumoral o actividad citotóxica frente a células cancerosas, y, por lo tanto, puede usarse como medicamento, en particular, un agente terapéutico y/o agente profiláctico para el cáncer, o un agente antitumoral.

Algunos ejemplos de cánceres a los que se aplica el derivado de CDN o el conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente invención pueden incluir cáncer de pulmón (cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de pulmón microcítico, etc.), cáncer de riñón, cáncer urotelial, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, glioblastoma multiforme, cáncer de

ovario (tumor epitelial de superficie, tumor estromático, tumor de células germinales, etc.), cáncer de páncreas, cáncer de mama, melanoma, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer gástrico, cáncer de esófago, cáncer de endometrio, cáncer de testículo (seminoma, no seminoma), cáncer de cuello uterino, coriocarcinoma placentario, glioblastoma multiforme, tumor cerebral, cáncer de cabeza y cuello, cáncer tiroideo, mesotelioma, tumor del estroma gastrointestinal (GIST), cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares, cáncer suprarrenal, carcinoma de células escamosas, leucemia, linfoma maligno, plasmocitoma, mieloma y sarcoma. Sin embargo, las aplicaciones del conjugado de anticuerpo-fármaco no se limitan a éstos, siempre que las células cancerosas como diana terapéutica expresen una proteína reconocible para el anticuerpo del conjugado de anticuerpo-fármaco.

El derivado de CDN o el conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente invención puede administrarse preferentemente a mamíferos, y se administra más preferentemente a seres humanos.

Las sustancias que se van a utilizar en una composición farmacéutica que contiene el derivado de CDN o el conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente invención pueden seleccionarse convenientemente para su aplicación a partir de aditivos de formulación que se utilizan generalmente en la técnica en vista de la dosis o concentración de administración.

El derivado de CDN o el conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente invención puede administrarse en forma de una composición farmacéutica que contiene uno o más componentes farmacéuticamente compatibles. Por ejemplo, la composición farmacéutica suele contener uno o más vehículos farmacéuticos (por ejemplo, líquido esterilizado (incluida agua y aceite (petróleo y aceite de origen animal, origen vegetal u origen sintético (tal como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral y aceite de sésamo))). El agua es el vehículo más habitual cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. La solución salina, una solución acuosa de dextrosa y una solución acuosa de glicerol también pueden utilizarse como vehículo líquido, en particular, para una solución inyectable. Los excipientes farmacéuticos adecuados son conocidos en la técnica. Si se desea, la composición anterior también puede contener una pequeña cantidad de un agente hidratante, un agente emulsionante o un agente tamponante del pH. En "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E. W. Martin se ofrecen ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados. Su formulación depende del modo de administración.

Se conocen diversos sistemas de administración que pueden utilizarse para administrar el derivado de CDN o el

conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente invención. Algunos ejemplos del procedimiento de introducción pueden incluir, entre otros, las vías intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa y subcutánea. La administración puede realizarse, por ejemplo, mediante inyección o inyección en embolada. En una realización preferida específica, la administración del derivado de CDN o del conjugado de anticuerpo-fármaco se realiza mediante inyección. La vía de administración preferida es la parenteral.

En una realización representativa, la composición farmacéutica que contiene el conjugado de anticuerpo-fármaco anterior se formula en forma de una composición farmacéutica adecuada para la administración intravenosa a seres humanos de acuerdo con procedimientos convencionales. La composición para la administración intravenosa suele ser una solución en un tampón acuoso estéril e isotónico. En caso necesario, el medicamento puede contener un agente solubilizante y un anestésico local para aliviar el dolor en el lugar de la inyección (por ejemplo, lignocaína). Generalmente, los componentes anteriores se suministran individualmente en forma de polvo liofilizado seco o concentrado anhidro en un envase herméticamente cerrado, tal como una ampolla o un sobre con indicación de la cantidad del principio activo, o en forma de una mezcla en una forma farmacéutica unitaria. Cuando la composición farmacéutica vaya a administrarse por infusión, podrá administrarse desde un frasco de infusión que contenga agua o solución salina de calidad farmacéutica estéril. Cuando la composición farmacéutica se administra por inyección, puede proporcionarse una ampolla que contenga agua estéril o solución salina para inyección, de modo que los componentes mencionados se mezclen entre sí antes de la administración. La composición farmacéutica puede suministrarse en forma de solución.

La composición farmacéutica de la presente invención puede ser una composición farmacéutica que contiene solamente el conjugado de anticuerpo-fármaco, o una composición farmacéutica que contiene el conjugado de anticuerpo-fármaco y al menos un agente de tratamiento del cáncer distinto del conjugado de anticuerpo-fármaco. El conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente invención puede administrarse junto con otros agentes para el tratamiento del cáncer, proporcionando un efecto anticanceroso mejorado. Otros agentes anticancerosos que se vaya a utilizar para tal fin pueden administrarse a un individuo simultáneamente, por separado o después de la administración del conjugado de anticuerpo-fármaco, y pueden administrarse con diferentes intervalos de administración. Algunos ejemplos de tales agentes para el tratamiento del cáncer pueden incluir abraxano, carboplatino, cisplatino, gemcitabina, irinotecán (CPT-11), paclitaxel, pemetrexed, sorafenib, vinblastina, agentes descritos en la publicación Internacional n.º WO 2003/038043, análogos de LH-RH (leuprorelina, goserelina, etc.), fosfato de estramustina, antagonistas del estrógeno (tamoxifeno, raloxifeno, etc.), inhibidores de la aromatasa (anastrozol, letrozol, exemestano, etc.) e inhibidores de puntos de control inmunitario (nivolumab, ipilimumab, etc.), pero no se limitan a éstos y es aceptable cualquier agente que tenga una actividad antitumoral.

La composición farmacéutica como se describe puede formularse en una formulación liofilizada o una formulación líquida en forma de una formulación que tenga la composición seleccionada y la pureza requerida. En la formulación en forma de una formulación liofilizada, la composición farmacéutica puede ser formulada en una formulación que

contenga aditivos de formulación apropiados que se utilizan en la técnica. También para un líquido, la composición farmacéutica puede formularse en forma de una formulación líquida que contenga diversos aditivos de formulación que se utilizan en la técnica.

Los componentes y la concentración de la composición farmacéutica pueden variar entre los procedimientos de administración; sin embargo, el conjugado de anticuerpo-fármaco contenido en la composición farmacéutica de la presente invención puede presentar un efecto farmacéutico incluso a una dosis más pequeña, ya que la afinidad del conjugado de anticuerpo-fármaco por un antígeno es mayor, es decir, la afinidad del conjugado de anticuerpo-fármaco con respecto a la constante de disociación (valor K_d) por el antígeno es mayor (valor K_d más bajo). Así, al determinar la dosis del conjugado de anticuerpo-fármaco, la dosis puede fijarse teniendo en cuenta la situación relativa a la afinidad del conjugado de anticuerpo-fármaco por el antígeno. Cuando el conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente invención se administra a un ser humano, por ejemplo, pueden administrarse aproximadamente de 0,001 a 100 mg/kg una vez, o en varias partes en intervalos de 1 a 180 días.

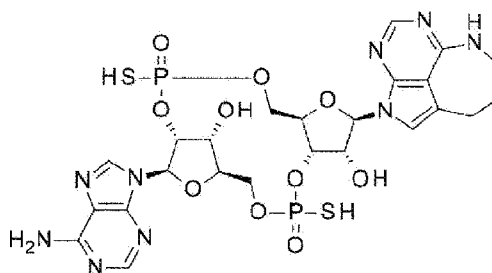
En lo sucesivo, la presente invención se describirá con referencia a los ejemplos; sin embargo, la presente invención no se limita a los ejemplos.

Ejemplos

En los ejemplos siguientes, la temperatura ambiente se refiere a una temperatura de entre 15 °C y 35 °C. El acetonitrilo deshidratado usado fue acetonitrilo (deshidratado)-Super, comercializado por KANTO CHEMICAL CO., INC., o acetonitrilo (superdeshidratado) comercializado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd. La piridina utilizada fue piridina (deshidratada)-Super, comercializada por KANTO CHEMICAL CO., INC. La cromatografía en gel de sílice se realizó utilizando un Biotage SNAP Ultra (fabricado por Biotage), Chromatorex Q-Pack SI (fabricado por FUJI SILYSIA CHEMICAL LTD.) o Purif-Pack-Ex SI (fabricado por Shoko Science Co., Ltd.). La cromatografía en columna de gel de sílice DIOL se realizó utilizando un Chromatorex Q-pack DIOL (fabricado por FUJI SILYSIA CHEMICAL LTD.). La cromatografía en columna de gel de sílice C18 se realizó utilizando un Biotage SNAP Ultra C18 (fabricado por Biotage). La cromatografía en columna de gel de amino-sílice se realizó utilizando un Biotage SNAP Isolute NH₂ (fabricado por Biotage). La HPLC preparativa se realizó utilizando un sistema HPLC SHIMADZU SPD-M10A (Shimadzu Corporation). Como columna preparativa se utilizó una Kinetex (5 µm, C18, 100 angstroms, 250 × 30,0 mm, producida por Phenomenex) o una Kinetex (5 µm, C18, 100 angstroms, 250 × 21,2 mm, producida por Phenomenex).

Para la medición de los datos espectrales se utilizaron los siguientes aparatos. La medición de los espectros de RMN de ¹H se realizó utilizando un JEOL ECS-400 (400 MHz), un Varian 400-MR (400 MHz) o un Varian Unity Inova 500 (500 MHz). La medición de los espectros de RMN de ³¹P se realizó utilizando un JEOL ECS-400 (160 MHz). La medición de los espectros de masas se realizó utilizando un sistema LC/MS cuadrupolar Agilent 6130 (Agilent Technologies). La medición LC/MS se realizó en las siguientes condiciones [columna: Develosil Combi-RP, 5 µm, 50 × 2,0 mm (fabricada por Nomura Chemical Co., Ltd.), fase móvil: ácido fórmico al 0,1 % en volumen-acetonitrilo/ácido fórmico al 0,1 % en volumen-agua destilada, ácido fórmico al 0,1 % en volumen-acetonitrilo: del 2 %-100 % (0 min-5 min o 0 min-10 min)].

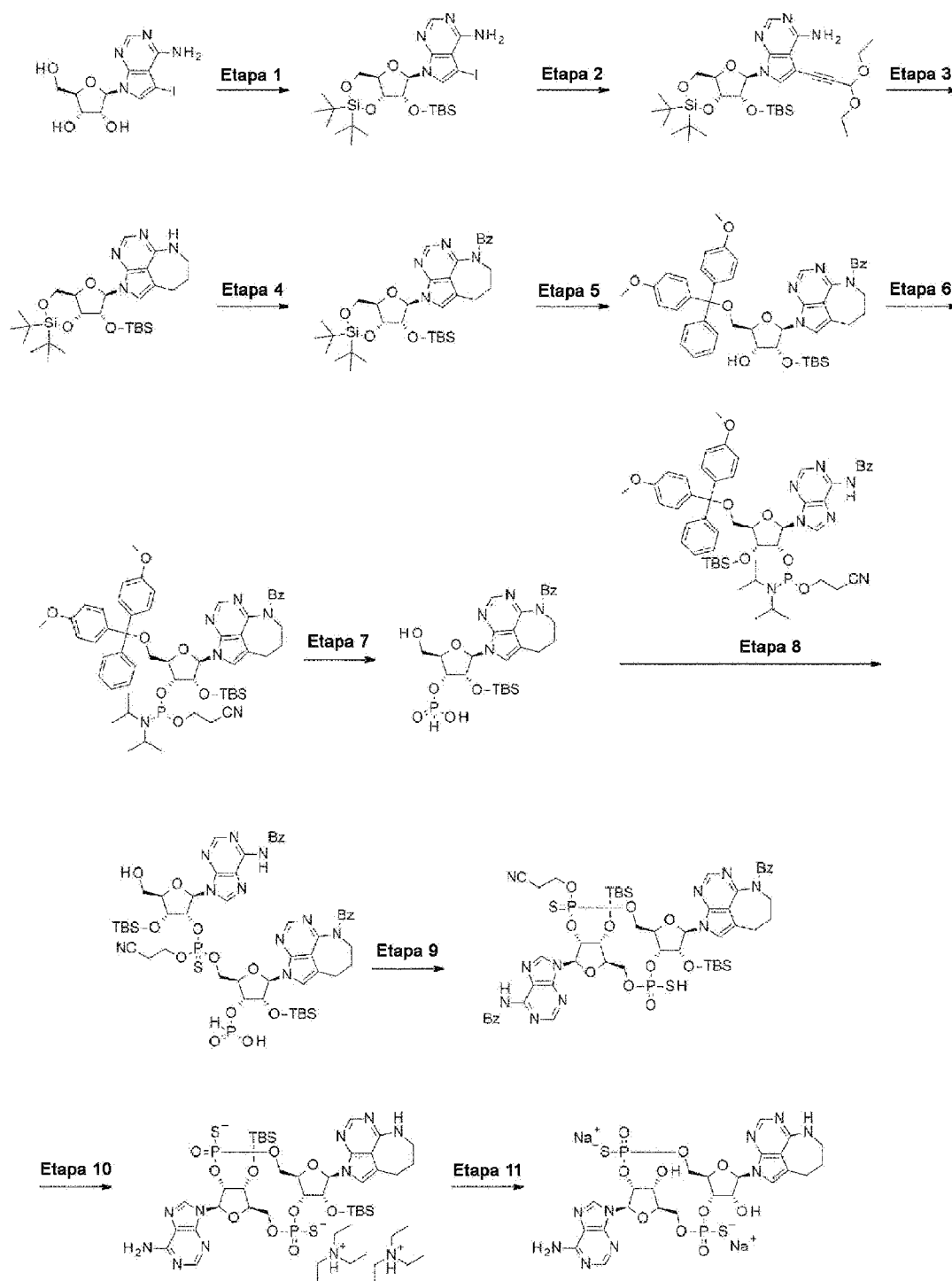
Ejemplo 1: Síntesis de CDN1 (5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-7-(6-Amino-9H-purin-9-il)-15,16-dihidroxi-2,10-bis(sulfanil)-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-1][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciotetradecin-2,10-diona



1

1a (Diastereómero 1)
1b (Diastereómero 2)
1c (Diastereómero 3)

[Esquema de síntesis]



(Etapa 1)

7-{2-O-[Terc-butil(dimetil)silil]-3,5-O-(di-terc-butilsililiden)-β-D-ribofuranosil}-5-yodo-7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-amina

A una disolución de 5-yodotubercidina (1,0 g) como compuesto conocido en la bibliografía (Tetrahedron, 2007, 63, 9850-9861) en N,N-dimetilformamida (10 ml) se le añadió bis(trifluorometanosulfonato) de di-terc-butilsililo (1,24 ml) y la mezcla de reacción se agitó a la misma temperatura durante 30 minutos. Se añadió imidazol (868 mg) a 0 °C, se aumentó la temperatura hasta la temperatura ambiente y se agitó la mezcla de reacción durante 30 minutos. A temperatura ambiente, se añadió terc-butildimetilclorosilano y la mezcla de reacción se agitó a la misma temperatura durante toda la noche. Se añadió a la mezcla de reacción una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio para inactivar la reacción y el producto resultante se sometió a extracción con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con salmuera y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El agente desecante se eliminó por filtración y el filtrado

se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo] para obtener el compuesto del título (910 mg).

MS(ESI) m/z: 647 (M+H)⁺.

5 RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 8,25 (1H, s), 7,03 (1H, s), 6,10 (1H, s), 5,63 (2H, sa), 4,49-4,44 (2H, m), 4,26 (1H, dd, J = 9,7, 4,8 Hz), 4,17 (1H, m), 4,00 (1H, t, J = 9,7 Hz), 1,09 (9H, s), 1,04 (9H, s), 0,91 (9H, s), 0,13 (3H, s), 0,11 (3H, s).

(Etapa 2)

7-{2-O-[Terc-butil(dimetil)silil]-3,5-O-(di-terc-butilsililiden)-β-D-ribofuranosil]-5-(3,3-dietoxiprop-1-in-1-il)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-amina

10 A una disolución mezclada del compuesto obtenido en la etapa 1 (910 mg) en N,N-dimetilformamida (3,0 ml)-tetrahidrofuran (9,0 ml), se le añadieron en este orden propargilaldehído dimetil acetal (1,01 ml), trietilamina (0,392 ml), tetraquis(trifenilfosfina)paladio(0) (163 mg) y yoduro de cobre(I) (53,6 mg) y la mezcla de reacción se agitó a 40 °C durante 18 horas. Se añadieron una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio y acetato de etilo a la mezcla de reacción, que se sometió a extracción con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con salmuera y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El agente desecante se eliminó por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo] para obtener el compuesto del título (878 mg). MS(ESI) m/z: 647 (M+H)⁺.

15 RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 8,27 (1H, s), 7,17 (1H, s), 6,09 (1H, s), 5,56 (2H, sa), 5,50 (1H, s), 4,48 (1H, dd, J = 9,1, 4,9 Hz), 4,42 (1H, d, J = 4,9 Hz), 4,25 (1H, dd, J = 9,4, 4,6 Hz), 4,17 (1H, m), 4,00 (1H, t, J = 9,7 Hz), 3,85-3,77 (2H, m), 3,66 (2H, m), 1,28 (6H, t, J = 7,3 Hz), 1,08 (9H, s), 1,04 (9H, s), 0,91 (9H, s), 0,13 (3H, s), 0,11 (3H, s).

20 (Etapa 3)

2-{2-O-[Terc-butil(dimetil)silil]-3,5-O-(di-terc-butilsililiden)-β-D-ribofuranosil]-6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzofazuleno

25 A una disolución del compuesto obtenido en la etapa 2 (878 mg) en etanol (8,8 ml) se le añadió paladio-carbono (M) húmedo al 10 % (500 mg), y la mezcla de reacción se agitó en una atmósfera de hidrógeno a temperatura ambiente durante 9 horas. El catalizador se eliminó por filtración, se lavó con diclorometano y el filtrado se concentró a presión reducida. A una solución del residuo en ácido acético (8,8 ml) se le añadió paladio-carbono (M) húmedo al 10 % (500 mg), y la mezcla de reacción se agitó en una atmósfera de hidrógeno a 40 °C durante 2 días. El catalizador se eliminó por filtración, se lavó con diclorometano y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo/trietilamina al 0,1 %] para obtener el compuesto del título (603 mg).

30 MS(ESI) m/z: 561 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 8,47 (1H, sa), 8,07 (1H, s), 6,70 (1H, s), 6,14 (1H, s), 4,47-4,43 (2H, m), 4,29 (1H, dd, J = 9,1, 4,8 Hz), 4,15 (1H, m), 3,99 (1H, t, J = 9,7 Hz), 3,55 (2H, m), 2,89 (2H, t, J = 5,4 Hz), 2,04 (2H, m), 1,09 (9H, s), 1,04 (9H, s), 0,90 (9H, s), 0,10 (3H, s), 0,10 (3H, s).

35 (Etapa 4)

6-Benzoil-2-{2-O-[terc-butil(dimetil)silil]-3,5-O-(di-terc-butilsililiden)-β-D-ribofuranosil]-6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzofazuleno

40 A una disolución del compuesto obtenido en la etapa 3 (2,17 g) en diclorometano (21,7 ml) se le añadieron piridina (1,56 ml), N,N-dimetilaminopiridina (94,5 mg) y cloruro de benzoilo (0,898 ml) en este orden a temperatura ambiente, y la mezcla de reacción se agitó a 50 °C durante 15 horas. Se añadió a la mezcla de reacción una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio para inactivar la reacción. Tras la extracción con diclorometano, la capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El agente desecante se eliminó por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo/trietilamina al 0,1 %] para obtener el compuesto del título (1,91 g).

45 MS(ESI) m/z: 665 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 8,08 (1H, s), 7,37-7,33 (3H, m), 7,23 (2H, t, J = 7,6 Hz), 6,97 (1H, s), 6,21 (1H, s), 4,50-4,46 (2H, m), 4,37-4,30 (2H, m), 4,28-4,09 (2H, m), 4,02 (1H, t, J = 10,0 Hz), 3,03 (2H, t, J = 6,3 Hz), 2,29-2,17 (2H, m), 1,10 (9H, s), 1,05 (9H, s), 0,90 (9H, s), 0,10 (6H, s).

(Etapa 5)

50 6-Benzoil-2-{5-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-2-O-[terc-butil(dimetil)silil]-β-D-ribofuranosil]-6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzofazuleno

A una disolución del compuesto obtenido en la etapa 4 (1,91 g) en diclorometano (15 ml) se le añadió una mezcla de fluoruro de hidrógeno-piridina (0,30 ml) y piridina (1,88 ml) preparada a 0 °C, y la mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 2 horas. Se añadió a la mezcla de reacción una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio para inactivar la reacción. Tras someter la mezcla de reacción a extracción con diclorometano, la capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El agente desecante se eliminó por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se disolvió en piridina (15 ml), se añadió cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (1,17 g) y la mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 12 horas. Se añadió metanol, la mezcla de reacción se agitó durante 30 minutos y, a continuación, se añadió una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio para inactivar la reacción. Tras someter la mezcla de reacción a extracción con diclorometano, la capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El agente desecante se eliminó por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo/trietilamina al 0,1 %] para obtener el compuesto del título (1,98 g).

MS(ESI) m/z: 827 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 8,07 (1H, s), 7,47 (2H, m), 7,37-7,19 (13H, m), 6,84 (4H, m), 6,37 (1H, dd, J = 5,5 Hz), 4,75 (1H, t, J = 5,2 Hz), 4,38-4,20 (4H, m), 3,80 (6H, s), 3,53 (1H, dd, J = 10,7, 2,8 Hz), 3,40 (1H, dd, J = 11,0, 3,1 Hz), 2,83 (1H, d, J = 3,7 Hz), 2,78 (2H, t, J = 6,4 Hz), 2,17 (2H, m), 0,81 (9H, s), -0,03 (3H, s), -0,21 (3H, s).

(Etapa 6)

6-Benzoil-2-(5-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-2-O-[terc-butil(dimetil)silil]-3-O-[(2-cianoetoxi)[di(propan-2-il)amino]fosfanil]-β-D-ribofuranosil)-6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azuleno

A una disolución del compuesto obtenido en la etapa 5 (1,98 g) en diclorometano (23,9 ml) se le añadieron N,N-diisopropiletilamina (1,02 ml) y 2-cianoetil N,N-diisopropilclorofosforamidita (1,07 ml), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15 horas. Se añadió a la mezcla de reacción una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio para inactivar la reacción. Tras someter la mezcla de reacción a extracción con diclorometano, la capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El agente desecante se eliminó por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo] para obtener el compuesto del título (2,06 g) en forma de una mezcla de diastereómeros en el átomo de fósforo (proporción de diastereómeros = 7:3).

MS(ESI) m/z: 1027 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 8,06 (0,3H, s), 8,04 (0,7H, s), 7,50-7,16 (15H, m), 6,85-6,79 (4H, m), 6,35 (0,7H, d, J = 6,7 Hz), 6,31 (0,3H, d, J = 6,1 Hz), 4,84 (0,7H, dd, J = 7,0, 4,6 Hz), 4,78 (0,3H, t, J = 5,8 Hz), 4,43-4,17 (4H, m), 4,04-3,85 (1,3H, m), 3,80-3,76 (6H, m), 3,69-3,43 (3H, m), 3,50 (0,7H, dd, J = 10,6, 3,3 Hz), 3,33-3,26 (1H, m), 2,87-2,76 (2H, m), 2,74-2,60 (1,4H, m), 2,31 (0,6H, t, J = 6,7 Hz), 2,23-2,11 (2H, m), 1,04-1,13 (7,8H, m), 2,1-1,13 (7,8H, m), 1,04 (4,2H, d, J = 6,7 Hz), 0,73 (2,7H, s), 0,72 (6,3H, s), -0,03 (0,9H, s), -0,06 (2,1H, s), -0,24 (3H, s).

(Etapa 7)

6-Benzoil-2-{2-O-[terc-butil(dimetil)silil]-3-O-[hidroxio(oxo)-λ⁵-fosfanil]-β-D-ribofuranosil}-6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azuleno

A una solución del compuesto obtenido en la etapa 6 (1,37 g) en acetonitrilo (6,67 ml) se le añadieron agua (48 µl) y una sal de piridina de ácido trifluoroacético (335 mg), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos. A la mezcla de reacción se le añadió terc-butilamina (6,67 ml) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Tras concentrar la mezcla de reacción a presión reducida, el residuo se destiló azeotrópicamente dos veces con acetonitrilo (5 ml). Se añadió agua (0,240 ml) a una solución del residuo en diclorometano (16,7 ml), a la que se añadió una solución de ácido dicloroacético (0,953 ml) en diclorometano (16,7 ml), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se añadió piridina (1,82 ml) para inactivar la reacción y la mezcla se concentró a presión reducida. El residuo se destiló azeotrópicamente tres veces con acetonitrilo deshidratado (10 ml), dejando aproximadamente 5 ml de acetonitrilo tras el último procedimiento. La solución de acetonitrilo resultante del compuesto del título se utilizó directamente para la reacción posterior.

(Etapa 8)

Se destiló azeotrópicamente tres veces N-benzoil-5'-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-3'-O-[terc-butil(dimetil)silil]-2'-O-[(2-cianoetoxi)[di(propan-2-il)amino]fosfanil]adenosina (1,31 g) disponible en el mercado (ChemGenes Corporation) con acetonitrilo deshidratado (10 ml), dejando aproximadamente 5 ml de acetonitrilo después del último procedimiento, y se añadieron los tamices moleculares 3A, 1/16 (5 partículas en forma de gránulos). Esta solución de acetonitrilo se añadió a la solución sintetizada en la etapa 7, y la mezcla de reacción se agitó en una atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente durante 20 minutos. A la mezcla de reacción se le añadió N,N-dimetil-N'-(3-sulfaniliden-3H-1,2,4-ditiazol-5-il)metanoimidamida (300 mg), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos, concentrándose a continuación a presión reducida. Se añadió agua (0,240 ml) a una solución del residuo en diclorometano (19,0 ml), se añadió una solución de ácido dicloroacético (1,20 ml) en diclorometano (19,0 ml), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Tras añadir piridina (13,2 ml) para inactivar

la reacción, el producto resultante se concentró a presión reducida. El producto bruto resultante se utilizó directamente para la reacción posterior.

(Etapa 9)

- 5 N-{9-[(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-14-(6-Benzoil-6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)-15,16-bis[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-10-(2-cianoetoxi)-2-oxo-2-sulfanil-10-sulfanilidenoctahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-7-il]-9H-purin-6-il}benzamida

- 10 Después de concentrar hasta aproximadamente 25 ml una disolución del producto bruto obtenido en la etapa 8 en piridina (39,6 ml), se añadió a la misma 2-cloro-5,5-dimetil-1,3,2λ⁵-dioxafosfinan-2-ona (908 mg), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añadieron agua (0,84 ml) y 3H-1,2-benzoditiol-3-ona (336 mg), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos. La mezcla de reacción se vertió en una solución acuosa (180 ml) de hidrogenocarbonato de sodio (5,25 g), y el producto resultante se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos, sometándose después a extracción con acetato de etilo. Tras secar la capa orgánica sobre sulfato de sodio anhidro, se eliminó el agente desecante por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo/metanol]
- 15 para obtener el compuesto del título (507 mg) en forma de una mezcla de diastereómeros en el átomo de fósforo.

MS(ESI) m/z: 1219 (M+H)⁺.

(Etapa 10)

- 20 (5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-7-(6-Amino-9H-purin-9-il)-15,16-bis[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) de bis(N,N-dietiletanaminio)

- 25 A una disolución del compuesto obtenido en la etapa 9 (507 mg) en metanol (5 ml) se le añadió amoniaco líquido al 28 % (5 ml), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 14 horas. Tras concentrar la mezcla de reacción, el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetronitrilo] para obtener el compuesto del título (301 mg) en forma de una mezcla de diastereómeros en el átomo de fósforo.

MS(ESI) m/z: 958 (M+H)⁺.

(Etapa 11)

- 30 (5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-7-(6-Amino-9H-purin-9-il)-15,16-dihidroxi-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) disódico

- 35 Se añadió trifluorhidrato de trietilamina (3,84 ml) al compuesto obtenido en la etapa 10 (301 mg), y la mezcla de reacción se agitó a 45 °C durante 3 horas. A la mezcla de reacción se le añadió una mezcla enfriada con hielo de una solución acuosa 1 M de hidrogenocarbonato de trietilamonio (20 ml) y trietilamina (4 ml) a temperatura ambiente. Tras concentrar la mezcla de reacción a presión reducida, ésta se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetronitrilo] y HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetronitrilo, acetronitrilo: del 0 %-25 % (0 min-40 min)] para separar los diastereómeros en el átomo de fósforo. El compuesto resultante (sal de trietilamina) se convirtió en una sal de sodio con el siguiente procedimiento.

[Conversión a sal de sodio]

- 40 Se suspendió la resina BT AG (R) 50W-X2 (calidad biotecnológica, malla 100-200, forma de hidrógeno) (500 mg) en agua pura, y se llenó con ella una columna vacía. Después de dejar fluir gravitacionalmente hacia abajo una porción excesiva de agua pura, se dejó fluir gravitacionalmente hacia abajo una solución acuosa 1 M de hidróxido de sodio (5 ml) y agua pura (10 ml) en este orden. El compuesto obtenido anteriormente se disolvió en agua pura (5 ml) y se cargó en una columna. Se separó una solución que se dejó fluir gravitacionalmente hacia abajo y se eluyó de nuevo con agua pura (10 ml). Las fracciones que contenían el producto deseado se reunieron y liofilizaron para obtener el diastereómero 1 (83,4 mg), el diastereómero 2 (44,8 mg) y el diastereómero 3 (13,1 mg) del compuesto del título (tiempo de retención en HPLC: diastereómero 1 > 2, 3).
- 45

Diastereómero 1

MS(ESI) m/z: 730 (M+H)⁺.

- 50 RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,74 (1H, s), 8,17 (1H, s), 8,02 (1H, s), 7,10 (1H, s), 6,34 (1H, d, J = 8,5 Hz), 6,30 (1H, d, J = 4,8 Hz), 5,41-5,34 (1H, m), 5,19-5,13 (1H, m), 4,85 (1H, d, J = 3,6 Hz), 4,79 (1H, t, J = 4,5 Hz), 4,52-4,41 (2H, m), 4,40-4,41 (2H, m), 85 (1H, d, J = 3,6 Hz), 4,79 (1H, t, J = 4,5 Hz), 4,52-4,41 (2H, m), 4,40-4,31 (2H, m), 4,07-3,97 (2H, m), 3,52-3,47 (2H, m), 2,90-2,76 (2H, m), 2,05-1,95 (2H, m). RMN de ³¹P (CD₃OD) δ: 57,9 (s), 54,5 (s).

Diastereómero 2

MS(ESI) m/z: 730 (M+H)⁺.

5 RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,82 (1H, s), 8,17 (1H, s), 8,02 (1H, s), 7,13 (1H, s), 6,35 (1H, dd, J = 2,4 Hz), 6,33 (1H, s), 5,50-5,43 (2H, m), 4,80 (1H, dd, J = 6,7, 4,2 Hz), 4,52-4,28 (5H, m), 4,02 (1H, d, J = 12,1 Hz), 3,93-3,86 (1H, m), 3,54-3,47 (2H, m), 2,95-2,88 (2H, m), 2,05-1,97 (2H, m).

RMN de ³¹P (CD₃OD) δ: 63,0 (s), 60,2 (s).

Diastereómero 3

MS(ESI) m/z: 730 (M+H)⁺.

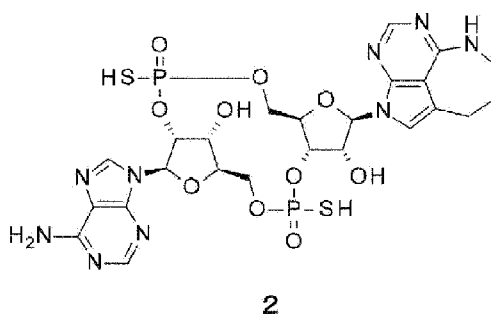
10 RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 9,16 (1H, s), 8,17 (1H, s), 8,02 (1H, s), 7,12 (1H, s), 6,35 (1H, dd, J = 8,5 Hz), 6,29 (1H, d, J = 6,7 Hz), 5,63-5,56 (1H, m), 5,54-5,46 (1H, m), 4,79 (1H, dd, J = 6,7, 4,8 Hz), 4,53-4,43 (2H, m), 4,36-4,28 (2H, m), 4,26-4,19 (1H, m), 4,16-4,09 (1H, m), 3,93-3,86 (1H, m), 3,52-3,47 (2H, m), 2,92-2,87 (2H, m), 2,04-1,95 (2H, m).

RMN de ³¹P (CD₃OD) δ: 62,8 (s), 58,7 (s).

Ejemplo 2: Síntesis de CDN2

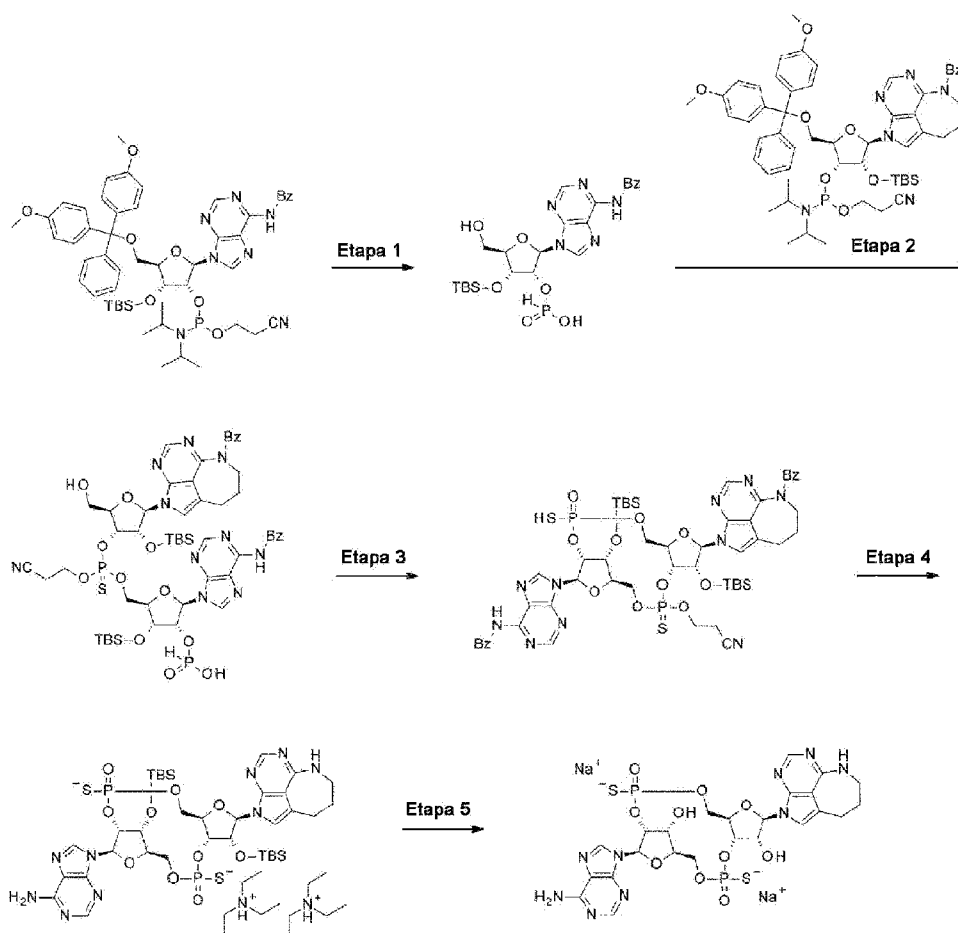
15 (5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-7-(6-Amino-9H-purin-9-yl)-15,16-dihidroxi-2,10-bis(sulfanil)-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzoc[d]azulen-2-yl)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidofosfaciclotetradecin-2,10-diona

(Diastereómero 4 del compuesto 1 descrito en el ejemplo 1)



2a (Diastereómero 4 de 1)

20 [Esquema de síntesis]



(Etapa 1)

N-Benzoil-3'-O-[terc-butil(dimetil)silil]-2'-O-[hidroxi(oxo)-λ⁵-fosfanil]adenosina

- 5 Usando N-benzoil-5'-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-3'-O-[terc-butil(dimetil)silil]-2'-O-[(2-cianoetoxi)[di(propan-2-il)amino]fosfanil]adenosina (962 mg) disponible en el mercado (ChemGenes Corporation), la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 7 del ejemplo 1 para obtener una solución de acetonitrilo del compuesto del título. Esta solución de acetonitrilo se utilizó directamente para la reacción posterior.

(Etapa 2)

- 10 Usando el compuesto obtenido en la etapa 1 y el compuesto obtenido en la etapa 6 del ejemplo 1 (1,00 g), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 8 del ejemplo 1. El producto bruto resultante se utilizó directamente para la reacción posterior.

(Etapa 3)

- 15 N-{9-[(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-14-(6-Benzoil-6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)-15,16-bis[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-2-(2-cianoetoxi)-10-oxo-10-sulfanil-2-sulfanilidenoctahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxadifosfaciotetradecin-7-il]-9H-purin-6-il}benzamida

Usando el producto bruto obtenido en la etapa 2, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 9 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (367 mg) en forma de una mezcla de diastereómeros en el átomo de fósforo.

MS(ESI) m/z: 1219 (M+H)⁺.

- 20 (Etapa 4)

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-7-(6-Amino-9H-purin-9-il)-15,16-bis[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxadifosfaciotetradecin-2,10-bis(tiolato) de bis(N,N-dietiletanaminio)

Usando el compuesto obtenido en la etapa 3 (367 mg), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 10 del ejemplo 1 para obtener el diastereómero 1 (115 mg: con impurezas) y el diastereómero 4 (101 mg: con impurezas) del compuesto del título.

Diastereómero 1 (menos polar)

5 MS(ESI) m/z: 958 (M+H)⁺.

Diastereómero 4 (más polar)

MS(ESI) m/z: 958 (M+H)⁺.

(Etapa 5)

10 (5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-7-(6-Amino-9H-purin-9-yl)-15,16-dihidroxi-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-yl)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-I][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxadifosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) disódico

(Diastereómero 4 del compuesto 1)

15 Usando el compuesto obtenido en la etapa 4 (diastereómero 4) (101 mg: con impurezas), la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 11 del ejemplo 1, y la purificación se realizó a continuación según las siguientes condiciones de purificación para obtener el compuesto del título en forma de una sal de trietilamina.

[Condiciones de purificación] Cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo], HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 5 %-25 % (0 min-40 min)], y HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/metanol, metanol: del 5 %-100 % (0 min-40 min)].

20 La sal de trietilamina obtenida se sometió a intercambio de sales de la misma manera que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (28,5 mg).

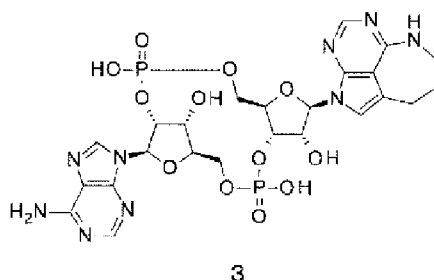
MS(ESI) m/z: 730 (M+H)⁺.

25 RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 9,11 (1H, s), 8,19 (1H, s), 8,02 (1H, s), 7,08 (1H, s), 6,35 (1H, d, J = 8,5 Hz), 6,27 (1H, d, J = 4,8 Hz), 5,43-5,36 (1H, m), 5,29-5,21 (1H, m), 4,95-4,88 (1H, m), 4,50-4,43 (1H, m), 4,42-4,33 (2H, m), 4,30-4,33 (2H, m), 4,30-4,22 (1H, m), 4,20-4,03 (2H, m), 3,52-3,46 (2H, m), 2,85-2,66 (2H, m), 2,05-1,90 (2H, m).

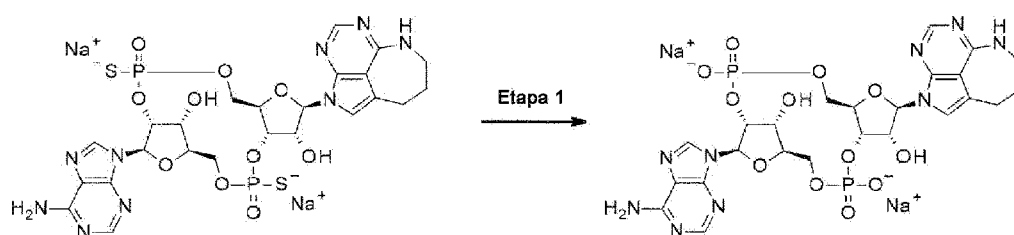
RMN de ³¹P (CD₃OD) δ: 58,1 (s), 54,1 (s).

Ejemplo 3: Síntesis de CDN3

30 (5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-7-(6-Amino-9H-purin-9-yl)-2,10,15,16-tetrahidroxi-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-yl)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-I][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxadifosfaciclotetradecin-2,10-diona



[Esquema de síntesis]



(Etapa 1)

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-7-(6-Amino-9H-purin-9-yl)-15,16-dihidroxi-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-yl)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-I][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidofosfaciclotetradecin-2,10-bis(olate) disódico

- 5 A una disolución del compuesto obtenido en la etapa 11 del ejemplo 1 (diastereómero 1) (30,0 mg) en acetona (0,5 ml)-agua (0,2 ml) se le añadieron trietilamina (0,27 ml) y yodometano (60 μl), y la mezcla de reacción se agitó durante 1 día. Tras concentrar la mezcla de reacción a presión reducida, se purificó mediante HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 0 %-20 % (0 min-40 min)]. El compuesto obtenido se sometió a intercambio salino del mismo modo que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en
- 10 la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (21,2 mg).

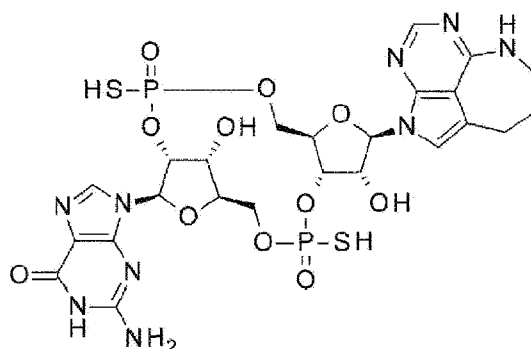
MS(ESI) m/z: 698 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,55 (1H, s), 8,18 (1H, s), 8,01 (1H, s), 7,32 (1H, s), 6,26 (1H, s), 6,13 (1H, s), 5,00-4,85 (2H, m), 4,68-4,64 (1H, m), 4,48-4,23 (5H, m), 4,15-4,04 (2H, m), 3,49-3,39 (2H, m), 2,90-2,66 (2H, m), 1,98-1,83 (2H, m).

RMN de ³¹P (CD₃OD) δ: -0,22 (s).

- 15 Ejemplo 4: Síntesis de CDN4

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-7-(2-Amino-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-yl)-15,16-dihidroxi-2,10-bis(sulfanil)-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-yl)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-I][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidofosfaciclotetradecin-2,10-diona



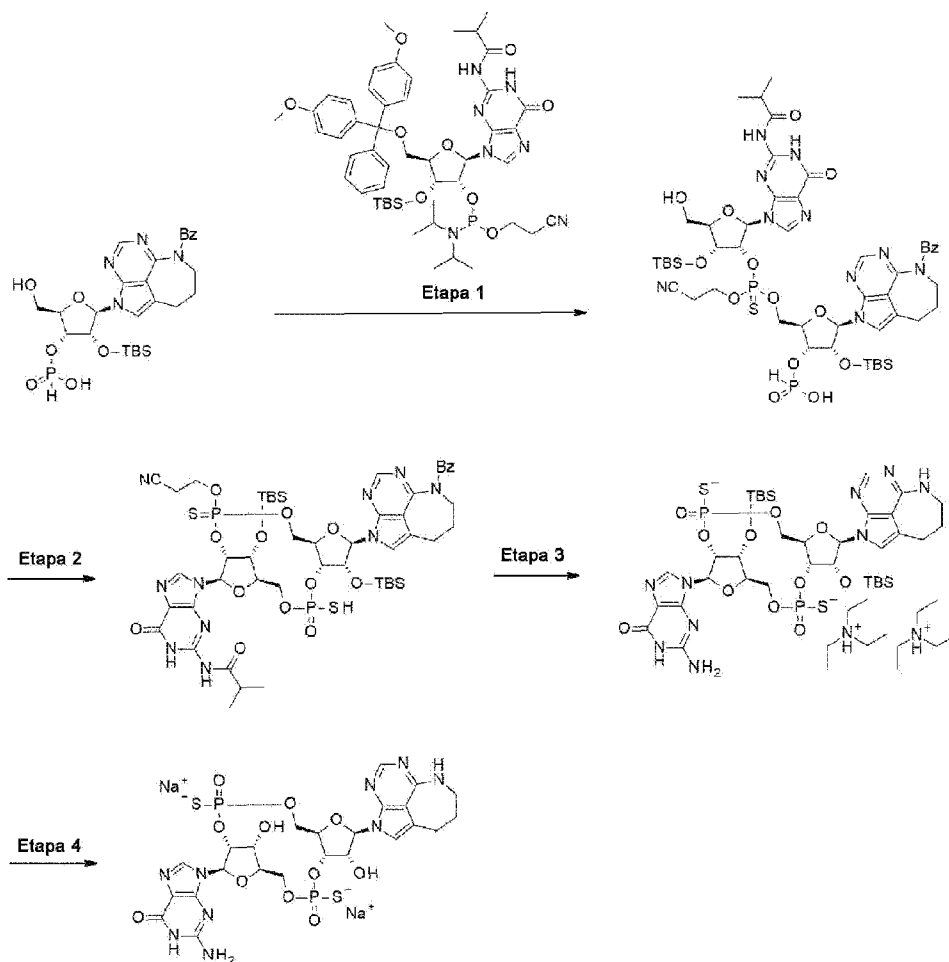
4

20

4a (Diastereómero 1)

4b (Diastereómero 2)

[Esquema de síntesis]



(Etapa 1)

La reacción de la etapa 7 del ejemplo 1 se realizó en la siguiente escala (materia prima: 1,01 g). Utilizando una solución de acetonitrilo del compuesto obtenido y disponible en el mercado (Wuhu Nuowei Chemistry Co, Ltd.) 5'-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-3'-O-[terc-butil(dimetil)silil]-2'-O-[(2-cianoetoxi)[di(propan-2-il)amino]fosfanil]-N-(2-metilpropanoil)guanosina (954 mg), la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 8 del ejemplo 1. El producto bruto resultante se utilizó directamente para la reacción posterior.

(Etapa 2)

N-{9-[(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-14-(6-Benzoil-6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)-15,16-bis[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-10-(2-cianoetoxi)-2-oxo-2-sulfanil-10-sulfanilidenoctahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfacilotetradecin-7-il]-6-oxo-6,9-dihidro-1H-purin-2-il}-2-metilpropanamida

Usando el producto bruto obtenido en la etapa 1, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 9 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (357 mg) en forma de una mezcla de diastereómeros en el átomo de fósforo.

MS(ESI) m/z: 1201 (M+H)⁺.

(Etapa 3)

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-7-(2-Amino-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il)-15,16-bis[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfacilotetradecin-2,10-bis(tiolato) de bis(N,N-dietiletanaminio)

Usando el compuesto obtenido en la etapa 3 (357 mg), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 10 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (241 mg) en forma de una mezcla de diastereómeros en el átomo de fósforo.

MS(ESI) m/z: 974 (M+H)⁺.

(Etapa 4)

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-7-(2-Amino-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il)-15,16-dihidroxi-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidofosfacilotetradecin-2,10-bis(tiolato) disódico

Usando el compuesto obtenido en la etapa 3 (241 mg), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 11 del ejemplo 1, y los diastereómeros en el átomo de fósforo se separaron con las siguientes condiciones de purificación para proporcionar dos diastereómeros del compuesto del título en forma de sales de trietilamina.

[Condiciones de purificación] Cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo] y HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 5 %-20 % (0 min-40 min)].

Las sales de trietilamina obtenidas se sometieron cada una a intercambio salino de la misma manera que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el diastereómero 1 (56,7 mg) y el diastereómero 2 (25,9 mg) del compuesto del título (tiempo de retención en HPLC: diastereómero 1 > 2).

Diastereómero 1 (menos polar)

MS(ESI) m/z: 746 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,03 (1H, s), 8,00 (1H, s), 7,11 (1H, s), 6,27 (1H, d, J = 3,0 Hz), 5,99 (1H, d, J = 8,5 Hz), 5,67-5,61 (1H, m), 5,27-5,21 (1H, m), 4,85 (1H, d, J = 3,6 Hz), 4,73 (1H, dd, J = 3,9, 2,0 Hz), 4,48-4,39 (2H, m), 4,38-4,30 (2H, m), 4,18-4,08 (2H, m), 3,51-3,45 (2H, m), 2,80-2,71 (1H, m), 2,63-2,53 (1H, m), 2,02-1,84 (2H, m).

RMN de ³¹P (CD₃OD) δ: 57,6 (s), 53,5 (s).

Diastereómero 2 (más polar)

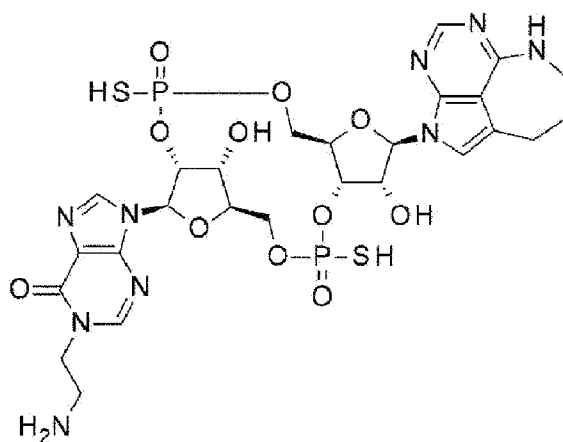
MS(ESI) m/z: 746 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,20 (1H, s), 8,01 (1H, s), 7,19 (1H, s), 6,32 (1H, d, J = 6,0 Hz), 6,05 (1H, d, J = 8,5 Hz), 5,67-5,53 (1H, m), 5,47-5,40 (1H, m), 4,77-4,71 (1H, m), 4,51-4,46 (1H, m), 4,45-4,30 (3H, m), 4,28-4,25 (1H, m), 4,19-4,08 (1H, m), 3,96-3,89 (1H, m), 3,53-3,46 (2H, m), 2,92-2,79 (2H, m), 2,05-1,93 (2H, m).

RMN de ³¹P (CD₃OD) δ: 61,7 (s), 59,5 (s).

Ejemplo 5: Síntesis de CDN5

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-7-[1-(2-Aminoetil)-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il]-15,16-dihidroxi-2,10-bis(sulfanil)-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidofosfacilotetradecin-2,10-diona

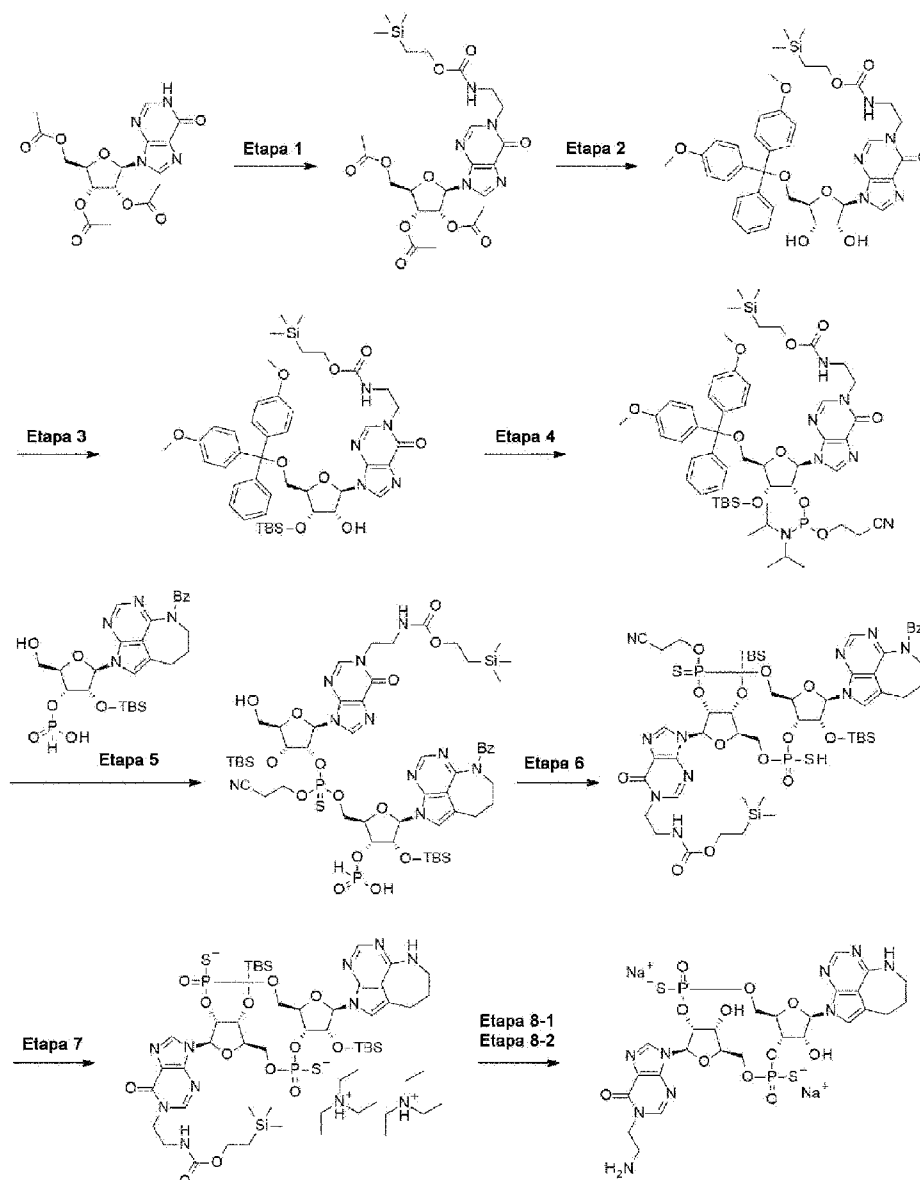


5

5a (Diastereómero 1)

5b (Diastereómero 2)

[Esquema de síntesis]



(Etapa 1)

2',3',5'-Tri-O-acetil-1-[2-((2-(trimetilsilil)etoxi)carbonil)amino]etil]inosina

- 5 A una suspensión de 2',3',5'-tri-O-acetilinosina (5,00 g) en tetrahidrofurano (90 ml) se le añadieron (2-hidroxietil)carbamato de 2-(trimetilsilil)etilo (3,12 g) y trifetilfosfina (3,99 g), y se añadió una solución de (E)-diazen-1,2-dicarboxilato de dipropán-2-ilo (3,05 ml) en tetrahidrofurano (10 ml), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15 horas. Tras concentrar la mezcla de reacción a presión reducida, el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo/metanol] para obtener el compuesto del título (3,01 g).

- 10 MS(ESI) m/z: 582 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 7,96 (1H, s), 7,93 (1H, s), 6,10 (1H, d, J = 4,8 Hz), 5,86 (1H, t, J = 5,4 Hz), 5,58 (1H, t, J = 5,1 Hz), 4,96 (1H, t, J = 7,3 Hz), 4,47-4,40 (2H, m), 4,36 (1H, dd, J = 13,0, 5,1 Hz), 4,24 (2H, t, J = 5,4 Hz), 4,15 (2H, t, J = 8,8 Hz), 3,55 (2H, q, J = 6,0 Hz), 2,15 (3H, s), 2,13 (3H, s), 2,10 (3H, s), 0,97 (2H, t, J = 8,8 Hz), 0,03 (9H, s).

(Etapa 2)

- 15 5'-O-[Bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-1-[2-((2-(trimetilsilil)etoxi)carbonil)amino]etil]inosina

A una disolución del compuesto obtenido en la etapa 1 (3,01 g) en tetrahidrofurano (15 ml)-metanol (15 ml) se le añadió carbonato de potasio (100 mg), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Se añadió

ácido acético (83 µl) a la mezcla de reacción, que se concentró a presión reducida, y el residuo se destiló azeotrópicamente con piridina. El producto resultante se disolvió de nuevo en piridina (30 ml), a la que se añadió cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (2,10 g) a 0 °C, y la mezcla de reacción se agitó durante 30 minutos y después se guardó en nevera toda la noche. Se añadió metanol (1 ml) a la mezcla de reacción, que se agitó durante 30 minutos, y después se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo/metanol/trietilamina al 0,1 %] para obtener el compuesto del título (3,61 g).

MS(ESI) m/z: 758 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 7,92 (1H, s), 7,76 (1H, s), 7,37 (2H, d, J = 7,3 Hz), 7,29-7,14 (7H, m), 6,78 (4H, d, J = 8,5 Hz), 5,94 (1H, d, J = 5,4 Hz), 5,63 (1H, s), 4,81-4,74 (1H, m), 4,46-4,41 (1H, m), 4,36-4,31 (1H, m), 4,19-4,05 (4H, m), 3,76 (6H, s), 3,52-3,44 (2H, m), 3,44-3,31 (2H, m), 0,99-0,91 (2H, m), 0,02 (9H, s) (sólo se muestran los picos observables)

(Etapa 3)

5'-O-[Bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-3'-O-[terc-butil(dimetil)silil]-1-[2-((2-(trimetilsilil)etoxi)carbonil)amino)etil]inosina

A una solución del compuesto obtenido en la etapa 2 (3,61 g) en diclorometano (18 ml) se le añadieron imidazol (811 mg) y terc-butil(cloro)dimetilsilano (861 mg), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 17 horas. Se añadió una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio a la mezcla de reacción, que se sometió a extracción con diclorometano. Tras secar la capa orgánica sobre sulfato de sodio anhidro, se eliminó el agente desecante por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo/trietilamina al 0,1 %] para obtener el compuesto del título (1,61 g) y 5'-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-2'-O-[terc-butil(dimetil)silil]-1-[2-(2-(trimetilsilil)etoxi)carbonil)amino)etil]inosina (1,31 g) en forma de un regioisómero del compuesto del título.

MS(ESI) m/z: 872 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 7,98 (1H, s), 7,85 (1H, s), 7,39 (2H, d, J = 7,9 Hz), 7,32-7,15 (7H, m), 6,78 (4H, d, J = 9,1 Hz), 5,93 (1H, d, J = 4,8 Hz), 5,22-5,11 (1H, m), 4,60 (1H, q, J = 5,6 Hz), 4,47 (1H, t, J = 4,2 Hz), 4,28-4,08 (5H, m), 3,77 (6H, s), 3,59-3,49 (2H, m), 3,45 (1H, dd, J = 10,3, 3,0 Hz), 3,26 (1H, dd, J = 10,3, 3,9 Hz), 3,15-3,08 (1H, m), 0,95 (2H, t, J = 8,5 Hz), 0,88 (9H, s), 0,07 (3H, s), 0,02 (9H, s), 0,00 (3H, s).

Regioisómero (forma 2'-O-TBS)

MS(ESI) m/z: 872 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 7,99 (1H, s), 7,82 (1H, s), 7,46-7,41 (2H, m), 7,35-7,19 (7H, m), 6,84-6,78 (4H, m), 5,98 (1H, d, J = 5,4 Hz), 5,06-4,96 (1H, m), 4,84 (1H, t, J = 5,4 Hz), 4,34-4,08 (6H, m), 3,78 (6H, s), 3,54 (2H, q, J = 5,8 Hz), 3,48 (1H, dd, J = 10,6, 2,7 Hz), 3,39 (1H, dd, J = 10,6, 3,9 Hz), 2,71 (1H, d, J = 4,2 Hz), 0,99-0,91 (2H, m), 0,85 (9H, s), 0,03 (9H, s), 0,02 (3H, s), -0,12 (3H, s).

(Etapa 4)

5'-O-[Bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-3'-O-[terc-butil(dimetil)silil]-2'-O-((2-cianoetoxi)[di(propan-2-il)amino]fosfanil)-1-[2-((2-(trimetilsilil)etoxi)carbonil)amino)etil]inosina

A una disolución del compuesto obtenido en la etapa 3 (1,61 g) en diclorometano (18,5 ml) se le añadieron 4,5-dicianimidazol (240 mg) y N,N,N',N'-tetraisopropilfosforodiamidita de 2-cianoetilo (0,703 ml), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15 horas. Se añadió a la mezcla de reacción una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio para inactivar la reacción. Tras someter la mezcla de reacción a extracción con diclorometano, la capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El agente desecante se eliminó por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice DIOL [hexano/acetato de etilo] para obtener el compuesto del título (1,95 g) en forma de una mezcla de diastereómeros en el átomo de fósforo (proporción de diastereómeros = 61:39).

MS(ESI) m/z: 1072 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 8,04 (0,39H, s), 7,99 (0,61H, s), 7,83 (0,39H, s), 7,82 (0,61H, s), 7,42 (2H, d, J = 7,3 Hz), 7,35-7,15 (7H, m), 6,85-6,77 (4H, m), 6,15 (0,61H, d, J = 6,0 Hz), 6,09 (0,39H, d, J = 4,8 Hz), 5,34-5,24 (0,61H, m), 5,12-5,03 (0,39H, m), 4,86-4,76 (0,39H, m), 4,72-4,62 (0,61H, m), 4,47-4,42 (0,39H, m), 4,42-4,36 (0,69H, m), 4,31-4,05 (6H, m), 3,78 (6H, s), 3,78-3,65 (1H, m), 3,61-3,39 (7H, m), 3,35 (0,61H, dd, J = 10,6, 3,9 Hz), 3,28 (0,39H, dd, J = 10,9, 4,2 Hz), 2,49 (0,78H, t, J = 6,0 Hz), 2,29 (1,22H, t, J = 5,7 Hz), 1,30-0,94 (12H, m), 0,85 (5,49H, s), 0,84 (3,51H, s), 0,09 (1,17H, s), 0,08 (1,83H, s), 0,03 (9H, s), 0,02 (1,83H, s), 0,00 (1,17H, s).

(Etapa 5)

Se realizó la misma reacción que en la etapa 7 del ejemplo 1 con la siguiente escala (materia prima: 910 mg). Utilizando una solución de acetonitrilo del compuesto obtenido y del compuesto obtenido en la etapa 4 (950 mg), la reacción se

llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 8 del ejemplo 1. El producto bruto resultante se utilizó directamente para la reacción posterior.

(Etapa 6)

5 (2-{9-[(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-14-(6-Benzoi-6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)-15,16-bis[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-10-(2-cianoetoxi)-2-oxo-2-sulfanil-10-sulfanilidenoctahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2 λ^5 ,10 λ^5 -furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxadifosfaciclotetradecin-7-il]-6-oxo-6,9-dihidro-1H-purin-1-il]etil)carbamato de 2-(trimetilsilil)etilo

10 Usando el producto bruto obtenido en la etapa 5, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 9 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (602 mg) en forma de una mezcla de diastereómeros en el átomo de fósforo.

MS(ESI) m/z: 1303 (M+H)⁺.

(Etapa 7)

15 (5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-15,16-Bis[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-2,10-dioxo-7-{6-oxo-1-[2-({[2-(trimetilsilil)etoxi]carbonil]amino)etil]-1,6-dihidro-9H-purin-9-il]-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2 λ^5 ,10 λ^5 -furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxadifosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) de bis(N,N-dietiletanaminio)

Usando el compuesto obtenido en la etapa 6 (602 mg), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 10 del ejemplo 1 para obtener el diastereómero 1 (205 mg; con impurezas) y el diastereómero 2 (244 mg; con impurezas) del compuesto del título.

20 Diastereómero 1 (menos polar)

MS(ESI) m/z: 1146 (M+H)⁺.

Diastereómero 2 (más polar)

MS(ESI) m/z: 1146 (M+H)⁺.

(Etapa 8-1)

25 (5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-7-[1-(2-Aminoetil)-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il]-15,16-dihidroxi-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2 λ^5 ,10 λ^5 -furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxadifosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) disódico (Diastereómero 1)

30 Se añadió trifluorhidrato de trietilamina (1,31 ml) al compuesto obtenido en la etapa 7 (diastereómero 1) (145 mg; con impurezas), y la mezcla de reacción se agitó a 45 °C durante 3 horas. A la mezcla de reacción se le añadió una mezcla enfriada con hielo de una solución 1 M de hidrogenocarbonato de trietilamonio (10 ml) y trietilamina (2 ml). La mezcla de reacción se concentró a presión reducida y se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo]. A una solución del compuesto obtenido en tetrahydrofurano (4 ml) se le añadió una solución en tetrahydrofurano de fluoruro de tetrabutilamonio (aproximadamente 1 M, 2 ml), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 39 horas. A la mezcla de reacción se le

35 añadió una solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio (4 ml), y la mezcla de reacción se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo] y HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 5 %-50 % (0 min-40 min)]. El intercambio salino se realizó de la misma manera que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1, excepto que en el

40 intercambio salino para el compuesto obtenido (sal de trietilamina), se utilizó una solución mixta de acetonitrilo-metanol-agua pura (1:1:1) como disolvente y eluyente para disolver el compuesto, para obtener el compuesto del título (72,5 mg).

MS(ESI) m/z: 774 (M+H)⁺.

45 RMN de ¹H (CD₃OD) δ : 8,60 (1H, s), 8,15 (1H, s), 8,02 (1H, s), 7,11 (1H, s), 6,26 (1H, d, J = 4,8 Hz), 6,24 (1H, t, J = 5,1 Hz), 5,47 (1H, dt, J = 8,2, 4,2 Hz), 5,23-5,17 (1H, m), 4,77-4,73 (2H, m), 4,52-4,44 (2H, m), 4,36-4,19 (3H, m), 4,14-4,02 (3H, m), 3,48 (2H, t, J = 4,8 Hz), 3,31-3,26 (2H, m), 2,90-2,74 (2H, m), 2,01-1,93 (2H, m). RMN de ³¹P (CD₃OD) δ : 57,7 (s), 54,7 (s).

(Etapa 8-2)

50 (5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-7-[1-(2-Aminoetil)-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il]-15,16-dihidroxi-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2 λ^5 ,10 λ^5 -furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxadifosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) disódico (Diastereómero 2)

Usando el compuesto obtenido en la etapa 7 (diastereómero 2) (133 mg: con impurezas), la reacción y el intercambio de sales se realizaron de la misma manera que en la etapa 8-1 para obtener el compuesto del título (55,4 mg).

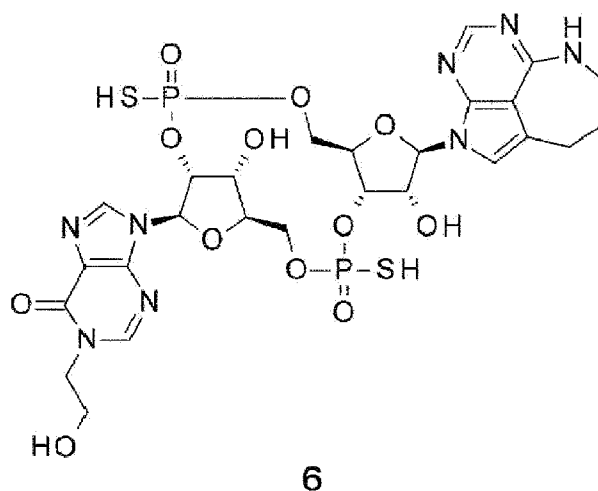
MS(ESI) m/z : 774 (M+H)⁺.

5 RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,72 (1H, s), 8,25 (1H, s), 8,02 (1H, s), 7,11 (1H, s), 6,31 (1H, d, J = 6,7 Hz), 6,28 (1H, d, J = 8,5 Hz), 5,47-5,38 (2H, m), 4,77 (1H, dd, J = 6,7, 4,2 Hz), 4,48 (1H, d, J = 4,2 Hz), 4,46-4,37 (2H, m), 4,37-4,29 (3H, m), 4,27-4,18 (1H, m), 4,08-4,02 (1H, m), 3,92-3,85 (1H, m), 3,53-3,46 (2H, m), 3,28-3,23 (2H, m), 2,93-2,86 (2H, m), 2,04-1,96 (2H, m).

RMN de ³¹P (CD₃OD) δ: 62,6 (s), 60,0 (s).

Ejemplo 6: Síntesis de CDN6

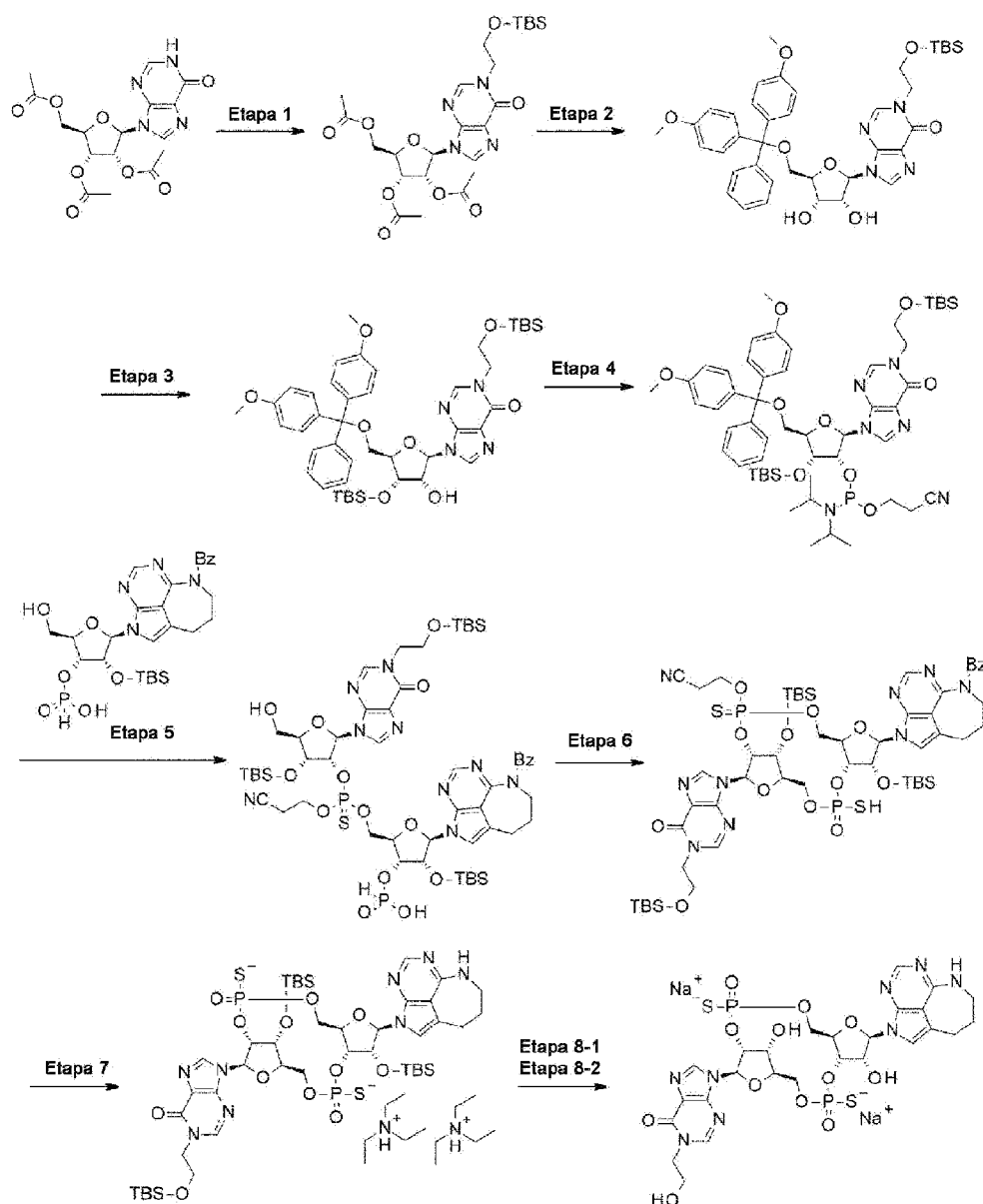
10 (5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-15,16-Dihidroxi-7-[1-(2-hidroxietil)-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-yl]-2,10-bis(sulfanil)-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-yl)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-diona



6a (Diastereómero 1)

6b (Diastereómero 2)

[Esquema de síntesis]



(Etapa 1)

2',3',5'-Tri-O-acetil-1-(2-[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]etil)inosina

- 5 A una suspensión de 2',3',5'-tri-O-acetilinosina (10,0 g) disponible en el mercado (Ark Pharm, Inc.) en tetrahidrofurano (100 ml) se le añadieron 2-[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]etan-1-ol (5,37 g) y trifenilfosfina (7,69 g) y, a continuación, se añadió (E)-diazeno-1,2-dicarboxilato de dipropan-2-ilo (6,10 ml), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 6 horas. Tras concentrar la mezcla de reacción a presión reducida, el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo/diclorometano] para obtener el compuesto del título como mezcla (10,6 g) con óxido de trifenilfosfina.

- 10 MS(ESI) m/z: 553 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 8,05 (1H, s), 7,92 (1H, s), 6,12 (1H, d, J = 5,4 Hz), 5,86 (1H, t, J = 5,4 Hz), 5,59 (1H, dd, J = 5,4, 4,2 Hz), 4,47-4,41 (2H, m), 4,38-4,31 (1H, m), 4,22-4,17 (2H, m), 3,89 (2H, t, J = 4,8 Hz), 2,15 (3H, s), 2,14 (3H, s), 2,08 (3H, s), 0,83 (9H, s), -0,06 (3H, s), -0,06 (3H, s).

(Etapa 2)

- 15 5'-O-[Bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-1-(2-[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]etil)inosina

Usando el compuesto obtenido en la etapa 1 (10,6 g), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 2 del ejemplo 5 para obtener el compuesto del título en forma de una mezcla (7,21 g) con óxido de trifenilfosfina.

MS(ESI) m/z: 729 (M+H)⁺.

- 5 RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 8,01 (1H, s), 7,97 (1H, s), 7,35-7,30 (2H, m), 7,25-7,17 (7H, m), 6,81-6,76 (4H, m), 5,95 (1H, d, J = 5,4 Hz), 5,13 (1H, sa), 4,68-4,61 (1H, m), 4,43-4,36 (2H, m), 4,31-4,23 (1H, m), 4,15-4,08 (1H, m), 3,89 (2H, t, J = 4,5 Hz), 3,77 (6H, s), 3,42 (1H, dd, J = 10,3, 3,6 Hz), 3,34 (1H, dd, J = 10,3, 3,6 Hz), 3,10 (1H, sa), 0,83 (9H, s), -0,06 (3H, s), -0,07 (3H, s).

(Etapa 3)

5'-O-[Bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-3'-O-[terc-butil(dimetil)silil]-1-(2-[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]etil)inosina

- 10 Usando el compuesto obtenido en la etapa 2 (7,21 g), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 3 del ejemplo 5 para obtener el compuesto del título (2,17 g) y 5'-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-2'-O-[terc-butil(dimetil)silil]-1-(2-[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]etil)inosina (2,55 g) en forma de un regioisómero del compuesto del título.

MS(ESI) m/z: 843 (M+H)⁺.

- 15 RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 7,99 (1H, s), 7,97 (1H, s), 7,43-7,39 (2H, m), 7,33-7,19 (7H, m), 6,83-6,77 (4H, m), 5,96 (1H, d, J = 4,2 Hz), 4,56-4,50 (2H, m), 4,33-4,25 (1H, m), 4,19-4,02 (2H, m), 3,89 (2H, t, J = 4,8 Hz), 3,78 (6H, s), 3,45 (1H, dd, J = 10,9, 4,2 Hz), 3,27 (1H, dd, J = 10,9, 4,2 Hz), 3,03 (1H, d, J = 6,0 Hz), 0,88 (9H, s), 0,82 (9H, s), 0,07 (3H, s), -0,01 (3H, s), -0,07 (3H, s), -0,07 (3H, s).

Regioisómero (forma 2'-O-TBS)

- 20 MS(ESI) m/z: 843 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 7,98 (1H, s), 7,94 (1H, s), 7,46-7,42 (2H, m), 7,35-7,20 (7H, m), 6,85-6,79 (4H, m), 5,99 (1H, d, J = 5,4 Hz), 4,83 (1H, t, J = 5,1 Hz), 4,33-4,29 (1H, m), 4,27-4,24 (1H, m), 4,24-4,12 (2H, m), 3,90 (2H, t, J = 4,5 Hz), 3,79 (3H, s), 3,78 (3H, s), 3,48 (1H, dd, J = 10,3, 3,0 Hz), 3,40 (1H, dd, J = 10,3, 3,0 Hz), 2,71 (1H, dd, J = 3,6 Hz), 0,86 (9H, s), 0,83 (9H, s), 0,01 (3H, s), -0,07 (3H, s), -0,07 (3H, s), -0,11 (3H, s).

- 25 (Etapa 4)

5'-O-[Bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-3'-O-[terc-butil(dimetil)silil]-1-(2-[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]etil)-2'-O-((2-cianoetoxi)[di(propan-2-il)amino]fosfanil)inosina

- 30 Usando el compuesto obtenido en la etapa 3 (2,17 g), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 4 del ejemplo 5 para obtener el compuesto del título (2,65 g) en forma de una mezcla de diastereómeros en el átomo de fósforo.

MS(ESI) m/z: 1043 (M+H)⁺.

- 35 RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 8,03 (0,53H, s), 8,01 (0,47H, s), 7,97 (0,53H, s), 7,93 (0,47H, s), 7,45-7,41 (2H, m), 7,35-7,19 (7H, m), 6,83-6,78 (4H, m), 6,17 (0,53H, d, J = 4,2 Hz), 6,05 (0,47H, d, J = 4,2 Hz), 4,87-4,80 (0,47H, m), 4,64-4,58 (0,53H, m), 4,46-4,40 (1H, m), 4,30-4,05 (3H, m), 3,92-3,87 (2H, m), 3,78 (6H, s), 3,86-3,40 (5H, m), 3,33-3,24 (1H, m), 2,54 (0,94H, t, J = 6,0 Hz), 2,43 (1,06H, t, J = 6,7 Hz), 1,16-1,09 (9H, m), 1,01-0,97 (3H, m), 0,83 (4,23H, s), 0,83 (4,77H, s), 0,82 (9H, s), 0,07 (1,41H, s), 0,04 (1,59H, s), -0,02 (3H, s), -0,07 (1,41H, s), -0,08 (1,59H, s), -0,08 (3H, s).

(Etapa 5)

- 40 Se realizó la misma reacción que en la etapa 7 del ejemplo 1 con la siguiente escala (materia prima: 935 mg). Utilizando una solución de acetonitrilo del compuesto obtenido y del compuesto obtenido en la etapa 4 (950 mg), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 8 del ejemplo 1. El producto bruto resultante se utilizó directamente para la reacción posterior.

(Etapa 6)

- 45 3-((5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-14-(6-Benzoil-6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzoc[d]azulen-2-il)-15,16-bis[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-7-[1-(2-[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]etil)-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il]-2-oxo-2-sulfanil-10-sulfanilidenoctahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-I][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-10-il]oxi)propanonitrilo

Usando el producto bruto obtenido en la etapa 5, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 9 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (494 mg) en forma de una mezcla de diastereómeros en el átomo de fósforo.

- 50 MS(ESI) m/z: 1274 (M+H)⁺.

(Etapa 7)

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-15,16-Bis[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-7-[1-(2-[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]etil)-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il]-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidofosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) de bis(N,N-dietiletanaminio)

Usando el compuesto obtenido en la etapa 6 (494 mg), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 10 del ejemplo 1 para obtener el diastereómero 1 (88,5 mg: con impurezas) y el diastereómero 2 (70,7 mg: con impurezas) del compuesto del título.

Diastereómero 1 (menos polar)

MS(ESI) m/z: 1003 (M-C₆H₁₅Si+2H)⁺.

Diastereómero 2 (más polar)

MS(ESI) m/z: 1003 (M-C₆H₁₅Si+2H)⁺.

(Etapa 8-1)

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-15,16-Dihidroxi-7-[1-(2-hidroxietil)-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il]-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidofosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) disódico

(Diastereómero 1)

Usando el compuesto obtenido en la etapa 7 (diastereómero 1) (88,5 mg: con impurezas), la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 11 del ejemplo 1, y la purificación se realizó a continuación según las siguientes condiciones de purificación para obtener el compuesto del título en forma de una sal de trietilamina.

[Condiciones de purificación] Cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo] y HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 5 %-30 % (0 min-40 min)].

La sal de trietilamina obtenida se sometió a intercambio de sales de la misma manera que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (25,7 mg).

MS(ESI) m/z: 775 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,63 (1H, s), 8,22 (1H, s), 8,02 (1H, s), 7,11 (1H, s), 6,30-6,24 (2H, m), 5,46-5,37 (1H, m), 5,23-5,15 (1H, m), 4,83-4,79 (1H, m), 4,78-4,74 (1H, m), 4,53-4,42 (2H, m), 4,35-4,16 (3H, m), 4,16-3,97 (3H, m), 3,83-3,78 (2H, m), 3,52-3,47 (2H, m), 2,88-2,81 (2H, m), 2,03-1,95 (2H, m).

RMN de ³¹P (CD₃OD) δ: 57,8 (s), 54,4 (s).

(Etapa 8-2)

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-15,16-Dihidroxi-7-[1-(2-hidroxietil)-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il]-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidofosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) disódico

(Diastereómero 2)

Usando el compuesto obtenido en la etapa 7 (diastereómero 2) (70,7 mg: con impurezas), la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 11 del ejemplo 1, y la purificación se realizó a continuación según las siguientes condiciones de purificación para obtener el compuesto del título en forma de una sal de trietilamina.

[Condiciones de purificación] Cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo], HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 5 %-25 % (0 min-40 min)], y HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/metanol, metanol: del 15 %-70 % (0 min-40 min)].

La sal de trietilamina obtenida se sometió a intercambio de sales de la misma manera que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (17,8 mg).

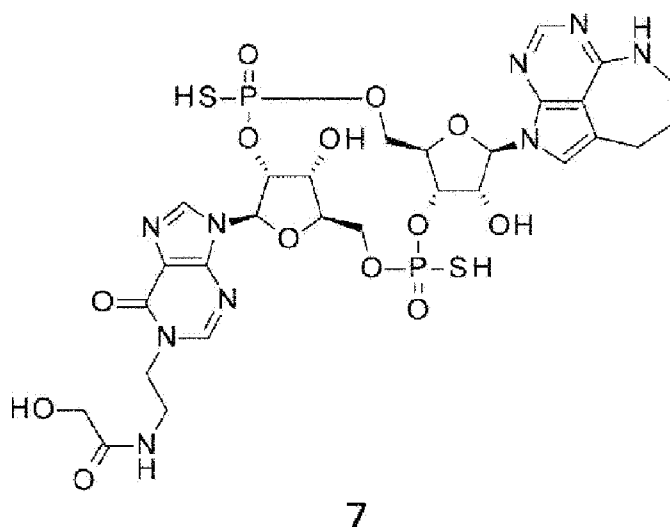
MS(ESI) m/z: 775 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,72 (1H, s), 8,23 (1H, s), 8,02 (1H, s), 7,11 (1H, s), 6,30 (2H, dd, J = 13,6, 7,6 Hz), 5,48-5,39 (2H, m), 4,78 (1H, dd, J = 6,7, 4,2 Hz), 4,51-4,28 (5H, m), 4,26-4,13 (2H, m), 4,06-4,00 (1H, m), 3,93-3,86 (1H, m), 3,85-3,80 (2H, m), 3,52-3,47 (2H, m), 2,94-2,88 (2H, m), 2,05-1,97 (2H, m).

RMN de ^{31}P (CD_3OD) δ : 62,9 (s), 60,0 (s).

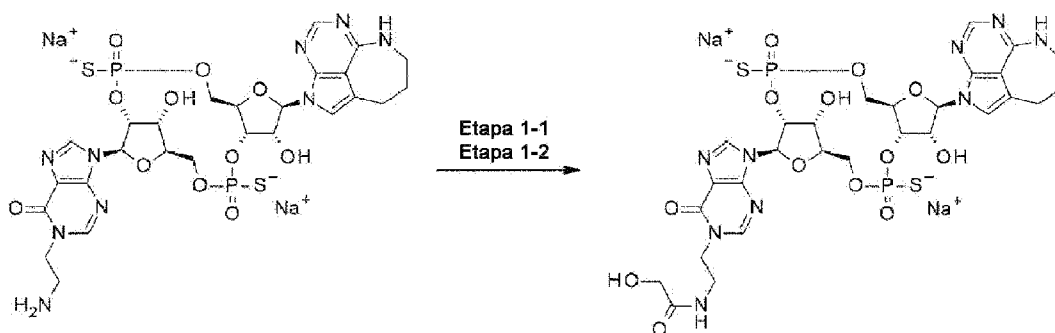
Ejemplo 7: Síntesis de CDN7

5 N-(2-{9-[(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-15,16-Dihidroxi-2,10-dioxo-2,10-bis(sulfanil)-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2 λ^5 ,10 λ^5 -furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidofosfacilotetradecin-7-il]-6-oxo-6,9-dihidro-1H-purin-1-il}etil)-2-hidroxiacetamida



7a (Diastereómero 1)
7b (Diastereómero 2)

10 [Esquema de síntesis]



(Etapa 1-1)

15 (5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-15,16-Dihidroxi-7-{1-[2-(2-hidroxiacetamida)etil]-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il}-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2 λ^5 ,10 λ^5 -furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidofosfacilotetradecin-2,10-bis(tiolato) disódico

(Diastereómero 1)

20 A una solución del compuesto obtenido en la etapa 8-1 del ejemplo 5 (10,0 mg) en N,N-dimetilformamida (0,5 ml) se le añadieron trietilamina (8 μl) y 1-[(hidroxiacetil)oxi]-2,5-diona (5,3 mg), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción se diluyó con una solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio y se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo] y HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 0 %-30 % (0 min-40 min)]. El compuesto obtenido (sal de trietilamina) se sometió a intercambio salino del mismo modo que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (10,5 mg).

25 MS(ESI) m/z: 832 (M+H) $^+$.

RMN de ^1H (CD_3OD) δ : 8,57 (1H, s), 8,04 (1H, s), 8,03 (1H, s), 7,13 (1H, s), 6,26 (1H, d, $J = 4,2$ Hz), 6,24-6,19 (1H, m), 5,57-5,49 (1H, m), 5,26-5,18 (1H, m), 4,80 (1H, d, $J = 3,6$ Hz), 4,76 (1H, t, $J = 4,5$ Hz), 4,51-4,41 (2H, m), 4,35-4,17 (3H, m), 4,11-3,95 (3H, m), 3,91 (2H, s), 3,62-3,55 (2H, m), 3,52-3,45 (2H, m), 2,89-2,65 (2H, m), 2,02-1,91 (2H, m).

5 RMN de ^{31}P (CD_3OD) δ : 57,6 (s), 54,3 (s).

(Etapa 1-2)

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-15,16-Dihidroxi-7-{1-[2-(2-hidroxiacetamida)etil]-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il]-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2 λ^5 ,10 λ^5 -furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciotetradecin-2,10-bis(tiolato) disódico

10 (Diastereómero 2)

Usando el compuesto obtenido en la etapa 8-2 (30,0 mg) del ejemplo 5, la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 1-1, y la purificación se realizó a continuación según las siguientes condiciones de purificación para obtener el compuesto del título en forma de una sal de trietilamina.

15 [Condiciones de purificación] Cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo] y HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 5 %-30 % (0 min-40 min)].

La sal de trietilamina obtenida se sometió a intercambio de sales de la misma manera que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (23,6 mg).

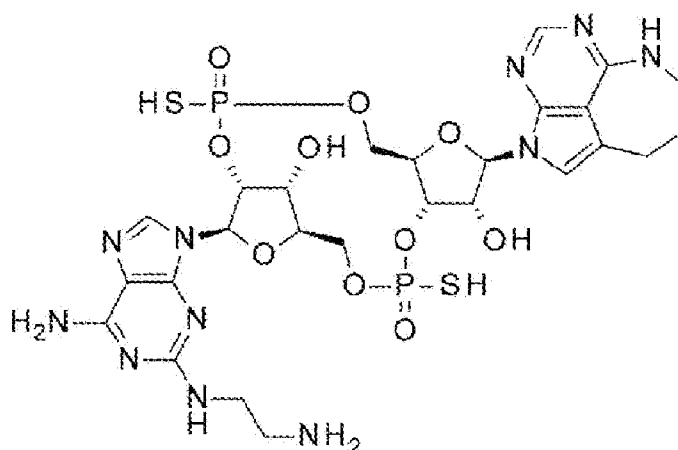
MS(ESI) m/z : 832 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

20 RMN de ^1H (CD_3OD) δ : 8,69 (1H, s), 8,14 (1H, s), 8,02 (1H, s), 7,11 (1H, s), 6,31 (1H, d, $J = 6,7$ Hz), 6,26 (1H, d, $J = 7,9$ Hz), 5,49-5,40 (2H, m), 4,77 (1H, dd, $J = 6,7, 4,8$ Hz), 4,48 (1H, d, $J = 4,2$ Hz), 4,46-4,28 (4H, m), 4,22 (2H, t, $J = 5,4$ Hz), 4,06-4,00 (1H, m), 3,94 (2H, s), 3,92-3,86 (1H, m), 3,70-3,55 (2H, m), 3,52-3,47 (2H, m), 2,92-2,86 (2H, m), 2,04-1,96 (2H, m).

RMN de ^{31}P (CD_3OD) δ : 62,7 (s), 59,9 (s).

25 Ejemplo 8: Síntesis de CDN8

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-7-{6-Amino-2-[(2-aminoetil)amino]-9H-purin-9-il}-15,16-dihidroxi-2,10-bis(sulfanil)-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2 λ^5 ,10 λ^5 -furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciotetradecin-2,10-diona



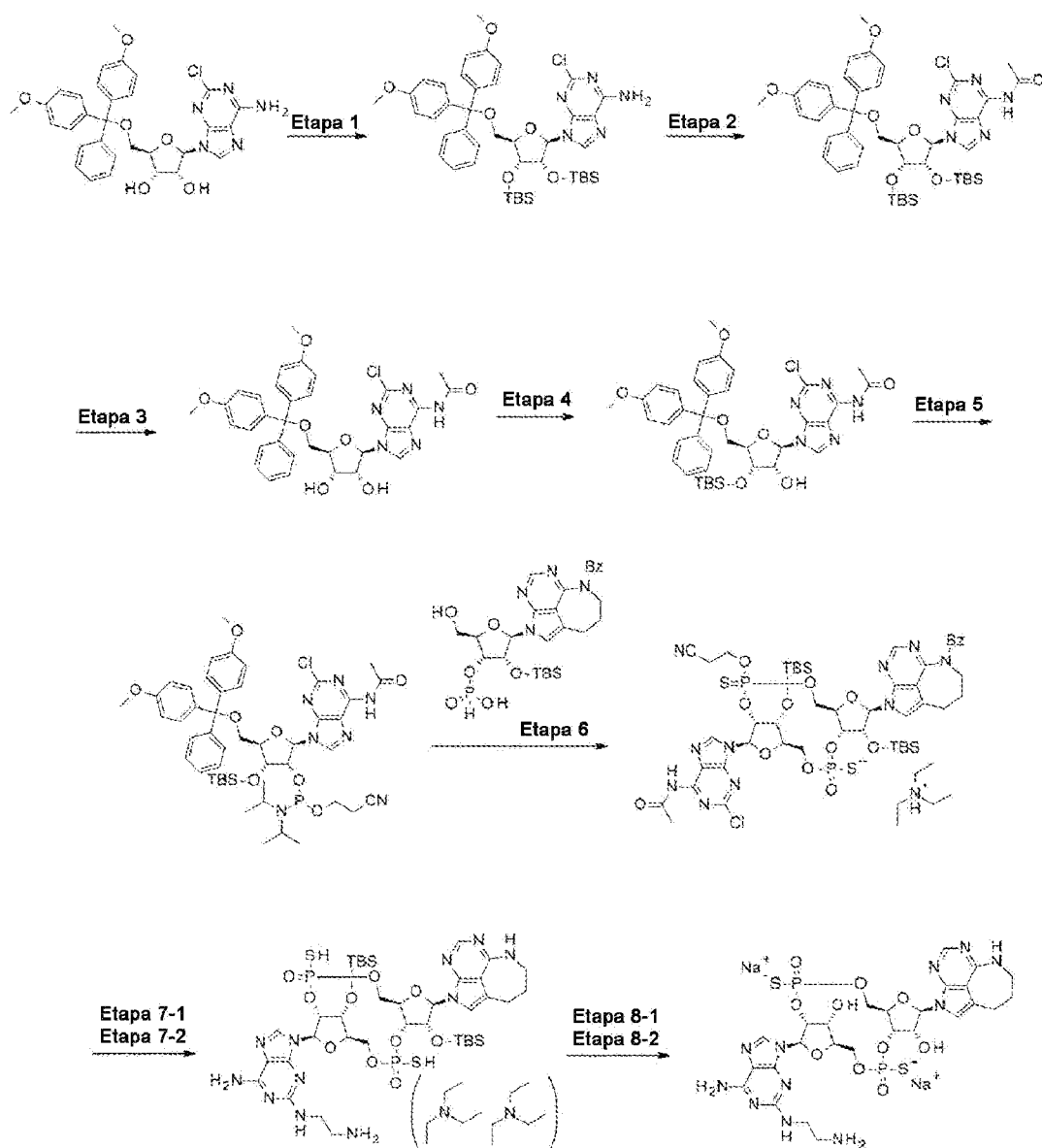
8

30

8a (Diastereómero 1)

8b (Diastereómero 2)

[Esquema de síntesis]



(Etapa 1)

5'-O-[Bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-2',3'-bis-O-[terc-butil(dimetil)silil]-2-cloroadenosina

- 5 A una solución de 5'-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-2-cloroadenosina (29,1 g) como compuesto conocido en la bibliografía (J. Med. Chem. 1989, 32, 1135-1140) en N,N-dimetilformamida (145 ml) se le añadieron imidazol (16,4 g) y terc-butildimetilclorosilano (18,2 g), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas. Tras añadir agua a la mezcla de reacción para inactivar la reacción, el producto resultante se sometió a extracción con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con salmuera y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El agente desecante se eliminó por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo/trietilamina al 0,1 %] para obtener el compuesto del título (34,9 g).

MS(ESI) m/z: 832 (M+H)⁺.

- 15 RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 8,02 (1H, s), 7,47-7,42 (2H, m), 7,36-7,32 (4H, m), 7,31-7,18 (3H, m), 6,84-6,79 (4H, m), 5,90 (1H, dd, J = 4,8 Hz), 5,72 (2H, sa), 4,74 (1H, dd, J = 4,5, 2,3 Hz), 4,25 (1H, dd, J = 4,2, 2,3 Hz), 4,21 (1H, qd, J = 4,2 Hz), 3,78 (6H, s), 3,58 (1H, dd, J = 10,9, 4,2 Hz), 3,33 (1H, dd, J = 10,9, 4,2 Hz), 0,84 (9H, s), 0,82 (9H, s), 0,04 (3H, s), -0,01 (3H, s), -0,02 (3H, s), -0,17 (3H, s).

(Etapa 2)

N-Acetil-5'-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-2',3'-bis-O-[terc-butil(dimetil)silil]-2-cloroadenosina

A una disolución del compuesto obtenido en la etapa 1 (34,9 g) en piridina (210 ml) se le añadieron anhídrido acético (140 ml) y 4-dimetilaminopiridina (515 mg), y la mezcla de reacción se agitó en una atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente durante 21 horas. Tras diluir la mezcla de reacción con diclorometano (100 ml), se añadió a la misma una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio, y la mezcla de reacción se sometió a extracción con diclorometano. Tras secar la capa orgánica sobre sulfato de sodio anhidro, se eliminó el agente desecante por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida. Se añadieron diclorometano (210 ml) y morfolina (7,30 ml) al residuo, y el producto resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se añadió una solución acuosa saturada de cloruro de amonio a la mezcla de reacción, que se sometió a extracción con diclorometano. Tras secar la capa orgánica sobre sulfato de sodio anhidro, se eliminó el agente desecante por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo/trietilamina al 0,1 %] para obtener el compuesto del título (45,4 g: con impurezas). El compuesto obtenido se utilizó directamente para la reacción posterior, sin más purificación.

RMN de ^1H (CDCl_3) δ : 8,95 (1H, sa), 8,22 (1H, s), 7,45-7,42 (2H, m), 7,34-7,20 (7H, m), 6,82 (4H, dq, $J = 9,4, 2,7$ Hz), 5,96 (1H, d, $J = 4,8$ Hz), 4,72-4,69 (1H, m), 4,23 (2H, sa), 3,79 (6H, s), 3,59 (1H, dd, $J = 10,9, 3,6$ Hz), 3,35 (1H, dd, $J = 10,3, 3,6$ Hz), 2,73 (3H, s), 0,83 (9H, s), 0,82 (9H, s), 0,04 (3H, s), 0,00 (3H, s), -0,03 (3H, s), -0,18 (3H, s).

(Etapa 3)

N-Acetil-5'-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-2-cloroadenosina

A una disolución del compuesto obtenido en la etapa 2 (45,4 g: con impurezas) en tetrahidrofurano (200 ml) se le añadió una disolución en tetrahidrofurano de fluoruro de tetrabutilamonio (aproximadamente 1,0 M, 100 ml), y la mezcla de reacción se agitó en una atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente durante 3 horas. Se añadió una solución acuosa saturada de cloruro de amonio a la mezcla de reacción, que se sometió a extracción con diclorometano. Tras secar la capa orgánica sobre sulfato de sodio anhidro, se eliminó el agente desecante por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [diclorometano/acetona/trietilamina al 0,1 %] para obtener el compuesto del título (23,0 g).

RMN de ^1H (CDCl_3) δ : 8,71 (1H, sa), 8,16 (1H, s), 7,28-7,16 (9H, m), 6,78-6,73 (4H, m), 5,99 (1H, d, $J = 5,4$ Hz), 4,86 (1H, t, $J = 5,1$ Hz), 4,49 (1H, dd, $J = 5,1, 2,7$ Hz), 4,39 (1H, q, $J = 3,2$ Hz), 3,78 (3H, s), 3,77 (3H, s), 3,42 (1H, dd, $J = 10,9, 3,6$ Hz), 3,35 (1H, dd, $J = 10,6, 3,3$ Hz), 2,66 (3H, s).

(Etapa 4)

N-Acetil-5'-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-3'-O-[terc-butil(dimetil)silil]-2-cloroadenosina

A una disolución del compuesto obtenido en la etapa 3 (23,0 g) en N,N-dimetilformamida (178 ml) se le añadieron imidazol (5,94 g) y terc-butildimetilclorosilano (6,44 g), y la mezcla de reacción se agitó en una atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente durante 18 horas. Se añadió una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio a la mezcla de reacción, que se sometió a extracción con diclorometano. Tras secar la capa orgánica sobre sulfato de sodio anhidro, se eliminó el agente desecante por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo/trietilamina al 0,1 %] para obtener el compuesto del título (9,01 g).

RMN de ^1H (CDCl_3) δ : 8,42 (1H, sa), 8,14 (1H, s), 7,38-7,35 (2H, m), 7,29-7,18 (7H, m), 6,80-6,76 (4H, m), 5,99 (1H, dd, $J = 4,2$ Hz), 4,71-4,66 (2H, m), 4,17-4,14 (1H, m), 3,78 (6H, s), 3,49 (1H, dd, $J = 10,6, 3,3$ Hz), 3,29 (1H, dd, $J = 10,9, 4,2$ Hz), 3,02 (1H, d, $J = 5,4$ Hz), 2,67 (3H, s), 0,89 (9H, s), 0,11 (3H, s), 0,02 (3H, s).

(Etapa 5)

N-Acetil-5'-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-3'-O-[terc-butil(dimetil)silil]-2-cloro-2'-O-[(2-cianoetoxi)di(propan-2-il)amino]fosfanil]adenosina

Usando el compuesto obtenido en la etapa 4 (9,01 g), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 6 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (10,6 g) en forma de una mezcla de diastereómeros en el átomo de fósforo (proporción de diastereómeros = 65:35). RMN de ^1H (CDCl_3) δ : 8,40 (1H, sa), 8,31 (0,35H, s), 8,25 (0,65H, s), 7,38 (2H, d, $J = 7,3$ Hz), 7,29-7,19 (7H, m), 6,80 (4H, dd, $J = 9,1, 2,4$ Hz), 6,27 (0,35H, d, $J = 3,0$ Hz), 6,13 (0,65H, d, $J = 3,6$ Hz), 4,88-4,83 (0,65H, m), 4,69-4,65 (0,35H, m), 4,56 (1H, t, $J = 4,8$ Hz), 4,23-4,17 (1H, m), 3,93-3,78 (1H, m), 3,78 (6H, s), 3,64-3,54 (4H, m), 3,33-3,28 (1H, m), 2,67 (3H, s), 2,56 (1,3H, t, $J = 6,3$ Hz), 2,52 (0,7H, t, $J = 6,3$ Hz), 1,16 (2,1H, d, $J = 7,3$ Hz), 1,14 (3,9H, d, $J = 6,0$ Hz), 1,12 (3,9H, d, $J = 6,0$ Hz), 1,02 (2,1H, d, $J = 6,7$ Hz), 0,83 (5,9H, s), 0,82 (3,1H, s), 0,10 (1,9H, s), 0,07 (1,1H, s), 0,01H (3H, s).

(Etapa 6)

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-7-(6-Acetamido-2-cloro-9H-purin-9-il)-14-(6-benzoil-6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazaenzo[cd]azulen-2-il)-15,16-bis[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-10-(2-cianoetoxi)-2-oxo-10-sulfanilidenoctahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2 λ^5 ,10 λ^5 -furo[3,2-I][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxadifosfaciotetradecin-2-tiolato de N,N-dietiletanaminio

Se realizó la misma reacción que en la etapa 7 del ejemplo 1 con la siguiente escala (materia prima: 2,06 g). Utilizando una solución de acetonitrilo del compuesto obtenido y el compuesto obtenido en la etapa 5 (1,98 g), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 8 del ejemplo 1 y la etapa 9 del ejemplo 1 para obtener el diastereómero 1 (180 mg) y el diastereómero 2 (167 mg: con impurezas) del compuesto del título.

5 Diastereómero 1 (menos polar)

MS(ESI) m/z: 1191 (M+H)⁺.

10 RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 9,10 (1H, s), 8,00 (1H, s), 7,40-7,36 (2H, m), 7,30-7,23 (4H, m), 6,38 (1H, d, J = 8,5 Hz), 6,35 (1H, d, J = 3,0 Hz), 5,67-5,60 (1H, m), 5,09-5,04 (1H, m), 4,72 (1H, d, J = 3,6 Hz), 4,50-4,29 (8H, m), 4,07 (1H, dd, J = 12,4, 4,5 Hz), 3,91-3,83 (1H, m), 3,54-3,45 (1H, m), 3,17 (6H, q, J = 7,3 Hz), 3,08 (2H, t, J = 6,0 Hz), 2,45-2,42 (2H, m), 2,42 (3H, s), 2,28-2,23 (2H, m), 1,29 (9H, t, J = 7,3 Hz), 1,01 (9H, s), 0,90 (9H, s), 0,29 (3H, s), 0,28 (3H, s), 0,25 (3H, s), 0,10 (3H, s).

Diastereómero 2 (más polar)

MS(ESI) m/z: 1191 (M+H)⁺.

(Etapa 7-1)

15 (5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-7-{6-Amino-2-[(2-aminoetil)amino]-9H-purin-9-il}-15,16-bis[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-2,10-bis(sulfanil)-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfacilotetradecin-2,10-diona

20 A una solución del compuesto obtenido en la etapa 6 (diastereómero 1) (49,6 mg) en metanol (1,28 ml) se le añadió etilendiamina (256 µl), y la mezcla de reacción se agitó a 60 °C durante 2 horas, y después se hizo reaccionar usando un reactor de microondas a 120 °C durante 2 horas. El producto resultante se purificó por HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 40 %-70 % (0 min-30 min)] para obtener el compuesto del título (37,2 mg).

MS(ESI) m/z: 1016 (M+H)⁺.

25 RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,27 (1H, s), 7,99 (1H, s), 7,16 (1H, s), 6,25 (1H, d, J = 4,2 Hz), 6,09 (1H, d, J = 8,5 Hz), 5,41-5,35 (1H, m), 5,12-5,08 (1H, m), 4,86-4,80 (2H, m), 4,69 (1H, t, J = 4,5 Hz), 4,51-4,45 (1H, m), 4,29-4,23 (2H, m), 4,11-4,03 (2H, m), 3,51-3,44 (4H, m), 3,13-3,04 (2H, m), 2,80-2,76 (2H, m), 2,02-1,92 (2H, m), 0,99 (9H, s), 0,84 (9H, s), 0,32 (3H, s), 0,29 (3H, s), 0,24 (3H, s), 0,07 (3H, s).

(Etapa 7-2)

30 (5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-7-{6-Amino-2-[(2-aminoetil)amino]-9H-purin-9-il}-15,16-bis[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfacilotetradecin-2,10-bis(tiolato) de bis(N,N-dietiletanaminio)

35 A una solución del compuesto obtenido en la etapa 6 (diastereómero 2) (50,0 mg: con impurezas) en metanol (1,29 ml) se le añadió etilendiamina (25,8 µl), y la mezcla de reacción se agitó a 60 °C durante 2 horas, y después se hizo reaccionar usando un reactor de microondas a 120 °C durante 2 horas. El producto resultante se purificó por HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 30 %-50 % (0 min-30 min)] para obtener el compuesto del título (23,7 mg). MS(ESI) m/z: 1016 (M+H)⁺.

40 RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,16 (1H, s), 8,00 (1H, s), 7,08 (1H, s), 6,33 (1H, d, J = 7,3 Hz), 6,13 (1H, d, J = 8,5 Hz), 5,51-5,48 (1H, m), 5,30 (1H, t, J = 4,8 Hz), 5,13-5,06 (1H, m), 4,95 (1H, d, J = 4,2 Hz), 4,66-4,55 (2H, m), 4,24 (1H, s), 4,08 (1H, dd, J = 12,4, 4,5 Hz), 3,89-3,83 (1H, m), 3,69-3,61 (1H, m), 3,50-3,33 (4H, m), 3,12-3,01 (14H, m), 2,89 (2H, t, J = 5,4 Hz), 2,03-1,96 (2H, m), 1,25 (18H, t, J = 7,3 Hz), 0,99 (9H, s), 0,74 (9H, s), 0,27 (6H, s), 0,18 (3H, s), -0,08 (3H, s).

(Etapa 8-1)

45 (5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-7-{6-Amino-2-[(2-aminoetil)amino]-9H-purin-9-il}-15,16-dihidroxi-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfacilotetradecin-2,10-bis(tiolato) disódico

(Diastereómero 1)

50 Usando el compuesto obtenido en la etapa 7-1 (37,2 mg), la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 11 del ejemplo 1, y el producto resultante se purificó después por HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 2 %-20 % (0 min-30 min)] para obtener el compuesto del título en forma de una sal de trietilamina.

La sal de trietilamina obtenida se sometió a intercambio de sales de la misma manera que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (16,5 mg).

MS(ESI) m/z : 788 (M+H)⁺.

5 RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,21 (1H, sa), 8,01 (1H, s), 7,07 (1H, s), 6,27 (1H, d, J = 3,6 Hz), 6,10 (1H, d, J = 8,5 Hz), 5,51-5,41 (1H, m), 5,16-5,11 (1H, m), 4,83 (1H, d, J = 3,6 Hz), 4,50-4,45 (2H, m), 4,35-4,29 (2H, m), 4,16-4,04 (2H, m), 3,50-3,42 (4H, m), 3,17-3,05 (2H, m), 2,82-2,66 (2H, m), 2,04-1,92 (2H, m).

RMN de ³¹P (CD₃OD) δ: 57,9 (s), 54,2 (s).

(Etapa 8-2)

10 (5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-7-{6-Amino-2-[(2-aminoetil)amino]-9H-purin-9-yl}-15,16-dihidroxi-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-yl)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) disódico

(Diastereómero 2)

15 Usando el compuesto obtenido en la etapa 7-2 (23,7 mg), la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 11 del ejemplo 1, y el producto resultante se purificó después por HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 2 %-20 % (0 min-30 min)] para obtener el compuesto del título en forma de una sal de trietilamina.

La sal de trietilamina obtenida se sometió a intercambio de sales de la misma manera que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (14,9 mg).

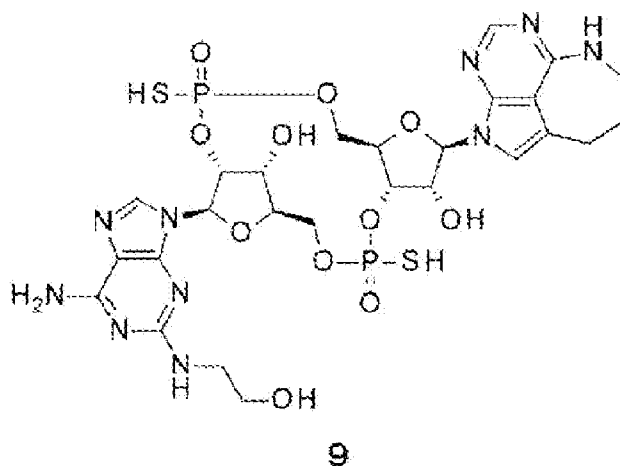
MS(ESI) m/z : 788 (M+H)⁺.

20 RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,27 (1H, sa), 8,02 (1H, s), 7,15 (1H, s), 6,31 (1H, d, J = 6,0 Hz), 6,12 (1H, d, J = 8,5 Hz), 5,45-5,33 (2H, m), 4,75 (1H, dd, J = 5,7, 4,5 Hz), 4,50 (1H, d, J = 4,2 Hz), 4,47-4,30 (4H, m), 4,17-4,13 (1H, m), 3,94-3,89 (1H, m), 3,69-3,59 (1H, m), 3,51-3,44 (3H, m), 3,21-3,07 (2H, m), 2,88-2,85 (2H, m), 2,03-1,97 (2H, m).

RMN de ³¹P (CD₃OD) δ: 62,2 (s), 59,8 (s).

Ejemplo 9: Síntesis de CDN9

25 (5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-7-{6-Amino-2-[(2-hidroxietil)amino]-9H-purin-9-yl}-15,16-dihidroxi-2,10-bis(sulfanil)-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-yl)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-diona

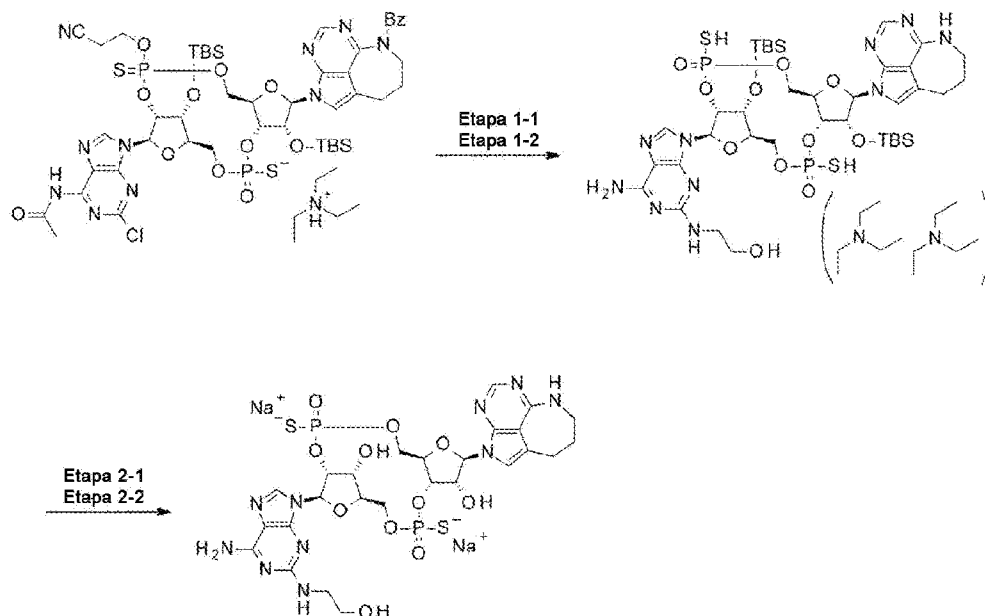


9

9a (Diastereómero 1)

9b (Diastereómero 2)

[Esquema de síntesis]



(Etapa 1-1)

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-7-{6-Amino-2-[(2-hidroxietil)amino]-9H-purin-9-il}-15,16-bis[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-2,10-bis(sulfanil)-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfacilotetradecin-2,10-diona

A una solución del compuesto obtenido en la etapa 6 del ejemplo 8 (diastereómero 1) (50,1 mg) en metanol (1,29 ml) se le añadió 2-aminoetanol (258 µl), y la mezcla de reacción se agitó a 60 °C durante 2 horas, y después se hizo reaccionar usando un reactor de microondas a 120 °C durante 2 horas. El producto resultante se purificó por HPLC preparativa [solución 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 20 %-60 % (0 min-30 min)] para obtener el compuesto del título (39,4 mg) en forma de una mezcla que contiene un compuesto derivado de la etanolamina.

MS(ESI) m/z: 1017 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,32 (1H, s), 8,01 (1H, s), 7,16 (1H, s), 6,28 (1H, d, J = 5,4 Hz), 6,13 (1H, d, J = 9,1 Hz), 5,44-5,38 (1H, m), 5,19-5,14 (1H, m), 4,98-4,83 (2H, m), 4,78-4,75 (1H, m), 4,45-4,39 (1H, m), 4,28-4,22 (1H, m), 4,18 (1H, s), 4,13-4,07 (1H, m), 4,04-3,99 (1H, m), 3,67 (2H, t, J = 5,4 Hz), 3,51-3,42 (4H, m), 2,86 (2H, t, J = 5,4 Hz), 2,04-1,98 (2H, m), 0,98 (9H, s), 0,82 (9H, s), 0,31 (3H, s), 0,27 (3H, s), 0,22 (3H, s), 0,05 (3H, s).

(Etapa 1-2)

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-7-{6-Amino-2-[(2-hidroxietil)amino]-9H-purin-9-il}-15,16-bis[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfacilotetradecin-2,10-bis(tiolato) de bis(N,N-dietiletanaminio)

A una solución del compuesto obtenido en la etapa 6 del ejemplo 8 (diastereómero 2) (49,3 mg: con impurezas) en metanol (1,27 ml) se le añadió 2-aminoetanol (254 µl), y la mezcla de reacción se agitó a 60 °C durante 2 horas, y después se hizo reaccionar usando un reactor de microondas a 120 °C durante 3 horas. El producto resultante se purificó por HPLC preparativa [solución 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 20 %-60 % (0 min-30 min)] para obtener el compuesto del título (26,1 mg). MS(ESI) m/z: 1017 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,25 (1H, s), 8,01 (1H, s), 7,10 (1H, s), 6,36 (1H, d, J = 7,3 Hz), 6,17 (1H, d, J = 7,9 Hz), 5,59-5,53 (1H, m), 5,41 (1H, t, J = 4,5 Hz), 5,21-5,14 (1H, m), 5,02-4,95 (2H, m), 4,70-4,61 (2H, m), 4,18 (1H, s), 4,03 (1H, dd, J = 12,1, 4,8 Hz), 3,91-3,86 (1H, m), 3,75-3,69 (2H, m), 3,52-3,43 (4H, m), 3,14 (12H, q, J = 7,3 Hz), 2,93-2,91 (2H, m), 2,04-1,99 (2H, m), 1,28 (18H, t, J = 7,6 Hz), 0,99 (9H, s), 0,75 (9H, s), 0,27 (6H, s), 0,21 (3H, s), -0,05 (3H, s).

(Etapa 2-1)

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-7-{6-Amino-2-[(2-hidroxietil)amino]-9H-purin-9-il}-15,16-dihidroxi-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfacilotetradecin-2,10-bis(tiolato) disódico

(Diastereómero 1)

Usando la mezcla obtenida en la etapa 1-1 (39,4 mg), la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 11 del ejemplo 1, y la purificación se realizó a continuación según las siguientes condiciones de purificación para obtener el compuesto del título en forma de una sal de trietilamina.

- 5 [Condiciones de purificación] HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 2 %-20 % (0 min-30 min)].

La sal de trietilamina obtenida se sometió a intercambio de sales de la misma manera que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (16,8 mg).

MS(ESI) m/z: 789 (M+H)⁺.

- 10 RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,25 (1H, s), 8,02 (1H, s), 7,10 (1H, s), 6,30 (1H, d, J = 3,6 Hz), 6,15 (1H, d, J = 8,5 Hz), 5,49-5,42 (1H, m), 5,21-5,16 (1H, m), 4,87-4,85 (1H, m), 4,50-4,35 (3H, m), 4,31 (1H, s), 4,12-4,10 (2H, m), 3,64 (2H, t, J = 5,4 Hz), 3,51-3,38 (4H, m), 2,85-2,70 (2H, m), 2,02-1,94 (2H, m).

RMN de ³¹P (CD₃OD) δ: 57,8 (s), 53,9 (s).

(Etapa 2-2)

- 15 (5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-7-{6-Amino-2-[(2-hidroxietil)amino]-9H-purin-9-il}-15,16-dihidroxi-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) disódico

(Diastereómero 2)

- 20 Usando el compuesto obtenido en la etapa 1-2 (26,1 mg), la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 11 del ejemplo 1, y la purificación se realizó a continuación según las siguientes condiciones de purificación para obtener el compuesto del título en forma de una sal de trietilamina.

[Condiciones de purificación] HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 2 %-20 % (0 min-30 min)].

- 25 La sal de trietilamina obtenida se sometió a intercambio de sales de la misma manera que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (18,6 mg).

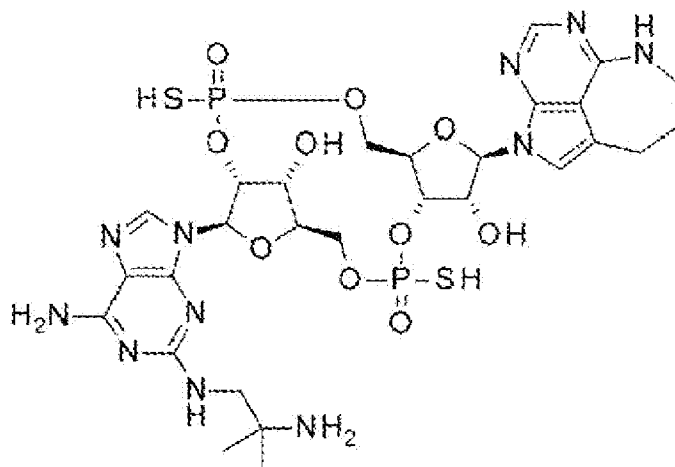
MS(ESI) m/z: 789 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,35 (1H, s), 8,03 (1H, s), 7,17 (1H, s), 6,33 (1H, d, J = 6,0 Hz), 6,16 (1H, d, J = 8,5 Hz), 5,49-5,41 (2H, m), 4,80 (1H, t, J = 5,4 Hz), 4,51-4,26 (5H, m), 4,07 (1H, d, J = 12,7 Hz), 3,94-3,89 (1H, m), 3,67 (2H, s, J = 5,7 Hz), 3,53-3,39 (4H, m), 2,89 (2H, t, J = 5,4 Hz), 2,03-1,99 (2H, m).

- 30 RMN de ³¹P (CD₃OD) δ: 62,8 (s), 60,3 (s).

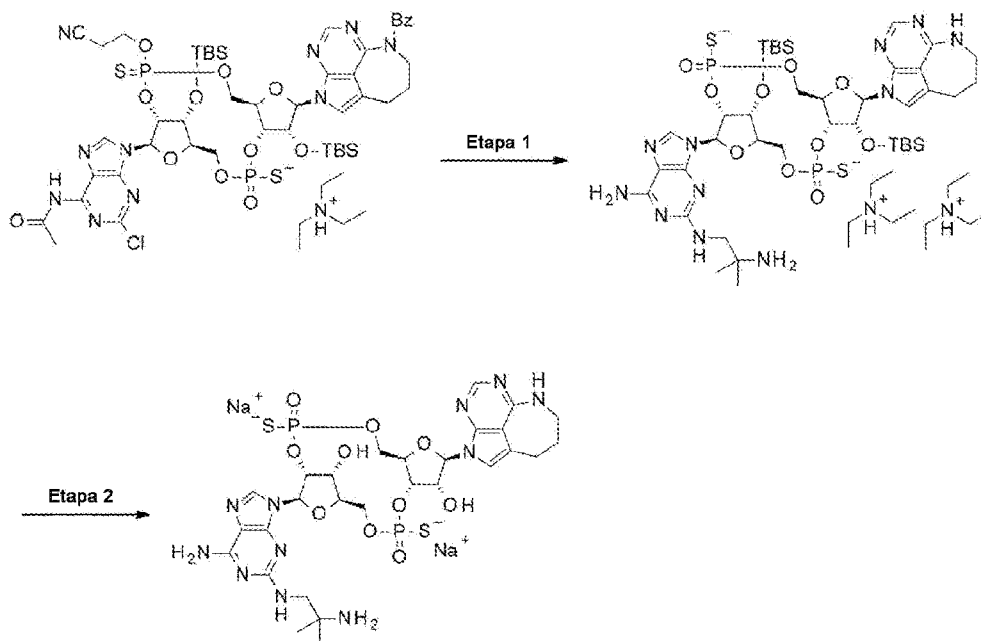
Ejemplo 10: Síntesis de CDN10

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-7-{6-Amino-2-[(2-amino-2-metilpropil)amino]-9H-purin-9-il}-15,16-dihidroxi-2,10-bis(sulfanil)-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-diona

**10**

10a (Diastereómero 1)

[Esquema de síntesis]



5

(Etapa 1)

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-7-{6-Amino-2-[(2-amino-2-metilpropil)amino]-9H-purin-9-il}-15,16-bis[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfacilotetradecin-2,10-bis(tiolato) de bis(N,N-dietiletanaminio)

10

A una disolución del compuesto obtenido en la etapa 6 del ejemplo 8 (diastereómero 1) (41,0 mg) en metanol (1,10 ml) se le añadió 1,2-diamino-2-metilpropano (210 µl), y la mezcla de reacción se agitó a 60 °C durante 2 horas, y después se hizo reaccionar usando un reactor de microondas a 120 °C durante 6 horas. El producto resultante se purificó simplemente por HPLC preparativa [solución 10 mM de acetato de trietilamonio/acetronitrilo, acetronitrilo: del 20 %-60 % (0 min-30 min)] para obtener el compuesto del título (16,3 mg: con impurezas). El compuesto obtenido se utilizó directamente para la reacción posterior, sin más purificación.

15

MS(ESI) m/z: 1044 (M+H)⁺.

(Etapa 2)

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-7-{6-Amino-2-[(2-amino-2-metilpropil)amino]-9H-purin-9-il}-15,16-dihidroxi-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzoc[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidofosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) disódico

- 5 Usando el compuesto obtenido en la etapa 1 (16,3 mg: con impurezas), la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 11 del ejemplo 1, y la purificación se realizó a continuación según las siguientes condiciones de purificación para obtener el compuesto del título en forma de una sal de trietilamina.

[Condiciones de purificación] HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 5 %-25 % (0 min-30 min)].

- 10 La sal de trietilamina obtenida se sometió a intercambio de sales de la misma manera que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (6,4 mg).

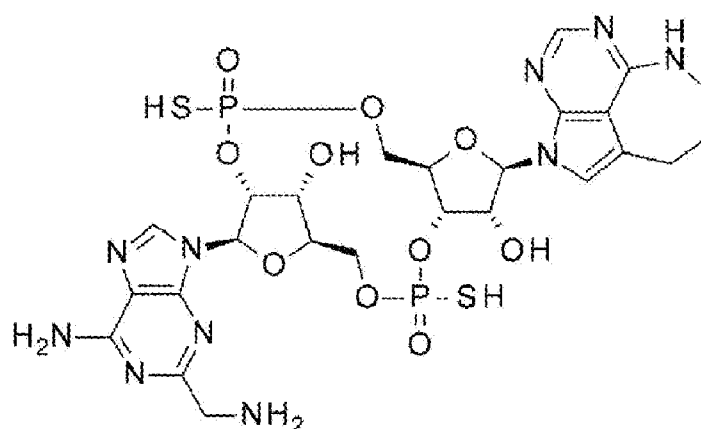
MS(ESI) m/z: 816 (M+H)⁺.

- 15 RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,28 (1H, sa), 8,01 (1H, s), 7,05 (1H, s), 6,27 (1H, d, J = 4,2 Hz), 6,15 (1H, d, J = 7,9 Hz), 5,41-5,27 (1H, m), 5,13-5,08 (1H, m), 4,84 (1H, d, J = 3,6 Hz), 4,73 (1H, t, J = 4,5 Hz), 4,50-4,44 (2H, m), 4,36-4,31 (2H, m), 4,16-4,00 (2H, m), 3,49 (2H, dd, J = 6,3, 3,3 Hz), 3,31-3,25 (2H, m), 2,84-2,70 (2H, m), 2,03-1,91 (2H, m), 1,34 (3H, s), 1,30 (3H, s).

RMN de ³¹P (CD₃OD) δ: 57,9 (s), 54,5 (s).

Ejemplo 11: Síntesis de CDN11

- 20 (5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-7-[6-Amino-2-(aminometil)-9H-purin-9-il]-15,16-dihidroxi-2,10-bis(sulfanil)-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzoc[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidofosfaciclotetradecin-2,10-diona



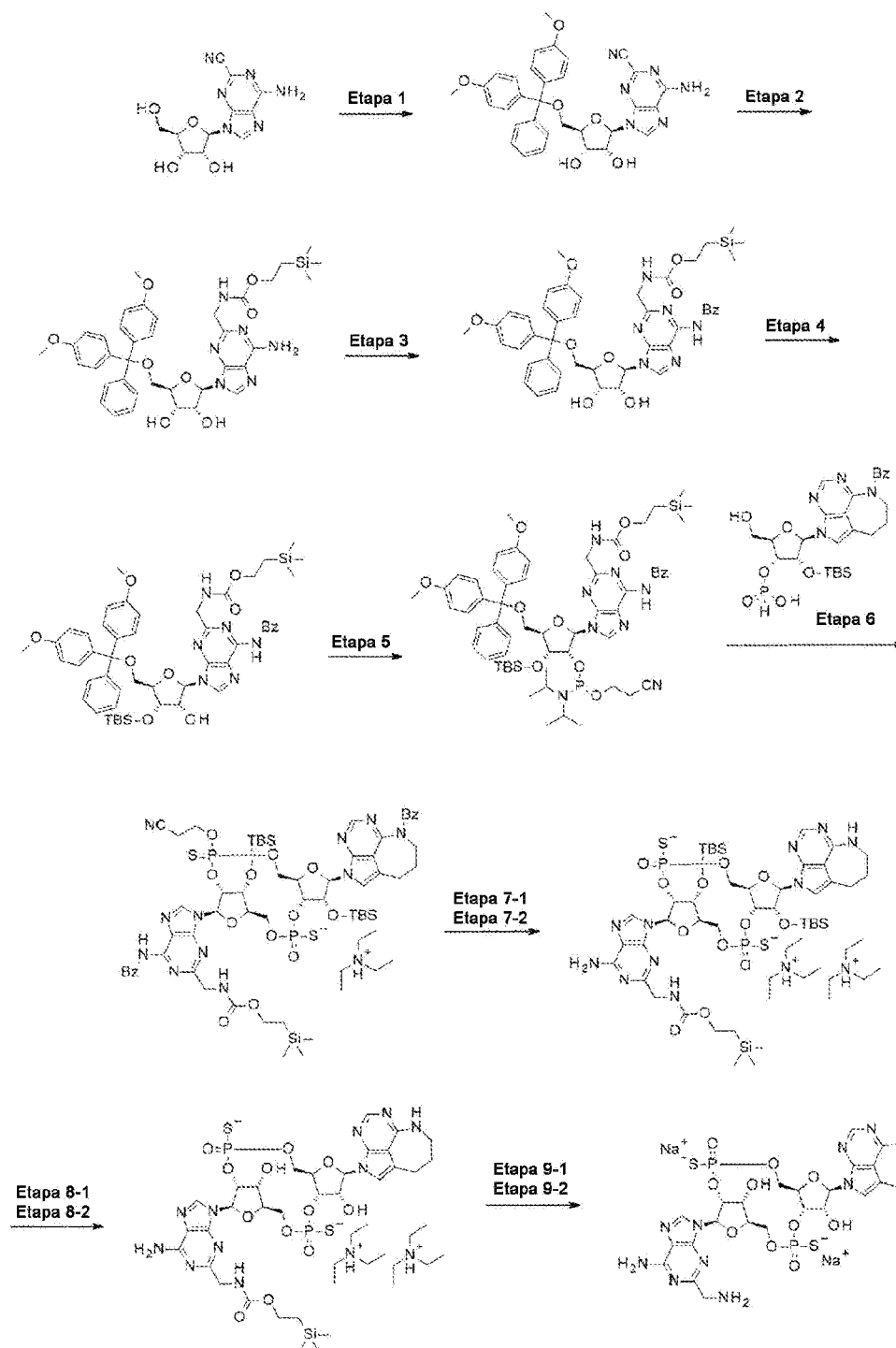
11

11a (Diastereómero 1)

11b (Diastereómero 2)

25

[Esquema de síntesis]



(Etapa 1)

5'-O-[Bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-2-cianoadenosina

- 5 A una solución de 2-cianoadenosina (440 mg) como compuesto conocido en la bibliografía (J. Am. Chem. Soc., 1989, 111, 8502-8504) en piridina (8,00 ml) se le añadió cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (642 mg), y la mezcla de reacción se agitó en una atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente durante 4 horas. Tras añadir metanol (10 ml) a la mezcla de reacción para inactivar la reacción, el producto resultante se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo/metanol/trietilamina al 0,1 %] para obtener el compuesto del título (528 mg).

RMN de ^1H (CDCl_3) δ : 8,21 (1H, s), 7,31-7,17 (9H, m), 6,79-6,70 (4H, m), 5,99 (1H, d, $J = 5,4$ Hz), 5,86 (2H, sa), 4,86 (1H, q, $J = 4,6$ Hz), 4,65 (1H, t, $J = 3,6$ Hz), 4,48-4,45 (1H, m), 4,41 (1H, q, $J = 3,0$ Hz), 3,79 (6H, s), 3,46 (1H, dd, $J = 10,9, 3,6$ Hz), 3,34 (1H, dd, $J = 10,6, 3,3$ Hz), 2,93 (1H, d, $J = 2,4$ Hz).

(Etapa 2)

5 5'-O-[Bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-2-[(2-(trimetilsilil)etoxi)carbonil]amino)metil]adenosina

A una disolución del compuesto obtenido en la etapa 1 (14,3 g) en tetrahidrofurano (500 ml) se le añadió una disolución en tetrahidrofurano de hidruro de litio y aluminio (aproximadamente 2,5 M, 29,0 ml), y la mezcla de reacción se agitó en una atmósfera de nitrógeno a 40 °C durante 2 horas. La mezcla de reacción se enfrió con hielo, se añadió una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio (450 ml), la mezcla de reacción se agitó durante 10 minutos y después se añadió 1-[(2-(trimetilsilil)etoxi)carbonil]oxi)pirrolidin-2,5-diona (25,0 g) para que reaccionara a temperatura ambiente durante 18 horas. Se añadió una solución acuosa saturada de la sal de Rochelle, y la mezcla de reacción se agitó durante 2,5 horas, sometiénose a continuación a extracción con una mezcla de diclorometano/metanol. Tras secar la capa orgánica sobre sulfato de sodio anhidro, se eliminó el agente desecante por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo/trietilamina al 0,1 %] para obtener el compuesto del título (10,8 g).

RMN de ^1H (CDCl_3) δ : 8,01 (1H, s), 7,26-7,15 (9H, m), 6,75-6,71 (4H, m), 6,37 (1H, sa), 5,93 (1H, d, $J = 6,0$ Hz), 5,67 (2H, sa), 5,59 (1H, sa), 4,77-4,74 (1H, m), 4,46-4,37 (4H, m), 4,21 (2H, t, $J = 8,5$ Hz), 3,76 (3H, s), 3,76 (3H, s), 3,42 (1H, dd, $J = 10,6, 3,3$ Hz), 3,25 (1H, dd, $J = 10,6, 3,3$ Hz), 3,16 (1H, sa), 1,03 (2H, t, $J = 8,5$ Hz), 0,05 (9H, s).

(Etapa 3)

20 N-Benzoil-5'-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-2-[(2-(trimetilsilil)etoxi)carbonil]amino)metil]adenosina

A una disolución del compuesto obtenido en la etapa 2 (10,8 g) en piridina (70,0 ml) se le añadió clorotrimetilsilano (15,0 ml), y la mezcla de reacción se agitó en una atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente durante 2 horas. Se añadió cloruro de benzoilo (8,44 ml) a la mezcla de reacción, que se agitó durante 2 horas más. La mezcla de reacción se enfrió a 0 °C y se agitó durante 10 minutos con adición de agua (21,0 ml), y después se volvió a agitar a la misma temperatura durante 20 minutos con adición de amoniaco líquido al 28 % (31,4 ml). La temperatura se elevó hasta la temperatura ambiente y la mezcla de reacción se agitó durante 3 horas más, concentrándose a continuación a presión reducida. El residuo se suspendió en acetato de etilo y el sólido se eliminó por filtración. El filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo/metanol/trietilamina al 0,1 %] para obtener el compuesto del título (9,47 g).

30 MS(ESI) m/z : 847 ($M+H$) $^+$.

RMN de ^1H (CDCl_3) δ : 9,54 (1H, sa), 8,17 (2H, d, $J = 6,7$ Hz), 7,91 (1H, sa), 7,66-7,52 (3H, m), 7,35-7,10 (9H, m), 6,75 (4H, d, $J = 8,5$ Hz), 6,45 (1H, sa), 6,23 (1H, sa), 6,03 (1H, d, $J = 6,7$ Hz), 4,70-4,65 (2H, m), 4,45-4,19 (5H, m), 3,73 (6H, s), 3,38-3,32 (2H, m), 2,65 (1H, sa), 1,05 (2H, t, $J = 8,8$ Hz), 0,00 (9H, s).

(Etapa 4)

35 N-Benzoil-5'-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-3'-O-[terc-butil(dimetil)silil]-2-[(2-(trimetilsilil)etoxi)carbonil]amino)metil]adenosina

Usando el compuesto obtenido en la etapa 3 (9,47 g), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 4 del ejemplo 8 para obtener el compuesto del título (3,13 g). MS(ESI) m/z : 961 ($M+H$) $^+$.

40 RMN de ^1H (CDCl_3) δ : 8,87 (1H, sa), 8,24 (1H, sa), 8,02 (2H, d, $J = 7,3$ Hz), 7,64-7,51 (3H, m), 7,40-7,18 (9H, m), 6,81-6,77 (4H, m), 6,08 (1H, d, $J = 4,8$ Hz), 5,85 (1H, sa), 4,70-4,52 (4H, m), 4,23-4,17 (3H, m), 3,77 (6H, s), 3,50 (1H, dd, $J = 10,9, 3,0$ Hz), 3,29 (1H, dd, $J = 10,9, 4,2$ Hz), 3,21 (1H, d, $J = 6,0$ Hz), 1,06-1,02 (2H, m), 0,89 (9H, s), 0,09 (3H, s), 0,05 (9H, s), 0,01 (3H, s).

(Etapa 5)

45 N-Benzoil-5'-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-3'-O-[terc-butil(dimetil)silil]-2'-O-[(2-cianoetoxi)[di(propan-2-il)amino]fosfanil]-2-[(2-(trimetilsilil)etoxi)carbonil]amino)metil]adenosina

A una disolución del compuesto obtenido en la etapa 4 (1,49 g) en diclorometano (15,5 ml) se le añadieron N,N-diisopropiletilamina (1,58 ml) y N,N-diisopropilclorofosforamidita de 2-cianoetilo (1,04 ml), y la mezcla de reacción se agitó en una atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo/trietilamina al 0,1 %] y cromatografía en columna de gel de sílice C18 [acetoneitrilo: 100 %] para obtener el compuesto del título (1,39 g) en forma de una mezcla de diastereómeros en el átomo de fósforo (proporción de diastereómeros = 6:4).

RMN de ^1H (CDCl_3) δ 8,84 (1H, s), 8,33 (0,6H, s), 8,28 (0,4H, s), 8,02-7,99 (2H, m), 7,64-7,59 (1H, m), 7,55-7,51 (2H, m), 7,42-7,20 (9H, m), 6,82-6,79 (4H, m), 6,30 (0,4H, d, $J = 4,2$ Hz), 6,25 (0,6H, d, $J = 4,2$ Hz), 5,95-5,88 (1H, m), 4,89-4,77 (1H, m), 4,60-4,58 (2H, m), 4,51-4,45 (1H, m), 4,25-4,18 (3H, m), 3,86-3,46 (5H, m), 3,78 (6H, s), 3,35-3,29 (1H, m), 2,53 (1,2H, t, $J = 6,3$ Hz), 2,38 (0,8H, t, $J = 6,3$ Hz), 1,16-0,98 (14H, m), 0,85 (3,6H, s), 0,84 (5,4H, s), 0,10 (1,8H, s), 0,08 (1,2H, s), 0,05 (9H, s), 0,01 (1,2H, s), -0,01 (1,8H, s).

(Etapa 6)

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-7-{6-Benzamido-2-[[[2-(trimetilsilil)etoxi]carbonil]amino]metil]-9H-purin-9-il}-14-(6-benzoil-6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)-15,16-bis[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-10-(2-cianoetoxi)-2-oxo-10-sulfanilidenoctahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2 λ^5 ,10 λ^5 -furo[3,2-1][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciotetradecin-2-tiolato de N,N-dietiletanaminio

Se realizó la misma reacción que en la etapa 7 del ejemplo 1 con la siguiente escala (materia prima: 1,94 g). Usando una solución de acetonitrilo del compuesto obtenido y el compuesto obtenido en la etapa 5 (2,19 g), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 8 del ejemplo 1 y la etapa 9 del ejemplo 1 para obtener el diastereómero 1 (138 mg) y el diastereómero 2 (82,8 mg) del compuesto del título. Diastereómero 1 (menos polar)

RMN de ^1H (CD_3OD) δ : 9,08 (1H, s), 8,11 (2H, d, $J = 7,3$ Hz), 7,98 (1H, s), 7,67 (1H, t, $J = 7,6$ Hz), 7,57 (2H, t, $J = 7,9$ Hz), 7,37 (2H, d, $J = 7,9$ Hz), 7,28-7,22 (4H, m), 6,54 (1H, d, $J = 8,5$ Hz), 6,36 (1H, d, $J = 1,8$ Hz), 5,66-5,59 (1H, m), 5,07-5,02 (1H, m), 4,85-4,83 (1H, m), 4,72 (1H, d, $J = 3,6$ Hz), 4,58-4,08 (12H, m), 3,88-3,78 (1H, m), 3,49-3,38 (1H, m), 3,21 (6H, q, $J = 7,3$ Hz), 3,05-3,00 (2H, m), 2,49-2,40 (1H, m), 2,34-2,26 (1H, m), 2,09-2,03 (2H, m), 1,31 (9H, t, $J = 7,6$ Hz), 1,21-1,09 (2H, m), 1,02 (9H, s), 0,91 (9H, s), 0,30 (3H, s), 0,29 (3H, s), 0,26 (3H, s), 0,12 (3H, s), 0,05 (9H, s).

Diastereómero 2 (más polar)

MS(ESI) m/z : 1392 ($M+H$) $^+$.

RMN de ^1H (CD_3OD) δ : 8,91 (1H, s), 8,10-8,07 (2H, m), 7,94 (1H, s), 7,67-7,63 (1H, m), 7,59-7,54 (2H, m), 7,41-7,20 (6H, m), 6,54 (1H, d, $J = 8,5$ Hz), 6,22 (1H, d, $J = 5,4$ Hz), 5,36-5,30 (1H, m), 3,20 (6H, q, $J = 7,3$ Hz), 3,04-3,00 (2H, m), 2,85-2,75 (2H, m), 2,23-2,13 (2H, m), 1,30 (9H, t, $J = 7,3$ Hz), 1,03 (9H, s), 0,79 (9H, s), 0,05 (9H, s). (sólo se muestran los picos observables)

(Etapa 7-1)

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-7-{6-Amino-2-[[[2-(trimetilsilil)etoxi]carbonil]amino]metil]-9H-purin-9-il}-15,16-bis[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2 λ^5 ,10 λ^5 -furo[3,2-1][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciotetradecin-2,10-bis(tiolato) de bis(N,N-dietiletanaminio)

Usando el compuesto obtenido en la etapa 6 (diastereómero 1) (42,3 mg), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 10 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (25,9 mg).

MS(ESI) m/z : 1131 ($M+H$) $^+$.

RMN de ^1H (CD_3OD) δ : 8,72 (1H, s), 8,00 (1H, s), 7,26 (1H, s), 6,35 (1H, d, $J = 9,1$ Hz), 6,26 (1H, d, $J = 4,8$ Hz), 5,42-5,36 (1H, m), 5,20-5,15 (1H, m), 4,91-4,87 (2H, m), 4,80-4,78 (1H, m), 4,43 (1H, t, $J = 11,2$ Hz), 4,36-4,28 (3H, m), 4,20-4,15 (3H, m), 4,09-3,99 (2H, m), 3,51 (2H, d, $J = 6,7$ Hz), 3,13 (12H, q, $J = 7,3$ Hz), 2,85 (2H, sa), 2,01-1,97 (2H, m), 1,25 (18H, t, $J = 7,3$ Hz), 1,07-1,00 (2H, m), 1,00 (9H, s), 0,82 (9H, s), 0,32 (3H, s), 0,28 (3H, s), 0,25 (3H, s), 0,07 (12H, s).

(Etapa 7-2)

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-7-{6-Amino-2-[[[2-(trimetilsilil)etoxi]carbonil]amino]metil]-9H-purin-9-il}-15,16-bis[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2 λ^5 ,10 λ^5 -furo[3,2-1][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciotetradecin-2,10-bis(tiolato) de bis(N,N-dietiletanaminio)

Usando el compuesto obtenido en la etapa 6 (diastereómero 2) (82,8 mg), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 10 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (45,2 mg).

RMN de ^1H (CD_3OD) δ : 8,61 (1H, s), 8,01 (1H, s), 7,08 (1H, s), 6,34 (2H, t, $J = 7,9$ Hz), 5,49 (1H, dd, $J = 10,6$, 4,5 Hz), 5,42 (1H, t, $J = 5,1$ Hz), 5,24-5,17 (1H, m), 5,00-4,95 (2H, m), 4,69-4,57 (2H, m), 4,36 (2H, t, $J = 17,8$ Hz), 4,22-4,15 (3H, m), 4,05 (1H, dd, $J = 12,4$, 5,1 Hz), 3,90-3,85 (1H, m), 3,51 (2H, d, $J = 9,1$ Hz), 3,17 (12H, q, $J = 7,3$ Hz), 2,92 (2H, t, $J = 5,4$ Hz), 2,04-1,99 (2H, m), 1,29 (18H, t, $J = 7,3$ Hz), 1,07-0,98 (2H, m), 1,00 (9H, s), 0,74 (9H, s), 0,28 (3H, s), 0,28 (3H, s), 0,21 (3H, s), 0,07 (9H, s), -0,06 (3H, s).

(Etapa 8-1)

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-7-[6-Amino-2-(((2-(trimetilsilil)etoxi)carbonil)amino)metil]-9H-purin-9-il]-15,16-dihidroxi-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-1][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfacilotetradecin-2,10-bis(tiolato) de bis(N,N-dietiletanaminio)

- 5 Se añadió trifluorhidrato de trietilamina (700 µl) al compuesto (25,9 mg) obtenido en la etapa 7-1, y la mezcla de reacción se agitó a 55 °C durante 2 horas. Se añadió una mezcla enfriada con hielo de una solución acuosa 1 M de carbonato de trietilamonio (3,5 ml) y trietilamina (1,10 ml) a la mezcla de reacción, que se purificó por HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 10 %-40 % (0 min-30 min)] para obtener el compuesto del título (19,1 mg).

- 10 MS(ESI) m/z: 903 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,71 (1H, s), 8,03 (1H, s), 7,10 (1H, s), 6,37 (1H, d, J = 7,9 Hz), 6,28 (1H, d, J = 4,2 Hz), 5,38-5,33 (1H, m), 5,18-5,13 (1H, m), 4,84-4,80 (2H, m), 4,50-4,40 (2H, m), 4,35-4,40 (4H, m), 4,21-4,16 (2H, m), 4,07-4,00 (2H, m), 3,51-3,49 (2H, m), 3,07 (12H, q, J = 7,3 Hz), 2,85 (2H, t, J = 5,4 Hz), 2,02-1,97 (2H, m), 1,23 (18H, t, J = 7,3 Hz), 1,04 (2H, t, J = 8,2 Hz), 0,07 (9H, s).

- 15 (Etapa 8-2)

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-7-[6-Amino-2-(((2-(trimetilsilil)etoxi)carbonil)amino)metil]-9H-purin-9-il]-15,16-dihidroxi-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-1][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfacilotetradecin-2,10-bis(tiolato) de bis(N,N-dietiletanaminio)

- 20 Usando el compuesto obtenido en la etapa 7-2 (45,2 mg), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 8-1 para obtener el compuesto del título (37,1 mg). MS(ESI) m/z: 903 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,75 (1H, s), 8,02 (1H, s), 7,13 (1H, s), 6,36 (1H, d, J = 9,1 Hz), 6,33 (1H, d, J = 6,7 Hz), 5,51-5,42 (2H, m), 4,81 (1H, dd, J = 6,7, 4,8 Hz), 4,51-4,28 (7H, m), 4,18 (2H, dt, J = 8,3, 2,6 Hz), 4,02 (1H, dt, J = 12,7 Hz), 3,92-3,87 (1H, m), 3,51-3,47 (2H, m), 3,13 (12H, q, J = 7,3 Hz), 2,93-2,90 (2H, m), 2,04-1,98 (2H, m), 1,27 (18H, t, J = 7,3 Hz), 1,06-0,99 (2H, m), 0,06 (9H, s).

- 25

(Etapa 9-1)

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-7-[6-Amino-2-(aminometil)-9H-purin-9-il]-15,16-dihidroxi-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-1][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfacilotetradecin-2,10-bis(tiolato) disódico

- 30 (Diastereómero 1)

A una solución del compuesto obtenido en la etapa 8-1 (19,1 mg) en tetrahidrofurano (576 µl) se le añadió una solución en tetrahidrofurano de fluoruro de tetrabutilamonio (aproximadamente 1 M, 288 µl), y la mezcla de reacción se agitó en una atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente durante la noche y, a continuación, se realizó la purificación según las siguientes condiciones de purificación para obtener el compuesto del título en forma de una sal de trietilamina.

- 35

[Condiciones de purificación] HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 0 %-30 % (0 min-40 min)] y Sep-Pak (R) C18 [agua/acetonitrilo].

La sal de trietilamina obtenida se sometió a intercambio de sales de la misma manera que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (8,4 mg).

- 40 MS(ESI) m/z: 759 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,48 (1H, s), 8,03 (1H, s), 7,04 (1H, s), 6,27 (1H, d, J = 3,6 Hz), 6,24 (1H, d, J = 8,5 Hz), 5,98-5,93 (1H, m), 5,04-4,99 (1H, m), 4,81-4,79 (2H, m), 4,45-4,39 (2H, m), 4,31-4,27 (2H, m), 4,12-3,99 (4H, m), 3,54-3,44 (2H, m), 2,88-2,85 (2H, m), 2,02-1,97 (2H, m).

RMN de ³¹P (CD₃OD) δ: 57,6, 55,5.

- 45 (Etapa 9-2)

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-7-[6-Amino-2-(aminometil)-9H-purin-9-il]-15,16-dihidroxi-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-1][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfacilotetradecin-2,10-bis(tiolato) disódico

(Diastereómero 2)

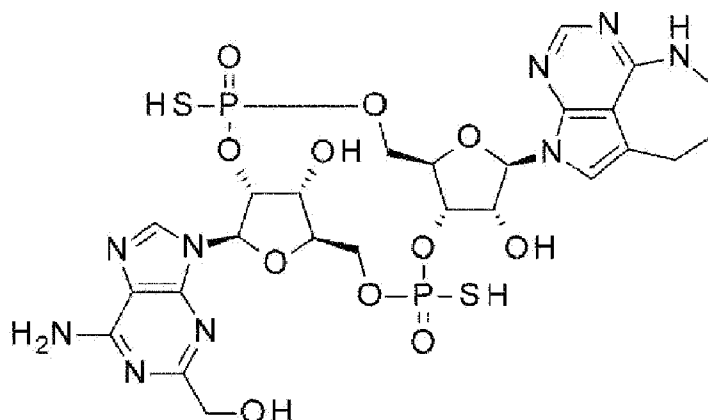
Usando el compuesto obtenido en la etapa 8-2 (37,1 mg), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 9-1 para obtener el compuesto del título (12,8 mg). MS(ESI) m/z: 759 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,61 (1H, s), 8,02 (1H, s), 7,13 (1H, s), 6,31 (1H, d, J = 6,0 Hz), 6,28 (1H, d, J = 8,5 Hz), 5,61-5,55 (1H, m), 5,38-5,35 (1H, m), 4,80 (1H, t, J = 5,1 Hz), 4,54 (1H, d, J = 4,2 Hz), 4,48-4,28 (4H, m), 4,13 (2H, s), 4,08-4,04 (1H, m), 3,94-3,90 (1H, m), 3,52-3,49 (2H, m), 2,90-2,88 (2H, m), 2,03-1,98 (2H, m).

RMN de ³¹P (CD₃OD) δ: 62,2 (s), 60,0 (s).

Ejemplo 12: Síntesis de CDN12

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-7-[6-Amino-2-(hidroximetil)-9H-purin-9-yl]-15,16-dihidroxi-2,10-bis(sulfanil)-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-iloctahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-1][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-diona

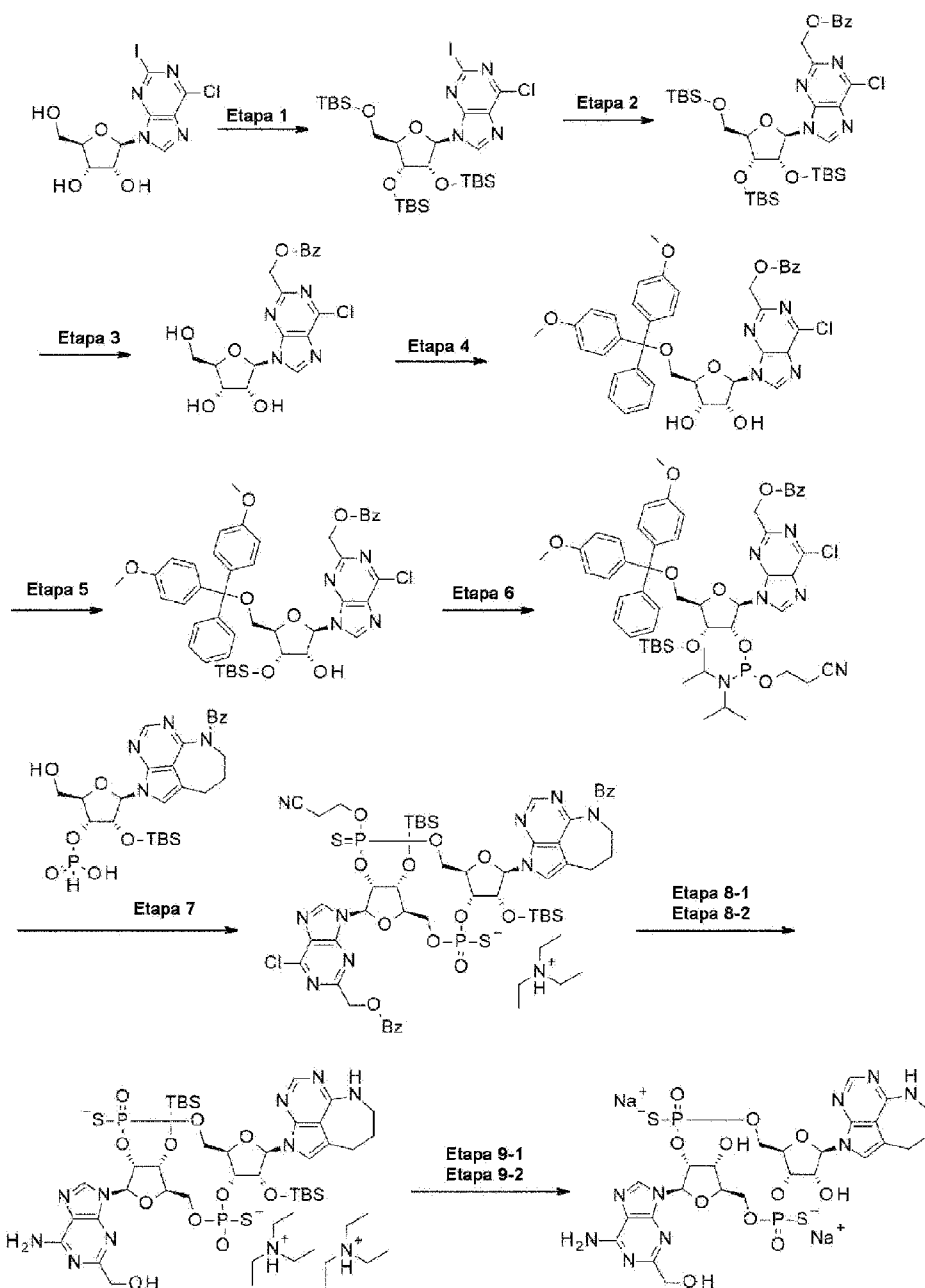


12

12a (Diastereómero 1)

12b (Diastereómero 2)

15 [Esquema de síntesis]



(Etapa 1)

6-Cloro-2-yodo-9-[2,3,5-tris-O-[terc-butil(dimetil)silil]-β-D-ribofuranosil]-9H-purina

- 5 A una disolución de 6-cloro-2-yodo-9-β-D-ribofuranosil-9H-purina (9,65 g) disponible en el mercado (Amadis Chemical Company Limited) en éter dimetílico de etilenglicol (120 ml) se le añadieron N,N-diisopropiletilamina (40,7 ml) y trifluorometanosulfonato de terc-butildimetilsililo (26,9 ml) a 0 °C, se aumentó la temperatura hasta la temperatura ambiente en una atmósfera de nitrógeno y la mezcla de reacción se agitó durante 19 horas. La mezcla de reacción se enfrió hasta 0 °C, se añadió a la mezcla de reacción una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio para inactivar la reacción, y la mezcla de reacción se sometió entonces a extracción con diclorometano. Tras secar la
- 10 capa orgánica sobre sulfato de sodio anhidro, se eliminó el agente desecante por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo] para obtener el compuesto del título (13,7 g).

- RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 8,48 (1H, s), 6,02 (1H, dd, J = 4,2 Hz), 4,54 (1H, t, J = 4,5 Hz), 4,29 (1H, t, J = 4,5 Hz), 4,18-4,15 (1H, m), 4,04 (1H, dd, J = 11,5, 4,2 Hz), 3,80 (1H, dd, J = 11,5, 2,4 Hz), 0,96 (9H, s), 0,93 (9H, s), 0,84 (9H, s), 0,17 (3H, s), 0,16 (3H, s), 0,10 (3H, s), 0,09 (3H, s), 0,01 (3H, s), -0,16 (3H, s).
- 15

(Etapa 2)

2-[(Benzoiloxi)metil]-6-cloro-9-{2,3,5-tris-O-[terc-butil(dimetil)silil]-β-D-ribofuranosil}-9H-purina

- 5 A una disolución del compuesto obtenido en la etapa 1 (13,7 g) en tetrahidrofurano (121 ml) se le añadieron tetraquis(trifenilfosfina)paladio(0) (2,10 g) y yoduro de (benciloximetil)cinc preparado de la manera descrita a continuación (aproximadamente 0,9 M, 30,2 ml) en una atmósfera de nitrógeno, y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 20 horas. Tras añadir a la mezcla de reacción una solución acuosa saturada de cloruro de amonio para inactivar la reacción, el producto resultante se sometió a extracción con diclorometano. Tras secar la capa orgánica sobre sulfato de sodio anhidro, se eliminó el agente desecante por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo] para obtener el compuesto del título (7,29 g).

[Preparación de yoduro de (benciloximetil)cinc]

- 15 Después de que una suspensión de polvo de cinc (5,99 g) en tetrahidrofurano (17,1 ml) se sometiera a ultrasonidos en una atmósfera de nitrógeno, se añadió a la misma una solución de benzoato de yodometilo (12,0 g) en tetrahidrofurano (21,3 ml), y la mezcla de reacción se agitó a la misma temperatura durante 1,5 horas para obtener una disolución en tetrahidrofurano de yoduro de (benciloximetil)cinc (aproximadamente 0,9 M, 38,4 ml). MS(ESI) m/z: 763 (M+H)⁺.

- 20 RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 8,58 (1H, s), 8,13 (1H, dd, J = 8,5, 1,2 Hz), 7,60-7,56 (1H, m), 7,47-7,43 (2H, m), 6,09 (1H, d, J = 4,8 Hz), 5,60 (1H, d, J = 13,9 Hz), 5,56 (1H, d, J = 13,9 Hz), 4,48 (1H, t, J = 4,5 Hz), 4,27 (1H, t, J = 4,2 Hz), 4,15-4,11 (1H, m), 4,03 (1H, dd, J = 11,5, 3,0 Hz), 3,80 (1H, dd, J = 11,5, 2,4 Hz), 0,96 (9H, s), 0,90 (9H, s), 0,76 (9H, s), 0,16 (3H, s), 0,15 (3H, s), 0,08 (3H, s), 0,06 (3H, s), -0,07 (3H, s), -0,27 (3H, s).

(Etapa 3)

2-[(Benzoiloxi)metil]-6-cloro-9-β-D-ribofuranosil-9H-purina

- 25 A una disolución del compuesto obtenido en la etapa 2 (7,29 g) en tetrahidrofurano (47,7 ml) se le añadió una disolución en tetrahidrofurano de fluoruro de tetrabutilamonio (aproximadamente 1 M, 38 ml) en una atmósfera de nitrógeno a 0 °C, y la mezcla de reacción se agitó a la misma temperatura durante 2,5 horas. Tras añadir a la mezcla de reacción una solución acuosa saturada de cloruro de amonio para inactivar la reacción, el producto resultante se sometió a extracción con diclorometano. Tras secar la capa orgánica sobre sulfato de sodio anhidro, se eliminó el agente desecante por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo] para obtener el compuesto del título (3,69 g). RMN de ¹H (CDCl₃) δ:
- 30 8,23 (1H, s), 8,15 (2H, dd, J = 8,5, 1,2 Hz), 7,63-7,59 (1H, m), 7,48 (2H, t, J = 7,9 Hz), 5,89 (1H, d, J = 6,0 Hz), 5,61 (1H, d, J = 13,9 Hz), 5,56 (1H, d, J = 14,5 Hz), 4,90 (1H, q, J = 5,6 Hz), 4,46-4,43 (1H, m), 4,28 (1H, q, J = 2,2 Hz), 4,02 (1H, dd, J = 10,0, 2,7 Hz), 3,84-3,79 (1H, m), 3,71-3,65 (1H, m), 3,56-3,53 (1H, m), 2,70 (1H, d, J = 2,4 Hz).

(Etapa 4)

2-[(Benzoiloxi)metil]-9-{5-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-β-D-ribofuranosil}-6-cloro-9H-purina

- 35 A una solución del compuesto obtenido en la etapa 3 (2,36 g) en piridina (56 ml) se le añadió cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (2,30 g), y la mezcla de reacción se agitó en una atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente durante 17 horas. Se añadió etanol (20 ml) a la mezcla de reacción, que se volvió a agitar durante unos 10 minutos y después se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo] para obtener el compuesto del título (1,41 g).

- 40 MS(ESI) m/z: 745 (M+Na)⁺.

RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 8,32 (1H, s), 8,14-8,11 (2H, m), 7,64-7,59 (1H, m), 7,49-7,44 (2H, m), 7,23-7,12 (9H, m), 6,72 (4H, d, J = 7,9 Hz), 5,94 (1H, d, J = 5,4 Hz), 5,64 (1H, d, J = 15,1 Hz), 5,59 (1H, d, J = 14,5 Hz), 4,83-4,77 (2H, m), 4,37-4,33 (2H, m), 3,77 (6H, s), 3,35 (1H, dd, J = 10,6, 3,3 Hz), 3,28 (1H, dd, J = 10,9, 3,6 Hz), 2,64 (1H, s).

(Etapa 5)

- 45 2-[(Benzoiloxi)metil]-9-{5-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-3-O-[terc-butil(dimetil)silil]-β-D-ribofuranosil}-6-cloro-9H-purina

- 50 A una disolución del compuesto obtenido en la etapa 4 (2,61 g) en éter dimetílico de etilenglicol (72,0 ml) se le añadieron N,N-diisopropiletilamina (1,89 ml) y trifluorometanosulfonato de terc-butildimetilsililo (1,24 ml), y la mezcla de reacción se agitó en una atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente durante 1,5 horas. Se añadió a la mezcla de reacción una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio para inactivar la reacción, y el producto resultante se sometió a extracción con diclorometano. Tras secar la capa orgánica sobre sulfato de sodio anhidro, se eliminó el agente desecante por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante

cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo/trietilamina al 0,1 %] para obtener el compuesto del título (1,10 g).

RMN de ^1H (CDCl_3) δ : 8,35 (1H, s), 8,12-8,10 (2H, m), 7,60-7,56 (1H, m), 7,46-7,42 (2H, m), 7,37-7,35 (2H, m), 7,28-7,20 (7H, m), 6,81-6,75 (4H, m), 6,00 (1H, d, $J = 4,8$ Hz), 5,50 (2H, s), 4,69 (1H, q, $J = 5,6$ Hz), 4,39 (1H, dd, $J = 5,1, 3,9$ Hz), 4,16 (1H, q, $J = 3,8$ Hz), 3,77 (6H, s), 3,45 (1H, dd, $J = 10,6, 3,3$ Hz), 3,31 (1H, dd, $J = 10,9, 4,2$ Hz), 3,06 (1H, d, $J = 6,7$ Hz), 0,86 (9H, s), 0,04 (3H, s), -0,02 (3H, s).

(Etapa 6)

2-[(Benzoiloxi)metil]-9-(5-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-3-O-[terc-butil(dimetil)silil]-2-O-[(2-cianoetoxi)[di(propan-2-il)amino]fosfanil]- β -D-ribofuranosil)-6-cloro-9H-purina

- 10 Usando el compuesto obtenido en la etapa 5 (511 mg), la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 6 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (569 mg) en forma de una mezcla de diastereómeros en el átomo de fósforo (proporción de diastereómeros = 6:4).

15 RMN de ^1H (CDCl_3) δ : 8,43 (0,6H, s), 8,39 (0,4H, s), 8,10 (2H, d, $J = 7,9$ Hz), 7,58 (1H, t, $J = 7,6$ Hz), 7,47-7,38 (4H, m), 7,31-7,18 (7H, m), 6,82-6,78 (4H, m), 6,25 (0,4H, d, $J = 4,8$ Hz), 6,21 (0,6H, d, $J = 4,8$ Hz), 5,49 (1H, d, $J = 13,9$ Hz), 5,45 (1H, d, $J = 13,9$ Hz), 4,98-4,93 (0,6H, m), 4,83-4,78 (0,4H, m), 4,45 (0,6H, t, $J = 4,2$ Hz), 4,36 (0,4H, t, $J = 4,2$ Hz), 4,21-4,17 (1H, m), 3,78 (6H, s), 3,76-3,32 (6H, m), 2,46 (1,2H, t, $J = 6,3$ Hz), 2,30 (0,8H, t, $J = 6,3$ Hz), 1,28-0,86 (12H, m), 0,825 (5,4H, s), 0,815 (3,6H, s), 0,08 (1,8H, s), 0,04 (1,2H, s), -0,01 (1,8H, s), -0,02 (1,2H, s).

(Etapa 7)

- 20 (5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-7-{2-[(Benzoiloxi)metil]-6-cloro-9H-purin-9-il}-14-(6-benzoil-6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)-15,16-bis[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-10-(2-cianoetoxi)-2-oxo-10-sulfanilidenooctahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2 λ^5 ,10 λ^5 -furo[3,2-1][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2-tiolato de N,N-dietiletanaminio

- 25 Se realizó la misma reacción que en la etapa 7 del ejemplo 1 con la siguiente escala (materia prima: 2,72 g). Usando una solución de acetonitrilo del compuesto obtenido y el compuesto obtenido en la etapa 6 (3,03 g), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 8 del ejemplo 1 y la etapa 9 del ejemplo 1 para obtener el diastereómero 1 (351 mg) y el diastereómero 2 (351 mg) del compuesto del título.

Diastereómero 1 (menos polar)

MS(ESI) m/z : 1268 ($M+H$) $^+$.

- 30 RMN de ^1H (CD_3OD) δ : 9,30 (1H, s), 8,14 (2H, d, $J = 7,3$ Hz), 7,99 (1H, s), 7,64 (1H, t, $J = 7,3$ Hz), 7,52 (2H, t, $J = 7,9$ Hz), 7,40-7,36 (2H, m), 7,30-7,23 (4H, m), 6,43 (1H, d, $J = 8,5$ Hz), 6,37 (1H, d, $J = 3,0$ Hz), 5,62-5,56 (1H, m), 5,62 (2H, s), 5,06-5,01 (1H, m), 4,83 (1H, dd, $J = 4,5, 2,7$ Hz), 4,69 (1H, dd, $J = 4,2$ Hz), 4,49-4,28 (7H, m), 4,08 (1H, dd, $J = 12,1, 4,8$ Hz), 3,81-3,70 (1H, m), 3,46-3,38 (1H, m), 3,17-3,10 (8H, m), 2,29-2,23 (4H, m), 1,28 (9H, t, $J = 7,3$ Hz), 0,91 (9H, s), 0,90 (9H, s), 0,29 (3H, s), 0,20 (3H, s), 0,16 (3H, s), 0,11 (3H, s).

Diastereómero 2 (más polar)

- 35 MS(ESI) m/z : 1268 ($M+H$) $^+$.

- 40 RMN de ^1H (CD_3OD) δ : 8,97 (1H, s), 8,14 (2H, d, $J = 8,5$ Hz), 7,94 (1H, s), 7,68-7,63 (1H, m), 7,55-7,50 (2H, m), 7,39-7,36 (2H, m), 7,26-7,21 (4H, m), 6,41 (1H, d, $J = 7,9$ Hz), 6,21 (1H, d, $J = 5,4$ Hz), 5,64 (1H, d, $J = 15,1$ Hz), 5,25 (1H, d, $J = 8,5$ Hz), 4,1 (1H, d, $J = 7,9$ Hz), 6,21 (1H, d, $J = 5,4$ Hz), 5,64 (1H, d, $J = 15,1$ Hz), 5,57 (1H, d, $J = 15,1$ Hz), 5,25-5,18 (2H, m), 5,13-5,10 (1H, m), 5,04-5,01 (1H, m), 4,94-4,78 (3H, m), 4,51 (1H, t, $J = 10,9$ Hz), 4,33-4,06 (6H, m), 3,15 (6H, q, $J = 7,3$ Hz), 3,08-2,96 (2H, m), 2,84-2,71 (2H, m), 2,25-2,19 (2H, m), 1,28 (9H, t, $J = 7,3$ Hz), 0,91 (9H, s), 0,79 (9H, s), 0,19 (6H, s), 0,14 (3H, s), 0,07 (3H, s).

(Etapa 8-1)

- 45 (5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-7-[6-Amino-2-(hidroximetil)-9H-purin-9-il]-15,16-bis[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2 λ^5 ,10 λ^5 -furo[3,2-1][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) de bis(N,N-dietiletanaminio)

- 50 A una disolución del compuesto obtenido en la etapa 7 (diastereómero 1) (37,3 mg) en metanol (0,500 ml) se le añadió una disolución acuosa al 28 % de amoníaco (0,500 ml), y la mezcla de reacción se agitó en un tubo protegido a 60 °C durante 3 horas. La mezcla de reacción se purificó directamente por HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 35 %-55 % (0 min-30 min)] para obtener el compuesto del título (22,0 mg: con impurezas).

MS(ESI) m/z : 988 ($M+H$) $^+$.

(Etapa 8-2)

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-7-[6-Amino-2-(hidroximetil)-9H-purin-9-il]-15,16-bis[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocdiazulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-1][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidofosfacilotetradecin-2,10-bis(tiolato) de bis(N,N-dietiletanaminio)

- 5 A una disolución del compuesto obtenido en la etapa 7 (diastereómero 2) (37,7 mg) en tetrahidrofurano (0,500 ml) se le añadió una disolución acuosa al 28 % de amoníaco (0,500 ml), y la mezcla de reacción se agitó en un tubo protegido a 60 °C durante 3 horas. A continuación, se añadió una solución acuosa de amoníaco al 28 % (0,500 ml) y la mezcla de reacción se agitó durante 3 horas. A continuación, se añadió una solución acuosa de amoníaco al 28 % (0,500 ml) y la mezcla de reacción se agitó durante toda la noche. La mezcla de reacción se purificó directamente por HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 20 %-50 % (0 min-30 min)] para obtener el compuesto del título (19,3 mg).

MS(ESI) m/z: 988 (M+H)⁺.

- 15 RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,64 (1H, s), 8,02 (1H, s), 7,09 (1H, s), 6,35 (2H, d, J = 7,9 Hz), 5,48-5,41 (2H, m), 5,26-5,19 (1H, m), 5,00-4,95 (2H, m), 4,70-4,53 (4H, m), 4,22 (1H, s), 4,06 (1H, dd, J = 12,1, 4,8 Hz), 3,91-3,86 (1H, m), 3,53-3,48 (2H, m), 3,18 (12H, q, J = 7,3 Hz), 2,92 (2H, t, J = 5,4 Hz), 2,04-1,99 (2H, m), 1,29 (18H, t, J = 7,3 Hz), 1,00 (9H, s), 0,74 (9H, s), 0,28 (6H, s), 0,21 (3H, s), -0,06 (3H, s).

(Etapa 9-1)

- 20 (5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-7-[6-Amino-2-(hidroximetil)-9H-purin-9-il]-15,16-dihidroxi-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocdiazulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-1][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidofosfacilotetradecin-2,10-bis(tiolato) disódico

Usando el compuesto obtenido en la etapa 8-1 (22,0 mg: con impurezas), la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 11 del ejemplo 1, y la purificación se realizó a continuación según las siguientes condiciones de purificación para obtener el compuesto del título en forma de una sal de trietilamina.

- 25 [Condiciones de purificación] HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 2 %-30 % (0 min-30 min)].

La sal de trietilamina obtenida se sometió a intercambio de sales de la misma manera que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (8,0 mg).

MS(ESI) m/z: 760 (M+H)⁺.

- 30 RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,70 (1H, s), 8,03 (1H, s), 7,14 (1H, s), 6,39 (1H, d, J = 8,5 Hz), 6,29 (1H, d, J = 3,6 Hz), 5,40-5,35 (1H, m), 5,15 (1H, dt, J = 9,1, 3,8 Hz), 4,84 (1H, d, J = 3,6 Hz), 4,80 (1H, t, J = 4,5 Hz), 4,57 (2H, s), 4,51-4,43 (2H, m), 4,38-4,31 (2H, m), 4,09-4,00 (2H, m), 3,52-3,48 (2H, m), 2,89-2,76 (2H, m), 2,01-1,97 (2H, m). RMN de ³¹P (CD₃OD) δ: 58,1 (s), 54,4 (s).

(Etapa 9-2)

- 35 (5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-7-[6-Amino-2-(hidroximetil)-9H-purin-9-il]-15,16-dihidroxi-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocdiazulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-1][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidofosfacilotetradecin-2,10-bis(tiolato) disódico

Usando el compuesto obtenido en la etapa 8-2 (19,3 mg), la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 11 del ejemplo 1, y la purificación se realizó a continuación según las siguientes condiciones de purificación para obtener el compuesto del título en forma de una sal de trietilamina.

- 40 [Condiciones de purificación] HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 2 %-30 % (0 min-30 min)].

La sal de trietilamina obtenida se sometió a intercambio de sales de la misma manera que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (6,5 mg).

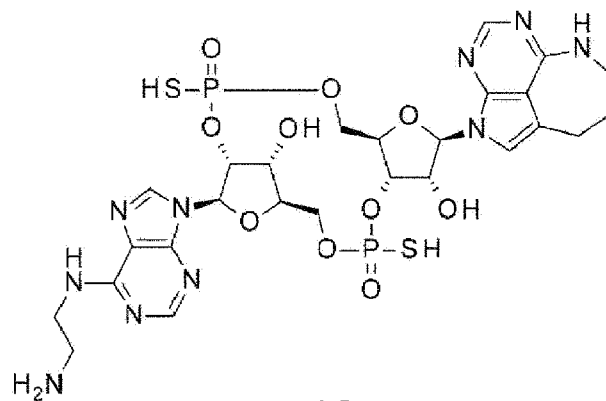
MS(ESI) m/z: 760 (M+H)⁺.

- 45 RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,76 (1H, s), 8,05 (1H, s), 7,18 (1H, s), 6,38 (1H, d, J = 8,5 Hz), 6,33 (1H, d, J = 6,7 Hz), 5,49-5,43 (2H, m), 4,81 (1H, dd, J = 6,3, 4,5 Hz), 4,58 (2H, s), 4,51-4,29 (5H, m), 4,04 (1H, d, J = 12,1 Hz), 3,93-3,88 (1H, m), 3,54-3,52 (2H, m), 2,92 (2H, t, J = 5,4 Hz), 2,05-2,00 (2H, m).

RMN de ³¹P (CD₃OD) δ: 63,0 (s), 60,3 (s).

Ejemplo 13: Síntesis de CDN13

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-7-{6-[(2-Aminoetil)amino]-9H-purin-9-il}-15,16-dihidroxi-2,10-bis(sulfanil)-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-1][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-diona



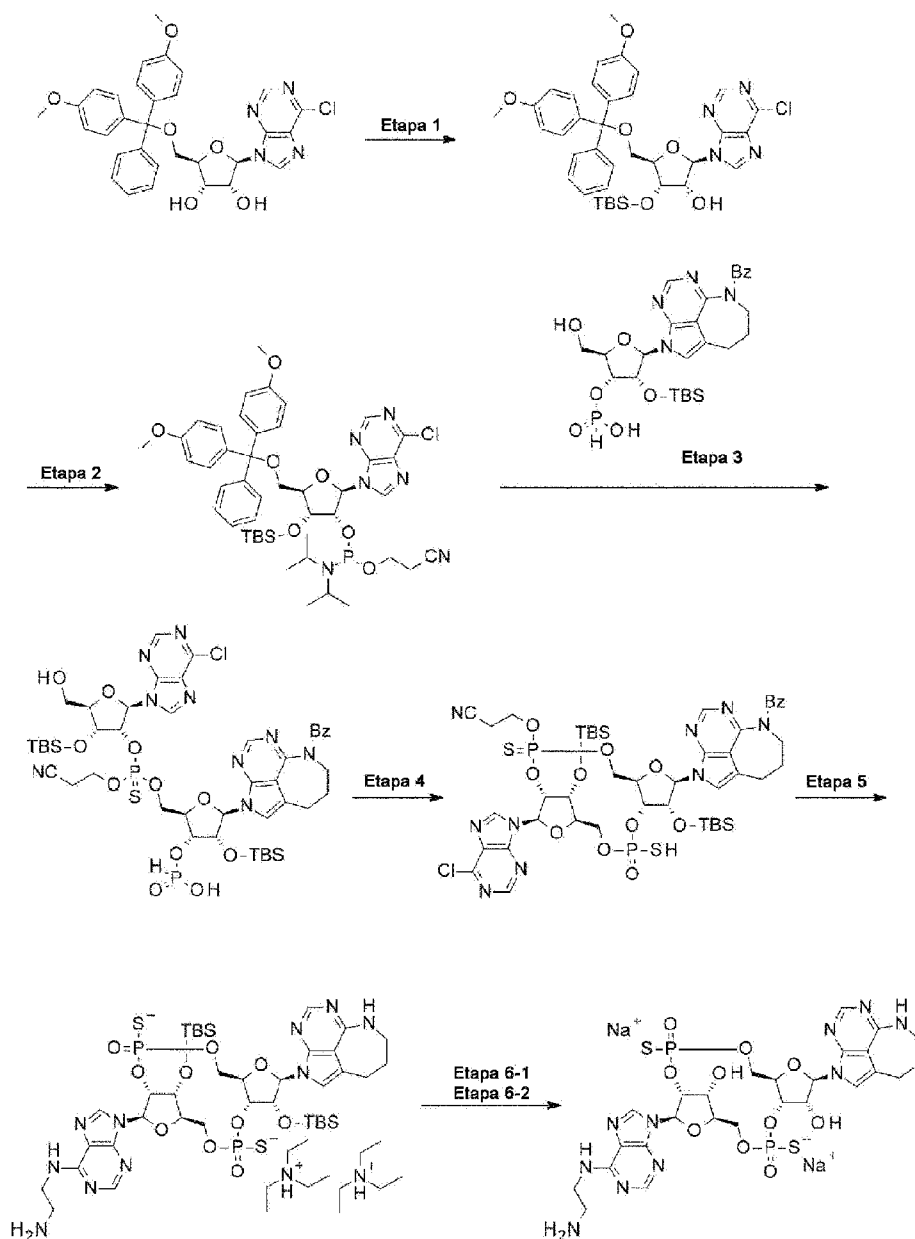
13

5

13a (Diastereómero 1)

13b (Diastereómero 2)

[Esquema de síntesis]



(Etapa 1)

9-{5-O-[Bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-β-D-ribofuranosil}-6-cloro-9H-purina

- 5 Utilizando 9-{5-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-β-D-ribofuranosil}-6-cloro-9H-purina (15,3 g) como compuesto conocido en la bibliografía (J. Org. Chem. 2000, 65, 5104-5113), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 3 del ejemplo 5 para obtener el compuesto del título (8,44 g) y 9-{5-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-2-O-[terc-butil(dimetil)silil]-β-D-ribofuranosil}-6-cloro-9H-purina (5,77 g) en forma de un regioisómero del compuesto del título.

MS(ESI) m/z : 703 (M+H)⁺.

- 10 RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 8,71 (1H, s), 8,37 (1H, s), 7,40-7,37 (2H, m), 7,31-7,19 (7H, m), 6,82-6,78 (4H, m), 6,06 (1H, dd, J = 4,9 Hz), 4,79-4,74 (1H, m), 4,59 (1H, dd, J = 4,9, 3,9 Hz), 4,20 (1H, dd, J = 3,9, 1,9 Hz), 3,79 (3H, s), 3,78 (3H, s), 3,52 (1H, dd, J = 10,7, 3,4 Hz), 3,29 (1H, dd, J = 10,7, 3,9 Hz), 3,08 (1H, d, J = 6,8 Hz), 0,90 (9H, s), 0,10 (3H, s), 0,03 (3H, s).

Regioisómero (forma 2'-O-TBS)

- 15 MS(ESI) m/z : 703 (M+H)⁺.

RMN de ^1H (CDCl_3) δ : 8,67 (1H, s), 8,36 (1H, s), 7,46-7,42 (2H, m), 7,36-7,20 (7H, m), 6,84-6,80 (4H, m), 6,11 (1H, d, $J = 5,4$ Hz), 5,00-4,97 (1H, m), 4,40-4,35 (1H, m), 4,31-4,28 (1H, m), 3,79 (3H, s), 3,79 (3H, s), 3,52 (1H, dd, $J = 10,7$, 2,9 Hz), 3,42 (1H, dd, $J = 10,7$, 3,9 Hz), 2,68 (1H, d, $J = 3,9$ Hz), 0,84 (9H, s), 0,00 (3H, s), -0,16 (3H, s).

(Etapa 2)

- 5 9-(5-O-[Bis-(4-metoxifenil)(fenil)metil]-3-O-[terc-butil(dimetil)silil]-2-O-[(2-cianoetoxi)[di(propan-2-il)amino]fosfanil]- β -D-ribofuranosil)-6-cloro-9H-purina

Usando el compuesto obtenido en la etapa 1 (5,39 g), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 4 del ejemplo 5 para obtener el compuesto del título (5,78 g) en forma de una mezcla de diastereómeros en el átomo de fósforo (proporción de diastereómeros = 1:1).

- 10 MS(ESI) m/z : 903 ($M+H$) $^+$.

RMN de ^1H (CDCl_3) δ : 8,69 (0,5H, s), 8,67 (0,5H, s), 8,43 (0,5H, s), 8,41 (0,5H, s), 7,43-7,37 (2H, m), 7,32-7,19 (7H, m), 6,83-6,78 (4H, m), 6,30 (0,5H, d, $J = 4,4$ Hz), 6,21 (0,5H, d, $J = 4,9$ Hz), 5,06-5,00 (0,5H, m), 4,86-4,80 (0,5H, m), 4,56-4,50 (1H, m), 4,27-4,20 (1H, m), 3,79 (6H, s), 3,75-3,62 (1H, m), 3,57-3,46 (4H, m), 3,30 (1H, dt, $J = 10,7$, 3,9 Hz), 2,50 (1H, t, $J = 6,3$ Hz), 2,37 (1H, t, $J = 6,6$ Hz), 1,13-1,06 (9H, m), 0,90 (1,5H, s), 0,89 (1,5H, s), 0,86 (4,5H, s), 0,85 (4,5H, s), 0,12 (1,5H, s), 0,08 (1,5H, s), 0,02 (1,5H, s), 0,02 (1,5H, s).

(Etapa 3)

- 20 Se realizó la misma reacción que en la etapa 7 del ejemplo 1 con la siguiente escala (materia prima: 1,84 g). Utilizando una solución de acetonitrilo del compuesto obtenido y del compuesto obtenido en la etapa 2 (1,62 g), se llevó a cabo la reacción de la misma manera que en la etapa 8 del ejemplo 1. El producto bruto resultante se utilizó directamente para la reacción posterior.

(Etapa 4)

3-[(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-14-(6-Benzoil-6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocdiazulen-2-il)-15,16-bis[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-7-(6-cloro-9H-purin-9-il)-2-oxo-2-sulfanil-10-sulfanilidenoctahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2 λ^5 ,10 λ^5 -furo[3,2-1][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfacilotetradecin-10-il]oxi]propanonitrilo

- 25 Usando el producto bruto obtenido en la etapa 3, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 9 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (626 mg) en forma de una mezcla de diastereómeros en el átomo de fósforo.

MS(ESI) m/z : 1134 ($M+H$) $^+$.

(Etapa 5)

- 30 (5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-7-{6-[(2-Aminoetil)amino]-9H-purin-9-il}-15,16-bis[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocdiazulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2 λ^5 ,10 λ^5 -furo[3,2-1][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfacilotetradecin-2,10-bis(tiolato) de bis(N,N-dietiletanaminio)

- 35 A una disolución del compuesto obtenido en la etapa 4 (299 mg: una mezcla de diastereómeros) en etanol (10 ml) se le añadieron etilendiamina (0,352 ml) y trietilamina (0,735 ml), y la mezcla de reacción se agitó a 60 °C durante 15 horas. Tras concentrar la mezcla de reacción a presión reducida, el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo] para obtener el diastereómero 1 (122 mg: con impurezas) y el diastereómero 2 (111 mg: con impurezas) del compuesto del título.

Diastereómero 1 (menos polar)

MS(ESI) m/z : 1001 ($M+H$) $^+$.

- 40 Diastereómero 2 (más polar)

MS(ESI) m/z : 1001 ($M+H$) $^+$.

(Etapa 6-1)

- 45 (5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-7-{6-[(2-Aminoetil)amino]-9H-purin-9-il}-15,16-dihidroxi-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocdiazulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2 λ^5 ,10 λ^5 -furo[3,2-1][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfacilotetradecin-2,10-bis(tiolato) disódico

(Diastereómero 1)

Usando el compuesto obtenido en la etapa 5 (diastereómero 1) (122 mg: con impurezas), la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 11 del ejemplo 1, y la purificación se realizó a continuación según las siguientes condiciones de purificación para obtener el compuesto del título en forma de una sal de trietilamina.

[Condiciones de purificación] Cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo] y HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 5 %-30 % (0 min-40 min)].

La sal de trietilamina obtenida se sometió a intercambio de sales de la misma manera que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (29,6 mg).

MS(ESI) m/z: 773 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,77 (1H, s), 8,27 (1H, s), 8,03 (1H, s), 7,10 (1H, s), 6,35 (1H, d, J = 8,5 Hz), 6,27 (1H, d, J = 4,8 Hz), 5,41 (1H, ddd, J = 7,9, 4,2, 2,1 Hz), 5,21-5,14 (1H, m), 4,84-4,77 (2H, m), 4,49-4,38 (2H, m), 4,35-4,26 (2H, m), 4,09-3,99 (2H, m), 3,92-3,80 (2H, m), 3,51-3,45 (2H, m), 3,22 (2H, t, J = 6,0 Hz), 2,89-2,81 (2H, m), 2,02-1,94 (2H, m).

RMN de ³¹P (CD₃OD) δ: 57,8 (s), 55,0 (s).

(Etapa 6-2)

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-7-{6-[(2-Aminoetil)amino]-9H-purin-9-il}-15,16-dihidroxi-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-1][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxadifosfacilotetradecin-2,10-bis(tiolato) disódico

(Diastereómero 2)

Usando el compuesto obtenido en la etapa 5 (diastereómero 2) (119 mg: con impurezas), la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 11 del ejemplo 1, y la purificación se realizó a continuación según las siguientes condiciones de purificación para obtener el compuesto del título en forma de una sal de trietilamina.

[Condiciones de purificación] Cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo] y HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 5 %-25 % (0 min-40 min)].

La sal de trietilamina obtenida se sometió a intercambio de sales de la misma manera que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (15,6 mg).

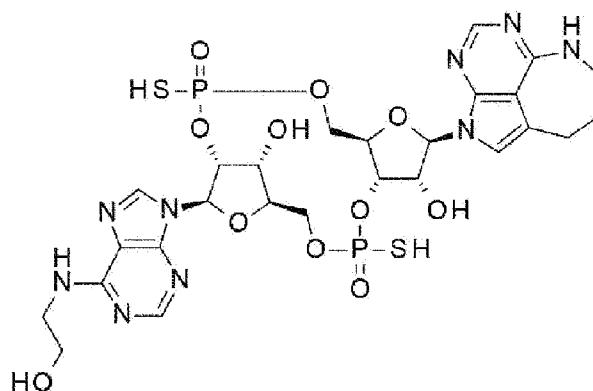
MS(ESI) m/z: 773 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,83 (1H, s), 8,27 (1H, s), 8,02 (1H, s), 7,10 (1H, s), 6,35 (1H, dd, J = 7,9 Hz), 6,32 (1H, d, J = 6,7 Hz), 5,55-5,43 (2H, m), 4,81 (1H, dd, J = 7,0, 4,5 Hz), 4,52-4,29 (5H, m), 4,06-4,00 (1H, m), 3,93-3,80 (3H, m), 3,52-3,47 (2H, m), 3,21 (2H, t, J = 5,7 Hz), 2,94-2,88 (2H, m), 2,05-1,96 (2H, m).

RMN de ³¹P (CD₃OD) δ: 63,1 (s), 60,1 (s).

Ejemplo 14: Síntesis de CDN14

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-15,16-Dihidroxi-7-{6-[(2-hidroxietil)amino]-9H-purin-9-il}-2,10-bis(sulfanil)-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-1][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxadifosfacilotetradecin-2,10-diona

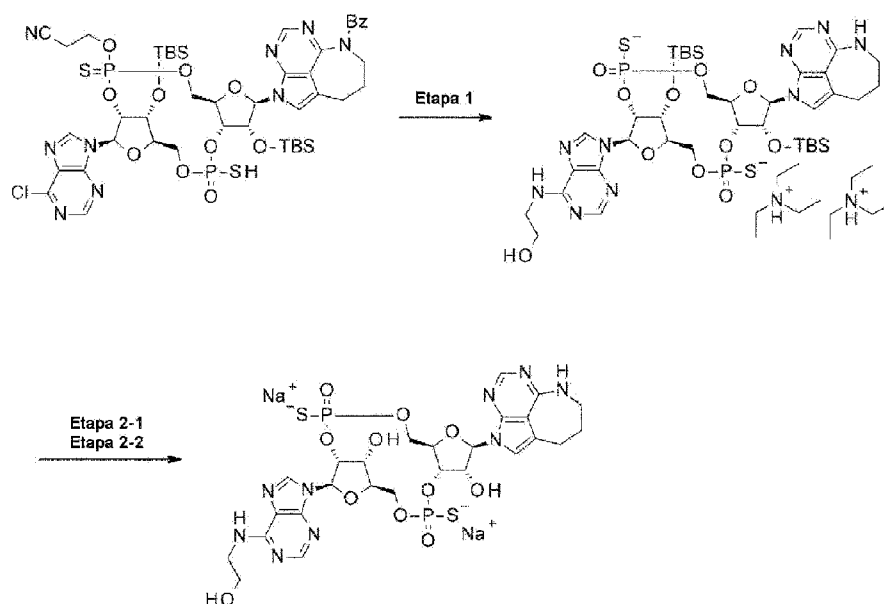


14

14a (Diastereómero 1)

14b (Diastereómero 2)

[Esquema de síntesis]



(Etapa 1)

- 5 (5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-15,16-di-*tert*-butyl-[(dimetil)silil]oxi-7-{6-[(2-hidroxi-etil)amino]-9H-purin-9-il}-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-1][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfacilotetradecin-2,10-bis(tiolato) de bis(N,N-dietiletanaminio)

- 10 A una disolución del compuesto obtenido en la etapa 4 del ejemplo 13 (313 mg) en etanol (10 ml) se le añadieron 2-aminoetanol (0,330 ml) y trietilamina (0,769 ml), y la mezcla de reacción se agitó a 60 °C durante 15 horas. Tras concentrar la mezcla de reacción a presión reducida, el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo] para obtener el diastereómero 1 (111 mg: con impurezas) y el diastereómero 2 (102 mg: con impurezas) del compuesto del título.

Diastereómero 1 (menos polar)

MS(ESI) *m/z*: 1002 (M+H)⁺.

Diastereómero 2 (más polar)

- 15 MS(ESI) *m/z*: 1002 (M+H)⁺.

(Etapa 2-1)

- 20 (5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-15,16-Dihidroxi-7-{6-[(2-hidroxi-etil)amino]-9H-purin-9-il}-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-1][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfacilotetradecin-2,10-bis(tiolato) disódico

Usando el compuesto obtenido en la etapa 1 (diastereómero 1) (111 mg: con impurezas), la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 11 del ejemplo 1, y la purificación se realizó a continuación según las siguientes condiciones de purificación para obtener el compuesto del título en forma de una sal de trietilamina.

- 25 [Condiciones de purificación] Cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo] y HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 5 %-30 % (0 min-40 min)].

La sal de trietilamina obtenida se sometió a intercambio de sales de la misma manera que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (47,1 mg).

MS(ESI) *m/z*: 774 (M+H)⁺.

RMN de ^1H (CD_3OD) δ : 8,70 (1H, s), 8,22 (1H, s), 8,03 (1H, s), 7,10 (1H, s), 6,34 (1H, d, $J = 8,5$ Hz), 6,29 (1H, d, $J = 4,8$ Hz), 5,41-5,34 (1H, m), 5,19-5,13 (1H, m), 4,84 (1H, d, $J = 4,2$ Hz), 4,79 (1H, dd, $J = 4,8, 2,4$ Hz), 4,52-4,41 (2H, m), 4,39-4,31 (2H, m), 4,07-3,96 (2H, m), 3,81-3,66 (4H, m), 3,52-3,47 (2H, m), 2,90-2,77 (2H, m), 2,03-1,95 (2H, m).

RMN de ^{31}P (CD_3OD) δ : 57,9 (s), 54,4 (s).

5 (Etapa 2-2)

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-15,16-Dihidroxi-7-{6-[(2-hidroxi-etil)amino]-9H-purin-9-il}-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2 λ^5 ,10 λ^5 -furo[3,2-1][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxadifosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) disódico

(Diastereómero 2)

- 10 Usando el compuesto obtenido en la etapa 1 (diastereómero 2) (102 mg: con impurezas), la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 11 del ejemplo 1, y la purificación se realizó a continuación según las siguientes condiciones de purificación para obtener el compuesto del título en forma de una sal de trietilamina.

[Condiciones de purificación] Cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo] y HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 5 %-25 % (0 min-40 min)].

- 15 La sal de trietilamina obtenida se sometió a intercambio de sales de la misma manera que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (27,1 mg).

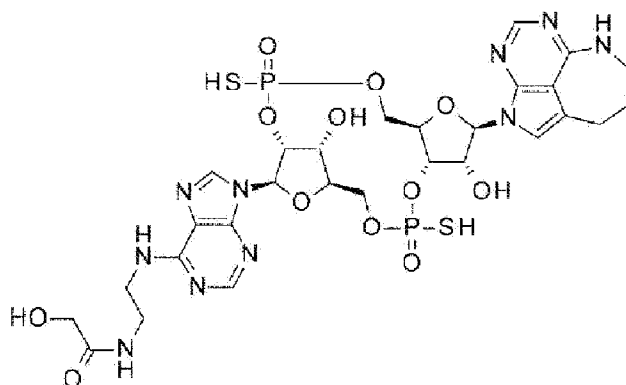
MS(ESI) m/z : 774 ($M+H$) $^+$.

RMN de ^1H (CD_3OD) δ : 8,78 (1H, s), 8,22 (1H, s), 8,02 (1H, s), 7,12 (1H, s), 6,34 (1H, dd, $J = 1,8$ Hz), 6,32 (1H, s), 5,52-5,42 (2H, m), 4,80 (1H, dd, $J = 6,7, 4,8$ Hz), 4,50-4,28 (5H, m), 4,05-3,98 (1H, m), 3,93-3,86 (1H, m), 3,81-3,68 (4H, m), 3,53-3,47 (2H, m), 2,95-2,88 (2H, m), 2,05-1,98 (2H, m).

- 20 RMN de ^{31}P (CD_3OD) δ : 63,0 (s), 60,2 (s).

Ejemplo 15: Síntesis de CDN15

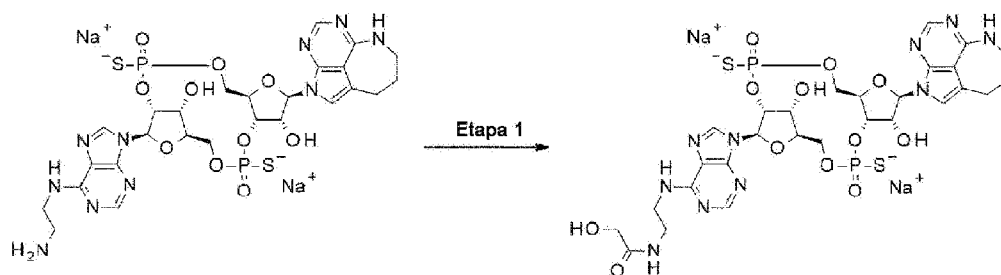
- 25 N-[2-({9-[(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-15,16-Dihidroxi-2,10-dioxo-2,10-bis(sulfanil)-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2 λ^5 ,10 λ^5 -furo[3,2-1][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxadifosfaciclotetradecin-7-il]-9H-purin-6-il}amino)etil]-2-hidroxiacetamida



15

15a (Diastereómero 1)

- 30 [Esquema de síntesis]



(Etapa 1)

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-15,16-Dihidroxi-7-(6-[[2-(2-hidroxiacetamida)etil]amino]-9H-purin-9-il)-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-1][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxadifosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) disódico

Usando el compuesto obtenido en la etapa 6-2 del ejemplo 13 (10,0 mg), la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 1-1 del ejemplo 7, y la purificación se realizó a continuación según las siguientes condiciones de purificación para obtener el compuesto del título en forma de una sal de trietilamina.

[Condiciones de purificación] Cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo], HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 5 %-35 % (0 min-40 min)].

La sal de trietilamina obtenida se sometió a intercambio de sales de la misma manera que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (6,6 mg).

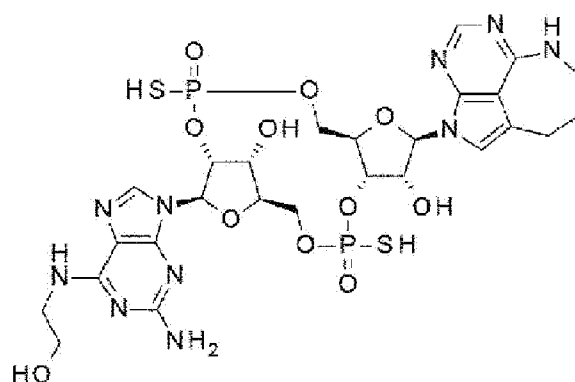
MS(ESI) m/z: 831 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,78 (1H, s), 8,24 (1H, s), 8,02 (1H, s), 7,12 (1H, s), 6,33 (2H, dd, J = 6,7 Hz), 5,52-5,42 (2H, m), 4,80 (1H, dd, J = 6,7, 4,2 Hz), 4,50-4,27 (5H, m), 4,04-3,98 (1H, m), 3,95 (2H, s), 3,93-3,86 (1H, m), 3,83-3,73 (2H, m), 3,58-3,46 (4H, m), 2,95-2,88 (2H, m), 2,05-1,98 (2H, m).

RMN de ³¹P (CD₃OD) δ: 63,1 (s), 60,4 (s).

Ejemplo 16: Síntesis de CDN16

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-7-{2-Amino-6-[(2-hidroxi)etil]amino]-9H-purin-9-il}-15,16-dihidroxi-2,10-bis(sulfanil)-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-1][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxadifosfaciclotetradecin-2,10-diona

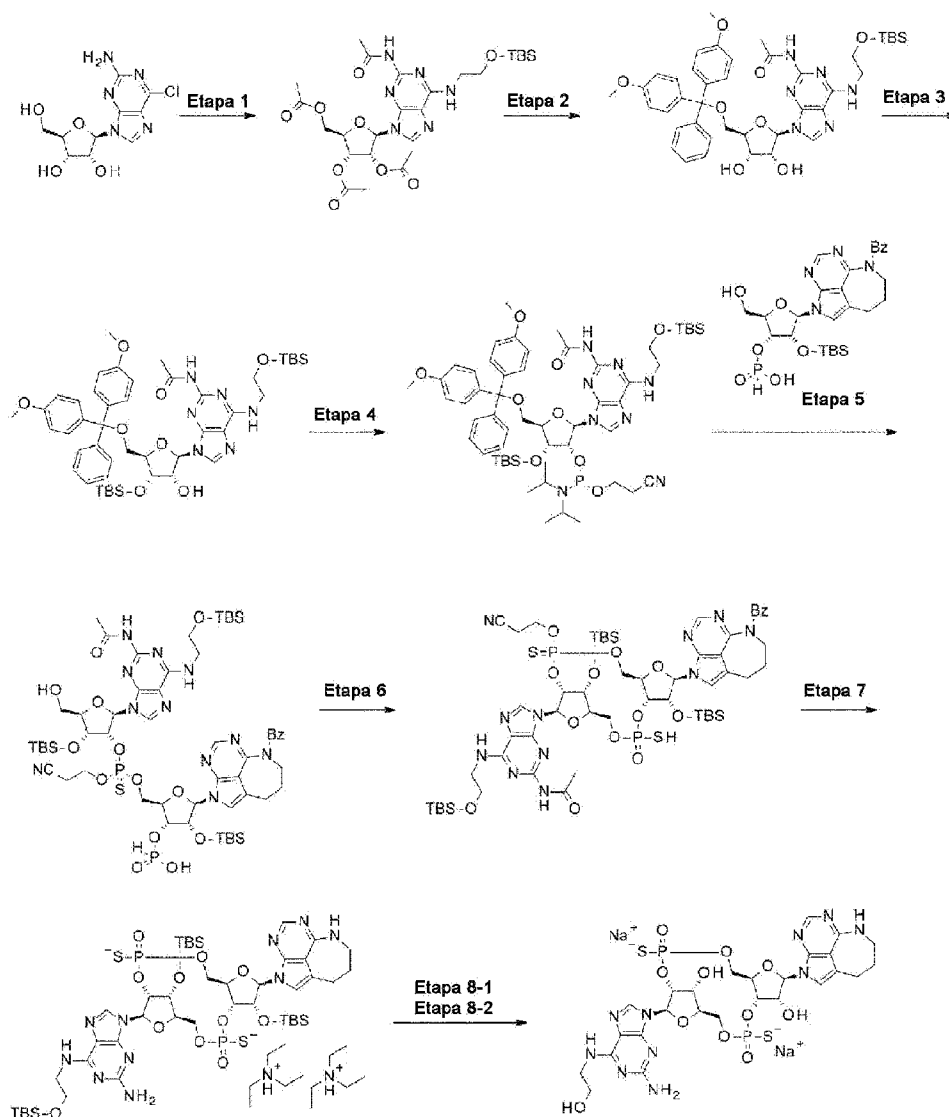


16

16a (Diastereómero 1)

16b (Diastereómero 2)

[Esquema de síntesis]



(Etapa 1)

2-Acetamido-2',3',5'-tri-O-acetil-N-(2-[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]etil)adenosina

- 5 A una solución de 6-cloro-9-β-D-ribofuranosil-9H-purin-2-amina disponible en el mercado (Tokyo Chemical Industry Co, Ltd.) de 6-cloro-9-β-D-ribofuranosil-9H-purin-2-amina (5,00 g) en etanol (30 ml) se le añadieron 2-[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]etan-1-amina (3,49 g) y N,N-diisopropiletilamina (4,33 ml), y la mezcla de reacción se agitó a 80 °C durante 65 horas. Después de concentrar la mezcla de reacción a presión reducida, se añadieron piridina (15 ml) y anhídrido acético (15 ml) al residuo, y la mezcla de reacción se agitó a 70 °C durante 4 horas. Tras concentrar la mezcla de reacción a presión reducida, se añadió una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio a la
- 10 mezcla de reacción, que se sometió a extracción con acetato de etilo. Tras secar la capa orgánica sobre sulfato de sodio anhidro, se eliminó el agente desecante por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo] para obtener el compuesto del título (8,91 g). MS(ESI) m/z: 609 (M+H)⁺.

- 15 RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 7,84 (1H, s), 7,77 (1H, s), 6,14 (1H, sa), 6,03 (1H, d, J = 4,8 Hz), 5,92 (1H, t, J = 5,1 Hz), 5,72 (1H, t, J = 5,1 Hz), 4,50-4,40 (2H, m), 4,35 (1H, dd, J = 11,8, 4,5 Hz), 3,83 (2H, t, J = 5,1 Hz), 3,76-3,63 (2H, m), 2,54 (3H, s), 2,14 (3H, s), 2,10 (6H, s), 0,91 (9H, s), 0,07 (6H, s).

(Etapa 2)

2-Acetamido-5'-O-[[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-N-(2-[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]etil)adenosina

- 20 A una disolución del compuesto obtenido en la etapa 1 (4,00 g) en diclorometano (40 ml) se le añadió una disolución en metanol de metóxido de sodio (1,0 M, 6,64 ml), y la mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 1 hora. Después

de añadir ácido acético (0,413 ml) y piridina (0,5 ml) a la mezcla de reacción para inactivar la reacción, la mezcla de reacción se concentró a presión reducida. Se añadió piridina al residuo y el producto resultante se concentró parcialmente a presión reducida para preparar una solución de piridina (aproximadamente 20 ml). A esta solución se le añadió cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (4,68 g) a 0 °C, y la mezcla de reacción se agitó a la misma temperatura durante 30 minutos, almacenándose después a 4 °C durante la noche. Se añadió metanol (2 ml) a la mezcla de reacción, que se agitó durante 30 minutos, y después se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo/metanol/trietilamina al 0,1 %] para obtener el compuesto del título (4,41 g).

MS(ESI) m/z: 785 (M+H)⁺.

- 10 RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 7,97 (1H, s), 7,90 (1H, s), 7,21-7,08 (9H, m), 6,73-6,67 (4H, m), 6,14 (1H, s), 5,88 (1H, d, J = 6,7 Hz), 4,91-4,85 (1H, m), 4,46 (1H, t, J = 3,0 Hz), 4,32 (1H, d, J = 5,4 Hz), 3,86-3,80 (2H, m), 3,76 (3H, s), 3,76 (3H, s), 3,70-3,66 (1H, m), 3,42-3,34 (2H, m), 3,13 (1H, dd, J = 10,6, 2,7 Hz), 2,24 (3H, s), 0,90 (9H, s), 0,07 (3H, s), 0,07 (3H, s) (sólo se muestran los picos observables)

(Etapa 3)

- 15 2-Acetamido-5'-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-3'-O-[terc-butil(dimetil)silil]-N-(2-[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]etil)adenosina

Usando el compuesto obtenido en la etapa 2 (4,41 g), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 3 del ejemplo 5 para obtener el compuesto del título (1,75 g) y 2-acetamido-5'-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-2'-O-[terc-butil(dimetil)silil]-N-(2-[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]etil)adenosina (1,31 g) en forma de un regioisómero del compuesto del título.

- 20

MS(ESI) m/z: 899 (M+H)⁺.

- 25 RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 7,89 (1H, s), 7,69 (1H, sa), 7,39-7,34 (2H, m), 7,29-7,18 (7H, m), 6,80-6,75 (4H, m), 6,11 (1H, sa), 5,89 (1H, dd, J = 5,4 Hz), 4,65 (1H, dd, J = 5,4, 2,7 Hz), 4,43 (1H, dd, J = 5,1, 3,3 Hz), 4,19-4,15 (1H, m), 3,83 (2H, dd, J = 5,4, 2,7 Hz), 3,77 (6H, s), 3,74-3,63 (2H, m), 3,40 (1H, dd, J = 10,9, 3,6 Hz), 3,22 (1H, dd, J = 10,9, 3,9 Hz), 2,43 (3H, s), 0,90 (9H, s), 0,88 (9H, s), 0,10 (3H, s), 0,06 (6H, s), 0,03 (3H, s). (sólo se muestran los picos observables)

Regioisómero (forma 2'-O-TBS)

MS(ESI) m/z: 899 (M+H)⁺.

- 30 RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 7,84 (1H, s), 7,52 (1H, sa), 7,48-7,44 (2H, m), 7,37-7,32 (4H, m), 7,29-7,18 (3H, m), 6,83-6,78 (4H, m), 6,12 (1H, sa), 5,89 (1H, dd, J = 6,0 Hz), 4,96-4,89 (1H, m), 4,32-4,27 (1H, m), 4,24 (1H, dd, J = 3,2, 1,6 Hz), 3,84 (2H, dd, J = 5,4, 2,7 Hz), 3,78 (6H, s), 3,75-3,65 (2H, m), 3,48 (1H, dd, J = 10,6, 2,7 Hz), 3,35 (1H, dd, J = 10,6, 3,6 Hz), 2,72 (1H, dd, J = 3,0 Hz), 2,37 (3H, s), 0,91 (9H, s), 0,84 (9H, s), 0,07 (6H, s), -0,01 (3H, s), -0,17 (3H, s).

(Etapa 4)

- 35 2-Acetamido-5'-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-3'-O-[terc-butil(dimetil)silil]-N-(2-[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]etil)-2'-O-[(2-cianoetoxi)[di(propan-2-il)amino]fosfanil]adenosina

Usando el compuesto obtenido en la etapa 3 (1,75 g), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 4 del ejemplo 5 para obtener el compuesto del título (2,08 g) en forma de una mezcla de diastereómeros en el átomo de fósforo (proporción de diastereómeros = 6:4). MS(ESI) m/z: 1099 (M+H)⁺.

- 40 RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 7,90 (0,6H, s), 7,88 (0,4H, s), 7,61 (1H, d, J = 7,3 Hz), 7,45-7,18 (9H, m), 6,81 (4H, m), 6,10 (0,6H, d, J = 5,4 Hz), 6,09 (1H, sa), 6,06 (0,4H, d, J = 4,8 Hz), 4,95-4,85 (0,6H, m), 4,76-4,69 (0,4H, s), 4,45-4,41 (0,6H, m), 4,40-4,36 (0,4H, m), 4,19-4,13 (1H, m), 3,86-3,80 (2H, m), 3,78 (6H, s), 3,75-3,41 (8H, m), 3,32-3,22 (1H, m), 2,55-2,45 (3H, m), 2,36-2,30 (1H, m), 1,30-1,10 (9H, m), 0,92 (1,2H, d, J = 6,7 Hz), 0,90 (9H, s), 0,85 (9H, s), 0,76 (1,8H, d, J = 6,7 Hz), 0,10 (1,8H, s), 0,07 (1,2H, s), 0,06 (6H, s), 0,00 (3H, s).

(Etapa 5)

- 45 Se realizó la misma reacción que en la etapa 7 del ejemplo 1 con la siguiente escala (materia prima: 981 mg). Utilizando una solución de acetonitrilo del compuesto obtenido y del compuesto obtenido en la etapa 4 (1,05 g), se llevó a cabo la reacción de la misma manera que en la etapa 8 del ejemplo 1. El producto bruto resultante se utilizó directamente para la reacción posterior.

(Etapa 6)

- 50 N-{9-[(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-14-(6-Benzoi-6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)-15,16-bis[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-10-(2-cianoetoxi)-2-oxo-2-sulfanil-10-sulfanilidenoctahidro-2H,10H,12H-5,8-

metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-1][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-7-il]-6-[(2-[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]etil)amino]-9H-purin-2-il]acetamida

Usando el producto bruto obtenido en la etapa 5, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 9 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (413 mg) en forma de una mezcla de diastereómeros en el átomo de fósforo.

MS(ESI) m/z: 1330 (M+H)⁺.

(Etapa 7)

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-7-{2-Amino-6-[(2-[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]etil)amino]-9H-purin-9-il]-15,16-bis[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-1][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) de bis(N,N-dietiletanaminio)

El compuesto obtenido en la etapa 6 (413 mg) se disolvió en metanol (5 ml) y amoníaco líquido al 28 % (5 ml), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 63 horas. Tras concentrar la mezcla de reacción a presión reducida, el residuo se purificó simplemente mediante cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo], y el diastereómero 1 menos polar y el diastereómero 2 más polar se separaron entre sí. Los diastereómeros se disolvieron de nuevo en metanol (5 ml) y amoníaco líquido al 28 % (5 ml), y cada mezcla de reacción se agitó a 100 °C durante 2 días. Después de concentrar cada mezcla de reacción a presión reducida, cada residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo] para obtener el diastereómero 1 (70,4 mg: con impurezas) y el diastereómero 2 (65,1 mg: con impurezas) del compuesto del título.

Diastereómero 1 (menos polar)

MS(ESI) m/z: 1131 (M+H)⁺.

Diastereómero 2 (más polar)

MS(ESI) m/z: 1131 (M+H)⁺.

(Etapa 8-1)

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-7-{2-Amino-6-[(2-hidroxietil)amino]-9H-purin-9-il]-15,16-dihidroxi-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-1][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) disódico

(Diastereómero 1)

Usando el compuesto obtenido en la etapa 7 (diastereómero 1) (70,4 mg: con impurezas), la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 11 del ejemplo 1, y la purificación se realizó a continuación según las siguientes condiciones de purificación para obtener el compuesto del título en forma de una sal de trietilamina.

[Condiciones de purificación] Cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo] y HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 5 %-30 % (0 min-40 min)].

La sal de trietilamina obtenida se sometió a intercambio de sales de la misma manera que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (20,8 mg).

MS(ESI) m/z: 789 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,24 (1H, s), 8,02 (1H, s), 7,09 (1H, s), 6,29 (1H, d, J = 4,2 Hz), 6,12 (1H, d, J = 8,5 Hz), 5,46-5,39 (1H, m), 5,22-5,15 (1H, m), 4,84 (1H, d, J = 3,6 Hz), 4,80 (1H, t, J = 4,5 Hz), 4,50-4,32 (3H, m), 4,32-4,28 (1H, m), 4,12-3,98 (2H, m), 3,74 (2H, t, J = 5,4 Hz), 3,68-3,60 (2H, m), 3,48 (2H, t, J = 5,4 Hz), 2,87-2,70 (2H, m), 2,01-1,93 (2H, m).

RMN de ³¹P (CD₃OD) δ: 57,8 (s), 54,1 (s).

(Etapa 8-2)

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-7-{2-Amino-6-[(2-hidroxietil)amino]-9H-purin-9-il]-15,16-dihidroxi-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-1][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) disódico

(Diastereómero 2)

Usando el compuesto obtenido en la etapa 7 (diastereómero 2) (65,1 mg: con impurezas), la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 11 del ejemplo 1, y la purificación se realizó a continuación según las siguientes condiciones de purificación para obtener el compuesto del título en forma de una sal de trietilamina.

- 5 [Condiciones de purificación] Cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo], HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 5 %-30 % (0 min-40 min)], y HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/metanol, metanol: del 0 %-60 % (0 min-40 min)].

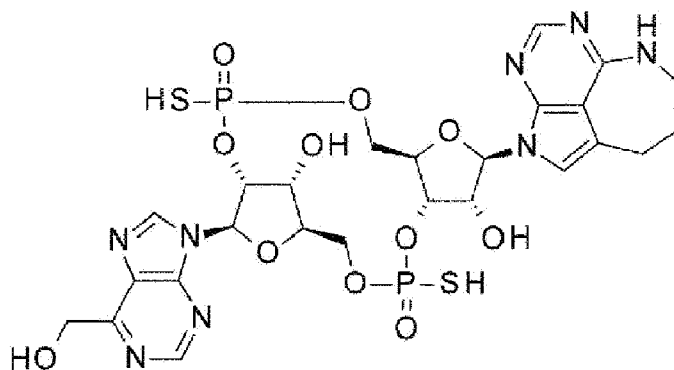
La sal de trietilamina obtenida se sometió a intercambio de sales de la misma manera que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (7,9 mg).

- 10 MS(ESI) m/z: 789 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,39 (1H, s), 8,02 (1H, s), 7,13 (1H, s), 6,33 (1H, d, J = 6,7 Hz), 6,13 (1H, d, J = 8,5 Hz), 5,51-5,40 (2H, m), 4,83-4,78 (1H, m), 4,51-4,29 (4H, m), 4,28-4,23 (1H, m), 4,07-4,00 (1H, m), 3,94-3,87 (1H, m), 3,75 (2H, t, J = 5,7 Hz), 3,69-3,62 (2H, m), 3,53-3,47 (2H, m), 2,91 (2H, t, J = 5,7 Hz), 2,05-1,97 (2H, m). RMN de ³¹P (CD₃OD) δ: 62,9 (s), 60,3 (s).

- 15 Ejemplo 17: Síntesis de CDN17

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-15,16-Dihidroxi-7-[6-(hidroximetil)-9H-purin-9-il]-2,10-bis(sulfanil)-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-1][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciotetradecin-2,10-diona

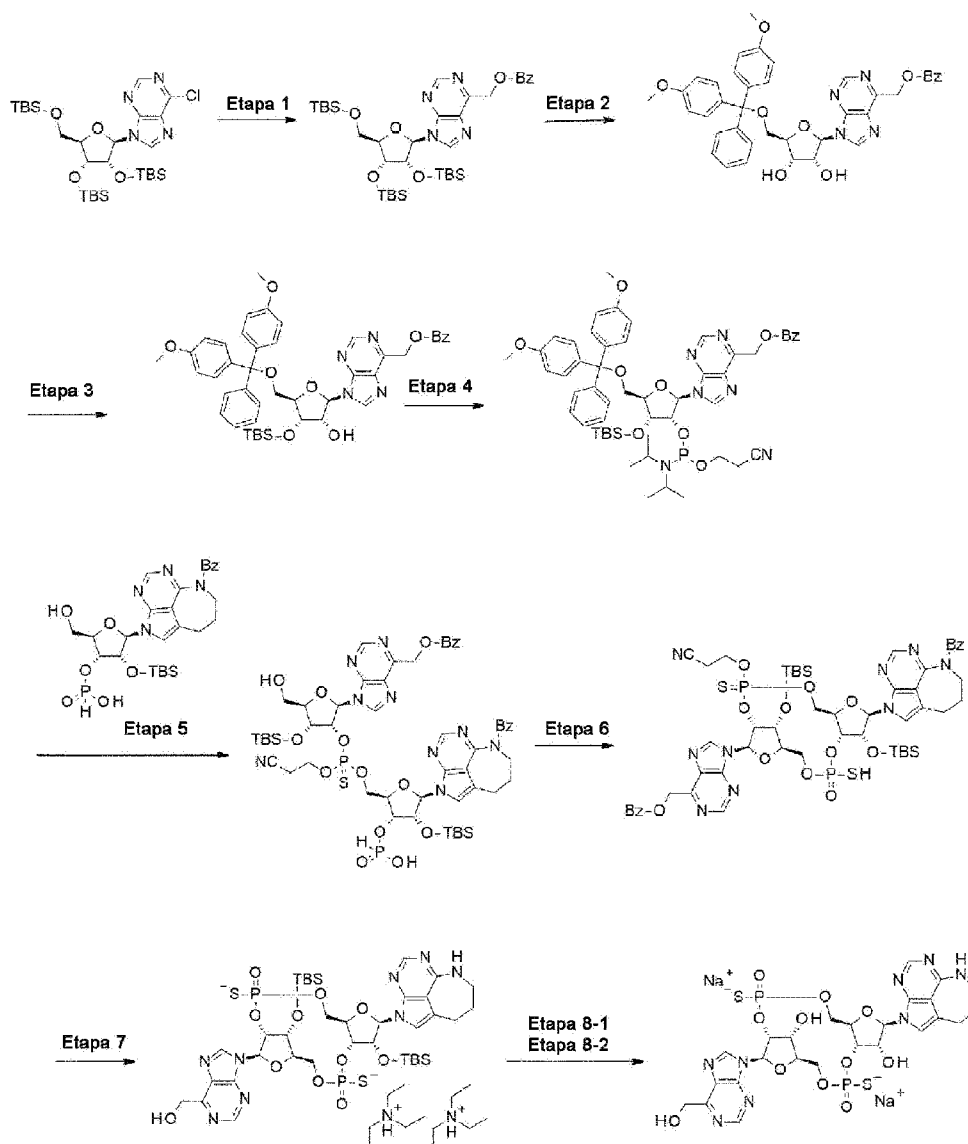


17

20

17a (Diastereómero 1)
17b (Diastereómero 2)

[Esquema de síntesis]



(Etapa 1)

6-[(Benzoiloxi)metil]-9-[2,3,5-tris-O-[terc-butil(dimetil)silil]-β-D-ribofuranosil]-9H-purina

- 5 Utilizando 6-cloro-9-[2,3,5-tris-O-[terc-butil(dimetil)silil]-β-D-ribofuranosil]-9H-purina (10,7 g) como compuesto conocido en la bibliografía (J. Org. Chem. 1997, 62, 6833-6841), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 2 del ejemplo 12 para obtener el compuesto del título (10,4 g).

MS (ESI) m/z: 729 (M+H)⁺.

- 10 RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 8,94 (1H, s), 8,50 (1H, s), 8,18-8,13 (2H, m), 7,60-7,54 (1H, m), 7,48-7,41 (2H, m), 6,13 (1H, dd, J = 4,2 Hz), 5,88 (2H, s), 4,63 (1H, dd, J = 4,5, 2,1 Hz), 4,34 (1H, dd, J = 4,2, 2,1 Hz), 4,17-4,14 (1H, m), 4,04 (1H, dd, J = 11,5, 3,6 Hz), 3,80 (1H, dd, J = 11,5, 2,4 Hz), 0,94 (9H, s), 0,93 (9H, s), 0,80 (9H, s), 0,14 (3H, s), 0,13 (3H, s), 0,11 (3H, s), 0,10 (3H, s), -0,02 (3H, s), -0,20 (3H, s).

(Etapa 2)

6-[(Benzoiloxi)metil]-9-[5-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-β-D-ribofuranosil]-9H-purina

- 15 A una disolución del compuesto obtenido en la etapa 1 (10,3 g) en tetrahidrofurano (50 ml) se le añadió una disolución en tetrahidrofurano de fluoruro de tetrabutilamonio (aproximadamente 1 M, 49,4 ml), y la mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 4 horas. Se añadió ácido acético (2,83 ml) a la mezcla de reacción, que se concentró a presión reducida. El residuo se purificó parcialmente mediante cromatografía en columna de gel de sílice [diclorometano/metanol]. A una solución del producto bruto en piridina (50 ml) se le añadió cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (10,1 g) a 0 °C, y la mezcla

de reacción se agitó a 4 °C durante la noche. Se añadió metanol (2 ml) a la mezcla de reacción, que se agitó durante 1 hora. Se añadió una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio a la mezcla de reacción, que se sometió a extracción con diclorometano. Tras secar la capa orgánica sobre sulfato de sodio anhidro, se eliminó el agente desecante por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo/trietilamina al 0,1 %] para obtener el compuesto del título (4,62 g).

MS (ESI) m/z: 689 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 8,91 (1H, s), 8,33 (1H, s), 8,15-8,11 (2H, m), 7,60-7,54 (1H, m), 7,46-7,40 (2H, m), 7,27-7,12 (9H, m), 6,75-6,70 (4H, m), 6,04 (1H, d, J = 6,0 Hz), 5,88 (2H, s), 5,43 (1H, sa), 4,90-4,84 (1H, m), 4,48-4,41 (2H, m), 3,76 (6H, s), 3,44 (1H, dd, J = 10,6, 3,3 Hz), 3,30 (1H, dd, J = 10,6, 3,3 Hz), 3,09 (1H, sa).

(Etapa 3)

6-[(Benzoiloxi)metil]-9-{5-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-3-O-[terc-butil(dimetil)silil]-β-D-ribofuranosil]-9H-purina

Usando el compuesto obtenido en la etapa 2 (4,53 g), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 3 del ejemplo 5 para obtener el compuesto del título (2,09 g) y 6-[(benzoiloxi)metil]-9-{5-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-2-O-[terc-butil(dimetil)silil]-β-D-ribofuranosil]-9H-purina (1,81 g) en forma de un regioisómero del compuesto del título.

MS (ESI) m/z: 803 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 8,92 (1H, s), 8,32 (1H, s), 8,16-8,12 (2H, m), 7,60-7,54 (1H, m), 7,47-7,36 (4H, m), 7,31-7,17 (7H, m), 6,81-6,76 (4H, m), 6,07 (1H, d, J = 4,8 Hz), 5,87 (2H, s), 4,81-4,74 (1H, m), 4,62-4,57 (1H, m), 4,22-4,17 (1H, m), 3,77 (6H, s), 3,52 (1H, dd, J = 10,9, 3,6 Hz), 3,26 (1H, dd, J = 10,9, 3,6 Hz), 3,12 (1H, d, J = 6,7 Hz), 0,89 (9H, s), 0,09 (3H, s), 0,02 (3H, s).

Regioisómero (forma 2'-O-TBS)

MS (ESI) m/z: 803 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 8,87 (1H, s), 8,31 (1H, s), 8,17-8,13 (2H, m), 7,60-7,55 (1H, m), 7,48-7,42 (4H, m), 7,35-7,31 (4H, m), 7,28-7,17 (3H, m), 6,83-6,78 (4H, m), 6,12 (1H, dd, J = 5,4 Hz), 5,88 (2H, s), 4,99 (1H, dd, J = 5,1, 2,6 Hz), 4,40-4,34 (1H, m), 4,28 (1H, dd, J = 3,6, 2,0 Hz), 3,77 (6H, s), 3,53 (1H, dd, J = 10,9, 3,0 Hz), 3,40 (1H, dd, J = 10,9, 3,9 Hz), 2,68 (1H, d, J = 4,8 Hz), 0,84 (9H, s), 0,00 (3H, s), -0,14 (3H, s).

(Etapa 4)

6-[(Benzoiloxi)metil]-9-{5-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-3-O-[terc-butil(dimetil)silil]-2-O-[(2-cianoetoxi)di(propan-2-il)amino]fosfanil]-β-D-ribofuranosil)-9H-purina

Usando el compuesto obtenido en la etapa 3 (2,04 g), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 4 del ejemplo 5 para obtener el compuesto del título (2,37 g) en forma de una mezcla de diastereómeros en el átomo de fósforo (proporción de diastereómeros = 56:44). MS (ESI) m/z: 1003 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 8,88 (0,44H, s), 8,87 (0,56H, s), 8,37 (0,44H, s), 8,35 (0,56H, s), 8,16-8,11 (2H, m), 7,60-7,54 (1H, m), 7,47-7,38 (4H, m), 7,33-7,16 (7H, m), 6,83-6,76 (4H, m), 6,31 (0,44H, d, J = 4,8 Hz), 6,21 (0,56H, d, J = 4,8 Hz), 5,87 (0,88H, s), 5,86 (1,12H, s), 5,08-5,01 (0,56H, m), 4,86-4,80 (0,44H, m), 4,56-4,50 (1H, m), 4,27-4,20 (1H, m), 3,85-3,54 (2H, m), 3,78 (6H, s), 3,54-3,44 (3H, m), 3,34-3,25 (1H, m), 2,51 (1,12H, t, J = 6,3 Hz), 2,34 (0,88H, t, J = 6,3 Hz), 1,14-1,05 (9H, m), 0,90 (3H, d, J = 6,7 Hz), 0,85 (5,04H, s), 0,85 (3,96H, s), 0,11 (1,68H, s), 0,08 (1,32H, s), 0,01 (3H, s).

(Etapa 5)

Se realizó la misma reacción que en la etapa 7 del ejemplo 1 con la siguiente escala (materia prima: 783 mg). Utilizando una solución de acetonitrilo del compuesto obtenido y del compuesto obtenido en la etapa 4 (765 mg), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 8 del ejemplo 1. El producto bruto resultante se utilizó directamente para la reacción posterior.

(Etapa 6)

Benzoato de {9-[(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-14-(6-benzoil-6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzoc[d]azulen-2-il)-15,16-bis[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-10-(2-cianoetoxi)-2-oxo-2-sulfanil-10-sulfanilidenoctahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-1] [1,3,6,9,11,2,10]pentaaxadifosfaciotetradecin-7-il]-9H-purin-6-il}metilo

Usando el producto bruto obtenido en la etapa 5, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 9 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (345 mg) en forma de una mezcla de diastereómeros en el átomo de fósforo.

MS (ESI) m/z: 1234 (M+H)⁺.

5 (Etapa 7)

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-15,16-Bis[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-7-[6-(hidroximetil)-9H-purin-9-il]-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-1][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfacilotetradecin-2,10-bis(tiolato) de bis(N,N-dietiletanaminio)

10 Usando el compuesto obtenido en la etapa 6 (345 mg), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 10 del ejemplo 1 para obtener el diastereómero 1 (101 mg: con impurezas) y el diastereómero 2 (89,9 mg: con impurezas) del compuesto del título.

Diastereómero 1 (menos polar)

MS (ESI) m/z: 973 (M+H)⁺.

Diastereómero 2 (más polar)

15 MS (ESI) m/z: 973 (M+H)⁺.

(Etapa 8-1)

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-15,16-Dihidroxi-7-[6-(hidroximetil)-9H-purin-9-il]-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-1][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfacilotetradecin-2,10-bis(tiolato) disódico (Diastereómero 1)

20 Usando el compuesto obtenido en la etapa 7 (diastereómero 1) (101 mg: con impurezas), la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 11 del ejemplo 1, y la purificación se realizó a continuación según las siguientes condiciones de purificación para obtener el compuesto del título en forma de una sal de trietilamina.

25 [Condiciones de purificación] Cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo], HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 5 %-30 % (0 min-40 min)].

La sal de trietilamina obtenida se sometió a intercambio de sales de la misma manera que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (59,2 mg).

MS (ESI) m/z: 745 (M+H)⁺.

30 RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 9,07 (1H, s), 8,88 (1H, s), 8,03 (1H, s), 7,10 (1H, s), 6,48 (1H, d, J = 8,5 Hz), 6,29 (1H, d, J = 4,8 Hz), 5,46 (1H, dt, J = 7,9, 4,2 Hz), 5,21-5,15 (1H, m), 5,10 (2H, s), 4,84-4,80 (1H, m), 4,79 (1H, t, J = 4,5 Hz), 4,51-4,42 (2H, m), 4,37-4,34 (1H, m), 4,33-4,24 (1H, m), 4,09-3,97 (2H, m), 3,52-3,47 (2H, m), 2,89-2,82 (2H, m), 2,03-1,95 (2H, m).

RMN de ³¹P (CD₃OD) δ: 57,9 (s), 54,8 (s).

(Etapa 8-2)

35 (5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-15,16-Dihidroxi-7-[6-(hidroximetil)-9H-purin-9-il]-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-1][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfacilotetradecin-2,10-bis(tiolato) disódico

(Diastereómero 2)

40 Usando el compuesto obtenido en la etapa 7 (diastereómero 2) (88,5 mg: con impurezas), la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 11 del ejemplo 1, y la purificación se realizó a continuación según las siguientes condiciones de purificación para obtener el compuesto del título en forma de una sal de trietilamina.

45 [Condiciones de purificación] Cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo], HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 5 %-30 % (0 min-40 min)], y HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/metanol, metanol: del 10 %-70 % (0 min-40 min)].

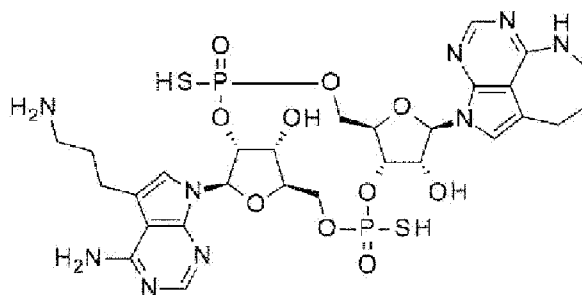
La sal de trietilamina obtenida se sometió a intercambio de sales de la misma manera que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (27,7 mg).

MS (ESI) m/z: 745 (M+H)⁺.

RMN de ^1H (CD_3OD) δ : 9,16 (1H, s), 8,87 (1H, s), 8,03 (1H, s), 7,11 (1H, s), 6,51 (1H, d, $J = 8,5$ Hz), 6,33 (1H, d, $J = 6,7$ Hz), 5,58-5,45 (2H, m), 5,12-5,09 (2H, m), 4,81-4,76 (1H, m), 4,53-4,49 (1H, m), 4,48-4,36 (2H, m), 4,34 (2H, s), 4,09-4,02 (1H, m), 3,92-3,85 (1H, m), 3,53-3,47 (2H, m), 2,94-2,87 (2H, m), 2,05-1,97 (2H, m). RMN de ^{31}P (CD_3OD) δ : 63,1 (s), 60,1 (s).

5 Ejemplo 18: Síntesis de CDN18

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-7-[4-Amino-5-(3-aminopropil)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il]-15,16-dihidroxi-2,10-bis(sulfanil)-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2 λ^5 ,10 λ^5 -furo[3,2-1][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfacilotetradecin-2,10-diona

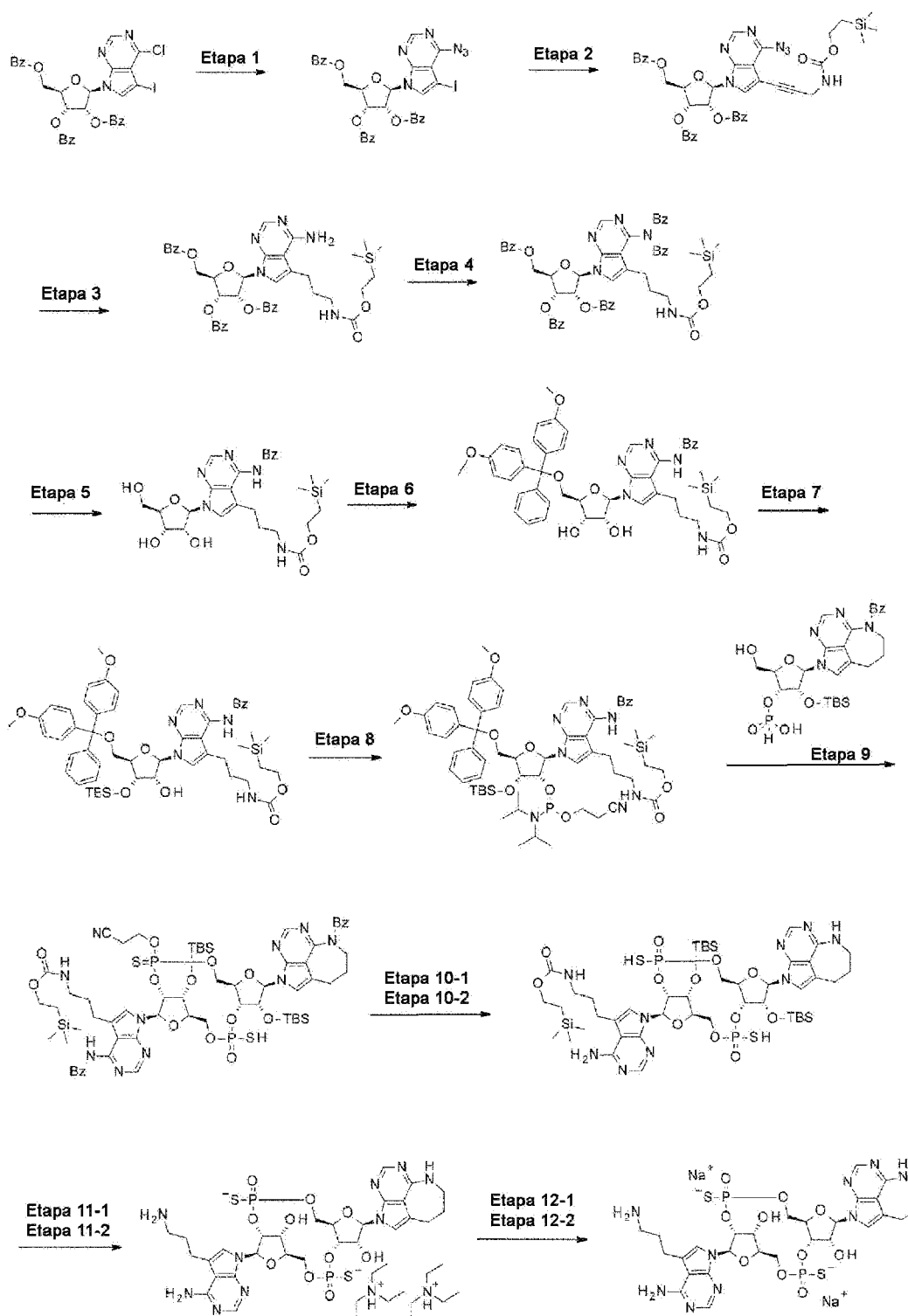


18

10

18a (Diastereómero 1)
18b (Diastereómero 2)

[Esquema de síntesis]



(Etapa 1)

4-Azido-5-yodo-7-(2,3,5-tri-O-benzoyl-beta-D-ribofuranosil)-7H-pirrol[2,3-d]pirimidina

5

A una solución de 4-cloro-5-yodo-7-(2,3,5-tri-O-benzoyl-beta-D-ribofuranosil)-7H-pirrol[2,3-d]pirimidina (17,96 g) como compuesto conocido en la bibliografía (Synth. Commun., 2012, 42, 358-374) en N,N-dimetilformamida (90 ml) se le añadió azida de tetrabutamonio (10,1 g), y la mezcla de reacción se agitó a 80 °C durante 30 minutos. La temperatura de la mezcla de reacción se volvió a llevar hasta la temperatura ambiente, y se añadieron una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio y acetato de etilo a la mezcla de reacción, que se sometió a extracción con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con salmuera y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El agente desecante se

eliminó por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo] para obtener el compuesto del título (17,66 g).

RMN de ^1H (CDCl_3) δ : 9,18 (1H, s), 8,13-8,09 (2H, m), 8,03-7,99 (2H, m), 7,95-7,90 (2H, m), 7,64-7,34 (10H, m), 6,71 (1H, d, $J = 5,1$ Hz), 6,20 (1H, t, $J = 5,5$ Hz), 6,11 (1H, t, $J = 5,3$ Hz), 4,96 (1H, dd, $J = 12,2, 3,2$ Hz), 4,88-4,84 (1H, m), 4,70 (1H, dd, $J = 12,2, 3,2$ Hz).

(Etapa 2)

4-Azido-7-(2,3,5-tri-O-benzoil- β -D-ribofuranosil)-5-[3-({[2-(trimetilsilil)etoxi]carbonil}amino)prop-1-in-1-il]-7H-pirrolol[2,3-d]pirimidina

A una disolución mezclada del compuesto obtenido en la etapa 1 (9,64 g) en N,N-dimetilformamida (30 ml)-tetrahidrofurano (100 ml) se le añadieron carbamato de 2-(trimetilsilil)etilprop-2-in-1-ilo (6,58 g), trietilamina (4,57 ml), tetraquis(trifenilfosfina)paladio(0) (763 mg) y yoduro de cobre(I) (251 mg) en este orden, y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se añadió agua a la mezcla de reacción, que se sometió a extracción con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con salmuera y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El agente desecante se eliminó por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo] para obtener el compuesto del título (7,20 g).

RMN de ^1H (CDCl_3) δ : 9,16 (1H, s), 8,14-8,08 (2H, m), 8,03-7,99 (2H, m), 7,94-7,90 (2H, m), 7,66 (1H, s), 7,65-7,35 (9H, m), 6,66 (1H, d, $J = 5,1$ Hz), 6,22 (1H, t, $J = 5,5$ Hz), 6,10 (1H, t, $J = 5,3$ Hz), 5,07 (1H, sa), 4,95 (1H, dd, $J = 12,3, 2,9$ Hz), 4,88-4,84 (1H, m), 4,70 (1H, dd, $J = 12,3, 3,7$ Hz), 4,29 (2H, d, $J = 5,5$ Hz), 4,21 (2H, t, $J = 8,6$ Hz), 1,02 (2H, t, $J = 8,6$ Hz), 0,05 (9H, s).

(Etapa 3)

7-(2,3,5-Tri-O-benzoil- β -D-ribofuranosil)-5-[3-({[2-(trimetilsilil)etoxi]carbonil}amino)propil]-7H-pirrolol[2,3-d]pirimidin-4-amina

A una disolución mixta del compuesto obtenido en la etapa 2 (7,20 g) en metanol (70 ml)-tetrahidrofurano (70 ml) se le añadió hidróxido de paladio al 20 %-carbono (2 g), y la mezcla de reacción se agitó en una atmósfera de hidrógeno a temperatura ambiente durante 2 horas. Tras eliminar el catalizador por filtración, el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo] para obtener el compuesto del título (5,45 g).

RMN de ^1H (CDCl_3) δ : 8,26 (1H, s), 8,19-8,15 (2H, m), 8,02-7,97 (2H, m), 7,96-7,92 (2H, m), 7,65-7,48 (5H, m), 7,43-7,32 (4H, m), 6,82 (1H, s), 6,73 (1H, d, $J = 6,3$ Hz), 6,17 (1H, t, $J = 5,9$ Hz), 6,11 (1H, dd, $J = 5,9, 3,9$ Hz), 5,23 (2H, s), 4,90 (1H, dd, $J = 12,2, 3,4$ Hz), 4,77-4,70 (2H, m), 4,63 (1H, dd, $J = 12,2, 3,4$ Hz), 4,15 (2H, t, $J = 8,6$ Hz), 3,20-3,10 (2H, m), 2,62 (2H, t, $J = 7,6$ Hz), 1,72-1,62 (2H, m), 1,01-0,94 (2H, m), 0,04 (9H, s).

(Etapa 4)

N,N-Dibenzoil-7-(2,3,5-tri-O-benzoil- β -D-ribofuranosil)-5-[3-({[2-(trimetilsilil)etoxi]carbonil}amino)propil]-7H-pirrolol[2,3-d]pirimidin-4-amina

A una disolución del compuesto obtenido en la etapa 3 (5,45 g) en diclorometano (60 ml) se le añadieron piridina (1,69 ml) y cloruro de benzoilo (2,01 ml) en este orden a 0°C , y la mezcla de reacción se agitó a 0°C durante 5 minutos, se añadió además trietilamina (2,91 ml), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Se añadieron una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio y diclorometano a la mezcla de reacción, que se sometió a extracción con diclorometano. Tras secar la capa orgánica sobre sulfato de sodio anhidro, se eliminó el agente desecante por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo], y se volvió a pulverizar con acetato de etilo y hexano. El sólido resultante se recogió por filtración para obtener el compuesto del título (6,16 g).

RMN de ^1H (CDCl_3) δ : 8,54 (1H, s), 8,20-8,16 (2H, m), 8,02-7,98 (2H, m), 7,96-7,92 (2H, m), 7,82-7,76 (4H, m), 7,65-7,32 (15H, m), 7,18 (1H, sa), 6,82 (1H, d, $J = 5,9$ Hz), 6,17 (1H, t, $J = 6,1$ Hz), 6,13 (1H, dd, $J = 5,9, 3,5$ Hz), 4,94 (1H, dd, $J = 12,2, 3,2$ Hz), 4,79-4,75 (1H, m), 4,65 (1H, dd, $J = 12,2, 3,2$ Hz), 4,41 (1H, sa), 4,08 (2H, t, $J = 8,6$ Hz), 2,95-2,87 (2H, m), 2,58-2,50 (2H, m), 1,54-1,52 (2H, m), 0,97-0,91 (2H, m), 0,02 (9H, s).

(Etapa 5)

N-Benzoil-7- β -D-ribofuranosil-5-[3-({[2-(trimetilsilil)etoxi]carbonil}amino)propil]-7H-pirrolol[2,3-d]pirimidin-4-amina

A una disolución del compuesto obtenido en la etapa 4 (6,16 g) en tetrahidrofurano (250 ml) se le añadió gota a gota una disolución en metanol de metóxido de sodio (1,0 M, 12,0 ml) a 0°C , y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se añadió ácido acético (1,07 ml) a la mezcla de reacción a 0°C , y la mezcla de reacción se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [acetato

de etilo/metanol], y se volvió a pulverizar con acetato de etilo y hexano. El sólido resultante se recogió por filtración para obtener el compuesto del título (3,35 g).

RMN de ^1H (CD_3OD) δ : 8,62 (1H, s), 8,04 (2H, d, $J = 7,0$ Hz), 7,69-7,62 (1H, m), 7,60-7,54 (3H, m), 6,26 (1H, d, $J = 6,3$ Hz), 4,59 (1H, t, $J = 5,7$ Hz), 4,31 (1H, dd, $J = 5,1, 3,5$ Hz), 4,12-4,01 (3H, m), 3,86 (1H, dd, $J = 12,3, 2,9$ Hz), 3,76 (1H, dd, $J = 12,1, 3,5$ Hz), 3,01 (2H, t, $J = 6,7$ Hz), 2,76 (2H, t, $J = 7,4$ Hz), 1,86-1,76 (2H, m), 0,93 (2H, t, $J = 8,2$ Hz), 0,03 (9H, s).

(Etapa 6)

N-Benzoil-7-{5-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]- β -D-ribofuranosil]-5-[3-({[2-(trimetilsilil)etoxi]carbonil}amino)propil]-7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-amina

- 10 El compuesto obtenido en la etapa 5 (3,35 g) se destiló azeotrópicamente con piridina, y se añadió cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (2,38 g) a una solución del residuo en piridina anhidra (50 ml) a 0°C , y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Después se añadió etanol (5 ml) a la mezcla de reacción para inactivar la reacción, y el producto resultante se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo] para obtener el compuesto del título (4,34 g).

- 15 RMN de ^1H (CDCl_3) δ : 8,51 (1H, sa), 8,30 (1H, sa), 8,05-7,90 (1H, m), 7,56-7,42 (3H, m), 7,39-7,31 (2H, m), 7,29-7,16 (10H, m), 6,81-6,75 (4H, m), 6,22 (1H, d, $J = 5,9$ Hz), 4,91 (1H, sa), 4,76-4,67 (2H, m), 4,45-4,41 (1H, m), 4,38-4,29 (1H, m), 4,05-3,95 (2H, m), 3,77 (6H, s), 3,50 (1H, dd, $J = 10,6, 3,1$ Hz), 3,37-3,27 (1H, m), 3,19-2,94 (4H, m), 2,66 (1H, sa), 1,82 (1H, sa), 0,93-0,76 (2H, m), -0,01 (9H, s).

(Etapa 7)

- 20 N-Benzoil-7-{5-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-3-O-[terc-butil(dimetil)silil]- β -D-ribofuranosil]-5-[3-({[2-(trimetilsilil)etoxi]carbonil}amino)propil]-7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-amina (forma 3'-O-TBS)

Usando el compuesto obtenido en la etapa 6 (4,34 g), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 4 del ejemplo 8 para obtener el compuesto del título (1,51 g) y N-benzoil-7-{5-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-2-O-[terc-butil(dimetil)silil]- β -D-ribofuranosil]-5-[3-({[2-(trimetilsilil)etoxi]carbonil}amino)propil]-7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-

- 25 amina (forma 2'-O-TBS) (2,01 g) en forma de un regioisómero del compuesto del título

(forma 3'-OTBS) (más polar)

- 30 RMN de ^1H (CDCl_3) δ : 8,38-8,26 (2H, m), 8,10-8,03 (1H, m), 7,58-7,40 (5H, m), 7,36-7,20 (10H, m), 6,86-6,77 (4H, m), 6,30-6,22 (1H, m), 5,02-4,89 (1H, m), 4,63-4,45 (2H, m), 4,17-4,10 (1H, m), 4,04-3,92 (2H, m), 3,79 (3H, s), 3,79 (3H, s), 3,59-3,52 (1H, m), 3,32-3,23 (1H, m), 3,17-2,80 (4H, m), 1,86-1,64 (2H, m), 0,89 (9H, s), 0,86-0,72 (2H, m), 0,09 (3H, s), 0,01 (3H, s), -0,01 (9H, s)

(forma 2'-OTBS) (menos polar)

- 35 RMN de ^1H (CDCl_3) δ : 8,39-8,25 (2H, m), 8,04 (1H, s), 7,57-7,42 (5H, m), 7,37-7,18 (10H, m), 6,87-6,80 (4H, m), 6,33 (1H, d, $J = 5,1$ Hz), 5,01 (1H, sa), 4,78 (1H, t, $J = 5,7$ Hz), 4,40-4,33 (1H, m), 4,29-4,25 (1H, m), 4,05-3,92 (2H, m), 3,80 (3H, s), 3,79 (3H, s), 3,59-3,51 (1H, m), 3,44-3,37 (1H, m), 3,16-3,03 (1H, m), 2,99-2,81 (3H, m), 1,74-1,61 (2H, m), 0,83 (9H, s), 0,80-0,70 (2H, m), 0,00-0,03 (12H, m), -0,20 (3H, s).

(Etapa 8)

N-Benzoil-7-(5-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-3-O-[terc-butil(dimetil)silil]-2-O-{{[2-(cianoetoxi)]di(propan-2-il)amino]fosfanil}- β -D-ribofuranosil)-5-[3-({[2-(trimetilsilil)etoxi]carbonil}amino)propil]-7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-amina

- 40 Usando el compuesto obtenido en la etapa 7 (forma 3'-OTBS) (1,51 g), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 6 del ejemplo 1 para obtener el diastereómero 1 (0,77 g) y el diastereómero 2 (0,48 g) del compuesto del título en forma de diastereómeros en el átomo de fósforo.

Diastereómero 1 (menos polar)

- 45 RMN de ^1H (CDCl_3) δ : 8,36-8,27 (2H, m), 8,02 (1H, sa), 7,57-7,40 (5H, m), 7,37-7,21 (10H, m), 6,87-6,77 (4H, m), 6,39 (1H, d, $J = 5,1$ Hz), 4,98 (1H, sa), 4,85-4,73 (1H, m), 4,56-4,47 (1H, m), 4,20-4,15 (1H, m), 4,05-3,92 (2H, m), 3,88-3,67 (8H, m), 3,63-3,47 (3H, m), 3,33-3,23 (1H, m), 3,15-2,82 (3H, m), 2,60-2,45 (2H, m), 1,83-1,64 (2H, m), 1,10 (6H, d, $J = 6,7$ Hz), 0,92 (6H, d, $J = 6,7$ Hz), 0,87 (9H, s), 0,81-0,71 (2H, m), 0,12 (3H, s), 0,03 (3H, s), -0,01 (9H, s).

Diastereómero 2 (más polar)

- 50 RMN de ^1H (CDCl_3) δ : 8,36-8,28 (2H, m), 8,05 (1H, sa), 7,57-7,38 (5H, m), 7,36-7,19 (10H, m), 6,84-6,79 (4H, m), 6,48-6,40 (1H, m), 5,02 (1H, sa), 4,65-4,42 (2H, m), 4,19-4,15 (1H, m), 4,06-3,90 (2H, m), 3,80-3,48 (11H, m), 3,32-3,24 (1H, m), 3,17-3,03 (2H, m), 2,99-2,86 (1H, m), 2,51-2,40 (2H, m), 1,86-1,69 (2H, m), 1,18-1,02 (12H, m), 0,85 (9H, s), 0,81-0,71 (2H, m), 0,08 (3H, s), 0,02 (3H, s), -0,01 (9H, s).

(Etapa 9)

(3-{4-Benzamido-7-[(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-14-(6-benzoil-6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)-15,16-bis[[terc-butil(dimetil)silil]oxy]-10-(2-cianoetoxi)-2-oxo-2-sulfanil-10-sulfanilidenoctahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-7-il]-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-5-il}propil)carbamato de 2-(trimetilsilil)etilo

Se realizó la misma reacción que en la etapa 7 del ejemplo 1 con la siguiente escala (materia prima: 1,08 g). Utilizando una solución de acetonitrilo del compuesto obtenido y del compuesto obtenido en la etapa 8 (1,25 g: una mezcla de diastereómeros), se llevó a cabo la reacción de la misma manera que en la etapa 8 del ejemplo 1 y la etapa 9 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título en forma de una mezcla de diastereómeros en el átomo de fósforo. Los diastereómeros en el átomo de fósforo se separaron mediante HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 10 %-50 % (0 min-35 min)] para obtener el diastereómero 1 (0,19 g) y el diastereómero 2 (0,043 g) del compuesto del título.

Diastereómero 1 (menos polar)

MS (ESI) m/z: 1419 (M+H)⁺.

Diastereómero 2 (más polar)

MS (ESI) m/z: 1419 (M+H)⁺.

(Etapa 10-1)

(3-{4-Amino-7-[(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-15,16-bis[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-2,10-dioxo-2,10-bis(sulfanil)-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-7-il]-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-5-il}propil)carbamato de 2-(trimetilsilil)etilo

Usando el compuesto obtenido en la etapa 9 (diastereómero 1) (0,19 g), la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 8-1 del ejemplo 12. El producto resultante se purificó por HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 40 %-70 % (0 min-35 min)] para obtener el compuesto del título (58 mg).

MS (ESI) m/z: 1158 (M+H)⁺.

(Etapa 10-2)

(3-{4-Amino-7-[(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-15,16-bis[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-2,10-dioxo-2,10-bis(sulfanil)-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-7-il]-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-5-il}propil)carbamato de 2-(trimetilsilil)etilo

Usando el compuesto obtenido en la etapa 9 (diastereómero 2) (43 mg), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 8-1 del ejemplo 12. El producto resultante se purificó por HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 30 %-60 % (0 min-35 min)] para obtener el compuesto del título (15 mg).

MS (ESI) m/z: 1158 (M+H)⁺.

(Etapa 11-1)

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-7-[4-Amino-5-(3-aminopropil)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il]-15,16-dihidroxi-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) de bis(N,N-dietiletanaminio)

A una disolución del compuesto obtenido en la etapa 10-1 (58 mg) en tetrahidrofurano (1 ml) se le añadió una disolución en tetrahidrofurano de fluoruro de tetrabutilamonio (aproximadamente 1 M, 5 ml), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Como la reacción aún no se había completado, la mezcla de reacción se agitó de nuevo a 40 °C durante 3 horas. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida y se purificó por HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 10 %-40 % (0 min-35 min)]. El producto resultante se purificó aún más con un Sep-Pak (R) C18 [solución acuosa al 0,1 % de trietilamina/acetonitrilo, acetonitrilo: del 0 %-30 %] para obtener el compuesto del título (25 mg).

MS (ESI) m/z: 786 (M+H)⁺.

(Etapa 11-2)

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-7-[4-Amino-5-(3-aminopropil)-7H-pirroló[2,3-d]pirimidin-7-il]-15,16-dihidroxi-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzó[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) de bis(N,N-dietiletanaminio)

- 5 Usando el compuesto obtenido en la etapa 10-2 (15 mg), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 11-1 para obtener el compuesto del título (7,2 mg). MS (ESI) m/z: 786 (M+H)⁺.

(Etapa 12-1)

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-7-[4-Amino-5-(3-aminopropil)-7H-pirroló[2,3-d]pirimidin-7-il]-15,16-dihidroxi-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzó[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) disódico

- 10 (Diastereómero 1)

Usando el compuesto obtenido en la etapa 11-1 (25 mg), se realizó el intercambio de sales de la misma manera que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (17 mg).

MS (ESI) m/z: 786 (M+H)⁺.

- 15 RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,028 (1H, s), 8,025 (1H, s), 7,71 (1H, s), 7,09 (1H, s), 6,51 (1H, d, J = 8,2 Hz), 6,26 (1H, d, J = 5,1 Hz), 5,38-5,29 (1H, m), 5,17-5,10 (1H, m), 4,85-4,80 (1H, m), 4,44-4,37 (1H, m), 4,33-4,23 (3H, m), 4,09-3,97 (2H, m), 3,52-3,46 (2H, m), 3,00-2,72 (6H, m), 2,13-2,02 (2H, m), 2,02-1,93 (2H, m).

RMN de ³¹P (CD₃OD) δ: 56,65 (s), 55,31 (s).

(Etapa 12-2)

- 20 (5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-7-[4-Amino-5-(3-aminopropil)-7H-pirroló[2,3-d]pirimidin-7-il]-15,16-dihidroxi-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzó[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) disódico

(Diastereómero 2)

- 25 Usando el compuesto obtenido en la etapa 11-2 (7,2 mg), se realizó el intercambio de sales de la misma manera que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (6,0 mg).

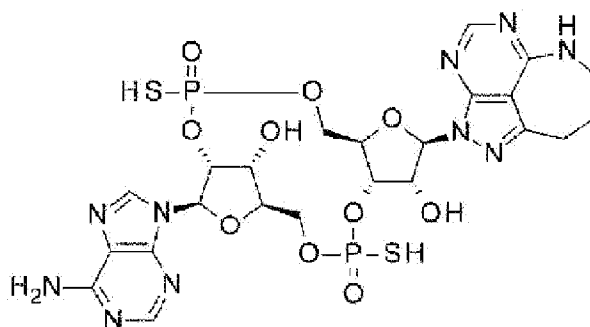
MS (ESI) m/z: 786 (M+H)⁺.

- 30 RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,02 (1H, s), 8,01 (1H, s), 7,75 (1H, s), 7,07 (1H, s), 6,52 (1H, d, J = 8,6 Hz), 6,29 (1H, d, J = 7,4 Hz), 5,61-5,55 (1H, m), 5,47-5,37 (1H, m), 4,86-4,83 (1H, m), 4,56-4,43 (2H, m), 4,31-4,21 (3H, m), 4,06-3,99 (1H, m), 3,91-3,84 (1H, m), 3,54-3,46 (3H, m), 3,00-2,87 (5H, m), 2,29-2,07 (2H, m), 2,06-1,95 (2H, m).

RMN de ³¹P (CD₃OD) δ: 63,08 (s), 58,68 (s).

Ejemplo 19: Síntesis de CDN19

- 35 (5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-7-(6-Amino-9H-purin-9-il)-15,16-dihidroxi-2,10-bis(sulfanil)-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-1,2,3,5,6-pentaazabenzó[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-diona

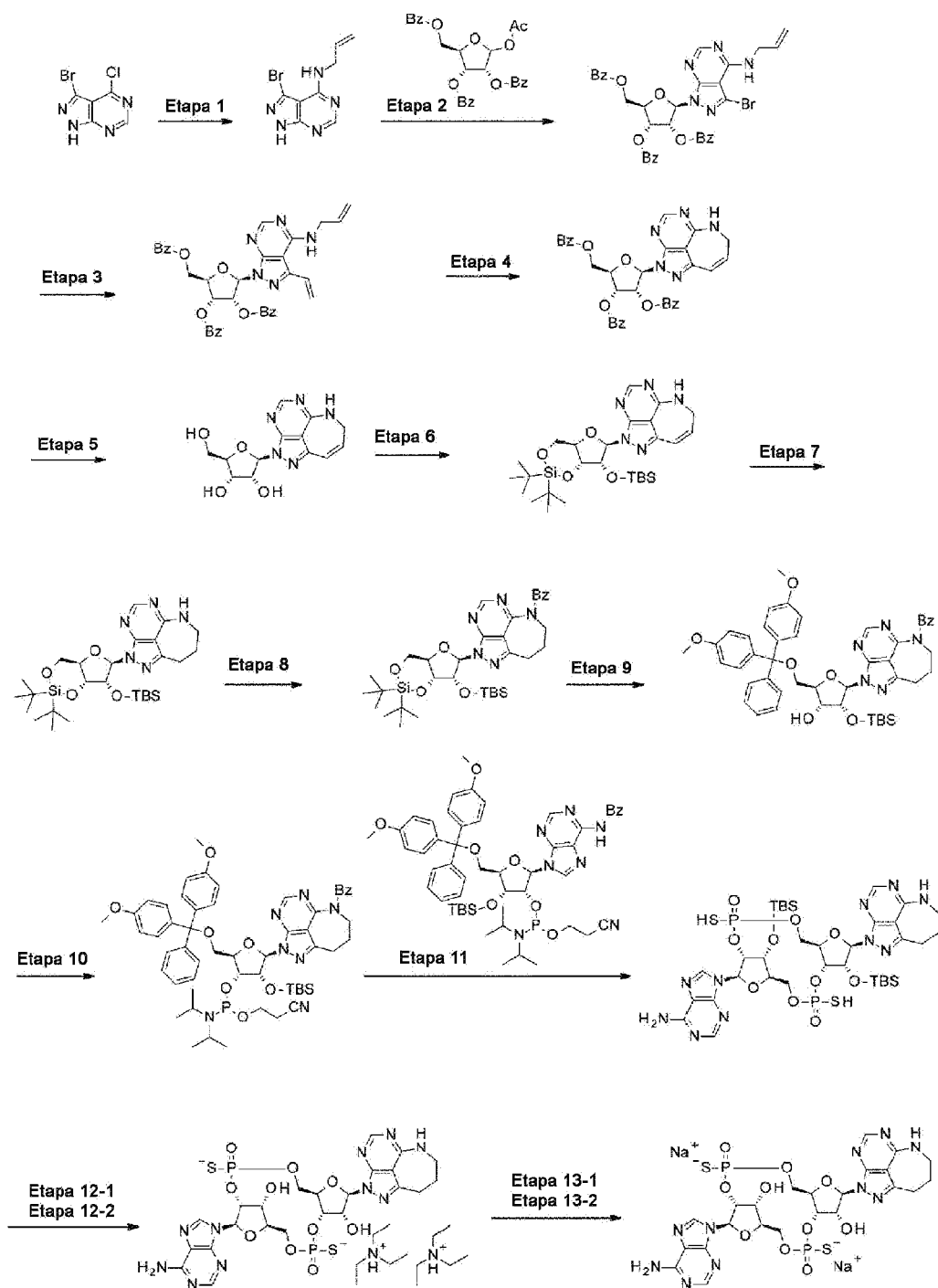


19

19a (Diastereómero 1)

19b (Diastereómero 2)

[Esquema de síntesis]



(Etapa 1)

5 3-Bromo-N-(prop-2-en-1-il)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-amina

La 3-bromo-4-cloro-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina (8,50 g) disponible en el mercado (BePharm Ltd.) se suspendió en dioxano (140 ml), se añadió N,N-diisopropiletilamina (12,5 ml) y alilamina (11 ml) a temperatura ambiente, y la mezcla de reacción se agitó a la misma temperatura durante 70 horas. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida y el residuo se convirtió en una suspensión con diclorometano y acetato de etilo, de la que se recogió el sólido por filtración (sólido 1). Después de concentrar el filtrado a presión reducida, se repitió el mismo procedimiento dos veces para obtener el sólido 2 y el sólido 3. El filtrado final se purificó con una columna de gel de sílice [hexano/acetato de

etilo] para obtener el sólido 4. Además, el sólido 1 se purificó con una columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo] para obtener el sólido 5. El sólido 4 y el sólido 5 se reunieron para obtener el compuesto del título (4,48 g). El sólido 2 y el sólido 3 se reunieron para obtener el compuesto del título con impurezas (3,78 g).

MS (ESI) m/z: 254 (M+H)⁺.

- 5 RMN de ¹H (DMSO-d₆) δ: 13,82 (1H, s), 8,26 (1H, s), 7,23 (1H, t, J = 5,9 Hz), 5,96 (1H, m), 5,18 (1H, dd, J = 17,1, 1,5 Hz), 5,10 (1H, dd, J = 10,3, 1,5 Hz), 4,19 (2H, m).

(Etapa 2)

3-Bromo-N-(prop-2-en-1-il)-1-(2,3,5-tri-O-benzoil-β-D-ribofuranosil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-amina

- 10 El compuesto obtenido en la etapa 1 (1,00 g) y 1-O-acetil-2,3,5-tri-O-benzoil-β-D-ribofuranosa disponible en el mercado (Ark Pharm) (2,58 g) se suspendieron en nitrometano (50 ml), y después se disolvieron por calentamiento. Se añadió un complejo de trifluoruro de boro y éter dietílico (0,63 ml) calentando a reflujo, y la mezcla de reacción se agitó a la misma temperatura durante 1 hora. A continuación, se añadieron 1-O-acetil-2,3,5-tri-O-benzoil-β-D-ribofuranosa (0,40 g) y un complejo de trifluoruro de boro y éter dietílico (0,10 ml), y la mezcla de reacción se agitó durante 3 horas. Tras concentrar la mezcla de reacción a presión reducida, el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo] para obtener el compuesto del título (1,80 g).

MS (ESI) m/z: 698 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 8,40 (1H, s), 8,13 (2H, m), 7,96 (4H, m), 7,59-7,32 (9H, m), 6,79 (1H, dd, J = 3,4 Hz), 6,39 (1H, dd, J = 5,1, 3,7 Hz), 6,25 (1H, t, J = 5,6 Hz), 6,17 (1H, t, J = 5,6 Hz), 6,00 (1H, m), 5,31 (1H, dd, J = 17,1, 1,0 Hz), 5,24 (1H, dd, J = 10,5, 1,2 Hz), 4,81 (1H, m), 4,75 (1H, dd, J = 12,0, 3,7 Hz), 4,63 (1H, dd, J = 12,2, 4,4 Hz), 4,30 (2H, m).

- 20 (Etapa 3)

3-Etenil-N-(prop-2-en-1-il)-1-(2,3,5-tri-O-benzoil-β-D-ribofuranosil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-amina

- 25 Una solución del compuesto obtenido en la etapa 2 (11,65 g) en tolueno (120 ml) se desgasificó por ultrasonidos a presión reducida. Se añadieron tributivinilestano (12,8 ml) y tetraquis(trifenilfosfina)paladio(0) (2,73 g) a la mezcla de reacción en una atmósfera de nitrógeno, y la mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 2 horas. Tras concentrar la mezcla de reacción a presión reducida, el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [diclorometano/acetato de etilo] para obtener el compuesto del título (10,07 g).

MS (ESI) m/z: 646 (M+H)⁺.

- 30 RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 8,42 (1H, s), 8,09 (2H, m), 7,99 (2H, m), 7,95 (2H, m), 7,59-7,50 (3H, m), 7,42-7,33 (6H, m), 6,90-6,84 (2H, m), 6,43 (1H, dd, J = 5,4, 3,4 Hz), 6,32 (1H, t, J = 5,9 Hz), 6,00 (1H, m), 5,94 (1H, dd, J = 17,6, 1,0 Hz), 5,67 (1H, dd, J = 11,2, 1,0 Hz), 5,56 (1H, t, J = 5,6 Hz), 5,27 (1H, dd, J = 17,1, 1,0 Hz), 5,22 (1H, dd, J = 10,3, 1,0 Hz), 4,82 (1H, m), 4,77 (1H, dd, J = 12,2, 3,9 Hz), 4,62 (1H, dd, J = 11,7, 4,9 Hz), 4,29 (2H, m).

(Etapa 4)

2-(2,3,5-Tri-O-benzoil-β-D-ribofuranosil)-6,7-dihidro-2H-1,2,3,5,6-pentaazabenz[cd]azuleno

- 35 El compuesto obtenido en la etapa 3 (9,0 g) se destiló azeotrópicamente dos veces con benceno. A una disolución del residuo en diclorometano (480 ml) se le añadieron ácido (+)-10-canforsulfónico (4,2 g) y dicloruro de bencilideno[1,3-bis(2,4,6-trimetilfenil)imidazolidin-2-ilideno] (triciclohexil-λ⁵-fosfanil)rutenio (catalizador de segunda generación de Grubbs) (360 mg) y la mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 3 horas. Se añadió además el catalizador de segunda generación Grubbs (360 mg) y la mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 1 hora. La mezcla de reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente, se lavó con una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio y salmuera en este orden y, a continuación, se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El agente desecante se eliminó por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo] para obtener el compuesto del título (6,39 g). MS (ESI) m/z: 618 (M+H)⁺.

- 45 RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 8,39 (1H, s), 8,11 (2H, m), 7,99 (2H, m), 7,96 (2H, m), 7,57-7,52 (3H, m), 7,42-7,35 (6H, m), 6,83 (1H, d, J = 2,9 Hz), 6,76 (1H, d, J = 10,7 Hz), 6,43 (1H, dd, J = 5,1, 3,2 Hz), 6,33 (1H, t, J = 5,9 Hz), 6,12 (1H, m), 5,61 (1H, sa), 4,83 (1H, m), 4,78 (1H, dd, J = 12,2, 3,9 Hz), 4,63 (1H, dd, J = 12,0, 4,6 Hz), 4,16 (2H, m).

(Etapa 5)

2-β-D-Ribofuranosil-6,7-dihidro-2H-1,2,3,5,6-pentaazabenz[cd]azuleno

- 50 A una disolución mixta del compuesto obtenido en la etapa 4 (620 mg) en metanol (10 ml)-tetrahidrofurano (5,0 ml) se le añadió una disolución en metanol de metóxido de sodio (1,0 M, 0,10 ml) a temperatura ambiente, y la mezcla de reacción se agitó a la misma temperatura durante 18 horas. La mezcla de reacción se neutralizó con ácido clorhídrico

1 N y, a continuación, se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [diclorometano/metanol] para obtener el compuesto del título (279 mg).

MS (ESI) m/z: 306 (M+H)⁺.

- 5 RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,23 (1H, s), 6,79 (1H, m), 6,22-6,17 (2H, m), 4,74 (1H, t, J = 5,1 Hz), 4,42 (1H, t, J = 4,6 Hz), 4,14 (2H, dd, J = 5,9, 1,5 Hz), 4,11 (1H, q, J = 4,1 Hz), 3,81 (1H, dd, J = 12,4, 3,2 Hz), 3,68 (1H, dd, J = 12,4, 4,6 Hz).
(Etapa 6)

2-{2-O-[Terc-butil(dimetil)silil]-3,5-O-(di-terc-butilsililiden)-β-D-ribofuranosil]-6,7-dihidro-2H-1,2,3,5,6-pentaazabenzocd]azuleno

- 10 Usando el compuesto obtenido en la etapa 5 (2,81 g), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 1 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (4,72 g). RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 8,38 (1H, s), 6,85 (1H, dt, J = 11,0, 1,4 Hz), 6,28 (1H, s), 6,16-6,08 (1H, m), 5,78 (1H, sa), 4,71-4,63 (2H, m), 4,39 (1H, dd, J = 9,0, 5,1 Hz), 4,22-4,10 (3H, m), 3,96 (1H, dd, J = 10,6, 9,0 Hz), 1,11 (9H, s), 1,05 (9H, s), 0,90 (9H, s), 0,11 (3H, s), 0,09 (3H, s).

(Etapa 7)

- 15 2-{2-O-[Terc-butil(dimetil)silil]-3,5-O-(di-terc-butilsililiden)-β-D-ribofuranosil]-6,7,8,9-tetrahidro-2H-1,2,3,5,6-pentaazabenzocd]azuleno

- 20 A una disolución del compuesto obtenido en la etapa 6 (2,12 g) en tetrahidrofurano (20 ml) se le añadió ácido acético (tres gotas con una pipeta Pasteur) y paladio al 10 %-carbono (AD) húmedo (0,82 g), y la mezcla de reacción se agitó en una atmósfera de hidrógeno a temperatura ambiente durante 3 horas. El catalizador se eliminó por filtración, se lavó con tetrahidrofurano y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo] para obtener el compuesto del título (2,09 g). RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 8,29 (1H, s), 6,33 (1H, sa), 6,27 (1H, s), 4,70 (1H, dd, J = 4,7 Hz), 4,62 (1H, dd, J = 9,6, 4,9 Hz), 4,39 (1H, dd, J = 9,0, 5,1 Hz), 4,21-4,08 (1H, m), 3,95 (1H, dd, J = 10,4, 9,2 Hz), 3,65-3,58 (2H, m), 3,15-2,99 (2H, m), 2,22-2,10 (2H, m), 1,11 (9H, s), 1,05 (9H, s), 0,90 (9H, s), 0,10 (3H, s), 0,09 (3H, s).

(Etapa 8)

- 25 6-Benzoil-2-{2-O-[terc-butil(dimetil)silil]-3,5-O-(di-terc-butilsililiden)-β-D-ribofuranosil]-6,7,8,9-tetrahidro-2H-1,2,3,5,6-pentaazabenzocd]azuleno

- 30 Usando el compuesto obtenido en la etapa 7 (2,09 g), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 4 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (2,23 g). RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 8,19 (1H, s), 7,47-7,40 (3H, m), 7,33-7,28 (2H, m), 6,34 (1H, s), 4,72 (1H, dd, J = 4,7 Hz), 4,66 (1H, dd, J = 9,4, 4,7 Hz), 4,49 (1H, dd, J = 14,7, 8,0 Hz), 4,40 (1H, dd, J = 9,0, 5,1 Hz), 4,24-4,09 (2H, m), 3,96 (1H, dd, J = 10,6, 9,0 Hz), 3,26-3,11 (2H, m), 2,45-2,23 (2H, m), 1,12 (9H, s), 1,05 (9H, s), 0,90 (9H, s), 0,12 (3H, s), 0,10 (3H, s).

(Etapa 9)

6-Benzoil-2-{5-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-2-O-[terc-butil(dimetil)silil]-β-D-ribofuranosil]-6,7,8,9-tetrahidro-2H-1,2,3,5,6-pentaazabenzocd]azuleno

- 35 Usando el compuesto obtenido en la etapa 8 (2,23 g), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 5 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (2,69 g). RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 8,22 (1H, s), 7,55-7,51 (2H, m), 7,46-7,36 (7H, m), 7,32-7,26 (2H, m), 7,26-7,16 (3H, m), 6,80-6,73 (4H, m), 6,43 (1H, d, J = 5,5 Hz), 5,32 (1H, t, J = 5,5 Hz), 4,43 (1H, dd, J = 14,3, 8,0 Hz), 4,34-4,29 (1H, m), 4,25-4,13 (2H, m), 3,78 (3H, s), 3,77 (3H, s), 3,46 (1H, dd, J = 10,4, 3,3 Hz), 3,17-3,05 (3H, m), 2,79 (1H, d, J = 3,5 Hz), 2,40-2,19 (2H, m), 0,82 (9H, s), 0,03 (3H, s), -0,13 (3H, s).

- 40 s).

(Etapa 10)

6-Benzoil-2-{5-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-2-O-[terc-butil(dimetil)silil]-3-O-[(2-cianoetoxi)di(propan-2-il)amino]fosfanil]-β-D-ribofuranosil)-6,7,8,9-tetrahidro-2H-1,2,3,5,6-pentaazabenzocd]azuleno

- 45 Usando el compuesto obtenido en la etapa 9 (2,69 g), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 4 del ejemplo 5 para obtener el compuesto del título (2,93 g) en forma de una mezcla de diastereómeros en el átomo de fósforo (proporción de diastereómeros = 6:4). RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 8,22 (0,4H, s), 8,21 (0,6H, s), 7,56-7,50 (2H, m), 7,44-7,37 (7H, m), 7,28-7,18 (5H, m), 6,81-6,73 (4H, m), 6,44 (0,6H, d, J = 6,3 Hz), 6,40 (0,4H, d, J = 6,3 Hz), 5,34-5,28 (1H, m), 4,47-4,35 (2,4H, m), 4,32-4,26 (0,6H, m), 4,25-4,16 (1H, m), 4,03-3,84 (1H, m), 3,80-3,73 (6H, m), 3,69-3,44 (4H, m), 3,18-3,00 (3H, m), 2,73-2,59 (1H, m), 2,40-2,19 (3H, m), 1,22-1,14 (8,4H, m), 1,01 (3,6H, d, J = 6,7 Hz), 0,76 (3,6H, s), 0,74 (5,4H, s), 0,02 (1,2H, s), 0,01 (1,8H, s), -0,12 (1,8H, s), -0,15 (1,2H, s).

- 50 0,76 (3,6H, s), 0,74 (5,4H, s), 0,02 (1,2H, s), 0,01 (1,8H, s), -0,12 (1,8H, s), -0,15 (1,2H, s).

(Etapa 11)

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-7-(6-Amino-9H-purin-9-yl)-15,16-bis[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-2,10-bis(sulfanil)-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-1,2,3,5,6-pentaazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2 λ^5 ,10 λ^5 -furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfacilotetradecin-2,10-diona

- 5 Usando el compuesto obtenido en la etapa 10 (1,04 g), la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 7 del ejemplo 1 para proporcionar una solución en acetonitrilo de 6-benzoil-2-{2-O-[terc-butil(dimetil)silil]-3-O-(dihidroxifosfanil)- β -D-ribofuranosil]-6,7,8,9-tetrahidro-2H-1,2,3,5,6-pentaazabenzocd]azuleno. Usando esta solución en acetonitrilo y N-benzoil-5'-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-3'-O-[terc-butil(dimetil)silil]-2'-O-[(2-cianoetoxi)[di(propan-2-il)amino]fosfanil]adenosina (1,20 g) disponible en el mercado (Cool Pharm Ltd.), la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 8 del ejemplo 1, la etapa 9 del ejemplo 1 y la etapa 10 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título en forma de una mezcla de diastereómeros en el átomo de fósforo. Los diastereómeros en el átomo de fósforo se separaron mediante HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 25-50 % (0 min-35 min)] para producir el diastereómero 1 (15 mg) y el diastereómero 2 (55 mg) del compuesto del título (tiempo de retención en HPLC: diastereómero 1 > 2).

Diastereómero 1 (menos polar)

- 15 MS (ESI) m/z: 959 (M+H)⁺.

Diastereómero 2 (más polar)

MS (ESI) m/z: 959 (M+H)⁺.

(Etapa 12-1)

- 20 (5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-7-(6-Amino-9H-purin-9-yl)-15,16-dihidroxi-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-1,2,3,5,6-pentaazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2 λ^5 ,10 λ^5 -furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfacilotetradecin-2,10-bis(tiolato) de bis(N,N-dietiletanaminio)

- 25 Se añadió trifluorhidrato de trietilamina (1 ml) al compuesto obtenido en la etapa 11 (diastereómero 1) (20 mg), y la mezcla de reacción se agitó a 45 °C durante 2 horas. La mezcla de reacción se añadió a una solución mixta enfriada con hielo de una solución acuosa 1 M de hidrogenocarbonato de trietilamonio (3 ml) y trietilamina (1 ml) para inactivar la reacción. El producto resultante se purificó con un Sep-Pak (R) C18 [triethylamina al 0,1 %/agua/acetonitrilo, acetonitrilo: del 0 %-17 %] para obtener el compuesto del título (15 mg).

MS (ESI) m/z: 731 (M+H)⁺.

(Etapa 12-2)

- 30 (5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-7-(6-Amino-9H-purin-9-yl)-15,16-dihidroxi-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-1,2,3,5,6-pentaazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2 λ^5 ,10 λ^5 -furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfacilotetradecin-2,10-bis(tiolato) de bis(N,N-dietiletanaminio)

Usando el compuesto obtenido en la etapa 11 (diastereómero 2) (43 mg), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 12-1 para obtener el compuesto del título (34 mg).

MS (ESI) m/z: 731 (M+H)⁺.

- 35 (Etapa 13-1)

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-7-(6-Amino-9H-purin-9-yl)-15,16-dihidroxi-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-1,2,3,5,6-pentaazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2 λ^5 ,10 λ^5 -furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfacilotetradecin-2,10-bis(tiolato) disódico

(Diastereómero 1)

- 40 Usando el compuesto obtenido en la etapa 12-1 (15 mg), se realizó el intercambio de sales de la misma manera que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para proporcionar una mezcla de diastereómeros del compuesto del título (12 mg). MS (ESI) m/z: 731 (M+H)⁺.

- 45 RMN de ¹H (CD₃OD) δ : 8,79 (1H, s), 8,18 (1H, s), 8,14 (1H, s), 6,37-6,34 (2H, m), 5,50 (1H, dd, J = 10,8, 5,3 Hz), 5,40-5,33 (1H, m), 5,06 (1H, dd, J = 4,5, 2,9 Hz), 4,94 (1H, d, J = 3,5 Hz), 4,67-4,30 (4H, m), 4,03 (1H, ddd, J = 12,5, 6,1, 2,2 Hz), 3,93 (1H, dt, J = 18,1, 6,1 Hz), 3,58 (2H, d, J = 7,4 Hz), 3,02 (2H, t, J = 5,9 Hz), 2,18-2,04 (2H, m).

RMN de ³¹P (CD₃OD) δ : 56,5 (s), 54,2 (s).

(Etapa 13-2)

- 50 (5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-7-(6-Amino-9H-purin-9-yl)-15,16-dihidroxi-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-1,2,3,5,6-pentaazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2 λ^5 ,10 λ^5 -furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfacilotetradecin-2,10-bis(tiolato) disódico

(Diastereómero 2)

Usando el compuesto obtenido en la etapa 12-2 (34 mg), se realizó el intercambio de sales de la misma manera que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para proporcionar una mezcla de diastereómeros del compuesto del título (28 mg: proporción de diastereómeros = 4:1).

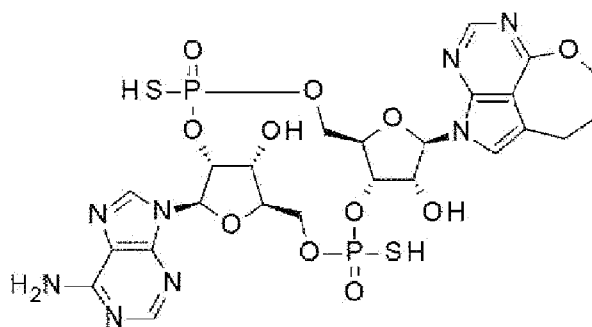
5 MS (ESI) m/z: 731 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 9,16 (0,2H, s), 8,85 (0,8H, s), 8,19 (0,2H, s), 8,17 (0,8H, s), 8,14 (0,8H, s), 8,13 (0,2H, s), 6,38-6,30 (2H, m), 5,67-5,61 (0,8H, m), 5,57-5,36 (1,2H, m), 5,22 (0,8H, dd, J = 5,9, 4,3 Hz), 5,10 (0,2H, t, J = 4,5 Hz), 4,64-4,26 (4,8H, m), 4,16-4,10 (0,2H, m), 4,05-3,98 (1H, m), 3,86-3,79 (1H, m), 3,62-3,54 (2H, m), 3,07 (1,6H, t, J = 5,7 Hz), 2,98 (0,4H, t, J = 5,9 Hz), 2,17-2,04 (2H, m).

10 RMN de ³¹P (CD₃OD) δ: 63,5 (s), 63,4 (s), 60,0 (s), 59,9 (s).

Ejemplo 20: Síntesis de CDN20

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-7-(6-Amino-9H-purin-9-yl)-14-(8,9-dihidro-6-oxa-2,3,5-triazabenz[cd]azulen-2(7H)-il)-15,16-dihidroxi-2,10-bis(sulfanil)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-diona

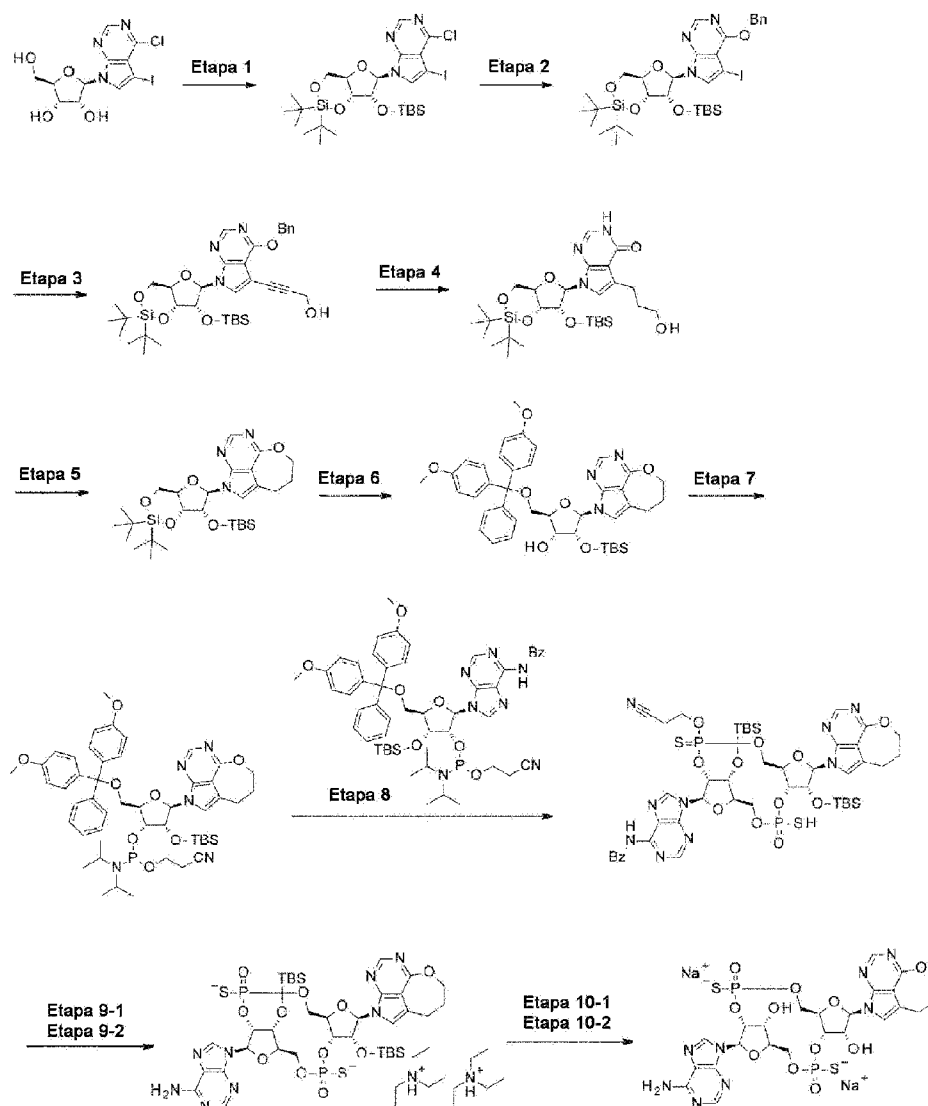


20

20a (Diastereómero 1)

20b (Diastereómero 2)

[Esquema de síntesis]



(Etapa 1)

7-{2-O-[Terc-butil(dimetil)silil]-3,5-O-(di-terc-butilsililiden)-β-D-ribofuranosil}-4-cloro-5-yodo-7H-pirrol[2,3-d]pirimidina

- 5 Utilizando 4-cloro-5-yodo-7-β-D-ribofuranosil-7H-pirrol[2,3-d]pirimidina (3,15 g) como compuesto conocido en la bibliografía (J. Med. Chem. 2008, 51, 3934-3945), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 1 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (2,97 g).

RMN de ^1H (CDCl_3) δ : 8,62 (1H, s), 7,38 (1H, s), 6,18 (1H, s), 4,53-4,47 (1H, m), 4,44 (1H, d, $J = 3,9$ Hz), 4,24-4,18 (2H, m), 4,06-3,98 (1H, m), 1,09 (9H, s), 1,05 (9H, s), 0,92 (9H, s), 0,13 (3H, s), 0,12 (3H, s).

(Etapa 2)

- 10 4-(Benciloxi)-7-{2-O-[terc-butil(dimetil)silil]-3,5-O-(di-terc-butilsililiden)-β-D-ribofuranosil}-5-yodo-7H-pirrol[2,3-d]pirimidina

- 15 A una disolución del compuesto obtenido en la etapa 1 (4,97 g) y alcohol bencílico (1,0 ml) en tetrahidrofurano (50 ml) se le añadió hidruro de sodio (que contenía un 37 % de aceite mineral) (426 mg) refrigerado con hielo, se aumentó la temperatura hasta la temperatura ambiente y se agitó la mezcla de reacción durante toda la noche. Se añadió una solución acuosa saturada de cloruro de amonio a la mezcla de reacción con refrigeración por hielo para inactivar la reacción. Tras someter la mezcla de reacción a extracción con acetato de etilo, la capa orgánica se lavó con agua y salmuera, y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El agente desecante se eliminó por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo] para obtener el compuesto del título (3,38 g).

RMN de ^1H (CDCl_3) δ : 8,43 (1H, s), 7,62-7,57 (2H, m), 7,43-7,37 (2H, m), 7,36-7,30 (1H, m), 7,13 (1H, s), 6,15 (1H, s), 5,65 (1H, d, $J = 13,7$ Hz), 5,62 (1H, d, $J = 13,7$ Hz), 4,50-4,43 (2H, m), 4,27 (1H, dd, $J = 9,2, 4,9$ Hz), 4,21-4,12 (1H, m), 4,01 (1H, dd, $J = 10,4, 9,2$ Hz), 1,09 (9H, s), 1,04 (9H, s), 0,91 (9H, s), 0,12 (3H, s), 0,11 (3H, s).

(Etapa 3)

- 5 4-(Benciloxi)-7-{2-O-[terc-butil(dimetil)silil]-3,5-O-(di-terc-butilsililiden)- β -D-ribofuranosil]-5-(3-hidroxiprop-1-in-1-il)-7H-pirrolol[2,3-d]pirimidina

Usando el compuesto obtenido en la etapa 2 (3,38 g) y 2-propin-1-ol (1,35 ml), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 2 del ejemplo 1, excepto que la temperatura de reacción se fijó a temperatura ambiente, para obtener el compuesto del título (2,22 g).

- 10 RMN de ^1H (CDCl_3) δ : 8,46 (1H, s), 7,59-7,55 (2H, m), 7,43-7,33 (3H, m), 7,22 (1H, s), 6,16 (1H, s), 5,60 (1H, d, $J = 12,7$ Hz), 5,57 (1H, d, $J = 12,7$ Hz), 4,51-4,41 (4H, m), 4,27 (1H, dd, $J = 9,5, 5,0$ Hz), 4,19 (1H, dt, $J = 9,9, 5,0$ Hz), 4,01 (1H, dd, $J = 9,9, 9,5$ Hz), 1,52 (1H, t, $J = 6,3$ Hz), 1,08 (9H, s), 1,04 (9H, s), 0,91 (9H, s), 0,13 (3H, s), 0,11 (3H, s).

(Etapa 4)

- 15 7-{2-O-[Terc-butil(dimetil)silil]-3,5-O-(di-terc-butilsililiden)- β -D-ribofuranosil]-5-(3-hidroxipropil)-3,7-dihidro-4H-pirrolol[2,3-d]pirimidin-4-ona

Usando el compuesto obtenido en la etapa 3 (3,38 g), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 7 del ejemplo 19, excepto que el disolvente de reacción se cambió a una mezcla de metanol (20 ml)-tetrahidrofurano (20 ml) para obtener el compuesto del título (0,92 g).

- 20 RMN de ^1H (CDCl_3) δ : 11,36 (1H, sa), 7,86 (1H, s), 6,69 (1H, s), 6,10 (1H, s), 4,48 (1H, dd, $J = 9,2, 4,9$ Hz), 4,37 (1H, dd, $J = 5,1$ Hz), 4,23 (1H, dd, $J = 9,3, 4,8$ Hz), 4,16 (1H, dt, $J = 9,8, 4,8$ Hz), 4,02 (1H, dd, $J = 9,8, 9,3$ Hz), 3,84 (1H, t, $J = 6,3$ Hz), 3,58 (2H, dd, $J = 11,9, 6,1$ Hz), 3,03-2,90 (2H, m), 1,86 (2H, s), 1,09 (9H, s), 1,04 (9H, s), 0,90 (9H, s), 0,10 (6H, s).

(Etapa 5)

- 25 2-{2-O-[Terc-butil(dimetil)silil]-3,5-O-(di-terc-butilsililiden)- β -D-ribofuranosil]-2,7,8,9-tetrahidro-6-oxa-2,3,5-triazabenzol[cd]azuleno

A una disolución del compuesto obtenido en la etapa 4 (0,92 g) en tetrahidrofurano (32 ml) se le añadieron trifenilfosfina (0,62 g) y azodicarboxilato de diisopropilo (0,47 ml) con refrigeración por hielo, la temperatura aumentó hasta la temperatura ambiente y la mezcla de reacción se agitó durante 1 hora. Tras concentrar la mezcla de reacción a presión reducida, el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo] para obtener el compuesto del título (0,77 g).

- 30 RMN de ^1H (CDCl_3) δ : 8,44 (1H, s), 6,85 (1H, s), 6,19 (1H, s), 4,56-4,51 (2H, m), 4,50-4,44 (2H, m), 4,35 (1H, dd, $J = 9,5, 5,0$ Hz), 4,17 (1H, dt, $J = 10,0, 5,0$ Hz), 4,00 (1H, dd, $J = 10,0, 9,5$ Hz), 2,98-2,92 (2H, m), 2,28-2,20 (2H, m), 1,10 (9H, s), 1,05 (9H, s), 0,91 (9H, s), 0,12 (3H, s), 0,11 (3H, s).

(Etapa 6)

- 35 2-{5-O-[Bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-2-O-[terc-butil(dimetil)silil]- β -D-ribofuranosil]-2,7,8,9-tetrahidro-6-oxa-2,3,5-triazabenzol[cd]azuleno

Usando el compuesto obtenido en la etapa 5 (0,95 g), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 5 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (1,13 g). RMN de ^1H (CDCl_3) δ : 8,42 (1H, s), 7,48-7,43 (2H, m), 7,37-7,21 (7H, m), 7,19 (1H, s), 6,85-6,79 (4H, m), 6,35 (1H, d, $J = 5,4$ Hz), 4,71 (1H, t, $J = 5,4$ Hz), 4,55-4,48 (2H, m), 4,35 (1H, dd, $J = 8,2, 4,3$ Hz), 4,22 (1H, q, $J = 3,0$ Hz), 3,79 (3H, s), 3,79 (3H, s), 3,53 (1H, dd, $J = 10,6, 3,1$ Hz), 3,37 (1H, dd, $J = 10,6, 3,1$ Hz), 2,80 (1H, dd, $J = 4,3$ Hz), 2,71 (2H, t, $J = 5,5$ Hz), 2,23-2,15 (2H, m), 0,83 (9H, s), -0,04 (3H, s), -0,16 (3H, s).

(Etapa 7)

- 45 2-(5-O-[Bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-2-O-[terc-butil(dimetil)silil]-3-O-[(2-cianoetoxi)[di(propan-2-il)amino]fosfanil]- β -D-ribofuranosil)-2,7,8,9-tetrahidro-6-oxa-2,3,5-triazabenzol[cd]azuleno

Usando el compuesto obtenido en la etapa 6 (1,13 g), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 4 del ejemplo 5, excepto que se usó una cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo/trietilamina al 0,1 %] para la purificación, para obtener el compuesto del título (1,00 g) en forma de una mezcla de diastereómeros en el átomo de fósforo (proporción de diastereómeros = 6:4).

- 50 RMN de ^1H (CDCl_3) δ : 8,41 (0,4H, s), 8,39 (0,6H, s), 7,51-7,43 (2H, m), 7,39-7,17 (8H, m), 6,85-6,79 (4H, m), 6,34 (0,6H, d, $J = 6,7$ Hz), 6,30 (0,4H, d, $J = 5,9$ Hz), 4,82 (0,6H, dd, $J = 6,7, 4,7$ Hz), 4,76 (0,4H, dd, $J = 5,9, 4,7$ Hz), 4,55-

4,47 (2H, m), 4,43-4,35 (1,2H, m), 4,30-4,25 (0,8H, m), 4,05-3,85 (1H, m), 3,81-3,76 (6H, m), 3,70-3,47 (4H, m), 3,32-3,24 (1H, m), 2,79-2,64 (3,2H, m), 2,31 (0,8H, t, J = 6,5 Hz), 2,23-2,14 (2H, m), 1,20-1,15 (8,4H, m), 1,03 (3,6H, d, J = 7,0 Hz), 0,75 (3,6H, s), 0,73 (5,4H, s), -0,03 (1,2H, s), -0,08 (1,8H, s), -0,20 (1,2H, s), -0,22 (1,8H, s).

(Etapa 8)

- 5 N-[9-[(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-15,16-Bis[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-10-(2-cianoetoxi)-14-(8,9-dihidro-6-oxa-2,3,5-triazabenzocd]azulen-2(7H)-il]-2-oxo-2-sulfanil-10-sulfanilidenoctahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-7-il]-9H-purin-6-il]benzamida

- 10 Usando el compuesto obtenido en la etapa 7 (1,00 g), la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 7 del ejemplo 1 para proporcionar una solución en acetonitrilo de 2-{2-O-[terc-butil(dimetil)silil]-3-O-(dihidroxifosfanil)-β-D-ribofuranosil]-2,7,8,9-tetrahidro-6-oxa-2,3,5-triazabenzocd]azuleno. Usando esta solución en acetonitrilo y N-benzoil-5'-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-3'-O-[terc-butil(dimetil)silil]-2'-O-[(2-cianoetoxi)di(propan-2-il)amino]fosfanil]adenosina (1,28 g) disponible en el mercado (Cool Pharm Ltd.).28 g), la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 8 del ejemplo 1 y la etapa 9 del ejemplo 1 para obtener una mezcla que contiene el diastereómero 1 del compuesto del título y una mezcla que contiene el diastereómero 2 del compuesto del título.

- 15 Diastereómero 1 (menos polar)

MS (ESI) m/z: 1116 (M+H)⁺.

Diastereómero 2 (más polar)

MS (ESI) m/z: 1116 (M+H)⁺.

(Etapa 9-1)

- 20 (5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-7-(6-Amino-9H-purin-9-il)-15,16-bis[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-14-(8,9-dihidro-6-oxa-2,3,5-triazabenzocd]azulen-2(7H)-il)-2,10-dioxooctahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) de bis(N,N-dietiletanaminio)

- 25 Usando toda la cantidad del compuesto obtenido en la etapa 8 (la mezcla que contiene el diastereómero 1), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 10 del ejemplo 1, y la purificación se llevó a cabo a continuación según las siguientes condiciones de purificación para obtener el compuesto del título (73 mg) en forma de una sal de trietilamina. [Condiciones de purificación] HPLC [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 30 %-60 % (0 min-35 min)].

MS (ESI) m/z: 959 (M+H)⁺.

(Etapa 9-2)

- 30 (5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-7-(6-Amino-9H-purin-9-il)-15,16-bis[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-14-(8,9-dihidro-6-oxa-2,3,5-triazabenzocd]azulen-2(7H)-il)-2,10-dioxooctahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) de bis(N,N-dietiletanaminio)

- 35 Usando toda la cantidad del compuesto obtenido en la etapa 8 (la mezcla que contiene el diastereómero 2), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 10 del ejemplo 1, y la purificación se llevó a cabo a continuación según las siguientes condiciones de purificación para obtener el compuesto del título (58 mg) en forma de una sal de trietilamina. [Condiciones de purificación] HPLC [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 25 %-50 % (0 min-35 min)].

MS (ESI) m/z: 959 (M+H)⁺.

(Etapa 10-1)

- 40 (5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-7-(6-Amino-9H-purin-9-il)-14-(8,9-dihidro-6-oxa-2,3,5-triazabenzocd]azulen-2(7H)-il)-15,16-dihidroxi-2,10-dioxooctahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) disódico

(Diastereómero 1)

- 45 Usando el compuesto obtenido en la etapa 9-1 (68 mg), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 12-1 del ejemplo 19 y, a continuación, se realizó el intercambio de sales de la misma manera que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (42 mg).

MS (ESI) m/z: 731 (M+H)⁺.

- 50 RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,73 (1H, s), 8,31 (1H, s), 8,17 (1H, s), 7,36 (1H, s), 6,38 (1H, d, J = 4,7 Hz), 6,34 (1H, d, J = 8,2 Hz), 5,42-5,34 (1H, m), 5,24-5,16 (1H, m), 4,86-4,81 (2H, m), 4,64-4,29 (6H, m), 4,12-4,01 (2H, m), 2,98-2,81 (2H, m), 2,28-2,13 (2H, m).

RMN de ^{31}P (CD_3OD) δ : 58,2 (s), 54,4 (s).

(Etapa 10-2)

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-7-(6-Amino-9H-purin-9-yl)-14-(8,9-dihidro-6-oxa-2,3,5-triazabeno[cd]azulen-2(7H)-il)-15,16-dihidroxi-2,10-dioxooctahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2 λ^5 ,10 λ^5 -furo[3,2-I][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidofacilotetradecin-2,10-bis(tiolato) disódico

(Diastereómero 2)

Usando el compuesto obtenido en la etapa 9-2 (58 mg), la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 12-1 del ejemplo 19, y el intercambio de sales se realizó a continuación de la misma manera que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (35 mg).

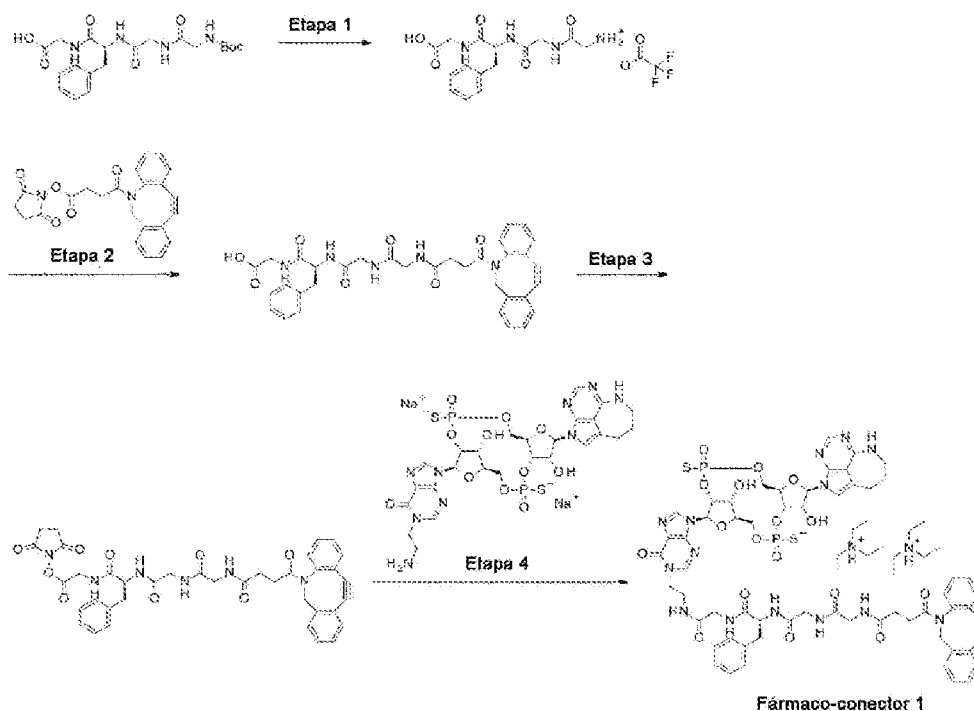
10 MS (ESI) m/z : 731 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

RMN de ^1H (CD_3OD) δ : 8,81 (1H, s), 8,31 (1H, s), 8,17 (1H, s), 7,38 (1H, s), 6,41 (1H, d, $J = 6,7$ Hz), 6,34 (1H, d, $J = 8,6$ Hz), 5,56-5,41 (2H, m), 4,87 (1H, m), 4,64-4,27 (7H, m), 4,06-3,99 (1H, m), 3,92-3,88 (1H, m), 2,99 (2H, t, $J = 5,5$ Hz), 2,28-2,19 (2H, m).

RMN de ^{31}P (CD_3OD) δ : 63,1 (s), 60,5 (s).

15 Ejemplo 21: Síntesis del fármaco-conector 1

[Esquema de síntesis]



(Etapa 1)

Trifluoroacetato de N-(azaniolilacetyl)glycyl-L-fenilalanilglicina

20 A una solución de N-(terc-butoxicarbonil)glicilglicil-L-fenilalanilglicina (3,00 g) disponible en el mercado (Bachem Holding AG) en diclorometano (30 ml) se le añadió ácido trifluoroacético (15 ml) a temperatura ambiente, y la mezcla de reacción se agitó a la misma temperatura durante 3 horas. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida y, a continuación, se suspendió en tolueno y se concentró de nuevo a presión reducida. Este procedimiento de concentración se repitió dos veces más. El residuo se convirtió en una suspensión con éter dietílico (100 ml) y se recogió por filtración para obtener una forma bruta del compuesto del título (3,27 g).

MS (ESI) m/z : 337 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

RMN de ^1H (DMSO- d_6) δ : 12,60 (1H, sa), 8,48 (1H, t, J = 5,6 Hz), 8,44 (1H, t, J = 5,9 Hz), 8,31 (1H, d, J = 8,8 Hz), 7,97 (3H, sa), 7,28-7,16 (5H, m), 4,58 (1H, m), 3,87 (1H, dd, J = 16,8, 5,6 Hz), 3,78 (2H, dd, J = 5,9 Hz), 3,67 (1H, dd, J = 17,1, 5,4 Hz), 3,56 (2H, da, J = 4,4 Hz), 3,05 (1H, dd, J = 13,7, 3,9 Hz), 2,74 (1H, dd, J = 13,7, 10,3 Hz).

(Etapla 2)

5 N-[4-(11,12-Dideshidrodibenzo[b,f]azocin-5(6H)-il)-4-oxobutanoil]glicilglicil-L-fenilalanilglicina

A una solución del compuesto obtenido en la etapa 1 (2,09 g) en N,N-dimetilformamida (46,4 ml) se le añadieron trietilamina (0,804 ml) y 1-[[4-(11,12-dideshidrodibenzo[b,f]azocin-5(6H)-il)-4-oxobutanoil]oxi]pirrolidin-2,5-diona (1,87 g), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 21 horas. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [diclorometano/metanol].

10 A una solución en diclorometano del compuesto resultante se añadió éter dietílico para preparar una suspensión, y el compuesto se recogió por filtración para obtener el compuesto del título (2,10 g).

MS (ESI) m/z: 624 (M+H) $^+$.

15 RMN de ^1H (DMSO- d_6) δ : 8,20-7,91 (4H, m), 7,68-7,13 (13H, m), 4,98 (1H, dd, J = 13,9, 3,2 Hz), 4,51-4,46 (1H, m), 3,73-3,47 (7H, m), 3,00 (1H, dd, J = 13,9, 4,1 Hz), 2,73 (1H, t, J = 11,7 Hz), 2,67-2,57 (1H, m), 2,29-2,22 (1H, m), 2,06-2,01 (1H, m), 1,80-1,73 (1H, m). (sólo se muestran los picos observables)

(Etapla 3)

N-[4-(11,12-Dideshidrodibenzo[b,f]azocin-5(6H)-il)-4-oxobutanoil]glicilglicil-L-fenilalanilglicinato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo

20 A una solución del compuesto obtenido en la etapa 2 (2,10 g) en N,N-dimetilformamida (33,7 ml) se le añadieron N-hidroxisuccinimida (426 mg) y clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (710 mg), y la mezcla de reacción se agitó en una atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente durante 16 horas. La mezcla de reacción se diluyó con diclorometano, se lavó tres veces con agua helada y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El agente desecante se eliminó por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida. Se añadió acetato de etilo al residuo aceitoso para precipitar un sólido. El disolvente se destiló a presión reducida, y se añadió éter dietílico al sólido resultante para preparar una suspensión, y el sólido se recogió por filtración para obtener el compuesto del título (2,18 g).

RMN de ^1H (DMSO- d_6) δ : 8,74-8,69 (1H, m), 8,16-8,08 (2H, m), 8,00-7,93 (1H, m), 7,71-7,15 (13H, m), 5,00 (1H, dd, J = 13,9, 3,0 Hz), 4,55-4,49 (1H, m), 4,27 (2H, t, J = 6,0 Hz), 3,77-3,68 (1H, m), 3,64-3,50 (4H, m), 3,02 (1H, dd, J = 13,9, 4,2 Hz), 2,82-2,73 (5H, m), 2,69-2,58 (1H, m), 2,33-2,24 (1H, m), 2,10-2,02 (1H, m), 1,83-1,75 (1H, m).

30 (Etapla 4)

N-[4-(11,12-Dideshidrodibenzo[b,f]azocin-5(6H)-il)-4-oxobutanoil]glicilglicil-L-fenilalanil-N-(2-{9-[(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-15,16-dihidroxi-2,10-dioxo-2,10-disulfuro-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzoc[d]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2 λ^5 ,10 λ^5 -furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidofosfaciotetradecin-7-il]-6-oxo-6,9-dihidro-1H-purin-1-il}etil)glicinamida de bis(N,N-dietiletanaminio)

(Fármaco-conector 1)

40 A una solución del compuesto obtenido en la etapa 8-2 del ejemplo 5 (10,0 mg) en N,N-dimetilformamida (1 ml) se le añadieron trietilamina (8 μ l) y el compuesto obtenido en la etapa 3 (17,6 mg), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Se añadió bencilamina (3 μ l) a la mezcla de reacción, que se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. A la mezcla de reacción se le añadieron una solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio y metanol, y la mezcla de reacción se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetronitrilo] y HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetronitrilo, acetronitrilo: del 5 %-50 % (0 min-40 min)] para obtener el compuesto del título (10,9 mg).

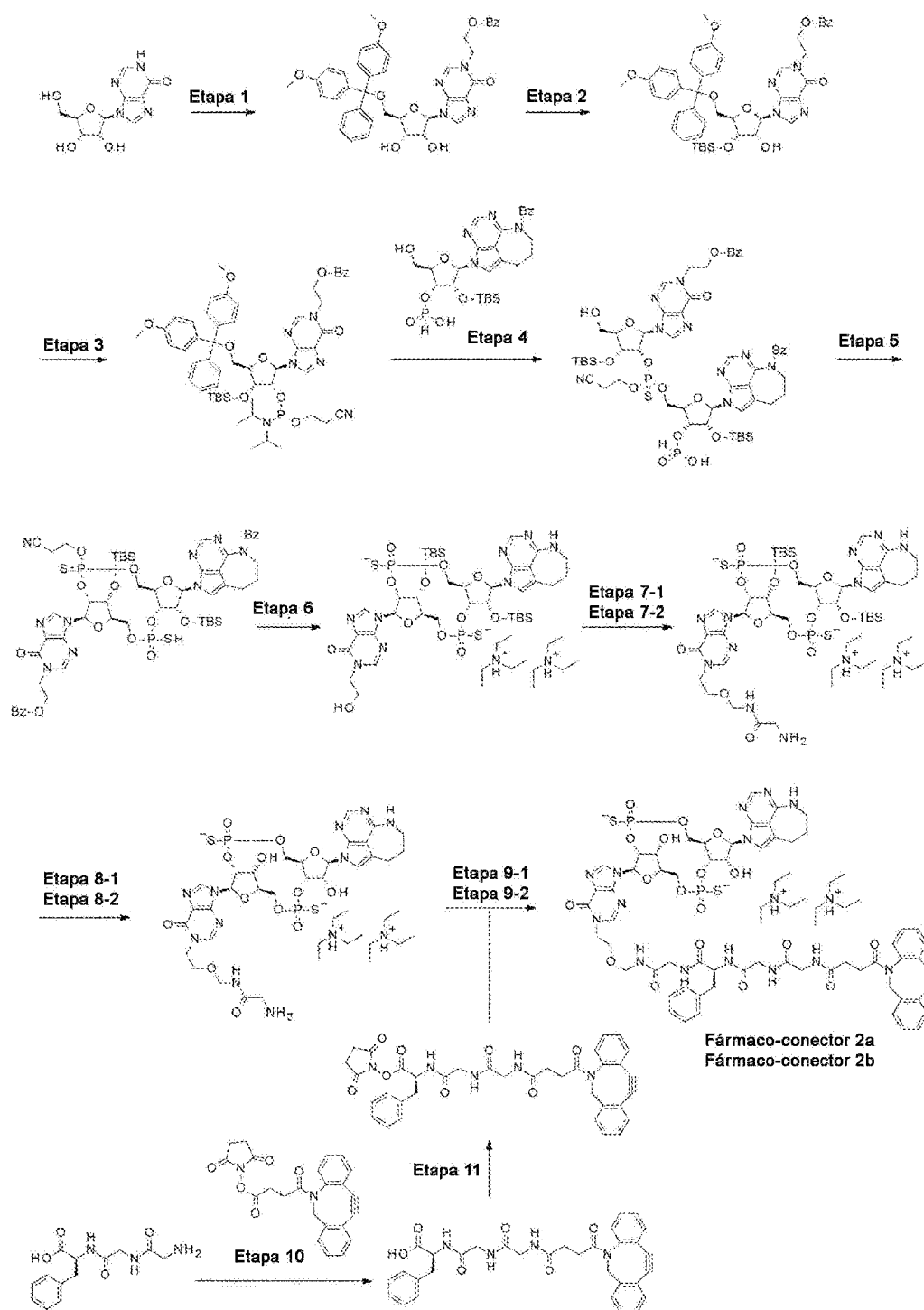
45 MS (ESI) m/z: 1379 (M+H) $^+$.

RMN de ^1H (CD $_3$ OD) δ : 8,72 (1H, d, J = 10,0 Hz), 8,15 (1H, d, J = 10,0 Hz), 8,02 (1H, s), 7,63-7,50 (2H, m), 7,42-7,37 (3H, m), 7,32-7,13 (8H, m), 7,12 (1H, s), 6,31 (1H, d, J = 6,7 Hz), 6,25 (1H, d, J = 8,5 Hz), 5,51-5,40 (2H, m), 5,09-4,99 (1H, m), 4,85-4,77 (1H, m), 4,53-4,42 (2H, m), 4,42-4,15 (5H, m), 4,04-3,96 (1H, m), 3,92-3,46 (12H, m), 3,18 (12H, q, J = 7,3 Hz),

50 3,16-2,73 (5H, m), 2,40-2,23 (2H, m), 2,06-1,94 (4H, m), 1,29 (18H, t, J = 7,3 Hz).

Ejemplo 22: Síntesis del fármaco-conector 2

[Esquema de síntesis]



(Etapa 1)

1-[2-(Benziloxi)etil]-5'-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]inosina

A una solución de inosina (10,0 g) en piridina (50 ml) y N,N-dimetilacetamida (50 ml) se le añadió cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (15,2 g) a 0 °C y, a continuación, la mezcla de reacción se agitó a 4 °C durante 64 horas. Se añadió metanol (2 ml) a la mezcla de reacción, se agitó durante 10 minutos, y después se concentró hasta aproximadamente 50 ml. Al residuo se le añadió 2-bromoetilbenzoato (7,02 ml) y 2,3,4,6,7,8,9,10-octahidropirimido[1,2-a]azepina (13,9 ml), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 día. Se añadieron una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio y agua a la mezcla de reacción, que se sometió a extracción con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con salmuera y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El agente desecante se eliminó por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna

de gel de sílice [hexano/acetato de etilo/metanol/trietilamina al 0,1 %] para obtener el compuesto del título (15,2 g). MS (ESI) m/z: 719 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 8,00 (1H, s), 7,98 (1H, s), 7,98-7,94 (2H, m), 7,62-7,15 (12H, m), 6,80-6,75 (4H, m), 5,95 (1H, d, J = 5,4 Hz), 4,82-4,79 (1H, m), 4,72-4,64 (3H, m), 4,55-4,34 (5H, m), 3,77 (6H, s), 3,43 (1H, dd, J = 10,6, 3,9 Hz), 3,34 (1H, dd, J = 10,6, 3,6 Hz).

(Etapa 2)

1-[2-(Benzoiloxi)etil]-5'-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-3'-O-[terc-butil(dimetil)silil]inosina

Usando el compuesto obtenido en la etapa 1 (3,01 g), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 3 del ejemplo 5 para obtener el compuesto del título (1,20 g) y 1-[2-(benzoiloxi)etil]-5'-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-2'-O-[terc-butil(dimetil)silil]inosina (1,22 g) en forma de un regioisómero del compuesto del título. MS (ESI) m/z: 833 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 8,03 (1H, s), 7,98-7,96 (1H, m), 7,96 (1H, s), 7,96-7,94 (1H, m), 7,59-7,52 (1H, m), 7,44-7,38 (4H, m), 7,32-7,15 (7H, m), 6,83-6,77 (4H, m), 5,94 (1H, d, J = 4,8 Hz), 4,69-4,63 (2H, m), 4,59-4,35 (4H, m), 4,16 (1H, dd, J = 3,8, 1,9 Hz), 3,77 (6H, d, J = 1,8 Hz), 3,47 (1H, dd, J = 10,9, 3,0 Hz), 3,27 (1H, dd, J = 10,9, 4,2 Hz), 3,00 (1H, d, J = 6,7 Hz), 0,87 (9H, s), 0,06 (3H, s), -0,01 (3H, s)

(forma 2'-O-TBS)

MS (ESI) m/z: 833 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 8,01 (1H, s), 7,97-7,93 (2H, m), 7,91 (1H, s), 7,59-7,53 (1H, m), 7,45-7,38 (4H, m), 7,35-7,17 (7H, m), 6,83-6,77 (4H, m), 5,97 (1H, d, J = 6,0 Hz), 4,84 (1H, t, J = 5,4 Hz), 4,71-4,60 (2H, m), 4,52-4,37 (2H, m), 4,33-4,28 (1H, m), 4,28-4,24 (1H, m), 3,78 (3H, s), 3,77 (3H, s), 3,47 (1H, dd, J = 10,9, 3,0 Hz), 3,38 (1H, dd, J = 10,9, 3,6 Hz), 2,71 (1H, d, J = 3,0 Hz), 0,80 (9H, s), -0,03 (3H, s), -0,19 (3H, s).

(Etapa 3)

1-[2-(Benzoiloxi)etil]-5'-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-3'-O-[terc-butil(dimetil)silil]-2'-O-[(2-cianoetoxi)di(propan-2-il)amino]fosfanil]inosina

Usando el compuesto obtenido en la etapa 2 (1,20 g), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 4 del ejemplo 5 para obtener el compuesto del título (1,41 g) en forma de una mezcla de diastereómeros en el átomo de fósforo (proporción de diastereómeros = 0,55:0,45). MS (ESI) m/z: 1033 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 8,05 (0,45H, s), 8,04 (0,55H, s), 7,99-7,95 (2H, m), 7,95 (0,55H, s), 7,92 (0,45H, s), 7,59-7,53 (1H, m), 7,45-7,39 (4H, m), 7,35-7,10 (7H, m), 6,83-6,78 (4H, m), 6,15 (0,55H, d, J = 5,4 Hz), 6,08 (0,45H, d, J = 6,0 Hz), 4,86-4,49 (3H, m), 4,49-4,35 (3H, m), 4,25-4,10 (1H, m), 3,78 (6H, s), 3,72-3,41 (5H, m), 3,35-3,25 (1H, m), 2,47 (1H, t, J = 6,7 Hz), 2,32 (1H, t, J = 6,3 Hz), 1,33-1,24 (6H, m), 1,13-1,03 (6H, m), 0,84 (4,05H, s), 0,84 (4,95H, s), 0,08 (1,35H, s), 0,05 (1,65H, s), 0,00 (1,35H, s), -0,01 (1,65H, s).

(Etapa 4)

Se realizó la misma reacción que en la etapa 7 del ejemplo 1 con la siguiente escala (materia prima: 1,40 g). Utilizando una solución de acetonitrilo del compuesto obtenido y del compuesto obtenido en la etapa 3 (1,41 g), se llevó a cabo la reacción de la misma manera que en la etapa 8 del ejemplo 1. El producto bruto resultante se utilizó directamente para la reacción posterior.

(Etapa 5)

Benzoato de 2-{9-[(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-14-(6-benzoil-6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)-15,16-bis[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-10-(2-cianoetoxi)-2-oxo-2-sulfanil-10-sulfanilidenoctahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-7-il]-6-oxo-6,9-dihidro-1H-purin-1-il]etilo

Usando el producto bruto obtenido en la etapa 4, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 9 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (778 mg) en forma de una mezcla de diastereómeros en el átomo de fósforo.

MS (ESI) m/z: 1264 (M+H)⁺.

(Etapa 6)

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-15,16-Bis[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-7-[1-(2-hidroxi)etil]-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il]-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-

metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-1][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) de bis(N,N-dietiletanaminio)

Usando el compuesto obtenido en la etapa 5 (778 mg), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 10 del ejemplo 1 para obtener el diastereómero 1 (255 mg) y el diastereómero 2 (con impurezas) del compuesto del título. El diastereómero 2 se purificó de nuevo por HPLC preparativa [agua/acetonitrilo con trietilamina al 0,2, acetónitrilo con trietilamina al 0,2 %: del 5 %-50 % (0 min-40 min)] para obtener el diastereómero 2 (94,6 mg) del compuesto del título.

Diastereómero 1 (menos polar)

MS (ESI) m/z: 1003 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,66 (1H, s), 8,21 (1H, s), 8,04 (1H, s), 7,33 (1H, s), 6,27 (1H, d, J = 5,1 Hz), 6,25 (1H, d, J = 3,6 Hz), 5,39-5,29 (1H, m), 5,18-5,11 (1H, m), 4,85-4,81 (1H, m), 4,79-4,74 (1H, m), 4,71-4,66 (1H, m), 4,50-4,42 (1H, m), 4,36-4,21 (2H, m), 4,09-3,98 (2H, m), 3,85-3,78 (2H, m), 3,78-3,69 (2H, m), 3,55-3,46 (2H, m), 3,17 (12H, q, J = 7,3 Hz), 2,98-2,75 (2H, m), 2,05-1,88 (2H, m), 1,28 (18H, t, J = 7,3 Hz), 0,98 (9H, s), 0,85 (9H, s), 0,31 (3H, s), 0,27 (3H, s), 0,25 (3H, s), 0,09 (3H, s).

Diastereómero 2 (más polar)

MS (ESI) m/z: 1003 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,50 (1H, s), 8,22 (1H, s), 8,07 (1H, s), 7,20 (1H, s), 6,33 (1H, d, J = 7,3 Hz), 6,26 (1H, d, J = 9,1 Hz), 5,59-5,44 (1H, m), 5,38-5,32 (1H, m), 5,21-5,11 (1H, m), 4,99-4,89 (2H, m), 4,68-4,54 (2H, m), 4,25-4,12 (3H, m), 4,09-4,03 (1H, m), 3,90-3,80 (3H, m), 3,59-3,51 (2H, m), 3,20 (12H, q, J = 7,3 Hz), 2,96-2,89 (2H, m), 2,07-1,98 (2H, m), 1,30 (18H, t, J = 7,3 Hz), 0,99 (9H, s), 0,74 (9H, s), 0,27 (3H, s), 0,27 (3H, s), 0,20 (3H, s), -0,05 (3H, s).

(Etapa 7-1)

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-15,16-Bis[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-7-(1-{2-[(glicilamino)metoxi]etil}-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il)-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-1][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) de bis(N,N-dietiletanaminio)

(Diastereómero 1)

A una disolución del compuesto obtenido en la etapa 6 (diastereómero 1) (30 mg) en tetrahidrofurano (0,5 ml) se le añadieron [(N-[(9H-fluoren-9-il)metoxi]carbonil]glicil)amino]acetato de metilo (91,7 mg) y ácido p-toluenosulfónico monohidratado (11,8 mg), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 6 horas. A la mezcla de reacción se le añadieron N,N-dimetilformamida (0,5 ml) y 1,8-diazabicyclo[5.4.0]-7-undeceno(56 μl), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. A la mezcla de reacción se le añadió una solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio, y la mezcla de reacción se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo] para obtener el compuesto del título (25,6 mg) que contenía la materia prima como impureza.

MS (ESI) m/z: 1089 (M+H)⁺.

(Etapa 7-2)

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-15,16-Bis[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-7-(1-{2-[(glicilamino)metoxi]etil}-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il)-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-1][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) de bis(N,N-dietiletanaminio)

(Diastereómero 2)

Usando el compuesto obtenido en la etapa 6 (diastereómero 2) (84,6 mg), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 7-1 para obtener el compuesto del título (70,9 mg) que contiene la materia prima como impureza.

MS (ESI) m/z: 1089 (M+H)⁺.

(Etapa 8-1)

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-7-(1-{2-[(Glicilamino)metoxi]etil}-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il)-15,16-dihidroxi-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-1][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) de bis(N,N-dietiletanaminio), diastereómero 1

Al compuesto obtenido en la etapa 7-1 (25,6 mg) se le añadió trifluorhidrato de trietilamina (2 ml), y la mezcla de reacción se agitó a 45 °C durante 3 horas. A la mezcla de reacción se le añadió una mezcla enfriada con hielo de una solución 1 M de hidrogenocarbonato de trietilamonio (10 ml) y trietilamina (2 ml) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida y se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice C18 (solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetronitrilo) para obtener el compuesto del título (16,6 mg: con una impureza derivada de la materia prima de la etapa 7-1). MS (ESI) m/z: 861 (M+H)⁺.

(Etapa 8-2)

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-7-(1-{2-[(Glicilamino)metoxi]etil}-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il)-15,16-dihidroxi-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-I][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfacilotetradecin-2,10-bis(tiolato) de bis(N,N-dietiletanaminio)

(Diastereómero 2)

Usando el compuesto obtenido en la etapa 7-2 (70,9 mg), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 8-1 para obtener el compuesto del título (51,7 mg: con una impureza derivada de la materia prima de la etapa 7-2).

MS (ESI) m/z: 861 (M+H)⁺.

(Etapa 9-1)

N-[4-(11,12-Dideshidrodibenzo[b,f]azocin-5(6H)-il)-4-oxobutanoil]glicilglicil-L-fenilalanil-N-[(2-{9-[(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-15,16-dihidroxi-2,10-dioxo-2,10-disulfuro-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-I][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfacilotetradecin-7-il]-6-oxo-6,9-dihidro-1H-purin-1-il}etoxi)metil]glicinamida de bis(N,N-dietiletanaminio)

(Fármaco-conector 2a: diastereómero 1)

A una solución del compuesto obtenido en la etapa 8-1 (16,6 mg) en N,N-dimetilformamida (0,5 ml) se le añadieron trietilamina (6 µl) y un compuesto obtenido en la etapa 11 descrito posteriormente (15,5 mg), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. Se añadió bencilamina (3 µl) a la mezcla de reacción, que se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación, se añadió una solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio y metanol, y la mezcla de reacción se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetronitrilo] y HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetronitrilo, acetronitrilo: del 10 %-45 % (0 min-30 min)] para obtener el compuesto del título (5,1 mg).

MS (ESI) m/z: 1409 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,66-8,60 (1H, m), 8,17 (1H, s), 8,02 (1H, s), 7,65-7,48 (2H, m), 7,43-7,36 (3H, m), 7,31-7,13 (8H, m), 7,11 (1H, s), 6,30-6,21 (2H, m), 5,46-5,37 (1H, m), 5,23-5,16 (1H, m), 5,08-4,99 (1H, m), 4,86-4,81 (1H, m), 4,80-4,75 (1H, m), 4,70-4,40 (7H, m), 4,40-4,20 (3H, m), 4,10-3,97 (3H, m), 3,86-3,58 (8H, m), 3,51-3,43 (3H, m), 3,18 (12H, q, J = 7,3 Hz), 3,01-2,93 (1H, m), 2,85-2,72 (3H, m), 2,37-2,15 (2H, m), 2,01-1,93 (2H, m), 1,29 (18H, t, J = 7,3 Hz). (sólo se muestran los picos observables)

(Etapa 9-2)

N-[4-(11,12-Dideshidrodibenzo[b,f]azocin-5(6H)-il)-4-oxobutanoil]glicilglicil-L-fenilalanil-N-[(2-{9-[(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-15,16-dihidroxi-2,10-dioxo-2,10-disulfuro-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-I][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfacilotetradecin-7-il]-6-oxo-6,9-dihidro-1H-purin-1-il}etoxi)metil]glicinamida de bis(N,N-dietiletanaminio)

(Fármaco-conector 2b: diastereómero 2)

Usando el compuesto obtenido en la etapa 8-2 (51,7 mg), la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 9-1, y la purificación se realizó a continuación según las siguientes condiciones de purificación para obtener el compuesto del título (33,7 mg). [Condiciones de purificación] Cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetronitrilo], HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetronitrilo, acetronitrilo: del 10 %-50 % (0 min-30 min)].

MS (ESI) m/z: 1409 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,73 (1H, d, J = 6,7 Hz), 8,19 (1H, d, J = 3,0 Hz), 8,02 (1H, s), 7,66-7,50 (2H, m), 7,43-7,37 (3H, m), 7,33-7,13 (8H, m), 7,11 (1H, s), 6,33-6,23 (2H, m), 5,51-5,38 (2H, m), 5,04 (1H, t, J = 13,6 Hz), 4,83-4,77 (1H,

m), 4,64-4,55 (2H, m), 4,52-4,26 (6H, m), 4,25-3,97 (2H, m), 3,93-3,45 (13H, m), 3,19 (12H, q, J = 7,3 Hz), 3,17-3,11 (1H, m), 3,02-2,92 (1H, m), 2,91-2,73 (3H, m), 2,40-2,24 (2H, m), 2,07-1,95 (3H, m), 1,30 (18H, t, J = 7,3 Hz).

(Etapa 10)

N-[4-(11,12-Dideshidrodibenzo[b,f]azocin-5(6H)-il)-4-oxobutanoil]glicilglicil-L-fenilalanina

- 5 A una solución de ácido (2S)-2-[[2-[(2-aminoacetil)amino]acetil]amino]-3-fenilpropanoico (2,86 g) disponible en el mercado (Bachem Holding AG) en N,N-dimetilformamida (51,2 ml), trietilamina (2,56 ml) y 1-[[4-(11,12-dideshidrodibenzo[b,f]azocin-5(6H)-il)-4-oxobutanoil]oxi]pirrolidin-2,5-diona (3,69 g) disponible en el mercado (Click Chemistry Tools), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. Se añadió una solución acuosa (500 ml) de ácido cítrico monohidratado (24,0 g) a la mezcla de reacción, que se sometió a extracción con acetato de etilo. Tras secar la capa orgánica sobre sulfato de sodio anhidro, se eliminó el agente desecante por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se disolvió en una solución mixta de acetato de etilo/acetonitrilo, se precipitó con éter diisopropílico y se recogió por filtración para obtener el compuesto del título (4,30 g).

- 15 RMN de ^1H (DMSO- d_6) δ : 12,8 (1H, sa), 8,15-7,95 (3H, m), 7,68-7,17 (13H, m), 5,01 (1H, d, J = 14,2 Hz), 4,41-4,37 (1H, m), 3,74-3,57 (5H, m), 3,05-3,01 (1H, m), 2,87 (1H, dd, J = 14,2, 9,3 Hz), 2,68-2,59 (1H, m), 2,32-2,25 (1H, m), 2,09-2,03 (1H, m), 1,82-1,76 (1H, m).

(Etapa 11)

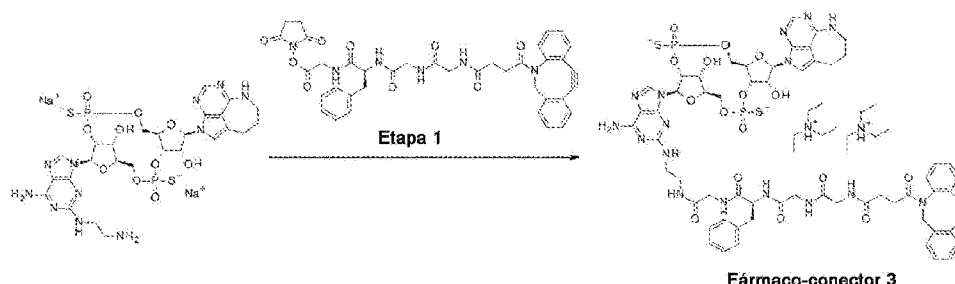
N-[4-(11,12-Dideshidrodibenzo[b,f]azocin-5(6H)-il)-4-oxobutanoil]glicilglicil-L-fenilalaninato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo

- 20 A una solución del compuesto obtenido en la etapa 10 (2,10 g) en N,N-dimetilformamida (75,9 ml) se le añadieron N-hidroxisuccinimida (961 mg) y clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (1,60 g), y la mezcla de reacción se agitó en una atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente durante 21 horas. La mezcla de reacción se diluyó con diclorometano, se lavó tres veces con agua helada y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El agente desecante se eliminó por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida. Se añadió tolueno al residuo y el producto resultante se concentró de nuevo a presión reducida. El residuo se disolvió en acetonitrilo y el producto resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice C18 [acetonitrilo: al 100 %]. Las fracciones que contenían el producto deseado se concentraron a presión reducida y, a continuación, se añadió éter diisopropílico al residuo para obtener una suspensión. El sólido obtenido se recogió por filtración para obtener el compuesto del título (2,59 g).

- 30 RMN de ^1H (DMSO- d_6) δ : 8,58-8,51 (1H, m), 8,17-8,00 (2H, m), 7,66-7,20 (13H, m), 5,02-4,98 (1H, m), 4,90-4,85 (1H, m), 3,78-3,57 (5H, m), 3,24-3,19 (1H, m), 3,06-3,00 (1H, m), 2,82 (4H, sa), 2,67-2,58 (1H, m), 2,32-2,23 (1H, m), 2,09-2,02 (1H, m), 1,82-1,75 (1H, m).

Ejemplo 23: Síntesis del fármaco-conector 3

[Esquema de síntesis]



- 35 (Etapa 1)

N-[4-(11,12-Dideshidrodibenzo[b,f]azocin-5(6H)-il)-4-oxobutanoil]glicilglicil-L-fenilalanil-N-[2-({6-amino-9-[(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-15,16-dihidroxi-2,10-dioxo-2,10-disulfuro-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzoc[d]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2 λ^5 ,10 λ^5 -furo[3,2-1][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciotetradecin-7-il]-9H-purin-2-il}amino)etil]glicinamida de bis(N,N-dietiletanaminio)

- 40 (Fármaco-conector 3)

A una solución del compuesto obtenido en la etapa 8-2 del ejemplo 8 (4,8 mg) en N,N-dimetilformamida (0,29 ml) se le añadieron trietilamina (1,9 μl) y el compuesto obtenido en la etapa 3 del ejemplo 21 (5,2 mg), y la mezcla de reacción se agitó en una atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente durante 1,5 horas. Después de añadir bencilamina

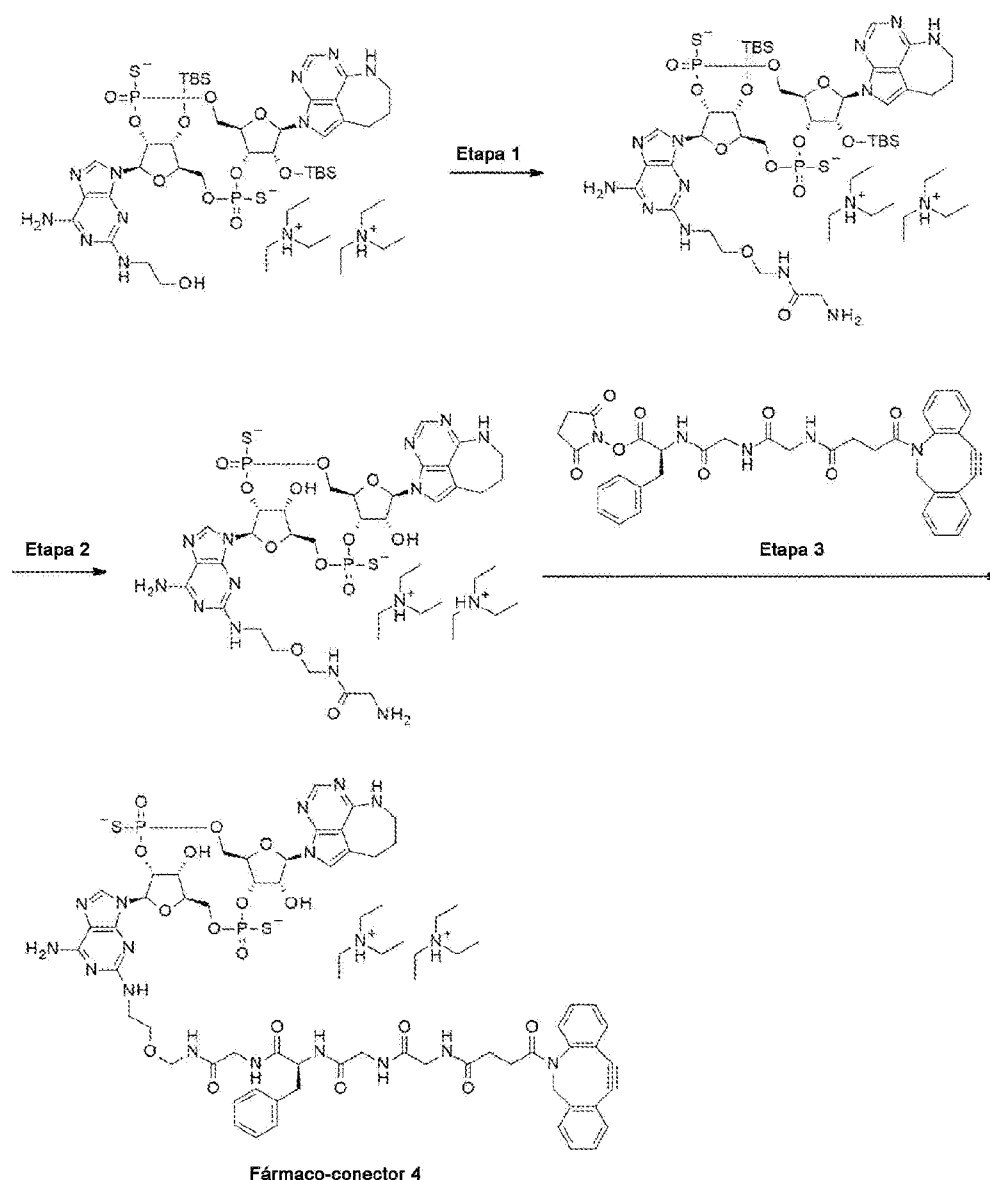
(3,2 µl) para inactivar la reacción, el producto resultante se purificó por HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 20 %-40 % (0 min-30 min)] para obtener el compuesto del título (8,0 mg).

MS (ESI) m/z: 1393 (M+H)⁺.

- 5 RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,35 (1H, sa), 8,02 (1H, s), 7,61-7,15 (14H, m), 6,33 (1H, dd, J = 6,0, 3,0 Hz), 6,15-6,09 (1H, m), 5,49-5,37 (2H, m), 5,05 (1H, dd, J = 13,9, 12,1 Hz), 4,85-4,79 (1H, m), 4,53-4,21 (6H, m), 4,06-3,61 (8H, m), 3,51-3,13 (6H, m), 3,16 (12H, q, J = 7,3 Hz), 3,06-2,65 (7H, m), 2,35-1,94 (4H, m), 1,28 (18H, t, J = 7,6 Hz).

Ejemplo 24: Síntesis del fármaco-conector 4

[Esquema de síntesis]



Fármaco-conector 4

10

(Etapa 1)

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-7-[6-Amino-2-(2-[(glicilamino)metoxi]etil)amino)-9H-purin-9-il]-15,16-bis[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-1][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidofosfaciotetradecin-2,10-bis(tiolato) de bis(N,N-dietiletanaminio)

15

Usando el compuesto obtenido en la etapa 1-2 del ejemplo 9 (17,6 mg), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 7-1 del ejemplo 22 para obtener el compuesto del título (8,3 mg).

MS (ESI) m/z: 1103 (M+H)⁺.

(Etapa 2)

- 5 (5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-7-[6-Amino-2-({2-[(glicilamino)metoxi]etil}amino)-9H-purin-9-il]-15,16-dihidroxi-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciotetradecin-2,10-bis(tiolato) de bis(N,N-dietiletanaminio)

Usando el compuesto obtenido en la etapa 1 (10,7 mg), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 8-1 del ejemplo 22 para obtener el compuesto del título (7,6 mg).

- 10 MS (ESI) m/z: 875 (M+H)⁺.

(Etapa 3)

- 15 N-[4-(11,12-Dideshidrodibenzo[b,f]azocin-5(6H)-il)-4-oxobutanoil]glicilglicil-L-fenilalanil-N-{{2-({6-amino-9-[(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-15,16-dihidroxi-2,10-dioxo-2,10-disulfuro-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciotetradecin-7-il]-9H-purin-2-il}amino)etoxi]metilglicinamida de bis(N,N-dietiletanaminio)

(Fármaco-conector 4)

- 20 Usando el compuesto obtenido en la etapa 2 (7,6 mg), la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 9-1 del ejemplo 22. La purificación se realizó según las siguientes condiciones de purificación para obtener el compuesto del título (7,6 mg) en forma de una sal de trietilamina.

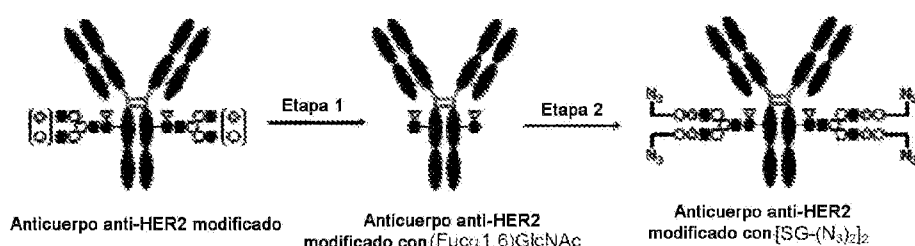
[Condiciones de purificación] HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 20 %-40 % (0 min-30 min)]. MS (ESI) m/z: 1423 (M+H)⁺.

- 25 RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,37 (1H, sa), 8,01 (1H, d, J = 2,4 Hz), 7,63-7,11 (14H, m), 6,33 (1H, d, J = 6,7 Hz), 6,17 (1H, d, J = 7,3 Hz), 5,51-5,36 (2H, m), 5,09-5,03 (1H, m), 4,84-4,80 (1H, m), 4,63-4,25 (8H, m), 4,07-3,58 (9H, m), 3,50-3,41 (4H, m), 3,28-2,72 (8H, m), 3,18 (12H, q, J = 7,3 Hz), 2,45-1,96 (4H, m), 1,29 (18H, t, J = 7,3 Hz).

Ejemplo 25: Síntesis del anticuerpo con glucano remodelado 1

Síntesis del anticuerpo anti-HER2 modificado con [SG-(N₃)₂]₂

[Esquema de síntesis]



- 30 (Etapa 1)

Preparación del anticuerpo anti-HER2 modificado con (Fucα1,6)GlcNAc

- 35 A una solución salina tamponada con fosfato de un anticuerpo anti-HER2 modificado preparado de acuerdo con el ejemplo de referencia 1 (20 ml, 12,6 mg/ml, pH 6,0) se le añadió una solución salina tamponada con fosfato de EndoS de tipo salvaje (0,147 ml, 7,70 mg/ml, pH 6,0), y la mezcla de reacción se agitó a 37 °C durante 2 horas y 15 minutos. El grado de progresión de la reacción se comprobó utilizando una estación de electroforesis Experion (fabricada por Bio-Rad Laboratories, Inc.). Una vez completada la reacción, se procedió a la purificación por cromatografía de afinidad y a la purificación por cromatografía en columna de hidroxipatita, de acuerdo con los procedimientos siguientes.

(1) Purificación por cromatografía de afinidad

Aparato de purificación: AKTA avant 25 (producido por GE Healthcare)

- 40 Columna: HiTrap rProtein A FF (5 ml) (producido por GE Healthcare)

Caudal: 5 ml/min (1,25 ml/min en carga)

La mezcla de reacción obtenida anteriormente se purificó en dos procedimientos separados. Al conectar la columna, se añadió la mezcla de reacción a la columna, y se hicieron fluir 2 CV de tampón de unión (tampón fosfato 20 mM (pH 6,0)) a 1,25 ml/min y 5 CV del mismo se volvieron a hacer fluir a 5 ml/min. En el lavado intermedio, se hicieron fluir 15 CV de solución de lavado (tampón fosfato 20 mM (pH 7,0), solución de cloruro de sodio 0,5 M). En la elución, se hicieron fluir 6 CV de tampón de elución (tampón de elución ImmunoPure IgG, producido por Pierce). El eluido se neutralizó inmediatamente con tampón Tris 1 M (pH 9,0). Las fracciones que contenían el producto deseado se sometieron a intercambio de tampón contra una solución tampón fosfato 5 mM/ácido 2-morfolinoetanosulfónico (MES) 50 mM (pH 6,8) de acuerdo con el procedimiento descrito en el procedimiento común C. La concentración de anticuerpo de la solución tampón obtenida se midió de acuerdo con el procedimiento descrito en el procedimiento común B, proporcionando así una solución parcialmente purificada del anticuerpo del título (26,57 mg/ml, 9,0 ml).

(2) Purificación mediante cromatografía de hidroxipatita

Aparato de purificación: AKTA avant 25 (producido por GE Healthcare)

Columna: Cartucho Bio-Scale Mini CHT de tipo I (5 ml) (fabricado por Bio-Rad Laboratories, Inc.)

Caudal: 5 ml/min (1,25 ml/min en carga)

La solución obtenida en (1) se añadió a la columna, y se hicieron fluir 2 CV de solución A (tampón fosfato 5 mM, solución MES 50 mM (pH 6,8)) a 1,25 ml/min y 3 CV de la misma se volvieron a hacer fluir a 5 ml/min. A continuación, se procedió a la elución con la solución A y la solución B (tampón fosfato 5 mM/solución MES 50 mM (pH 6,8), solución de cloruro de sodio 2 M). Las condiciones de elución fueron solución A:solución B = de 100:0 a 0:100 (5 CV). A continuación, se hicieron fluir 5 CV de solución de lavado (tampón fosfato 500 mM (pH 6,5)). Las fracciones que contenían el producto diana se sometieron a intercambio de tampón contra tampón fosfato 20 mM (pH 6,0) de acuerdo con el procedimiento descrito en el procedimiento común C. La concentración de anticuerpo de la solución tampón obtenida se midió de acuerdo con el procedimiento descrito en el procedimiento común B, proporcionando así una solución del anticuerpo del título (17,29 mg/ml, aproximadamente 13 ml).

(Etapa 2)

Preparación del anticuerpo anti-HER2 modificado con $[SG-(N_3)_2]_2$

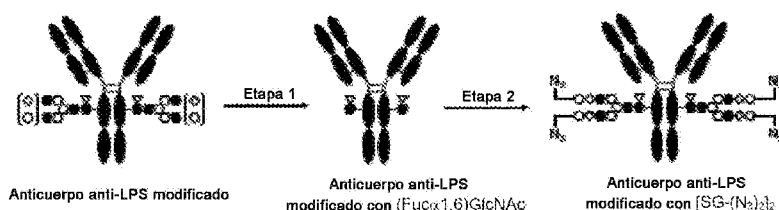
Al anticuerpo obtenido en la etapa 1 en una solución tampón fosfato 20 mM (17,29 mg/ml, 13 ml, pH 6,0) se le añadió $[N_3-PEG(3)]_2-SG(10)Ox$ (compuesto 1-10 en el documento WO2018/003983) (52 mg) en una solución tampón fosfato 20 mM (pH 6,0) (3,0 ml + 1,0 ml para lavado) y se añadió una solución salina tamponada con fosfato de EndoS (D233Q/Q303L) (0,698 ml, 5,8 mg/ml, pH 6,0), y la mezcla de reacción se agitó a 30 °C durante 4 horas. La mezcla de reacción se almacenó a -80 °C durante 15 horas y luego se descongeló a 30 °C, y se añadieron $[N_3-PEG(3)]_2-SG(10)Ox$ (7,5 mg) y una solución salina tamponada con fosfato de EndoS (D233Q/Q303L) (0,155 ml, 5,8 mg/ml, pH 6,0) a la mezcla de reacción, que se agitó a 30 °C durante 2 horas. El grado de progresión de la reacción se comprobó utilizando una estación de electroforesis Experion (fabricada por Bio-Rad Laboratories, Inc.).

Tras la finalización de la reacción, la purificación mediante cromatografía de afinidad y la purificación mediante cromatografía de hidroxipatita se realizaron como en la etapa 1. Las fracciones que contenían el producto diana (siete fracciones en total) se separaron en cuatro fracciones anteriores y tres fracciones posteriores, y cada fracción se sometió a un intercambio de tampón contra solución salina tamponada con fosfato (pH 6,0) de acuerdo con el procedimiento descrito en el procedimiento común C. La concentración de anticuerpo de cada solución tampón obtenida se midió de acuerdo con el procedimiento descrito en el procedimiento común B, proporcionando así una solución del anticuerpo del título (cuatro fracciones anteriores: 14,99 mg/ml, 10 ml) y una solución del anticuerpo del título (tres fracciones posteriores: 10,97 mg/ml, 6,2 ml).

Ejemplo 26: Síntesis del anticuerpo con glucano remodelado 2

Preparación del anticuerpo anti-LPS modificado con $[SG-(N_3)_2]_2$

[Esquema de síntesis]



(Etapa 1)

Preparación del anticuerpo anti-LPS modificado con (Fuc α 1,6)GlcNAc

- 5 Usando una solución salina tamponada con fosfato de un anticuerpo anti-LPS modificado preparado de acuerdo con el ejemplo de referencia 2 (8,5 ml, 10,96 mg/ml, pH 6,0), se realizaron los mismos procedimientos que en la etapa 1 del ejemplo 25 para obtener el anticuerpo del título en solución tampón fosfato 20 mM (11,70 mg/ml, 7,5 ml, pH 6,0).

(Etapa 2)

Preparación del anticuerpo anti-LPS modificado con [SG-(N₃)₂]₂

- 10 Usando el anticuerpo en una disolución tampón fosfato 20 mM obtenida en la etapa 1 (11,70 mg/ml, 7,5 ml, pH 6,0) y [N₃-PEG(3)]₂-SG(10)Ox (20,3 mg), se realizaron los mismos procedimientos que en la etapa 2 del ejemplo 25 para obtener una solución salina tamponada con fosfato del anticuerpo del título (10,55 mg/ml, 7,5 ml, pH 6,0).

Ejemplo 27: Síntesis del conjugado de anticuerpo-fármaco 1 (síntesis del conjugado de anticuerpo anti-HER2-CDN 1)

- 15 Se diluyó una solución salina tamponada con fosfato del anticuerpo con glucano remodelado 1 (pH 6,0) (10,97 mg/ml, 0,500 ml) con propilenglicol (0,250 ml). A esta solución se le añadió una mezcla de una solución en dimetilsulfóxido del fármaco-conector 3 (10 mM, 0,0907 ml, 24 equivalentes por molécula de anticuerpo) y propilenglicol (0,159 ml), y el producto resultante se hizo reaccionar con un rotador de tubos (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente durante 2 días. La mezcla de reacción se purificó de acuerdo con el procedimiento descrito en el procedimiento común D para obtener una solución del conjugado de anticuerpo diana-fármaco en ABS (tampón acetato 10 mM, sorbitol al 5 %, pH 5,5) (3,5 ml).

- 20 El análisis se realizó de acuerdo con los procedimientos descritos en los procedimientos comunes E y G para adquirir los siguientes resultados.

Concentración de anticuerpo: 0,97 mg/ml

Rendimiento del anticuerpo: 3,41 mg (62 %)

Número promedio de moléculas de fármaco conjugado: 3,6

Ejemplo 28: Síntesis del conjugado de anticuerpo-fármaco 2 (síntesis del conjugado de anticuerpo anti-HER2-CDN 2)

- 25 Se diluyó una solución salina tamponada con fosfato del anticuerpo con glucano remodelado 1 (pH 6,0) (10,97 mg/ml, 0,500 ml) con propilenglicol (0,250 ml). A esta solución se le añadió una mezcla de una solución en dimetilsulfóxido del fármaco-conector 4 (10 mM, 0,0907 ml, 24 equivalentes por molécula de anticuerpo) y propilenglicol (0,159 ml), y el producto resultante se hizo reaccionar con un rotador de tubos (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente durante 2 días. La mezcla de reacción se purificó de acuerdo con el procedimiento descrito en el procedimiento común D para obtener una solución del conjugado de anticuerpo diana-fármaco en ABS (3,5 ml).

- 30 El análisis se realizó de acuerdo con los procedimientos descritos en los procedimientos comunes E y G para adquirir los siguientes resultados.

Concentración de anticuerpo: 1,08 mg/ml

Rendimiento del anticuerpo: 3,78 mg (69 %)

- 35 Número promedio de moléculas de fármaco conjugado: 3,2

Ejemplo 29: Síntesis del conjugado de anticuerpo-fármaco 3 (síntesis del conjugado de anticuerpo anti-HER2-CDN 3)

- 40 Se diluyó una solución salina tamponada con fosfato del anticuerpo con glucano remodelado 1 (pH 6,0) (10,97 mg/ml, 0,500 ml) con propilenglicol (0,250 ml). A esta solución se le añadió una mezcla de una solución en dimetilsulfóxido del fármaco-conector 2a (10 mM, 0,0907 ml, 24 equivalentes por molécula de anticuerpo) y propilenglicol (0,159 ml), y el producto resultante se hizo reaccionar con un rotador de tubos (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente durante 47 horas. La mezcla de reacción se purificó de acuerdo con el procedimiento descrito en el procedimiento común D para obtener una solución del conjugado de anticuerpo diana-fármaco en ABS (3,5 ml).

- El análisis se realizó de acuerdo con los procedimientos descritos en los procedimientos comunes E y G para adquirir los siguientes resultados.

- 45 Concentración de anticuerpo: 0,91 mg/ml

Rendimiento del anticuerpo: 3,17 mg (58 %)

Número promedio de moléculas de fármaco conjugado: 3,6

Ejemplo 30: Síntesis del conjugado de anticuerpo-fármaco 4 (síntesis del conjugado de anticuerpo anti-LPS-CDN 1)

Se diluyó una solución salina tamponada con fosfato del anticuerpo con glucano remodelado 1 (pH 6,0) (10,55 mg/ml, 1,00 ml) con propilenglicol (0,500 ml). A esta solución se le añadió una mezcla de una solución en dimetilsulfóxido del fármaco-conector 3 (10 mM, 0,174 ml, 24 equivalentes por molécula de anticuerpo) y propilenglicol (0,326 ml), y el producto resultante se hizo reaccionar con un rotador de tubos (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente durante 2 días. La mezcla de reacción se purificó de acuerdo con el procedimiento descrito en el procedimiento común D para obtener una solución del conjugado de anticuerpo diana-fármaco en ABS (6,5 ml).

El análisis se realizó de acuerdo con los procedimientos descritos en los procedimientos comunes E y G para adquirir los siguientes resultados.

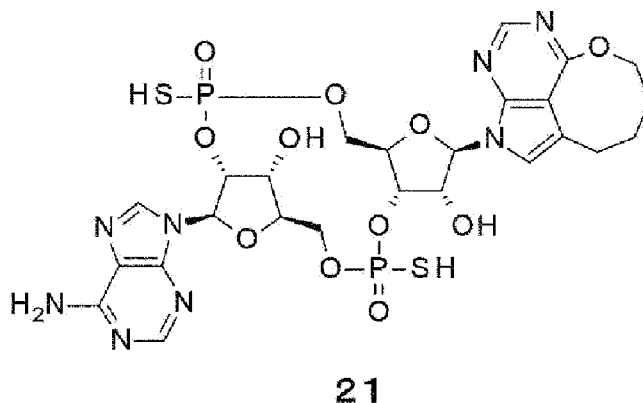
Concentración de anticuerpo: 1,11 mg/ml

Rendimiento del anticuerpo: 7,23 mg (69 %)

Número promedio de moléculas de fármaco conjugado: 3,9

Ejemplo 31: Síntesis de CDN21

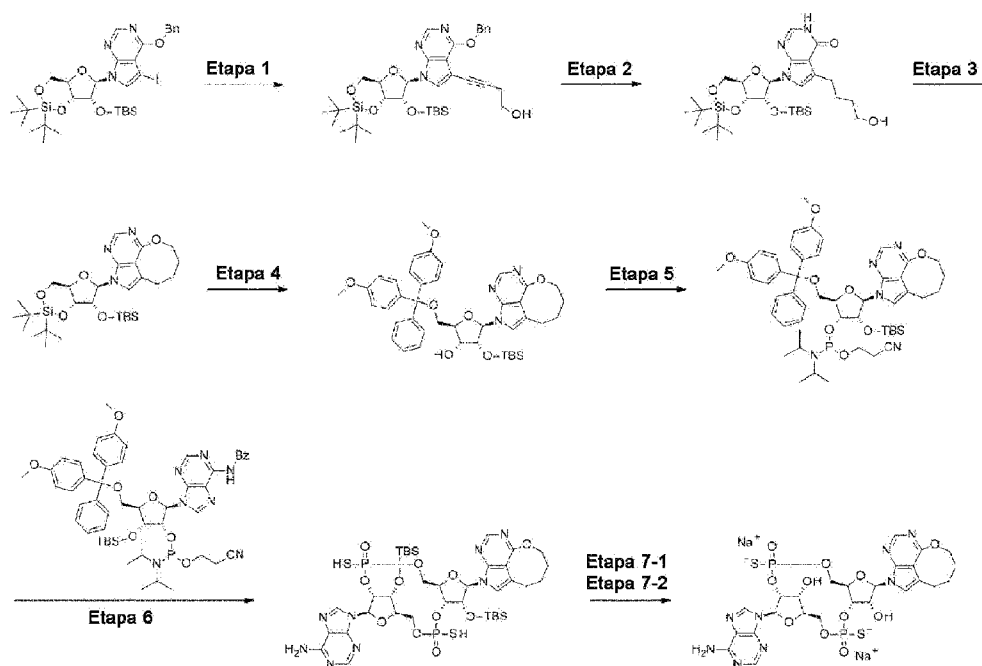
5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-7-(6-Amino-9H-purin-9-yl)-15,16-dihidroxi-2,10-bis(sulfanil)-14-(7,8,9,10-tetrahidro-2H-6-oxa-2,3,5-triazacicloocta[1,2,3-cd]inden-2-yl)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-diona



21a (Diastereómero 1)

21b (Diastereómero 2)

[Esquema de síntesis]



(Etapa 1)

4-(Benciloxi)-7-{2-O-[terc-butil(dimetil)silil]-3,5-O-(di-terc-butilsililiden)-β-D-ribofuranosil}-5-(4-hidroxibut-1-in-1-il)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina

- 5 Usando el compuesto obtenido en la etapa 2 del ejemplo 20 (3,37 g) y 3-butin-1-ol (1,72 ml), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 2 del ejemplo 1, excepto que la temperatura de reacción se fijó a la temperatura ambiente, para obtener el compuesto del título (2,74 g).

10 RMN de ^1H (CDCl_3) δ : 8,44 (1H, s), 7,58-7,53 (2H, m), 7,42-7,31 (3H, m), 7,16 (1H, s), 6,16 (1H, s), 5,61 (2H, dd, $J = 14,9, 12,5$ Hz), 4,47 (1H, dd, $J = 9,2, 4,9$ Hz), 4,42 (1H, d, $J = 4,7$ Hz), 4,26 (1H, dd, $J = 9,4, 4,7$ Hz), 4,17 (1H, td, $J = 9,9, 4,8$ Hz), 4,01 (1H, t, $J = 9,6$ Hz), 3,71-3,64 (2H, m), 2,65 (2H, t, $J = 6,1$ Hz), 1,87 (1H, t, $J = 6,5$ Hz), 1,08 (9H, s), 1,04 (9H, s), 0,91 (9H, s), 0,11 (3H, s), 0,10 (3H, s).

(Etapa 2)

7-{2-O-[Terc-butil(dimetil)silil]-3,5-O-(di-terc-butilsililiden)-β-D-ribofuranosil}-5-(4-hidroxibut-1-in-1-il)-3,7-dihidro-4H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-ona

- 15 Usando el compuesto obtenido en la etapa 1 (2,74 g), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 7 del ejemplo 19, excepto que el disolvente de reacción se cambió a un disolvente mixto de metanol (30 ml)-tetrahidrofurano (30 ml), para obtener el compuesto del título (2,21 g).

20 RMN de ^1H (CDCl_3) δ : 11,55 (1H, sa), 7,90 (1H, s), 6,63 (1H, s), 6,09 (1H, s), 4,47 (1H, dd, $J = 9,0, 5,1$ Hz), 4,38 (1H, dd, $J = 4,7$ Hz), 4,24 (1H, dd, $J = 9,4, 4,7$ Hz), 4,19-4,11 (1H, m), 4,01 (1H, t, $J = 9,8$ Hz), 3,82-3,74 (2H, m), 2,88 (1H, sa), 2,83-2,74 (2H, m), 1,85-1,75 (2H, m), 1,71-1,62 (2H, m), 1,09 (9H, s), 1,04 (9H, s), 0,90 (9H, s), 0,102 (3H, s), 0,099 (3H, s).

(Etapa 3)

2-{2-O-[Terc-butil(dimetil)silil]-3,5-O-(di-terc-butilsililiden)-β-D-ribofuranosil}-7,8,9,10-tetrahidro-2H-6-oxa-2,3,5-triazaciccloocta[1,2,3-cd]indeno

- 25 Usando el compuesto obtenido en la etapa 2 (1,89 g), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 5 del ejemplo 20 para obtener el compuesto del título (1,40 g). RMN de ^1H (CDCl_3) δ : 8,41 (1H, s), 6,84 (1H, s), 6,21 (1H, s), 4,54-4,43 (4H, m), 4,31 (1H, dd, $J = 9,6, 4,9$ Hz), 4,17 (1H, td, $J = 10,0, 5,1$ Hz), 4,00 (1H, dd, $J = 10,4, 9,2$ Hz), 2,87-2,73 (2H, m), 2,05-1,87 (4H, m), 1,10 (1H, m), 0,00 (1H, dd, $J = 10,4, 9,2$ Hz), 2,87-2,73 (2H, m), 2,05-1,87 (4H, m), 1,10 (9H, s), 1,05 (9H, s), 0,91 (9H, s), 0,12 (3H, s), 0,10 (3H, s).

- 30 (Etapa 4)

2-{5-O-[Bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-2-O-[terc-butil(dimetil)silil]-β-D-ribofuranosil]-7,8,9,10-tetrahidro-2H-6-oxa-2,3,5-triazacicloocta[1,2,3-cd]indeno

Usando el compuesto obtenido en la etapa 3 (1,61 g), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 5 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (1,95 g). RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 8,40 (1H, s), 7,49-7,43 (2H, m), 7,38-7,20 (8H, m), 6,86-6,78 (4H, m), 6,38 (1H, d, J = 5,5 Hz), 4,70 (1H, t, J = 5,3 Hz), 4,54-4,45 (2H, m), 4,38-4,31 (1H, m), 4,26-4,18 (1H, m), 3,79 (3H, s), 3,79 (3H, s), 3,53 (1H, dd, J = 10,6, 2,3 Hz), 3,37 (1H, dd, J = 10,6, 3,1 Hz), 2,81 (1H, d, J = 3,9 Hz), 2,56-2,45 (2H, m), 2,00-1,91 (2H, m), 1,86-1,76 (2H, m), 0,82 (9H, s), -0,04 (3H, s), -0,17 (3H, s).

(Etapa 5)

2-(5-O-[Bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-2-O-[terc-butil(dimetil)silil]-3-O-[(2-cianoetoxi)di(propan-2-il)amino]fosfanil)-β-D-ribofuranosil]-7,8,9,10-tetrahidro-2H-6-oxa-2,3,5-triazacicloocta[1,2,3-cd]indeno

Usando el compuesto obtenido en la etapa 4 (1,95 g), se realizaron procedimientos de la misma manera que en la etapa 4 del ejemplo 5 para obtener el compuesto del título (2,20 g) en forma de una mezcla de diastereómeros en el átomo de fósforo (proporción de diastereómeros = 6:4). RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 8,39 (0,4H, s), 8,37 (0,6H, s), 7,51-7,45 (2H, m), 7,40-7,20 (8H, m), 6,86-6,78 (4H, m), 6,37 (0,6H, d, J = 6,7 Hz), 6,32 (0,4H, d, J = 6,3 Hz), 4,83-4,78 (0,6H, m), 4,77-4,70 (0,4H, m), 4,56-4,44 (2H, m), 4,42-4,33 (1,4H, m), 4,29-4,24 (0,6H, m), 4,07-3,86 (1H, m), 3,82-3,75 (6H, m), 3,70-3,46 (4H, m), 3,32-3,24 (1H, m), 2,76-2,65 (1H, m), 2,63-2,49 (2H, m), 2,32 (1H, t, J = 6,7 Hz), 2,01-1,90 (2H, m), 1,87-1,74 (2H, m), 1,23-1,12 (8,4H, m), 1,03 (3,6H, d, J = 6,7 Hz), 0,74 (3,6H, s), 0,72 (5,4H, s), -0,04 (1,2H, s), -0,08 (1,8H, s), -0,21 (1,2H, s), -0,23 (1,8H, s).

(Etapa 6)

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-7-(6-Amino-9H-purin-9-il)-15,16-bis[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-2,10-bis(sulfanil)-14-(7,8,9,10-tetrahidro-2H-6-oxa-2,3,5-triazacicloocta[1,2,3-cd]inden-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-1][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfacilotetradecin-2,10-diona

Usando el compuesto obtenido en la etapa 5 (1,18 g), la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 7 del ejemplo 1 para proporcionar una solución en acetonitrilo de 2-{2-O-[terc-butil(dimetil)silil]-3-O-[hidroxio(oxo)-λ⁵-fosfanil]-β-D-ribofuranosil]-7,8,9,10-tetrahidro-2H-6-oxa-2,3,5-triazacicloocta[1,2,3-cd]indeno. Usando esta solución en acetonitrilo y N-benzoil-5'-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-3'-O-[terc-butil(dimetil)silil]-2'-O-[(2-cianoetoxi)di(propan-2-il)amino]fosfanil]adenosina (1,49 g) disponible en el mercado (Cool Pharm Ltd.), 49 g), la reacción se realizó de la misma manera que en las etapas 8, 9 y 10 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título en forma de una mezcla de diastereómeros en el átomo de fósforo. Esta mezcla se purificó por HPLC [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 25 %-60 % (0 min-35 min)] para obtener el diastereómero 1 (50 mg) y el diastereómero 2 (34 mg) del compuesto del título.

Diastereómero 1 (menos polar)

MS (ESI) m/z: 973 (M+H)⁺.

Diastereómero 2 (más polar)

MS (ESI) m/z: 973 (M+H)⁺.

(Etapa 7-1)

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-7-(6-Amino-9H-purin-9-il)-15,16-dihidroxi-2,10-dioxo-14-(7,8,9,10-tetrahidro-2H-6-oxa-2,3,5-triazacicloocta[1,2,3-cd]inden-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-1][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfacilotetradecin-2,10-bis(tiolato) disódico (Diastereómero 1)

Usando el compuesto obtenido en la etapa 6 (diastereómero 1) (50 mg), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 11 del ejemplo 1, y el producto resultante se purificó a continuación con un Sep-Pak (R) C18 [solución acuosa al 0,1 % de trietilamina/acetonitrilo = 5:1] para obtener una sal de trietilamina del compuesto del título.

La sal de trietilamina obtenida se sometió a intercambio de sales de la misma manera que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (33 mg).

MS (ESI) m/z: 745 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,73 (1H, s), 8,30 (1H, s), 8,17 (1H, s), 7,40 (1H, s), 6,39 (1H, d, J = 4,3 Hz), 6,34 (1H, d, J = 8,6 Hz), 5,40-5,36 (1H, m), 5,22-5,17 (1H, m), 4,87-4,84 (1H, m), 4,80 (1H, t, J = 4,5 Hz), 4,64-4,31 (6H, m), 4,11-4,03 (2H, m), 2,82 (1H, dd, J = 16,4, 8,6 Hz), 2,68 (1H, dd, J = 16,2, 8,8 Hz), 2,06-1,71 (4H, m). RMN de ³¹P (CD₃OD) δ: 58,1 (s), 54,2 (s).

(Etapa 7-2)

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-7-(6-Amino-9H-purin-9-yl)-15,16-dihidroxi-2,10-dioxo-14-(7,8,9,10-tetrahidro-2H-6-oxa-2,3,5-triazacicloocta[1,2,3-cd]inden-2-yl)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2 λ^5 ,10 λ^5 -furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidofosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) disódico

(Diastereómero 2)

- 5 Usando el compuesto obtenido en la etapa 6 (diastereómero 2) (34 mg), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 11 del ejemplo 1, y el producto resultante se purificó a continuación con un Sep-Pak (R) C18 [solución acuosa al 0,1 % de trietilamina/acetronitrilo = 5:1] para obtener una sal de trietilamina del compuesto del título.

La sal de trietilamina obtenida se sometió a intercambio de sales de la misma manera que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (21 mg).

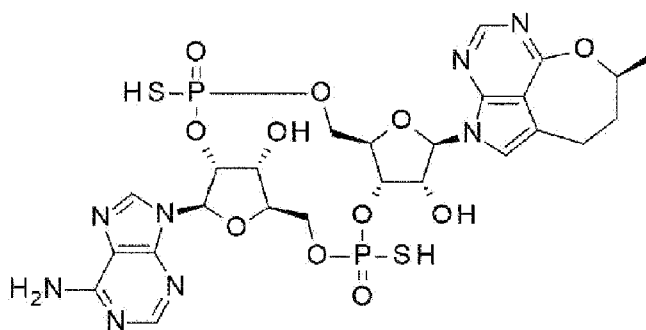
- 10 MS (ESI) m/z: 745 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CD₃OD) δ : 8,81 (1H, s), 8,30 (1H, s), 8,17 (1H, s), 7,40 (1H, s), 6,43 (1H, d, J = 6,7 Hz), 6,34 (1H, d, J = 8,6 Hz), 5,55-5,42 (2H, m), 4,87-4,84 (1H, m), 4,59-4,28 (7H, m), 4,06-3,99 (1H, m), 3,94-3,86 (1H, m), 2,96-2,81 (2H, m), 2,07-1,94 (2H, m), 1,93-1,80 (2H, m).

RMN de ³¹P (CD₃OD) δ : 63,1 (s), 60,5 (s).

- 15 Ejemplo 32: Síntesis de CDN22

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-7-(6-Amino-9H-purin-9-yl)-15,16-dihidroxi-14-[(7S)-7-metil-8,9-dihidro-6-oxa-2,3,5-triazabenzocd]azulen-2(7H)-il]-2,10-bis(sulfanil)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2 λ^5 ,10 λ^5 -furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidofosfaciclotetradecin-2,10-diona

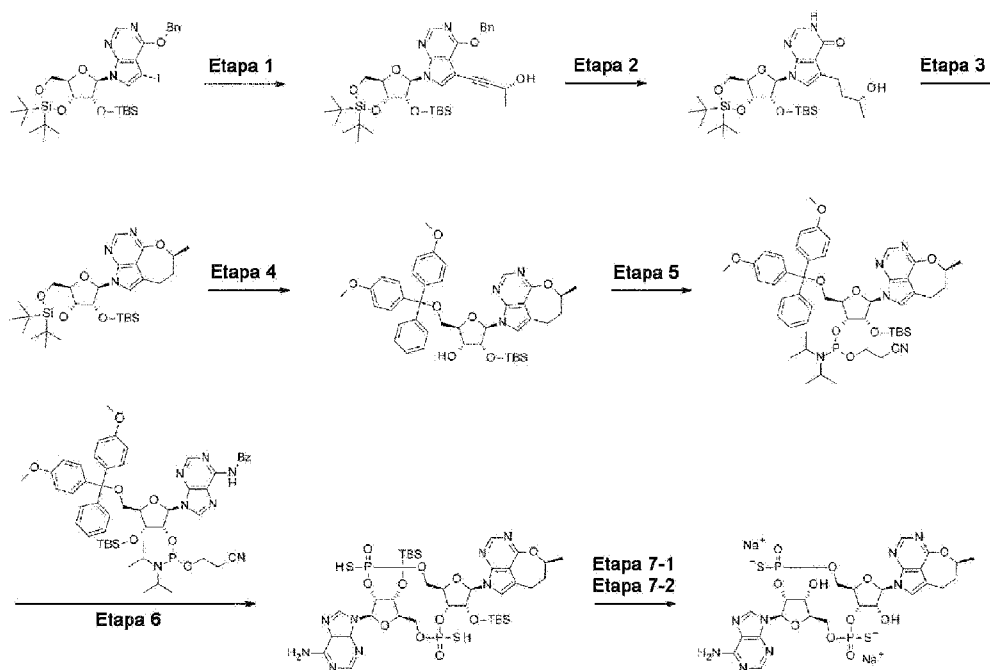


22

20

22a (Diastereómero 1)
22b (Diastereómero 2)

[Esquema de síntesis]



(Etapa 1)

4-(Benciloxi)-7-{2-O-[terc-butil(dimetil)silil]-3,5-O-(di-terc-butilsililiden)-β-D-ribofuranosil]-5-[(3R)-3-hidroxi-1-but-1-il]-7H-pirrol[2,3-d]pirimidina

- 5 Usando el compuesto obtenido en la etapa 2 del ejemplo 20 (2,54 g) y (R)-(+)-3-butin-2-ol (1,36 ml), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 2 del ejemplo 1, excepto que la temperatura de reacción se fijó a la temperatura ambiente, para obtener el compuesto del título (1,85 g).

10 RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 8,46 (1H, s), 7,57 (2H, d, J = 7,0 Hz), 7,44-7,32 (3H, m), 7,20 (1H, s), 6,16 (1H, s), 5,58 (1H, d, J = 12,9 Hz), 5,55 (1H, d, J = 13,7 Hz), 4,71-4,63 (1H, m), 4,48 (1H, dd, J = 9,2, 4,9 Hz), 4,42 (1H, d, J = 4,7 Hz), 4,26 (1H, dd, J = 9,4, 4,7 Hz), 4,23-4,14 (1H, m), 4,01 (1H, t, J = 9,6 Hz), 1,70 (1H, d, J = 5,5 Hz), 1,42 (3H, d, J = 6,7 Hz), 1,09 (9H, s), 1,04 (9H, s), 0,91 (9H, s), 0,12 (3H, s), 0,11 (3H, s).

(Etapa 2)

7-{2-O-[Terc-butil(dimetil)silil]-3,5-O-(di-terc-butilsililiden)-β-D-ribofuranosil]-5-[(3R)-3-hidroxi-1-but-1-il]-3,7-dihidro-4H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-ona

- 15 Usando el compuesto obtenido en la etapa 1 (1,85 g), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 7 del ejemplo 19, excepto que el disolvente de reacción se cambió a un disolvente mixto de metanol (15 ml)-tetrahidrofurano (15 ml), para obtener el compuesto del título (1,34 g).

20 RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 11,81 (1H, s), 7,89 (1H, s), 6,68 (1H, s), 6,12 (1H, s), 4,49 (1H, dd, J = 9,2, 4,5 Hz), 4,34 (1H, d, J = 4,3 Hz), 4,27-4,14 (3H, m), 4,03 (1H, t, J = 9,6 Hz), 3,77-3,65 (1H, m), 3,17-3,06 (1H, m), 2,85-2,74 (1H, m), 1,84-1,73 (1H, m), 1,71-1,61 (1H, m), 1,15 (3H, d, J = 6,3 Hz), 1,09 (9H, s), 1,04 (9H, s), 0,90 (9H, s), 0,10 (6H, s).

(Etapa 3)

(7S)-2-{2-O-[Terc-butil(dimetil)silil]-3,5-O-(di-terc-butilsililiden)-β-D-ribofuranosil]-7-metil-2,7,8,9-tetrahidro-6-oxa-2,3,5-triazabenzodiazepino

- 25 Usando el compuesto obtenido en la etapa 2 (1,34 g), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 5 del ejemplo 20 para obtener el compuesto del título (0,70 g). RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 8,43 (1H, s), 6,82 (1H, s), 6,19 (1H, s), 4,58-4,43 (3H, m), 4,33 (1H, dd, J = 9,6, 5,0 Hz), 4,17 (1H, td, J = 10,0, 5,0 Hz), 4,00 (1H, dd, J = 10,4, 9,2 Hz), 3,06-2,97 (1H, m), 2,89-2,79 (1H, m), 2,23-2,08 (2H, m), 1,60 (3H, d, J = 6,3 Hz), 1,10 (9H, s), 1,05 (9H, s), 0,91 (9H, s), 0,12 (3H, s), 0,11 (3H, s).

(Etapa 4)

- 30 (7S)-2-{5-O-[Bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-2-O-[terc-butil(dimetil)silil]-β-D-ribofuranosil]-7-metil-2,7,8,9-tetrahidro-6-oxa-2,3,5-triazabenzodiazepino

Usando el compuesto obtenido en la etapa 3 (0,70 g), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 5 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (0,82 g). RMN de ^1H (CDCl_3) δ : 8,41 (1H, s), 7,49-7,43 (2H, m), 7,37-7,20 (7H, m), 7,16 (1H, s), 6,85-6,78 (4H, m), 6,35 (1H, d, $J = 5,5$ Hz), 4,72 (1H, t, $J = 5,3$ Hz), 4,57-4,47 (1H, m), 4,36 (1H, dd, $J = 9,0, 3,9$ Hz), 4,22 (1H, q, $J = 3,1$ Hz), 3,79 (3H, s), 3,79 (3H, s), 3,52 (1H, dd, $J = 10,6, 2,7$ Hz), 3,37 (1H, dd, $J = 10,6, 3,1$ Hz), 2,81 (1H, d, $J = 3,9$ Hz), 2,78-2,58 (2H, m), 2,16-2,07 (2H, m), 1,59 (3H, d, $J = 6,7$ Hz), 0,83 (9H, s), -0,03 (3H, s), -0,15 (3H, s).

(Etapa 5)

(7S)-2-(5-O-[Bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-2-O-[terc-butil(dimetil)silil]-3-O-((2-cianoetoxi)[di(propan-2-il)amino]fosfanil)- β -D-ribofuranosil)-7-metil-2,7,8,9-tetrahidro-6-oxa-2,3,5-triazabenzocd]azuleno

- 10 Usando el compuesto obtenido en la etapa 4 (0,82 g), se realizaron procedimientos de la misma manera que en la etapa 4 del ejemplo 5 para obtener el compuesto del título (0,85 g) en forma de una mezcla de diastereómeros en el átomo de fósforo (proporción de diastereómeros = 6:4).

15 RMN de ^1H (CDCl_3) δ : 8,40 (0,4H, s), 8,38 (0,6H, s), 7,50-7,43 (2H, m), 7,39-7,16 (8H, m), 6,86-6,78 (4H, m), 6,34 (0,6H, d, $J = 6,7$ Hz), 6,30 (0,4H, d, $J = 5,9$ Hz), 4,86-4,80 (0,6H, m), 4,79-4,74 (0,4H, m), 4,55-4,46 (1H, m), 4,44-4,35 (1,4H, m), 4,29-4,24 (0,6H, m), 4,05-3,85 (1H, m), 3,82-3,75 (6H, m), 3,69-3,47 (4H, m), 3,31-3,24 (1H, m), 2,82-2,61 (3H, m), 2,31 (1H, t, $J = 6,7$ Hz), 2,17-2,07 (2H, m), 1,58-1,55 (3H, m), 1,22-1,13 (8,4H, m), 1,03 (3,6H, d, $J = 6,7$ Hz), 0,75 (3,6H, s), 0,74 (5,4H, s), -0,03 (1,2H, s), -0,07 (1,8H, s), -0,19 (1,2H, s), -0,21 (1,8H, s).

(Etapa 6)

- 20 (5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-7-(6-Amino-9H-purin-9-il)-15,16-bis[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-14-[(7S)-7-metil-8,9-dihidro-6-oxa-2,3,5-triazabenzocd]azulen-2(7H)-il]-2,10-bis(sulfanil)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2 λ^5 ,10 λ^5 -furo[3,2-1][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-diona

- 25 Usando el compuesto obtenido en la etapa 5 (0,85 g), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 7 del ejemplo 1 para proporcionar una solución en acetonitrilo de (7S)-2-[2-O-[terc-butil(dimetil)silil]-3-O-[hidroxio(oxo)- λ^5 -fosfanil]- β -D-ribofuranosil]-7-metil-2,7,8,9-tetrahidro-6-oxa-2,3,5-triazabenzocd]azuleno. Usando esta solución en acetonitrilo y N-benzoil-5'-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-3'-O-[terc-butil(dimetil)silil]-2'-O-((2-cianoetoxi)[di(propan-2-il)amino]fosfanil)adenosina (1,12 g) disponible en el mercado (Cool Pharm Ltd.), 12 g), la reacción se realizó de la misma manera que en las etapas 8, 9 y 10 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título en forma de una mezcla de diastereómeros en el átomo de fósforo. Esta mezcla se purificó por HPLC [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 25 %-60 % (0 min-35 min)] para producir el diastereómero 1 (95 mg) y el diastereómero 2 (44 mg) del compuesto del título (tiempo de retención en HPLC: diastereómero 1 > 2).

Diastereómero 1 (menos polar)

MS (ESI) m/z: 973 (M+H) $^+$.

Diastereómero 2 (más polar)

MS (ESI) m/z: 973 (M+H) $^+$.

- 35 (Etapa 7-1)

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-7-(6-Amino-9H-purin-9-il)-15,16-dihidroxi-14-[(7S)-7-metil-8,9-dihidro-6-oxa-2,3,5-triazabenzocd]azulen-2(7H)-il]-2,10-dioxooctahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2 λ^5 ,10 λ^5 -furo[3,2-1][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) disódico

(Diastereómero 1)

- 40 Usando el compuesto obtenido en la etapa 6 (diastereómero 1) (95 mg), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 11 del ejemplo 1, y el producto resultante se purificó a continuación con un Sep-Pak (R) C18 [solución acuosa al 0,1 % de trietilamina/acetonitrilo = 5:1] para obtener una sal de trietilamina del compuesto del título.

La sal de trietilamina obtenida se sometió a intercambio de sales de la misma manera que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (57 mg).

- 45 MS (ESI) m/z: 745 (M+H) $^+$.

RMN de ^1H (CD_3OD) δ : 8,72 (1H, s), 8,30 (1H, s), 8,17 (1H, s), 7,35 (1H, s), 6,37 (1H, d, $J = 4,3$ Hz), 6,34 (1H, d, $J = 8,2$ Hz), 5,40-5,35 (1H, m), 5,22-5,17 (1H, m), 4,85-4,81 (2H, m), 4,66-4,58 (1H, m), 4,53-4,40 (2H, m), 4,39-4,30 (2H, m), 4,12-4,01 (2H, m), 3,02-2,93 (1H, m), 2,80-2,68 (1H, m), 2,23-2,14 (1H, m), 2,12-2,00 (1H, m), 1,57 (3H, d, $J = 6,3$ Hz).

- 50 RMN de ^{31}P (CD_3OD) δ : 58,1 (s), 54,3 (s).

(Etapa 7-2)

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-7-(6-Amino-9H-purin-9-yl)-15,16-dihidroxi-14-[(7S)-7-metil-8,9-dihidro-6-oxa-2,3,5-triazabenz[cd]azulen-2(7H)-il]-2,10-dioxooctahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidofosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) disódico

5 (Diastereómero 2)

Usando el compuesto obtenido en la etapa 6 (diastereómero 2) (44 mg), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 11 del ejemplo 1, y el producto resultante se purificó después con un Sep-Pak (R) C18 [solución acuosa al 0,1 % de trietilamina/acetronitrilo = 5:1] para obtener una sal de trietilamina del compuesto del título.

10 La sal de trietilamina obtenida se sometió a intercambio de sales de la misma manera que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (30 mg).

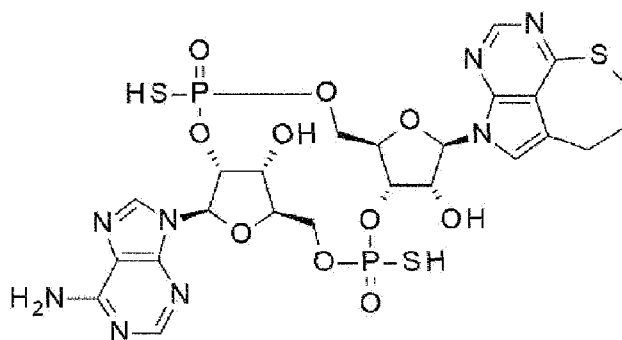
MS (ESI) m/z: 745 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,81 (1H, s), 8,30 (1H, s), 8,17 (1H, s), 7,36 (1H, s), 6,41 (1H, d, J = 6,7 Hz), 6,34 (1H, d, J = 8,6 Hz), 5,55-5,42 (2H, m), 4,87-4,84 (1H, m), 4,65-4,57 (1H, m), 4,55-4,28 (5H, m), 4,06-3,99 (1H, m), 3,93-3,86 (1H, m), 3,11-3,01 (1H, m), 2,95-2,83 (1H, m), 2,29-2,19 (1H, m), 2,16-2,03 (1H, m), 1,57 (3H, d, J = 6,3 Hz).

15 RMN de ³¹P (CD₃OD) δ: 63,7 (s), 61,2 (s).

Ejemplo 33: Síntesis de CDN23

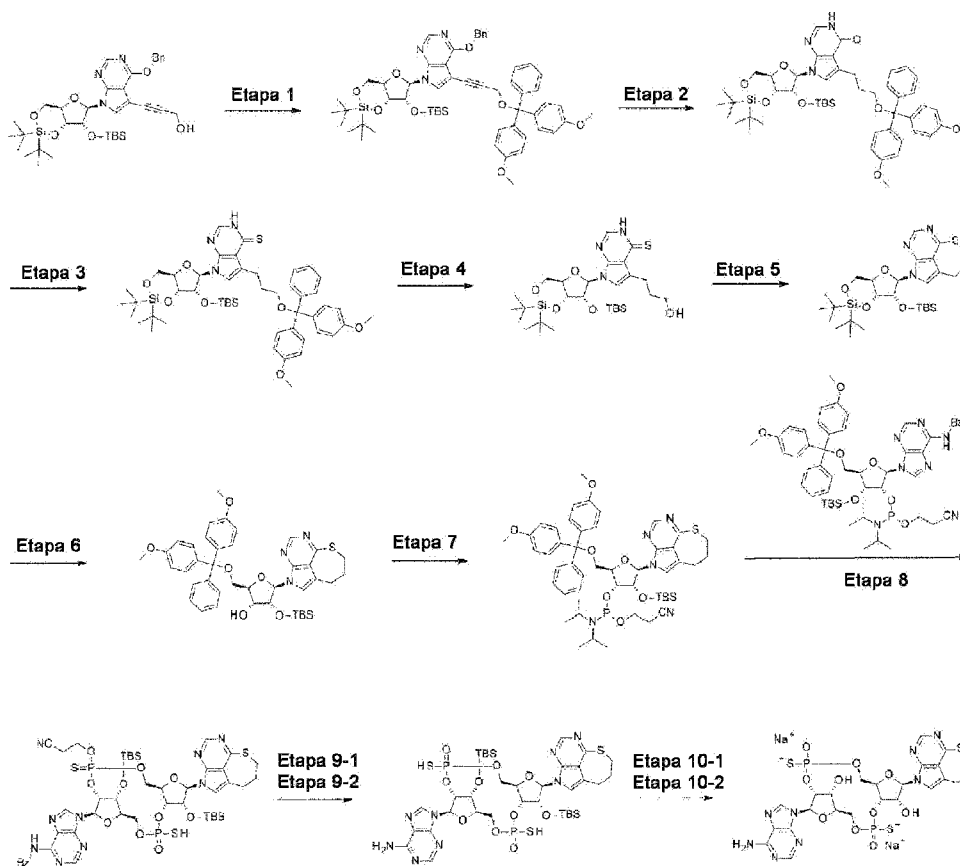
(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-7-(6-Amino-9H-purin-9-yl)-14-(8,9-dihidro-6-tia-2,3,5-triazabenz[cd]azulen-2(7H)-il)-15,16-dihidroxi-2,10-bis(sulfanil)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidofosfaciclotetradecin-2,10-diona



23

23a (Diastereómero 1)
23b (Diastereómero 2)

[Esquema de síntesis]



(Etapa 1)

4-(Benciloxi)-5-{3-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metoxi]prop-1-in-1-il}-7-{2-O-[terc-butil(dimetil)silil]-3,5-O-(di-terc-butilsililiden)-β-D-ribofuranosil]-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina

- 5 Usando el compuesto obtenido en la etapa 3 del ejemplo 20 (4,17 g), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 1 del ejemplo 11, excepto que el disolvente de reacción se cambió a un disolvente mixto de diclorometano (40 ml)-piridina (40 ml), para obtener el compuesto del título (5,70 g).

10 RMN de ^1H (CDCl_3) δ : 8,44 (1H, s), 7,53-7,47 (4H, m), 7,41-7,35 (4H, m), 7,33-7,11 (7H, m), 6,86-6,79 (4H, m), 6,17 (1H, s), 5,61 (1H, d, $J = 13,7$ Hz), 5,58 (1H, d, $J = 13,7$ Hz), 4,49 (1H, dd, $J = 9,0, 5,0$ Hz), 4,44 (1H, dd, $J = 4,8$ Hz), 4,29 (1H, dd, $J = 9,6, 5,0$ Hz), 4,23-4,15 (1H, m), 4,04 (1H, t, $J = 9,8$ Hz), 3,98 (2H, s), 3,78 (6H, s), 1,10 (9H, s), 1,05 (9H, s), 0,91 (9H, s), 0,12 (3H, s), 0,11 (3H, s).

(Etapa 2)

5-{3-[Bis(4-metoxifenil)(fenil)metoxi]propil}-7-{2-O-[terc-butil(dimetil)silil]-3,5-O-(di-terc-butilsililiden)-β-D-ribofuranosil]-3,7-dihidro-4H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-ona

- 15 A una disolución mixta del compuesto obtenido en la etapa 1 (5,70 g) en metanol (100 ml)-tetrahidrofurano (50 ml) se le añadieron formiato de amonio (3,71 g) y paladio al 10 %-carbono (AD) húmedo (2 g), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. Tras eliminar el catalizador por filtración, el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo] para obtener el compuesto del título (4,56 g).

20 RMN de ^1H (CDCl_3) δ : 11,61 (1H, sa), 7,75 (1H, s), 7,48-7,44 (2H, m), 7,37-7,14 (7H, m), 6,84-6,79 (4H, m), 6,57 (1H, s), 6,05 (1H, s), 4,45 (1H, dd, $J = 9,2, 4,9$ Hz), 4,35 (1H, d, $J = 5,1$ Hz), 4,23 (1H, dd, $J = 9,6, 4,9$ Hz), 4,16-4,10 (1H, m), 3,97 (1H, t, $J = 9,8$ Hz), 3,78 (6H, s), 3,19-3,08 (2H, m), 2,90 (2H, t, $J = 7,8$ Hz), 2,07-1,98 (2H, m), 1,09 (9H, s), 1,04 (9H, s), 0,89 (9H, s), 0,09 (3H, s), 0,08 (3H, s).

(Etapa 3)

- 25 5-{3-[Bis(4-metoxifenil)(fenil)metoxi]propil}-7-{2-O-[terc-butil(dimetil)silil]-3,5-O-(di-terc-butilsililiden)-β-D-ribofuranosil]-3,7-dihidro-4H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-tiona

A una disolución del compuesto obtenido en la etapa 2 (1,01 g) en diclorometano (10 ml) se le añadió piridina (0,461 ml), y se añadió gota a gota anhídrido trifluorometanosulfónico (0,385 ml) con refrigeración por hielo, y la mezcla de reacción se agitó durante 30 minutos. Se añadió a la mezcla de reacción una suspensión de monohidrogenosulfuro de sodio n-hidratado (2,54 g) en N,N-dimetilformamida (25 ml) a la misma temperatura, y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Se añadieron una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio y acetato de etilo a la mezcla de reacción, que se filtró a través de Celite y se sometió a extracción con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con salmuera y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El agente desecante se eliminó por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo] para obtener el compuesto del título (0,51 g).

- 10 RMN de ^1H (CDCl_3) δ : 10,83 (1H, s), 7,83 (1H, s), 7,50-7,44 (2H, m), 7,39-7,14 (7H, m), 6,87-6,79 (4H, m), 6,72 (1H, s), 6,07 (1H, s), 4,48-4,42 (1H, m), 4,31 (1H, d, $J = 4,3$ Hz), 4,21-4,09 (2H, m), 3,99-3,92 (1H, m), 3,79 (6H, s), 3,19-3,09 (4H, m), 2,09-3,09 (4H, m), 2,09-1,98 (2H, m), 1,08 (9H, s), 1,04 (9H, s), 0,90 (9H, s), 0,09 (3H, s), 0,09 (3H, s).

(Etapa 4)

- 15 7-{2-O-[Terc-butil(dimetil)silil]-3,5-O-(di-terc-butilsililiden)- β -D-ribofuranosil-5-(3-hidroxipropil)-3,7-dihidro-4H-pirrolol[2,3-d]pirimidin-4-tiona

A una disolución del compuesto obtenido en la etapa 3 (2,79 g) en diclorometano (80 ml) se le añadió agua destilada (4 ml), y se añadió gota a gota ácido dicloroacético (1,28 ml) con enfriamiento con hielo, y la mezcla de reacción se agitó durante 30 minutos. Se añadió piridina (2,50 ml) a la mezcla de reacción a la misma temperatura, y la mezcla de reacción se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo] para obtener el compuesto del título (0,96 g).

- 20 RMN de ^1H (CDCl_3) δ : 11,16 (1H, s), 7,89 (1H, s), 6,83 (1H, s), 6,11 (1H, s), 4,51-4,45 (1H, m), 4,36-4,29 (1H, m), 4,22-4,13 (2H, m), 4,06-3,97 (1H, m), 3,27-3,09 (2H, m), 2,25-2,13 (1H, m), 2,00-1,93 (2H, m), 1,08 (9H, s), 1,04 (9H, s), 0,90 (9H, s), 0,10 (6H, s).

(Etapa 5)

- 25 2-{2-O-[Terc-butil(dimetil)silil]-3,5-O-(di-terc-butilsililiden)- β -D-ribofuranosil]-2,7,8,9-tetrahidro-6-tia-2,3,5-triazabenz[cd]azuleno

Usando el compuesto obtenido en la etapa 4 (0,35 g), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 5 del ejemplo 20 para obtener el compuesto del título (0,25 g). RMN de ^1H (CDCl_3) δ : 8,53 (1H, s), 6,92 (1H, s), 6,21 (1H, s), 4,50-4,44 (2H, m), 4,30 (1H, dd, $J = 9,6, 4,9$ Hz), 4,17 (1H, td, $J = 10,0, 5,0$ Hz), 4,00 (1H, dd, $J = 10,4, 9,2$ Hz), 3,18-3,12 (2H, m), 3,06-3,00 (2H, m), 2,39-2,30 (2H, m), 1,09 (9H, s), 1,05 (9H, s), 0,91 (9H, s), 0,12 (3H, s), 0,11 (3H, s).

(Etapa 6)

2-{5-O-[Bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-2-O-[terc-butil(dimetil)silil]- β -D-ribofuranosil]-2,7,8,9-tetrahidro-6-tia-2,3,5-triazabenz[cd]azuleno

- 35 Usando el compuesto obtenido en la etapa 5 (0,41 g), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 5 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (0,46 g). RMN de ^1H (CDCl_3) δ : 8,52 (1H, s), 7,48-7,42 (2H, m), 7,37-7,20 (8H, m), 6,85-6,78 (4H, m), 6,36 (1H, d, $J = 5,1$ Hz), 4,70 (1H, t, $J = 5,1$ Hz), 4,37 (1H, dd, $J = 8,8, 4,1$ Hz), 4,23-4,19 (1H, m), 3,79 (3H, s), 3,79 (3H, s), 3,53 (1H, dd, $J = 10,6, 2,7$ Hz), 3,38 (1H, dd, $J = 10,6, 3,1$ Hz), 3,16-3,09 (2H, m), 2,78 (1H, d, $J = 4,1$ Hz), 2,76-2,70 (2H, m), 2,30-2,22 (2H, m), 0,83 (9H, s), -0,03 (3H, s), -0,14 (3H, s).

- 40 (Etapa 7)

2-(5-O-[Bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-2-O-[terc-butil(dimetil)silil]-3-O-[(2-cianoetoxi)[di(propan-2-il)amino]fosfanil]- β -D-ribofuranosil)-2,7,8,9-tetrahidro-6-tia-2,3,5-triazabenz[cd]azuleno

Usando el compuesto obtenido en la etapa 6 (0,46 g), se realizaron procedimientos de la misma manera que en la etapa 4 del ejemplo 5 para obtener el compuesto del título (0,48 g) en forma de una mezcla de diastereómeros en el átomo de fósforo (proporción de diastereómeros = 6:4).

- 50 RMN de ^1H (CDCl_3) δ : 8,51 (0,4H, s), 8,49 (0,6H, s), 7,50-7,43 (2H, m), 7,38-7,23 (8H, m), 6,86-6,78 (4H, m), 6,36 (0,6H, d, $J = 6,7$ Hz), 6,32 (0,4H, d, $J = 5,5$ Hz), 4,83-4,78 (0,6H, m), 4,76-4,71 (0,4H, m), 4,45-4,35 (1,4H, m), 4,29-4,24 (0,6H, m), 4,04-3,84 (1H, m), 3,82-3,75 (6H, m), 3,70-3,48 (4H, m), 3,32-3,25 (1H, m), 3,16-3,09 (2H, m), 2,84-2,73 (2H, m), 2,73-2,61 (1H, m), 2,36-2,20 (3H, m), 1,22-1,13 (8,4H, m), 1,03 (3,6H, d, $J = 7,0$ Hz), 0,76 (3,6H, s), 0,75 (5,4H, s), -0,03 (1,2H, s), -0,07 (1,8H, s), -0,18 (1,2H, s), -0,20 (1,8H, s).

(Etapa 8)

N-{9-[(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-15,16-Bis[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-10-(2-cianoetoxi)-14-(8,9-dihidro-6-tia-2,3,5-triazabenz[cd]azulen-2(7H)-il)-2-oxo-2-sulfanil-10-sulfanilidenoctahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-I][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-7-il]-9H-purin-6-il}benzamida

- 5 Usando el compuesto obtenido en la etapa 7 (0,48 g), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 7 del ejemplo 1 para proporcionar una solución en acetonitrilo de 2-{2-O-[terc-butil(dimetil)silil]-3-O-[hidroxi(oxo)-λ⁵-fosfanil]-β-D-ribofuranosil]-2,7,8,9-tetrahidro-6-tia-2,3,5-triazabenz[cd]azuleno. Usando esta solución en acetonitrilo y N-benzoil-5'-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-3'-O-[terc-butil(dimetil)silil]-2'-O-[(2-cianoetoxi)[di(propan-2-il)amino]fosfanil]adenosina (0,61 g) disponible en el mercado (Cool Pharm Ltd.).61 g), la reacción se realizó de la misma manera que en las etapas 8 y 9 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título en forma de una mezcla de diastereómeros en el átomo de fósforo. Esta mezcla se purificó por HPLC [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 40 %-90 % (0 min-35 min)] para obtener el diastereómero 1 (40 mg) y el diastereómero 2 (18 mg) del compuesto del título.

Diastereómero 1 (menos polar)

MS (ESI) m/z: 1132 (M+H)⁺.

- 15 Diastereómero 2 (más polar)

MS (ESI) m/z: 1132 (M+H)⁺.

(Etapas 9-1)

- 20 (5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-7-(6-Amino-9H-purin-9-il)-15,16-bis[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-14-(8,9-dihidro-6-tia-2,3,5-triazabenz[cd]azulen-2(7H)-il)-2,10-bis(sulfanil)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-I][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-diona

Usando el compuesto obtenido en la etapa 8 (diastereómero 1) (40 mg), la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 10 del ejemplo 1, y el producto resultante se purificó después por HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 30 %-60 % (0 min-35 min)] para obtener el compuesto del título (35 mg).

- 25 MS (ESI) m/z: 975 (M+H)⁺.

(Etapas 9-2)

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-7-(6-Amino-9H-purin-9-il)-15,16-bis[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-14-(8,9-dihidro-6-tia-2,3,5-triazabenz[cd]azulen-2(7H)-il)-2,10-bis(sulfanil)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-I][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-diona

- 30 Usando el compuesto obtenido en la etapa 8 (diastereómero 2) (18 mg), la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 10 del ejemplo 1, y el producto resultante se purificó después por HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 25 %-50 % (0 min-35 min)] para obtener el compuesto del título (15 mg).

MS (ESI) m/z: 975 (M+H)⁺.

- 35 (Etapas 10-1)

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-7-(6-Amino-9H-purin-9-il)-14-(8,9-dihidro-6-tia-2,3,5-triazabenz[cd]azulen-2(7H)-il)-15,16-dihidroxi-2,10-dioxooctahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-I][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) disódico

(Diastereómero 1)

- 40 Usando el compuesto obtenido en la etapa 9-1 (35 mg), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 11 del ejemplo 1, y el producto resultante se purificó con un Sep-Pak (R) C18 [solución acuosa al 0,1 % de trietilamina/acetonitrilo = 5:1] para proporcionar una sal de trietilamina del compuesto del título.

La sal de trietilamina obtenida se sometió a intercambio de sales de la misma manera que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (18 mg).

- 45 MS (ESI) m/z: 747 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,73 (1H, s), 8,41 (1H, s), 8,17 (1H, s), 7,48 (1H, s), 6,40 (1H, d, J = 4,3 Hz), 6,34 (1H, d, J = 8,6 Hz), 5,40-5,35 (1H, m), 5,23-5,17 (1H, m), 4,86-4,79 (2H, m), 4,54-4,41 (2H, m), 4,39-4,31 (2H, m), 4,12-4,01 (2H, m), 3,23-3,16 (2H, m), 3,05-2,86 (2H, m), 2,36-2,20 (2H, m).

RMN de ³¹P (CD₃OD) δ: 58,1 (s), 54,2 (s).

(Etapa 10-2)

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-7-(6-Amino-9H-purin-9-yl)-14-(8,9-dihidro-6-tia-2,3,5-triazabenz[cd]azulen-2(7H)-il)-15,16-dihidroxi-2,10-dioxooctahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidofosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) disódico

5 (Diastereómero 2)

Usando el compuesto obtenido en la etapa 9-2 (15 mg), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 11 del ejemplo 1, y el producto resultante se purificó con un Sep-Pak (R) C18 [solución acuosa al 0,1 % de trietilamina/acetonitrilo = 5:1] para proporcionar una sal de trietilamina el compuesto del título.

10 La sal de trietilamina obtenida se sometió a intercambio de sales de la misma manera que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (8,1 mg).

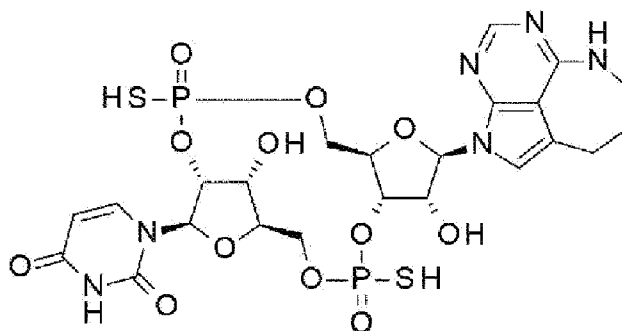
MS (ESI) m/z: 747 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,81 (1H, s), 8,41 (1H, s), 8,17 (1H, s), 7,49 (1H, s), 6,43 (1H, d, J = 6,7 Hz), 6,34 (1H, d, J = 8,2 Hz), 5,55-5,41 (2H, m), 4,87-4,82 (1H, m), 4,57-4,27 (5H, m), 4,07-3,99 (1H, m), 3,94-3,86 (1H, m), 3,24-3,16 (2H, m), 3,12-3,03 (2H, m), 2,39-2,25 (2H, m).

15 RMN de ³¹P (CD₃OD) δ: 63,0 (s), 60,5 (s).

Ejemplo 34: Síntesis de CDN24

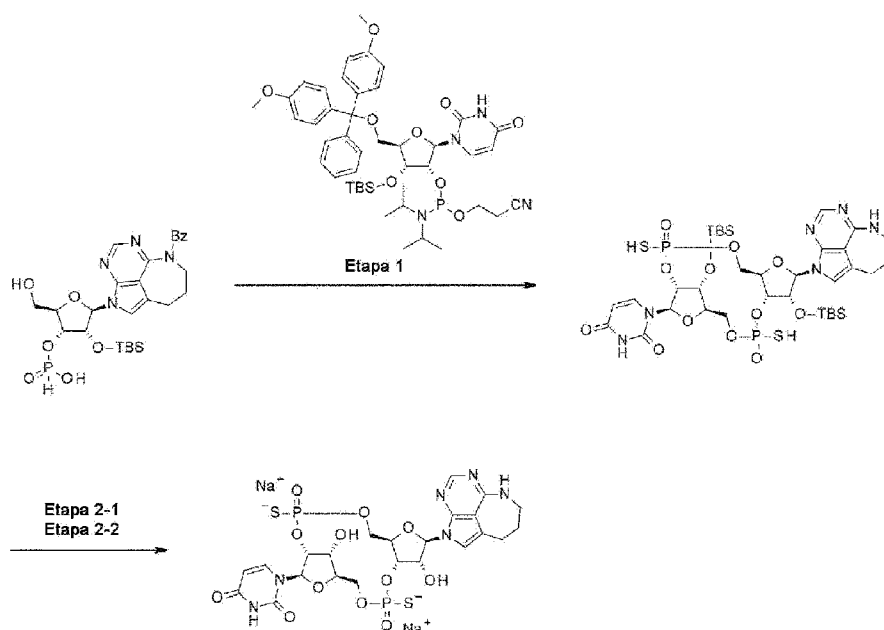
1-[(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-15,16-Dihidroxi-2,10-dioxo-2,10-bis(sulfanil)-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidofosfaciclotetradecin-7-il]pirimidin-2,4(1H,3H)-diona



24

24a (Diastereómero 1)
24b (Diastereómero 2)

[Esquema de síntesis]



(Etapa 1)

1-[(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-15,16-Bis[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-2,10-dioxo-2,10-bis(sulfanil)-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzoc[d]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-7-il]pirimidin-2,4(1H,3H)-diona

Se realizó la misma reacción que en la etapa 7 del ejemplo 1 con la siguiente escala (materia prima: 1,01 g). Usando una solución de acetonitrilo del compuesto obtenido y disponible en el mercado (Angene International Limited) 5'-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-3'-O-[terc-butil(dimetil)silil]-2'-O-[(2-cianoetoxi)[di(propan-2-il)amino]fosfanil]uridina (1,03 g), la reacción se realizó de la misma manera que en las etapas 8, 9 y 10 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título en forma de una mezcla de diastereómeros en el átomo de fósforo. Esta mezcla se purificó por HPLC [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 25 %-60 % (0 min-35 min)] para obtener el diastereómero 1 (50 mg) y el diastereómero 2 (23 mg) del compuesto del título.

Diastereómero 1 (menos polar)

MS (ESI) m/z: 935 (M+H)⁺.

Diastereómero 2 (más polar)

MS (ESI) m/z: 935 (M+H)⁺.

(Etapa 2-1)

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-7-(2,4-Dioxo-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-15,16-dihidroxi-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzoc[d]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) disódico

(Diastereómero 1)

Usando el compuesto obtenido en la etapa 1 (diastereómero 1) (50 mg), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 11 del ejemplo 1, y el producto resultante se purificó a continuación con un Sep-Pak (R) C18 [solución acuosa al 0,1 % de trietilamina/acetonitrilo = 5:1] para obtener una sal de trietilamina del compuesto del título.

La sal de trietilamina obtenida se sometió a intercambio de sales de la misma manera que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (30 mg).

MS (ESI) m/z: 707 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,09 (1H, d, J = 8,2 Hz), 8,03 (1H, s), 7,16 (1H, s), 6,32 (1H, d, J = 8,6 Hz), 6,28 (1H, d, J = 4,3 Hz), 5,82 (1H, d, J = 8,2 Hz), 5,08-5,01 (1H, m), 4,93-4,84 (1H, m), 4,73 (1H, t, J = 4,5 Hz), 4,68 (1H, d, J = 3,9 Hz), 4,48-4,38 (2H, m), 4,33-4,24 (1H, m), 4,23 (1H, d, J = 2,3 Hz), 4,09-3,99 (2H, m), 3,56-3,46 (2H, m), 2,96-2,83 (2H, m), 2,07-1,95 (2H, m).

RMN de ^{31}P (CD_3OD) δ : 58,3 (s), 54,6 (s).

(Etapa 2-2)

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-7-(2,4-Dioxo-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-15,16-dihidroxi-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2 λ^5 ,10 λ^5 -furo[3,2-I][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) disódico

(Diastereómero 2)

Usando el compuesto obtenido en la etapa 1 (diastereómero 2) (23 mg), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 11 del ejemplo 1, y el producto resultante se purificó a continuación con un Sep-Pak (R) C18 [solución acuosa al 0,1 % de trietilamina/acetronitrilo = 5:1] para obtener una sal de trietilamina del compuesto del título.

La sal de trietilamina obtenida se sometió a intercambio de sales de la misma manera que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (11 mg).

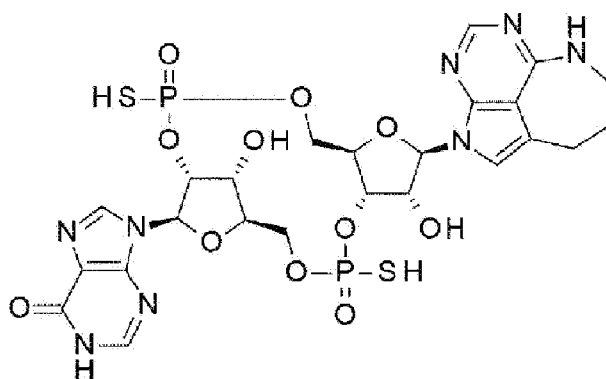
MS (ESI) m/z : 707 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

RMN de ^1H (CD_3OD) δ : 8,08 (1H, d, $J = 7,8$ Hz), 8,01 (1H, s), 7,16 (1H, s), 6,35 (1H, d, $J = 8,6$ Hz), 6,31 (1H, d, $J = 6,7$ Hz), 5,85 (1H, d, $J = 7,8$ Hz), 5,38-5,33 (1H, m), 5,04-4,96 (1H, m), 4,75 (1H, dd, $J = 6,5, 4,5$ Hz), 4,50-4,34 (3H, m), 4,33-4,26 (1H, m), 4,22-4,17 (1H, m), 4,04-3,97 (1H, m), 3,91-3,84 (1H, m), 3,53-3,46 (2H, m), 2,97-2,87 (2H, m), 2,05-1,95 (2H, m).

RMN de ^{31}P (CD_3OD) δ : 63,2 (s), 60,2 (s).

Ejemplo 35: Síntesis de CDN25

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-15,16-Dihidroxi-7-(6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il)-2,10-bis(sulfanil)-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2 λ^5 ,10 λ^5 -furo[3,2-I][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-diona

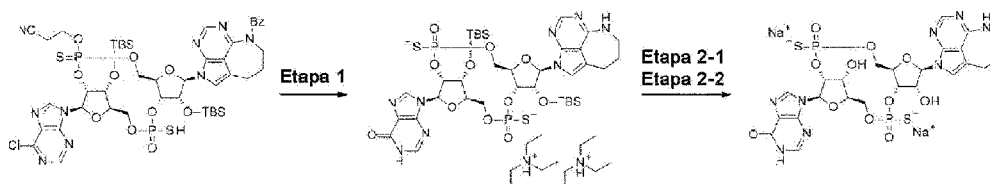


25

25a (Diastereómero 1)

25b (Diastereómero 2)

[Esquema de síntesis]



(Etapa 1)

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-15,16-Bis[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-2,10-dioxo-7-(6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il)-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2 λ^5 ,10 λ^5 -furo[3,2-I][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) de bis(N,N-dietiletanaminio)

- 5 A una disolución del compuesto (313 mg) obtenido en la etapa 4 del ejemplo 13 en tetrahidrofurano (5,0 ml) se le añadieron N-[(E)-(piridina-2-il)metiliden]hidroxilamina (337 mg) y N,N,N',N'-tetrametilguanidina (0,346 ml), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 día. Se añadieron metanol (5,0 ml) y amoníaco líquido al 28 % (5,0 ml) a la mezcla de reacción, que se agitó a 50 °C durante 5 horas. Tras concentrar la mezcla de reacción a presión reducida, el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo] para obtener el diastereómero 1 (106 mg; con impurezas) y el diastereómero 2 (105 mg; con impurezas) del compuesto del título.

Diastereómero 1 (menos polar)

MS (ESI) m/z: 959 (M+H)⁺.

- 10 Diastereómero 2 (más polar)

MS (ESI) m/z: 959 (M+H)⁺.

(Etapa 2-1)

- 15 (5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-15,16-Dihidroxi-2,10-dioxo-7-(6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il)-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidofosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) disódico (Diastereómero 1)

Usando el compuesto (diastereómero 1) (106 mg; con impurezas) obtenido en la etapa 1 anterior, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 11 del ejemplo 1, y la purificación se llevó a cabo según las siguientes condiciones de purificación para obtener el compuesto del título en forma de una sal de trietilamina.

- 20 [Condiciones de purificación] Cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo] y HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/solución de acetonitrilo-metanol (1:1), solución de acetonitrilo-metanol (1:1): del 7 %-50 % (0 min-40 min)].

La sal de trietilamina obtenida se sometió a intercambio de sales de la misma manera que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (43,4 mg).

MS (ESI) m/z: 731 (M+H)⁺.

- 25 RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,66 (1H, s), 8,02 (2H, s), 7,09 (1H, s), 6,30 (1H, d, J = 6,8 Hz), 6,28 (1H, d, J = 4,8 Hz), 5,45-5,38 (1H, m), 5,20-5,13 (1H, m), 4,82 (1H, d, J = 4,2 Hz), 4,77 (1H, t, J = 4,5 Hz), 4,52-4,41 (2H, m), 4,36-4,27 (2H, m), 4,08-3,97 (2H, m), 3,53-3,46 (2H, m), 2,88-2,80 (2H, m), 2,04-1,95 (2H, m).

RMN de ³¹P (CD₃OD) δ: 57,7 (s), 54,6 (s).

(Etapa 2-2)

- 30 (5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-15,16-Dihidroxi-2,10-dioxo-7-(6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il)-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidofosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) disódico

(Diastereómero 2)

- 35 Usando el compuesto (diastereómero 2) (105 mg; con impurezas) obtenido en la etapa 1 anterior, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 11 del ejemplo 1, y la purificación se llevó a cabo según las siguientes condiciones de purificación para obtener el compuesto del título en forma de una sal de trietilamina.

[Condiciones de purificación] Cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo] y HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/solución de acetonitrilo-metanol (1:1), solución de acetonitrilo-metanol (1:1): del 7 %-45 % (0 min-40 min)].

- 40 La sal de trietilamina obtenida se sometió a intercambio de sales de la misma manera que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (21,5 mg).

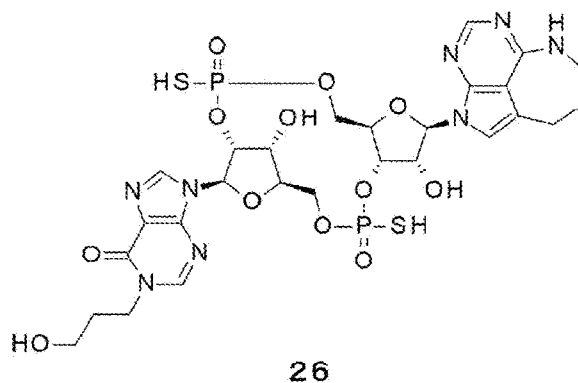
MS (ESI) m/z: 731 (M+H)⁺.

- 45 RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,72 (1H, s), 8,03 (1H, s), 8,02 (1H, s), 7,11 (1H, s), 6,32 (1H, dd, J = 6,0 Hz), 6,30 (1H, d, J = 8,0 Hz), 5,49-5,40 (2H, m), 4,77 (1H, dd, J = 6,7, 4,2 Hz), 4,49 (1H, dd, J = 4,5 Hz), 4,47-4,29 (4H, m), 4,07-4,01 (1H, m), 3,93-3,86 (1H, m), 3,52-3,47 (2H, m), 2,90 (2H, t, J = 5,4 Hz), 2,05-1,97 (2H, m).

RMN de ³¹P (CD₃OD) δ: 62,9 (s), 60,0 (s)

Ejemplo 36: Síntesis de CDN26

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-15,16-Dihidroxi-7-[1-(3-hidroxipropil)-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il]-2,10-bis(sulfanil)-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzo[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciotetradecin-2,10-diona

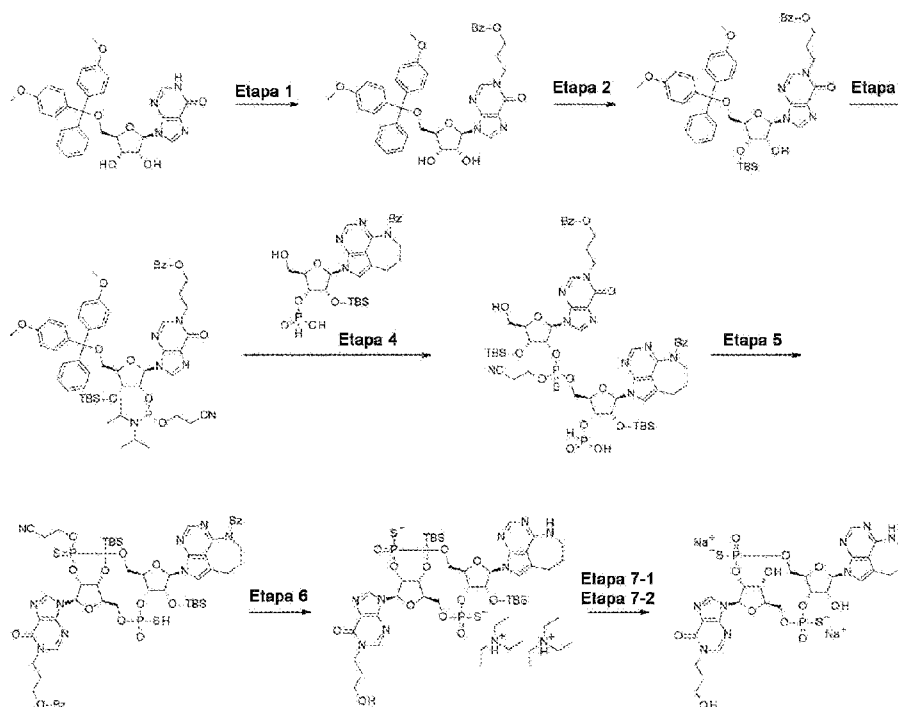


5

26a (Diastereómero 1)

26b (Diastereómero 2)

[Esquema de síntesis]



10 (Etapa 1)

1-[3-(Benzoiloxi)propil]-5'-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]inosina

A una disolución de 3-bromopropan-1-ol (1,14 ml) en tetrahidrofurano (25 ml) se le añadieron trietilamina (1,83 ml) y cloruro de benzoilo (1,43 ml), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 6 horas. La mezcla de reacción se filtró, se lavó con tetrahidrofurano y el filtrado se concentró a presión reducida. A una solución del residuo en N,N-dimetilacetamida deshidratada (25 ml) se le añadieron 5'-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]inosina (5,0 g) disponible en el mercado (Aamdís Chemical) y 1,8-diazabicyclo[5.4.0]-7-undeceno (2,75 ml), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 días. Se añadió agua a la mezcla de reacción, que se sometió a extracción con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con salmuera y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El agente desecante se eliminó por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo/metanol] para obtener el compuesto del título (4,41 g).

MS (ESI) m/z: 733 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 8,00-7,98 (1H, m), 7,98-7,96 (1H, m), 7,97 (1H, s), 7,96 (1H, s), 7,58-7,52 (1H, m), 7,46-7,39 (2H, m), 7,35-7,30 (2H, m), 7,26-7,16 (7H, m), 6,81-6,75 (4H, m), 5,87 (1H, d, J = 6,0 Hz), 4,85 (1H, d, J = 3,6 Hz), 4,67-4,62 (1H, m), 4,43-4,34 (3H, m), 4,30-4,16 (2H, m), 3,78-3,75 (1H, m), 3,77 (6H, s), 3,42 (1H, dd, J = 10,3, 3,6 Hz), 3,33 (1H, dd, J = 10,3, 3,6 Hz), 3,02 (1H, dd, J = 2,4 Hz), 2,32 (2H, dd, J = 11,8, 5,7 Hz).

(Etapa 2)

1-[3-(Benzoiloxi)propil]-5'-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-3'-O-[terc-butil(dimetil)silil]inosina

Usando el compuesto (4,41 g) obtenido en la etapa 1 anterior, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 3 del ejemplo 5 para obtener el compuesto del título (1,60 g) y 1-[3-(benzoiloxi)propil]-5'-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-2'-O-[terc-butil(dimetil)silil]inosina (1,70 g) en forma de un regioisómero del compuesto del título.

MS (ESI) m/z: 847 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 8,01 (1H, d, J = 1,2 Hz), 8,00 (1H, s), 7,99 (1H, d, J = 1,2 Hz), 7,93 (1H, s), 7,60-7,52 (1H, m), 7,46-7,38 (4H, m), 7,33-7,16 (7H, m), 6,83-6,77 (4H, m), 5,90 (1H, d, J = 4,8 Hz), 4,58-4,52 (1H, m), 4,50-4,46 (1H, m), 4,39 (2H, t, J = 6,0 Hz), 4,28-4,12 (3H, m), 3,78 (3H, s), 3,77 (3H, s), 3,46 (1H, dd, J = 10,6, 3,9 Hz), 3,26 (1H, dd, J = 10,6, 3,9 Hz), 2,99 (1H, dd, J = 6,7 Hz), 2,30 (2H, dd, J = 13,3, 6,0 Hz), 0,88 (9H, s), 0,07 (3H, s), 0,00 (3H, s).

Regioisómero (forma 2'-O-TBS)

MS (ESI) m/z: 847 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 8,01 (1H, d, J = 1,8 Hz), 7,99 (1H, d, J = 1,8 Hz), 7,98 (1H, s), 7,87 (1H, s), 7,59-7,54 (1H, m), 7,47-7,40 (4H, m), 7,36-7,17 (7H, m), 6,84-6,78 (4H, m), 5,94 (1H, d, J = 5,4 Hz), 4,84 (1H, t, J = 5,4 Hz), 4,41-4,35 (2H, m), 4,33-4,28 (1H, m), 4,28-4,19 (3H, m), 3,78 (3H, s), 3,78 (3H, s), 3,48 (1H, dd, J = 10,9, 3,0 Hz), 3,37 (1H, dd, J = 10,9, 3,0 Hz), 2,68 (1H, d, J = 3,6 Hz), 2,34-2,26 (2H, m), 0,84 (9H, s), 0,01 (3H, s), -0,13 (3H, s).

(Etapa 3)

1-[3-(Benzoiloxi)propil]-5'-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-3'-O-[terc-butil(dimetil)silil]-2'-O-[(2-cianoetoxi)[di(propan-2-il)amino]fosfanil]inosina

Usando el compuesto (1,60 g) obtenido en la etapa 2 anterior, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 4 del ejemplo 5 para obtener el compuesto del título (1,91 g) en forma de una mezcla de diastereómeros en el átomo de fósforo (proporción de diastereómeros = 67:33).

MS (ESI) m/z: 1047 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 8,04-8,00 (0,33H, m), 8,03 (1H, s), 8,02 (1H, s), 7,91 (0,67H, d, J = 14,5 Hz), 7,60-7,53 (1H, m), 7,49-7,40 (4H, m), 7,35-7,17 (7H, m), 6,84-6,78 (4H, m), 6,14 (0,67H, d, J = 5,1 Hz), 6,06 (0,33H, d, J = 6,0 Hz), 4,86-4,78 (0,33H, m), 4,68-4,61 (0,67H, m), 4,44-4,35 (2H, m), 4,29-4,09 (4H, m), 3,78 (6H, s), 3,65-3,42 (6,33H, m), 3,34-3,24 (0,67H, m), 2,76 (1,34H, t, J = 6,6 Hz), 2,50 (0,66H, t, J = 6,6 Hz), 2,38 (1,34H, t, J = 6,6 Hz), 2,30 (0,66H, t, J = 6,6 Hz), 1,30-1,24 (6H, m), 1,15-1,07 (4,02H, m), 0,95 (1,98H, d, J = 6,6 Hz), 0,84 (9H, s), 0,09 (0,99H, s), 0,05 (2,01H, s), 0,00 (3H, s).

(Etapa 4)

Se llevó a cabo la misma reacción que en la etapa 7 del ejemplo 1 en la siguiente escala (materia prima: 981 mg). Utilizando una solución de acetonitrilo del compuesto obtenido y el compuesto (1,03 g) obtenido en la etapa 3 anterior, se llevó a cabo la reacción de la misma manera que en la etapa 8 del ejemplo 1, y el producto bruto resultante se utilizó directamente para la reacción posterior.

(Etapa 5)

Benzoato de 3-{9-[(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-14-(6-benzoil-6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzoc[d]azulen-2-il)-15,16-bis[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-10-(2-cianoetoxi)-2-oxo-2-sulfanil-10-sulfanilidenoctahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxadifosfaciotetradecin-7-il]-6-oxo-6,9-dihidro-1H-purin-1-il}propilo

Usando el producto bruto obtenido en la etapa 4 anterior, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 9 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (774 mg) en forma de una mezcla de diastereómeros en el átomo de fósforo.

MS (ESI) m/z: 1278 (M+H)⁺.

(Etapa 6)

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-15,16-Bis[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-7-[1-(3-hidroxiopropil)-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il]-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) de bis(N,N-dietiletanaminio)

- 5 Usando el compuesto (774 mg) obtenido en la etapa 5 anterior, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 10 del ejemplo 1, y el producto resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa al 0,2 % de trietilamina/acetonitrilo] para obtener el diastereómero 1 (101 mg: con impurezas) y el diastereómero 2 (90,8 mg: con impurezas) del compuesto del título.

Diastereómero 1 (menos polar)

- 10 MS (ESI) m/z: 1017 (M+H)⁺.

Diastereómero 2 (más polar)

MS (ESI) m/z: 1017 (M+H)⁺.

(Etapa 7-1)

- 15 (5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-15,16-Dihidroxi-7-[1-(3-hidroxiopropil)-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il]-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) disódico

(Diastereómero 1)

- 20 Usando el compuesto (diastereómero 1) (101 mg: con impurezas) obtenido en la etapa 6 anterior, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 11 del ejemplo 1, y la purificación se llevó a cabo según las siguientes condiciones de purificación para obtener el compuesto del título en forma de una sal de trietilamina.

[Condiciones de purificación] Cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo].

La sal de trietilamina obtenida se sometió a intercambio de sales de la misma manera que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (48,8 mg).

- 25 MS (ESI) m/z: 789 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,65 (1H, s), 8,28 (1H, s), 8,03 (1H, s), 7,09 (1H, s), 6,28 (1H, s), 6,27 (1H, d, J = 4,8 Hz), 5,46-5,38 (1H, m), 5,21-5,13 (1H, m), 4,83-4,80 (1H, m), 4,79-4,75 (1H, m), 4,52-4,39 (2H, m), 4,36-4,28 (2H, m), 4,26-4,17 (1H, m), 4,17-4,08 (1H, m), 4,08-3,97 (2H, m), 3,59 (2H, t, J = 5,7 Hz), 3,49 (2H, t, J = 4,8 Hz), 2,91-2,74 (2H, m), 2,02-1,92 (4H, m).

- 30 RMN de ³¹P (CD₃OD) δ: 57,6 (s), 54,6 (s).

(Etapa 7-2)

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-15,16-Dihidroxi-7-[1-(3-hidroxiopropil)-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il]-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) disódico

- 35 (Diastereómero 2)

Usando el compuesto (diastereómero 2) (90,8 mg: con impurezas) obtenido en la etapa 6 anterior, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 11 del ejemplo 1, y la purificación se llevó a cabo según las siguientes condiciones de purificación para obtener el compuesto del título en forma de una sal de trietilamina.

- 40 [Condiciones de purificación] Cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo] y HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 3 %-20 % (0 min-40 min)].

La sal de trietilamina obtenida se sometió a intercambio de sales de la misma manera que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (22,3 mg).

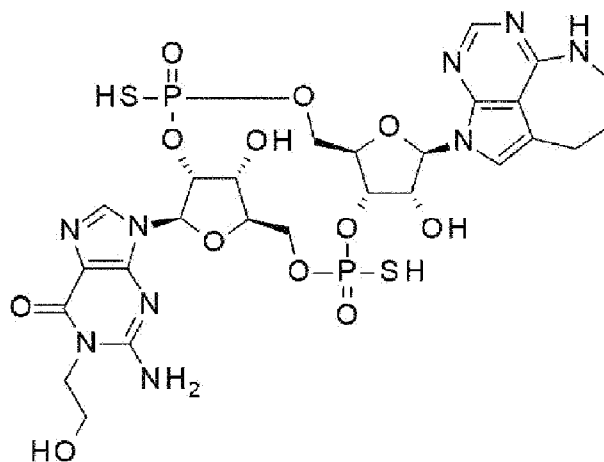
MS (ESI) m/z: 789 (M+H)⁺.

- 45 RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,71 (1H, s), 8,29 (1H, s), 8,02 (1H, s), 7,11 (1H, s), 6,32 (1H, d, J = 6,7 Hz), 6,28 (1H, d, J = 8,5 Hz), 5,48-5,38 (2H, m), 4,80-4,74 (1H, m), 4,51-4,47 (1H, m), 4,47-4,28 (4H, m), 4,27-4,14 (2H, m), 4,07-4,01 (1H, m), 3,92-3,86 (1H, m), 3,60 (2H, t, J = 6,0 Hz), 3,53-3,47 (2H, m), 2,93-2,87 (2H, m), 2,06-1,94 (4H, m).

RMN de ³¹P (CD₃OD) δ: 62,8 (s), 59,9 (s).

Ejemplo 37: Síntesis de CDN27

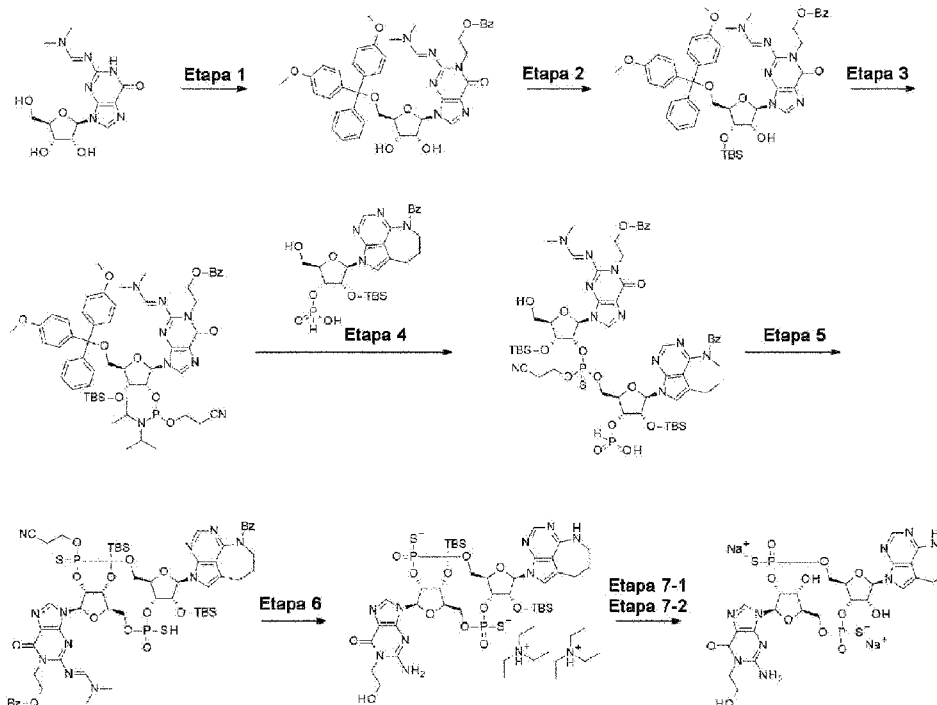
(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-7-[2-Amino-1-(2-hidroxietil)-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il]-15,16-dihidroxi-2,10-bis(sulfanil)-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-diona

**27**

27a (Diastereómero 1)

27b (Diastereómero 2)

[Esquema de síntesis]



(Etapa 1)

1-[2-(Benzoiloxi)etil]-5'-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-N-[(dimetilamino)metiliden]guanosina

A una solución mixta de N-[(dimetilamino)metiliden]guanosina (10,0 g) como compuesto conocido en la bibliografía (Journal of Organic Chemistry, 1994, 59, 7243-7248) en N,N-dimetilacetamida (50 ml)-piridina (50 ml) se le añadió cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (10,5 g) a 0 °C, y la mezcla de reacción se agitó a 4 °C durante 16 horas. A la mezcla de

reacción se añadieron benzoato de 2-bromoetilo (6,54 ml) y 1,8-diazabicyclo[5.4.0]-7-undeceno (11,0 ml), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 días. Se añadieron una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio y agua a la mezcla de reacción, que se sometió a extracción con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con salmuera y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El agente desecante se eliminó por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo/metanol] para obtener el compuesto del título en forma de una mezcla con óxido de trifenilfosfina (16,7 g).

MS (ESI) m/z: 789 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 8,17 (1H, s), 7,93-7,89 (2H, m), 7,55 (1H, s), 7,54-7,48 (1H, m), 7,42-7,36 (4H, m), 7,31-7,26 (4H, m), 7,25-7,19 (2H, m), 7,16-7,11 (1H, m), 6,82-6,76 (4H, m), 5,96 (1H, d, J = 6,7 Hz), 4,79-4,70 (1H, m), 4,70-4,61 (2H, m), 4,60-4,52 (1H, m), 4,52-4,45 (1H, m), 4,41-4,38 (1H, m), 4,34-4,30 (1H, m), 3,75 (3H, s), 3,75 (3H, s), 3,39-3,36 (2H, m), 2,89 (3H, s), 2,80 (3H, s).

(Etapa 2)

1-[2-(Benzoiloxi)etil]-5'-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-3'-O-[terc-butil(dimetil)silil]-N-[(dimetilamino)metiliden]guanosina

Usando el compuesto (15,7 g) obtenido en la etapa 1 anterior, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 3 del ejemplo 5 para obtener el compuesto del título (4,82 g) y 1-[2-(benzoiloxi)etil]-5'-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-2'-O-[terc-butil(dimetil)silil]-N-[(dimetilamino)metiliden]guanosina (6,01 g) en forma de un regioisómero del compuesto del título.

MS (ESI) m/z: 903 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 8,24 (1H, s), 7,99-7,95 (2H, m), 7,85 (1H, s), 7,56-7,50 (1H, m), 7,44-7,38 (4H, m), 7,34-7,27 (6H, m), 7,24-7,18 (1H, m), 6,84-6,79 (4H, m), 5,98 (1H, d, J = 4,2 Hz), 4,87-4,77 (2H, m), 4,72-4,61 (2H, m), 4,41-4,36 (2H, m), 4,16-4,09 (1H, m), 3,78 (3H, s), 3,78 (3H, s), 3,45 (1H, dd, J = 10,6, 3,9 Hz), 3,25 (1H, dd, J = 10,6, 3,9 Hz), 3,05 (1H, dd, J = 5,4 Hz), 2,91 (3H, s), 2,78 (3H, s), 0,86 (9H, s), 0,05 (3H, s), -0,04 (3H, s).

Regioisómero (forma 2'-O-TBS)

MS (ESI) m/z: 903 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 8,23 (1H, s), 7,97-7,91 (2H, m), 7,82 (1H, s), 7,56-7,50 (1H, m), 7,45-7,36 (4H, m), 7,35-7,26 (6H, m), 7,25-7,19 (1H, m), 6,85-6,79 (4H, m), 5,98 (1H, d, J = 5,4 Hz), 4,88-4,77 (2H, m), 4,73-4,62 (3H, m), 4,32-4,27 (1H, m), 4,23-4,19 (1H, m), 3,79 (3H, s), 3,79 (3H, s), 3,47 (1H, dd, J = 10,9, 3,6 Hz), 3,37 (1H, dd, J = 10,9, 3,6 Hz), 2,90 (3H, s), 2,76 (1H, d, J = 2,5 Hz), 2,75 (3H, s), 0,84 (9H, s), 0,02 (3H, s), -0,15 (3H, s).

(Etapa 3)

1-[2-(Benzoiloxi)etil]-5'-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-3'-O-[terc-butil(dimetil)silil]-2'-O-[(2-cianoetoxi)di(propan-2-il)amino]fosfanil]-N-[(dimetilamino)metiliden]guanosina

Usando el compuesto (4,81 g) obtenido en la etapa 2 anterior, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 4 del ejemplo 5 para obtener el compuesto del título (5,41 g) en forma de una mezcla de diastereómeros en el átomo de fósforo (proporción de diastereómeros = 7:3).

MS (ESI) m/z: 1103 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 8,33 (0,7H, s), 8,31 (0,3H, s), 7,98-7,94 (2H, m), 7,87 (0,3H, s), 7,80 (0,7H, s), 7,56-7,50 (1H, m), 7,46-7,37 (4H, m), 7,35-7,27 (6H, m), 7,24-7,18 (1H, m), 6,85-6,80 (4H, m), 6,14 (0,7H, d, J = 6,0 Hz), 6,13 (0,3H, d, J = 5,4 Hz), 4,92-4,59 (4H, m), 4,55-4,48 (0,7H, m), 4,33-4,29 (0,3H, m), 4,25-4,21 (0,6H, m), 4,17-4,13 (1,4H, m), 3,79 (3H, s), 3,79 (3H, s), 3,60-3,38 (5H, m), 3,33-3,23 (1H, m), 2,93 (2,1H, s), 2,92 (0,9H, s), 2,82 (2,1H, s), 2,81 (0,9H, s), 2,47-2,42 (0,6H, m), 2,34-2,27 (1,4H, m), 1,09 (4,2H, d, J = 6,7 Hz), 1,07 (1,8H, d, J = 7,3 Hz), 1,05 (4,2H, d, J = 6,7 Hz), 0,91 (1,8H, d, J = 7,3 Hz), 0,84 (9H, s), 0,07 (0,9H, s), 0,04 (2,1H, s), -0,02 (3H, s).

(Etapa 4)

Se llevó a cabo la misma reacción que en la etapa 7 del ejemplo 1 en la siguiente escala (materia prima: 1,68 g). Utilizando una solución de acetonitrilo del compuesto obtenido y el compuesto (1,81 g) obtenido en la etapa 3 anterior, se llevó a cabo la reacción de la misma manera que en la etapa 8 del ejemplo 1, y el producto bruto resultante se utilizó directamente para la reacción posterior.

(Etapa 5)

Benzoato de 2-(9-[(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-14-(6-benzoil-6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)-15,16-bis[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-10-(2-cianoetoxi)-2-oxo-2-sulfanil-10-

sulfanilidenoctahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-7-il]-2-[(E)-[(dimetilamino)metiliden]amino]-6-oxo-6,9-dihidro-1H-purin-1-il)etilo

- 5 Usando el producto bruto obtenido en la etapa 4 anterior, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 9 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (1,15 g) en forma de una mezcla de diastereómeros en el átomo de fósforo.

MS (ESI) m/z: 1334 (M+H)⁺.

(Etapa 6)

- 10 (5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-7-[2-Amino-1-(2-hidroxietil)-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il]-15,16-bis[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) de bis(N,N-dietiletanaminio)

Usando el compuesto (1,15 g) obtenido en la etapa 5 anterior, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 10 del ejemplo 1 para obtener el diastereómero 1 (134 mg: con impurezas) y el diastereómero 2 (127 mg: con impurezas) del compuesto del título.

- 15 Diastereómero 1 (menos polar)

MS (ESI) m/z: 1018 (M+H)⁺.

Diastereómero 2 (más polar)

MS (ESI) m/z: 1018 (M+H)⁺.

(Etapa 7-1)

- 20 (5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-7-[2-Amino-1-(2-hidroxietil)-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il]-15,16-dihidroxi-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) disódico

(Diastereómero 1)

- 25 Usando el compuesto (diastereómero 1) (134 mg: con impurezas) obtenido en la etapa 6 anterior, la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 11 del ejemplo 1, y la purificación se realizó a continuación según las siguientes condiciones de purificación para obtener el compuesto del título en forma de una sal de trietilamina.

[Condiciones de purificación] Cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo] y HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 5 %-25 % (0 min-40 min)].

- 30 La sal de trietilamina obtenida se sometió a intercambio de sales de la misma manera que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (36,0 mg).

MS (ESI) m/z: 790 (M+H)⁺.

- 35 RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,01 (1H, s), 7,99 (1H, s), 7,17 (1H, s), 6,23 (1H, d, J = 2,4 Hz), 5,96 (1H, d, J = 8,5 Hz), 5,67-5,58 (1H, m), 5,29-5,22 (1H, m), 4,95-4,85 (1H, m), 4,83-4,79 (1H, m), 4,48-4,40 (2H, m), 4,39-4,31 (2H, m), 4,22-4,09 (3H, m), 3,73-3,66 (2H, m), 3,56-3,50 (1H, m), 3,50-3,44 (2H, m), 2,80-2,68 (1H, m), 2,48-2,35 (1H, m), 2,00-1,88 (1H, m), 1,87-1,77 (1H, m).

RMN de ³¹P (CD₃OD) δ: 57,6 (s), 53,1 (s).

(Etapa 7-2)

- 40 (5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-7-[2-Amino-1-(2-hidroxietil)-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il]-15,16-dihidroxi-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) disódico

(Diastereómero 2)

- 45 Usando el compuesto (diastereómero 2) (127 mg: con impurezas) obtenido en la etapa 6 anterior, la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 11 del ejemplo 1, y la purificación se realizó a continuación según las siguientes condiciones de purificación para obtener el compuesto del título en forma de una sal de trietilamina.

[Condiciones de purificación] Cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo] y HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 3 %-20 % (0 min-40 min)].

La sal de trietilamina obtenida se sometió a intercambio de sales de la misma manera que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (20,1 mg).

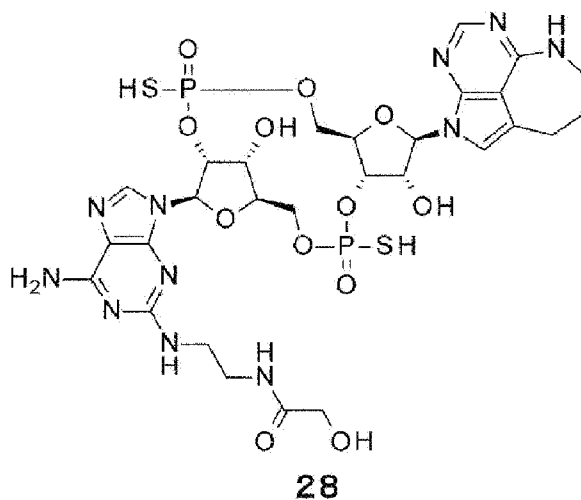
MS (ESI) m/z : 790 (M+H)⁺.

5 RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,20 (1H, s), 8,02 (1H, s), 7,19 (1H, s), 6,31 (1H, d, J = 6,0 Hz), 6,05 (1H, d, J = 8,5 Hz), 5,62-5,52 (1H, m), 5,47-5,40 (1H, m), 4,80-4,75 (1H, m), 4,51-4,47 (1H, m), 4,47-4,21 (5H, m), 4,16-4,09 (1H, m), 3,99-3,89 (2H, m), 3,84-3,78 (2H, m), 3,52-3,46 (2H, m), 2,93-2,83 (1H, m), 2,82-2,72 (1H, m), 2,03-1,92 (2H, m).

RMN de ³¹P (CD₃OD) δ: 61,6 (s), 59,6 (s).

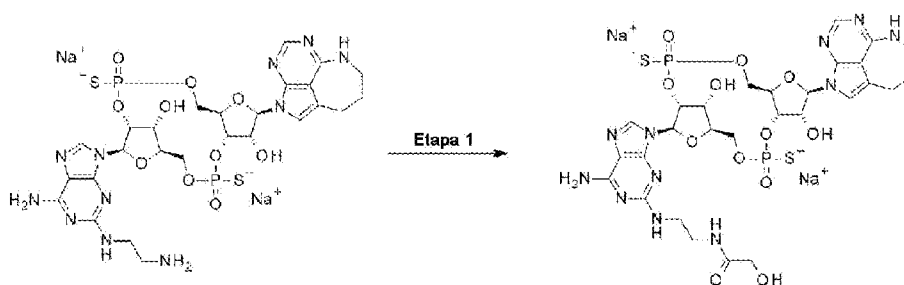
Ejemplo 38: Síntesis de CDN28

10 N-[2-((6-Amino-9-[(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-15,16-dihidroxi-2,10-dioxo-2,10-bis(sulfanil)-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzoc[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-1][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxadifosfaciotetradecin-7-il]-9H-purin-2-il)amino)etil]-2-hidroxiacetamida



28a (Diastereómero 1)

15 [Esquema de síntesis]



(Etapa 1)

20 (5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-7-(6-Amino-2-[[2-(2-hidroxiacetamida)etil]amino]-9H-purin-9-il)-15,16-dihidroxi-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzoc[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-1][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxadifosfaciotetradecin-2,10-bis(tiolato) disódico

Usando el compuesto (6,6 mg) obtenido en la etapa 8-2 del ejemplo 8, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 1-1 del ejemplo 7, y la purificación se llevó a cabo a continuación según las siguientes condiciones de purificación para obtener el compuesto del título en forma de una sal de trietilamina.

25 [Condiciones de purificación] HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 2 %-30 % (0 min-30 min)].

La sal de trietilamina obtenida se sometió a intercambio de sales de la misma manera que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (2,9 mg).

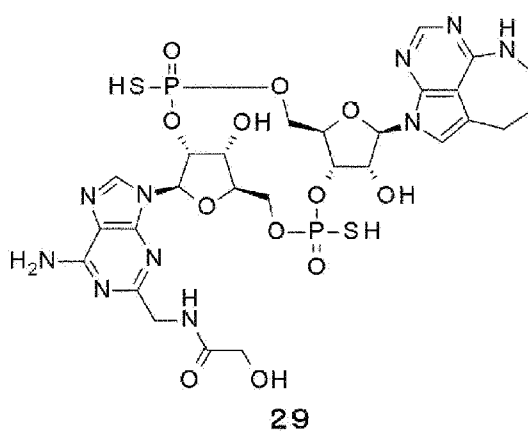
MS (ESI) m/z: 846 (M+H)⁺.

5 RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,33 (1H, s), 8,02 (1H, s), 7,16 (1H, s), 6,33 (1H, d, J = 6,0 Hz), 6,18 (1H, d, J = 8,5 Hz), 5,53-5,45 (2H, m), 4,79 (1H, t, J = 5,1 Hz), 4,50-4,25 (5H, m), 4,10 (1H, d, J = 11,5 Hz), 3,97 (2H, s), 3,94-3,89 (1H, m), 3,53-3,39 (6H, m), 2,88 (2H, t, J = 5,7 Hz), 2,04-1,98 (2H, m).

RMN de ³¹P (CD₃OD) δ: 62,6, 60,1.

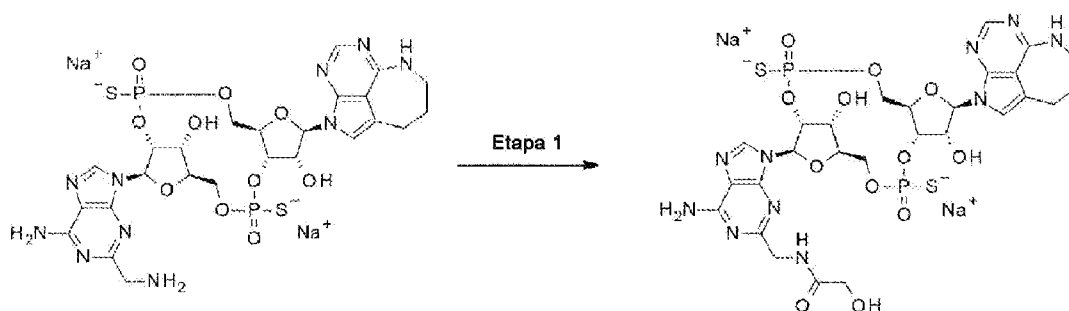
Ejemplo 39: Síntesis de CDN29

10 N-({6-Amino-9-[(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-15,16-dihidroxi-2,10-dioxo-2,10-bis(sulfanil)-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzoc[d]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfacilotetradecin-7-il]-9H-purin-2-il}metil)-2-hidroxiacetamida



29a (Diastereómero 1)

15 [Esquema de síntesis]



(Etapa 1)

20 (5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-7-{6-Amino-2-[(2-hidroxiacetamida)metil]-9H-purin-9-il}-15,16-dihidroxi-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzoc[d]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfacilotetradecin-2,10-bis(tiolato) disódico

Usando el compuesto (4,6 mg) obtenido en la etapa 9-2 del ejemplo 11, la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 1-1 del ejemplo 7, y el producto resultante se purificó por HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 2 %-30 % (0 min-30 min)] para obtener el compuesto del título en forma de una sal de trietilamina.

25 La sal de trietilamina obtenida se sometió a intercambio de sales de la misma manera que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (4,0 mg).

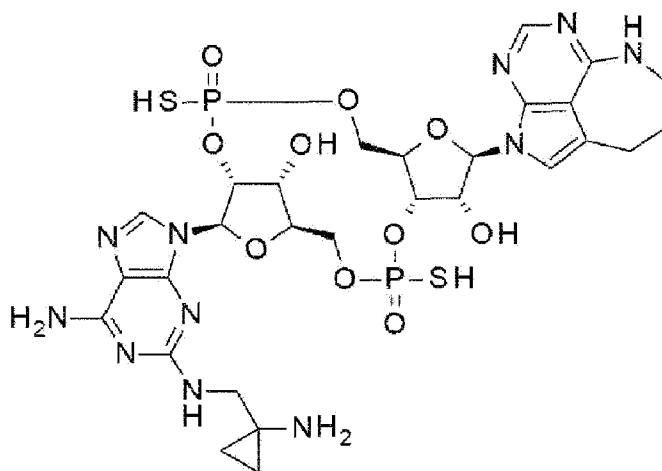
MS (ESI) m/z: 817 (M+H)⁺.

RMN de ^1H (CD_3OD) δ : 8,75 (1H, s), 8,02 (1H, s), 7,12 (1H, s), 6,36 (1H, dd, $J = 8,5$ Hz), 6,33 (1H, d, $J = 6,7$ Hz), 5,49-5,41 (2H, m), 4,80 (1H, dd, $J = 6,7, 4,8$ Hz), 4,50-4,29 (7H, m), 4,07 (2H, s), 4,05-4,01 (1H, m), 3,92-3,87 (1H, m), 3,51-3,49 (2H, m), 2,93-2,90 (2H, m), 2,03-1,99 (2H, m).

RMN de ^{31}P (CD_3OD) δ : 63,2, 60,3.

5 Ejemplo 40: Síntesis de CDN30

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-7-(6-Amino-2-[[[(1-aminociclopropil)metil]amino]-9H-purin-9-il]-15,16-dihidroxi-2,10-bis(sulfanil)-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2 λ^5 ,10 λ^5 -furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-diona

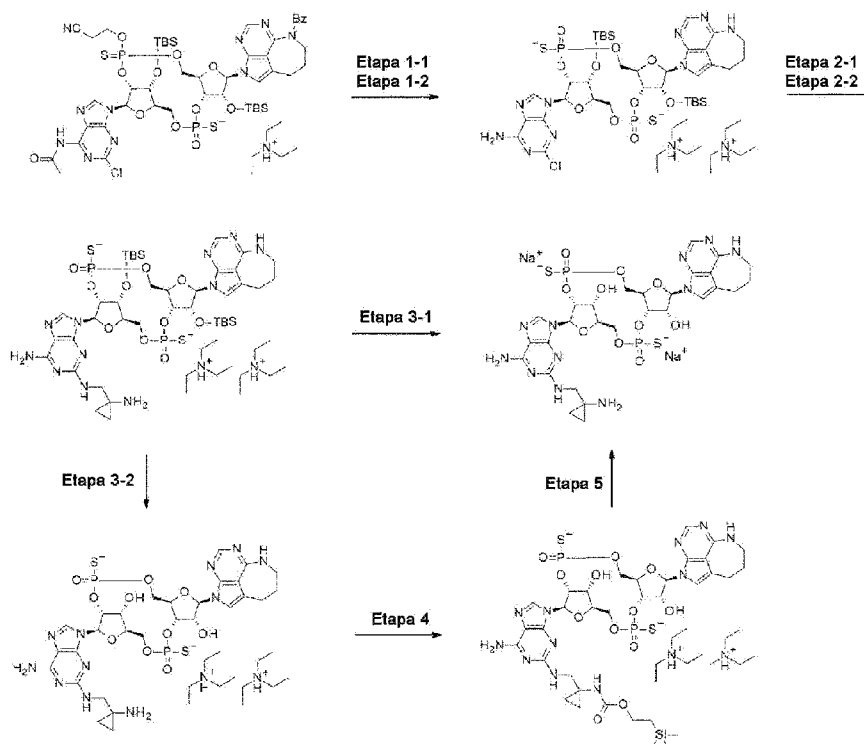


30

30a (Diastereómero 1)

30b (Diastereómero 2)

[Esquema de síntesis]



(Etapa 1-1)

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-7-(6-Amino-2-cloro-9H-purin-9-il)-15,16-bis-[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) de bis(N,N-dietiletanaminio)

- 5 Usando el compuesto (diastereómero 1) (590 mg) obtenido en la etapa 6 del ejemplo 8, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 10 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (420 mg).

MS (ESI) m/z: 992 (M+H)⁺.

- 10 RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,76 (1H, s), 7,97 (1H, s), 7,30 (1H, s), 6,23 (1H, d, J = 4,8 Hz), 6,22 (1H, d, J = 7,9 Hz), 5,43-5,37 (1H, m), 5,19-5,15 (1H, m), 4,85-4,77 (3H, m), 4,44-4,31 (2H, m), 4,22 (1H, sa), 4,08-4,00 (2H, m), 3,52-3,48 (2H, m), 3,14 (12H, q, J = 7,3 Hz), 2,84-2,81 (2H, m), 2,02-1,92 (2H, m), 1,26 (18H, t, J = 7,3 Hz), 1,00 (9H, s), 0,85 (9H, s), 0,33 (3H, s), 0,28 (3H, s), 0,27 (3H, s), 0,10 (3H, s).

(Etapa 1-2)

- 15 (5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-7-(6-Amino-2-cloro-9H-purin-9-il)-15,16-bis[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) de bis(N,N-dietiletanaminio)

Usando el compuesto (diastereómero 2) (710 mg) obtenido en la etapa 6 del ejemplo 8, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 10 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (452 mg).

MS (ESI) m/z: 992 (M+H)⁺.

- 20 RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,55 (1H, s), 8,01 (1H, s), 7,07 (1H, s), 6,34 (1H, d, J = 7,3 Hz), 6,20 (1H, d, J = 8,5 Hz), 5,52-5,44 (1H, m), 5,38-5,36 (1H, m), 5,17-5,10 (1H, m), 4,98-4,95 (2H, m), 4,67-4,57 (2H, m), 4,25 (1H, sa), 4,11-4,07 (1H, m), 3,89-3,84 (1H, m), 3,52-3,49 (2H, m), 3,18 (12H, q, J = 7,3 Hz), 2,93-2,91 (2H, m), 2,03-1,99 (2H, m), 1,30 (18H, t, J = 7,3 Hz), 1,00 (9H, s), 0,74 (9H, s), 0,27 (6H, s), 0,20 (3H, s), -0,28 (3H, s).

(Etapa 2-1)

- 25 (5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-7-(6-Amino-2-[(1-aminociclopropil)metil]amino)-9H-purin-9-il)-15,16-bis[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) de bis(N,N-dietiletanaminio)

- 30 A una solución de 1-(aminometil)ciclopropan-1-amina·2HCl (309 mg) en metanol (40 ml) se le añadió resina MP-Carbonato (5,45 g), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La resina se eliminó por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida. Se añadió una solución del residuo en metanol (0,837 ml) al compuesto (30,0 mg) obtenido en la etapa 1-1 anterior, y el producto resultante se hizo reaccionar con un reactor de microondas a 120 °C durante 4 horas. Tras concentrar la mezcla de reacción a presión reducida, el residuo se purificó por HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetronitrilo, acetronitrilo: del 30 %-60 % (0 min-30 min)] para obtener una mezcla que contiene el compuesto del título. La mezcla obtenida se utilizó directamente para la etapa siguiente.

- 35 MS (ESI) m/z: 1042 (M+H)⁺.

(Etapa 2-2)

- 40 (5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-7-(6-Amino-2-[(1-aminociclopropil)metil]amino)-9H-purin-9-il)-15,16-bis[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) de bis(N,N-dietiletanaminio)

Usando el compuesto (58,6 mg) obtenido en la etapa 1-2 anterior, se obtuvo una mezcla que contenía el compuesto del título de la misma manera que en la etapa 2-1 anterior. La mezcla obtenida se utilizó directamente para la reacción posterior. MS (ESI) m/z: 1042 (M+H)⁺.

- 45 (Etapa 3-1)

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-7-(6-Amino-2-[(1-aminociclopropil)metil]amino)-9H-purin-9-il)-15,16-dihidroxi-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) disódico

(Diastereómero 1)

Usando la mezcla obtenida en la etapa 2-1 anterior, la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 11 del ejemplo 1, y el producto resultante se purificó después por HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 2 %-20 % (0 min-30 min)] para obtener el compuesto del título en forma de una sal de trietilamina.

- 5 La sal de trietilamina obtenida se sometió a intercambio de sales de la misma manera que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (2,0 mg).

MS (ESI) m/z: 812 (M-2Na+1H)⁺.

- 10 RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,25 (1H, s), 8,01 (1H, s), 7,04 (1H, s), 6,28 (1H, d, J = 4,2 Hz), 6,12 (1H, d, J = 7,9 Hz), 5,43-5,35 (1H, m), 5,15-5,11 (1H, m), 4,75 (1H, t, J = 4,2 Hz), 4,65-4,56 (1H, m), 4,49-4,43 (2H, m), 4,37-4,31 (2H, m), 4,15-4,01 (2H, m), 3,73-3,59 (1H, m), 3,50-3,47 (2H, m), 3,22-3,15 (1H, m), 2,85-2,68 (2H, m), 2,00-1,93 (2H, m), 0,87-0,80 (4H, m).

RMN de ³¹P (CD₃OD) δ: 57,7 (s), 54,3 (s).

(Etapa 3-2)

- 15 (5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-7-(6-Amino-2-[(1-aminociclopropil)metil]amino)-9H-purin-9-il)-15,16-dihidroxi-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) de bis(N,N-dietiletanaminio)

Usando la mezcla obtenida en la etapa 2-2 anterior, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 11 del ejemplo 1 para proporcionar una mezcla que contenía el compuesto del título. La mezcla obtenida se utilizó directamente para la reacción posterior.

- 20 (Etapa 4)

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-7-[6-Amino-2-({1-([2-(trimetilsilil)etoxi]carbonil)amino}ciclopropil)metil]amino)-9H-purin-9-il]-15,16-dihidroxi-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) de bis(N,N-dietiletanaminio)

- 25 A una solución de la mezcla obtenida en la etapa 3-2 anterior en N,N-dimetilformamida (1,0 ml) se le añadió trietilamina (40,8 μl) y (2-(trimetilsilil)etil)carbonato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (39,5 mg), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Tras enfriar añadiendo agua a la mezcla de reacción, el producto resultante se purificó por HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 10 %-50 % (0 min-30 min)] para obtener el compuesto del título (11,0 mg).

- 30 MS (ESI) m/z: 958 (M+H)⁺.

- 35 RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,40 (1H, s), 8,03 (1H, s), 7,12 (1H, s), 6,32 (1H, d, J = 6,7 Hz), 6,18 (1H, d, J = 8,5 Hz), 5,53-5,49 (1H, m), 5,46-5,39 (1H, m), 4,83 (1H, dd, J = 6,3, 4,5 Hz), 4,53-4,30 (4H, m), 4,26-4,24 (1H, m), 4,13-4,08 (2H, m), 4,04-4,00 (1H, m), 3,93-3,88 (1H, m), 3,60 (1H, d, J = 13,9 Hz), 3,52-3,49 (2H, m), 3,40 (1H, d, J = 13,9 Hz), 3,04 (12H, q, 7,3 Hz), 2,93-2,90 (2H, m), 2,04-1,99 (2H, m), 1,23 (18H, t, J = 7,3 Hz), 0,96-0,92 (2H, m), 0,84-0,80 (2H, m), 0,76-0,73 (2H, m), 0,02 (9H, s).

(Etapa 5)

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-7-(6-Amino-2-[(1-aminociclopropil)metil]amino)-9H-purin-9-il)-15,16-dihidroxi-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) disódico (Diastereómero 2)

- 40 A una disolución del compuesto (11,0 mg) obtenido en la etapa 4 anterior en tetrahidrofurano (474 μl) se le añadió una disolución en tetrahidrofurano de fluoruro de tetrabutilamonio (aproximadamente 1 M, 237 μl), y la mezcla de reacción se agitó en una atmósfera de nitrógeno a 40 °C durante 3 horas. Tras la inactivación por adición de una solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio a la mezcla de reacción, el producto resultante se purificó por HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 2 %-30 % (0 min-30 min)] y un Sep-Pak (R) C18 [agua/acetonitrilo/trietilamina al 0,1 %] para obtener el compuesto del título en forma de una sal de trietilamina.
- 45

La sal de trietilamina obtenida se sometió a intercambio de sales de la misma manera que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (4,1 mg).

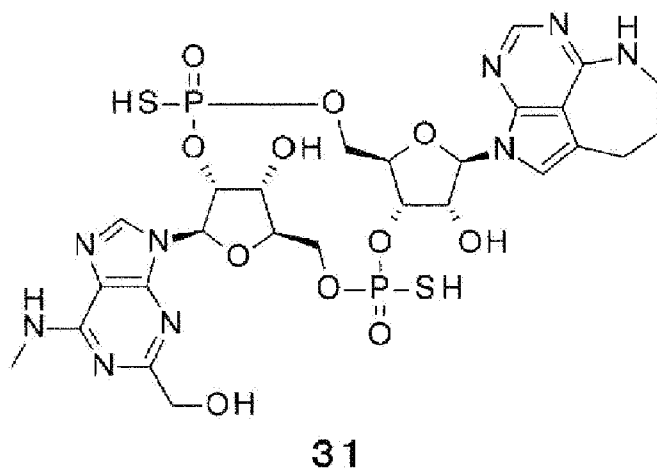
MS (ESI) m/z: 812 (M-2Na+1H)⁺.

- 50 RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,34 (1H, s), 8,01 (1H, s), 7,14 (1H, s), 6,32 (1H, d, J = 6,0 Hz), 6,16 (1H, d, J = 8,5 Hz), 5,43-5,37 (2H, m), 4,78 (1H, t, J = 5,4 Hz), 4,50-4,28 (5H, m), 4,12-4,08 (1H, m), 3,95-3,89 (1H, m), 3,69-3,64 (1H, m), 3,51-

3,48 (2H, m), 3,26 (1H, d, J = 14,5), 2,89-2,86 (2H, m), 2,03-1,98 (2H, m), 0,83-0,79 (4H, m). RMN de ^{31}P (CD_3OD) δ : 62,3 (s), 60,0 (s).

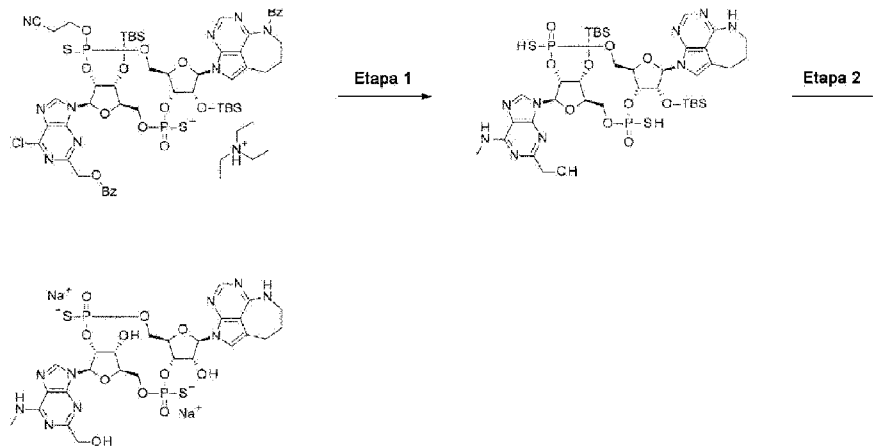
Ejemplo 41: Síntesis de CDN31

- 5 (5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-15,16-Dihidroxi-7-[2-(hidroximetil)-6-(metilamino)-9H-purin-9-il]-2,10-bis(sulfanil)-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2 λ^5 ,10 λ^5 -furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciotetradecin-2,10-diona



31a (Diastereómero 1)

- 10 [Esquema de síntesis]



(Etapa 1)

- 15 (5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-15,16-Bis[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-7-[2-(hidroximetil)-6-(metilamino)-9H-purin-9-il]-2,10-bis(sulfanil)-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2 λ^5 ,10 λ^5 -furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciotetradecin-2,10-diona

A una disolución del diastereómero 2 (más polar) obtenido en la etapa 7 del ejemplo 12 (56,5 mg) en metanol (1,00 ml) se le añadió una disolución acuosa al 40 % de metilamina (1,00 ml), y la mezcla de reacción se agitó en un tubo sellado a 60 °C durante 3 horas. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida para obtener una mezcla que contenía el compuesto del título. La mezcla obtenida se utilizó directamente para la reacción posterior.

- 20 MS (ESI) m/z: 1002 (M+H) $^+$.

(Etapa 2)

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-15,16-Dihidroxi-7-[2-(hidroximetil)-6-(metilamino)-9H-purin-9-il]-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2 λ^5 ,10 λ^5 -furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidofosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) disódico

- 5 Usando la mezcla obtenida en la etapa 1 anterior, la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 11 del ejemplo 1, y el producto resultante se purificó después por HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 2 %-20 % (0 min-30 min)] para obtener el compuesto del título en forma de una sal de trietilamina.

La sal de trietilamina obtenida se sometió a intercambio de sales de la misma manera que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (16,0 mg).

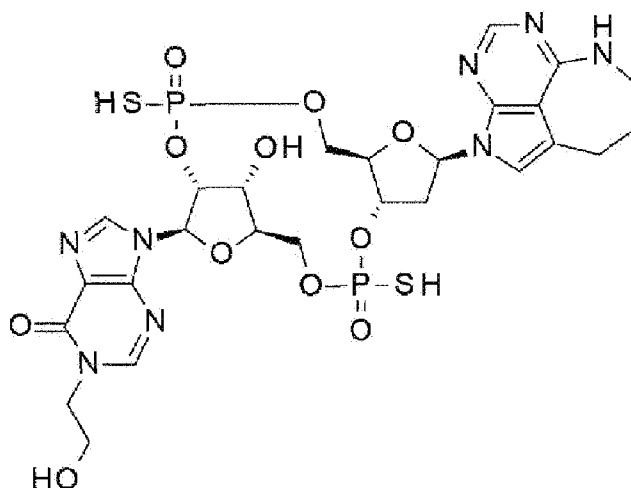
- 10 MS (ESI) m/z: 774 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CD₃OD) δ : 8,70 (1H, s), 8,02 (1H, s), 7,13 (1H, s), 6,38 (1H, dd, J = 9,1 Hz), 6,33 (1H, d, J = 7,3 Hz), 5,49-5,42 (2H, m), 4,80 (1H, dd, J = 6,7, 4,2 Hz), 4,60 (2H, s), 4,50-4,28 (5H, m), 4,05-4,00 (1H, m), 3,92-3,87 (1H, m), 3,52-3,49 (2H, m), 3,14 (3H, sa), 2,91 (2H, t, J = 5,4 Hz), 2,04-1,99 (2H, m).

RMN de ³¹P (CD₃OD) δ : 63,1 (s), 60,3 (s).

- 15 Ejemplo 42: Síntesis de CDN32

(5R,7R,8R,12aR,14R,15aS,16R)-16-Hidroxi-7-[1-(2-hidroxietil)-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il]-2,10-bis(sulfanil)-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2 λ^5 ,10 λ^5 -furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidofosfaciclotetradecin-2,10-diona



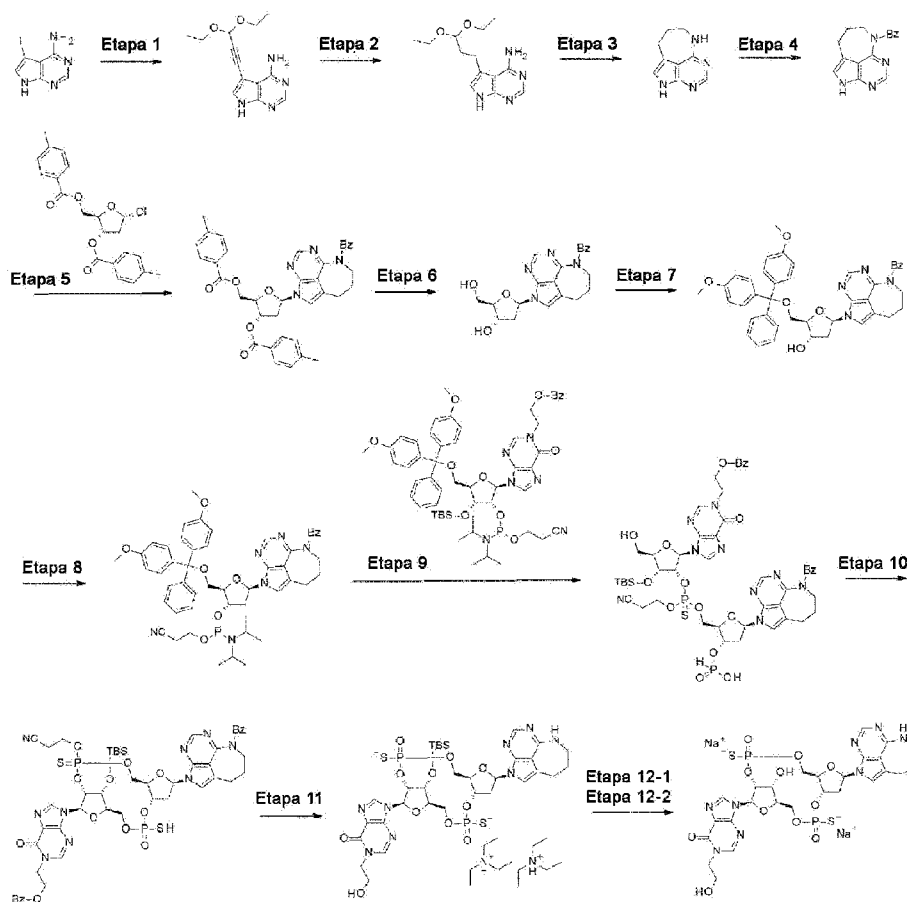
32

20

32a (Diastereómero 1)

32b (Diastereómero 2)

[Esquema de síntesis]



(Etapa 1)

5-(3,3-Dietoxiprop-1-in-1-il)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-amina

- 5 A una solución de 5-yodo-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-amina (22 g) disponible en el mercado (PharmaBlock Sciences (Nanjing), Inc.) en N,N-dimetilformamida (70 ml) se le añadieron yoduro de cobre (1,61 g), dicloruro de bis(trifenilfosfina)paladio (5,94 g) y trietilamina (35 ml). Se añadió propargilaldehído dietil acetal (22 ml) a lo largo de 2 horas, y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche. Se añadió cloroformo (350 ml) a la mezcla de reacción, que se lavó dos veces con agua. Tras secar la capa orgánica con sulfato de magnesio, se eliminó el agente desecante por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida. Se añadió acetato de etilo (350 ml) al residuo, y el producto resultante se agitó durante la noche. El sólido precipitado se recogió por filtración para obtener el compuesto del título (9,60 g).

MS (ESI) m/z: 261 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (DMSO-d₆) δ: 12,04 (1H, sa), 8,11 (1H, sa), 7,57 (1H, s), 6,56 (2H, sa), 5,59 (1H, s), 3,68 (2H, m), 3,57 (2H, m), 1,17 (6H, t, J = 7,3 Hz).

15 (Etapa 2)

5-(3,3-Dietoxipropil)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-amina

- 20 A una solución mixta del compuesto (17,9 g) obtenido en la etapa 1 anterior en tetrahidrofurano (160 ml)-etanol (80 ml) se le añadió paladio al 10 %-carbono (M) húmedo (25,0 g), y la mezcla de reacción se agitó en una atmósfera de hidrógeno a temperatura ambiente durante toda la noche. El catalizador se eliminó mediante filtración con Celite, y el filtrado se concentró a presión reducida para obtener una forma bruta del compuesto del título (17,0 g).

MS (ESI) m/z: 265 (M+H)⁺.

(Etapa 3)

6,7,8,9-Tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azuleno

- 5 El compuesto (50,21 g) obtenido en la etapa 2 anterior se disolvió en solución acuosa al 90 % de ácido acético (344 ml), y la mezcla de reacción se agitó a 50 °C durante la noche. Tras confirmar la desaparición de la materia prima, se añadió paladio-carbono (M) húmedo (60 g) a la mezcla de reacción, que se agitó en una atmósfera de hidrógeno a 40 °C durante toda la noche. El catalizador se eliminó por filtración con Celite y el filtrado se concentró a presión reducida. Se añadió al residuo una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio (350 ml) y el producto resultante se sometió siete veces a extracción con cloroformo/metanol (9:1). La capa orgánica se concentró a presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo/metanol] para obtener el compuesto del título (18,47 g).

MS (ESI) m/z: 175 (M+H)⁺.

- 10 RMN de ¹H (DMSO-d₆) δ: 11,26 (1H, sa), 7,97 (1H, s), 7,37 (1H, sa), 6,86 (1H, sa), 3,35 (2H, m), 2,80 (2H, t, J = 5,4 Hz), 1,88 (2H, m).

(Etapa 4)

Fenil(2,7,8,9-tetrahidro-6H-2,3,5,6-tetraazabenzocd)azulen-6-il)metanona

- 15 A una suspensión del compuesto (8,47 g) obtenido en la etapa 3 anterior en diclorometano (120 ml) se le añadieron piridina deshidratada (39,2 ml), N,N-dimetilaminopiridina (2,38 g) y cloruro de benzoilo (22,6 ml) en este orden, y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Tras concentrar la mezcla de reacción a presión reducida, se añadieron al residuo cloroformo (150 ml), metanol (60 ml) y trietilamina (50 ml), y el producto resultante se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. La mezcla de reacción se vertió en una mezcla de dos capas de cloroformo y agua, y se sometió a extracción con cloroformo. La capa orgánica se lavó dos veces con una solución acuosa al 25 % p/v de hidrogenosulfato de potasio y se secó sobre sulfato de magnesio anhidro. El agente desecante se eliminó por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida. Se añadieron acetato de etilo (50 ml) y hexano (125 ml) en este orden al residuo para hacer una pasta, que se agitó durante 1 hora. El sólido precipitado se recogió por filtración para obtener el compuesto del título (9,89 g).
- 20

MS (ESI) m/z: 279 (M+H)⁺.

- 25 RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 10,07 (1H, sa), 8,11 (1H, s), 7,39-7,21 (5H, m), 7,12 (1H, s), 4,32 (2H, m), 3,06 (2H, m), 2,26 (2H, m).

(Etapa 5)

6-Benzoil-2-[2-desoxi-3,5-bis-O-(4-metilbenzoil)-β-D-eritro-pentofuranosil]-6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd)azuleno

- 30 A una suspensión del compuesto (7,10 g) obtenido en la etapa 4 anterior en acetonitrilo (80 ml) se le añadieron hidróxido de potasio en polvo (2,9 g) y tris[2-(2-metoxietoxi)etil]amina (0,41 ml) en una atmósfera de nitrógeno, y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Con refrigeración por hielo, se añadieron cloruro de 2-desoxi-3,5-bis-O-(4-metilbenzoil)-α-D-eritro-pentofuranosilo (10,12 g) como compuesto conocido en la bibliografía (Synlett, 2004(2): 335-337) y acetonitrilo (60 ml), se aumentó la temperatura hasta la temperatura ambiente y se agitó la mezcla de reacción durante toda la noche. Se añadió a la mezcla de reacción una solución acuosa saturada de cloruro de amonio para inactivar la reacción. El sólido precipitado se recogió por filtración y se lavó con agua para obtener el compuesto del título (9,70 g).
- 35

MS (ESI) m/z: 631 (M+H)⁺.

- 40 RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 8,10 (1H, s), 8,00-7,96 (4H, m), 7,37-7,22 (9H, m), 7,10 (1H, s), 6,88 (1H, dd, J = 8,5, 5,4 Hz), 5,76 (1H, m), 4,77 (1H, dd, J = 11,8, 3,9 Hz), 4,65-4,57 (2H, m), 4,32 (1H, m), 4,20 (1H, m), 2,90-2,78 (3H, m), 2,73 (1H, ddd, J = 2,1, 5,7, 8,5 Hz), 2,44 (6H, s), 2,19 (2H, m).

(Etapa 6)

6-Benzoil-2-(2-desoxi-β-D-eritro-pentofuranosil)-6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd)azuleno

- 45 A una disolución mixta del compuesto (8,69 g) obtenido en la etapa 5 anterior en metanol (45 ml)-tetrahidrofurano (135 ml) se le añadió gota a gota disolución acuosa 2 N de hidróxido de sodio (27,6 ml) a -10 °C durante 20 minutos. Tras agitar a la misma temperatura durante 2 horas, se añadió ácido clorhídrico 1 N (58 ml) para inactivar la reacción. Tras concentrar la mezcla de reacción a presión reducida, el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo/metanol] para obtener el compuesto del título (4,09 g).

MS (ESI) m/z: 395 (M+H)⁺.

- 50 RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 8,04 (1H, s), 7,39-7,23 (5H, m), 7,05 (1H, s), 6,27 (1H, dd, J = 9,7, 5,4 Hz), 6,00 (1H, d, J = 10,9 Hz), 4,77 (1H, d, J = 4,8 Hz), 4,41 (1H, dd, J = 14,5, 7,9 Hz), 4,19 (1H, s), 4,15 (1H, dd, J = 14,5, 7,9 Hz), 3,94 (1H, d, J = 12,7 Hz), 3,74 (1H, m), 3,16-2,95 (3H, m), 2,30-2,14 (3H, m), 1,96 (1H, s).

(Etapa 7)

6-Benzoil-2-{5-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-2-desoxi-β-D-eritro-pentofuranosil}-6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocdiazuleno

- 5 Usando el compuesto (4,55 g) obtenido en la etapa 6 anterior, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 1 del ejemplo 11 para obtener el compuesto del título (6,38 g).

MS (ESI) m/z: 697 (M+H)⁺.

- 10 RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 8,08 (1H, s), 7,43 (2H, d, J = 7,9 Hz), 7,36-7,19 (13H, m), 6,84-6,76 (5H, m), 4,66 (1H, sa), 4,31 (1H, m), 4,21 (1H, m), 4,07 (1H, m), 3,79 (6H, s), 3,44 (1H, dd, J = 10,0, 3,9 Hz), 3,38 (1H, dd, J = 10,3, 4,8 Hz), 2,85 (2H, t, J = 6,3 Hz), 2,66 (1H, m), 2,47 (1H, ddd, J = 4,1, 6,5, 13,9 Hz), 2,18 (2H, m) (sólo se muestran los picos observables)

(Etapa 8)

6-Benzoil-2-(5-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-3-O-[(2-cianoetoxi)[di(propan-2-il)amino]fosfanil]-2-desoxi-β-D-eritro-pentofuranosil)-6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocdiazuleno

- 15 Usando el compuesto (6,37 g) obtenido en la etapa 7 anterior, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 6 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (6,05 g) como una mezcla de diastereómeros (proporción de diastereómeros = 1:1).

- 20 RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 8,09 (0,5H, s), 8,08 (0,5H, s), 7,46-7,41 (2H, m), 7,35-7,19 (13H, m), 6,84-6,75 (5H, m), 4,82-4,76 (1H, m), 4,35-4,19 (3H, m), 3,89-3,54 (4H, m), 3,79 (1,5H, s), 3,79 (1,5H, s), 3,78 (1,5H, s), 3,78 (1,5H, s), 3,42 (1H, td, J = 9,8, 3,8 Hz), 3,38-3,30 (1H, m), 2,81 (2H, t, J = 6,3 Hz), 2,74-2,66 (1H, m), 2,63-2,49 (1H, m), 2,62 (1H, t, J = 6,0 Hz), 2,45 (1H, t, J = 6,3 Hz), 2,21-2,14 (2H, m), 1,20-1,17 (9H, m), 1,11 (3H, d, J = 6,7 Hz).

(Etapa 9)

- 25 Usando el compuesto (868 mg) obtenido en la etapa 8 anterior, se llevó a cabo la reacción de la misma manera que en la etapa 7 del ejemplo 1 para proporcionar una solución en acetonitrilo de 6-benzoil-2-{2-desoxi-3-O-[hidroxio(oxo)-λ⁵-fosfanil]-β-D-eritro-pentofuranosil}-6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocdiazuleno. Utilizando esta solución en acetonitrilo y el compuesto (1,00 g) obtenido en la etapa 3 del ejemplo 22, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 8 del ejemplo 1, y el producto bruto resultante se utilizó directamente para la reacción posterior.

(Etapa 10)

- 30 Benzoato de 2-{9-[(5R,7R,8R,12aR,14R,15aS,16R)-14-(6-benzoil-6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocdiazulen-2-il)-16-[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-10-(2-cianoetoxi)-2-oxo-2-sulfanil-10-sulfanilidenoctahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciotetradecin-7-il]-6-oxo-6,9-dihidro-1H-purin-1-il}etilo

Usando el producto bruto obtenido en la etapa 9, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 9 anterior del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (702 mg) en forma de una mezcla de diastereómeros en el átomo de fósforo.

- 35 MS (ESI) m/z: 1134 (M+H)⁺.

(Etapa 11)

(5R,7R,8R,12aR,14R,15aS,16R)-16-[[Terc-butil(dimetil)silil]oxi]-7-[1-(2-hidroxietil)-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il]-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocdiazulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciotetradecin-2,10-bis(tiolato) de bis(N,N-dietiletanaminio)

- 40 Usando el compuesto (702 mg) obtenido en la etapa 10 anterior, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 10 del ejemplo 1 para obtener el diastereómero 1 (119 mg: con impurezas) y el diastereómero 2 (113 mg: con impurezas) del compuesto del título.

Diastereómero 1 (menos polar)

MS (ESI) m/z: 873 (M+H)⁺.

- 45 Diastereómero 2 (más polar)

MS (ESI) m/z: 873 (M+H)⁺.

(Etapa 12-1)

(5R,7R,8R,12aR,14R,15aS,16R)-16-Hidroxi-7-[1-(2-hidroxietil)-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il]-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzoc[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidofosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) disódico

(Diastereómero 1)

- 5 Usando el compuesto (diastereómero 1) (119 mg: con impurezas) obtenido en la etapa 11 anterior, la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 11 del ejemplo 1, y la purificación se realizó a continuación según las siguientes condiciones de purificación para obtener el compuesto del título en forma de una sal de trietilamina.

- 10 [Condiciones de purificación] Cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo] y HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 5 %-30 % (0 min-40 min)].

La sal de trietilamina obtenida se sometió a intercambio de sales de la misma manera que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (51,8 mg).

MS (ESI) m/z: 759 (M+H)⁺.

- 15 RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,69 (1H, s), 8,24 (1H, s), 8,02 (1H, s), 7,09 (1H, s), 6,68 (1H, t, J = 7,0 Hz), 6,29 (1H, d, J = 8,5 Hz), 5,36-5,27 (2H, m), 4,75-4,71 (1H, m), 4,41-4,30 (3H, m), 4,28-4,12 (3H, m), 4,06-4,00 (1H, m), 3,94-3,84 (1H, m), 3,82 (2H, t, J = 4,8 Hz), 3,52-3,47 (2H, m), 2,91-2,69 (4H, m), 2,04-1,96 (2H, m).

RMN de ³¹P (CD₃OD) δ: 57,3 (s), 54,9 (s).

(Etapa 12-2)

- 20 (5R,7R,8R,12aR,14R,15aS,16R)-16-Hidroxi-7-[1-(2-hidroxietil)-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il]-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzoc[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidofosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) disódico

(Diastereómero 2)

- 25 Usando el compuesto (diastereómero 2) (113 mg: con impurezas) obtenido en la etapa 11 anterior, la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 11 del ejemplo 1, y la purificación se realizó a continuación según las siguientes condiciones de purificación para obtener el compuesto del título en forma de una sal de trietilamina.

[Condiciones de purificación] Cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo] y HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 5 %-25 % (0 min-40 min)].

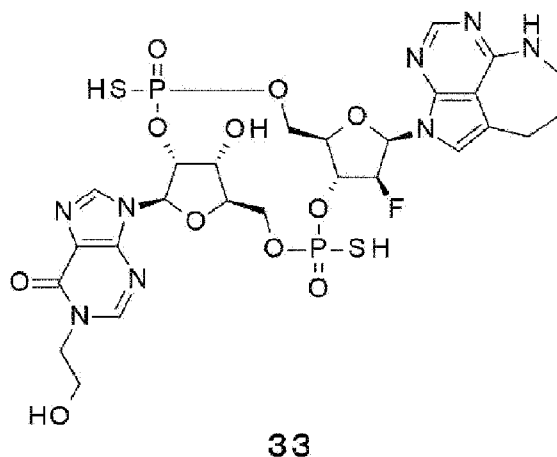
- 30 La sal de trietilamina obtenida se sometió a intercambio de sales de la misma manera que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (65,4 mg).

MS (ESI) m/z: 759 (M+H)⁺.

- 35 RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,78 (1H, s), 8,24 (1H, s), 8,02 (1H, s), 7,08 (1H, s), 6,73 (1H, dd, J = 9,1, 5,4 Hz), 6,29 (1H, d, J = 8,5 Hz), 5,59-5,52 (1H, m), 5,45-5,37 (1H, m), 4,45 (1H, d, J = 4,2 Hz), 4,40-4,16 (6H, m), 4,01 (1H, d, J = 12,7 Hz), 3,87-3,75 (3H, m), 3,53-3,46 (2H, m), 2,93-2,88 (2H, m), 2,87-2,65 (2H, m), 2,06-1,96 (2H, m). RMN de ³¹P (CD₃OD) δ: 63,1 (s), 57,3 (s).

Ejemplo 43: Síntesis de CDN33

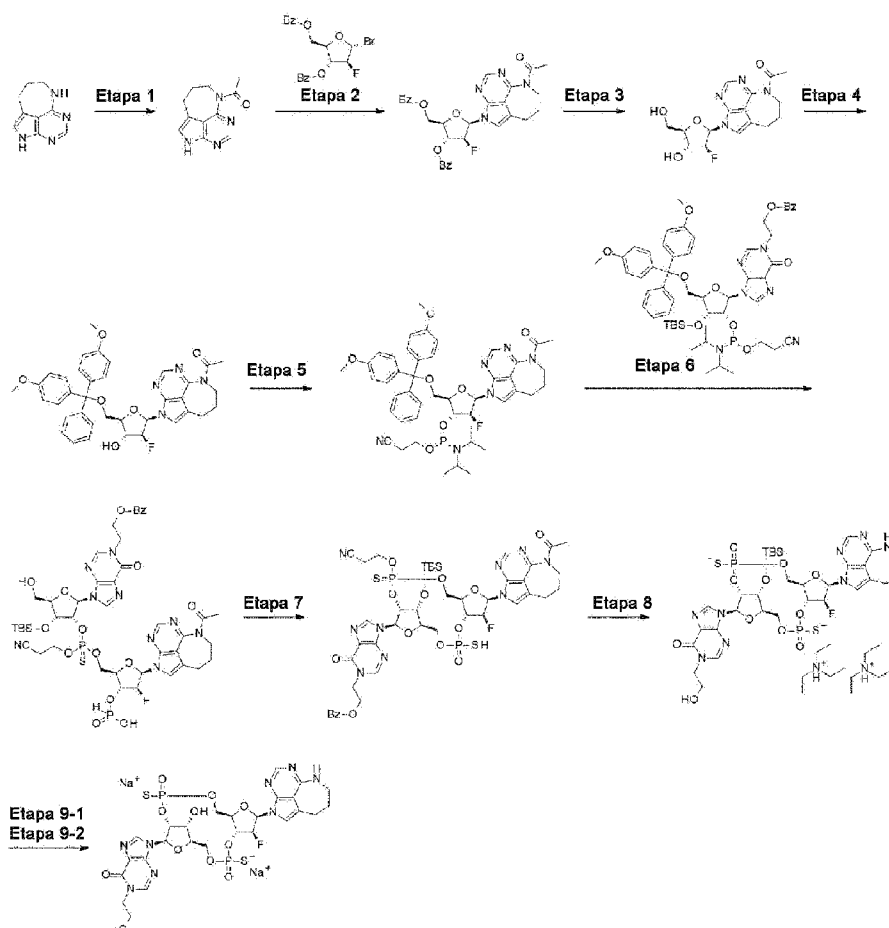
(5R,7R,8R,12aR,14R,15S,15aR,16R)-15-Fluoro-16-hidroxi-7-[1-(2-hidroxietil)-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il]-2,10-bis(sulfanil)-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzoc[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidofosfaciclotetradecin-2,10-diona



33a (Diastereómero 1)

33b (Diastereómero 2)

5 [Esquema de síntesis]



(Etapa 1)

1-(2,7,8,9-Tetrahidro-6H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-6-il)etan-1-ona

10 El compuesto (6,88 g) obtenido en la etapa 3 del ejemplo 42 se disolvió en anhídrido acético (48 ml), y la mezcla de reacción se agitó a 90 °C. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida, y el residuo se disolvió en una mezcla de cloroformo (100 ml)-metanol (50 ml)-trietilamina (30 ml). Tras agitar a temperatura ambiente durante 4

horas, la mezcla de reacción se vertió en una mezcla de dos capas de cloroformo y agua, y se sometió a extracción con cloroformo. Tras secar la capa orgánica sobre sulfato de magnesio, se eliminó el agente desecante por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida. Se añadió hexano/acetato de etilo (1:2) al residuo para preparar una suspensión, y el sólido se recogió por filtración para obtener el compuesto del título (7,18 g).

- 5 MS (ESI) m/z: 217 (M+H)⁺.
- RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,47 (1H, s), 7,21 (1H, s), 4,11 (2H, d, J = 8,5 Hz), 2,97 (2H, t, J = 6,3 Hz), 2,46 (3H, s), 2,06 (2H, m).
- (Etapa 2)
- 10 6-Acetil-2-(3,5-di-O-benzoil-2-desoxi-2-fluoro-β-D-arabinofuranosil)-6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocdiazuleno
- Usando el compuesto (6,00 g) obtenido en la etapa 1 anterior y disponible en el mercado (Carbosynth Limited) [(2R,3R,4S,5R)-3-benzoiloxi-5-bromo-4-fluoro-tetrahidrofurano-2-il]benzoato de metilo (14,1 g), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 5 del ejemplo 42 para obtener el compuesto del título (11,45 g). MS (ESI) m/z: 559 (M+H)⁺.
- 15 RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 8,58 (1H, s), 8,12 (4H, t, J = 7,3 Hz), 7,69-7,44 (6H, m), 7,28 (1H, dd, J = 2,4 Hz), 6,92 (1H, dd, J = 23,3, 2,7 Hz), 5,77 (1H, dd, J = 17,5, 3,0 Hz), 5,34 (1H, dd, J = 50,2, 3,0 Hz), 4,83 (2H, dd, J = 11,8, 4,5 Hz), 4,76 (2H, dd, J = 11,8, 5,1 Hz), 4,56 (1H, m), 4,14 (2H, m), 2,90 (2H, t, J = 6,7 Hz), 2,07 (3H, s).
- (Etapa 3)
- 6-Acetil-2-(2-desoxi-2-fluoro-β-D-arabinofuranosil)-6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocdiazuleno
- 20 A una disolución mixta del compuesto (8,70 g) obtenido en la etapa 2 anterior en metanol (58 ml)-tetrahidrofurano (117 ml) se le añadió gota a gota disolución acuosa 2 N de hidróxido de sodio (32 ml) a -20 °C durante 12 minutos. Tras agitar a la misma temperatura durante 3 horas, se añadió ácido clorhídrico 1 N (66 ml) para inactivar la reacción. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo/metanol] para obtener el compuesto del título (3,27 g).
- 25 MS (ESI) m/z: 351 (M+H)⁺.
- RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 8,54 (1H, s), 7,20 (1H, dd, J = 1,8 Hz), 6,68 (1H, dd, J = 17,5, 4,2 Hz), 5,16 (1H, ddd, J = 52,0, 2,4, 1,2 Hz), 4,75 (1H, ddd, J = 19,2, 2,6, 1,3 Hz), 4,16 (1H, m), 4,08 (2H, m), 3,99 (1H, dd, J = 12,1, 3,6 Hz), 3,92 (1H, dd, J = 12,1, 4,2 Hz), 2,93 (2H, m), 2,52 (3H, s), 2,07 (2H, m) (sólo se muestran los picos observables)
- (Etapa 4)
- 30 6-Acetil-2-{5-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-2-desoxi-2-fluoro-β-D-arabinofuranosil}-6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocdiazuleno
- Usando el compuesto (3,95 g) obtenido en la etapa 3 anterior (3,95 g), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 1 del ejemplo 11 para obtener el compuesto del título (5,66 g).
- MS (ESI) m/z: 653 (M+H)⁺.
- 35 RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 8,56 (1H, s), 7,50-7,20 (10H, m), 6,85-6,78 (5H, m), 5,07 (1H, dt, J = 51,8, 3,2 Hz), 4,59 (1H, da, J = 18,1 Hz), 4,21-4,02 (3H, m), 3,80 (3H, s), 3,79 (3H, s), 3,50 (1H, dd, J = 10,3, 5,4 Hz), 3,44 (1H, dd, J = 10,0, 5,1 Hz), 2,88 (2H, m), 2,54 (3H, s), 2,42 (1H, sa), 2,07 (2H, m).
- (Etapa 5)
- 40 6-Acetil-2-{5-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-3-O-[(2-cianoetoxi)[di(propan-2-il)amino]fosfanil]-2-desoxi-2-fluoro-β-D-arabinofuranosil}-6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocdiazuleno
- Usando el compuesto (5,68 g) obtenido en la etapa 4 anterior, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 6 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (5,08 g) en forma de una mezcla de diastereómeros en el átomo de fósforo (proporción de diastereómeros = 1:1).
- MS (ESI) m/z: 853 (M+H)⁺.
- 45 RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 8,58 (0,5H, s), 8,57 (0,5H, s), 7,51-7,20 (10H, m), 6,85-6,76 (5H, m), 5,24-5,02 (1H, m), 4,76-4,60 (1H, m), 4,21-4,05 (3H, m), 3,91-3,74 (1H, m), 3,80 (1,5H, s), 3,79 (1,5H, s), 3,79 (1,5H, s), 3,79 (1,5H, s), 3,69-3,55 (3H, m), 3,49-3,37 (2H, m), 2,95-2,80 (2H, m), 2,61 (1H, t, J = 6,3 Hz), 2,54 (3H, s), 2,43 (1H, t, J = 6,7 Hz), 2,11-2,03 (2H, m), 1,21-1,17 (9H, m), 1,11 (3H, d, J = 7,3 Hz).
- (Etapa 6)

Usando el compuesto (1,00 g) obtenido en la etapa 5 anterior, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 7 del ejemplo 1 para proporcionar una solución en acetonitrilo de 6-acetil-2-{2-desoxi-2-fluoro-3-O-[hidroxi(oxo)-λ⁵-fosfanil]-β-D-arabinofuranosil}-6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azuleno. Utilizando esta solución en acetonitrilo y el compuesto (1,21 g) obtenido en la etapa 3 del ejemplo 22, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 8 del ejemplo 1, y el producto bruto resultante se utilizó directamente para la reacción posterior.

(Etapa 7)

Benzoato de 2-{9-[(5R,7R,8R,12aR,14R,15S,15aR,16R)-14-(6-acetil-6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)-16-[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-10-(2-cianoetoxi)-15-fluoro-2-oxo-2-sulfanil-10-sulfanilidenoctahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-7-il]-6-oxo-6,9-dihidro-1H-purin-1-il]etil

Usando el producto bruto obtenido en la etapa 6 anterior, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 9 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (757 mg) en forma de una mezcla de diastereómeros en el átomo de fósforo.

MS (ESI) m/z: 1090 (M+H)⁺.

(Etapa 8)

(5R,7R,8R,12aR,14R,15S,15aR,16R)-16-[[Terc-butil(dimetil)silil]oxi]-15-fluoro-7-[1-(2-hidroxietyl)-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il]-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) de bis(N,N-dietiletanaminio)

Usando el compuesto (757 mg) obtenido en la etapa 7 anterior, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 10 del ejemplo 1 para obtener el diastereómero 1 (113 mg: con impurezas) y el diastereómero 2 (108 mg: con impurezas) del compuesto del título.

Diastereómero 1 (menos polar)

MS (ESI) m/z: 891 (M+H)⁺.

Diastereómero 2 (más polar)

MS (ESI) m/z: 891 (M+H)⁺.

(Etapa 9-1)

(5R,7R,8R,12aR,14R,15S,15aR,16R)-15-Fluoro-16-hidroxi-7-[1-(2-hidroxietyl)-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il]-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) disódico

(Diastereómero 1)

Usando el compuesto (diastereómero 1) (113 mg: con impurezas) obtenido en la etapa 8 anterior, la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 11 del ejemplo 1, y la purificación se realizó a continuación según las siguientes condiciones de purificación para obtener el compuesto del título en forma de una sal de trietilamina.

[Condiciones de purificación] Cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo] y HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 5 %-30 % (0 min-30 min)].

La sal de trietilamina obtenida se sometió a intercambio de sales de la misma manera que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (28,8 mg).

MS (ESI) m/z: 777 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,67 (1H, s), 8,24 (1H, s), 8,04 (1H, s), 7,05 (1H, s), 6,73 (1H, dd, J = 23,9, 2,7 Hz), 6,28 (1H, d, J = 8,5 Hz), 5,43-5,24 (3H, m), 4,77-4,72 (1H, m), 4,51-4,32 (4H, m), 4,26-4,12 (2H, m), 4,06-3,91 (2H, m), 3,82 (2H, t, J = 5,1 Hz), 3,50 (2H, t, J = 5,1 Hz), 2,92-2,85 (2H, m), 2,06-1,97 (2H, m).

RMN de ³¹P (CD₃OD) δ: 57,8 (s), 54,7 (s).

(Etapa 9-2)

(5R,7R,8R,12aR,14R,15S,15aR,16R)-15-Fluoro-16-hidroxi-7-[1-(2-hidroxietyl)-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il]-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) disódico

(Diastereómero 2)

Usando el compuesto (diastereómero 2) (108 mg: con impurezas) obtenido en la etapa 8 anterior, la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 11 del ejemplo 1, y la purificación se realizó a continuación según las siguientes condiciones de purificación para obtener el compuesto del título en forma de una sal de trietilamina.

- 5 [Condiciones de purificación] Cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo] y HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 5 %-20 % (0 min-30 min)].

La sal de trietilamina obtenida se sometió a intercambio de sales de la misma manera que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (3,2 mg).

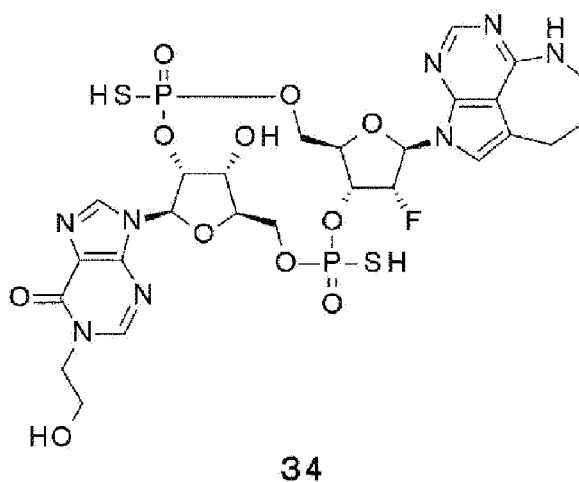
- 10 MS (ESI) m/z: 777 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,76 (1H, s), 8,23 (1H, s), 8,04 (1H, s), 7,06 (1H, s), 6,73 (1H, dd, J = 24,5, 2,1 Hz), 6,28 (1H, d, J = 8,5 Hz), 5,53-5,45 (1H, m), 5,43-5,27 (2H, m), 4,62-4,49 (1H, m), 4,45-4,41 (1H, m), 4,40-4,27 (2H, m), 4,27-4,15 (3H, m), 4,03-3,92 (2H, m), 3,87-3,78 (2H, m), 3,51 (2H, t, J = 5,6 Hz), 2,90 (2H, t, J = 5,6 Hz), 2,08-1,96 (2H, m).

RMN de ³¹P (CD₃OD) δ: 63,0 (s), 57,8 (s).

- 15 Ejemplo 44: Síntesis de CDN34

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-15-Fluoro-16-hidroxi-7-[1-(2-hidroxietil)-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il]-2,10-bis(sulfanil)-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-diona

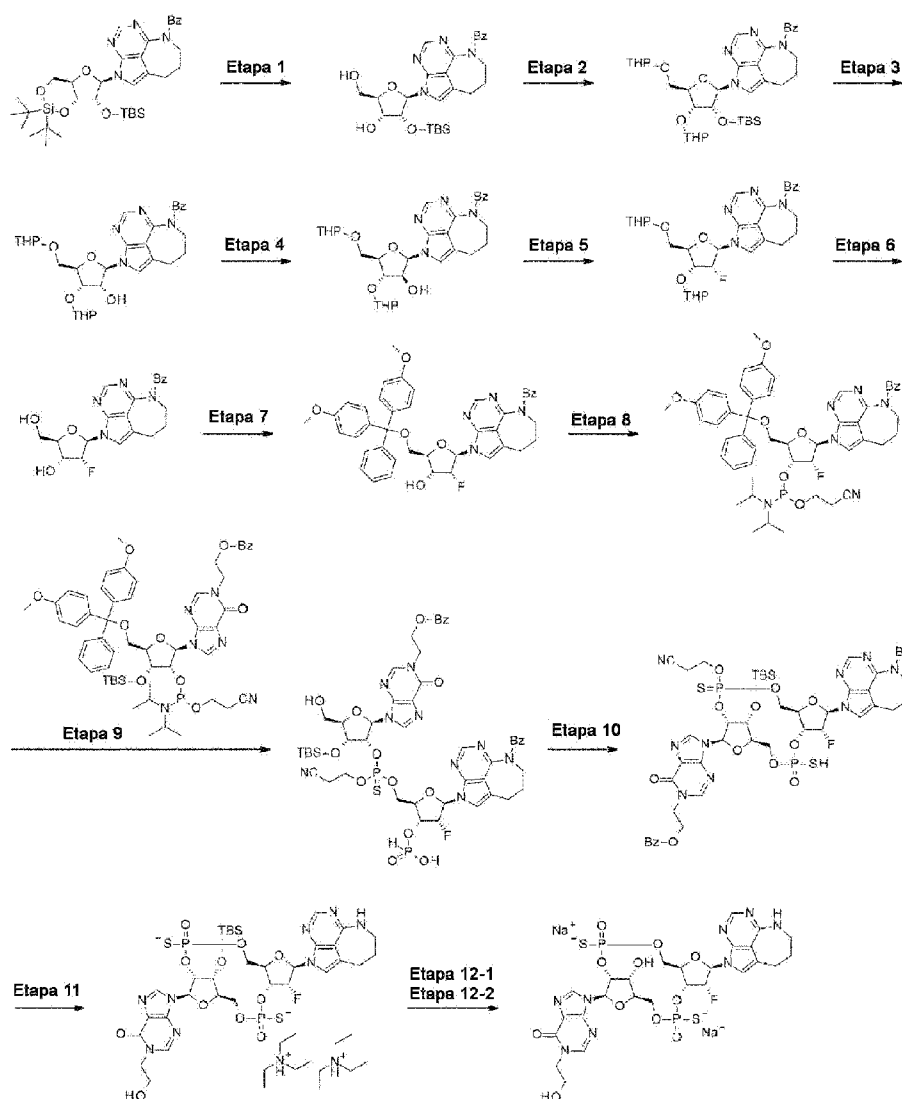


20

34a (Diastereómero 1)

34b (Diastereómero 2)

[Esquema de síntesis]



(Etapa 1)

6-Benzoil-2-{2-O-[terc-butil(dimetil)silil]-β-D-ribofuranosil}-6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azuleno

- 5 A una disolución mixta del compuesto (35,80 g) obtenido en la etapa 4 del ejemplo 1 en diclorometano (322 ml)-piridina (35 ml) se le añadió una disolución de fluoruro de hidrógeno-piridina (6,33 g) en diclorometano (36 ml) con enfriamiento con hielo durante 5 minutos, y la mezcla de reacción se agitó a la misma temperatura durante 3 horas. Se añadieron a la mezcla de reacción una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio (268 ml) y salmuera (143 ml) en este orden para inactivar la reacción, y el producto resultante se sometió a extracción con acetato de etilo. Tras secar la capa orgánica sobre sulfato de sodio anhidro, se eliminó el agente desecante por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida. Se añadió hexano/acetato de etilo (1:1) (108 ml) al residuo para hacer una pasta, que se agitó a 50 °C durante 30 minutos, y se añadió hexano (161 ml) y el producto resultante se agitó durante 2 horas. El sólido precipitado se recogió por filtración y se lavó con hexano/acetato de etilo (4:1) (143 ml) para obtener el compuesto del título (26,81 g).
- 10

MS (ESI) m/z: 525 (M+H)⁺.

- 15 RMN de ¹H (DMSO-d₆) δ: 7,98 (1H, s), 7,65 (1H, s), 7,39 (1H, m), 7,26-7,20 (4H, m), 6,19 (1H, d, J = 6,5 Hz), 5,15 (1H, t, J = 5,6 Hz), 5,00 (1H, d, J = 4,8 Hz), 4,48 (1H, t, J = 5,6 Hz), 4,27 (1H, m), 4,11-4,02 (2H, m), 3,97 (1H, m), 3,67-3,57 (2H, m), 2,99 (2H, m), 2,23-2,07 (2H, m), 0,68 (9H, s), -0,11 (3H, s), -0,26 (3H, s).

(Etapa 2)

- 20 6-Benzoil-2-{2-O-[terc-butil(dimetil)silil]-3,5-bis-O-(oxan-2-il)-β-D-ribofuranosil}-6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azuleno

A una disolución del compuesto (19,93 g) obtenido en la etapa anterior 1 y 3,4-dihidro-2H-pirano (35 ml) en N,N-dimetilformamida (200 ml) se le añadió ácido p-toluenosulfónico monohidratado (7,25 g) con refrigeración por hielo, y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. Se añadió una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio a la mezcla de reacción con refrigeración por hielo para inactivar la reacción, y la mezcla de reacción se sometió a extracción con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con agua y salmuera en este orden, y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El agente desecante se eliminó por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo] para obtener el compuesto del título (24,73 g).

RMN de ^1H (CDCl_3) δ : 8,10-8,07 (1H, m), 7,59-7,35 (1H, m), 7,35-7,27 (3H, m), 7,25-7,17 (2H, m), 6,44-6,36 (1H, m), 4,90-3,36 (13H, m), 3,06-2,96 (2H, m), 2,31-2,15 (2H, m), 2,01-1,43 (12H, m), 0,84-0,73 (9H, m), 0,04-(-0,35) (6H, m).

(Etapa 3)

6-Benzoil-2-[3,5-bis-O-(oxan-2-il)- β -D-ribofuranosil]-6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azuleno

A una disolución del compuesto (24,73 g) obtenido en la etapa 2 anterior y ácido acético (3,1 ml) en tetrahidrofurano (250 ml) se le añadió una disolución en tetrahidrofurano de fluoruro de tetrabutilamonio (aproximadamente 1 M, 55 ml) con refrigeración por hielo, y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida, se añadió acetato de etilo al residuo y el producto resultante se lavó con agua y salmuera en este orden. Tras secar la capa orgánica sobre sulfato de sodio anhidro, se eliminó el agente desecante por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo] para obtener el compuesto del título (18,74 g).

RMN de ^1H (CDCl_3) δ : 8,12-8,09 (1H, m), 7,49-7,30 (4H, m), 7,28-7,20 (2H, m), 6,41-6,30 (1H, m), 4,83-4,18 (7H, m), 4,12-3,50 (7H, m), 3,06-2,97 (2H, m), 2,31-2,17 (2H, m), 1,96-1,47 (12H, m).

(Etapa 4)

6-Benzoil-2-[3,5-bis-O-(oxan-2-il)- β -D-arabinofuranosil]-6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azuleno

A una disolución del compuesto (18,74 g) obtenido en la etapa 3 anterior y piridina (13,1 ml) en diclorometano (300 ml) se le añadió anhídrido trifluorometanosulfónico (11 ml) gota a gota con enfriamiento con hielo, y la mezcla de reacción se agitó durante 10 minutos. Se añadió salmuera a la mezcla de reacción para inactivar la reacción, el producto resultante se sometió a extracción con diclorometano y la capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El agente desecante se eliminó por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se disolvió en tetrahidrofurano (300 ml), se añadió gota a gota una solución de nitrito de tetrabutilamonio (28,34 g) en tetrahidrofurano (150 ml) con refrigeración por hielo, y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida, se añadió acetato de etilo al residuo y el producto resultante se lavó con agua y salmuera en este orden. Tras secar la capa orgánica sobre sulfato de sodio anhidro, se eliminó el agente desecante por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo] para obtener el compuesto del título (10,46 g).

RMN de ^1H (CDCl_3) δ : 8,13-8,06 (1H, m), 7,63-7,30 (4H, m), 7,29-7,18 (2H, m), 6,79-6,55 (1H, m), 4,93-3,45 (14H, m), 3,11-2,95 (2H, m), 2,32-2,14 (2H, m), 1,98-1,44 (12H, m).

(Etapa 5)

6-Benzoil-2-[2-desoxi-2-fluoro-3,5-bis-O-(oxan-2-il)- β -D-ribofuranosil]-6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azuleno

A una disolución del compuesto (10,46 g) obtenido en la etapa 4 anterior y piridina (7,3 ml) en diclorometano (200 ml) se le añadió anhídrido trifluorometanosulfónico (6,1 ml) gota a gota con enfriamiento con hielo, y la mezcla de reacción se agitó durante 10 minutos. Se añadió salmuera a la mezcla de reacción para inactivar la reacción, el producto resultante se sometió a extracción con diclorometano y la capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El agente desecante se eliminó por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se disolvió en tetrahidrofurano (200 ml), se añadió al mismo una solución de tetrahidrofurano de fluoruro de tetrabutilamonio (aproximadamente 1 M, 150 ml), y el producto resultante se agitó a la misma temperatura durante 3 horas. Se añadió una solución acuosa saturada de cloruro de amonio a la mezcla de reacción, que se sometió a extracción con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se eliminó el agente desecante por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo] para obtener el compuesto del título (7,65 g).

RMN de ^1H (CDCl_3) δ : 8,13-8,08 (1H, m), 7,53-7,31 (4H, m), 7,26-7,22 (2H, m), 6,68-6,53 (1H, m), 5,42-5,08 (1H, m), 4,93-4,18 (6H, m), 4,10-3,76 (3H, m), 3,71-3,47 (3H, m), 3,06-2,96 (2H, m), 2,29-2,18 (2H, m), 1,96-1,47 (12H, m).

(Etapa 6)

6-Benzoil-2-(2-desoxi-2-fluoro-β-D-ribofuranosil)-6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azuleno

A una disolución del compuesto (7,65 g) obtenido en la etapa 5 anterior en etanol (150 ml) se le añadió p-toluenosulfonato de piridinio (6,62 g), y la mezcla de reacción se agitó a 50 °C durante 3 horas. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida, se añadió acetato de etilo al residuo y el producto resultante se lavó con una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio y salmuera en este orden. Tras secar la capa orgánica sobre sulfato de sodio anhidro, se eliminó el agente desecante por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo] para obtener el compuesto del título (3,55 g).

RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 8,05 (1H, s), 7,41-7,35 (3H, m), 7,30-7,24 (2H, m), 7,06 (1H, s), 6,07-6,00 (2H, m), 5,85 (1H, ddd, J = 52,8, 6,7, 4,7 Hz), 4,66 (1H, d, J = 3,9 Hz), 4,42-4,31 (2H, m), 4,20 (1H, m), 3,93 (1H, dd, J = 12,9, 1,6 Hz), 3,74 (1H, td, J = 12,3, 1,6 Hz), 3,12-2,96 (2H, m), 2,51 (1H, s), 2,33-2,15 (2H, m).

(Etapa 7)

6-Benzoil-2-{5-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-2-desoxi-2-fluoro-β-D-ribofuranosil}-6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azuleno

Usando el compuesto (3,55 g) obtenido en la etapa 6 anterior, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 1 del ejemplo 11 para obtener el compuesto del título (5,77 g).

RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 8,09 (1H, s), 7,45-7,41 (2H, m), 7,36-7,17 (13H, m), 6,85-6,79 (4H, m), 6,53 (1H, dd, J = 17,2, 2,3 Hz), 5,40 (1H, ddd, J = 53,2, 4,8, 2,3 Hz), 4,83-4,72 (1H, m), 4,32-4,21 (2H, m), 4,19-4,14 (1H, m), 3,79 (3H, s), 3,79 (3H, s), 3,59 (1H, dd, J = 11,0, 2,7 Hz), 3,45 (1H, dd, J = 11,0, 3,5 Hz), 2,79 (2H, t, J = 6,3 Hz), 2,45 (1H, s), 2,24-2,11 (2H, m).

(Etapa 8)

6-Benzoil-2-(5-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-3-O-[(2-cianoetoxi)[di(propan-2-il)amino]fosfanil]-2-desoxi-2-fluoro-β-D-ribofuranosil)-6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azuleno

Usando el compuesto (5,77 g) obtenido en la etapa 7 anterior, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 6 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (5,95 g) en forma de una mezcla de diastereómeros en el átomo de fósforo (proporción de diastereómeros = 1:1).

RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 8,10 (0,5H, s), 8,09 (0,5H, s), 7,45-7,12 (15H, m), 6,84-6,75 (4H, m), 6,57-6,46 (1H, m), 5,61-5,33 (1H, m), 5,07-4,83 (1H, m), 4,34-4,18 (3H, m), 3,93-3,72 (7H, m), 3,69-3,49 (4H, m), 3,38-3,27 (1H, m), 2,87-2,68 (2H, m), 2,61 (1H, td, J = 6,3, 1,6 Hz), 2,40 (1H, td, J = 6,4, 2,1 Hz), 2,21-2,12 (2H, m), 1,21-1,13 (9H, m), 1,03 (3H, d, J = 6,7 Hz).

(Etapa 9)

Usando el compuesto (1,02 g) obtenido en la etapa 8 anterior, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 7 del ejemplo 1 para proporcionar una solución en acetonitrilo de 6-benzoil-2-{2-desoxi-2-fluoro-3-O-[hidroxio(oxo)-λ⁵-fosfanil]-β-D-ribofuranosil}-6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azuleno. Utilizando la solución en acetonitrilo obtenida y el compuesto (1,15 g) obtenido en la etapa 3 del ejemplo 22, se llevó a cabo la reacción de la misma manera que en la etapa 8 del ejemplo 1, y el producto bruto resultante se utilizó directamente para la reacción posterior.

(Etapa 10)

Benzoato de 2-{9-[(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-14-(6-benzoil-6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)-16-[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-10-(2-cianoetoxi)-15-fluoro-2-oxo-2-sulfanil-10-sulfanilidenoctahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciotetradecin-7-il]-6-oxo-6,9-dihidro-1H-purin-1-il}etilo

Usando el producto bruto obtenido en la etapa 9 anterior, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 9 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (818 mg: con impurezas) en forma de una mezcla de diastereómeros en el átomo de fósforo. MS (ESI) m/z: 1152 (M+H)⁺.

(Etapa 11)

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-16-[[Terc-butil(dimetil)silil]oxi]-15-fluoro-7-[1-(2-hidroxietil)-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il]-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciotetradecin-2,10-bis(tiolato) de bis(N,N-dietiletanaminio)

Usando el compuesto (818 mg) obtenido en la etapa 10 anterior, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 10 del ejemplo 1 para obtener el diastereómero 1 (107 mg: con impurezas) y el diastereómero 2 (101 mg: con impurezas) del compuesto del título.

Diastereómero 1 (menos polar)

5 MS (ESI) m/z: 891 (M+H)⁺.

Diastereómero 2 (más polar)

MS (ESI) m/z: 891 (M+H)⁺.

(Etapa 12-1)

10 (5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-15-Fluoro-16-hidroxi-7-[1-(2-hidroxi-etil)-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il]-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoadifosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) disódico

(Diastereómero 1)

15 Usando el compuesto (diastereómero 1) (107 mg: con impurezas) obtenido en la etapa 11 anterior, la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 11 del ejemplo 1, y la purificación se realizó a continuación según las siguientes condiciones de purificación para obtener el compuesto del título en forma de una sal de trietilamina.

[Condiciones de purificación] Cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo] y HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 5 %-30 % (0 min-30 min)].

20 La sal de trietilamina obtenida se sometió a intercambio de sales de la misma manera que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (29,1 mg).

MS (ESI) m/z: 777 (M+H)⁺.

25 RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,58 (1H, m), 8,11 (1H, m), 8,03 (1H, s), 7,11 (1H, s), 6,47 (1H, d, J = 17,5 Hz), 6,26 (1H, d, J = 8,5 Hz), 5,53-5,36 (2H, m), 5,29-5,17 (1H, m), 4,77 (1H, d, J = 4,2 Hz), 4,54-4,46 (1H, m), 4,44-4,38 (1H, m), 4,35-4,32 (1H, m), 4,30-4,25 (2H, m), 4,25-4,16 (1H, m), 4,06-3,99 (1H, m), 3,96-3,85 (1H, m), 3,82-3,71 (2H, m), 3,54-3,42 (2H, m), 2,77-2,68 (1H, m), 2,66-2,55 (1H, m), 2,02-1,81 (2H, m).

RMN de ³¹P (CD₃OD) δ: 57,5 (s), 53,0 (s).

(Etapa 12-2)

30 (5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-15-Fluoro-16-hidroxi-7-[1-(2-hidroxi-etil)-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il]-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoadifosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) disódico

(Diastereómero 2)

Usando el compuesto (diastereómero 2) (101 mg: con impurezas) obtenido en la etapa 11 anterior, la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 11 del ejemplo 1, y la purificación se realizó a continuación según las siguientes condiciones de purificación para obtener el compuesto del título en forma de una sal de trietilamina.

35 [Condiciones de purificación] Cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo] y HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 5 %-20 % (0 min-30 min)].

La sal de trietilamina obtenida se sometió a intercambio de sales de la misma manera que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (11,2 mg).

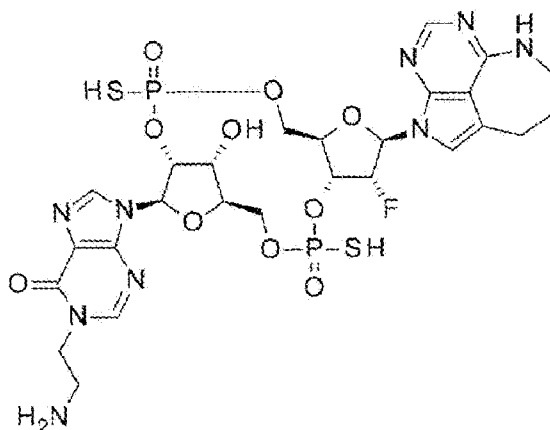
40 MS (ESI) m/z: 777 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,61 (1H, m), 8,16 (1H, m), 8,02 (1H, m), 7,36 (1H, s), 6,49 (1H, dd, J = 16,0, 2,1 Hz), 6,28 (1H, d, J = 8,5 Hz), 5,56-5,33 (3H, m), 4,58-4,49 (2H, m), 4,45-4,37 (2H, m), 4,31-4,27 (1H, m), 4,25-4,16 (1H, m), 4,10-3,98 (3H, m), 3,80 (2H, t, J = 5,1 Hz), 3,48 (2H, dd, J = 6,7, 3,6 Hz), 2,90-2,72 (2H, m), 2,00-1,90 (2H, m).

RMN de ³¹P (CD₃OD) δ: 59,5 (s), 57,7 (s).

45 Ejemplo 45: Síntesis de CDN35

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-7-[1-(2-Aminoetil)-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il]-15-fluoro-16-hidroxi-2,10-bis(sulfanil)-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-diona



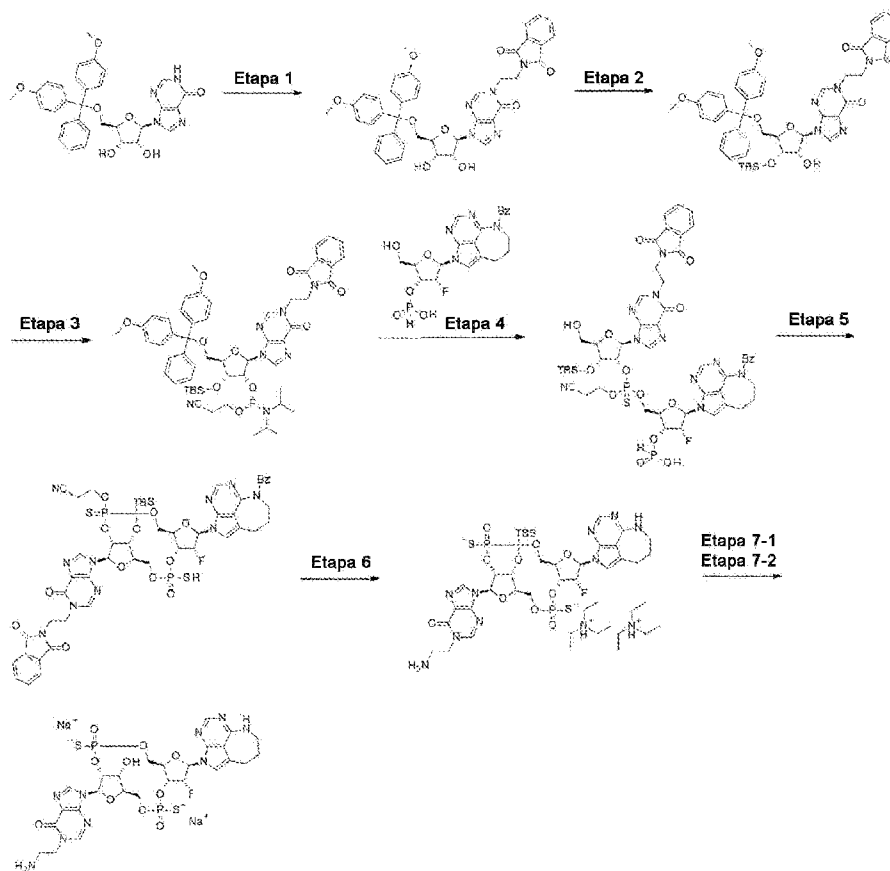
35

5

35a (Diastereómero 1)

35b (Diastereómero 2)

[Esquema de síntesis]



10 (Etapa 1)

5'-O-[Bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-1-[2-(1,3-dioxo-1,3-dihidro-2H-isoindol-2-il)etil]inosina

A una suspensión de 5'-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]inosina (13,0 g) disponible en el mercado (Aamdis Chemical) en N,N-dimetilacetamida (60 ml) se le añadieron N-(2-bromoetil)ftalimida (7,02 g) y 1,8-diazabicyclo[5.4.0]-7-undeceno (4,1 ml), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. A continuación, se añadieron N-(2-bromoetil)ftalimida (1,75 g) y 1,8-diazabicyclo[5.4.0]-7-undeceno (1,1 ml), y la mezcla de reacción se agitó durante 1 día. Se añadió agua a la mezcla de reacción para inactivar la reacción, y el producto resultante se sometió a extracción con diclorometano. Tras secar la capa orgánica sobre sulfato de sodio anhidro, se eliminó el agente desecante por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [acetato de etilo/metanol] para obtener el compuesto del título (12,4 g).

RMN de ^1H (CDCl_3) δ : 7,83 (1H, s), 7,76-7,67 (4H, m), 7,64 (1H, s), 7,35-7,33 (2H, m), 7,25-7,11 (7H, m), 6,74-6,70 (4H, m), 5,93 (1H, d, $J = 5,1$ Hz), 5,68 (1H, d, $J = 3,9$ Hz), 4,71 (1H, q, $J = 4,8$ Hz), 4,43 (1H, m), 4,37-4,18 (3H, m), 4,10-4,06 (2H, m), 3,730 (3H, s), 3,728 (3H, s), 3,51 (1H, m), 3,36 (1H, dd, $J = 10,6, 3,9$ Hz), 3,32 (1H, dd, $J = 11,0, 5,5$ Hz).

(Etapa 2)

5'-O-[Bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-3'-O-[terc-butil(dimetil)silil]-1-[2-(1,3-dioxo-1,3-dihidro-2H-isoindol-2-il)etil]inosina

Usando el compuesto (12,4 g) obtenido en la etapa 1 anterior, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 3 del ejemplo 5 para obtener el compuesto del título (4,18 g) y 5'-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-2'-O-[terc-butil(dimetil)silil]-1-[2-(1,3-dioxo-1,3-dihidro-2H-isoindol-2-il)etil]inosina (6,31 g) en forma de un regioisómero del compuesto del título.

RMN de ^1H (CDCl_3) δ : 8,00 (1H, s), 7,82-7,77 (2H, m), 7,74 (1H, s), 7,72-7,67 (2H, m), 7,41-7,39 (2H, m), 7,32-7,19 (7H, m), 6,83-6,78 (4H, m), 5,90 (1H, d, $J = 5,1$ Hz), 4,53-4,41 (3H, m), 4,32-4,25 (1H, m), 4,19-4,11 (3H, m), 3,79 (3H, s), 3,78 (3H, s), 3,46 (1H, dd, $J = 10,6, 3,1$ Hz), 3,24 (1H, dd, $J = 10,8, 4,1$ Hz), 2,98 (1H, d, $J = 6,7$ Hz), 0,85 (9H, s), 0,04 (3H, s), -0,03 (3H, s).

Regioisómero (forma 2'-O-TBS)

RMN de ^1H (CDCl_3) δ : 7,97 (1H, s), 7,82-7,78 (2H, m), 7,73-7,69 (2H, m), 7,66 (1H, s), 7,44-7,41 (2H, m), 7,33-7,18 (7H, m), 6,81 (4H, d, $J = 7,8$ Hz), 5,91 (1H, d, $J = 5,9$ Hz), 4,82 (1H, t, $J = 5,5$ Hz), 4,43 (1H, m), 4,34-4,23 (3H, m), 4,18-4,08 (2H, m), 3,79 (6H, s), 3,46 (1H, dd, $J = 10,6, 2,7$ Hz), 3,36 (1H, dd, $J = 10,6, 3,5$ Hz), 2,70 (1H, d, $J = 3,1$ Hz), 0,83 (9H, s), -0,04 (3H, s), -0,19 (3H, s).

(Etapa 3)

5'-O-[Bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-3'-O-[terc-butil(dimetil)silil]-2'-O-[(2-cianoetoxi)[di(propan-2-il)amino]fosfanil]-1-[2-(1,3-dioxo-1,3-dihidro-2H-isoindol-2-il)etil]inosina

Usando el compuesto (8,89 g) obtenido en la etapa 2 anterior, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 6 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (9,45 g) en forma de una mezcla de diastereómeros en el átomo de fósforo (proporción de diastereómeros = 1:1).

RMN de ^1H (CDCl_3) δ : 8,01 (0,5H, s), 8,00 (0,5H, s), 7,82-7,77 (2H, m), 7,74 (0,5H, s), 7,72-7,67 (2,5H, m), 7,42 (2H, d, $J = 7,8$ Hz), 7,33-7,18 (7H, m), 6,81 (4H, d, $J = 8,6$ Hz), 6,10 (0,5H, d, $J = 5,5$ Hz), 6,04 (0,5H, d, $J = 5,1$ Hz), 4,75 (0,5H, m), 4,60 (0,5H, m), 4,49-4,41 (1H, m), 4,38-4,23 (2H, m), 4,22-4,05 (3H, m), 3,79 (6H, s), 3,78-3,65 (1H, m), 3,62-3,39 (4H, m), 3,33-3,23 (1H, m), 2,49 (1H, t, $J = 6,3$ Hz), 2,34 (1H, t, $J = 6,7$ Hz), 1,12-1,08 (9H, m), 0,91 (3H, d, $J = 7,0$ Hz), 0,82 (9H, s), 0,06 (1,5H, s), 0,03 (1,5H, s), -0,03 (3H, s).

(Etapa 4)

Usando el compuesto (1,30 g) obtenido en la etapa 8 del ejemplo 44, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 7 del ejemplo 1 para proporcionar una solución en acetonitrilo de 6-benzoil-2-{2-desoxi-2-fluoro-3-O-[hidroxio(oxo)- λ^5 -fosfanil]- β -D-ribofuranosil]-6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azuleno. Utilizando la solución en acetonitrilo obtenida y el compuesto (1,50 g) obtenido en la etapa 3 anterior, se llevó a cabo la reacción de la misma manera que en la etapa 8 del ejemplo 1, y el producto bruto resultante se utilizó directamente para la reacción posterior.

(Etapa 5)

3-[(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-14-(6-Benzoil-6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)-16-{[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-7-{1-[2-(1,3-dioxo-1,3-dihidro-2H-isoindol-2-il)etil]-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il]-15-fluoro-2-oxo-2-sulfanil-10-sulfanilidenoctahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2 λ^5 ,10 λ^5 -furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxadifosfaciotetradecin-10-il]oxi]propanonitrilo

Usando el producto bruto obtenido en la etapa 4 anterior, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 9 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (828 mg) en forma de una mezcla de diastereómeros en el átomo de fósforo.

MS (ESI) m/z: 1177 (M+H)⁺.

(Etapa 6)

- 5 (5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-7-[1-(2-Aminoetil)-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il]-16-[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-15-fluoro-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciotetradecin-2,10-bis(tiolato) de bis(N,N-dietiletanaminio)

- 10 A una disolución mixta del compuesto (828 mg) obtenido en la etapa 5 anterior en etanol (5,0 ml)-tetrahidrofurano (5,0 ml) se le añadió monohidrato de hidrazina (0,342 ml), y la mezcla de reacción se agitó a 50 °C durante 6 horas. Tras concentrar la mezcla de reacción a presión reducida, el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo] para obtener el diastereómero 1 (90,9 mg: con impurezas) y el diastereómero 2 (91,1 mg: con impurezas) del compuesto del título.

Diastereómero 1 (menos polar)

MS (ESI) m/z: 890 (M+H)⁺.

Diastereómero 2 (más polar)

- 15 MS (ESI) m/z: 890 (M+H)⁺.

(Etapa 7-1)

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-7-[1-(2-Aminoetil)-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il]-15-fluoro-16-hidroxi-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciotetradecin-2,10-bis(tiolato) disódico

- 20 (Diastereómero 1)

Usando el compuesto (90,9 mg: con impurezas) obtenido en la etapa 6 anterior (diastereómero 1), la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 11 del ejemplo 1, y la purificación se realizó a continuación según las siguientes condiciones de purificación para obtener el compuesto del título en forma de una sal de trietilamina.

- 25 [Condiciones de purificación] Cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo] y HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/solución de acetonitrilo-metanol (1:1), solución de acetonitrilo-metanol (1:1): del 10 %-50 % (0 min-40 min)].

La sal de trietilamina obtenida se sometió a intercambio de sales de la misma manera que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (20,2 mg).

MS (ESI) m/z: 776 (M+H)⁺.

- 30 RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,54 (1H, s), 8,03 (1H, s), 7,99 (1H, s), 7,13 (1H, s), 6,44 (1H, d, J = 18,1 Hz), 6,22 (1H, d, J = 7,9 Hz), 5,56-5,38 (2H, m), 5,33-5,21 (1H, m), 4,72 (1H, d, J = 4,2 Hz), 4,58-4,49 (1H, m), 4,41-4,24 (4H, m), 4,24-4,17 (1H, m), 4,05-3,98 (1H, m), 3,86-3,76 (1H, m), 3,50-3,42 (2H, m), 3,27-3,16 (2H, m), 2,78-2,68 (1H, m), 2,59-2,49 (1H, m), 1,98-1,80 (2H, m).

RMN de ³¹P (CD₃OD) δ: 57,5 (s), 53,1 (s).

- 35 (Etapa 7-2)

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-7-[1-(2-Aminoetil)-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il]-15-fluoro-16-hidroxi-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciotetradecin-2,10-bis(tiolato) disódico

(Diastereómero 2)

- 40 Usando el compuesto (diastereómero 2) (91,1 mg: con impurezas) obtenido en la etapa 6 anterior, la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 11 del ejemplo 1, y la purificación se realizó a continuación según las siguientes condiciones de purificación para obtener el compuesto del título en forma de una sal de trietilamina.

- 45 [Condiciones de purificación] Cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo] y HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/solución de acetonitrilo-metanol (1:1), solución de acetonitrilo-metanol (1:1): del 10 %-45 % (0 min-40 min)].

La sal de trietilamina obtenida se sometió a intercambio de sales de la misma manera que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (26,3 mg).

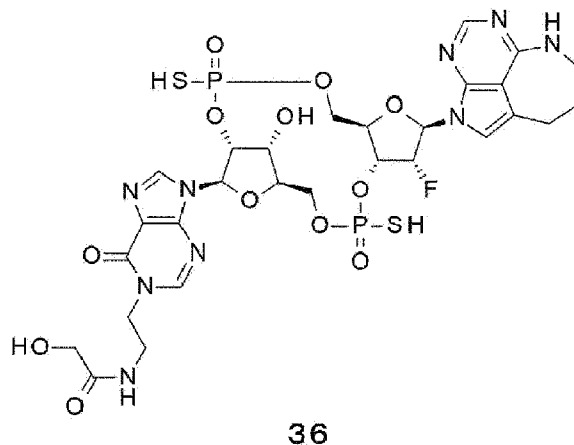
MS (ESI) m/z: 776 (M+H)⁺.

RMN de ^1H (CD_3OD) δ : 8,56 (1H, s), 8,08 (1H, s), 8,02 (1H, s), 7,37 (1H, s), 6,48 (1H, d, $J = 16,2$ Hz), 6,23 (1H, d, $J = 7,9$ Hz), 5,58-5,32 (3H, m), 4,65-4,27 (6H, m), 4,07-3,96 (3H, m), 3,48-3,42 (2H, m), 3,38-3,23 (2H, m), 2,85-2,75 (1H, m), 2,69-2,59 (1H, m), 1,99-1,81 (2H, m).

RMN de ^{31}P (CD_3OD) δ : 59,0 (s), 57,6 (s).

5 Ejemplo 46: Síntesis de CDN36

N-(2-{9-[(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-15-Fluoro-16-hidroxi-2,10-dioxo-2,10-bis(sulfanil)-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzoc[d]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2 λ^5 ,10 λ^5 -furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciotetradecin-7-il]-6-oxo-6,9-dihidro-1H-purin-1-il}etil)-2-hidroxiacetamida

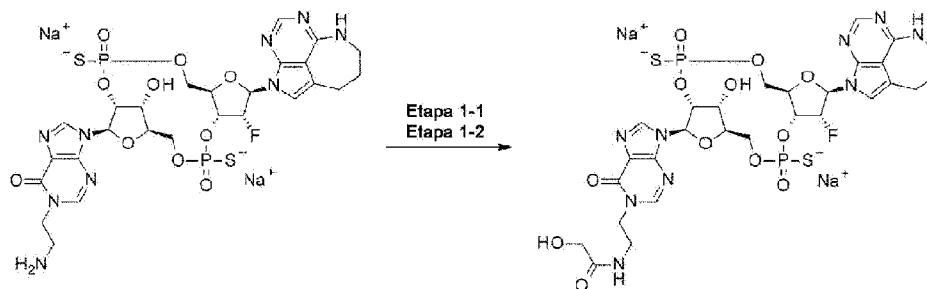


10

36a (Diastereómero 1)

36b (Diastereómero 2)

[Esquema de síntesis]



15 (Etapa 1-1)

(5R,7R,8S,12aR,14R,15R,15aS,16R)-16-Fluoro-15-hidroxi-7-[1-[2-(2-hidroxiacetamida)etil]-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il]-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzoc[d]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2 λ^5 ,10 λ^5 -furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciotetradecin-2,10-bis(tiolato) disódico

(Diastereómero 1)

20 Usando el compuesto (15,0 mg) obtenido en la etapa 7-1 del ejemplo 45, la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 1-1 del ejemplo 7, y la purificación se realizó a continuación según las siguientes condiciones de purificación para obtener el compuesto del título en forma de una sal de trietilamina.

[Condiciones de purificación] Cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo] y HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/solución de acetonitrilo-metanol (1:1), solución de acetonitrilo-metanol (1:1): del 10 %-45 % (0 min-40 min)].

25

La sal de trietilamina obtenida se sometió a intercambio de sales de la misma manera que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (10,3 mg).

MS (ESI) m/z: 834 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,46 (1H, ma), 8,04 (1H, s), 7,82 (1H, ma), 7,15 (1H, ma), 6,43 (1H, dd, J = 16,9 Hz), 6,17 (1H, dd, J = 9,1, 4,5 Hz), 5,70-5,24 (3H, m), 4,81-4,75 (1H, m), 4,52-4,44 (1H, m), 4,43-4,26 (4H, m), 4,24-3,94 (2H, m), 3,89-3,84 (2H, m), 3,72-3,37 (5H, m), 2,75-2,65 (1H, m), 2,48-2,32 (1H, m), 1,98-1,76 (2H, m). RMN de ³¹P (CD₃OD) δ: 57,0 (s), 53,0 (s).

(Etapa 1-2)

(5R,7R,8S,12aR,14R,15R,15aS,{1-[2-(2-Hidroxiacetamida)etil]-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il}-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfacilotetradecin-2,10-bis(tiolato) disódico

10 (Diastereómero 2)

Usando el compuesto (15,0 mg) obtenido en la etapa 7-2 del ejemplo 45, la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 1-1 del ejemplo 7, y la purificación se realizó a continuación según las siguientes condiciones de purificación para obtener el compuesto del título en forma de una sal de trietilamina.

[Condiciones de purificación] Cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo] y HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/solución de acetonitrilo-metanol (1:1), solución de acetonitrilo-metanol (1:1): del 10 %-45 % (0 min-40 min)].

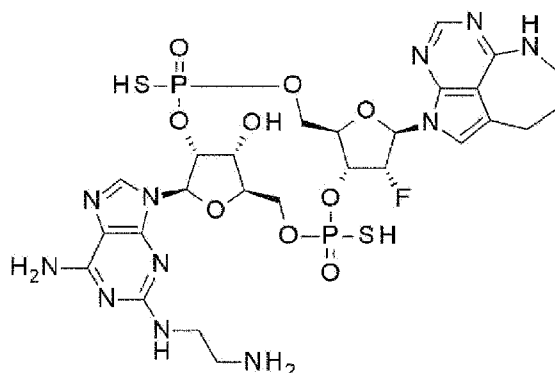
La sal de trietilamina obtenida se sometió a intercambio de sales de la misma manera que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (10,6 mg).

MS (ESI) m/z: 834 (M+H)⁺.

20 RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,54 (1H, sa), 8,03 (1H, s), 7,97 (1H, sa), 7,35 (1H, sa), 6,48 (1H, d, J = 15,7 Hz), 6,23 (1H, d, J = 8,5 Hz), 5,65-5,39 (3H, m), 4,57-4,47 (2H, m), 4,46-4,36 (2H, m), 4,31-4,19 (2H, m), 4,07-3,96 (2H, m), 3,95-3,78 (3H, m), 3,67-3,43 (4H, m), 2,85-2,75 (1H, m), 2,71-2,59 (1H, m), 2,00-1,84 (2H, m). RMN de ³¹P (CD₃OD) δ: 59,1 (s), 57,5 (s).

Ejemplo 47: Síntesis de CDN37

25 (5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-7-{6-Amino-2-[(2-aminoetil)amino]-9H-purin-9-il}-15-fluoro-16-hidroxi-2,10-bis(sulfanil)-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfacilotetradecin-2,10-diona

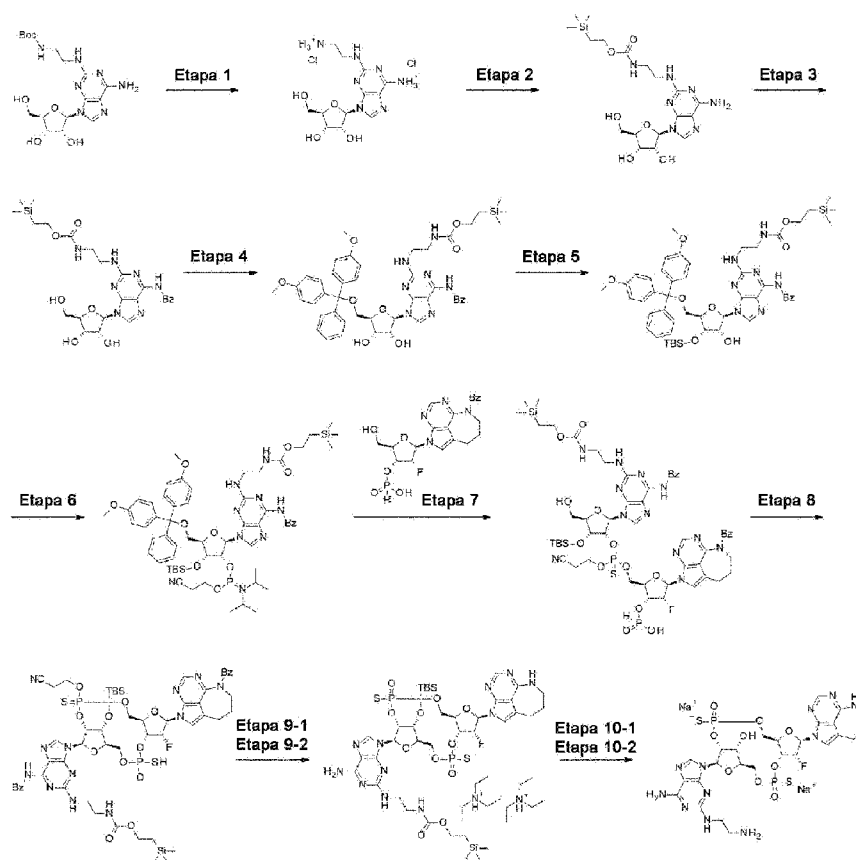


37

37a (Diastereómero 1)

37b (Diastereómero 2)

[Esquema de síntesis]



(Etapa 1)

Dicloruro de 2-[(2-azaniioleil)amino]adenosina

- 5 A una disolución de 2-[(2-azaniioleil)amino]adenosina (28,7 g) como compuesto conocido en la bibliografía (documento WO 2012/159072) en metanol (240 ml) se le añadió una disolución en dioxano de cloruro de hidrógeno (aproximadamente 4 M, 240 ml), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche. La mezcla de reacción se concentró a aproximadamente 50 ml a presión reducida, y el sólido precipitado se suspendió en éter dietílico y se recogió por filtración para obtener el compuesto del título (28,8 g).

- 10 RMN de ^1H (CD_3OD) δ : 8,32 (1H, s), 5,98 (1H, d, $J = 6,0$ Hz), 4,51 (1H, t, $J = 5,4$ Hz), 4,30 (1H, dd, $J = 5,1, 3,3$ Hz), 4,14-4,11 (1H, m), 3,86-3,72 (4H, m), 3,23 (2H, t, $J = 6,0$ Hz).

(Etapa 2)

2-[(2-([2-(Trimetilsilil)etoxi]carbonyl)amino]etil]amino}adenosina

- 15 A una mezcla del compuesto (28,8 g) obtenido en la etapa 1 anterior en tetrahidrofurano (330 ml)-agua (70 ml) se le añadió trietilamina (37 ml) y 1-([2-(trimetilsilil)etoxi]carbonyl)pirrolidin-2,5-diona (18,4 g), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida y se destiló azeotrópicamente con tolueno. El residuo se suspendió en tolueno y el sólido se recogió por filtración. El sólido obtenido se disolvió en diclorometano y metanol, y el producto resultante se concentró a presión reducida. Se añadió tetrahidrofurano al residuo, se eliminó por filtración el sólido precipitado y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se disolvió en diclorometano y metanol, y el producto resultante se concentró a presión reducida. El sólido precipitado se suspendió en diclorometano y se recogió por filtración para obtener el compuesto del título (22,5 g).

- 20 RMN de ^1H (CD_3OD) δ : 7,92 (1H, s), 5,83 (1H, d, $J = 6,0$ Hz), 4,77 (1H, t, $J = 5,4$ Hz), 4,33 (1H, dd, $J = 4,8, 3,0$ Hz), 4,14-4,10 (3H, m), 3,87 (1H, dd, $J = 12,4, 2,7$ Hz), 3,73 (1H, dd, $J = 12,1, 3,0$ Hz), 3,50-3,42 (2H, m), 3,32-3,29 (2H, m), 0,98-0,86 (2H, m), 0,03 (9H, s).

(Etapa 3)

- 25 N-Benzoyl-2-([2-([2-(trimetilsilil)etoxi]carbonyl)amino]etil]amino}adenosina

Usando el compuesto (24,7 g) obtenido en la etapa 2 anterior, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 3 del ejemplo 11 para obtener el compuesto del título (22,1 g).

RMN de ^1H (CD_3OD) δ : 8,19 (1H, s), 8,05 (2H, d, $J = 7,9$ Hz), 7,63 (1H, t, $J = 7,6$ Hz), 7,54 (2H, t, $J = 7,6$ Hz), 5,95 (1H, d, $J = 5,4$ Hz), 4,75 (1H, t, $J = 5,4$ Hz), 4,36 (1H, t, $J = 4,5$ Hz), 4,11-4,07 (3H, m), 3,86 (1H, dd, $J = 12,4, 3,3$ Hz), 3,75 (1H, dd, $J = 12,1, 3,6$ Hz), 3,59-3,47 (2H, m), 3,36-3,33 (2H, m), 0,92 (2H, t, $J = 8,2$ Hz), 0,00 (9H, s).

(Etapla 4)

N-Benzoil-5'-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-2-[[2-((2-(trimetilsilil)etoxi)carbonil)amino)etil]amino]adenosina

Usando el compuesto (22,1 g) obtenido en la etapa 3 anterior, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 1 del ejemplo 11 para obtener el compuesto del título (29,5 g).

RMN de ^1H ($\text{DMSO}-d_6$) δ : 10,7 (1H, s), 8,09 (1H, s), 8,01-7,99 (2H, m), 7,64-7,60 (1H, m), 7,52 (2H, t, $J = 7,6$ Hz), 7,36-7,34 (2H, m), 7,26-7,17 (7H, m), 7,05-7,02 (1H, m), 6,95-6,92 (1H, m), 6,85-6,80 (4H, m), 5,88 (1H, d, $J = 4,8$ Hz), 5,53 (1H, d, $J = 5,4$ Hz), 5,20 (1H, d, $J = 5,4$ Hz), 4,72-4,63 (1H, m), 4,34-4,26 (1H, m), 4,05-3,99 (3H, m), 3,72-3,71 (6H, m), 3,31-3,10 (6H, m), 0,89 (2H, t, $J = 8,5$ Hz), 0,00 (9H, s).

(Etapla 5)

N-Benzoil-5'-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-3'-O-[terc-butil(dimetil)silil]-2-[[2-((2-(trimetilsilil)etoxi)carbonil)amino)etil]amino]adenosina

Usando el compuesto (29,5 g) obtenido en la etapa 4 anterior, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 3 del ejemplo 5 para obtener el compuesto del título (6,85 g).

RMN de ^1H ($\text{DMSO}-d_6$, 90°C) δ : 10,3 (1H, sa), 8,02 (1H, s), 7,99 (2H, d, $J = 7,3$ Hz), 7,60 (1H, t, $J = 7,3$ Hz), 7,51 (2H, t, $J = 7,6$ Hz), 7,37 (2H, d, $J = 7,3$ Hz), 7,28-7,20 (7H, m), 6,85-6,82 (4H, m), 6,69-6,53 (2H, m), 5,86 (1H, d, $J = 5,4$ Hz), 5,07-5,04 (1H, m), 4,80-4,74 (1H, m), 4,36-4,33 (1H, m), 4,08-3,99 (3H, m), 3,74 (6H, s), 3,37-3,15 (6H, m), 0,89 (2H, t, $J = 7,9$ Hz), 0,86 (9H, s), 0,09 (3H, s), 0,04 (3H, s), 0,01 (9H, s).

(Etapla 6)

N-Benzoil-5'-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-3'-O-[terc-butil(dimetil)silil]-2'-O-((2-cianoetoxi)[di(propan-2-il)amino]fosfanil)-2-[[2-(2-(trimetilsilil)etoxi)carbonil)amino)etil]amino]adenosina

Usando el compuesto (6,22 g) obtenido en la etapa 5 anterior, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 6 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (6,18 g) en forma de una mezcla de diastereómeros en el átomo de fósforo (proporción de diastereómeros = 1:1).

RMN de ^1H (CD_3Cl) δ : 8,82 (1H, s), 8,00-7,97 (2H, m), 7,88 (0,5H, s), 7,85 (0,5H, s), 7,59 (1H, t, $J = 7,0$ Hz), 7,51 (2H, t, $J = 7,6$ Hz), 7,43 (2H, d, $J = 7,3$ Hz), 7,33-7,20 (7H, m), 6,81 (4H, d, $J = 8,5$ Hz), 6,08-6,01 (1H, m), 5,19-4,88 (2H, m), 4,51-4,42 (1H, m), 4,20-4,08 (3H, m), 3,82-3,24 (11H, m), 3,78 (6H, s), 2,52 (1H, s, $J = 6,3$ Hz), 2,38-2,34 (1H, m), 1,14-1,09 (9H, m), 0,90-0,85 (2H, m), 0,87 (9H, s), 0,12 (1,5H, s), 0,09 (1,5H, s), 0,03 (3H, s), -0,01 (9H, s).

(Etapla 7)

Usando el compuesto (1,03 g) obtenido en la etapa 8 del ejemplo 44, la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 7 del ejemplo 1 para proporcionar una solución en acetonitrilo de 6-benzoil-2-{2-desoxi-2-fluoro-3-O-[hidroxioxo)- λ^5 -fosfanil]- β -D-ribofuranosil]-6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azuleno. Utilizando la solución en acetonitrilo obtenida y el compuesto (999 mg) obtenido en la etapa 6 anterior, se llevó a cabo la reacción de la misma manera que en la etapa 8 del ejemplo 1, y el producto bruto resultante se utilizó directamente para la reacción posterior.

(Etapla 8)

[2-((6-Benzamido-9-[(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-14-(6-benzoil-6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)-16-[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-10-(2-cianoetoxi)-15-fluoro-2-oxo-2-sulfanil-10-sulfanilidenooctahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2 λ^5 ,10 λ^5 -furo[3,2-I][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxadifosfaciotetradecin-7-il]-9H-purin-2-il]amino)etil]carbamato de 2-(trimetilsilil)etilo

Usando la mezcla obtenida en la etapa 7 anterior, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 9 del ejemplo 1 para obtener el diastereómero 1 (370 mg: con impurezas) y el diastereómero 2 (201 mg: con impurezas) del compuesto del título.

Diastereómero 1 (menos polar)

MS (ESI) m/z : 1307 (M-H) $^-$.

Diastereómero 2 (más polar)

MS (ESI) m/z: 1307 (M-H)⁺.

(Etapa 9-1)

- 5 (5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-7-(6-Amino-2-([2-([2-(trimetilsilil)etoxi]carbonil)amino)etil]amino)-9H-purin-9-il)-16-([terc-butil(dimetil)silil]oxi)-15-fluoro-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) de bis(N,N-dietiletanaminio)

Usando el compuesto (370 mg: con impurezas) obtenido en la etapa 8 anterior (diastereómero 1), la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 10 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (134 mg: con impurezas).

MS (ESI) m/z: 1048 (M+H)⁺.

- 10 (Etapa 9-2)

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-7-(6-Amino-2-([2-([2-(trimetilsilil)etoxi]carbonil)amino)etil]amino)-9H-purin-9-il)-16-([terc-butil(dimetil)silil]oxi)-15-fluoro-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) de bis(N,N-dietiletanaminio)

- 15 Usando el compuesto (diastereómero 2) (201 mg: con impurezas) obtenido en la etapa 8 anterior, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 10 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (49,1 mg: con impurezas).

MS (ESI) m/z: 1048 (M+H)⁺.

(Etapa 10-1)

- 20 (5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-7-{6-Amino-2-[(2-aminoetil)amino]-9H-purin-9-il}-15-fluoro-16-hidroxi-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) disódico

(Diastereómero 1)

- 25 Usando el compuesto (134 mg) obtenido en la etapa 9-1 anterior, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 5 del ejemplo 40, y el producto resultante se purificó a continuación mediante cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo] para obtener el compuesto del título en forma de una sal de trietilamina.

La sal de trietilamina obtenida se sometió a intercambio de sales de la misma manera que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (22 mg).

- 30 MS (ESI) m/z: 790 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,04 (1H, sa), 8,01 (1H, s), 7,06 (1H, s), 6,43 (1H, d, J = 16,9 Hz), 6,00 (1H, d, J = 7,3 Hz), 5,78-5,55 (1H, m), 5,39 (1H, dd, J = 51,7, 3,9 Hz), 5,31-5,18 (1H, m), 4,80 (1H, d, J = 3,6 Hz), 4,50-4,44 (1H, m), 4,40-4,32 (4H, m), 4,14-4,10 (1H, m), 3,52-3,40 (2H, m), 3,35-3,23 (2H, m), 3,06-2,90 (2H, m), 2,63-2,53 (1H, m), 2,40-2,20 (1H, m), 1,99-1,76 (2H, m).

- 35 RMN de ³¹P (CD₃OD) δ: 57,2 (s), 52,6 (s).

(Etapa 10-2)

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-7-{6-Amino-2-[(2-aminoetil)amino]-9H-purin-9-il}-15-fluoro-16-hidroxi-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) disódico

- 40 (Diastereómero 2)

Usando el compuesto (49,1 mg: con impurezas) obtenido en la etapa 9-2 anterior, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 5 del ejemplo 40, y el producto resultante se purificó a continuación mediante cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo] para obtener el compuesto del título en forma de una sal de trietilamina.

- 45 La sal de trietilamina obtenida se sometió a intercambio de sales de la misma manera que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (21 mg).

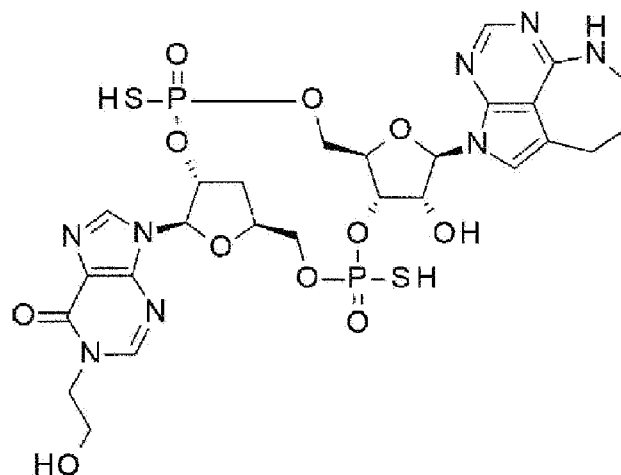
MS (ESI) m/z: 790 (M+H)⁺.

RMN de ^1H (CD_3OD) δ : 8,02 (1H, sa), 8,01 (1H, s), 7,40 (1H, s), 6,48 (1H, d, $J = 16,3$ Hz), 6,01 (1H, d, $J = 7,9$ Hz), 5,80-5,63 (1H, m), 5,45-5,28 (2H, m), 4,54-4,48 (2H, m), 4,41-4,36 (2H, m), 4,28-4,20 (2H, m), 4,08-4,03 (1H, m), 3,54-3,41 (2H, m), 3,40-2,52 (6H, m), 2,03-1,84 (2H, m).

RMN de ^{31}P (CD_3OD) δ : 57,8 (s).

5 Ejemplo 48: Síntesis de CDN38

(5S,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS)-15-Hidroxi-7-[1-(2-hidroxi-etil)-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il]-2,10-bis(sulfanil)-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2 λ^5 ,10 λ^5 -furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaóxadifosfaciclotetradecin-2,10-diona



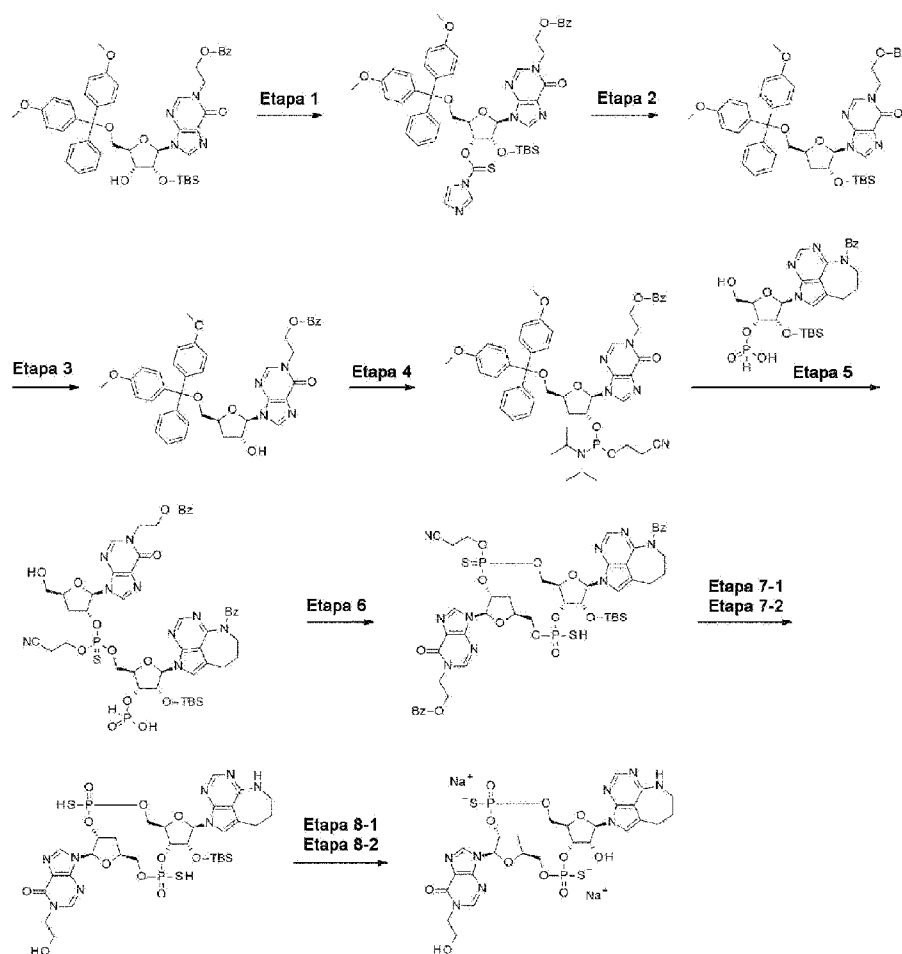
38

10

38a (Diastereómero 1)

38b (Diastereómero 2)

[Esquema de síntesis]



(Etapa 1)

1-[2-(Benzoiloxi)etil]-5'-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-2'-O-[terc-butil(dimetil)silil]-3'-O-(1H-imidazol-1-carbothioil)inosina

- 5 A una solución del compuesto (forma 2'-O-TBS) (1,45 g) obtenido en la etapa 2 del ejemplo 22 en N,N-dimetilformamida (8,7 ml) se le añadieron N,N-dimetil-4-aminopiridina (213 mg), y di(1H-imidazol-1-il)metanotona (1,55 g) a temperatura ambiente, y la mezcla de reacción se agitó durante 20 horas. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo y se lavó con una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio y salmuera en este orden. Tras secar la capa orgánica sobre sulfato de sodio anhidro, se eliminó el agente desecante por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo] para obtener el compuesto del título (1,58 g).

MS (ESI) m/z: 943 (M+H)⁺.

- 15 RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 8,38 (1H, s), 8,05 (1H, s), 8,02-7,94 (3H, m), 7,93 (1H, s), 7,66-7,65 (1H, m), 7,60-7,52 (1H, m), 7,46-7,18 (10H, m), 7,08 (1H, s), 6,83-6,80 (4H, m), 6,07 (1H, dd, J = 5,4, 3,0 Hz), 6,02 (1H, dd, J = 6,0 Hz), 5,20 (1H, dd, J = 6,7, 5,4 Hz), 4,72-4,63 (2H, m), 4,55-4,38 (3H, m), 3,78 (3H, s), 3,77 (3H, s), 3,57-3,56 (2H, m), 0,65 (9H, s), -0,11 (3H, s), -0,26 (3H, s).

(Etapa 2)

1-[2-(Benzoiloxi)etil]-5'-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-2'-O-[terc-butil(dimetil)silil]-3'-desoxinosina

- 20 A una solución del compuesto (1,69 g) obtenido en la etapa 1 anterior en benceno (10 ml) se le añadieron hidruro de tributilestaño (1,42 ml) y 2,2'-azobis(isobutironitrilo) (29,4 mg) a temperatura ambiente, y la mezcla de reacción se agitó a 80 °C durante 4 horas. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo] para obtener el compuesto del título (1,12 g).

MS (ESI) m/z: 817 (M+H)⁺.

RMN de ^1H (CDCl_3) δ : 7,99-7,96 (4H, m), 7,60-7,55 (1H, m), 7,46-7,19 (11H, m), 6,83-6,81 (4H, m), 5,94 (1H, d, $J = 1,2$ Hz), 4,68-4,60 (4H, m), 4,52-4,39 (2H, m), 3,79 (6H, s), 3,42-3,34 (2H, m), 2,15-2,08 (1H, m), 1,94-1,89 (1H, m), 0,86 (9H, s), 0,06 (3H, s), 0,04 (3H, s).

(Etapa 3)

5 1-[2-(Benzoiloxi)etil]-5'-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-3'-desoxinosina

A una disolución del compuesto (1,75 g) obtenido en la etapa 2 anterior en tetrahidrofurano (11 ml) se le añadió una disolución en tetrahidrofurano de fluoruro de tetrabutilamonio (aproximadamente 1 M, 2,6 ml) a 0 °C, y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo] para obtener el compuesto del título (1,29 g).

MS (ESI) m/z : 703 ($M+H$) $^+$.

RMN de ^1H (CDCl_3) δ : 7,99-7,95 (4H, m), 7,60-7,55 (1H, m), 7,45-7,37 (4H, m), 7,29-7,17 (7H, m), 6,81-6,78 (4H, m), 5,88 (1H, d, $J = 3,0$ Hz), 4,76-4,63 (4H, m), 4,52-4,40 (2H, m), 3,78 (6H, s), 3,36 (1H, dd, $J = 10,3, 3,0$ Hz), 3,29 (1H, dd, $J = 10,3, 4,8$ Hz), 2,30-2,23 (1H, m), 2,18-2,12 (1H, m) (sólo se muestran los picos observables)

15 (Etapa 4)

1-[2-(Benzoiloxi)etil]-5'-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-2'-O-[(2-cianoetoxi)[di(propan-2-il)amino]fosfanil]-3'-desoxinosina

20 Usando el compuesto (1,28 g), obtenido en la etapa 3 anterior se llevó a cabo la reacción de la misma manera que en la etapa 4 del ejemplo 5 para obtener el compuesto del título (1,47 g) en forma de una mezcla de diastereómeros en el átomo de fósforo (proporción de diastereómeros = 1:1).

MS (ESI) m/z : 820 ($M-C_6H_{14}N+OH+H$) $^+$.

RMN de ^1H (CDCl_3) δ : 7,99-7,94 (4H, m), 7,59-7,56 (1H, m), 7,46-7,42 (4H, m), 7,33-7,18 (7H, m), 6,81 (4H, d, $J = 8,5$ Hz), 6,13 (0,5H, sa), 6,07 (0,5H, sa), 4,84-4,39 (6H, m), 3,84-3,52 (10H, m), 3,42-3,34 (2H, m), 2,59 (1H, t, $J = 6,3$ Hz), 2,52 (1H, t, $J = 6,3$ Hz), 2,30-2,07 (2H, m), 1,18-1,07 (12H, m).

25 (Etapa 5)

Se llevó a cabo la misma reacción que en la etapa 7 del ejemplo 1 en la siguiente escala (materia prima: 836 mg). Utilizando una solución de acetonitrilo del compuesto obtenido y el compuesto (735 mg) obtenido en la etapa 4 anterior, se llevó a cabo la reacción de la misma manera que en la etapa 8 del ejemplo 1, y el producto bruto resultante se utilizó directamente para la reacción posterior.

30 (Etapa 6)

Benzoato de 2-{9-[(5S,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR)-14-(6-benzoil-6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)-15-[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-10-(2-cianoetoxi)-2-oxo-2-sulfanil-10-sulfanilidenooctahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2 λ^5 ,10 λ^5 -furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciotetradecin-7-il]-6-oxo-6,9-dihidro-1H-purin-1-il}etilo

35 Usando el producto bruto obtenido en la etapa 5 anterior, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 9 del ejemplo 1 para obtener el diastereómero 1 (67,6 mg) y el diastereómero 2 (91,6 mg) del compuesto del título (tiempo de retención en HPLC: diastereómero 1 > 2).

Diastereómero 1 (menos polar)

MS (ESI) m/z : 1134 ($M+H$) $^+$.

40 Diastereómero 2 (más polar)

MS (ESI) m/z : 1134 ($M+H$) $^+$.

(Etapa 7-1)

45 (5S,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR)-15-[[Terc-butil(dimetil)silil]oxi]-7-[1-(2-hidroxi)etil]-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il]-2,10-bis(sulfanil)-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il]octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2 λ^5 ,10 λ^5 -furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciotetradecin-2,10-diona

Usando el compuesto (diastereómero 1) (67,6 mg) obtenido en la etapa 6 anterior, la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 10 del ejemplo 1, y el producto resultante se purificó por HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 0 %-50 % (0 min-30 min)] para obtener el compuesto del título (34,9 mg).

MS (ESI) m/z: 873 (M+H)⁺.

(Etapa 7-2)

(5S,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR)-15-[[Terc-butil(dimetil)silil]oxi]-7-[1-(2-hidroxi-etil)-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il]-2,10-bis(sulfanil)-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzoc[d]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-diona

Usando el compuesto (diastereómero 2) (91,6 mg) obtenido en la etapa 6 anterior, la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 10 del ejemplo 1, y el producto resultante se purificó por HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetronitrilo, acetronitrilo: del 0 %-50 % (0 min-30 min)] para obtener el compuesto del título (44,2 mg).

MS (ESI) m/z: 873 (M+H)⁺.

(Etapa 8-1)

(5S,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS)-15-Hidroxi-7-[1-(2-hidroxi-etil)-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il]-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzoc[d]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) disódico

(Diastereómero 1)

Usando el compuesto (34,9 mg) obtenido en la etapa 7-1 anterior, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 11 del ejemplo 1, y el producto resultante se purificó a continuación con un Sep-Pak (R) C18 [solución acuosa al 0,1 % de trietilamina/acetronitrilo] para obtener el compuesto del título en forma de una sal de trietilamina.

La sal de trietilamina obtenida se sometió a intercambio de sales de la misma manera que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (21,9 mg).

MS (ESI) m/z: 759 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,34 (1H, sa), 8,23 (1H, s), 8,02 (1H, s), 7,24 (1H, sa), 6,28 (1H, d, J = 3,6 Hz), 6,15 (1H, d, J = 3,0 Hz), 5,37-5,32 (1H, m), 4,99-4,93 (1H, m), 4,74-4,58 (3H, m), 4,36-4,29 (2H, m), 4,24-4,13 (3H, m), 4,00-3,91 (1H, m), 3,82 (2H, t, J = 4,8 Hz), 3,51-3,49 (2H, m), 3,00-2,90 (3H, m), 2,57-2,51 (1H, m), 2,02-1,97 (2H, m).

RMN de ³¹P (CD₃OD) δ: 59,7 (s), 56,2 (s).

(Etapa 8-2)

(5S,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS)-15-Hidroxi-7-[1-(2-hidroxi-etil)-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il]-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzoc[d]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) disódico

(Diastereómero 2)

Usando el compuesto (44,2 mg) obtenido en la etapa 7-2 anterior, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 11 del ejemplo 1, y el producto resultante se purificó a continuación con un Sep-Pak (R) C18 [solución acuosa al 0,1 % de trietilamina/acetronitrilo] para obtener el compuesto del título en forma de una sal de trietilamina.

La sal de trietilamina obtenida se sometió a intercambio de sales de la misma manera que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (26,5 mg).

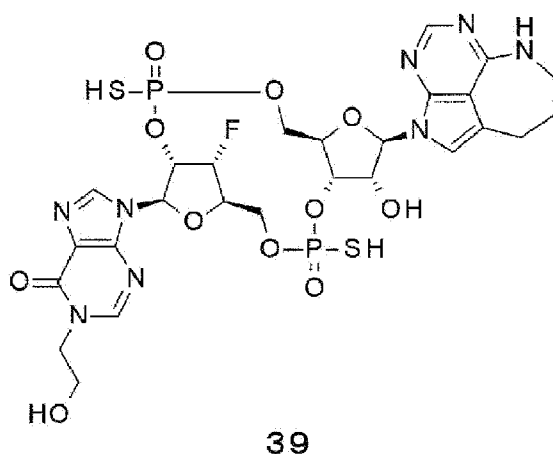
MS (ESI) m/z: 759 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,48-8,46 (1H, ma), 8,24 (1H, s), 8,03 (1H, s), 7,41-7,38 (1H, ma), 6,32 (1H, d, J = 4,8 Hz), 6,15 (1H, d, J = 4,2 Hz), 5,46-5,41 (1H, m), 5,21-5,17 (1H, m), 4,68-4,65 (1H, m), 4,59-4,54 (2H, m), 4,50-4,44 (1H, m), 4,35-4,32 (1H, m), 4,21-4,18 (2H, m), 4,02-3,92 (2H, m), 3,84-3,81 (2H, m), 3,52-3,50 (2H, m), 2,96-2,83 (3H, m), 2,54-2,48 (1H, m), 2,03-1,98 (2H, m).

RMN de ³¹P (CD₃OD) δ: 60,3 (s), 59,1 (s).

Ejemplo 49: Síntesis de CDN39

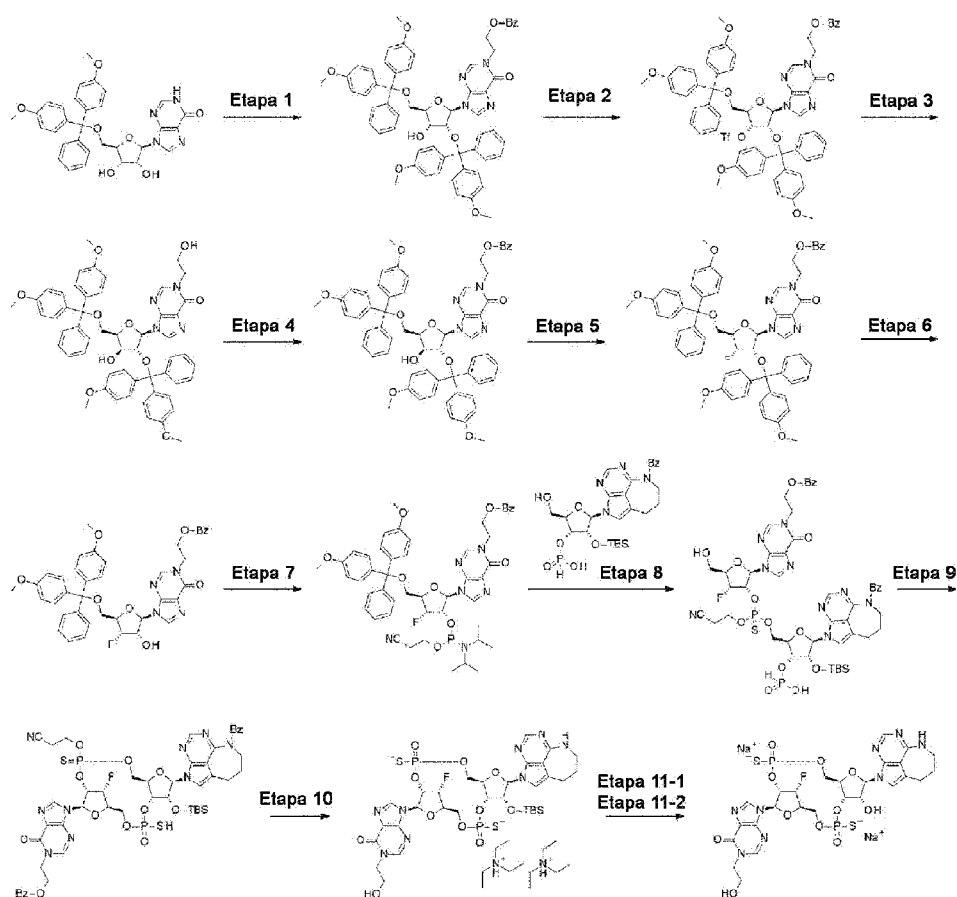
(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-16-Fluoro-15-hidroxi-7-[1-(2-hidroxi-etil)-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il]-2,10-bis(sulfanil)-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzoc[d]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-diona



39a (Diastereómero 1)

39b (Diastereómero 2)

5 [Esquema de síntesis]



(Etapa 1)

1-[2-(Benzoiloxi)etil]-2', 5'-bis-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]inosina

10

A una solución mixta de 5'-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]inosina (20,0 g) disponible en el mercado (Amadis Chemical Company Limited) en piridina (50 ml)-N,N-dimetilacetamida (70,1 ml) se le añadieron cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (12,5 g), benzoato de 2-bromoetil (6,60 ml) y 1,8-diazabicyclo[5.4.0]-7-undeceno (13,1 ml), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 20 horas. Se añadieron a la mezcla de reacción una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio y agua para inactivar la reacción, y el producto resultante se sometió a extracción

con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con salmuera y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El agente desecante se eliminó por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo/trietilamina al 0,1 %] para obtener el compuesto del título (24,1 g: con impurezas).

5 MS (ESI) m/z: 1121 (M+H)⁺.

(Etapa 2)

1-[2-(Benzoiloxi)etil]-2',5'-bis-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-3'-O-(trifluorometanosulfonil)inosina

10 A una disolución del compuesto (24,1 g) obtenido en la etapa 1 anterior en diclorometano (120 ml) se le añadió piridina (19,0 ml), y se añadió lentamente gota a gota anhídrido trifluorometanosulfónico (5,96 ml) a 0 °C, y la mezcla de reacción se agitó a la misma temperatura durante 1 hora. Se añadieron a la mezcla de reacción una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio y agua para inactivar la reacción, y el producto resultante se sometió a extracción con diclorometano, y la capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El agente desecante se eliminó por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo/trietilamina al 0,1 %] para obtener el compuesto del título (19,7 g: con impurezas).

15 MS (ESI) m/z: 1153 (M+H)⁺.

(Etapa 3)

9-{2,5-Bis-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-β-D-xilofuranosil}-1-(2-hidroxietil)-1,9-dihidro-6H-purin-6-ona

20 A una solución del compuesto (19,7 g) obtenido en la etapa 2 anterior en N,N-dimetilformamida (85,4 ml) se le añadió acetato de cesio (8,20 g), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. Se añadieron metanol (85,4 ml) y carbonato de potasio (4,72 g) a la mezcla de reacción, que se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Se añadió agua a la mezcla de reacción para inactivar la reacción, y el producto resultante se sometió a extracción con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con salmuera y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El agente desecante se eliminó por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo/metanol/trietilamina al 0,1 %] para obtener el compuesto del título (12,2 g: con impurezas).

25 MS (ESI) m/z: 917 (M+H)⁺.

(Etapa 4)

1-[2-(Benzoiloxi)etil]-9-{2,5-bis-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-β-D-xilofuranosil}-1,9-dihidro-6H-purin-6-ona

30 A una disolución del compuesto (12,2 g) obtenido en la etapa 3 anterior en diclorometano (48,8 ml) se le añadieron piridina (1,61 ml) y anhídrido benzoico (3,16 g), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 64 horas. Se añadieron a la mezcla de reacción una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio y agua para inactivar la reacción, y el producto resultante se sometió a extracción con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con salmuera y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El agente desecante se eliminó por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo/metanol/trietilamina al 0,1 %] para obtener el compuesto del título (7,36 g: con impurezas).

35 MS (ESI) m/z: 1021 (M+H)⁺.

(Etapa 5)

1-[2-(Benzoiloxi)etil]-2',5'-bis-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-3'-desoxi-3'-fluoroinosina

40 A una disolución del compuesto (7,36 g) obtenido en la etapa 4 anterior en diclorometano (37,0 ml) se le añadió 2,6-lutidina (3,34 ml) y, a continuación, se añadió trifluoruro de N,N-dietilaminoazufre (1,42 g) a -78 °C, la temperatura se aumentó gradualmente hasta la temperatura ambiente en una atmósfera de nitrógeno y, a continuación, la mezcla de reacción se agitó durante toda la noche. Se añadió lentamente a la mezcla de reacción una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio para inactivar la reacción, se añadió agua y el producto resultante se sometió a extracción con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con salmuera y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El agente desecante se eliminó por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo 0,1 % trietilamina] para obtener el compuesto del título (6,89 g: con impurezas).

45 MS (ESI) m/z: 1023 (M+H)⁺.

50 (Etapa 6)

1-[2-(Benzoiloxi)etil]-5'-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-3'-desoxi-3'-fluoroinosina

A una disolución del compuesto (6,89 g) obtenido en la etapa 5 anterior en diclorometano (25,0 ml) se le añadieron agua (0,303 ml) y ácido dicloroacético (1,39 ml), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 63 horas. Se añadió piridina (2,0 ml) a la mezcla de reacción, que se concentró a presión reducida. El residuo se purificó parcialmente mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo/metanol] y cromatografía en columna de gel de sílice DIOL [hexano/acetato de etilo]. A una solución del compuesto (25,0 ml) obtenido en piridina se le añadió cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (1,83 g) a 0 °C, y la mezcla de reacción se agitó a 4 °C durante 21 horas. Se añadió metanol (1,0 ml) a la mezcla de reacción, que se agitó a 4 °C durante 1 hora, y después se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo/metanol/trietilamina al 0,1 %] para obtener el compuesto del título (1,33 g).

10 MS (ESI) m/z: 721 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 7,99 (1H, s), 7,95 (1H, d, J = 1,2 Hz), 7,93 (1H, s), 7,93 (1H, d, J = 1,5 Hz), 7,58-7,51 (1H, m), 7,43-7,37 (2H, m), 7,35-7,30 (2H, m), 7,26-7,13 (7H, m), 6,82-6,75 (4H, m), 5,98 (1H, d, J = 7,3 Hz), 5,13 (1H, dd, J = 54,7, 4,1 Hz), 5,05-4,92 (1H, m), 4,63 (2H, t, J = 5,1 Hz), 4,56-4,25 (4H, m), 3,76 (3H, s), 3,76 (3H, s), 3,45 (1H, dd, J = 10,9, 3,6 Hz), 3,34 (1H, dd, J = 10,9, 3,6 Hz).

15 (Etapa 7)

1-[2-(Benzoiloxi)etil]-5'-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-2'-O-[(2-cianoetoxi)[di(propan-2-il)amino]fosfanil]-3'-desoxi-3'-fluorinosina

Usando el compuesto (1,33 g) obtenido en la etapa 6 anterior, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 4 del ejemplo 5 para obtener el compuesto del título (1,49 g) en forma de una mezcla de diastereómeros en el átomo de fósforo (proporción de diastereómeros = 1:1).

20 el átomo de fósforo (proporción de diastereómeros = 1:1).

MS (ESI) m/z: 921 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 7,99 (0,5H, s), 7,98-7,93 (3H, m), 7,88 (0,5H, s), 7,58-7,52 (1H, m), 7,45-7,37 (4H, m), 7,33-7,18 (7H, m), 6,85-6,77 (4H, m), 6,14 (0,5H, d, J = 7,3 Hz), 6,10 (0,5H, d, J = 7,9 Hz), 5,27-5,01 (2H, m), 4,70-4,61 (2H, m), 4,57-4,30 (3H, m), 3,78 (3H, s), 3,77 (3H, s), 3,62-3,33 (6H, m), 2,56 (1H, t, J = 6,3 Hz), 2,32 (1H, t, J = 6,3 Hz), 1,12 (6H, d, J = 6,3 Hz), 1,04 (3H, d, J = 6,3 Hz), 0,76 (3H, d, J = 6,3 Hz).

25 Hz), 1,12 (6H, d, J = 6,3 Hz), 1,04 (3H, d, J = 6,3 Hz), 0,76 (3H, d, J = 6,3 Hz).

(Etapa 8)

Se llevó a cabo la misma reacción que en la etapa 7 del ejemplo 1 en la siguiente escala (materia prima: 948 mg). Utilizando una solución de acetonitrilo del compuesto obtenido y el compuesto (850 mg) obtenido en la etapa 7 anterior, se llevó a cabo la reacción de la misma manera que en la etapa 8 del ejemplo 1, y el producto bruto resultante se utilizó directamente para la reacción posterior.

30 utilizó directamente para la reacción posterior.

(Etapa 9)

Benzoato de 2-{9-[(5R,7R,8S,12aR,14R,15R,15aR,16R)-14-(6-benzoil-6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)-15-[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-10-(2-cianoetoxi)-16-fluoro-2-oxo-2-sulfanil-10-sulfanilidenoctahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxadifosfaciotetradecin-7-il]-6-oxo-6,9-dihidro-1H-purin-1-il}etilo

35 6-oxo-6,9-dihidro-1H-purin-1-il}etilo

Usando el producto bruto obtenido en la etapa 8 anterior, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 9 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (709 mg) en forma de una mezcla de diastereómeros en el átomo de fósforo.

MS (ESI) m/z: 1152 (M+H)⁺.

40 (Etapa 10)

(5R,7R,8S,12aR,14R,15R,15aR,16R)-15-[[Terc-butil(dimetil)silil]oxi]-16-fluoro-7-[1-(2-hidroxietil)-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il]-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il]octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxadifosfaciotetradecin-2,10-bis(tiolato) de bis(N,N-dietiletanaminio)

45 Usando el compuesto (709 mg) obtenido en la etapa 9 anterior, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 10 del ejemplo 1 para obtener el diastereómero 1 (108 mg: con impurezas) y el diastereómero 2 (102 mg: con impurezas) del compuesto del título.

Diastereómero 1 (menos polar)

MS (ESI) m/z: 891 (M+H)⁺.

50 Diastereómero 2 (más polar)

MS (ESI) m/z: 891 (M+H)⁺.

(Etapa 11-1)

- 5 (5R,7R,8S,12aR,14R,15R,15aS,16R)-16-Fluoro-15-hidroxi-7-[1-(2-hidroxi-etil)-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il]-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) disódico

(Diastereómero 1)

Usando el compuesto (diastereómero 1) (108 mg: con impurezas) obtenido en la etapa 10 anterior, la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 11 del ejemplo 1, y la purificación se realizó a continuación según las siguientes condiciones de purificación para obtener el compuesto del título en forma de una sal de trietilamina.

- 10 [Condiciones de purificación] Cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo] y HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 3 %-30 % (0 min-40 min)].

La sal de trietilamina obtenida se sometió a intercambio de sales de la misma manera que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (40,1 mg).

- 15 MS (ESI) m/z: 777 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,66 (1H, m), 8,26 (1H, s), 8,02 (1H, s), 7,09 (1H, s), 6,29-6,24 (2H, m), 5,68-5,45 (2H, m), 5,26-5,18 (1H, m), 4,78-4,73 (1H, m), 4,62-4,42 (3H, m), 4,26-3,98 (5H, m), 3,85-3,78 (2H, m), 3,53-3,47 (2H, m), 2,91-2,84 (2H, m), 2,04-1,96 (2H, m).

RMN de ³¹P (CD₃OD) δ: 58,0 (s), 56,9 (s).

- 20 (Etapa 11-2)

(5R,7R,8S,12aR,14R,15R,15aS,16R)-16-Fluoro-15-hidroxi-7-[1-(2-hidroxi-etil)-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il]-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) disódico

(Diastereómero 2)

- 25 Usando el compuesto (diastereómero 2) (102 mg: con impurezas) obtenido en la etapa 10 anterior, la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 11 del ejemplo 1, y la purificación se realizó a continuación según las siguientes condiciones de purificación para obtener el compuesto del título en forma de una sal de trietilamina.

- 30 [Condiciones de purificación] Cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo] y HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 3 %-25 % (0 min-40 min)].

La sal de trietilamina obtenida se sometió a intercambio de sales de la misma manera que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (26,7 mg).

MS (ESI) m/z: 777 (M+H)⁺.

- 35 RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,73 (1H, m), 8,25 (1H, s), 8,02 (1H, s), 7,10 (1H, sa), 6,33 (1H, dd, J = 6,7 Hz), 6,28 (1H, d, J = 9,1 Hz), 5,65-5,50 (1H, m), 5,49-5,43 (1H, m), 5,31 (1H, dd, J = 54,4, 3,6 Hz), 4,79 (1H, dd, J = 6,3, 4,5 Hz), 4,62-4,34 (4H, m), 4,27-4,14 (2H, m), 4,08-4,01 (1H, m), 3,93-3,87 (1H, m), 3,86-3,80 (2H, m), 3,53-3,47 (2H, m), 2,95-2,89 (2H, m), 2,06-1,97 (2H, m).

RMN de ³¹P (CD₃OD) δ: 63,1 (s), 59,7 (s).

Ejemplo 50: Síntesis de CDN40

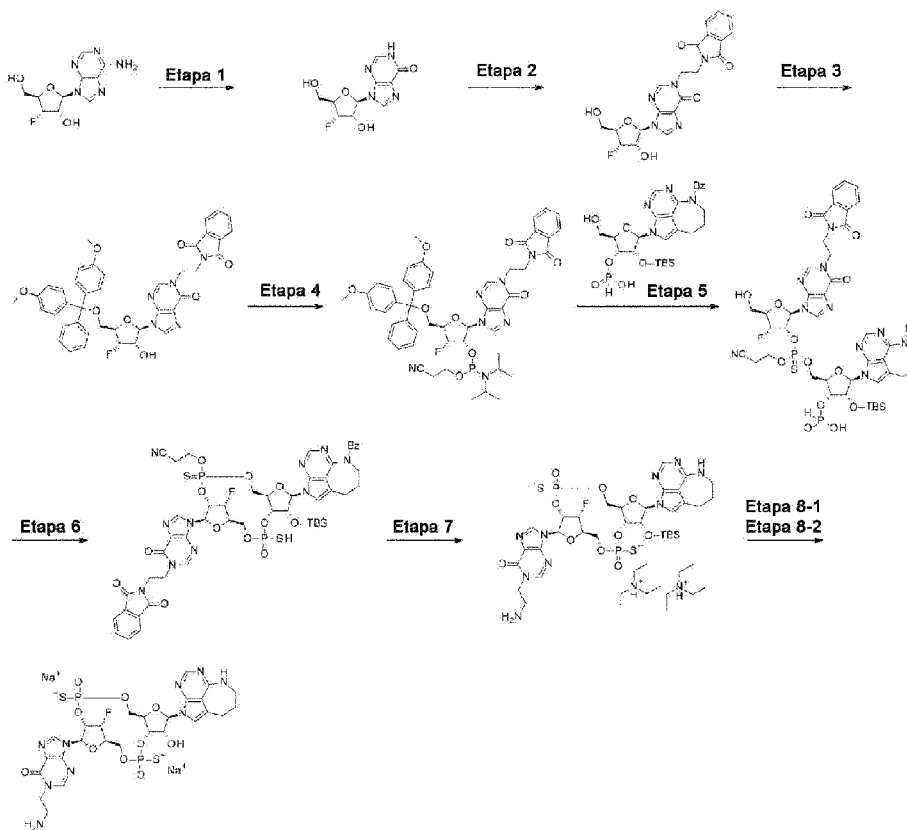
- 40 (5R,7R,8S,12aR,14R,15R,15aS,16R)-7-[1-(2-Aminoetil)-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il]-16-fluoro-15-hidroxi-2,10-bis(sulfanil)-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-diona



40b (Diastereómero 2)

40b (Diastereómero 2)

5 [Esquema de síntesis]



(Etapla 1)

3'-Desoxi-3'-fluoroinosina

10 A una solución de 50 ml de ácido acético (120 ml) se le añadió en pequeñas porciones una solución acuosa (48 ml) de nitrato de sodio (6,10 g), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 43 horas. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida y se destiló azeotrópicamente dos veces con tolueno. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [diclorometano/metanol] para obtener el compuesto del título (3,76 g).

MS (ESI) m/z : 271 ($M+H$)⁺.

RMN de ^1H (CD_3OD) δ : 8,30 (1H, s), 8,05 (1H, s), 603 (1H, d, $J = 7,8$ Hz), 5,08 (1H, dd, $J = 54,4, 4,1$ Hz), 4,89-4,85 (1H, m), 4,38 (1H, dt, $J = 26,8, 3,2$ Hz), 3,82-3,73 (2H, m).

(Etapa 2)

3'-Desoxi-1-[2-(1,3-dioxo-1,3-dihidro-2H-isoindol-2-il)etil]-3'-fluorinosina

- 5 A una disolución del compuesto (3,76 g) obtenido en la etapa 1 anterior en N,N-dimetilacetamida (37,6 ml) se le añadieron 2-(2-bromoetil)-1H-isoindol-1,3(2H)-diona (6,60 ml) y 1,8-diazabicyclo[5.4.0]-7-undeceno (3,12 ml), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 días. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo/metanol] para obtener el compuesto del título (3,51 g: con impurezas).

- 10 MS (ESI) m/z : 444 ($M+H$) $^+$.

RMN de ^1H (CDCl_3) δ : 7,87 (1H, s), 7,84 (1H, s), 7,81 (2H, dd, $J = 5,4, 3,0$ Hz), 7,73 (2H, dd, $J = 5,4, 3,0$ Hz), 5,83 (1H, dd, $J = 7,9$ Hz), 5,28 (1H, dd, $J = 11,5, 2,4$ Hz), 5,18 (1H, dd, $J = 55,0, 4,2$ Hz), 5,01-4,87 (1H, m), 4,49 (1H, d, $J = 28,4$ Hz), 4,43-4,28 (2H, m), 4,19-4,08 (2H, m), 3,95 (1H, d, $J = 8,2$ Hz), 3,91-3,84 (1H, m), 3,76 (1H, d, $J = 13,3$ Hz).

(Etapa 3)

- 15 5'-O-[Bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-3'-desoxi-1-[2-(1,3-dioxo-1,3-dihidro-2H-isoindol-2-il)etil]-3'-fluorinosina

Usando el compuesto (3,51 g) obtenido en la etapa 2 anterior, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 1 del ejemplo 11 para obtener el compuesto del título (4,05 g).

MS (ESI) m/z : 746 ($M+H$) $^+$.

- 20 RMN de ^1H (CDCl_3) δ : 7,95 (1H, s), 7,79 (2H, dd, $J = 5,4, 3,0$ Hz), 7,73 (1H, s), 7,70 (2H, dd, $J = 5,4, 3,0$ Hz), 7,34-7,29 (2H, m), 7,25-7,18 (7H, m), 6,81-6,76 (4H, m), 5,92 (1H, d, $J = 7,3$ Hz), 5,12 (1H, dd, $J = 54,4, 4,2$ Hz), 4,97-4,85 (1H, m), 4,55-4,40 (2H, m), 4,30-4,22 (1H, m), 4,21-4,01 (2H, m), 3,77 (6H, s), 3,73 (1H, dd, $J = 10,3$ Hz), 3,43 (1H, dd, $J = 10,9, 3,6$ Hz), 3,32 (1H, dd, $J = 10,9, 3,6$ Hz).

(Etapa 4)

- 25 5'-O-[Bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-2'-O-[(2-cianoetoxi)[di(propan-2-il)amino]fosfanil]-3'-desoxi-1-[2-(1,3-dioxo-1,3-dihidro-2H-isoindol-2-il)etil]-3'-fluorinosina

Usando el compuesto (4,05 g) obtenido en la etapa 3 anterior, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 4 del ejemplo 5 para obtener el compuesto del título (4,35 g) en forma de una mezcla de diastereómeros en el átomo de fósforo (proporción de diastereómeros = 1:1).

MS (ESI) m/z : 946 ($M+H$) $^+$.

- 30 RMN de ^1H (CDCl_3) δ : 7,95 (0,5H, s), 7,94 (0,5H, s), 7,84-7,78 (2H, m), 7,73-7,68 (2H, m), 7,65 (1H, s), 7,43-7,41 (2H, m), 7,32-7,15 (7H, m), 6,84-6,77 (4H, m), 6,09 (0,5H, d, $J = 7,9$ Hz), 6,05 (0,5H, d, $J = 7,9$ Hz), 5,31-5,16 (1H, m), 5,15-4,98 (1H, m), 4,51-4,21 (3H, m), 4,20-4,05 (2H, m), 3,793 (1,5H, s), 3,789 (3H, s), 3,784 (1,5H, s), 3,66-3,55 (2H, m), 3,50-3,30 (4H, m), 2,56 (1H, t, $J = 6,3$ Hz), 2,41 (1H, t, $J = 6,3$ Hz), 1,16 (3H, d, $J = 7,3$ Hz), 1,14 (3H, d, $J = 7,3$ Hz), 1,10 (3H, d, $J = 7,3$ Hz), 0,83 (3H, d, $J = 7,3$ Hz).

- 35 (Etapa 5)

Se llevó a cabo la misma reacción que en la etapa 7 del ejemplo 1 en la siguiente escala (materia prima: 1,47 g). Utilizando una solución de acetonitrilo del compuesto obtenido y el compuesto (1,35 g) obtenido en la etapa 4 anterior, se llevó a cabo la reacción de la misma manera que en la etapa 8 del ejemplo 1, y el producto bruto resultante se utilizó directamente para la reacción posterior.

- 40 (Etapa 6)

3-[(5R,7R,8S,12aR,14R,15R,15aR,16R)-14-(6-Benzoi-6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzoc[d]azulen-2-il)-15-[(terc-butil(dimetil)silil)oxi]-7-{1-[2-(1,3-dioxo-1,3-dihidro-2H-isoindol-2-il)etil]-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il]-16-fluoro-2-oxo-2-sulfanil-10-sulfanilidenoctahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2 λ^5 ,10 λ^5 -furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxadifosfaciclotetradecin-10-il]oxi]propanonitrilo

- 45 Usando el producto bruto obtenido en la etapa 5 anterior, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 9 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (1,25 g) en forma de una mezcla de diastereómeros en el átomo de fósforo.

MS (ESI) m/z : 1177 ($M+H$) $^+$.

(Etapa 7)

(5R,7R,8S,12aR,14R,15R,15aR,16R)-7-[1-(2-Aminoetil)-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il]-15-[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-16-fluoro-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciotetradecin-2,10-bis(tiolato) de bis(N,N-dietiletanaminio)

- 5 A una disolución mixta del compuesto (1,25 g) obtenido en la etapa 6 anterior en etanol (7,5 ml)-tetrahidrofurano (7,5 ml) se le añadió monohidrato de hidrazina (0,599 ml), y la mezcla de reacción se agitó a 50 °C durante 6 horas. Tras concentrar la mezcla de reacción a presión reducida, el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo] para obtener el diastereómero 1 (145 mg: con impurezas) y el diastereómero 2 (198 mg: con impurezas) del compuesto del título (tiempo de retención en HPLC: diastereómero 1 > 2).

Diastereómero 1 (menos polar)

MS (ESI) m/z: 890 (M+H)⁺.

Diastereómero 2 (más polar)

MS (ESI) m/z: 890 (M+H)⁺.

- 15 (Etapas 8-1)

(5R,7R,8S,12aR,14R,15R,15aS,16R)-7-[1-(2-Aminoetil)-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il]-16-fluoro-15-hidroxi-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciotetradecin-2,10-bis(tiolato) disódico

(Diastereómero 1)

- 20 Usando el compuesto (diastereómero 1) (145 mg: con impurezas) obtenido en la etapa 7 anterior, la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 11 del ejemplo 1, y la purificación se realizó a continuación según las siguientes condiciones de purificación para obtener el compuesto del título en forma de una sal de trietilamina.

- 25 [Condiciones de purificación] Cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo] y HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/solución de acetonitrilo-metanol (1:1), solución de acetonitrilo-metanol (1:1): del 5 %-50 % (0 min-40 min)].

La sal de trietilamina obtenida se sometió a intercambio de sales de la misma manera que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (70,7 mg).

MS (ESI) m/z: 776 (M+H)⁺.

- 30 RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,64 (1H, s), 8,23 (1H, s), 8,02 (1H, s), 7,07 (1H, s), 6,27 (1H, d, J = 4,5 Hz), 6,25 (1H, d, J = 6,7 Hz), 5,67-5,43 (2H, m), 5,23-5,16 (1H, m), 4,76 (1H, t, J = 5,1 Hz), 4,63-4,45 (3H, m), 4,31-4,03 (5H, m), 3,51-3,46 (2H, m), 3,31-3,26 (2H, m), 2,90-2,83 (2H, m), 2,03-1,94 (2H, m).

RMN de ³¹P (CD₃OD) δ: 57,9 (s), 56,9 (s).

(Etapas 8-2)

- 35 (5R,7R,8S,12aR,14R,15R,15aS,16R)-7-[1-(2-Aminoetil)-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il]-16-fluoro-15-hidroxi-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciotetradecin-2,10-bis(tiolato) disódico

(Diastereómero 2)

- 40 Usando el compuesto (diastereómero 2) (198 mg: con impurezas) obtenido en la etapa 7 anterior, la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 11 del ejemplo 1, y la purificación se realizó a continuación según las siguientes condiciones de purificación para obtener el compuesto del título en forma de una sal de trietilamina.

[Condiciones de purificación] Cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo] y HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/solución de acetonitrilo-metanol (1:1), solución de acetonitrilo-metanol (1:1): del 5 %-50 % (0 min-40 min)].

- 45 La sal de trietilamina obtenida se sometió a intercambio de sales de la misma manera que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (69,7 mg).

MS (ESI) m/z: 776 (M+H)⁺.

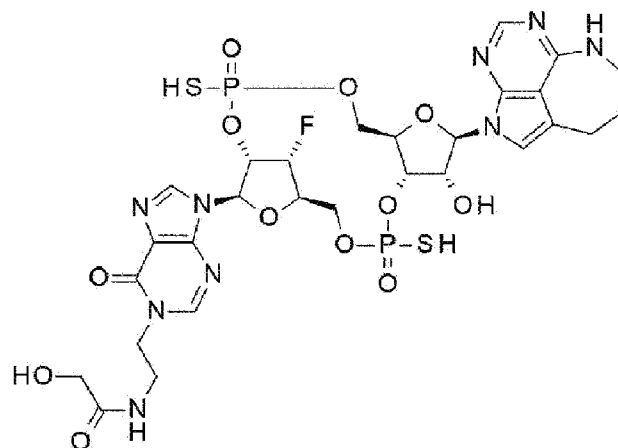
RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,73 (1H, s), 8,27 (1H, s), 8,02 (1H, s), 7,09 (1H, s), 6,31 (1H, dd, J = 6,7 Hz), 6,26 (1H, d, J = 8,5 Hz), 5,62-5,47 (1H, m), 5,47-5,41 (1H, m), 5,30 (1H, dd, J = 53,8, 3,6 Hz), 4,78 (1H, dd, J = 6,7, 4,2 Hz), 4,58 (1H,

dd, $J = 26,0$ Hz), 4,51-4,41 (2H, m), 4,40-4,23 (3H, m), 4,11-4,05 (1H, m), 3,93-3,86 (1H, m), 3,53-3,46 (2H, m), 3,36-3,28 (2H, m), 2,90 (2H, t, $J = 5,7$ Hz), 2,05-1,96 (2H, m).

RMN de ^{31}P (CD_3OD) δ : 62,8 (s), 59,4 (s).

Ejemplo 51: Síntesis de CDN41

- 5 N-(2-{9-[(5R,7R,8S,12aR,14R,15R,15aS,16R)-16-Fluoro-15-hidroxi-2,10-dioxo-2,10-bis(sulfanil)-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2 λ^5 ,10 λ^5 -furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciotetradecin-7-il]-6-oxo-6,9-dihidro-1H-purin-1-il}etil)-2-hidroxiacetamida

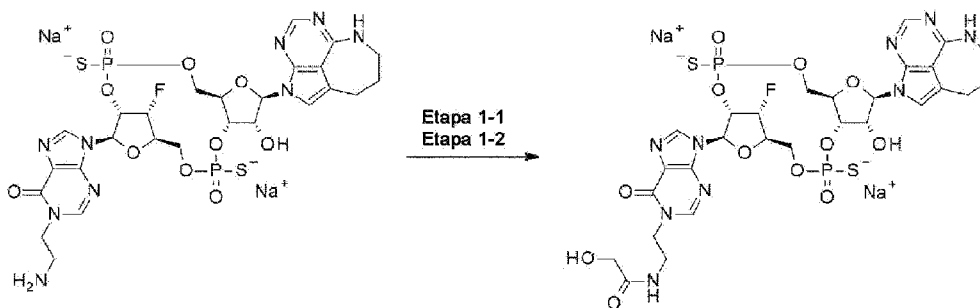


41

41a (Diastereómero 1)

41b (Diastereómero 2)

[Esquema de síntesis]



(Etapa 1-1)

- 15 (5R,7R,8S,12aR,14R,15R,15aS,16R)-16-Fluoro-15-hidroxi-7-{1-[2-(2-hidroxiacetamida)etil]-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il}-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2 λ^5 ,10 λ^5 -furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciotetradecin-2,10-bis(tiolato) disódico

(Diastereómero 1)

- 20 Usando el compuesto (25,0 mg) obtenido en la etapa 8-1 del ejemplo 50, la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 1-1 del ejemplo 7, y la purificación se realizó a continuación según las siguientes condiciones de purificación para obtener el compuesto del título en forma de una sal de trietilamina.

[Condiciones de purificación] Cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo] y HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 5 %-30 % (0 min-40 min)].

- 25 La sal de trietilamina obtenida se sometió a intercambio de sales de la misma manera que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (18,6 mg).

MS (ESI) m/z : 834 ($M+H$) $^+$.

RMN de ^1H (CD_3OD) δ : 8,60 (1H, m), 8,12 (1H, m), 8,02 (1H, s), 7,11 (1H, sa), 6,27 (1H, d, $J = 4,9$ Hz), 6,23 (1H, d, $J = 9,1$ Hz), 5,75-5,58 (1H, m), 5,54 (1H, dd, $J = 53,5, 3,0$ Hz), 5,28-5,20 (1H, m), 4,75 (1H, t, $J = 5,2$ Hz), 4,62-4,52 (1H, m), 4,52-4,42 (2H, m), 4,29-4,01 (5H, m), 3,92 (2H, s), 3,64-3,58 (2H, m), 3,53-3,47 (2H, m), 2,93-2,76 (2H, m), 2,06-1,93 (2H, m).

5 RMN de ^{31}P (CD_3OD) δ : 57,9 (s), 56,7 (s).

(Etapa 1-2)

(5R,7R,8S,12aR,14R,15R,15aS,16R)-16-Fluoro-15-hidroxi-7-[1-[2-(2-hidroxiacetamida)etil]-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il]-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2 λ^5 ,10 λ^5 -furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidofosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) disódico

10 (Diastereómero 2)

Usando el compuesto (diastereómero 2) (15,0 mg) obtenido en la etapa 8-2 del ejemplo 50, la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 1-1 del ejemplo 7, y la purificación se realizó a continuación según las siguientes condiciones de purificación para obtener el compuesto del título en forma de una sal de trietilamina.

15 [Condiciones de purificación] Cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo] y HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 5 %-30 % (0 min-40 min)].

La sal de trietilamina obtenida se sometió a intercambio de sales de la misma manera que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (7,4 mg).

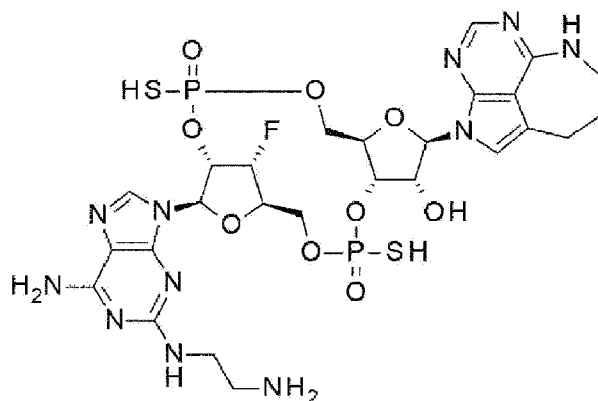
MS (ESI) m/z : 834 ($M+H$) $^+$.

20 RMN de ^1H (CD_3OD) δ : 8,69 (1H, m), 8,16 (1H, s), 8,02 (1H, s), 7,11 (1H, s), 6,32 (1H, dd, $J = 6,7$ Hz), 6,26 (1H, d, $J = 8,6$ Hz), 5,67-5,51 (1H, m), 5,48-5,43 (1H, m), 5,29 (1H, dd, $J = 54,0, 3,7$ Hz), 4,77 (1H, dd, $J = 6,4, 4,6$ Hz), 4,62-4,33 (2H, m), 4,25-4,17 (2H, m), 4,08-4,01 (1H, m), 3,94 (2H, s), 3,93-3,85 (1H, m), 3,70-3,56 (2H, m), 3,52-3,46 (2H, m), 2,93-2,86 (2H, m), 2,04-1,97 (4H, m).

RMN de ^{31}P (CD_3OD) δ : 62,8 (s), 59,5 (s).

25 Ejemplo 52: Síntesis de CDN42

(5R,7R,8S,12aR,14R,15R,15aS,16R)-7-[6-Amino-2-[(2-aminoetil)amino]-9H-purin-9-il]-16-fluoro-15-hidroxi-2,10-bis(sulfanil)-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2 λ^5 ,10 λ^5 -furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidofosfaciclotetradecin-2,10-diona

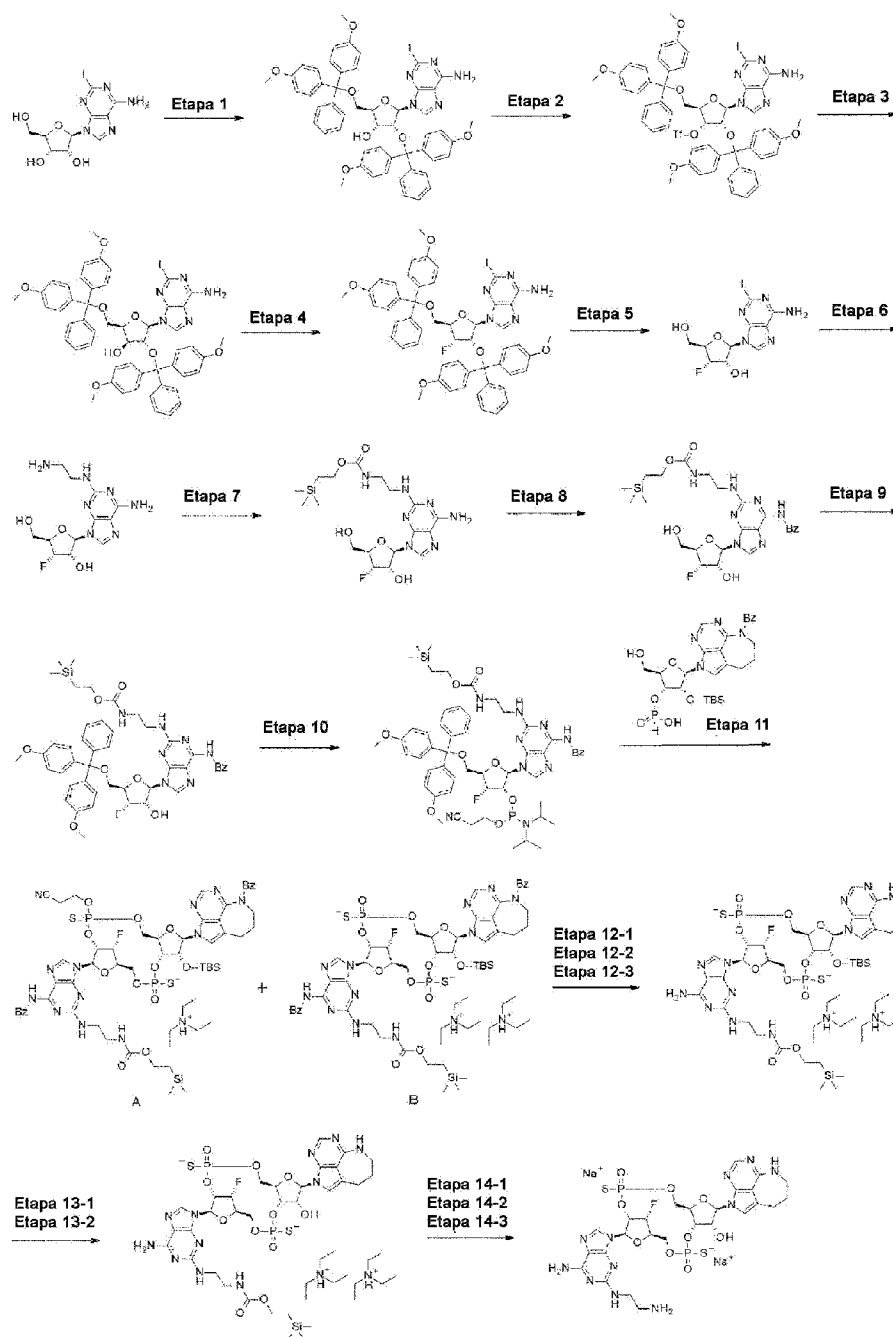


42

30

42a (Diastereómero 1)
42b (Diastereómero 2)

[Esquema de síntesis]



(Etapa 1)

2',5'-Bis-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-2-yodoadenosina

- La 2-yodoadenosina (1,35 g) disponible en el mercado (Amadis Chemical Company Limited) se destiló azeotrópicamente tres veces con piridina. A una solución del residuo en piridina deshidratada (17,0 ml) se le añadió cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (2,35 g), y la mezcla de reacción se agitó en una atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente durante toda la noche. Se añadió metanol (5,00 ml) a la mezcla de reacción para inactivar la reacción, y el producto resultante se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo/trietilamina al 0,1 %] para obtener el compuesto del título (1,96 g: con impurezas).
- MS (ESI) m/z: 998 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 7,88 (1H, s), 7,29-7,12 (18H, m), 6,73-6,60 (8H, m), 6,31 (1H, dd, J = 7,9 Hz), 5,69 (2H, sa), 5,13 (1H, dd, J = 7,6, 4,5 Hz), 4,07 (1H, t, J = 3,3 Hz), 3,77 (6H, s), 3,76 (3H, s), 3,74 (3H, s), 3,14 (2H, d, J = 3,6 Hz), 2,87 (1H, d, J = 4,2 Hz), 2,28 (1H, s).

(Etapa 2)

2',5'-Bis-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-2-yodo-3'-O-(trifluorometanosulfonil)adenosina

El compuesto (100 mg) obtenido en la etapa 1 anterior se destiló azeotrópicamente tres veces con tolueno. A una disolución del residuo en diclorometano deshidratado (1,0 ml) se le añadieron piridina (0,20 ml) y anhídrido trifluorometanosulfónico (27,0 µl) en una atmósfera de nitrógeno a 0 °C, y la mezcla de reacción se agitó a la misma temperatura durante 80 minutos. Se añadió a la mezcla de reacción una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio para inactivar la reacción, y el producto resultante se sometió a extracción con diclorometano. Tras secar la capa orgánica sobre sulfato de sodio anhidro, se eliminó el agente desecante por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo/trietilamina al 0,1 %] para obtener el compuesto del título (57,2 mg).

MS (ESI) m/z: 1130 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 7,73 (1H, s), 7,32-7,09 (18H, m), 6,79-6,70 (6H, m), 6,60-6,56 (2H, m), 6,19 (1H, dd, J = 8,2, 3,9 Hz), 6,01 (1H, d, J = 7,9 Hz), 5,59 (2H, sa), 4,05 (1H, d, J = 3,6 Hz), 3,98 (1H, t, J = 6,7 Hz), 3,78 (3H, s), 3,77 (3H, s), 3,71 (3H, s), 3,70 (3H, s), 3,39 (1H, dd, J = 10,9, 6,0 Hz), 3,17 (1H, dd, J = 10,6, 7,0 Hz).

(Etapa 3)

9-{2,5-Bis-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-β-D-xilofuranosil}-2-yodo-9H-purin-6-amina

A una solución del compuesto (2,76 g) obtenido en la etapa 2 anterior en N,N-dimetilformamida (24,4 ml) se le añadió acetato de cesio (1,20 g), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. Se añadieron metanol (24,4 ml) y carbonato de potasio (675 mg) a la mezcla de reacción, que se agitó durante 2 horas. Se añadió agua a la mezcla de reacción para precipitar un sólido y, a continuación, se destiló el componente metanólico a presión reducida. El sólido resultante se recogió por filtración para obtener el compuesto del título (2,38 g). RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 8,02 (1H, s), 7,42-7,13 (18H, m), 6,79-6,72 (8H, m), 5,68 (2H, sa), 5,55 (1H, d, J = 1,2 Hz), 5,49 (1H, d, J = 9,1 Hz), 4,48 (1H, s), 4,41-4,37 (1H, m), 4,06 (1H, dd, J = 9,1, 3,6 Hz), 3,77 (9H, s), 3,76 (3H, s), 3,56-3,48 (2H, m).

(Etapa 4)

2',5'-Bis-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-3'-desoxi-3'-fluoro-2-yodoadenosina

A una disolución del compuesto (2,54 g) obtenido en la etapa 3 anterior en diclorometano (17,0 ml) se le añadió piridina (1,13 ml), se añadió trifluoruro de N,N-dietilaminoazufre (0,397 ml) con refrigeración por hielo, y la mezcla de reacción se agitó en una atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente durante 40 minutos. Se añadió a la mezcla de reacción una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio para inactivar la reacción, y el producto resultante se sometió a extracción con diclorometano. Tras secar la capa orgánica sobre sulfato de sodio anhidro, se eliminó el agente desecante por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo/trietilamina al 0,1 %] para obtener el compuesto del título (2,02 g: con impurezas).

MS (ESI) m/z: 1000 (M+H)⁺.

(Etapa 5)

3'-Desoxi-3'-fluoro-2-yodoadenosina

A una disolución de la mezcla (2,02 g) obtenida en la etapa 4 anterior en diclorometano (20,2 ml) se le añadieron agua (0,364 ml) y ácido dicloroacético (0,996 ml) con refrigeración por hielo, y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se añadió piridina (1,95 ml) a la mezcla de reacción para inactivar la reacción, y el producto resultante se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo] para obtener el compuesto del título (1,34 g: con impurezas).

RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 5,94 (1H, dd, J = 7,9 Hz), 5,09 (1H, dd, J = 54,7, 4,3 Hz), 4,95-4,89 (1H, m), 4,40 (1H, d, J = 27,3 Hz), 3,87-3,76 (2H, m) (sólo se muestran los picos observables)

(Etapa 6)

2-[(2-Aminoetil)amino]-3'-desoxi-3'-fluoroadenosina

Se añadió etilendiamina (1,35 ml) al compuesto (1,34 g) obtenido en la etapa 5 anterior, y la mezcla de reacción se agitó a 110 °C durante 1 hora. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo] para obtener el compuesto del título (543 mg: con impurezas).

RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 7,94 (1H, s), 5,88 (1, d, J = 7,9 Hz), 5,09 (1H, dd, J = 54,7, 4,5 Hz), 4,95 (1H, dq, J = 25,1, 4,2 Hz), 4,38 (1H, dt, J = 27,6, 2,7 Hz), 3,84-3,76 (2H, m), 3,56-3,53 (2H, m), 3,01 (2H, t, J = 5,7 Hz).

(Etapa 7)

3'-Desoxi-3'-fluoro-2-[[2-([2-(trimetilsilil)etoxi]carbonil)amino]etil]amino}adenosina

A una solución del compuesto (543 mg) obtenido en la etapa 6 anterior en tetrahidrofurano (10 ml) se le añadieron 1-([2-(trimetilsilil)etoxi]carbonil)oxi}pirrolidin-2,5-diona (961 mg), N,N-dimetilformamida (5,0 ml) y metanol (5,0 ml), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 horas. A continuación, se añadió 1-([2-(trimetilsilil)etoxi]carbonil)oxi}pirrolidin-2,5-diona (800 mg) y la mezcla de reacción se agitó durante 40 minutos. Tras concentrar la mezcla de reacción a presión reducida, el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo] para obtener el compuesto del título (483 mg).

RMN de ^1H (CD_3OD) δ : 7,87 (1H, s), 5,83 (1H, d, $J = 7,9$ Hz), 5,15-4,96 (2H, m), 4,35 (1H, dt, $J = 27,4, 2,7$ Hz), 4,11-4,04 (2H, m), 3,84-3,73 (2H, m), 3,48-3,38 (2H, m), 2,96-2,83 (2H, m), 0,95-0,83 (2H, m), 0,00 (9H, s).

(Etapa 8)

N-Benzoil-3'-desoxi-3'-fluoro-2-[[2-([2-(trimetilsilil)etoxi]carbonil)amino]etil]amino}adenosina

Usando el compuesto (483 mg) obtenido en la etapa 7 anterior, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 3 del ejemplo 11 para obtener el compuesto del título (374 mg).

RMN de ^1H (CDCl_3) δ : 9,16-9,03 (1H, m), 8,01 (2H, d, $J = 7,3$ Hz), 7,63-7,33 (4H, m), 5,85-5,60 (2H, m), 5,21-4,91 (2H, m), 4,45 (1H, d, $J = 27,8$ Hz), 4,19-4,06 (2H, m), 3,92 (1H, d, $J = 12,7$ Hz), 3,77-3,34 (6H, m), 1,05-0,87 (2H, m), -0,02 (9H, s) (sólo se muestran los picos observables)

(Etapa 9)

N-Benzoil-5'-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-3'-desoxi-3'-fluoro-2-[[2-([2-(trimetilsilil)etoxi]carbonil)amino]etil]amino}adenosina

Usando el compuesto (374 mg) obtenido en la etapa 8 anterior, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 1 del ejemplo 11 para obtener el compuesto del título (398 mg).

MS (ESI) m/z : 878 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

RMN de ^1H (CDCl_3) δ : 8,94 (1H, sa), 8,01-7,98 (2H, m), 7,88-7,81 (1H, m), 7,62-7,49 (3H, m), 7,40-7,20 (9H, m), 6,83-6,78 (4H, m), 6,12-5,48 (2H, m), 5,22-4,98 (2H, m), 4,52 (1H, d, $J = 27,8$ Hz), 4,24-4,10 (2H, m), 3,77 (6H, s), 3,65-3,29 (8H, m), 1,04-0,88 (2H, m), 0,01 (9H, sa).

(Etapa 10)

N-Benzoil-5'-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-2'-O-([2-(2-cianoetoxi)[di(propan-2-il)amino]fosfanil]-3'-desoxi-3'-fluoro-2-[[2-([2-(trimetilsilil)etoxi]carbonil)amino]etil]amino}adenosina

Usando el compuesto (398 mg) obtenido en la etapa 9 anterior, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 6 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (434 mg) en forma de una mezcla de diastereómeros en el átomo de fósforo (proporción de diastereómeros = 1:1).

RMN de ^1H (CDCl_3) δ : 8,79-8,75 (1H, m), 8,00-7,97 (2H, m), 7,83 (0,5H, s), 7,77 (0,5H, s), 7,61-7,21 (12H, m), 6,84-6,79 (4H, m), 6,07-5,96 (1H, m), 5,58-5,10 (3H, m), 4,50-4,40 (1H, m), 4,11-4,06 (2H, m), 3,87-3,80 (1H, m), 3,79 (3H, s), 3,78 (3H, s), 3,65-3,20 (10H, m), 2,63-2,59 (1H, m), 2,39 (1H, t, $J = 6,3$ Hz), 1,17 (3H, d, $J = 6,7$ Hz), 1,15 (3H, d, $J = 6,7$ Hz), 1,10 (3H, d, $J = 6,7$ Hz), 0,92-0,86 (2H, m), 0,81 (3H, d, $J = 6,7$ Hz), -0,01 (9H, s).

(Etapa 11)

Compuesto A:

(5R,7R,8S,12aR,14R,15R,15aR,16R)-7-(6-Benzamido-2-[[2-([2-(trimetilsilil)etoxi]carbonil)amino]etil]amino)-9H-purin-9-il)-14-(6-benzoil-6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocdiazulen-2-il)-15-[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-10-(2-cianoetoxi)-16-fluoro-2-oxo-10-sulfanilidenoctahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2 λ^5 ,10 λ^5 -furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidofosfaciclotetradecin-2-tiolato de N,N-dietiletanaminio

Compuesto B:

(5R,7R,8S,12aR,14R,15R,15aR,16R)-7-(6-Benzamido-2-[[2-([2-(trimetilsilil)etoxi]carbonil)amino]etil]amino)-9H-purin-9-il)-14-(6-benzoil-6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocdiazulen-2-il)-15-[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-16-fluoro-2,10-dioxooctahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2 λ^5 ,10 λ^5 -furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidofosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) de bis(N,N-dietiletanaminio)

Se llevó a cabo la misma reacción que en la etapa 7 del ejemplo 1 en la siguiente escala (materia prima: 502 mg). Usando una solución de acetonitrilo del compuesto obtenido y el compuesto (434 mg) obtenido en la etapa 10 anterior,

la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 8 del ejemplo 1 y la etapa 9 del ejemplo 1 para obtener el diastereómero 1 (43,9 mg) y el diastereómero 2 (27,0 mg) del compuesto del título A, y el diastereómero 1 (55,0 mg) y el diastereómero 2 (121 mg) del compuesto del título B (cada uno con impurezas).

Diastereómero 1 del compuesto A (menos polar)

5 MS (ESI) m/z: 1309 (M+H)⁺.

Diastereómero 2 del compuesto A (más polar)

MS (ESI) m/z: 1309 (M+H)⁺.

Diastereómero 1 del compuesto B (menos polar)

MS (ESI) m/z: 1256 (M+H)⁺.

10 Diastereómero 2 del compuesto B (más polar)

MS (ESI) m/z: 1256 (M+H)⁺.

(Etapa 12-1)

15 (5R,7R,8S,12aR,14R,15R,15aR,16R)-7-(6-Amino-2-([2-([2-(trimetilsilil)etoxi]carbonil)amino)etil]amino)-9H-purin-9-il)-15-([terc-butil(dimetil)silil]oxi)-16-fluoro-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) de bis(N,N-dietiletanaminio)

Usando el compuesto A (diastereómero 1) (43,9 mg) obtenido en la etapa 11 anterior, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 10 del ejemplo 1 para proporcionar el compuesto del título.

MS (ESI) m/z: 1048 (M+H)⁺.

20 (Etapa 12'-1)

(5R,7R,8S,12aR,14R,15R,15aR,16R)-7-(6-Amino-2-([2-([2-(trimetilsilil)etoxi]carbonil)amino)etil]amino)-9H-purin-9-il)-15-([terc-butil(dimetil)silil]oxi)-16-fluoro-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) de bis(N,N-dietiletanaminio)

25 Usando el compuesto B (diastereómero 1) (55,0 mg) obtenido en la etapa 11 anterior, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 10 del ejemplo 1 para proporcionar el compuesto del título.

MS (ESI) m/z: 1048 (M+H)⁺.

(Etapa 12-2)

30 (5R,7R,8S,12aR,14R,15R,15aR,16R)-7-(6-Amino-2-([2-([2-(trimetilsilil)etoxi]carbonil)amino)etil]amino)-9H-purin-9-il)-15-([terc-butil(dimetil)silil]oxi)-16-fluoro-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) de bis(N,N-dietiletanaminio)

Usando el compuesto A (diastereómero 2) (27,0 mg: con impurezas) obtenido en la etapa 11 anterior, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 10 del ejemplo 1 para proporcionar el compuesto del título.

35 MS (ESI) m/z: 1048 (M+H)⁺.

(Etapa 13-1)

40 (5R,7R,8S,12aR,14R,15R,15aS,16R)-7-(6-Amino-2-([2-([2-(trimetilsilil)etoxi]carbonil)amino)etil]amino)-9H-purin-9-il)-16-fluoro-15-hidroxi-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) de bis(N,N-dietiletanaminio)

El compuesto obtenido en la etapa 12-1 anterior y el compuesto obtenido en la etapa 12'-1 se reunieron, y la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (36,4 mg).

MS (ESI) m/z: 934 (M+H)⁺.

(Etapa 13-2)

45 (5R,7R,8S,12aR,14R,15R,15aS,16R)-7-(6-Amino-2-([2-([2-(trimetilsilil)etoxi]carbonil)amino)etil]amino)-9H-purin-9-il)-16-fluoro-15-hidroxi-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-

5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) de bis(N,N-dietiletanaminio)

Usando el compuesto obtenido en la etapa 12-2 anterior, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (12,4 mg).

5 MS (ESI) m/z: 934 (M+H)⁺.

(Etapa 14-1)

(5R,7R,8S,12aR,14R,15R,15aS,16R)-7-{6-Amino-2-[(2-aminoetil)amino]-9H-purin-9-il}-16-fluoro-15-hidroxi-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd)azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) disódico

10 (Diastereómero 1)

Usando el compuesto (36,4 mg) obtenido en la etapa 13-1 anterior, la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 5 del ejemplo 40, y la purificación se realizó a continuación según las siguientes condiciones de purificación para obtener el compuesto del título en forma de una sal de trietilamina.

15 [Condiciones de purificación] HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 2 %-30 % (0 min-40 min)] y Sep-Pak (R) C18 [agua/acetonitrilo/trietilamina al 0,1 %].

La sal de trietilamina obtenida se sometió a intercambio de sales de la misma manera que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (21,0 mg).

MS (ESI) m/z: 790 (M+H)⁺.

20 RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,26 (1H, sa), 8,01 (1H, s), 7,04 (1H, s), 6,27 (1H, dd, J = 4,8 Hz), 6,13 (1H, d, J = 7,9 Hz), 5,69-5,50 (1H, m), 5,57 (1H, dd, J = 53,5, 2,7 Hz), 5,14-5,10 (1H, m), 4,73 (1H, t, J = 4,8 Hz), 4,62-4,53 (1H, m), 4,50-4,44 (2H, m), 4,24-4,01 (3H, m), 3,67-3,58 (1H, m), 3,50-3,44 (3H, m), 3,20-3,04 (2H, m), 2,83-2,81 (2H, m), 2,04-1,94 (2H, m).

RMN de ³¹P (CD₃OD) δ: 58,4 (s), 56,5 (s).

(Etapa 14-2)

25 (5R,7R,8S,12aR,14R,15R,15aS,16R)-7-{6-Amino-2-[(2-aminoetil)amino]-9H-purin-9-il}-16-fluoro-15-hidroxi-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd)azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) de bis(N,N,N-tributilbutan-1-aminio)

30 Usando el compuesto (29,5 mg) obtenido en la etapa 13-2 anterior, la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 5 del ejemplo 40, y la purificación se realizó a continuación según las siguientes condiciones de purificación para obtener el compuesto del título (24,2 mg: con impurezas).

[Condiciones de purificación] HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 2 %-30 % (0 min-30 min)], Sep-Pak (R) C18 [agua/acetonitrilo/trietilamina al 0,1 %], y HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 10 %-25 % (0 min-30 min)].

35 RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,27 (1H, s), 8,02 (1H, s), 7,13 (1H, s), 6,32 (1H, d, J = 6,0 Hz), 6,15 (1H, d, J = 7,9 Hz), 5,63-5,51 (1H, m), 5,39-5,35 (1H, m), 5,30 (1H, dd, J = 54,4, 3,6 Hz), 4,77 (1H, t, J = 5,1 Hz), 4,60-4,34 (4H, m), 4,19-4,13 (1H, m), 3,92-3,88 (1H, m), 3,70-3,62 (1H, m), 3,51-3,45 (3H, m), 3,26-3,07 (18H, m), 2,98-2,87 (2H, m), 2,03-1,99 (2H, m), 1,70-1,62 (16H, m), 1,47-1,37 (16H, m), 1,03 (24H, t, J = 7,3 Hz).

(Etapa 14-2')

40 (5R,7R,8S,12aR,14R,15R,15aS,16R)-7-{6-Amino-2-[(2-aminoetil)amino]-9H-purin-9-il}-16-fluoro-15-hidroxi-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd)azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) disódico

(Diastereómero 2)

El compuesto (19,0 mg: con impurezas) obtenido en la etapa 14-2 anterior se purificó por HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 10 %-25 % (0 min-30 min)].

45 El compuesto resultante se sometió a intercambio de sales de la misma manera que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (8,4 mg).

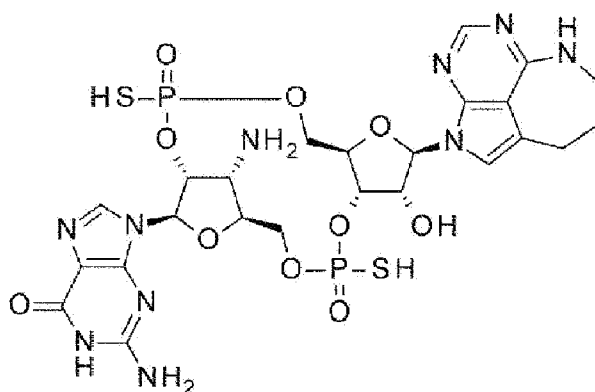
MS (ESI) m/z: 790 (M+H)⁺.

RMN de ^1H (CD_3OD) δ : 8,27 (1H, s), 8,01 (1H, s), 7,12 (1H, s), 6,31 (1H, dd, $J = 6,0$ Hz), 6,15 (1H, d, $J = 8,5$ Hz), 5,65-5,49 (1H, m), 5,38-5,34 (1H, m), 5,30 (1H, dd, $J = 55,0, 3,0$ Hz), 4,77 (1H, dd, $J = 5,7, 4,5$ Hz), 4,60-4,34 (4H, m), 4,19-4,13 (1H, m), 3,92-3,88 (1H, m), 3,68-3,61 (1H, m), 3,51-3,45 (3H, m), 3,22-3,07 (2H, m), 2,89-2,87 (2H, m), 2,03-1,98 (2H, m).

5 RMN de ^{31}P (CD_3OD) δ : 62,6 (s), 59,5 (s).

Ejemplo 53: Síntesis de CDN43

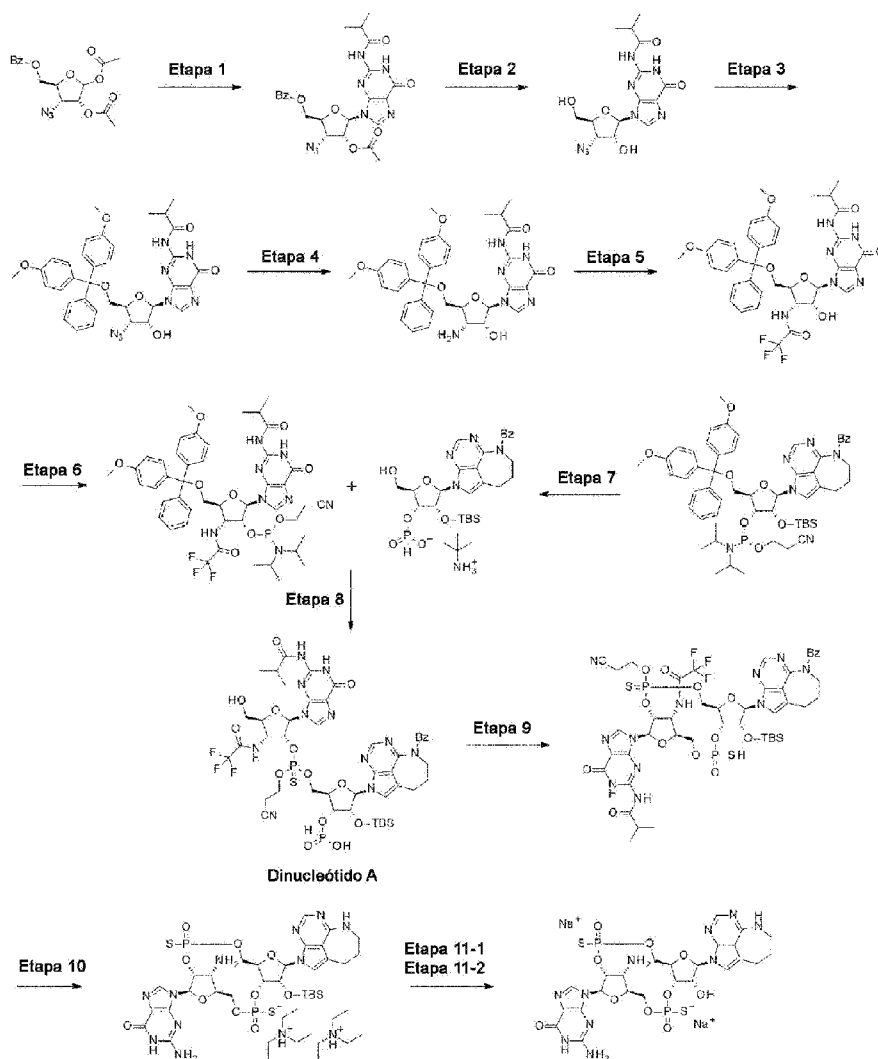
(5S,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-16-Amino-7-(2-amino-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-yl)-15-hidroxi-2,10-bis(sulfanil)-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-yl)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2 λ^5 ,10 λ^5 -furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-diona



43

43a (Diastereómero 1)
43b (Diastereómero 2)

[Esquema de síntesis]



(Etapa 1)

2'-O-acetil-3'-azido-5'-O-benzoyl-3'-desoxy-N-(2-metilpropanoil)guanosina

- 5 A una solución de 1,2-di-O-acetil-3-azido-5-O-benzoyl-3-desoxy-D-ribofuranosa (4,0 g) como compuesto conocido en la bibliografía (Reel. Trav. Chim. Pay-Bas, 1986, 105, 85-91) en acetonitrilo (60 ml) se le añadieron N2-isobutirilguanina (3,65 g) y N,O-bis(trimetilsilil)acetamida (8,08 ml) a temperatura ambiente, y la mezcla de reacción se agitó a 70 °C durante 3 horas. Se añadió trifluorometanosulfonato de trimetilsililo (2,98 ml) a 70 °C, y la mezcla de reacción se agitó a la misma temperatura durante 1 día. Una vez enfriada la mezcla de reacción, se le añadió una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio para inactivar la reacción, y el producto resultante se sometió a extracción con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con salmuera y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El agente desecante se eliminó por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo] para obtener el compuesto del título (4,82 g). RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 12,2 (1H, s), 9,42 (1H, s), 8,02 (2H, m), 7,71 (1H, s), 7,63 (1H, m), 7,48 (2H, m), 5,97 (1H, dd, J = 3,9 Hz), 5,87 (1H, dd, J = 5,5, 3,9 Hz), 5,10 (1H, dd, J = 11,7, 5,5 Hz), 4,93 (1H, t, J = 5,9 Hz), 4,66 (1H, dd, J = 11,7, 5,5 Hz), 4,14 (1H, q, J = 7,2 Hz), 2,77 (1H, m), 2,21 (3H, s), 1,31 (6H, m).
- 10
- 15

(Etapa 2)

3'-Azido-3'-desoxy-N-(2-metilpropanoil)guanosina

- 20 A una disolución mixta del compuesto (5,48 g) obtenido en la etapa 1 anterior en tetrahidrofurano (64 ml)-metanol (32 ml) se le añadió hidróxido de sodio 5 M (17 ml) a 0 °C, y la mezcla de reacción se agitó durante 15 minutos. Se añadió ácido acético (5,08 ml) a la mezcla de reacción para inactivar la reacción, y la mezcla de reacción se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [diclorometano/metanol] para obtener el compuesto del título (3,8 g).

RMN de ^1H (CD_3OD) δ : 8,29 (1H, s), 5,97 (1H, dt, $J = 5,7$ Hz), 4,86 (1H, t, $J = 5,3$ Hz), 4,29 (1H, t, $J = 5,3$ Hz), 4,10 (1H, dt, $J = 5,9, 2,4$ Hz), 3,87 (1H, dd, $J = 12,1, 3,1$ Hz), 3,76 (1H, dd, $J = 12,3, 3,3$ Hz), 2,74 (1H, m), 1,24 (6H, d, $J = 6,7$ Hz).

(Etapa 3)

5 3'-Azido-5'-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-3'-desoxi-N-(2-metilpropanoil)guanosina

Usando el compuesto (3,8 g) obtenido en la etapa 2 anterior, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 1 del ejemplo 11 para obtener el compuesto del título (5,78 g).

10 RMN de ^1H (CDCl_3) δ : 11,9 (1H, s), 7,68 (2H, d, $J = 7,4$ Hz), 7,60 (1H, s), 7,57 (2H, d, $J = 8,6$ Hz), 7,51 (2H, d, $J = 8,6$ Hz), 7,39-7,18 (3H, m), 7,02 (1H, d, $J = 4,7$ Hz), 6,95 (2H, d, $J = 9,0$ Hz), 6,89 (2H, d, $J = 9,0$ Hz), 5,84 (1H, m), 5,63 (1H, d, $J = 7,8$ Hz), 4,58 (1H, dd, $J = 6,7, 2,3$ Hz), 3,99 (1H, m), 3,83 (3H, s), 3,81 (3H, s), 3,63 (1H, dd, $J = 11,0, 1,6$ Hz), 2,92 (1H, dd, $J = 10,8, 2,5$ Hz), 0,91 (1H, m), 69 (3H, d, $J = 6,7$ Hz), 0,21 (3H, d, $J = 7,0$ Hz).

(Etapa 4)

3'-Amino-5'-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-3'-desoxi-N-(2-metilpropanoil)guanosina

15 A una disolución del compuesto (5,17 g) obtenido en la etapa 3 anterior en metanol (60 ml) se le añadió trifenilfosfina (3,98 g), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo] para obtener el compuesto del título (2,22 g). RMN de ^1H (CDCl_3) δ : 7,77 (2H, d, $J = 6,7$ Hz), 7,49-7,17 (8H, m), 6,86-6,77 (4H, m), 5,93 (1H, d, $J = 2,7$ Hz), 5,85 (1H, d, $J = 3,5$ Hz), 5,02 (1H, dd, $J = 6,7, 2,7$ Hz), 4,74 (1H, m), 4,32 (1H, m), 4,06 (1H, m), 3,79 (3H, s), 3,78 (3H, s), 3,72 (1H, t, $J = 5,9$ Hz), 3,49 (1H, dd, $J = 10,4, 3,3$ Hz), 3,33 (1H, dd, $J = 10,4, 3,7$ Hz), 2,26 (1H, m), 1,21-0,95 (6H, m).

(Etapa 5)

5'-O-[Bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-3'-desoxi-N-(2-metilpropanoil)-3'-(2,2,2-trifluoroacetamida)guanosina

25 A una solución del compuesto (2,22 g) obtenido en la etapa 4 anterior en N,N-dimetilformamida (20 ml) se le añadió trifluoroacetato de etilo (4,0 ml), y la mezcla de reacción se agitó a 50 °C durante 2 días. Una vez enfriada la mezcla de reacción, se le añadió una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio para inactivar la reacción, y el producto resultante se sometió a extracción con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con salmuera y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El agente desecante se eliminó por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [diclorometano/metanol] para obtener el compuesto del título (2,06 g).

30 MS (ESI) m/z : 751 ($M+H$) $^+$.

RMN de ^1H (CDCl_3) δ : 12,0 (1H, sa), 7,81 (1H, sa), 7,65 (1H, s), 7,59 (2H, d, $J = 7,4$ Hz), 7,47 (2H, d, $J = 9,0$ Hz), 7,43 (2H, d, $J = 8,6$ Hz), 7,27-7,18 (3H, m), 6,87 (2H, d, $J = 9,0$ Hz), 6,82 (2H, d, $J = 9,0$ Hz), 5,72 (1H, d, $J = 6,3$ Hz), 5,67 (1H, m), 5,02 (1H, m), 4,33 (1H, m), 3,80 (3H, s), 3,78 (3H, s), 3,60 (1H, dd, $J = 10,6, 1,6$ Hz), 3,29 (1H, dd, $J = 10,6, 2,7$ Hz), 1,36 (1H, m), 0,82 (3H, d, $J = 7,0$ Hz), 0,44 (3H, d, $J = 6,7$ Hz).

35 (Etapa 6)

5'-O-[Bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-2'-O-[(2-cianoetoxi)[di(propan-2-il)amino]fosfanil]-3'-desoxi-N-(2-metilpropanoil)-3'-(2,2,2-trifluoroacetamida)guanosina

40 Usando el compuesto (1,0 g) obtenido en la etapa 5 anterior, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 4 del ejemplo 5 para obtener el compuesto del título (780 mg) en forma de una mezcla de diastereómeros en el átomo de fósforo.

(Etapa 7)

6-Benzoil-2-{2-O-[terc-butil(dimetil)silil]-3-O-[oxide(oxo)- λ^5 -fosfanil]- β -D-ribofuranosil]-6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzoc[d]azuleno de 2-metilpropan-2-amino

45 A una solución del compuesto (5,0 g) obtenido en la etapa 6 anterior del ejemplo 1 en acetonitrilo (30 ml) se le añadieron agua (0,18 ml) y una sal de piridina de ácido trifluoroacético (1,2 g), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. A la mezcla de reacción se le añadió terc-butilamina (30 ml) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Tras concentrar la mezcla de reacción a presión reducida, el residuo se destiló azeotrópicamente dos veces con acetonitrilo. A una solución del residuo en diclorometano (50 ml) se le añadieron en este orden agua (0,88 ml) y una solución de ácido dicloroacético (3,2 ml) en diclorometano (50 ml), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se añadieron metanol (5 ml) y piridina (6,3 ml) para inactivar la reacción, y la mezcla de reacción se concentró a presión reducida. El residuo

se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice DIOL [hexano/acetato de etilo -> diclorometano/metanol] para obtener el compuesto del título (3,0 g).

MS (ESI) m/z: 589 (M+H)⁺.

- 5 RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,01 (1H, s), 7,65 (1H, s), 7,44 (1H, m), 7,34-7,26 (4H, m), 7,02 (1H, d, J = 639,3 Hz), 6,24 (1H, s), 4,89 (1H, m), 4,81 (1H, ddd, J = 10,6, 5,1, 1,6 Hz), 4,43-4,27 (3H, m), 3,90 (2H, m), 3,14 (2H, m), 2,30 (2H, m), 1,42 (9H, s), 0,80 (9H, s), -0,27 (6H, s).

(Etapa 8)

Dinucleótido A

- 10 A una disolución mezclada del compuesto (543 mg) obtenido en la etapa 7 anterior en diclorometano (6,0 ml)-acetonitrilo (6,0 ml) se le añadieron los tamices moleculares 3A, 1/16 (500 mg) y 4,5-dicianoimidazol (126 mg), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos. El compuesto (780 mg) obtenido en la etapa 6 anterior se añadió a la mezcla de reacción, que se agitó durante 5 horas, y se añadió N,N-dimetil-N'-(3-sulfaniliden-3H-1,2,4-ditiazol-5-il)metanimidamida (219 mg), y la mezcla de reacción se agitó durante 2 horas más. Los tamices moleculares 3A se retiraron de la mezcla de reacción por filtración, y se añadió una solución acuosa saturada de
- 15 hidrogenocarbonato de sodio al filtrado, que se sometió a extracción con acetato de etilo. Tras secar la capa orgánica sobre sulfato de sodio anhidro, se eliminó el agente desecante por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo]. A una solución del compuesto resultante (740 mg) en diclorometano (6,0 ml) se le añadieron en este orden agua (0,086 ml) y una solución de ácido dicloroacético (0,158 ml) en diclorometano (6,0 ml), y la mezcla de reacción se agitó a
- 20 temperatura ambiente durante 1,5 horas. Se añadió piridina (0,31 ml) para inactivar la reacción y la mezcla se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [diclorometano/metanol] para obtener el compuesto del título (520 mg) en forma de una mezcla de diastereómeros en el átomo de fósforo.

MS (ESI) m/z: 1168 (M+H)⁺.

- 25 (Etapa 9)

N-{9-[(5S,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-14-(6-Benzoil-6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)-15-[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-10-(2-cianoetoxi)-2-oxo-2-sulfanil-10-sulfaniliden-16-(2,2,2-trifluoroacetamida)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-7-il]-6-oxo-6,9-dihidro-1H-purin-2-il}-2-metilpropanamida

- 30 Usando el compuesto (270 mg) obtenido en la etapa 8 anterior, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 9 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (110 mg) en forma de una mezcla de diastereómeros en el átomo de fósforo.

MS (ESI) m/z: 1182 (M+H)⁺.

(Etapa 10)

- 35 (5S,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-16-Amino-7-(2-amino-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il)-15-[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) de bis(N,N-dietiletanaminio)

- 40 Usando el compuesto (110 mg) obtenido en la etapa 9 anterior, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 10 del ejemplo 1 para obtener el diastereómero 1 (34,2 mg) y el diastereómero 2 (19,3 mg) del compuesto del título.

Diastereómero 1 (menos polar)

MS (ESI) m/z: 859 (M+H)⁺.

Diastereómero 2 (más polar)

- 45 MS (ESI) m/z: 859 (M+H)⁺.

(Etapa 11-1)

(5S,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-16-Amino-7-(2-amino-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il)-15-hidroxi-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) disódico

- 50 (Diastereómero 1)

Usando el compuesto (34,2 mg) obtenido en la etapa 10 anterior (diastereómero 1), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 11 del ejemplo 1, y el producto resultante se purificó a continuación mediante cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo] para obtener el compuesto del título en forma de una sal de trietilamina.

- 5 La sal de trietilamina obtenida se sometió a intercambio de sales de la misma manera que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (8,9 mg).

MS (ESI) m/z: 745 (M+H)⁺.

- 10 RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,01 (1H, s), 7,93 (1H, s), 7,01 (1H, s), 6,20 (1H, dt, J = 3,9 Hz), 6,01 (1H, dt, J = 8,6 Hz), 5,65 (1H, m), 5,19 (1H, dt, J = 9,5, 4,0 Hz), 4,68 (1H, t, J = 4,3 Hz), 4,40-4,28 (2H, m), 4,23 (1H, m), 4,17 (1H, m), 4,11-4,01 (3H, m), 3,41 (2H, m), 2,75-2,53 (2H, m), 1,98-1,78 (2H, m).

RMN de ³¹P (CD₃OD) δ: 58,0 (s), 54,3 (s).

(Etapa 11-2)

- 15 (5S,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-16-Amino-7-(2-amino-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il)-15-hidroxi-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzoc[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) disódico

(Diastereómero 2)

- 20 Usando el compuesto (diastereómero 2) (19,3 mg) obtenido en la etapa 10 anterior, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 11 del ejemplo 1, y el producto resultante se purificó a continuación mediante cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo] para obtener el compuesto del título en forma de una sal de trietilamina.

La sal de trietilamina obtenida se sometió a intercambio de sales de la misma manera que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (5,6 mg).

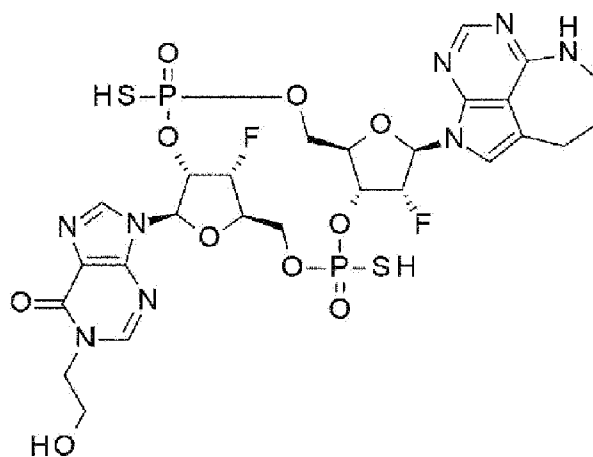
MS (ESI) m/z: 745 (M+H)⁺.

- 25 RMN de ¹H (DMSO-d₆) δ: 10,7 (1H, s), 8,40 (2H, sa), 8,09 (1H, s), 8,03 (1H, s), 7,74 (1H, sa), 7,22 (1H, s), 6,95 (1H, sa), 6,53 (2H, sa), 6,1,6 (2H, t, J = 8,2 Hz), 5,57 (1H, q, J = 8,0 Hz), 5,25 (1H, dd, J = 7,8, 4,3 Hz), 4,61 (1H, dd, J = 7,6, 4,5 Hz), 4,38 (1H, s), 4,27-4,11 (3H, m), 3,85-3,71 (3H, m), 3,35 (2H, m), 2,80 (2H, m), 1,93 (2H, m).

RMN de ³¹P (DMSO-d₆) δ: 60,3 (s), 58,3 (s).

Ejemplo 54: Síntesis de CDN44

- 30 (5R,7R,8S,12aR,14R,15R,15aR,16R)-15,16-Difluoro-7-[1-(2-hidroxietil)-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il]-2,10-bis(sulfanil)-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzoc[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-diona



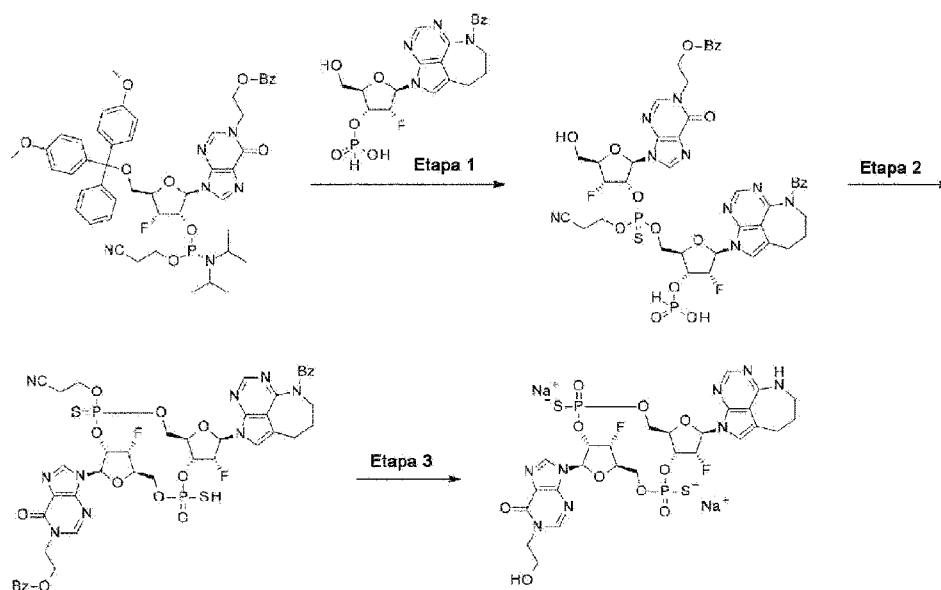
44

44a (Diastereómero 1)

44b (Diastereómero 2)

35

[Esquema de síntesis]



(Etapa 1)

- Usando el compuesto (636 mg) obtenido en la etapa 8 del ejemplo 44, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 7 del ejemplo 1 para proporcionar una solución en acetonitrilo de 6-benzoil-2-{2-desoxi-2-fluoro-3-O-[hidroxi(oxo)-λ⁵-fosfanil]-β-D-ribofuranosil}-6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azuleno. Utilizando la solución en acetonitrilo obtenida y el compuesto obtenido en la etapa 7 del ejemplo 49 (640 mg), se llevó a cabo la reacción de la misma manera que en la etapa 8 del ejemplo 1, y el producto bruto resultante se utilizó directamente para la reacción posterior.

(Etapa 2)

- 10 Benzoato de 2-{9-[(5R,7R,8S,12aR,14R,15R,15aR,16R)-14-(6-benzoil-6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)-10-(2-cianoetoxi)-15,16-difluoro-2-oxo-2-sulfanil-10-sulfanilidenoctahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfacilotetradecin-7-il]-6-oxo-6,9-dihidro-1H-purin-1-il} etilo

- 15 Usando el producto bruto obtenido en la etapa 1 anterior, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 9 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (228 mg: con impurezas) en forma de una mezcla de diastereómeros en el átomo de fósforo. MS (ESI) m/z: 1040 (M+H)⁺.

(Etapa 3)

- 20 (5R,7R,8S,12aR,14R,15R,15aR,16R)-15,16-Difluoro-7-[1-(2-hidroxietil)-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il]-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfacilotetradecin-2,10-bis(tiolato) disódico

- 25 El compuesto (228 mg) obtenido en la etapa 2 anterior se disolvió en metanol (5 ml) y una solución acuosa de amoníaco al 28 % (5 ml), y la mezcla de reacción se agitó a 60 °C durante 12 horas. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida y se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo], HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 5 %-30 % (0 min-40 min)], y HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/solución de acetonitrilo-metanol (1:1), solución de acetonitrilo-metanol (1:1): del 7 %-50 % (0 min-40 min)] en este orden para obtener el diastereómero 1 y el diastereómero 2 del compuesto del título en forma de sales de trietilamina (tiempo de retención en HPLC: diastereómero 1 > 2).

- 30 Las sales de trietilamina obtenidas se sometieron cada una a intercambio salino de la misma manera que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el diastereómero 1 (12,5 mg) y el diastereómero 2 (15,8 mg) del compuesto del título.

Diastereómero 1 (menos polar)

MS (ESI) m/z: 779 (M+H)⁺.

RMN de ^1H (CD_3OD) δ : 8,63 (1H, s), 8,16 (1H, s), 8,03 (1H, s), 7,08 (1H, s), 6,47 (1H, dd, $J = 17,5, 1,8$ Hz), 6,27 (1H, d, $J = 7,9$ Hz), 5,64-5,36 (3H, m), 5,31-5,20 (1H, m), 4,62-4,50 (2H, m), 4,44-4,39 (1H, m), 4,32-4,12 (3H, m), 4,10-4,03 (1H, m), 3,99-3,91 (1H, m), 3,83-3,72 (2H, m), 3,52-3,46 (2H, m), 2,78-2,72 (2H, m), 2,04-1,85 (2H, m).

RMN de ^{31}P (CD_3OD) δ : 57,5 (s), 55,0 (s).

5 Diastereómero 2 (más polar)

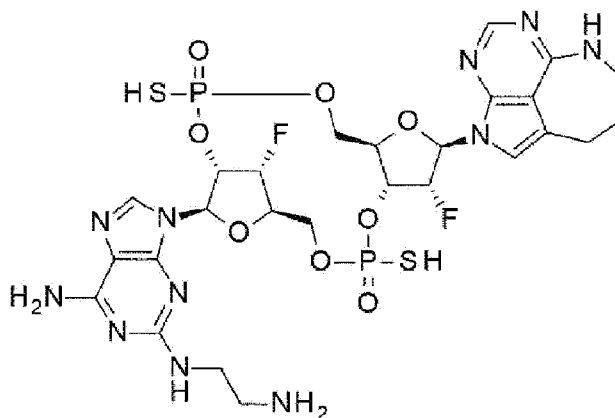
MS (ESI) m/z : 779 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

RMN de ^1H (CD_3OD) δ : 8,69 (1H, s), 8,21 (1H, s), 8,03 (1H, s), 7,25 (1H, s), 6,49 (1H, dd, $J = 15,1, 3,0$ Hz), 6,28 (1H, d, $J = 9,1$ Hz), 5,64-5,28 (4H, m), 4,61-4,39 (4H, m), 4,26-4,17 (1H, m), 4,13-3,95 (3H, m), 3,84-3,77 (2H, m), 3,53-3,45 (2H, m), 2,92-2,77 (2H, m), 2,02-1,92 (2H, m).

10 RMN de ^{31}P (CD_3OD) δ : 60,7 (s), 57,4 (s).

Ejemplo 55: Síntesis de CDN45

(5R,7R,8S,12aR,14R,15R,15aR,16R)-7-{6-Amino-2-[(2-aminoetil)amino]-9H-purin-9-yl}-15,16-difluoro-2,10-bis(sulfanil)-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-yl)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2 λ^5 ,10 λ^5 -furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciotetradecin-2,10-diona

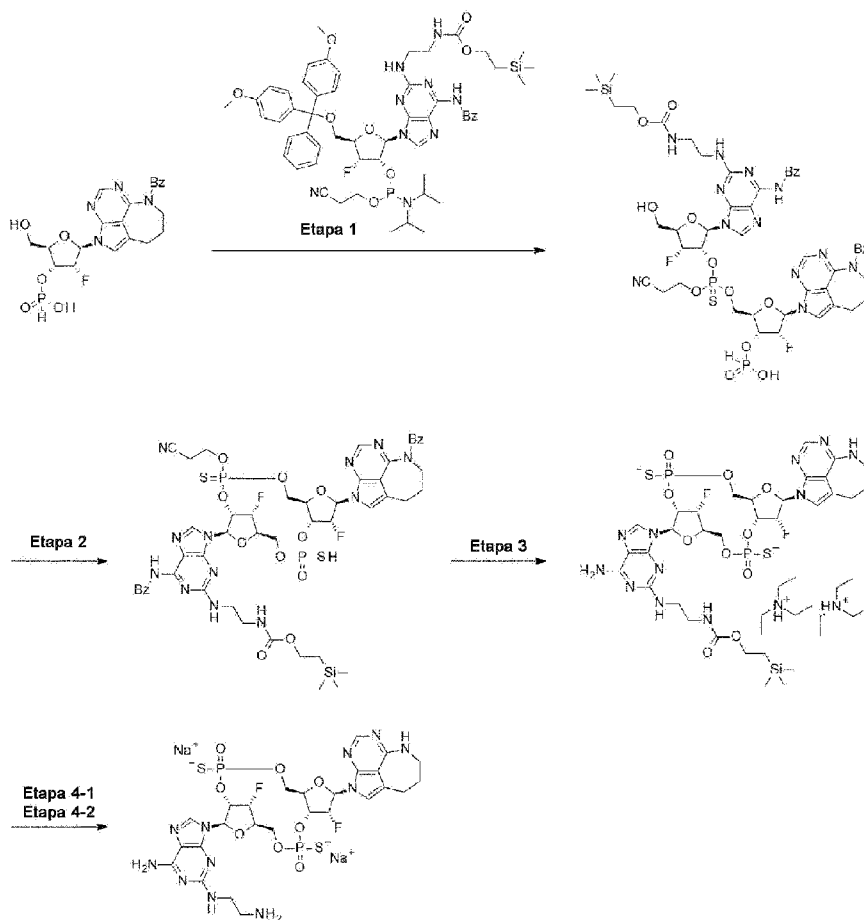


45

45a (Diastereómero 1)

45b (Diastereómero 2)

[Esquema de síntesis]



(Etapa 1)

- 5 Usando el compuesto (696 mg) obtenido en la etapa 8 del ejemplo 44, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 7 del ejemplo 1 para proporcionar una solución en acetonitrilo de 6-benzoyl-2-{2-desoxi-2-fluoro-3-O-[hidroxio(oxo)-λ⁵-fosfaniil]-β-D-ribofuranosil}-6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azuleno. Utilizando la solución en acetonitrilo obtenida y el compuesto (738 mg) obtenido en la etapa 10 del ejemplo 52 se llevó a cabo la reacción de la misma manera que en la etapa 8 del ejemplo 1, y el producto bruto resultante se utilizó directamente para la reacción posterior.

(Etapa 2)

- 10 [2-({6-Benzamido-9-[(5R,7R,8S,12aR,14R,15R,15aR,16R)-14-(6-benzoyl-6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)-10-(2-cianoetoxi)-15,16-difluoro-2-oxo-2-sulfanil-10-sulfanilidenoctahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfacilotetradecin-7-il]-9H-purin-2-il}amino)etil]carbamato de 2-(trimetilsilil)etilo

- 15 Usando la mezcla obtenida en la etapa 1 anterior, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 9 del ejemplo 1 para proporcionar una mezcla que contenía el compuesto del título (1,31 g). La mezcla obtenida se utilizó directamente para la reacción posterior.

MS (ESI) m/z: 1195 (M-H):

(Etapa 3)

- 20 (5R,7R,8S,12aR,14R,15R,15aR,16R)-7-(6-Amino-2-[[2-({[2-(trimetilsilil)etoxi]carbonil}amino)etil]amino]-9H-purin-9-il)-15,16-difluoro-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfacilotetradecin-2,10-bis(tiolato) de bis(N,N-dietiletanaminio)

- 25 Usando la mezcla (1,31 g) obtenida en la etapa 2 anterior, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 10 del ejemplo 1 para obtener el diastereómero 1 (249 mg; con impurezas) y el diastereómero 2 (344 mg; con impurezas) del compuesto del título.

Diastereómero 1 (menos polar)

MS (ESI) m/z: 936 (M+H)⁺.

Diastereómero 2 (más polar)

MS (ESI) m/z: 936 (M+H)⁺.

5 (Etapa 4-1)

(5R,7R,8S,12aR,14R,15R,15aR,16R)-7-{6-Amino-2-[(2-aminoetil)amino]-9H-purin-9-il}-15,16-difluoro-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) disódico

(Diastereómero 1)

- 10 Usando el compuesto (diastereómero 1) (249 mg: con impurezas) obtenido en la etapa 3 anterior, la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 5 del ejemplo 40, y la purificación se realizó a continuación según las siguientes condiciones de purificación para obtener el compuesto del título en forma de una sal de trietilamina.

- 15 [Condiciones de purificación] HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 10 %-40 % (0 min-30 min)], y HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 0 %-30 % (0 min-30 min)].

La sal de trietilamina obtenida se sometió a intercambio de sales de la misma manera que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (9,2 mg).

MS (ESI) m/z: 792 (M+H)⁺.

- 20 RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,17 (1H, sa), 8,01 (1H, s), 7,01 (1H, s), 6,45 (1H, dd, J = 17,5 Hz), 6,07 (1H, d, J = 8,5 Hz), 5,84-5,64 (1H, m), 5,61 (1H, dd, J = 53,5, 3,3 Hz), 5,40 (1H, dd, J = 52,0, 4,2 Hz), 5,30-5,18 (1H, m), 4,59-4,17 (6H, m), 3,54-3,42 (2H, m), 3,39-3,31 (2H, m), 3,05-2,98 (2H, m), 2,69-2,51 (2H, m), 2,02-1,83 (2H, m).

RMN de ³¹P (CD₃OD) δ: 57,3 (s), 54,8 (s).

(Etapa 4-2)

- 25 (5R,7R,8S,12aR,14R,15R,15aR,16R)-7-{6-Amino-2-[(2-aminoetil)amino]-9H-purin-9-il}-15,16-difluoro-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) disódico

(Diastereómero 2)

- 30 Usando el compuesto (diastereómero 2) (344 mg: con impurezas) obtenido en la etapa 3 anterior, la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 5 del ejemplo 40, y la purificación se realizó a continuación según las siguientes condiciones de purificación para obtener el compuesto del título en forma de una sal de trietilamina.

[Condiciones de purificación] HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 10 %-40 % (0 min-30 min)], y HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 10 %-30 % (0 min-30 min)].

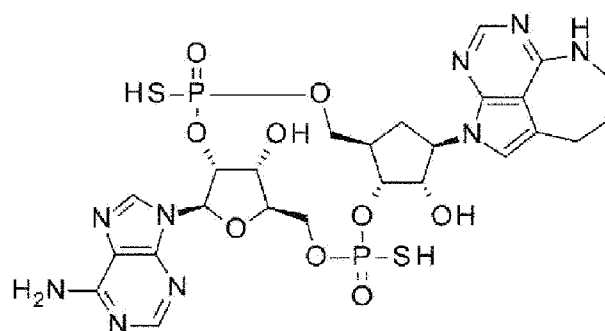
- 35 La sal de trietilamina obtenida se sometió a intercambio de sales de la misma manera que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (4,7 mg).

MS (ESI) m/z: 792 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,05 (1H, sa), 8,01 (1H, s), 7,35 (1H, s), 6,50 (1H, d, J = 16,3 Hz), 6,06 (1H, d, J = 8,5 Hz), 5,98-5,75 (1H, m), 5,48-5,28 (3H, m), 4,59-4,28 (3H, m), 4,29-4,22 (1H, m), 4,04-3,98 (1H, m), 3,56-3,42 (2H, m), 3,36-2,61 (6H, m), 2,05-1,86 (2H, m).

- 40 RMN de ³¹P (CD₃OD) δ: 58,4 (sa), 57,6 (s).

Ejemplo 56: Síntesis de CDN46 (5R,7R,8R,12aR,14R,15S,15aR,16R)-7-(6-amino-9H-purin-9-il)-15,16-dihidroxi-2,10-bis(sulfanil)-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)decahidro-2H,10H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-ciclopenta[1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-diona

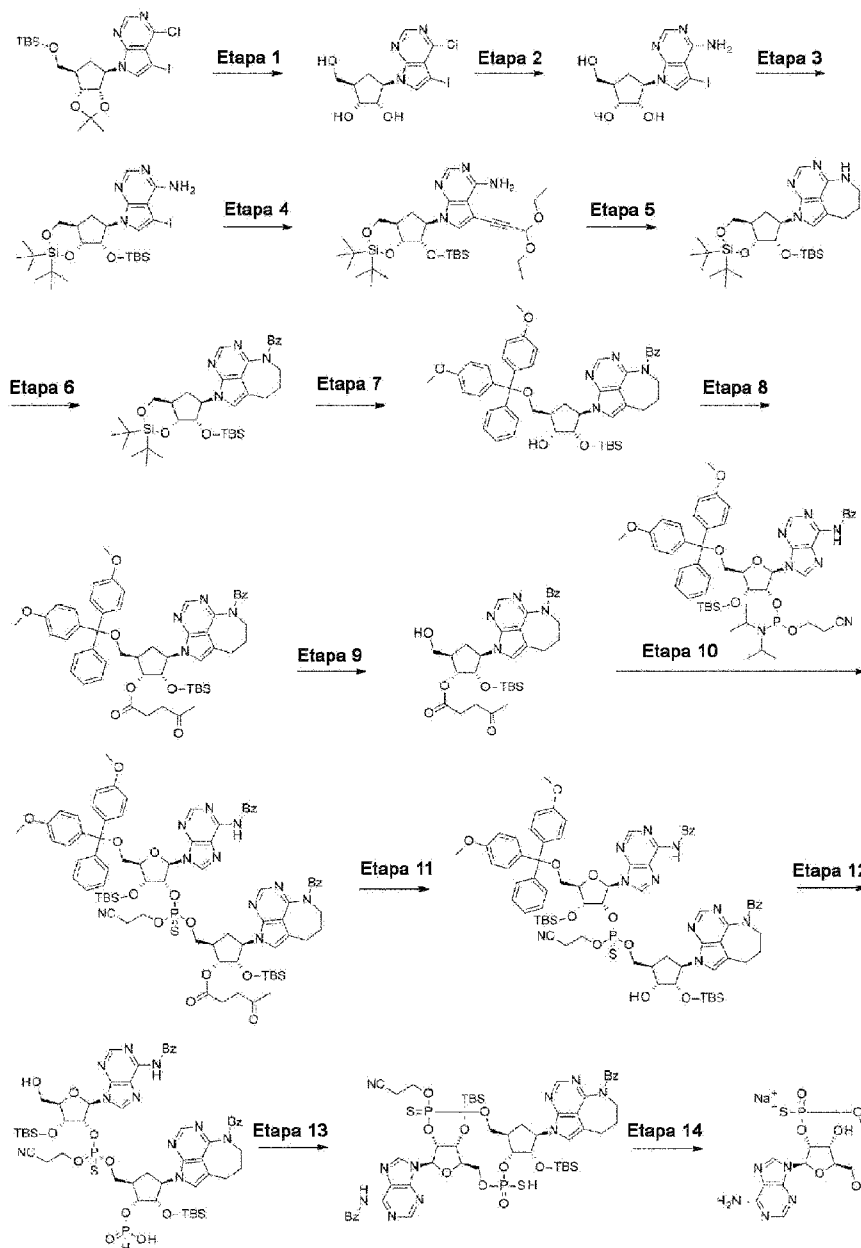


46

46a (Diastereómero 1)

46b (Diastereómero 2)

5 [Esquema de síntesis]



(Etapa 1)

(1R,2S,3R,5R)-3-(4-Cloro-5-yodo-7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-7-il)-5-(hidroximetil)ciclopentan-1,2-diol

- 5 A 7-[(3aS,4R,6R,6aR)-6-({[terc-butil(dimetil)silil]oxi}metil)-2,2-dimetiltetrahydro-2H,3aH-ciclopenta[d][1,3]dioxol-4-il]-4-cloro-5-yodo-7H-pirrol[2,3-d]pirimidina (6,0 g) como compuesto conocido en la bibliografía (documento WO 2015/199136) se le añadieron ácido trifluoroacético (36 ml) y agua (12 ml) en este orden, y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida para obtener una forma bruta del compuesto del título. El producto bruto obtenido se utilizó directamente para la reacción posterior.

(Etapa 2)

- 10 (1R,2S,3R,5R)-3-(4-Amino-5-yodo-7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-7-il)-5-(hidroximetil)ciclopentan-1,2-diol

A una solución del compuesto (4,4 g) obtenido en la etapa 1 anterior en 1,4-dioxano (40 ml) se le añadió amoniaco líquido al 28 % (40 ml), y la mezcla de reacción se agitó a 90 °C durante 72 horas. Tras concentrar la mezcla de reacción a presión reducida, el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice C18 [agua/metanol] para obtener el compuesto del título (3,4 g).

RMN de ^1H (CD_3OD) δ : 8,07 (1H, s), 7,56 (1H, s), 6,57 (1H, sa), 4,89 (1H, dd, $J = 19,2, 8,6$ Hz), 4,79 (1H, d, 6,7 Hz), 4,70 (1H, t, $J = 5,3$ Hz), 4,59 (1H, d, $J = 4,3$ Hz), 4,15 (1H, m), 3,78 (1H, m), 3,45 (2H, m), 2,14 (1H, m), 2,03 (1H, m), 1,48 (1H, m).

(Etapa 3)

- 5 7-[(4aR,6R,7S,7aR)-2,2-Di-terc-butil-7-[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]hexahidro-2H-ciclopenta[d][1,3,2]dioxasilin-6-il]-5-yodo-7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-amina

Usando el compuesto (3,3 g) obtenido en la etapa 2 anterior, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 1 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (4,6 g).

- 10 RMN de ^1H (CDCl_3) δ : 8,27 (1H, s), 7,00 (1H, s), 5,69 (1H, sa), 4,92 (1H, dt, $J = 9,0, 1,2$ Hz), 4,32 (3H, m), 3,98 (1H, t, $J = 10,8$ Hz), 2,58 (1H, m), 2,26 (1H, m), 1,74 (1H, sa), 1,49 (1H, dt, $J = 12,5, 8,6$ Hz), 1,13 (9H, s), 1,09 (9H, s), 0,86 (9H, s), 0,06 (3H, s), 0,00 (3H, s).

(Etapa 4)

7-[(4aR,6R,7S,7aR)-2,2-Di-terc-butil-7-[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]hexahidro-2H-ciclopenta[d][1,3,2]dioxasilin-6-il]-5-(3,3-dietoxiprop-1-in-1-il)-7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-amina

- 15 Usando el compuesto (4,6 g) obtenido en la etapa 3 anterior, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 2 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (3,6 g).

RMN de ^1H (CDCl_3) δ : 8,30 (1H, s), 7,15 (1H, s), 5,61 (1H, sa), 5,55 (1H, s), 4,90 (1H, dt, $J = 9,0, 1,2$ Hz), 4,32 (3H, m), 3,97 (1H, t, $J = 10,8$ Hz), 3,86 (2H, m), 3,71 (2H, m), 2,58 (1H, m), 2,28 (1H, m), 1,68 (1H, s), 1,48 (1H, m), 1,32 (6H, t, $J = 7,0$ Hz), 1,13 (9H, s), 1,09 (9H, s), 0,86 (9H, s), 0,05 (3H, s), 0,04 (3H, s).

- 20 (Etapa 5)

2-[(4aR,6R,7S,7aR)-2,2-Di-terc-butil-7-[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]hexahidro-2H-ciclopenta[d][1,3,2]dioxasilin-6-il]-6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azuleno

Usando el compuesto (3,60 g) obtenido en la etapa 4 anterior, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 3 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (2,44 g).

- 25 MS (ESI) m/z : 589 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

RMN de ^1H (CDCl_3) δ : 8,18 (1H, s), 6,66 (1H, s), 6,55 (1H, sa), 4,94 (1H, m), 4,36-4,25 (3H, m), 3,97 (1H, t, $J = 10,8$ Hz), 3,57 (2H, m), 2,93 (2H, t, $J = 5,5$ Hz), 2,58 (1H, m), 2,27 (1H, m), 2,09 (1H, m), 1,46 (1H, dt, $J = 12,5, 8,6$ Hz), 1,29 (1H, m), 1,12 (9H, s), 1,08 (9H, s), 0,86 (9H, s), 0,04 (3H, s), 0,03 (3H, s).

(Etapa 6)

- 30 {2-[(4aR,6R,7S,7aR)-2,2-Di-terc-butil-7-[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]hexahidro-2H-ciclopenta[d][1,3,2]dioxasilin-6-il]-2,7,8,9-tetrahidro-6H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-6-il}(fenil)metanona

Usando el compuesto (2,44 g) obtenido en la etapa 5 anterior, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 4 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (2,01 g).

MS (ESI) m/z : 663 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

- 35 RMN de ^1H (CDCl_3) δ : 8,12 (1H, s), 7,42-7,25 (5H, m), 6,97 (1H, s), 5,04 (1H, t, $J = 9,0$ Hz), 4,44 (1H, m), 4,38 (1H, dd, $J = 10,0, 4,9$ Hz), 4,33-4,23 (3H, m), 4,00 (1H, t, $J = 10,8$ Hz), 3,06 (2H, m), 2,60 (1H, m), 2,29 (3H, m), 1,57 (1H, m), 1,14 (9H, s), 1,10 (9H, s), 0,84 (9H, s), 0,06 (3H, s), 0,05 (3H, s).

(Etapa 7)

- 40 {2-[(1R,2S,3R,4R)-4-[[Bis(4-metoxifenil)(fenil)metoxi]metil]-2-[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-3-hidroxiciclopentilo]-2,7,8,9-tetrahidro-6H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-6-il}(fenil)metanona

Usando el compuesto (2,01 g) obtenido en la etapa 6 anterior, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 5 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (2,13 g).

- 45 RMN de ^1H (CDCl_3) δ : 8,03 (1H, s), 7,49 (2H, m), 7,38-7,19 (13H, m), 7,02 (1H, s), 6,83 (4H, m), 5,07 (1H, m), 4,60 (1H, dd, $J = 8,6, 5,1$ Hz), 4,29 (2H, m), 3,99 (1H, m), 3,79 (6H, s), 3,33 (1H, dd, $J = 9,4, 3,9$ Hz), 3,22 (1H, dd, $J = 9,2, 4,1$ Hz), 2,97 (2H, t, $J = 6,5$ Hz), 2,68 (1H, d, $J = 1,6$ Hz), 2,37-2,18 (5H, m), 0,73 (9H, s), -0,18 (3H, s), -0,47 (3H, s).

(Etapa 8)

(1R,2S,3R,5R)-3-(6-Benzoil-6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)-5-[[bis(4-metoxifenil)(fenil)metoxi]metil]-2-[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]ciclopentilo 4-oxopentanoato

A una solución de ácido levulínico (2,96 g) en tetrahidrofurano (20 ml) se le añadió N,N-diclohexilcarbodiimida (2,63 g), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 12 horas. Tras eliminar un precipitado por filtración, el filtrado se concentró a presión reducida. A una solución del residuo en diclorometano (20 ml) se le añadió el compuesto (2,10 g) obtenido en la etapa 7 anterior y 4-dimetilaminopiridina (155 mg), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Tras añadir a la mezcla de reacción una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio para inactivar la reacción, el producto resultante se sometió a extracción con acetato de etilo, y la capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El agente desecante se eliminó por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo] para obtener el compuesto del título (2,35 g).

RMN de ^1H (CDCl_3) δ : 8,02 (1H, s), 7,49 (2H, m), 7,40-7,19 (13H, m), 7,04 (1H, s), 6,84 (4H, m), 5,26 (1H, dd, $J = 5,1, 2,0$ Hz), 5,06 (1H, q, $J = 9,0$ Hz), 4,61 (1H, dd, $J = 8,8, 4,9$ Hz), 4,28 (2H, m), 3,79 (6H, s), 3,39 (1H, dd, $J = 9,2, 3,7$ Hz), 3,19 (1H, dd, $J = 9,4, 3,9$ Hz), 3,00-1,85 (14H, m), 0,64 (9H, s), -0,13 (3H, s), -0,45 (3H, s).

(Etapa 9)

(1R,2S,3R,5R)-3-(6-Benzoil-6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)-2-[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-5-(hidroximetil)ciclopentilo-4-oxopentanoato

A una disolución del compuesto (2,35 g) obtenido en la etapa 8 anterior en diclorometano (25 ml) se le añadieron en este orden agua (0,24 ml) y una disolución de ácido dicloroacético (1,05 ml) en diclorometano (25 ml), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Tras añadir metanol (1,0 ml) y una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio a la mezcla de reacción para inactivar la reacción, el producto resultante se sometió a extracción con acetato de etilo y la capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El agente desecante se eliminó por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo] para obtener el compuesto del título (1,15 g).

MS (ESI) m/z : 621 ($M+H$) $^+$.

RMN de ^1H (CDCl_3) δ : 8,05 (1H, s), 7,38-7,17 (5H, m), 7,04 (1H, s), 5,19 (1H, dd, $J = 4,5, 1,4$ Hz), 4,82-4,69 (2H, m), 4,47 (1H, dd, $J = 14,5, 7,4$ Hz), 4,31 (1H, d, $J = 7,8$ Hz), 4,15-4,08 (1H, m), 3,83 (1H, m), 3,75 (1H, d, $J = 10,8$ Hz), 3,11-2,95 (2H, m), 2,90-2,51 (4H, m), 2,47-2,32 (2H, m), 2,32-2,11 (3H, m), 2,22 (3H, s), 0,68 (9H, s), -0,16 (3H, s), -0,50 (3H, s).

(Etapa 10)

N-Benzoil-2'-O-[[{[(1R,2R,3S,4R)-4-(6-benzoil-6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)-3-[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-2-[(4-oxopentilo)oxi]ciclopentil]metoxi](2-cianoetoxi)fosforotioil]-5'-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-3'-O-[terc-butil(dimetil)silil]adenosina

A una disolución del compuesto (550 mg) obtenido en la etapa 9 anterior en acetonitrilo (12 ml) se le añadieron los tamices moleculares 3A, 1/16 (500 mg) y N-benzoil-5'-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-3'-O-[terc-butil(dimetil)silil]-2'-O-[(2-cianoetoxi)di(propan-2-il)amino]fosfanil]adenosina (1,23 g) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos. A la mezcla de reacción se le añadió 4,5-dicanoimidazol y la mezcla de reacción se agitó durante 1 hora, y después se añadió 1,1-dióxido de 3H-1,2-benzotiol-3-ona (355 mg), y la mezcla de reacción se agitó durante 1 hora más. Los tamices moleculares 3A se retiraron de la mezcla de reacción por filtración, y se añadió una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio al filtrado, que se sometió a extracción con acetato de etilo. Tras secar la capa orgánica sobre sulfato de sodio anhidro, se eliminó el agente desecante por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo] para obtener el compuesto del título (1,17 g) en forma de una mezcla de diastereómeros en el átomo de fósforo. MS (ESI) m/z : 1539 ($M+H$) $^+$.

(Etapa 11)

N-Benzoil-2'-O-[[{[(1R,2R,3S,4R)-4-(6-benzoil-6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)-3-[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-2-hidroxiciclopentilo]metoxi](2-cianoetoxi)fosforotioil]-5'-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-3'-O-[terc-butil(dimetil)silil]adenosina

A una disolución del compuesto (1,22 g) obtenido en la etapa 10 anterior en acetonitrilo (2,0 ml) se le añadió una disolución mixta de hidrazina monohidrato (0,25 ml) en ácido acético (5,0 ml)-piridina (7,5 ml), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Tras añadir agua a la mezcla de reacción para inactivar la reacción, el producto resultante se sometió a extracción con acetato de etilo, y la capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El agente desecante se eliminó por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo] para obtener el compuesto del título (770 mg) en forma de una mezcla de diastereómeros en el átomo de fósforo.

MS (ESI) m/z: 1442 (M+H)⁺.

(Etapa 12)

N-Benzoil-2'-O-[[[(1R,2R,3S,4R)-4-(6-benzoil-6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)-3-[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-2-[[hidroxi(oxo)-λ⁵-fosfanil]oxi]ciclopentilo]metoxi](2-cianoetoxi)fosforotioil]-3'-O-[terc-butil(dimetil)silil]adenosina

A una disolución del compuesto (770 mg) obtenido en la etapa 11 anterior en piridina (8,0 ml) se le añadió difenilfosfito (0,61 ml), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Se añadieron agua (20 ml), acetonitrilo (8,0 ml) y una solución acuosa de acetato de trietilamonio (2 M, 1,6 ml) a la mezcla de reacción, que se agitó durante 1 hora, y la mezcla de reacción se concentró a presión reducida. A una solución del residuo en diclorometano (5,0 ml) se le añadieron en este orden agua (0,096 ml) y una solución de ácido dicloroacético (0,22 ml) en diclorometano (5,0 ml), y la mezcla de reacción se agitó durante 30 minutos. Se añadió piridina (0,43 ml) para inactivar la reacción y la mezcla se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo] para obtener el compuesto del título (400 mg) en forma de una mezcla de diastereómeros en el átomo de fósforo.

MS (ESI) m/z: 1203 (M+H)⁺.

(Etapa 13)

N-{9-[(5R,7R,8R,12aR,14R,15S,15aR,16R)-14-(6-Benzoil-6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)-15,16-bis[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-10-(2-cianoetoxi)-2-oxo-2-sulfanil-10-sulfanilidendecahidro-2H,10H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-ciclopenta[[1,3,6,9,11,2,10]pentaoxadifosfacilotetradecin-7-il]-9H-purin-6-il]}(benzamida

Usando el compuesto (400 mg) obtenido en la etapa 12 anterior, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 9 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (300 mg) en forma de una mezcla de diastereómeros en el átomo de fósforo.

MS (ESI) m/z: 1217 (M+H)⁺.

(Etapa 14)

(5R,7R,8R,12aR,14R,15S,15aR,16R)-7-(6-Amino-9H-purin-9-il)-15,16-dihidroxi-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)decahidro-2H,10H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-ciclopenta[[1,3,6,9,11,2,10]pentaoxadifosfacilotetradecin-2,10-bis(tiolato) disódico

A una disolución del compuesto (300 mg) obtenido en la etapa 13 anterior en metanol (10 ml) se le añadió amoniaco líquido al 28 % (10 ml), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 12 horas. Después de concentrar la mezcla de reacción a presión reducida, se añadió trifluorhidrato de trietilamina (3,0 ml) al residuo, y el producto resultante se agitó a 45 °C durante 2 horas. La mezcla de reacción se añadió gota a gota a una solución mixta enfriada con hielo de una solución 1 M de hidrogenocarbonato de trietilamonio (18 ml)-triethylamina (6,0 ml) para inactivar la reacción. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida y se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo] para obtener el diastereómero 1 y el diastereómero 2 del compuesto del título en forma de sales de trietilamina.

Las sales de trietilamina obtenidas se sometieron cada una a intercambio salino de la misma manera que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el diastereómero 1 (45,6 mg) y el diastereómero 2 (12,6 mg) del compuesto del título. Diastereómero 1 (menos polar)

MS (ESI) m/z: 728 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,69 (1H, s), 8,10 (1H, s), 7,93 (1H, s), 7,10 (1H, s), 6,29 (1H, dd, J = 8,2 Hz), 5,38 (1H, dq, J = 9,7, 2,7 Hz), 4,99 (2H, m), 4,79 (1H, d, J = 3,9 Hz), 4,61 (1H, dd, J = 7,2, 4,9 Hz), 4,36 (1H, m), 4,29 (1H, m), 4,19 (1H, m), 3,99 (1H, m), 3,89 (1H, q, J = 9,9 Hz), 3,47 (2H, t, J = 4,9 Hz), 2,80 (2H, q, J = 5,7 Hz), 2,72 (1H, m), 2,37 (1H, dt, J = 16,4, 6,7 Hz), 1,94 (2H, m), 1,61 (1H, dt, J = 16,4, 6,7 Hz).

RMN de ³¹P (CD₃OD) δ: 58,3 (s), 54,0 (s).

Diastereómero 2 (más polar)

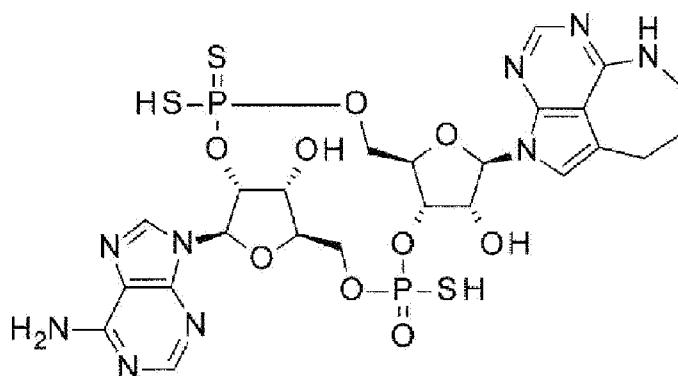
MS (ESI) m/z: 728 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,74 (1H, s), 8,10 (1H, s), 7,95 (1H, s), 7,09 (1H, s), 6,26 (1H, d, J = 8,6 Hz), 5,44 (1H, m), 5,24 (1H, m), 5,06 (1H, q, J = 9,3 Hz), 4,59 (1H, dd, J = 9,4, 4,3 Hz), 4,51 (1H, d, J = 4,3 Hz), 4,34-4,21 (3H, m), 3,94 (1H, m), 3,74 (1H, m), 3,47 (2H, m), 2,85 (2H, t, J = 5,5 Hz), 2,54 (1H, m), 2,45 (1H, dt, J = 17,1, 6,7 Hz), 1,95 (2H, m), 1,38 (1H, ddd, J = 14,6, 8,3, 5,0 Hz).

RMN de ³¹P (CD₃OD) δ: 62,7 (s), 60,1 (s).

Ejemplo 57: Síntesis de CDN47

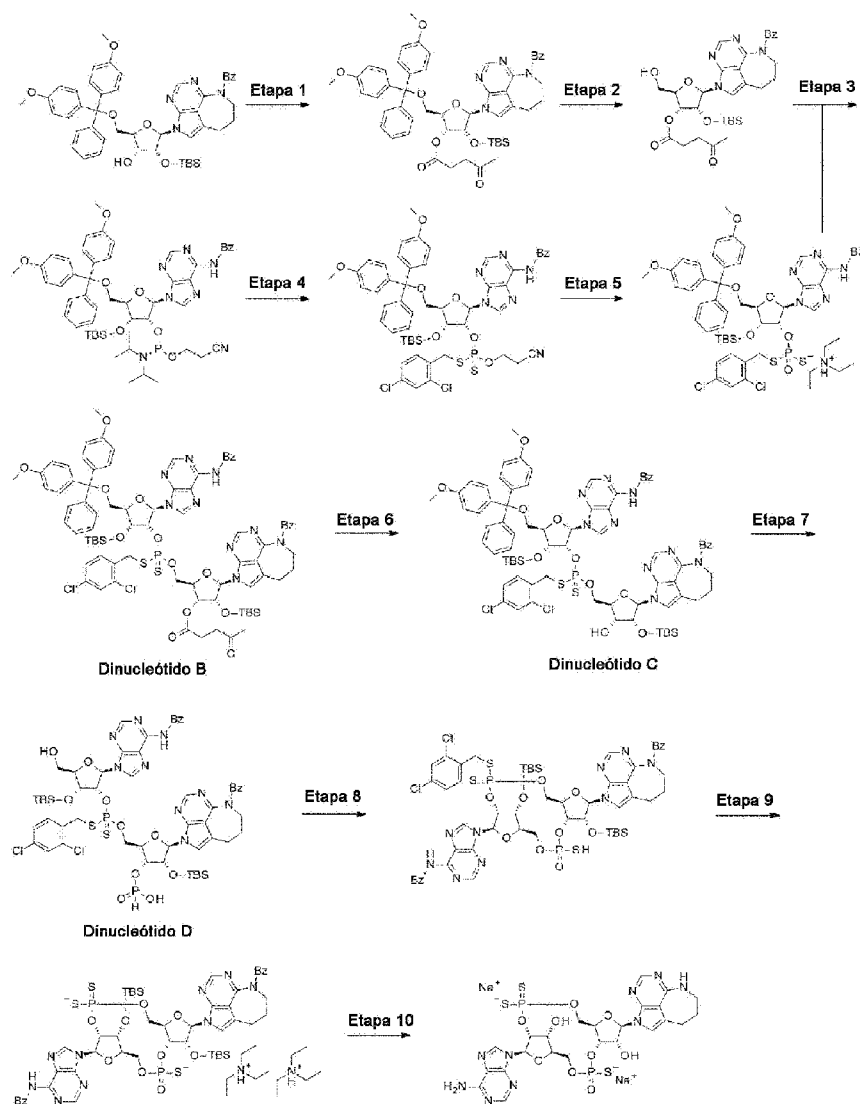
(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-7-(6-Amino-9H-purin-9-yl)-15,16-dihidroxi-2,10-bis(sulfanil)-10-sulfaniliden-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-yl)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2-ona

**47**

47a (Diastereómero 1)

5

[Esquema de síntesis]



(Etapa 1)

6-Benzoil-2-{5-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-2-O-[terc-butil(dimetil)silil]-3-O-(4-oxopentanoil)-β-D-ribofuranosil]-6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocdiazuleno

- 5 Usando el compuesto obtenido en la etapa 5 del ejemplo 1, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 8 del ejemplo 56 para obtener el compuesto del título (2,8 g).

RMN de ^1H (CDCl_3) δ : 8,08 (1H, s), 7,48-7,19 (15H, m), 6,37 (4H, d, $J = 6,7$ Hz), 5,48 (1H, dd, $J = 5,1, 2,3$ Hz), 4,83 (1H, dd, $J = 6,7, 5,1$ Hz), 4,37-4,00 (3H, m), 3,80 (3H, s), 3,79 (3H, s), 3,69 (1H, m), 3,54 (1H, dd, $J = 10,6, 2,7$ Hz), 3,39 (1H, dd, $J = 11,0, 2,7$ Hz), 2,90-2,57 (6H, m), 2,20 (3H, s), 2,20-2,11 (2H, m), 0,69 (9H, s), -0,03 (3H, s), -0,29 (3H, s).

10

(Etapa 2)

6-Benzoil-2-{2-O-[terc-butil(dimetil)silil]-3-O-(4-oxopentanoil)-β-D-ribofuranosil]-6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocdiazuleno

- 15 Usando el compuesto (2,8 g) obtenido en la etapa 1 anterior, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 9 del ejemplo 56 para obtener el compuesto del título (1,74 g).

RMN de ^1H (CDCl_3) δ : 8,06 (1H, s), 7,38-7,20 (5H, m), 7,04 (1H, s), 6,32 (1H, dd, $J = 12,1, 1,6$ Hz), 5,64 (1H, d, $J = 7,8$ Hz), 5,47 (1H, d, $J = 5,1$ Hz), 5,16 (1H, dd, $J = 7,8, 5,1$ Hz), 4,40 (1H, m), 4,29 (1H, s), 4,17 (1H, m), 3,91 (1H, m), 3,75 (1H, m), 3,02 (2H, m), 2,90-2,60 (4H, m), 2,30-2,14 (2H, m), 2,22 (3H, s), 0,68 (9H, s), -0,15 (3H, s), -0,46 (3H, s).

(Etapa 3)

N-Benzoil-5'-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-3'-O-[terc-butil(dimetil)silil]-2'-O-[[2,4-diclorofenil)metil]sulfanil]fosforotioil]adenosina

- 5 A una disolución de N-benzoil-5'-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-3'-O-[terc-butil(dimetil)silil]-2'-O-[[2-cianoetoxi][di(propan-2-il)amino]fosfanil]adenosina (3,73 g) disponible en el mercado (ChemGenes Corporation) en acetonitrilo (30 ml) se le añadieron los tamices moleculares 3A, 1/16 (1,0 g) y 2,4-diclorobencilmercaptano (1,8 ml), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se añadió perclorato de imidazol (3,18 g) a la mezcla de reacción, que se agitó durante 2,5 horas y, a continuación, se añadió azufre (242 mg) y la mezcla de reacción se agitó durante 1 hora. Los tamices moleculares 3A se retiraron de la mezcla de reacción por filtración, y se
- 10 añadió una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio al filtrado, que se sometió a extracción con acetato de etilo. Tras secar la capa orgánica sobre sulfato de sodio anhidro, se eliminó el agente desecante por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo] para obtener el compuesto del título (2,73 g) en forma de una mezcla de diastereómeros en el átomo de fósforo.

- 15 MS (ESI) m/z: 1111 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 8,89 (1H, s), 8,74 (1H, d, J = 1,8 Hz), 8,32 (0,5H s), 8,26 (0,5H, s), 8,02 (2H, m), 7,64-7,61 (15H, m), 6,82 (4H, d, J = 9,0), 6,45 (0,5H, d, J = 6,7 Hz), 6,38 (0,5H, d, J = 6,3 Hz), 5,88 (0,5H, ddd, J = 14,2, 6,6, 4,8 Hz), 5,74 (0,5H, ddd, J = 14,4, 6,4, 4,8 Hz), 4,75 (0,5H, dd, J = 4,7, 2,7 Hz), 4,64 (0,5H, dd, J = 4,7, 2,3 Hz), 4,22-3,82 (5H, m), 3,78 (6H, s), 3,58-3,53 (2H, m), 3,34-3,29 (2H, m), 2,57 (1H, t, J = 6,3 Hz), 2,48 (1H, t, J = 6,3 Hz), 0,90 (4,5H, s),

20 0,88 (4,5H, s), 0,16 (1,5H, s), 0,11 (1,5H, s), 0,07 (1,5H, s), 0,04 (1,5H, s).

(Etapa 4)

N-Benzoil-5'-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-3'-O-[terc-butil(dimetil)silil]-2'-O-[[2,4-diclorofenil)metil]sulfanil](sulfuro)fosforil]adenosina de N,N-dietiletanaminio

- 25 A una disolución del compuesto (2,66 g) obtenido en la etapa 3 anterior en acetonitrilo (30 ml) se le añadió trietilamina (30 ml), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice DIOL [hexano/acetato de etilo] para obtener el compuesto del título (2,5 g) en forma de una mezcla de diastereómeros en el átomo de fósforo.

MS (ESI) m/z: 1058 (M+H)⁺.

(Etapa 5)

- 30 Dinucleótido B

A una disolución del compuesto (2,5 g) obtenido en la etapa 4 anterior en diclorometano (10 ml) se le añadieron en este orden los tamices moleculares 4A, 1/16 (1,0 g), el compuesto (930 mg) obtenido en la etapa 2 anterior y 1-metilimidazol (1,18 ml), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 20 minutos. A la mezcla de reacción se le añadió cloruro de 2,4,6-trisopropilbencenosulfonilo (905 mg), y la mezcla de reacción se agitó durante

35 4 horas. Los tamices moleculares 4A se retiraron de la mezcla de reacción por filtración, y se añadió una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio al filtrado, que se sometió a extracción con acetato de etilo. Tras secar la capa orgánica sobre sulfato de sodio anhidro, se eliminó el agente desecante por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo] para obtener el compuesto del título (1,04 g) en forma de una mezcla de diastereómeros en el átomo de fósforo.

40

MS (ESI) m/z: 1662 (M+H)⁺.

(Etapa 6)

Dinucleótido C

- 45 Usando el compuesto (1,04 g) obtenido en la etapa 5 anterior, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 11 del ejemplo 56 para obtener el compuesto del título (820 mg) en forma de una mezcla de diastereómeros en el átomo de fósforo. MS (ESI) m/z: 1564 (M+H)⁺.

(Etapa 7)

Dinucleótido D

- 50 Usando el compuesto (820 mg) obtenido en la etapa 6 anterior, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 12 del ejemplo 56 para obtener el compuesto del título (440 mg) en forma de una mezcla de diastereómeros en el átomo de fósforo.

(Etapa 8)

- 5 N-{9-[(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-14-(6-Benzoil-6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)-15,16-bis[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-10-[[[(2,4-diclorofenil)metil]sulfanil]-2-oxo-2-sulfanil-10-sulfanilidenoctahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-1]]1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-7-il]-9H-purin-6-il}benzamida

Usando el compuesto (440 mg) obtenido en la etapa 7 anterior, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 9 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (360 mg).

MS (ESI) m/z: 1340 (M+H)⁺.

(Etapa 9)

- 10 (5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-7-(6-Benzamido-9H-purin-9-il)-14-(6-benzoil-6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)-15,16-bis[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-2-oxo-10-sulfanilidenoctahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-1]]1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) de bis(N,N-dietiletanaminio)

- 15 A una disolución en dimetilsulfóxido del compuesto (360 mg) obtenido en la etapa 8 anterior se le añadieron 1-dodecanotiol (434 mg) y 1,8-diazabicyclo[5.4.0]-7-undeceno (0,40 ml), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 6 horas. La mezcla de reacción se purificó directamente mediante cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetónitrilo] para obtener el compuesto del título (130 mg).

MS (ESI) m/z: 1182 (M+H)⁺.

- 20 (Etapa 10)

(2S,5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-7-(6-Amino-9H-purin-9-il)-15,16-dihidroxi-2-oxo-10-sulfaniliden-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-1]]1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) disódico

- 25 Usando el compuesto (130 mg) obtenido en la etapa 9 anterior, la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 14 del ejemplo 56, y el producto resultante se purificó entonces mediante cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetónitrilo] para obtener el compuesto del título en forma de una sal de trietilamina.

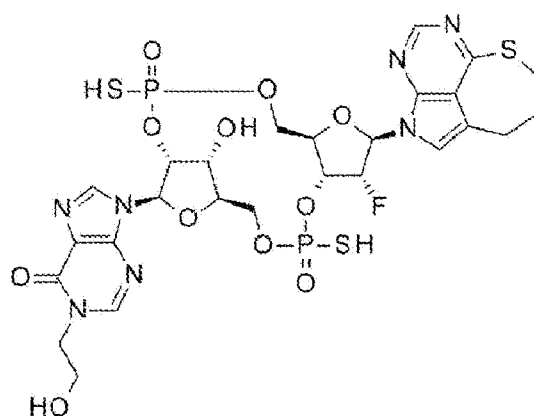
La sal de trietilamina obtenida se sometió a intercambio de sales de la misma manera que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (62,8 mg).

- 30 MS (ESI) m/z: 746 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,70 (1H, s), 8,07 (1H, s), 8,03 (1H, s), 7,25 (1H, s), 6,26 (1H, d, J = 8,6 Hz), 6,21 (1H, d, J = 5,9 Hz), 5,52 (1H, dq, J = 14,1, 5,2 Hz), 5,36 (1H, m), 4,70 (1H, dd, J = 5,7, 4,5 Hz), 4,42 (1H, d, J = 4,3 Hz), 4,37-4,26 (3H, m), 4,21 (1H, m), 3,96 (1H, m), 3,84 (1H, m), 3,50 (2H, m), 2,81 (2H, m), 1,93 (2H, m). RMN de ³¹P (CD₃OD) δ: 119,8 (s), 59,4 (s).

- 35 Ejemplo 58: Síntesis de CDN48

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-14-(8,9-Dihidro-6-tia-2,3,5-triazabenz[cd]azulen-2(7H)-il)-15-fluoro-16-hidroxi-7-[1-(2-hidroxietil)-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il]-2,10-bis(sulfanil)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-1]]1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-diona

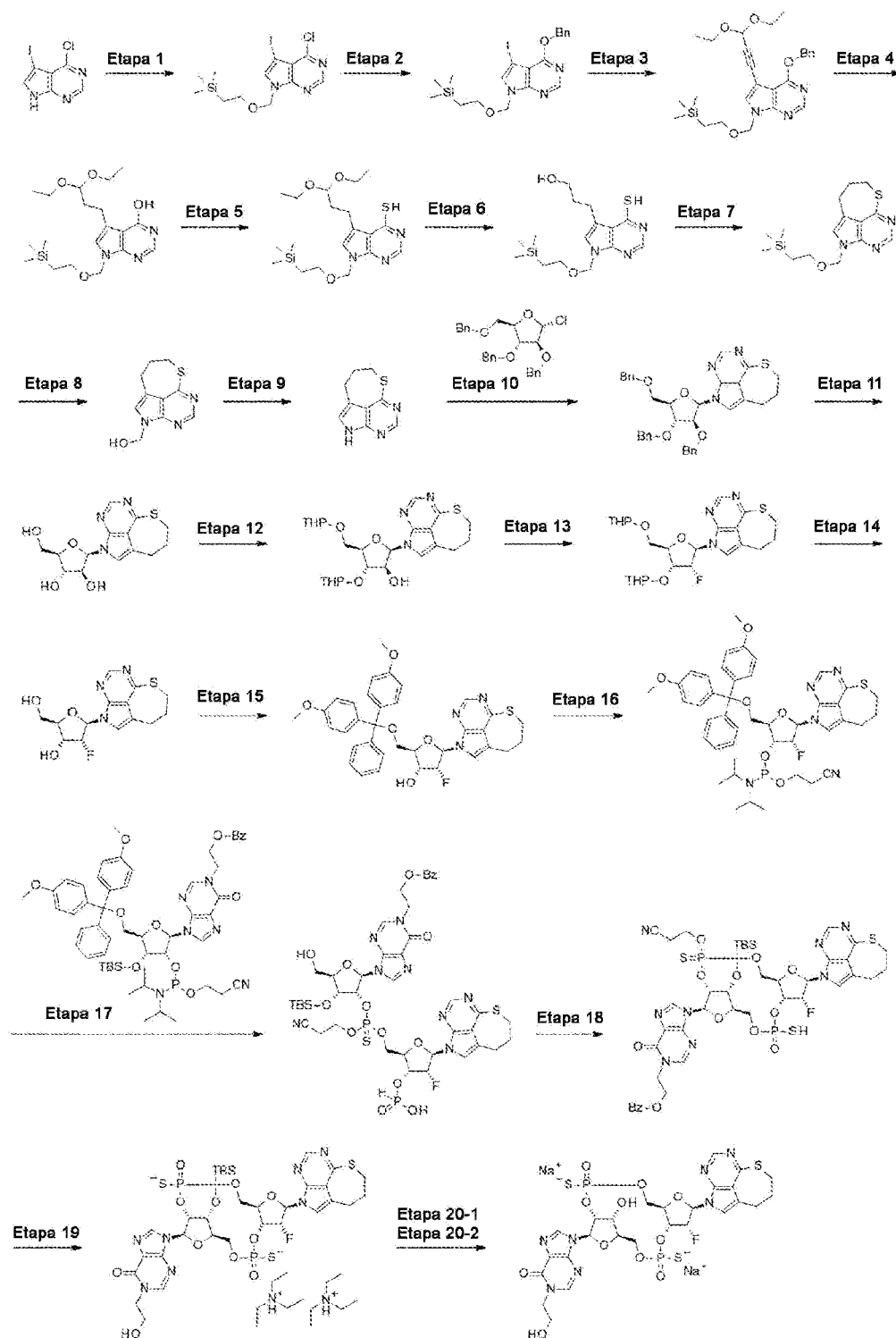


48

48a (Diastereómero 1)

48b (Diastereómero 2)

5 [Esquema de síntesis]



(Etapa 1)

4-Cloro-5-yodo-7-[[2-(trimetilsilil)etoxi]metil]-7H-pirrol[2,3-d]pirimidina

5

A una solución de 4-cloro-5-yodo-7H-pirrol[2,3-d]pirimidina (73,8 g) disponible en el mercado (PharmaBlock Sciences (Nanjing), Inc.) en N,N-dimetilformamida (10 ml) se le añadió hidruro de sodio (que contenía aceite mineral al 45 %) (13,3 g) con refrigeración por hielo, y la mezcla de reacción se agitó durante 40 minutos con aumento de la temperatura hasta la temperatura ambiente. La mezcla de reacción se volvió a enfriar con hielo, se añadió [2-(clorometoxi)etil]((trimetil)silano) (51,0 ml) a lo largo de 10 minutos, y la mezcla de reacción se agitó a la misma temperatura durante 30 minutos. A la mezcla de reacción, en su mayor parte solidificada, se le añadió agua (260 ml)

en pequeñas porciones para inactivar la reacción. El sólido se recogió por filtración, se lavó con agua (1500 ml) y hexano (600 ml), y se secó a presión reducida a 40 °C para obtener el compuesto del título (97,63 g). MS (ESI) m/z: 410 (M+H)⁺.

5 RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 8,64 (1H, s), 7,54 (1H, s), 5,61 (2H, s), 3,52 (2H, t, J = 8,3 Hz), 0,92 (2H, t, J = 8,3 Hz), -0,04 (9H, s).

(Etapa 2)

4-(Benciloxi)-5-yodo-7-[[2-(trimetilsilil)etoxi]metil]-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina

10 A una disolución de alcohol bencilico (27 ml) en N,N-dimetilformamida (170 ml) se le añadió hidruro de sodio (que contenía aceite mineral al 45 %) (12 g) con refrigeración por hielo, y la mezcla de reacción se agitó durante 40 minutos con aumento de la temperatura hasta temperatura ambiente. La mezcla de reacción se volvió a enfriar con hielo, se añadió una suspensión del compuesto (97,63 g) obtenido en la etapa 1 anterior en N,N-dimetilformamida (360 ml) durante 40 minutos, y la mezcla de reacción se agitó a la misma temperatura durante 35 minutos. Se añadieron trozos de hielo y una solución acuosa saturada de cloruro de amonio a la mezcla de reacción para inactivar la reacción. La mezcla de reacción se vertió en una mezcla en dos capas de una solución acuosa saturada de cloruro de amonio y acetato de etilo, y se sometió a extracción con acetato de etilo:tolueno (9:1). La capa orgánica se lavó dos veces con agua y otras dos con salmuera, y a continuación se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El agente desecante se eliminó por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo] para obtener el compuesto del título (107,7 g). MS (ESI) m/z: 482 (M+H)⁺.

20 RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 8,47 (1H, s), 7,61 (2H, d, J = 7,3 Hz), 7,41 (2H, t, J = 7,6 Hz), 7,36-7,30 (1H, m), 7,30 (1H, s), 5,65 (2H, s), 5,57 (2H, s), 3,52 (2H, t, J = 8,3 Hz), 0,91 (2H, t, J = 8,3 Hz), -0,05 (9H, s).

(Etapa 3)

4-(Benciloxi)-5-(3,3-dietoxiprop-1-in-1-il)-7-[[2-(trimetilsilil)etoxi]metil]-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina

25 A una disolución mezclada del compuesto (113,4 g) obtenido en la etapa 2 anterior en acetonitrilo (1000 ml)-triethylamina (98 ml) se le añadieron yoduro de cobre (4,49 g), tetraquistrifenilfosfinapaladio(0) (8,17 g) y 3,3-dietoxiprop-1-ino (104 ml) en una atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente, y la mezcla de reacción se agitó a la misma temperatura durante 4,5 horas. Tras concentrar la mezcla de reacción a presión reducida, se añadieron acetato de etilo y hexano al residuo, y se eliminó un precipitado sólido por filtración. El sólido se lavó con una mezcla de acetato de etilo:hexano (1:1), y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo] para obtener el compuesto del título (145,5 g: con impurezas).

MS (ESI) m/z: 482 (M+H)⁺.

(Etapa 4)

5-(3,3-Dietoxipropil)-7-[[2-(trimetilsilil)etoxi]metil]-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-ol

35 A una disolución del compuesto (145,5 g) obtenido en la etapa 3 anterior en etanol (900 ml) se le añadió un catalizador de paladio-carbono (M) al 10 % húmedo (50,2 g), y la mezcla de reacción se agitó en una atmósfera de hidrógeno a temperatura ambiente durante 5 horas. Se añadió diclorometano (500 ml) a la mezcla de reacción, se eliminó el catalizador por filtración con Celite y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó dos veces mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo] para obtener el compuesto del título (59,6 g). MS (ESI) m/z: 418 (M+Na)⁺, 394 [M-H]⁻.

40 RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 11,23 (1H, sa), 7,85 (1H, s), 6,79 (1H, s), 5,47 (2H, s), 4,58 (1H, t, J = 5,9 Hz), 3,69 (2H, m), 3,57-3,49 (4H, m), 2,90 (2H, t, J = 7,8 Hz), 2,07 (2H, m), 1,23 (6H, t, J = 7,1 Hz), 0,91 (2H, t, J = 8,1 Hz), -0,04 (9H, s).

(Etapa 5)

5-(3,3-Dietoxipropil)-7-[[2-(trimetilsilil)etoxi]metil]-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-tiol

45 A una disolución del compuesto (59,6 g) obtenido en la etapa 4 anterior en diclorometano deshidratado (300 ml) se le añadió 2,6-lutidina (42 ml) en una atmósfera de nitrógeno. Se añadió anhídrido trifluorometanosulfónico (31 ml) gota a gota a -20 °C durante 20 minutos, y la mezcla de reacción se agitó a la misma temperatura durante 20 minutos. A continuación, se añadieron N,N-dimetilformamida (500 ml) e hidrato de monohidrogenosulfuro de sodio (33,5 g) enfriados con hielo, se aumentó la temperatura hasta la temperatura ambiente y se agitó la mezcla de reacción durante 2,5 horas. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida para destilar los componentes de bajo punto de ebullición. El residuo se vertió en una mezcla de dos capas de acetato de etilo y una solución acuosa saturada enfriada con hielo de cloruro de amonio, y se sometió a extracción con una mezcla de acetato de etilo:tolueno (9:1). La capa orgánica se lavó una vez con una solución acuosa saturada de cloruro amónico y dos veces con salmuera, y después se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El agente desecante se eliminó por filtración y el filtrado se concentró a presión

reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo] para obtener una mezcla del compuesto del título y 2,6-lutidina. La mezcla obtenida se vertió en una mezcla de dos capas de acetato de etilo y ácido clorhídrico 1 N, y se sometió dos veces a extracción con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó tres veces con salmuera y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El agente desecante se eliminó por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida para obtener el compuesto del título (57,6 g).

MS (ESI) m/z: 410 [M-H]⁻.

RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 11,69 (1H, sa), 7,90 (1H, s), 6,96 (1H, s), 5,49 (2H, s), 4,61 (1H, t, J = 5,9 Hz), 3,71 (2H, m), 3,55 (2H, m), 3,49 (2H, t, J = 8,1 Hz), 3,14 (2H, t, J = 7,8 Hz), 2,08 (2H, m), 1,23 (6H, t, J = 7,1 Hz), 0,90 (2H, t, J = 8,3 Hz), -0,04 (9H, s).

(Etapa 6)

3-(4-Sulfanil-7-[[2-(trimetilsilil)etoxi]metil]-7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-5-il)propan-1-ol

El compuesto (31,62 g) obtenido en la etapa 5 anterior se disolvió en solución acuosa al 80 % de ácido acético (300 ml), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Tras confirmar la desaparición de la materia prima, la mezcla de reacción se enfrió con hielo, se añadió cuidadosamente borohidruro de sodio (1,45 g) en pequeñas porciones, y la mezcla de reacción se agitó a la misma temperatura durante 30 minutos. Posteriormente, se añadió triacetoxiborohidruro de sodio (24,4 g) a lo largo de 15 minutos, y la mezcla de reacción se agitó a la misma temperatura durante 1,5 horas. La mezcla de reacción se concentró a aproximadamente 1/5 del volumen original a presión reducida. Se añadió cuidadosamente hidrogenocarbonato de sodio (sólido) al residuo para neutralizarlo hasta cierto grado, la mezcla de reacción se sometió a extracción con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con hidrogenocarbonato de sodio saturado y salmuera en este orden, y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El agente desecante se eliminó por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo] para obtener el compuesto del título (17,93 g).

MS (ESI) m/z: 340 [M+H]⁺.

RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 11,92 (1H, sa), 7,95 (1H, s), 7,01 (1H, s), 5,51 (2H, s), 3,70 (2H, t, J = 5,9 Hz), 3,50 (2H, t, J = 8,1 Hz), 3,23 (2H, t, J = 7,3 Hz), 2,33 (1H, sa), 1,99 (2H, m), 0,91 (2H, t, J = 8,3 Hz), -0,04 (9H, s).

(Etapa 7)

2-[[2-(Trimetilsilil)etoxi]metil]-2,7,8,9-tetrahidro-6-tia-2,3,5-triazabenz[cd]azuleno

A una disolución del compuesto (31,31 g) obtenido en la etapa 6 anterior en tetrahidrofurano deshidratado (600 ml) se le añadieron trifenilfosfina (25,4 g) y azodicarboxilato de diisopropilo (21,8 g) en una atmósfera de nitrógeno a 0 °C, y la mezcla de reacción se agitó a la misma temperatura durante 1 hora. Tras concentrar la mezcla de reacción a presión reducida, el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [diclorometano/acetato de etilo] y cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo] en este orden para obtener el compuesto del título (35,93 g: con impurezas).

MS (ESI) m/z: 322 [M+H]⁺.

RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 8,57 (1H, s), 7,08 (1H, s), 5,58 (2H, s), 3,52 (2H, t, J = 8,3 Hz), 3,17 (2H, m), 3,06 (2H, t, J = 5,6 Hz), 2,36 (2H, m), 0,92 (2H, t, J = 8,3 Hz), -0,05 (9H, s).

(Etapa 8)

(8,9-Dihidro-6-tia-2,3,5-triazabenz[cd]azulen-2(7H)-il)metanol

A una disolución del compuesto (35,93 g) obtenido en la etapa 7 anterior en diclorometano (150 ml) se le añadió ácido trifluoroacético (150 ml) a temperatura ambiente, y la mezcla de reacción se agitó a la misma temperatura durante 1,5 horas. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida y después se destiló azeotrópicamente cuatro veces con tolueno. Se añadió al residuo una mezcla de diclorometano:hexano (1:2) y se recogió por filtración un sólido precipitado (sólido 1). Tras concentrar el filtrado a presión reducida, el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo → acetato de etilo/metanol] para obtener el sólido 2. El sólido 1 y el sólido 2 se reunieron para obtener el compuesto del título (20,13 g).

MS (ESI) m/z: 222 [M+H]⁺.

RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 8,60 (1H, s), 7,19 (1H, s), 5,71 (2H, s), 3,21 (2H, m), 3,07 (2H, m), 2,38 (2H, m) (sólo se muestran los picos observables)

(Etapa 9)

2,7,8,9-Tetrahidro-6-tia-2,3,5-triazabenz[cd]azuleno

A una suspensión del compuesto (20,13 g) obtenido en la etapa 8 anterior en metanol (250 ml) se le añadió una solución acuosa de amoníaco al 28 % (150 ml), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 horas. La mezcla de reacción se concentró hasta aproximadamente la mitad del volumen a presión reducida. El sólido precipitado se recogió por filtración y se lavó con etanol para obtener el sólido 1. El filtrado se concentró a presión reducida y el sólido 2 se obtuvo por el mismo procedimiento. El filtrado se aplicó a gel de sílice y, a continuación, se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [diclorometano/metanol]. Las fracciones que contenían el producto deseado se concentraron a presión reducida, la suspensión se lavó con etanol y el sólido se recogió por filtración (sólido 3). El sólido 1, el sólido 2 y el sólido 3 se reunieron para obtener el compuesto del título (12,36 g). MS (ESI) m/z: 192 [M+H]⁺.

10 RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 10,53 (1H, sa), 8,57 (1H, s), 7,10 (1H, s), 3,18 (2H, m), 3,08 (2H, t, J = 5,6 Hz), 2,37 (2H, m).
(Etapa 10)

2-(2,3,5-Tri-O-bencil-β-D-arabinofuranosil)-2,7,8,9-tetrahidro-6-tia-2,3,5-triazabenz[cd]azuleno

15 A una suspensión del compuesto (13,47 g) obtenido en la etapa 9 anterior en acetonitrilo deshidratado (350 ml) se le añadieron hidróxido de potasio en polvo (10,3 g) y tris[2-(2-metoxietoxi)etil]amina (1,13 ml) en una atmósfera de nitrógeno, y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 horas. Se añadió una solución de cloruro de 2,3,5-tri-O-bencil-α-D-arabinofuranosilo (40,2 g) como compuesto conocido en la bibliografía (J. Med. Chem. 1976, 19, 6, 814-816) en acetonitrilo (100 ml) en pequeñas porciones con enfriamiento por hielo, y la temperatura se aumentó a temperatura ambiente y la mezcla de reacción se agitó durante 4 horas. La materia no disuelta se eliminó por filtración y se lavó con acetonitrilo. El filtrado se concentró a presión reducida y el residuo se purificó dos veces mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo] para obtener el compuesto del título (26,19 g).

MS (ESI) m/z: 594 [M+H]⁺.

25 RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 8,51 (1H, s), 7,37-7,17 (14H, m), 6,86 (2H, m), 6,82 (1H, d, J = 4,9 Hz), 4,68 (1H, d, J = 11,7 Hz), 4,59 (1H, d, J = 11,7 Hz), 4,54 (1H, d, J = 13,2 Hz), 4,52 (1H, d, J = 11,7 Hz), 4,36-4,33 (2H, m), 4,22 (1H, d, J = 11,7 Hz), 4,14-4,08 (2H, m), 3,77 (1H, dd, J = 10,7, 3,9 Hz), 3,72 (1H, dd, J = 10,5, 4,1 Hz), 3,13 (2H, m), 2,81 (2H, m), 2,27 (2H, m).

(Etapa 11)

2-β-D-Arabinofuranosil-2,7,8,9-tetrahidro-6-tia-2,3,5-triazabenz[cd]azuleno

30 A una disolución del compuesto (26,19 g) obtenido en la etapa 10 anterior en diclorometano deshidratado (300 ml) se le añadió una disolución en diclorometano de tricloruro de boro (1 M, 200 ml) en una atmósfera de nitrógeno a -78 °C, y la mezcla de reacción se agitó a la misma temperatura durante 2 horas, y después se aumentó la temperatura a 0 °C y la mezcla de reacción se agitó más durante 4 horas. La mezcla de reacción se enfrió de nuevo a -78 °C, se añadió una solución de metanol (80 ml) en diclorometano (160 ml), y la mezcla de reacción se agitó durante 30 minutos aumentando la temperatura hasta la temperatura ambiente. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida y se destiló azeotrópicamente dos veces con etanol. Se añadieron etanol (200 ml) y éter dietílico (100 ml) al residuo para hacer una pasta, y el sólido se recogió por filtración (sólido 1). El filtrado se concentró a presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [diclorometano/metanol]. Las fracciones que contenían el producto deseado se concentraron a presión reducida, se añadió etanol a las mismas para preparar una suspensión, y el sólido se recogió por filtración (sólido 2). El sólido 1 y el sólido 2 se reunieron para obtener el compuesto del título (13,2 g).

MS (ESI) m/z: 324 [M+H]⁺.

RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,73 (1H, s), 7,96 (1H, s), 6,70 (1H, d, J = 4,9 Hz), 4,32 (1H, t, J = 4,6 Hz), 4,25 (1H, t, J = 4,6 Hz), 3,97 (1H, m), 3,90 (1H, dd, J = 12,0, 3,2 Hz), 3,85 (1H, dd, J = 12,0, 4,6 Hz), 3,53 (2H, m), 3,17 (2H, m), 2,43 (2H, m).

45 (Etapa 12)

2-[3,5-Bis-O-(oxan-2-il)-β-D-arabinofuranosil]-2,7,8,9-tetrahidro-6-tia-2,3,5-triazabenz[cd]azuleno

50 A una disolución del compuesto (15,35 g) obtenido en la etapa 11 anterior en dimetilsulfóxido deshidratado (160 ml) se le añadieron 3,4-dihidro-2H-pirano (17,2 ml) y ácido p-toluenosulfónico monohidratado (9,02 g) a 0 °C, y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. A continuación, se añadió 3,4-dihidro-2H-pirano (8,6 ml), la mezcla de reacción se agitó durante 45 minutos e inmediatamente después se añadió trietilamina (13 ml) para inactivar la reacción. La mezcla de reacción se vertió en una mezcla de dos capas de acetato de etilo y una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio, y se sometió a extracción con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó una vez con agua y dos veces con salmuera, y después se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El agente desecante se eliminó por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante

cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo] para obtener el compuesto del título (10,81 g) en forma de una mezcla de cuatro diastereómeros.

MS (ESI) m/z: 492 [M+H]⁺.

- 5 RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 8,548 (0,2H, s), 8,546 (0,3H, s), 8,54 (0,3H, s), 8,53 (0,2H, s), 7,54 (0,2H, s), 7,53 (0,3H, s), 7,51 (0,2H, s), 7,44 (0,3H, s), 6,75 (0,2H, d, J = 5,4 Hz), 6,71 (0,2H, d, J = 5,9 Hz), 6,57 (0,3H, d, J = 5,9 Hz), 6,56 (0,3H, d, J = 5,9 Hz), 4,87-4,69 (2H, m), 4,55-3,54 (10H, m), 3,18-3,12 (2H, m), 3,10-2,96 (2H, m), 2,40-2,30 (2H, m), 1,92-1,51 (12H, m).

(Etapa 13)

2-[2-Desoxi-2-fluoro-3,5-bis-O-(oxan-2-il)-β-D-ribofuranosil]-2,7,8,9-tetrahidro-6-tia-2,3,5-triazabenz[cd]azuleno

- 10 A una disolución del compuesto (10,81 g) obtenido en la etapa 12 anterior en diclorometano deshidratado (150 ml) se le añadieron piridina (5,3 ml) y anhídrido trifluorometanosulfónico (5,6 ml) en una atmósfera de nitrógeno a 0 °C, y la mezcla de reacción se agitó a la misma temperatura durante 1 hora. Tras añadir trozos de hielo a la mezcla de reacción para inactivar la reacción, ésta se vertió en una mezcla de dos capas de acetato de etilo y una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio, y se sometió a extracción con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó dos veces con salmuera y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El agente desecante se eliminó por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida para obtener una forma bruta de triflato en forma amorfa. La forma bruta de triflato obtenida se disolvió en tetrahidrofurano deshidratado (150 ml), al que se añadió en pequeñas porciones una solución de tetrahidrofurano de fluoruro de tetrabutilamonio (aproximadamente 1 M, 154 ml) con refrigeración por hielo, y la mezcla de reacción se agitó a la misma temperatura durante toda la noche. Se añadió a la mezcla de reacción una solución acuosa saturada de cloruro de amonio para inactivar la reacción. La mezcla de reacción se concentró hasta aproximadamente la mitad del volumen a presión reducida. El residuo se vertió en una mezcla de dos capas de acetato de etilo y una solución acuosa saturada de cloruro de amonio, y se sometió a extracción con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó una vez con una solución acuosa saturada de cloruro amónico y dos veces con salmuera. La capa acuosa se sometió de nuevo a extracción con acetato de etilo y el extracto se lavó con salmuera. Las capas orgánicas se reunieron y se secaron sobre sulfato de sodio anhidro. El agente desecante se eliminó por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida para obtener una forma bruta del compuesto del título (40,37 g).
- 15
- 20
- 25

MS (ESI) m/z: 494 [M+H]⁺.

(Etapa 14)

2-(2-Desoxi-2-fluoro-β-D-ribofuranosil)-2,7,8,9-tetrahidro-6-tia-2,3,5-triazabenz[cd]azuleno

- 30 A una solución del compuesto (40,37 g) obtenido en la etapa 13 anterior en metanol (400 ml) se le añadió ácido p-toluenosulfónico monohidratado (2,09 g), y la mezcla de reacción se agitó a 60 °C durante 4 horas. Se añadió trietilamina (16 ml) a la mezcla de reacción para inactivar la reacción. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo → acetato de etilo/metanol]. Las fracciones que contenían el producto deseado se concentraron a presión reducida hasta que las fracciones se convirtieron en una suspensión, y el sólido se recogió por filtración. El sólido obtenido se lavó con hexano/acetato de etilo (1:1) para obtener el sólido 1. El filtrado se concentró a presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [diclorometano/metanol] para obtener el sólido 2. El sólido 1 y el sólido 2 se reunieron para obtener el compuesto del título (5,32 g). MS (ESI) m/z: 326 [M+H]⁺.
- 35

- 40 RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 8,51 (1H, s), 7,01 (1H, s), 6,00 (1H, dd, J = 13,7, 6,3 Hz), 5,95 (1H, dd, J = 11,7, 2,0 Hz), 5,87 (1H, ddd, J = 52,7, 6,3, 4,9 Hz), 4,69 (1H, m), 4,32 (1H, sa), 3,96 (1H, d, J = 12,7 Hz), 3,77 (1H, m), 3,17 (2H, m), 3,04 (2H, m), 2,41-2,31 (3H, m).

(Etapa 15)

2-{5-O-[Bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-2-desoxi-2-fluoro-β-D-ribofuranosil}-2,7,8,9-tetrahidro-6-tia-2,3,5-triazabenz[cd]azuleno

- 45 Usando el compuesto (5,32 g) obtenido en la etapa 14 anterior, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 1 del ejemplo 11 para obtener el compuesto del título (10,1 g).

MS (ESI) m/z: 628 [M+H]⁺.

- 50 RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 8,54 (1H, s), 7,42 (2H, dd, J = 7,3 Hz), 7,32-7,21 (8H, m), 6,81 (4H, m), 6,52 (1H, dd, J = 17,3, 2,2 Hz), 5,37 (1H, ddd, J = 53,3, 4,4, 2,4 Hz), 4,76 (1H, m), 4,16 (1H, m), 3,789 (3H, s), 3,786 (3H, s), 3,59 (1H, dd, J = 10,7, 2,4 Hz), 3,44 (1H, dd, J = 10,7, 3,4 Hz), 3,12 (2H, m), 2,76 (2H, t, J = 5,6 Hz), 2,27 (2H, m), 2,18 (1H, dd, J = 7,8, 2,9 Hz).

(Etapa 16)

2-(5-O-[Bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-3-O-((2-cianoetoxi)[di(propan-2-il)amino]fosfanil)-2-desoxi-2-fluoro-β-D-ribofuranosil)-2,7,8,9-tetrahidro-6-tia-2,3,5-triazabenzocd]azuleno

Usando el compuesto (10,1 g) obtenido en la etapa 15 anterior, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 6 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (12,6 g) en forma de una mezcla de diastereómeros en el átomo de fósforo (proporción de diastereómeros = 1:1).

RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 8,53 (1H, s), 7,40 (2H, m), 7,34-7,17 (8H, m), 6,84-6,74 (4H, m), 6,53 (0,5H, dd, J = 17,3, 2,2 Hz), 6,48 (0,5H, dd, J = 17,6, 1,5 Hz), 5,50-5,31 (1H, m), 4,99 (0,5H, m), 4,85 (0,5H, m), 4,31-4,26 (1H, m), 3,93-3,76 (1H, m), 3,792 (1,5H, s), 3,789 (1,5H, s), 3,779 (1,5H, s), 3,776 (1,5H, s), 3,67-3,51 (4H, m), 3,34-3,30 (1H, m), 3,13-3,10 (2H, m), 2,76-2,69 (2H, m), 2,61 (1H, td, J = 6,3, 2,4 Hz), 2,39 (1H, m), 2,28-2,21 (2H, m), 1,19-1,15 (9H, m), 1,03 (3H, d, J = 6,8 Hz).

(Etapa 17)

Usando el compuesto (740 mg) obtenido en la etapa 16 anterior, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 7 del ejemplo 1 para proporcionar una solución en acetonitrilo de 2-{2-desoxi-2-fluoro-3-O-[hidroxio(oxo)-λ⁵-fosfanil]-β-D-ribofuranosil)-2,7,8,9-tetrahidro-6-tia-2,3,5-triazabenzocd]azuleno. Utilizando la solución en acetonitrilo obtenida y el compuesto obtenido en la etapa 3 del ejemplo 22 (924 mg), se llevó a cabo la reacción de la misma manera que en la etapa 8 del ejemplo 1, y el producto bruto resultante se utilizó directamente para la reacción posterior.

(Etapa 18)

Benzoato de 2-{9-[(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-16-[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-10-(2-cianoetoxi)-14-(8,9-dihidro-6-tia-2,3,5-triazabenzocd]azulen-2(7H)-il)-15-fluoro-2-oxo-2-sulfanil-10-sulfanilidenoctahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-7-il]-6-oxo-6,9-dihidro-1H-purin-1-il]etilo

Usando el producto bruto obtenido en la etapa 17 anterior, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 9 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (502 mg: con impurezas) en forma de una mezcla de diastereómeros en el átomo de fósforo. MS (ESI) m/z: 1065 (M+H)⁺.

(Etapa 19)

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-16-[[Terc-butil(dimetil)silil]oxi]-14-(8,9-dihidro-6-tia-2,3,5-triazabenzocd]azulen-2(7H)-il)-15-fluoro-7-[1-(2-hidroxietil)-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il]-2,10-dioxooctahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) de bis(N,N-dietiletanamino)

Usando el compuesto (502 mg) obtenido en la etapa 18 anterior, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 10 del ejemplo 1 para obtener el diastereómero 1 (67,8 mg: con impurezas) y el diastereómero 2 (69,5 mg: con impurezas) del compuesto del título.

Diastereómero 1 (menos polar)

MS (ESI) m/z: 908 (M+H)⁺.

Diastereómero 2 (más polar)

MS (ESI) m/z: 908 (M+H)⁺.

(Etapa 20-1)

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-14-(8,9-Dihidro-6-tia-2,3,5-triazabenzocd]azulen-2(7H)-il)-15-fluoro-16-hidroxi-7-[1-(2-hidroxietil)-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il]-2,10-dioxooctahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) disódico

(Diastereómero 1)

Usando el compuesto obtenido en la etapa 19 anterior (diastereómero 1) (67,8 mg: con impurezas), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 11 del ejemplo 1, y la purificación se llevó a cabo a continuación según las siguientes condiciones de purificación para obtener el compuesto del título en forma de una sal de trietilamina. [Condiciones de purificación] Cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo], HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/solución de acetonitrilo-metanol (1:1), solución de acetonitrilo-metanol (1:1): del 10 %-45 % (0 min-40 min)], y HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/metanol, metanol: del 25 %-75 % (0 min-40 min)].

La sal de trietilamina obtenida se sometió a intercambio de sales de la misma manera que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (21,2 mg).

MS (ESI) m/z: 794 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,55 (1H, sa), 8,41 (1H, s), 8,09 (1H, sa), 7,51 (1H, s), 6,58 (1H, d, J = 16,9 Hz), 6,25 (1H, d, J = 7,9 Hz), 5,55-5,34 (2H, m), 5,30-5,17 (1H, m), 4,74 (1H, d, J = 4,2 Hz), 4,55-4,47 (1H, m), 4,46-4,40 (1H, m), 4,37-4,30 (2H, m), 4,28-4,16 (2H, m), 4,05-3,99 (1H, m), 3,90-3,70 (3H, m), 3,28-3,20 (1H, m), 3,18-3,10 (1H, m), 2,91-2,82 (1H, m), 2,76-2,64 (1H, m), 2,33-2,22 (1H, m), 2,21-2,09 (1H, m).

RMN de ³¹P (CD₃OD) δ: 57,6 (s), 52,7 (s).

(Etapa 20-2)

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-14-(8,9-Dihidro-6-tia-2,3,5-triazabenzocd]azulen-2(7H)-il)-15-fluoro-16-hidroxi-7-[1-(2-hidroxietil)-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il]-2,10-dioxooctahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfacilotetradecin-2,10-bis(tiolato) disódico

(Diastereómero 2)

Usando el compuesto obtenido en la etapa 19 anterior (diastereómero 2) (69,5 mg: con impurezas), la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 11 del ejemplo 1, y la purificación se realizó a continuación según las siguientes condiciones de purificación para obtener el compuesto del título en forma de una sal de trietilamina. [Condiciones de purificación] Cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo], HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/solución de acetonitrilo-metanol (1:1), solución de acetonitrilo-metanol (1:1): del 10 %-45 % (0 min-40 min)], y HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/metanol, metanol: del 25 %-75 % (0 min-40 min)].

La sal de trietilamina obtenida se sometió a intercambio de sales de la misma manera que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (14,9 mg).

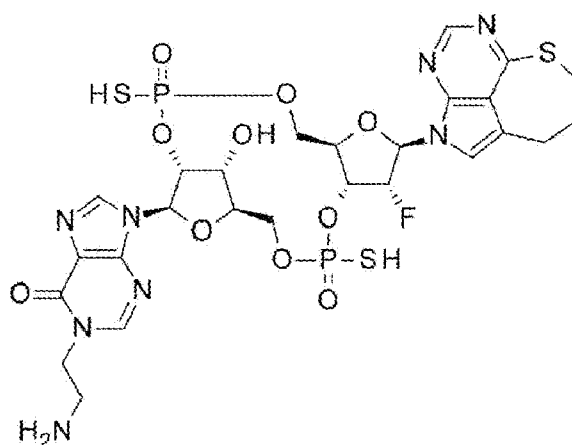
MS (ESI) m/z: 794 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,60 (1H, s), 8,41 (1H, s), 8,16 (1H, s), 7,72 (1H, s), 6,60 (1H, d, J = 15,7 Hz), 6,28 (1H, d, J = 7,9 Hz), 5,61-5,33 (3H, m), 4,59-4,49 (2H, m), 4,48-4,39 (2H, m), 4,34-4,27 (1H, m), 4,25-4,16 (1H, m), 4,11-3,99 (3H, m), 3,86-3,75 (2H, m), 3,25-3,11 (2H, m), 3,05-2,90 (2H, m), 2,35-2,17 (2H, m).

RMN de ³¹P (CD₃OD) δ: 59,1 (s), 57,9 (s).

Ejemplo 59: Síntesis de CDN49

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-7-[1-(2-Aminoetil)-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il]-14-(8,9-dihidro-6-tia-2,3,5-triazabenzocd]azulen-2(7H)-il)-15-fluoro-16-hidroxi-2,10-bis(sulfanil)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfacilotetradecin-2,10-diona

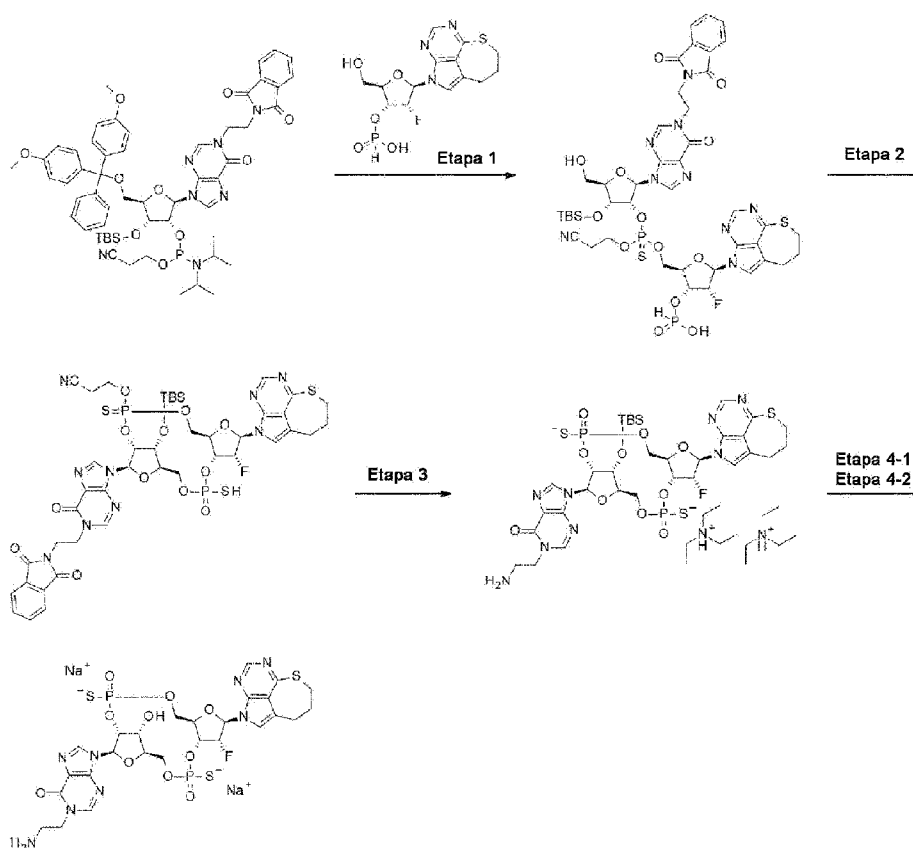


49

49a (Diastereómero 1)

49b (Diastereómero 2)

[Esquema de síntesis]



(Etapa 1)

- Usando el compuesto obtenido en la etapa 16 del ejemplo 58 (1,80 g), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 7 del ejemplo 1 para proporcionar una solución en acetonitrilo de 2-{2-desoxi-2-fluoro-3-O-[hidroxi(oxo)-λ⁵-fosfaniil]-β-D-ribofuranosil}-2,7,8,9-tetrahidro-6-tia-2,3,5-triazabenzocd]azuleno. Utilizando la solución en acetonitrilo obtenida y el compuesto obtenido en la etapa 3 del ejemplo 45 (2,30 g), se llevó a cabo la reacción del mismo modo que en la etapa 8 del ejemplo 1, y el producto bruto resultante se utilizó directamente para la reacción posterior.

(Etapa 2)

- 3-[(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-16-[[Terc-butil(dimetil)silil]oxi]-14-(8,9-dihidro-6-tia-2,3,5-triazabenzocd]azulen-2(7H)-il]-7-{1-[2-(1,3-dioxo-1,3-dihidro-2H-isoindol-2-il)etil]-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il]-15-fluoro-2-oxo-2-sulfanil-10-sulfanilidenoctahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-I][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxadifosfaciclotetradecin-10-il]oxi]propanonitrilo

- Usando el producto bruto obtenido en la etapa 1 anterior, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 9 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (1,22 g) en forma de una mezcla de diastereómeros en el átomo de fósforo.

MS (ESI) m/z: 1090 (M+H)⁺.

(Etapa 3)

- (5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-7-[1-(2-Aminoetil)-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il]-16-[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-14-(8,9-dihidro-6-tia-2,3,5-triazabenzocd]azulen-2(7H)-il]-15-fluoro-2,10-dioxooctahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-I][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxadifosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) de bis(N,N-dietiletanaminio)

- Usando el compuesto obtenido en la etapa 2 anterior (1,22 g), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 6 del ejemplo 45, y el producto resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo] para obtener el diastereómero 1 (108 mg: con impurezas) y el diastereómero 2 (111 mg: con impurezas) del compuesto del título.

Diastereómero 1 (menos polar)

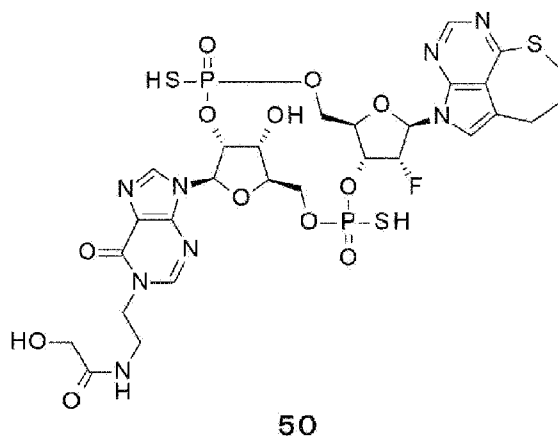
MS (ESI) m/z: 907 (M+H)⁺.

Diastereómero 2 (más polar)

MS (ESI) m/z: 907 (M+H)⁺.

(Etapa 4-1)

- 5 (5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-7-[1-(2-Aminoetil)-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il]-14-(8,9-dihidro-6-tia-2,3,5-triazabenz[cd]azulen-2(7H)-il)-15-fluoro-16-hidroxi-2,10-dioxooctahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-I][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidofosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) disódico
- (Diastereómero 1)
- 10 Usando el compuesto obtenido en la etapa 3 anterior (diastereómero 1) (108 mg: con impurezas), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 11 del ejemplo 1, y la purificación se llevó a cabo a continuación según las siguientes condiciones de purificación para obtener el compuesto del título en forma de una sal de trietilamina.
- [Condiciones de purificación] Cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo] y HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/solución de acetonitrilo-metanol (1:1), solución de acetonitrilo-metanol (1:1): del 10 %-50 % (0 min-40 min)].
- 15 La sal de trietilamina obtenida se sometió a intercambio de sales de la misma manera que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (44,4 mg).
- MS (ESI) m/z: 793 (M+H)⁺.
- RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,50 (1H, s), 8,42 (1H, s), 7,92 (1H, s), 7,56 (1H, s), 6,56 (1H, d, J = 16,3 Hz), 6,21 (1H, d, J = 6,0 Hz), 5,57-5,40 (2H, m), 5,35-5,22 (1H, m), 4,73-4,67 (1H, m), 4,58-4,49 (1H, m), 4,45-4,26 (4H, m), 4,24-4,15 (1H, m), 4,05-3,96 (1H, m), 3,78-3,51 (1H, m), 3,26-3,06 (4H, m), 2,93-2,82 (1H, m), 2,70-2,51 (1H, m), 2,29-2,07 (2H, m).
- 20 RMN de ³¹P (CD₃OD) δ: 57,5 (s), 52,9 (s).
- (Etapa 4-2)
- 25 (5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-7-[1-(2-Aminoetil)-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il]-14-(8,9-dihidro-6-tia-2,3,5-triazabenz[cd]azulen-2(7H)-il)-15-fluoro-16-hidroxi-2,10-dioxooctahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-I][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidofosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) disódico
- (Diastereómero 2)
- Usando el compuesto obtenido en la etapa 3 (diastereómero 2) (111 mg: con impurezas), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 11 del ejemplo 1, y la purificación se llevó a cabo a continuación según las siguientes condiciones de purificación para obtener el compuesto del título en forma de una sal de trietilamina.
- 30 [Condiciones de purificación] Cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo], HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 5 %-25 % (0 min-40 min)], y HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/metanol, metanol: del 20 %-60 % (0 min-40 min)].
- 35 La sal de trietilamina obtenida se sometió a intercambio de sales de la misma manera que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (40,6 mg).
- MS (ESI) m/z: 793 (M+H)⁺.
- RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,57 (1H, s), 8,41 (1H, s), 8,13 (1H, s), 7,72 (1H, s), 6,59 (1H, dd, J = 15,7, 1,8 Hz), 6,26 (1H, d, J = 8,5 Hz), 5,61-5,34 (3H, m), 4,57-4,48 (2H, m), 4,48-4,38 (2H, m), 4,38-4,28 (2H, m), 4,08-3,98 (3H, m), 3,29-3,21 (2H, m), 3,20-3,12 (2H, m), 3,02-2,92 (1H, m), 2,92-2,81 (1H, m), 2,29-2,15 (2H, m).
- 40 RMN de ³¹P (CD₃OD) δ: 58,7 (s), 57,8 (s).
- Ejemplo 60: Síntesis de CDN50
- N-(2-{9-[(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-14-(8,9-Dihidro-6-tia-2,3,5-triazabenz[cd]azulen-2(7H)-il)-15-fluoro-16-hidroxi-2,10-dioxo-2,10-bis(sulfanil)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-I][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidofosfaciclotetradecin-7-il]-6-oxo-6,9-dihidro-1H-purin-1-il}etil)-2-hidroxiacetamida

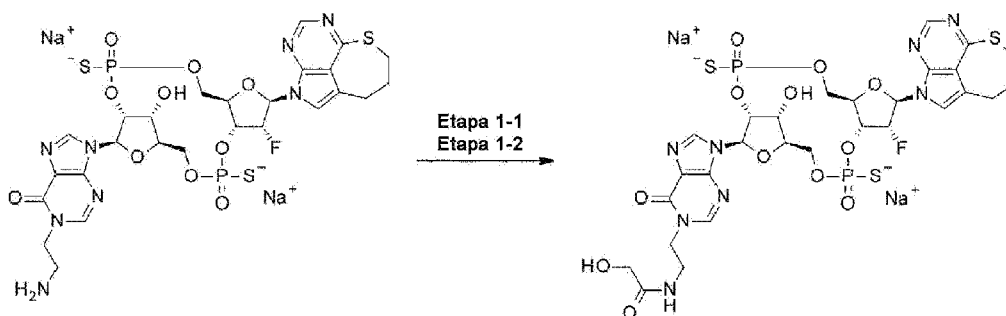


50

50a (Diastereómero 1)

50b (Diastereómero 2)

5 [Esquema de síntesis]



(Etapa 1-1)

10 (5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-14-(8,9-Dihidro-6-tia-2,3,5-triazabenzofuro[15-fluoro-16-hidroxi-7-{1-[2-(2-hidroxiacetamida)etil]-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il}-2,10-dioxooctahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-1][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxadifosfaciotetradecin-2,10-bis(tiolato) disódico

(Diastereómero 1)

Usando el compuesto obtenido en la etapa 4-1 del ejemplo 59 (20,0 mg), la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 1-1 del ejemplo 7, y la purificación se realizó a continuación según las siguientes condiciones de purificación para obtener el compuesto del título en forma de una sal de trietilamina.

15 [Condiciones de purificación] Cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo] y HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 10 %-30 % (0 min-40 min)].

La sal de trietilamina obtenida se sometió a intercambio de sales de la misma manera que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (15,6 mg).

20 MS (ESI) m/z: 851 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,43 (1H, s), 8,40 (1H, sa), 7,66 (1H, sa), 7,58 (1H, s), 6,53 (1H, d, J = 16,3 Hz), 6,14 (1H, d, J = 8,5 Hz), 5,73-5,64 (1H, m), 5,59-5,42 (1H, m), 5,42-5,29 (1H, m), 4,80-4,74 (1H, m), 4,53-4,26 (5H, m), 4,21-4,12 (1H, m), 3,99-3,92 (1H, m), 3,83 (2H, s), 3,66-3,56 (1H, m), 3,43-3,26 (2H, m), 3,23-3,06 (2H, m), 2,89-2,79 (1H, m), 2,49-2,33 (1H, m), 2,27-2,15 (1H, m), 2,15-2,02 (1H, m). RMN de ³¹P (CD₃OD) δ: 57,0 (s), 52,6 (s).

25 (Etapa 1-2)

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-14-(8,9-Dihidro-6-tia-2,3,5-triazabenzofuro[15-fluoro-16-hidroxi-7-{1-[2-(2-hidroxiacetamida)etil]-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il}-2,10-dioxooctahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-1][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxadifosfaciotetradecin-2,10-bis(tiolato) disódico

(Diastereómero 2)

Usando el compuesto obtenido en la etapa 4-2 del ejemplo 59 (10,0 mg), la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 1-1 del ejemplo 7, y la purificación se realizó a continuación según las siguientes condiciones de purificación para obtener el compuesto del título en forma de una sal de trietilamina.

- 5 [Condiciones de purificación] Cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo] y HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 7 %-25 % (0 min-40 min)].

La sal de trietilamina obtenida se sometió a intercambio de sales de la misma manera que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (6,6 mg).

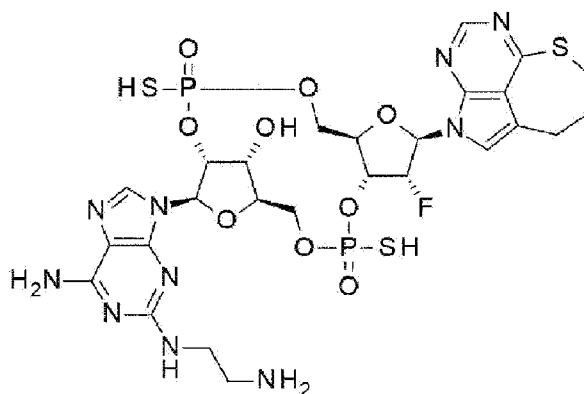
- 10 MS (ESI) m/z: 851 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,46 (1H, s), 8,42 (1H, s), 7,84 (1H, s), 7,78 (1H, s), 6,59 (1H, d, J = 15,1 Hz), 6,20 (1H, d, J = 7,9 Hz), 5,69-5,38 (3H, m), 4,60-4,50 (2H, m), 4,48-4,38 (2H, m), 4,31-4,20 (2H, m), 4,10-3,93 (2H, m), 3,87 (2H, s), 3,73-3,57 (2H, m), 3,52-3,41 (1H, m), 3,25-3,10 (2H, m), 3,01-2,90 (1H, m), 2,83-2,71 (1H, m), 2,30-2,11 (2H, m).

RMN de ³¹P (CD₃OD) δ: 58,2 (s), 57,6 (s).

- 15 Ejemplo 61: Síntesis de CDN51

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-7-{6-Amino-2-[(2-aminoetil)amino]-9H-purin-9-yl}-14-(8,9-dihidro-6-tia-2,3,5-triazabenz[cd]azulen-2(7H)-il)-15-fluoro-16-hidroxi-2,10-bis(sulfanil)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-1][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciotetradecin-2,10-diona

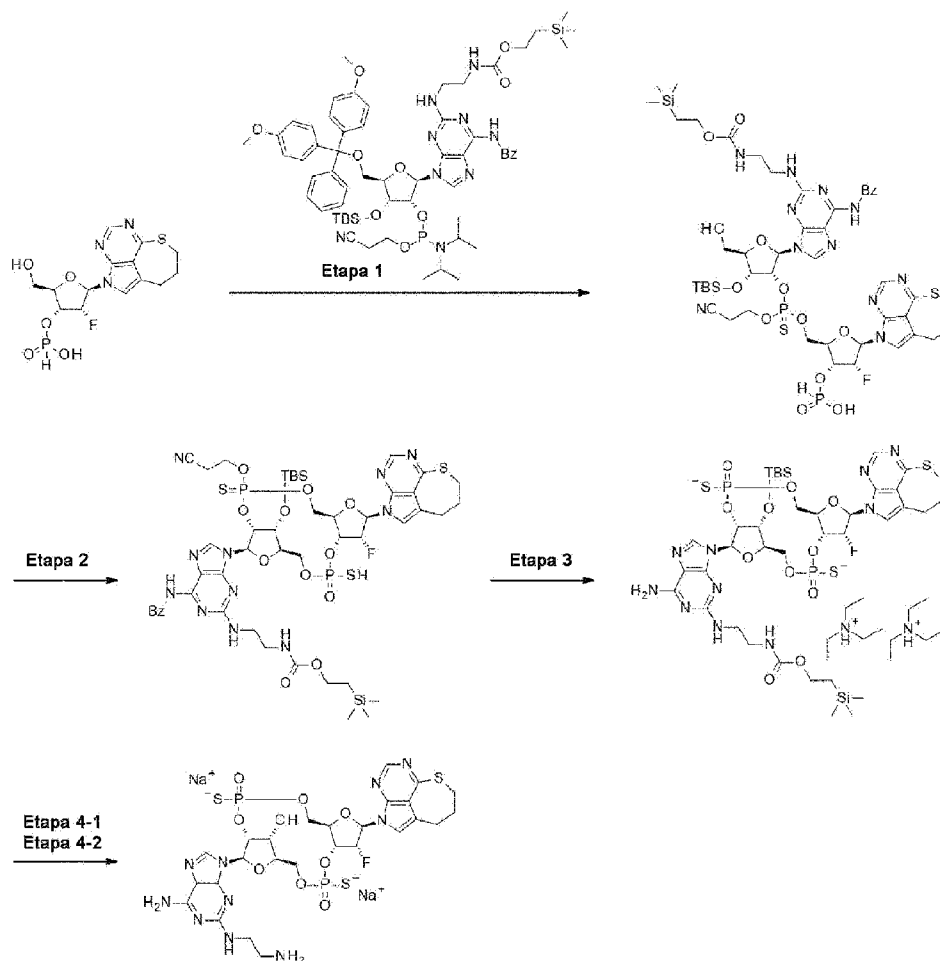


51

20

51a (Diastereómero 1)
51b (Diastereómero 2)

[Esquema de síntesis]



(Etapa 1)

Usando el compuesto obtenido en la etapa 16 del ejemplo 58 (1,80 g), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 7 del ejemplo 1 para proporcionar una solución en acetonitrilo de 2-{2-desoxi-2-fluoro-3-O-[hidroxi(oxo)-λ⁵-fosfani]-β-D-ribofuranosil}-2,7,8,9-tetrahidro-6-tia-2,3,5-triazabenz[cd]azuleno. Utilizando la solución en acetonitrilo obtenida y el compuesto obtenido en la etapa 6 del ejemplo 47 (3,10 g), se llevó a cabo la reacción del mismo modo que en la etapa 8 del ejemplo 1, y el producto bruto resultante se utilizó directamente para la reacción posterior.

(Etapa 2)

- 10 [2-({6-Benzamido-9-[(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-16-[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-10-(2-cianoetoxy)-14-(8,9-dihidro-6-tia-2,3,5-triazabenz[cd]azulen-2(7H)-il)-15-fluoro-2-oxo-2-sulfanil-10-sulfanilidenoctahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxadifosfaciclotetradecin-7-il]-9H-purin-2-il} amino)etil]carbamato de 2-(trimetilsilil)etilo

- 15 Usando el producto bruto obtenido en la etapa 1 anterior, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 9 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (1,83 g: con impurezas).

MS (ESI) m/z: 1222 (M+H)⁺.

(Etapa 3)

- 20 (5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-7-(6-Amino-2-[[2-({2-(trimetilsilil)etoxy}carbonilamino)etil]amino]-9H-purin-9-il)-16-[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-14-(8,9-dihidro-6-tia-2,3,5-triazabenz[cd]azulen-2(7H)-il)-15-fluoro-2,10-dioxooctahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxadifosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) de bis(N,N-di-etiletanaminio)

Usando la mezcla obtenida en la etapa 2 anterior (1,83 g), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 10 del ejemplo 1 para obtener el diastereómero 1 (151 mg: con impurezas) y el diastereómero 2 (103 mg: con impurezas) del compuesto del título.

Diastereómero 1 (menos polar)

5 MS (ESI) m/z: 1065 (M+H)⁺.

Diastereómero 2 (más polar)

MS (ESI) m/z: 1065 (M+H)⁺.

(Etapa 4-1)

10 (5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-7-{6-Amino-2-[(2-aminoetil)amino]-9H-purin-9-yl}-14-(8,9-dihidro-6-tia-2,3,5-triazabenzocd]azulen-2(7H)-il)-15-fluoro-16-hidroxi-2,10-dioxooctahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-1][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxadifosfacilotetradecin-2,10-bis(tiolato) de sodio

(Diastereómero 1)

15 Usando el compuesto obtenido en la etapa 3 anterior (diastereómero 1) (151 mg: con impurezas), la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 5 del ejemplo 40, y la purificación se realizó a continuación según las siguientes condiciones de purificación para obtener el compuesto del título en forma de una sal de trietilamina.

[Condiciones de purificación] Cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo] y HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 2 %-30 % (0 min-30 min)].

20 La sal de trietilamina obtenida se sometió a intercambio de sales de la misma manera que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (10,6 mg).

MS (ESI) m/z: 807 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,39 (1H, s), 7,97 (1H, sa), 7,55 (1H, s), 6,51 (1H, dd, J = 16,3 Hz), 6,00-5,92 (1H, m), 5,83-5,65 (1H, m), 5,44 (1H, dd, J = 52,0, 3,6 Hz), 5,34-5,20 (1H, m), 4,77 (1H, d, J = 3,6 Hz), 4,49-4,31 (5H, m), 4,11-4,07 (1H, m), 3,28-2,72 (8H, m), 2,29-1,99 (2H, m).

25 RMN de ³¹P (CD₃OD) δ: 57,3 (s), 52,3 (s).

(Etapa 4-2)

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-7-{6-Amino-2-[(2-aminoetil)amino]-9H-purin-9-yl}-14-(8,9-dihidro-6-tia-2,3,5-triazabenzocd]azulen-2(7H)-il)-15-fluoro-16-hidroxi-2,10-dioxooctahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-1][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxadifosfacilotetradecin-2,10-bis(tiolato) de sodio

30 (Diastereómero 2)

Usando el compuesto obtenido en la etapa 3 anterior (diastereómero 2) (103 mg: con impurezas), la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 5 del ejemplo 40, y la purificación se realizó a continuación según las siguientes condiciones de purificación para obtener el compuesto del título en forma de una sal de trietilamina.

35 [Condiciones de purificación] Cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo] y HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 10 %-30 % (0 min-30 min)].

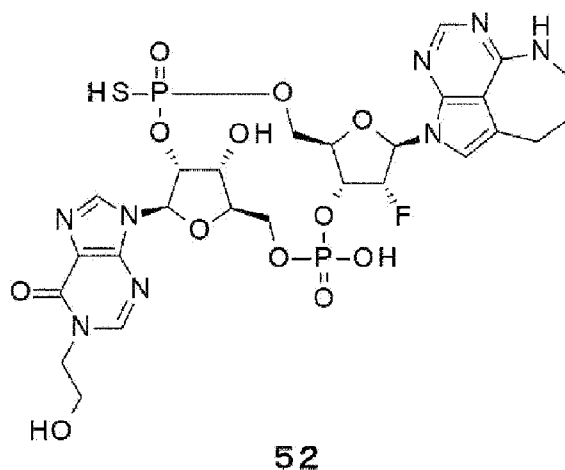
La sal de trietilamina obtenida se sometió a intercambio de sales de la misma manera que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (12,1 mg).

MS (ESI) m/z: 807 (M+H)⁺.

40 RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,39 (1H, s), 7,95 (1H, sa), 7,82 (1H, s), 6,58 (1H, dd, J = 15,1 Hz), 6,00-5,95 (1H, m), 5,90-5,71 (1H, m), 5,40 (1H, dd, J = 51,7, 3,3 Hz), 5,38-5,25 (1H, m), 4,53-4,39 (4H, m), 4,28-4,18 (2H, m), 4,10-4,05 (1H, m), 3,27-2,54 (8H, m), 2,34-2,10 (2H, m).

RMN de ³¹P (CD₃OD) δ: 57,9 (s), 57,3 (s).

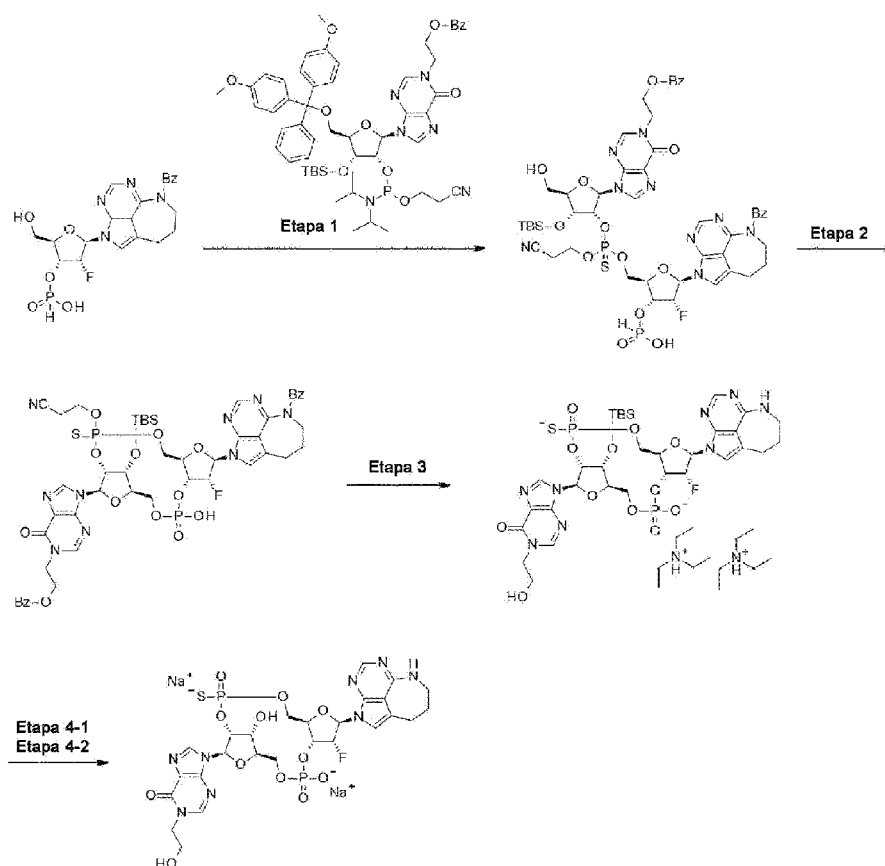
45 Ejemplo 62: Síntesis de CDN52 (5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-15-fluoro-2,16-dihidroxi-7-[1-(2-hidroxi-etil)-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-yl]-10-sulfanil-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-1][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxadifosfacilotetradecin-2,10-diona



52a (Diastereómero 1)

52b (Diastereómero 2)

5 [Esquema de síntesis]



(Etapa 1)

Usando el compuesto obtenido en la etapa 8 del ejemplo 44 (1,00 g), la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 7 del ejemplo 1 para proporcionar una solución en acetonitrilo de 6-benzoyl-2-{2-desoxi-2-fluoro-3-O-[hidroxi(oxo)-λ⁵-fosfanil]-β-D-ribofuranosil}-6,7,8,9-tetrahydro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azuleno. Utilizando la solución en acetonitrilo obtenida y el compuesto obtenido en la etapa 3 del ejemplo 22 (1,13 g), se llevó a cabo la reacción del mismo modo que en la etapa 8 del ejemplo 1, y el producto bruto resultante se utilizó directamente para la reacción posterior.

(Etapa 2)

Benzoato de 2-{9-[(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-14-(6-benzoil-6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)-16-[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-10-(2-cianoetoxi)-15-fluoro-2-hidroxi-2-oxo-10-sulfanilidenoctahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2 λ^5 ,10 λ^5 -furo[3,2-1] [1,3,6,9,11,2,10]pentaoxadifosfacilotetradecin-7-il]-6-oxo-6,9-dihidro-1H-purin-1-il}etilo

- 5 Una disolución del producto bruto obtenido en la etapa 1 anterior en piridina (32,5 ml) se concentró hasta aproximadamente 25 ml y, a continuación, se añadió a la misma 2-cloro-5,5-dimetil-1,3,2 λ^5 -dioxafosfinan-2-ona (945 mg), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añadió yodo (1,11 g) a la mezcla de reacción, que se agitó durante 1 hora. La mezcla de reacción se vertió en una solución acuosa (150 ml) de hidrogenocarbonato de sodio (4,30 g), y el producto resultante se agitó durante 30 minutos, sometiéndose después a extracción con acetato de etilo. Tras secar la capa orgánica sobre sulfato de sodio anhidro, se eliminó el agente desecante por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo/metanol] para obtener el compuesto del título (671 mg: con impurezas) en forma de una mezcla de diastereómeros en el átomo de fósforo.

MS (ESI) m/z: 1136 (M+H)⁺.

- 15 (Etapa 3)

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-16-[[Terc-butil(dimetil)silil]oxi]-15-fluoro-7-[1-(2-hidroxietil)-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il]-2,10-dioxo-10-sulfuro-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2 λ^5 ,10 λ^5 -furo[3,2-1][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxadifosfacilotetradecin-2-olato de bis(N,N-dietiletanaminio)

- 20 Usando el compuesto obtenido en la etapa 2 anterior (671 mg), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 10 del ejemplo 1 para obtener el diastereómero 1 (55,6 mg: con impurezas) y el diastereómero 2 (65,7 mg: con impurezas) del compuesto del título.

Diastereómero 1 (menos polar)

MS (ESI) m/z: 875 (M+H)⁺.

- 25 Diastereómero 2 (más polar)

MS (ESI) m/z: 875 (M+H)⁺.

(Etapa 4-1)

- 30 (5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-15-Fluoro-16-hidroxi-7-[1-(2-hidroxietil)-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il]-2,10-dioxo-10-sulfuro-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2 λ^5 ,10 λ^5 -furo[3,2-1][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxadifosfacilotetradecin-2-olate de sodio

(Diastereómero 1)

Usando el compuesto obtenido en la etapa 3 anterior (diastereómero 1) (55,6 mg: con impurezas), la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 11 del ejemplo 1, y la purificación se realizó a continuación según las siguientes condiciones de purificación para obtener el compuesto del título en forma de una sal de trietilamina.

- 35 [Condiciones de purificación] Cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetronitrilo] y HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetronitrilo, acetronitrilo: del 5 %-25 % (0 min-30 min)].

La sal de trietilamina obtenida se sometió a intercambio de sales de la misma manera que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (11,3 mg).

- 40 MS (ESI) m/z: 761 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CD₃OD) δ : 8,55 (1H, m), 8,15 (1H, m), 8,03 (1H, s), 7,14 (1H, d, J = 4,8 Hz), 6,46 (1H, d, J = 18,1 Hz), 6,28 (1H, d, J = 7,9 Hz), 5,50-5,29 (2H, m), 5,16-5,04 (1H, m), 4,74-4,69 (1H, m), 4,40-4,18 (6H, m), 4,13-4,07 (1H, m), 4,02-3,91 (1H, m), 3,84-3,74 (2H, m), 3,53-3,43 (2H, m), 2,81-2,63 (2H, m), 2,02-1,85 (2H, m). RMN de ³¹P (CD₃OD) δ : 53,4 (s), -0,86 (s).

- 45 (Etapa 4-2)

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-15-Fluoro-16-hidroxi-7-[1-(2-hidroxietil)-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il]-2,10-dioxo-10-sulfuro-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2 λ^5 ,10 λ^5 -furo[3,2-1][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxadifosfacilotetradecin-2-olate de sodio

(Diastereómero 2)

Usando el compuesto obtenido en la etapa 3 anterior (diastereómero 2) (65,7 mg: con impurezas), la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 11 del ejemplo 1, y la purificación se realizó a continuación según las siguientes condiciones de purificación para obtener el compuesto del título en forma de una sal de trietilamina.

- 5 [Condiciones de purificación] Cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo] y HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 3 %-20 % (0 min-30 min)].

La sal de trietilamina obtenida se sometió a intercambio de sales de la misma manera que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (23,5 mg).

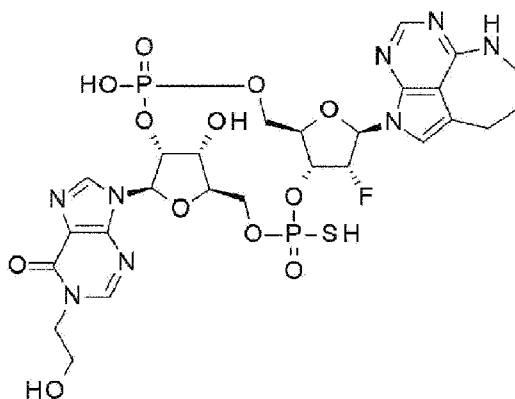
MS (ESI) m/z: 761 (M+H)⁺.

- 10 RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,58 (1H, d, J = 3,0 Hz), 8,19 (1H, d, J = 2,4 Hz), 8,03 (1H, s), 7,40 (1H, s), 6,49 (1H, dd, J = 16,3, 1,8 Hz), 6,29 (1H, d, J = 8,5 Hz), 5,51-5,22 (3H, m), 4,59-4,55 (1H, m), 4,43-4,17 (5H, m), 4,14-4,01 (3H, m), 3,85-3,78 (2H, m), 3,51-3,44 (2H, m), 2,90-2,75 (2H, m), 1,99-1,90 (2H, m).

RMN de ³¹P (CD₃OD) δ: 59,7 (s), -0,75 (s).

Ejemplo 63: Síntesis de CDN53

- 15 (5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-15-Fluoro-10,16-dihidroxi-7-[1-(2-hidroxietil)-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il]-2-sulfanil-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-1][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfacilotetradecin-2,10-diona

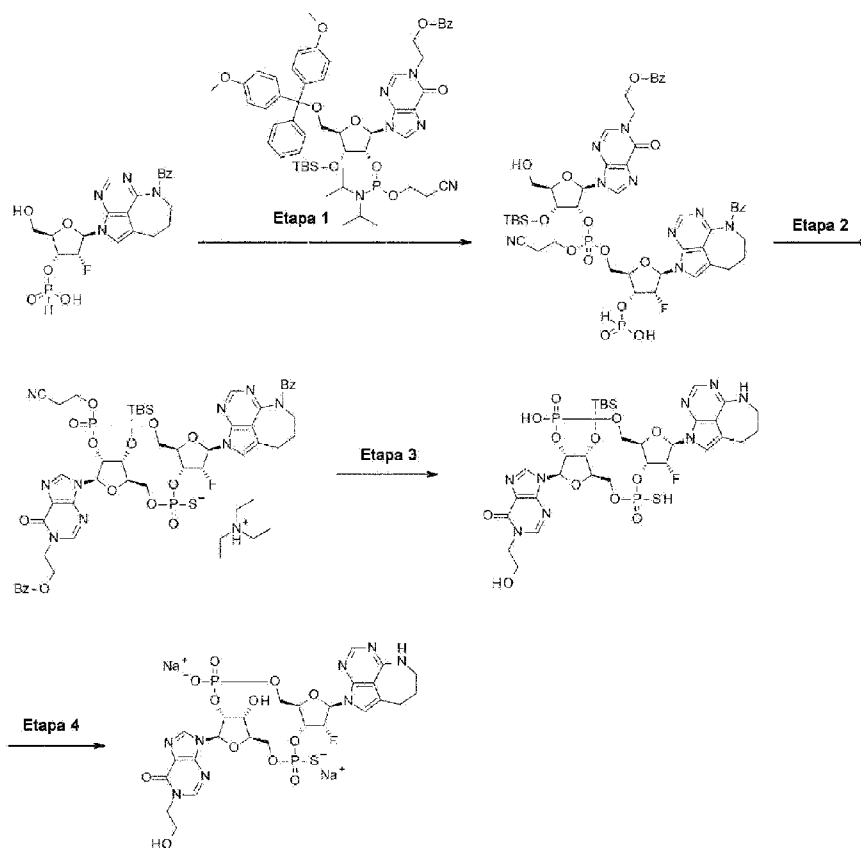


53

53a (Diastereómero 1)

20

[Esquema de síntesis]



(Etapa 1)

Usando el compuesto obtenido en la etapa 8 del ejemplo 44 (1,02 g), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 7 del ejemplo 1 para proporcionar una solución en acetonitrilo de 6-benzoil-2-{2-desoxi-2-fluoro-3-O-[hidroxi(oxo)-λ⁵-fosfaniil]-β-D-ribofuranosil}-6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azuleno (solución A de acetonitrilo). El compuesto obtenido en la etapa 3 del ejemplo 22 (1,23 g) se deshidrató azeotrópicamente tres veces con acetonitrilo deshidratado (10 ml). Después del último procedimiento, se dejaron aproximadamente 7 ml de acetonitrilo y se añadieron los tamices moleculares 3A, 1/16 (5 partículas en forma de gránulos) (solución de acetonitrilo B). Se mezclaron la solución de acetonitrilo A y la solución de acetonitrilo B, y la mezcla se agitó en una atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se añadió una solución decana de hidroperóxido de terc-butilo (5,5 M, 0,50 ml) a la mezcla de reacción, que se agitó durante 40 minutos, y la mezcla de reacción se enfrió con hielo, se añadió una solución acuosa (1,1 ml) de tiosulfato de sodio pentahidratado (826 mg), y la mezcla de reacción se agitó durante 10 minutos. Se añadió agua (20 ml) a la mezcla de reacción, que se sometió a extracción con una mezcla de diclorometano-metanol. Tras secar la capa orgánica sobre sulfato de sodio anhidro, se eliminó el agente desecante por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida. A una solución del residuo en diclorometano (15,9 ml) se le añadieron en este orden agua (0,200 ml) y una solución de ácido dicloroacético (1,00 ml) en diclorometano (15,9 ml), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Después de añadir piridina (11,0 ml) a la mezcla de reacción para inactivar la reacción, la mezcla de reacción se concentró a presión reducida. El producto bruto resultante se utilizó directamente para la reacción posterior.

(Etapa 2)

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-7-{1-[2-(Benzoiloxi)etil]-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il}-14-(6-benzoil-6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)-16-[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-10-(2-cianoetoxi)-15-fluoro-2,10-dioxooctahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-1][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxadifosfaciclotetradecin-2-tiolato de N,N-dietiletanaminio

El producto bruto obtenido en la etapa 1 se hizo reaccionar de la misma manera que en la etapa 9 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (122 mg: con impurezas). MS (ESI) m/z: 1136 (M+H)⁺.

(Etapa 3)

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-16-[[Terc-butil(dimetil)silil]oxi]-15-fluoro-10-hidroxi-7-[1-(2-hidroxi-etil)-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il]-2-sulfanil-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2 λ^5 ,10 λ^5 -furo[3,2-1][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxadifosfaciclotetradecin-2,10-diona

- 5 Usando el compuesto obtenido en la etapa 2 anterior (122 mg, con impurezas), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 10 del ejemplo 1, y el producto bruto resultante se usó directamente para la reacción posterior.

MS (ESI) m/z: 875 (M+H)⁺.

(Etapa 4)

- 10 (5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-15-Fluoro-16-hidroxi-7-[1-(2-hidroxi-etil)-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il]-2,10-dioxo-2-sulfuro-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2 λ^5 ,10 λ^5 -furo[3,2-1][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxadifosfaciclotetradecin-10-olato disódico

- 15 Usando el producto bruto obtenido en la etapa 3 anterior, la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 11 del ejemplo 1, y el producto resultante se purificó después por HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 2 %-30 % (0 min-30 min)] para obtener el compuesto del título en forma de una sal de trietilamina. La sal de trietilamina obtenida se sometió a intercambio salino del mismo modo que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (30 mg).

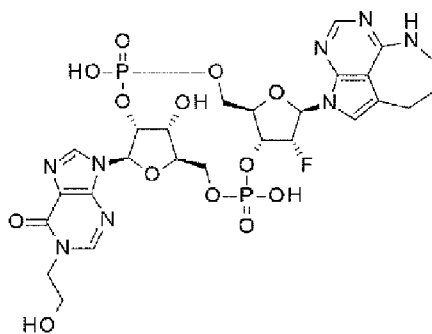
MS (ESI) m/z: 761 (M+H)⁺.

- 20 RMN de ¹H (CD₃OD) δ : 8,58 (1H, s), 8,12 (1H, s), 8,02 (1H, s), 7,13 (1H, s), 6,47 (1H, d, J = 18,1 Hz), 6,27 (1H, d, J = 8,5 Hz), 5,41 (1H, dd, J = 51,7, 3,9 Hz), 5,29-5,16 (2H, m), 4,58-4,52 (2H, m), 4,36-4,17 (5H, m), 4,05-3,90 (2H, m), 3,82-3,71 (2H, m), 3,52-3,43 (2H, m), 2,76-2,63 (2H, m), 2,02-1,85 (2H, m).

RMN de ³¹P (CD₃OD) δ : 58,0 (s), -0,97 (s).

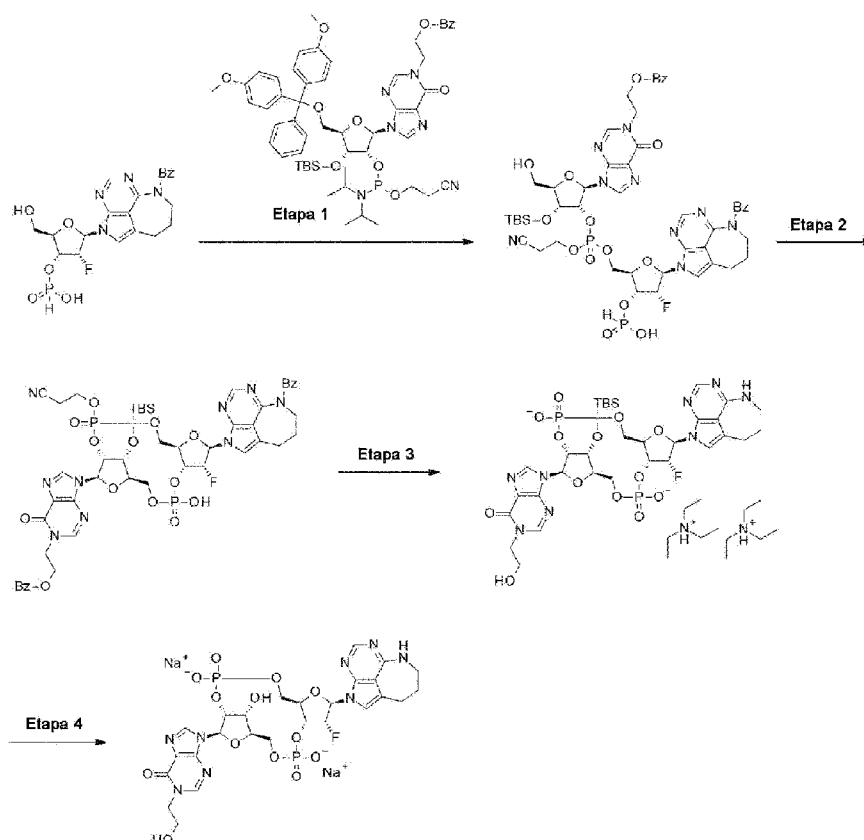
Ejemplo 64: Síntesis de CDN54

- 25 (5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-15-Fluoro-2,10,16-trihidroxi-7-[1-(2-hidroxi-etil)-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il]-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2 λ^5 ,10 λ^5 -furo[3,2-1][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxadifosfaciclotetradecin-2,10-diona



54

[Esquema de síntesis]



(Etapa 1)

Usando el compuesto obtenido en la etapa 8 del ejemplo 44 (1,00 g) y el compuesto obtenido en la etapa 3 del ejemplo 22 (1,13 g), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 1 del ejemplo 63, y el producto bruto resultante se usó directamente para la reacción posterior.

(Etapa 2)

Benzoato de 2-[9-[(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-14-(6-benzoil-6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)-16-[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-10-(2-cianoetoxi)-15-fluoro-2-hidroxi-2,10-dioxooctahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-1][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-7-il]-6-oxo-6,9-dihidro-1H-purin-1-il]etilol

Usando el producto bruto obtenido en la etapa 1 anterior, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 2 del ejemplo 62 para obtener el compuesto del título (602 mg: con impurezas) en forma de una mezcla de diastereómeros en el átomo de fósforo. MS (ESI) m/z: 1120 (M+H)⁺.

(Etapa 3)

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-16-[[Terc-butil(dimetil)silil]oxi]-15-fluoro-7-[1-(2-hidroxietil)-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il]-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2X⁵,10λ⁵-furo[3,2-1][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-bis(olato) de bis(N,N-dietiletanaminio)

Usando el compuesto obtenido en la etapa 2 anterior (602 mg), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 10 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (90,8 mg: con impurezas).

MS (ESI) m/z: 859 (M+H)⁺.

(Etapa 4)

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-15-Fluoro-16-hidroxi-7-[1-(2-hidroxietil)-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il]-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-1][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-bis(olate) disódico

Usando el compuesto obtenido en la etapa 3 anterior (90,8 mg: con impurezas), la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 11 del ejemplo 1, y la purificación se realizó a continuación según las siguientes condiciones de purificación para obtener el compuesto del título en forma de una sal de trietilamina.

- 5 [Condiciones de purificación] Cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo] y HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 1 %-20 % (0 min-40 min)].

La sal de trietilamina obtenida se sometió a intercambio de sales de la misma manera que en el apartado [Conversión a sal de sodio] descrito en la etapa 11 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (40,4 mg).

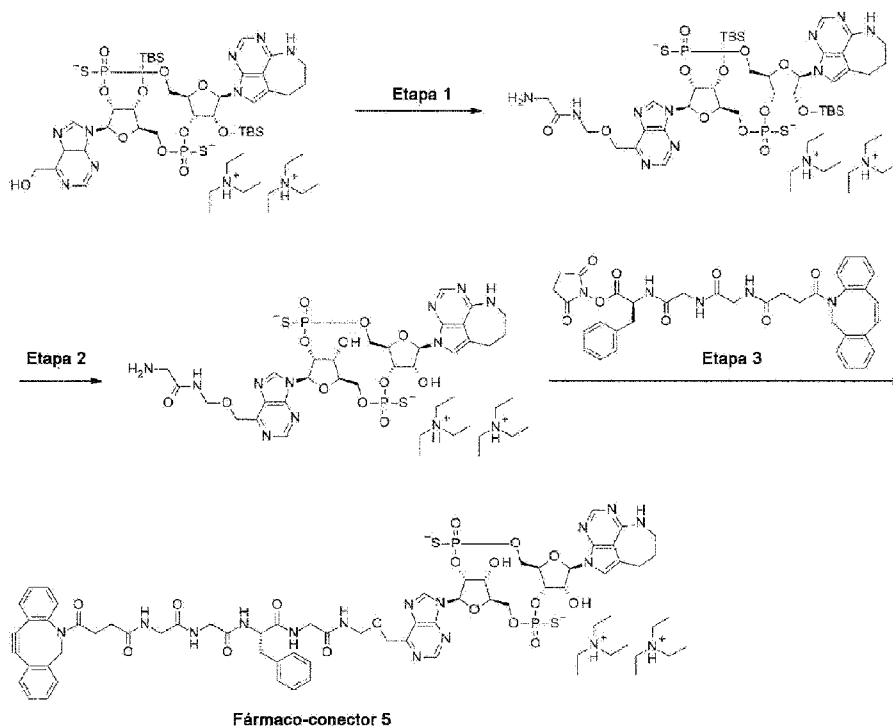
MS (ESI) m/z: 745 (M+H)⁺.

- 10 RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,56 (1H, s), 8,19 (1H, s), 8,03 (1H, s), 7,10 (1H, s), 6,46 (1H, d, J = 18,7 Hz), 6,31 (1H, d, J = 8,5 Hz), 5,51-5,32 (1H, m), 5,24-5,01 (2H, m), 4,61-4,56 (1H, m), 4,41-4,21 (5H, m), 4,21-3,97 (3H, m), 3,87-3,75 (2H, m), 3,54-3,41 (2H, m), 2,83-2,67 (2H, m), 2,02-1,85 (2H, m).

RMN de ³¹P (CD₃OD) δ: -0,59 (s), -0,81 (s).

Ejemplo 65: Síntesis del fármaco-conector 5

- 15 [Esquema de síntesis]



(Etapa 1)

- 20 (5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-15,16-Bis[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-7-(6-[[[(glicilamino)metoxi]metil]-9H-purin-9-il]-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-1][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidofosfacilotetradecin-2,10-bis(tiolato) de bis(N,N-dietiletanaminio)

Usando el compuesto obtenido en la etapa 7 del ejemplo 17 (diastereómero 2) (80,6 mg), la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 7-1 del ejemplo 22 para obtener el compuesto del título (66,1 mg: con impurezas).

MS (ESI) m/z: 1059 (M+H)⁺.

(Etapa 2)

- 25 (5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-7-(6-[[[(Glicilamino)metoxi]metil]-9H-purin-9-il]-15,16-dihidroxi-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-1][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidofosfacilotetradecin-2,10-bis(tiolato) de bis(N,N-dietiletanaminio)

Usando el compuesto obtenido en la etapa 1 anterior (66,1 mg), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 8-1 del ejemplo 22 para obtener el compuesto del título (40,4 mg: con impurezas).

MS (ESI) m/z: 831 (M+H)⁺.

(Etapa 3)

- 5 N-[4-(11,12-Dideshidrodibenzo[b,f]azocin-5(6H)-il)-4-oxobutanoil]glicilglicil-L-fenilalanil-N-[(9-[(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-15,16-dihidroxi-2,10-dioxo-2,10-disulfuro-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-1][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-7-il]-9H-purin-6-il}metoxi)metil]glicinamida de bis(N,N-dietiletanaminio)

- 10 (Fármaco-conector 5)

Usando el compuesto obtenido en la etapa 2 anterior (40,4 mg), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 9-1 del ejemplo 22, y el producto resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo] y HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 10 %-45 % (0 min-30 min)] para obtener el compuesto del título (5,0 mg).

- 15 (5,0 mg).

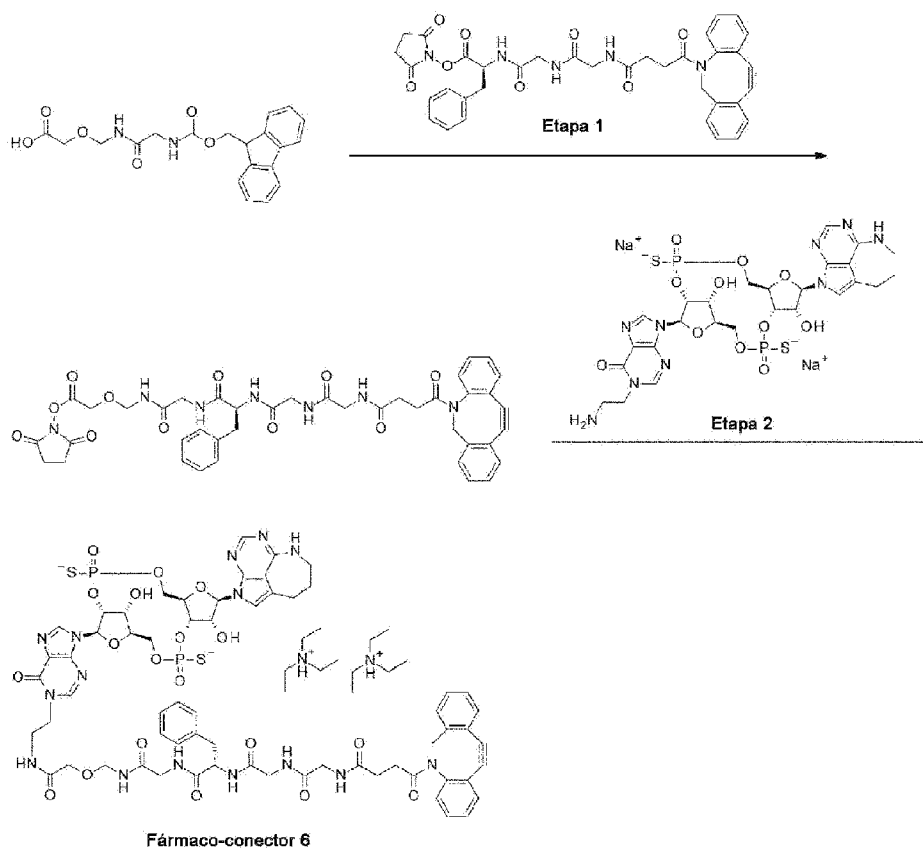
MS (ESI) m/z: 1379 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 9,17 (1H, s), 8,83 (1H, d, J = 4,8 Hz), 8,01 (1H, d, J = 3,6 Hz), 7,63-7,45 (2H, m), 7,40-7,34 (3H, m), 7,29-7,12 (8H, m), 7,09 (1H, s), 6,47 (1H, d, J = 8,5 Hz), 6,31 (1H, d, J = 6,7 Hz), 5,56-5,47 (2H, m), 5,05-4,91 (4H, m), 4,88-4,73 (3H, m), 4,57-4,30 (5H, m), 4,09-4,01 (1H, m), 4,00-3,55 (9H, m), 3,52-3,45 (2H, m), 3,18 (12H, q, J = 7,3 Hz), 3,02-2,94 (1H, m), 2,90-2,71 (3H, m), 2,35-2,20 (2H, m), 2,04-1,92 (3H, m), 1,27 (18H, t, J = 7,3 Hz).

- 20 J = 7,3 Hz), 3,02-2,94 (1H, m), 2,90-2,71 (3H, m), 2,35-2,20 (2H, m), 2,04-1,92 (3H, m), 1,27 (18H, t, J = 7,3 Hz).

Ejemplo 66: Síntesis del fármaco-conector 6

[Esquema de síntesis]



(Etapa 1)

N-[4-(11,12-Dideshidrodibenzo[b,f]azocin-5(6H)-il)-4-oxobutanoil]glicilglicil-L-fenilalanil-N-({2-[(2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi]-2-oxoetoxi}metil)glicinamida

A una solución de ácido {[N-[(9H-fluoren-9-il)metoxi]carbonil]glicil}amino]metoxi]acético (955 mg) como compuesto conocido en la bibliografía (documento WO 2014/057687) en N,N-dimetilformamida (8,0 ml) se le añadió 1,8-diazabicyclo[5.4.0]-7-undeceno (0,74 ml), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora (mezcla de reacción A). A una solución del compuesto obtenido en la etapa 10 del ejemplo 22 (938 mg) en N,N-dimetilformamida (8,0 ml) se le añadieron N-hidroxisuccinimida (229 mg) y clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (380 mg), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 50 minutos (mezcla de reacción B). La mezcla de reacción A se añadió a la mezcla de reacción B, y el producto resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se añadieron diclorometano (50 ml) y una solución acuosa al 10 % de ácido cítrico (10 ml) a la mezcla de reacción, que se sometió a extracción con diclorometano. La capa orgánica se lavó con salmuera y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El agente desecante se eliminó por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo/(capa inferior de cloroformo/metanol/agua = 7:3:1)]. A una solución del compuesto obtenido en N,N-dimetilformamida (8,0 ml) se le añadieron N-hidroxisuccinimida (229 mg) y clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (380 mg), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añadieron diclorometano (100 ml) y agua (25 ml) a la mezcla de reacción, que se sometió a extracción con diclorometano. La capa orgánica se lavó con salmuera y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El agente desecante se eliminó por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo/metanol]. Las fracciones que contenían el producto deseado se concentraron a presión reducida y se añadió éter dietílico al residuo para obtener una suspensión. El sólido obtenido se recogió por filtración para obtener el compuesto del título (412 mg).

RMN de ^1H (DMSO- d_6) δ : 8,72 (1H, m), 8,32 (1H, m), 8,17-7,96 (3H, m), 7,71-7,15 (13H, m), 5,01 (1H, d, J = 13,9 Hz), 4,70-4,48 (5H, m), 3,81-3,51 (7H, m), 3,05 (1H, dd, J = 14,2, 3,9 Hz), 2,83 (4H, s), 2,80 (1H, m), 2,64 (1H, m), 2,28 (1H, m), 2,07 (1H, m), 1,79 (1H, m).

(Etapas 2)

N-[4-(11,12-Dideshidrodibenzo[b,f]azocin-5(6H)-il)-4-oxobutanoil]glicilglicil-L-fenilalanil-N-({2-[(2-9-[(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-15,16-dihidroxi-2,10-dioxo-2,10-disulfuro-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzoc[d]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2 λ^5 ,10 λ^5 -furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidofosfaciclotetradecin-7-il]-6-oxo-6,9-dihidro-1H-purin-1-il)etil}amino]-2-oxoetoxi}metil)glicinamida de bis(N,N-dietiletanaminio)

(Fármaco-conector 6)

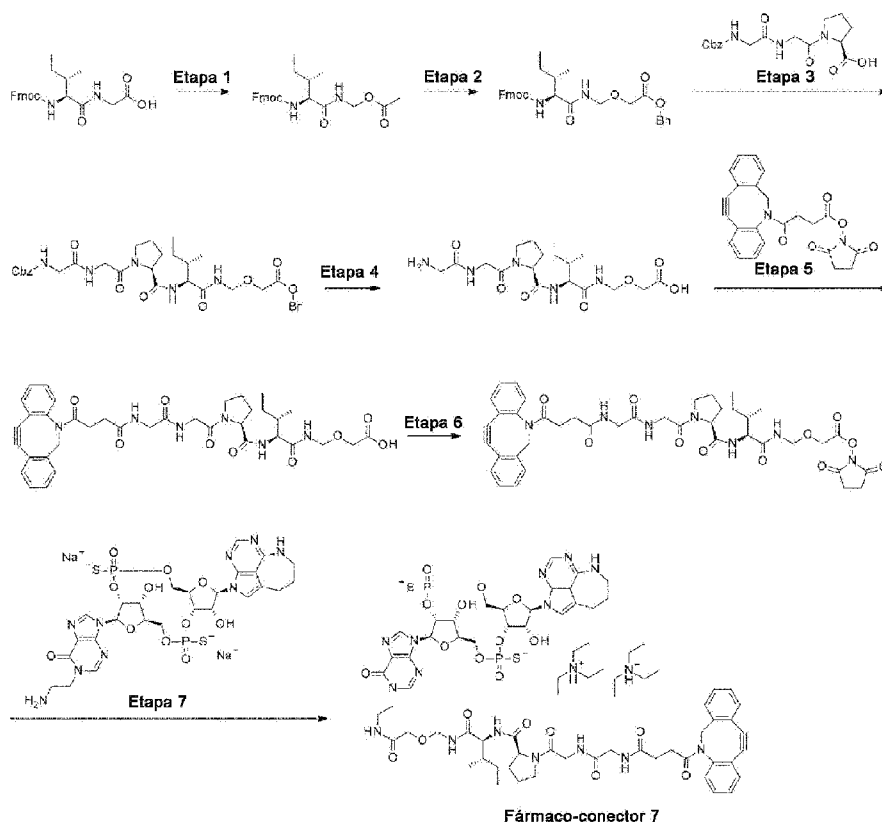
Usando el compuesto obtenido en la etapa 8-2 del ejemplo 5 (20,0 mg) y el compuesto obtenido en la etapa 1 anterior (23,7 mg), la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 4 del ejemplo 21, y el producto resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo], HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 20 %-45 % (0 min-40 min)], y HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/metanol, metanol: del 30 %-80 % (0 min-40 min)] para obtener el compuesto del título (14,1 mg).

MS (ESI) m/z: 1466 (M+H) $^+$.

RMN de ^1H (CD $_3$ OD) δ : 8,74-8,69 (1H, m), 8,17-8,12 (1H, m), 8,04-7,96 (1H, m), 7,65-7,13 (13H, m), 7,13-7,04 (1H, m), 6,33-6,23 (2H, m), 5,50-5,31 (2H, m), 5,07-4,94 (2H, m), 4,85-4,76 (1H, m), 4,71-4,26 (10H, m), 4,18-3,53 (13H, m), 3,53-3,33 (3H, m), 3,19 (12H, q, J = 7,3 Hz), 3,05-2,92 (1H, m), 2,91-2,70 (3H, m), 2,40-2,20 (2H, m), 2,07-1,87 (2H, m), 1,29 (18H, t, J = 7,3 Hz).

Ejemplo 67: Síntesis del fármaco-conector 7

[Esquema de síntesis]



(Etapa 1)

[(N-[(9H-Fluoren-9-il)metoxi]carbonil]-L-isoleucil)amino]acetato de metilo

- 5 A una mezcla de N-[(9H-fluoren-9-il)metoxi]carbonil]-L-isoleucilglicina (2,50 g) disponible en el mercado (Iris Biotech GmbH) en tetrahidrofurano (45 ml)-tolueno (15 ml) se le añadieron piridina (0,588 ml) y tetraacetato de plomo (3,24 g) a temperatura ambiente, y la mezcla de reacción se agitó a 65 °C durante 3 horas. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo y se lavó con agua y salmuera en este orden. Tras secar la capa orgánica sobre sulfato de sodio anhidro, se eliminó el agente desecante por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo] para obtener el compuesto del título (2,06 g).

MS (ESI) m/z: 447 (M+Na)⁺.

RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 7,77 (2H, d, J = 7,9 Hz), 7,58 (2H, d, J = 7,3 Hz), 7,40 (2H, t, J = 7,3 Hz), 7,32 (2H, td, J = 7,6, 1,2 Hz), 6,97-6,92 (1H, ma), 5,32-5,20 (3H, m), 4,47-4,37 (2H, m), 4,21 (1H, t, J = 6,7 Hz), 4,05-4,01 (1H, m), 2,04 (3H, s), 1,92-1,84 (1H, m), 1,51-1,41 (1H, m), 1,17-1,07 (1H, m), 0,93-0,89 (6H, m).

- 15 (Etapa 2)

[[[N-[(9H-fluoren-9-il)metoxi]carbonil]-L-isoleucil)amino]metoxi]acetato de bencilo

- 20 A una suspensión del compuesto obtenido en la etapa 1 anterior (2,06 g) en tetrahidrofurano (48 ml) se le añadieron glicolato de bencilo (1,38 ml) y ácido p-toluenosulfónico monohidratado (92,3 mg) a 0 °C, y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo y se lavó con agua saturada de hidrogenocarbonato de sodio, y la capa acuosa se sometió a extracción con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó conjuntamente con salmuera y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El agente desecante se eliminó por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo] para obtener el compuesto del título (1,72 g).

MS (ESI) m/z: 553 (M+Na)⁺.

- 25 RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 7,76 (2H, d, J = 7,9 Hz), 7,58 (2H, d, J = 7,3 Hz), 7,42-7,29 (9H, m), 6,74-6,69 (1H, ma), 5,24-5,21 (1H, ma), 5,17 (2H, s), 4,86 (2H, d, J = 6,7 Hz), 4,48-4,39 (2H, m), 4,23-4,19 (3H, m), 4,04-4,00 (1H, m), 1,95-1,87 (1H, m), 1,50-1,41 (1H, m), 1,15-1,07 (1H, m), 0,93-0,89 (6H, m).

(Etapa 3)

N-[(Benciloxi)carbonil]glicilglicil-L-prolil-N-[[2-(benciloxi)-2-oxoetoxi]metil]-L-isoleucinamida

A una suspensión del compuesto obtenido en la etapa 2 anterior (1,72 g) en acetonitrilo (40 ml) se le añadió 1,8-diazabicyclo[5.4.0]-7-undeceno (0,290 ml) a temperatura ambiente, y la mezcla de reacción se agitó durante 1 hora (mezcla de reacción A). A una suspensión de N-[(benzoiloxi)carbonil]glicilglicil-L-prolina (1,41 g) disponible en el mercado en acetonitrilo (20 ml) se le añadieron 3H-[1,2,3]triazolo[4,5-b]piridin-3-ol (529 mg), clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (746 mg) y N,N-diisopropiletilamina (0,678 ml) a temperatura ambiente, y la mezcla de reacción se agitó durante 1 hora. Esta mezcla de reacción se añadió a la mezcla de reacción A anterior a temperatura ambiente, y el producto resultante se agitó durante 6 horas, concentrándose a continuación a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo/metanol] para obtener el compuesto del título (1,56 g).

MS (ESI) m/z: 676 (M+Na)⁺.

RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 7,37-7,27 (10H, m), 5,17 (2H, s), 5,09 (2H, s), 4,82-4,70 (2H, m), 4,56-4,44 (1H, m), 4,17-4,14 (3H, m), 4,07-3,96 (2H, m), 3,83-3,82 (2H, m), 3,64-3,48 (2H, m), 2,34-1,78 (5H, m), 1,61-1,51 (1H, m), 1,25-1,13 (1H, m), 0,95-0,87 (6H, m).

(Etapa 4)

Glicilglicil-L-prolil-N-[(carboximetoxi)metil]-L-isoleucinamida

A una mezcla del compuesto obtenido en la etapa 3 anterior (1,56 g) en metanol (8 ml)-tetrahidrofurano (24 ml)-diclorometano (8 ml) se le añadió paladio al 10 %-carbono (M) húmedo (1,4 g), y la mezcla de reacción se agitó en una atmósfera de hidrógeno a temperatura ambiente durante 23 horas. Se añadió una mezcla de metanol/tetrahidrofurano (1:1) (50 ml) a la mezcla de reacción, que se filtró con Celite. El Celite se lavó con una mezcla de metanol/tetrahidrofurano (1:1). Tras concentrar el filtrado a presión reducida, se añadieron al residuo metanol (20 ml), tetrahidrofurano (20 ml) y paladio al 10 %-carbono (M) húmedo (1,0 g), y la mezcla de reacción se agitó en una atmósfera de hidrógeno a temperatura ambiente durante 3 horas. La mezcla de reacción se filtró con Celite, y el Celite se lavó con metanol/tetrahidrofurano (1:1). El filtrado se concentró a presión reducida para obtener una forma bruta del compuesto del título (1,02 g).

MS (ESI) m/z: 430 (M+H)⁺.

(Etapa 5)

N-[4-(11,12-Dideshidrodibenzo[b,f]azocin-5(6H)-il)-4-oxobutanoil]glicilglicil-L-prolil-N-[(carboximetoxi)metil]-L-isoleucinamida

A una solución del compuesto obtenido en la etapa 4 anterior (1,02 g) en N,N-dimetilformamida (24 ml) se le añadió 1-[[4-(11,12-dideshidrodibenzo[b,f]azocin-5(6H)-il)-4-oxobutanoil]oxi]pirrolidin-2,5-diona (956 mg) y N,N-diisopropiletilamina (0,496 ml) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo/metanol]. Las fracciones que contenían el producto deseado se concentraron a presión reducida y se añadió acetato de etilo al residuo para solidificarlo. El sólido obtenido se recogió por filtración para obtener el compuesto del título (1,06 g).

MS (ESI) m/z: 739 (M+Na)⁺, 715 (M-H)⁻.

RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 7,64-7,59 (2H, m), 7,48-7,44 (3H, m), 7,38-7,23 (3H, m), 5,15-5,12 (1H, m), 4,74-4,70 (2H, m), 4,64-4,48 (1H, m), 4,25-4,18 (1H, m), 4,11-3,96 (3H, m), 3,91-3,85 (1H, m), 3,78-3,57 (5H, m), 2,84-2,75 (1H, m), 2,39-2,16 (3H, m), 2,08-1,84 (5H, m), 1,61-1,52 (1H, m), 1,23-1,15 (1H, m), 0,96-0,87 (6H, m).

(Etapa 6)

N-[4-(11,12-Dideshidrodibenzo[b,f]azocin-5(6H)-il)-4-oxobutanoil]glicilglicil-L-prolil-N-[(2-(2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-2-oxoetoxi]metil]-L-isoleucinamida

A una suspensión del compuesto obtenido en la etapa 5 anterior (1,06 g) en N,N-dimetilformamida (16 ml) se le añadieron N-hidroxisuccinimida (187 mg) y clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (312 mg), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. La mezcla de reacción se diluyó con cloroformo y se lavó tres veces con agua. Tras secar la capa orgánica sobre sulfato de sodio anhidro, se eliminó el agente desecante por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida. Se añadió acetato de etilo al residuo y el sólido obtenido se recogió por filtración. Al sólido recogido por filtración se le añadió éter dietílico para preparar una suspensión, y el sólido se recogió por filtración para obtener el compuesto del título (767 mg).

MS (ESI) m/z: 836 (M+Na)⁺.

RMN de ^1H (CD_3OD) δ : 7,68-7,56 (2H, m), 7,48-7,44 (3H, m), 7,38-7,23 (3H, m), 5,15-5,12 (1H, m), 4,83-4,70 (2H, m), 4,64-4,50 (3H, m), 4,24-3,55 (8H, m), 2,83-2,76 (5H, m), 2,38-2,18 (3H, m), 2,11-1,84 (5H, m), 1,60-1,52 (1H, m), 1,25-1,13 (1H, m), 0,98-0,87 (6H, m).

(Etapa 7)

- 5 N-[4-(11,12-Dideshidrodibenzo[b,f]azocin-5(6H)-il)-4-oxobutanoil]glicilglicil-L-prolil-N-({2-[(2-{9-[(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-15,16-dihidroxi-2,10-dioxo-2,10-disulfuro-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2 λ^5 ,10 λ^5 -furo[3,2-1][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciotetradecin-7-il]-6-oxo-6,9-dihidro-1H-purin-1-il}etil)amino]-2-oxoetoxi)metil)-L-isoleucinamida de bis(N,N-dietiletanaminio)

- 10 (Fármaco-conector 7)

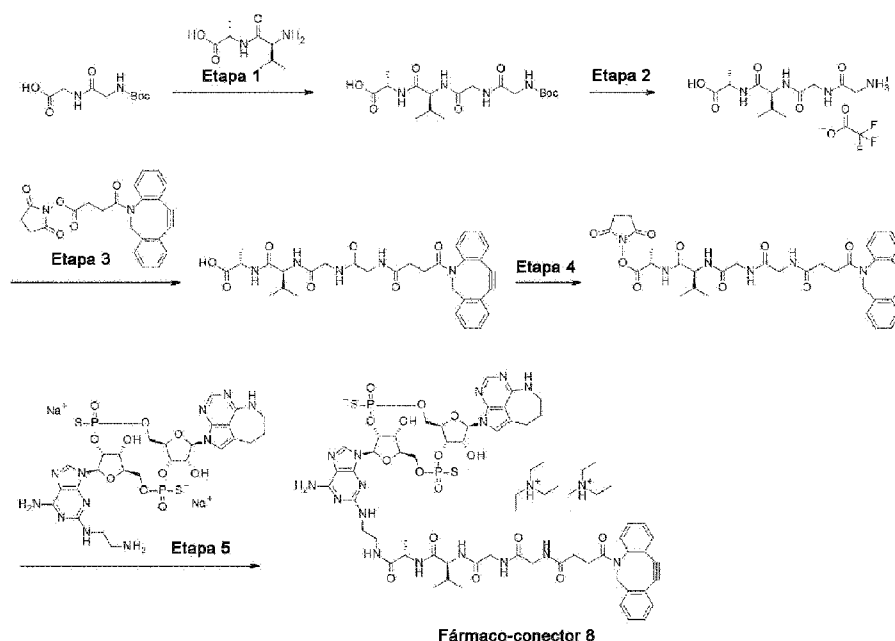
Usando el compuesto obtenido en la etapa 8-2 del ejemplo 5 (20,0 mg) y el compuesto obtenido en la etapa 6 anterior (20,9 mg), la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 4 del ejemplo 21, y el producto resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo], HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 20 %-45 % (0 min-40 min)], y HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/metanol, metanol: del 30 %-80 % (0 min-40 min)] para obtener el compuesto del título (11,9 mg).

MS (ESI) m/z : 1472 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$

- 20 RMN de ^1H (CD_3OD) δ : 8,71 (1H, sa), 8,19-8,13 (1H, m), 8,02 (1H, s), 7,64-7,56 (2H, m), 7,48-7,41 (3H, m), 7,37-7,08 (4H, m), 6,34-6,23 (2H, m), 5,48-5,36 (2H, m), 5,16-5,08 (1H, m), 4,98-4,55 (6H, m), 4,52-4,15 (7H, m), 4,07-3,81 (6H, m), 3,80-3,45 (8H, m), 3,19 (12H, q, $J = 7,3$ Hz), 2,93-2,85 (2H, m), 2,85-2,71 (1H, m), 2,45-2,30 (1H, m), 2,30-2,11 (2H, m), 2,08-1,83 (6H, m), 1,66-1,45 (1H, m), 1,29 (18H, t, $J = 7,3$ Hz), 1,28-1,10 (1H, m), 1,01-0,85 (7H, m).

Ejemplo 68: Síntesis del fármaco-conector 8

[Esquema de síntesis]



- 25 (Etapa 1)

N-(Terc-butoxicarbonil)glicilglicil-L-valil-L-alanina

- 30 A una solución de N-(terc-butoxicarbonil)glicilglicina (5,00 g) disponible en el mercado (Chemfun Medical Technology (Shanghai) Co., Ltd.) y N-hidroxisuccinimida (2,97 g) en N,N-dimetilformamida (50 ml) se le añadió clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (4,95 g) en una atmósfera de nitrógeno a 0 °C, se aumentó la temperatura hasta la temperatura ambiente y se agitó la mezcla de reacción durante 1 hora. Se añadieron trietilamina (3,6 ml) y L-valil-L-alanina (4,05 g) disponible en el mercado (KOKUSAN CHEMICAL Co., Ltd.) a la mezcla de reacción, que se agitó a la misma temperatura durante 6 horas. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [diclorometano/metanol]. Las fracciones que contenían el

producto deseado se concentraron a presión reducida y se les añadió éter dietílico para obtener una suspensión. El sólido obtenido se recogió por filtración para obtener el compuesto del título (4,99 g).

MS (ESI) m/z: 401 (M-H)⁻.

- 5 RMN de ¹H (DMSO-d₆) δ: 12,43 (1H, a), 8,27 (1H, d, J = 6,8 Hz), 7,92 (1H, t, J = 5,4 Hz), 7,79 (1H, d, J = 9,3 Hz), 6,99 (1H, t, J = 5,9 Hz), 4,19 (1H, t, J = 8,1 Hz), 4,13 (1H, m), 3,73 (2H, d, J = 5,4 Hz), 3,52 (2H, d, J = 5,9 Hz), 1,92 (1H, dd, m), 1,35 (9H, s), 1,24 (3H, d, J = 7,3 Hz), 0,85 (3H, d, J = 6,3 Hz), 0,79 (3H, d, J = 6,8 Hz).

(Etapa 2)

Trifluoroacetato de N-(azaniolilacetil)glicil-L-valil-L-alanina

- 10 Usando el compuesto obtenido en la etapa 1 anterior (1,00 g), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 1 del ejemplo 21 para proporcionar una forma bruta del compuesto del título (1,10 g).

MS (ESI) m/z: 301 (M-H)⁻.

RMN de ¹H (DMSO-d₆) δ: 12,49 (1H, a), 8,54 (1H, t, J = 5,6 Hz), 8,34 (1H, d, J = 6,8 Hz), 8,03 (1H, d, J = 9,3 Hz), 8,00 (3H, sa), 4,24 (1H, dd, J = 8,8, 6,8 Hz), 4,17 (1H, m), 3,93-3,84 (2H, m), 3,62-3,58 (2H, m), 1,96 (1H, m), 1,27 (3H, d, J = 7,3 Hz), 0,89 (3H, d, J = 6,8 Hz), 0,84 (3H, d, J = 6,8 Hz).

- 15 (Etapa 3)

N-[4-(11,12-Dideshidrodibenzo[b,f]azocin-5(6H)-il)-4-oxobutanoil]glicilglicil-L-valil-L-alanina

Usando el compuesto obtenido en la etapa 2 anterior (861 mg), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 2 del ejemplo 21 para obtener el compuesto del título (737 mg).

MS (ESI) m/z: 590 (M+H)⁺.

- 20 RMN de ¹H (DMSO-d₆) δ: 12,46 (1H, s), 8,28 (1H, t, J = 8,1 Hz), 8,18 (1H, t, J = 5,9 Hz), 8,13 (0,5H, t, J = 5,6 Hz), 8,04 (0,5H, t, J = 5,9 Hz), 7,99 (0,5H, t, J = 5,9 Hz), 7,73 (0,5H, d, J = 1,5 Hz), 7,67 (1H, m), 7,61 (1H, m), 7,53-7,44 (3H, m), 7,40-7,28 (3H, m), 5,03 (0,5H, d, J = 6,3 Hz), 5,00 (0,5H, d, J = 6,3 Hz), 4,21 (1H, dd, J = 9,0, 7,1 Hz), 4,18-4,08 (1H, m), 3,78-3,67 (2H, m), 3,65-3,55 (3H, m), 2,72-2,59 (1H, m), 2,28 (1H, d, J = 7,8 Hz), 2,09-2,03 (1H, m), 1,99-1,91 (1H, m), 1,79 (1H, m), 1,25 (1,5H, d, J = 5,4 Hz), 1,24 (1,5H, d, J = 5,4 Hz), 0,87 (3H, d, J = 6,8 Hz), 0,82-0,79 (3H, m).

- 25 (Etapa 4)

N-[4-(11,12-Dideshidrodibenzo[b,f]azocin-5(6H)-il)-4-oxobutanoil]glicilglicil-L-valil-L-alaninato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo

Usando el compuesto obtenido en la etapa 3 anterior (260 mg), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 3 del ejemplo 21 para obtener el compuesto del título (84 mg).

- 30 MS (ESI) m/z: 687 (M+H)⁺.

- 35 RMN de ¹H (DMSO-d₆) δ: 8,73 (1H, t, J = 7,0 Hz), 8,18 (0,5H, t, J = 5,7 Hz), 8,12 (0,5H, t, J = 5,7 Hz), 8,04 (0,5H, t, J = 5,7 Hz), 7,98 (0,5H, t, J = 5,7 Hz), 7,84-7,60 (3H, m), 7,52-7,44 (3H, m), 7,40-7,28 (3H, m), 5,03 (0,5H, d, J = 6,0 Hz), 5,00 (0,5H, d, J = 6,0 Hz), 4,69-4,58 (1H, m), 4,22 (1H, t, J = 7,6 Hz), 3,80-3,54 (5H, m), 2,80 (4H, s), 2,73-2,59 (1H, m), 2,34-2,24 (1H, m), 2,11-2,02 (1H, m), 1,99-1,91 (1H, m), 1,79 (1H, m), 1,45 (1,5H, d, J = 3,6 Hz), 1,43 (1,5H, d, J = 3,6 Hz), 0,85 (3H, d, J = 6,7 Hz), 0,83-0,79 (3H, m).

(Etapa 5)

- 40 N-[4-(11,12-Dideshidrodibenzo[b,f]azocin-5(6H)-il)-4-oxobutanoil]glicilglicil-L-valil-N-[2-({6-amino-9-[(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-15,16-dihidroxi-2,10-dioxo-2,10-disulfuro-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-1][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidofosfacilotetradecin-7-il]-9H-purin-2-il}amino)etil]-L-alaninamida de bis(N,N-dietiletanaminio)

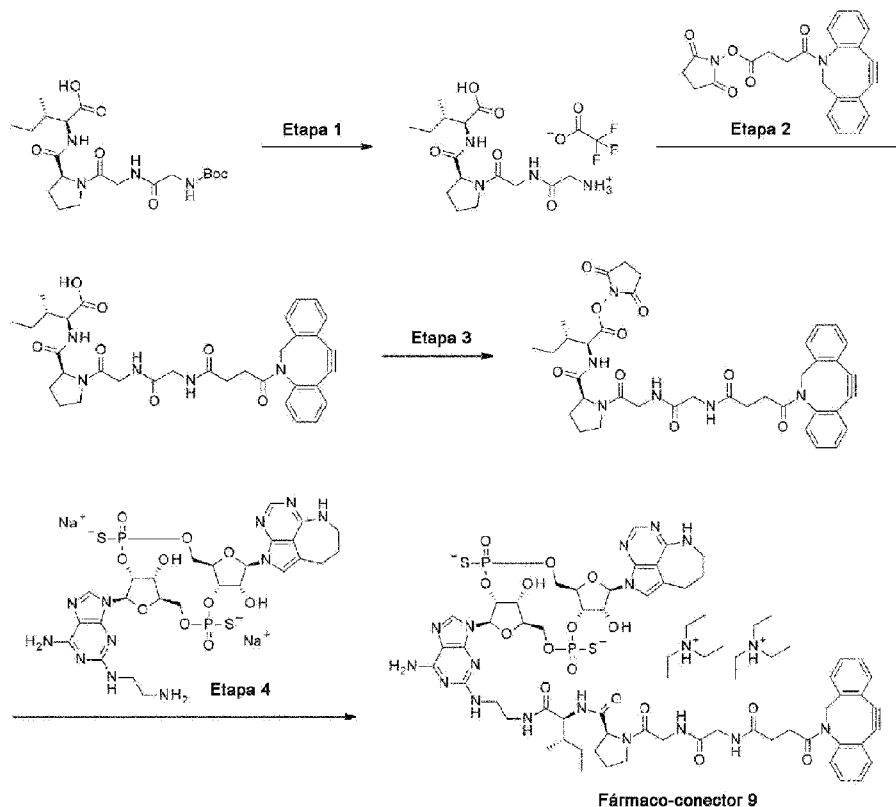
(Fármaco-conector 8)

- 45 Usando el compuesto obtenido en la etapa 8-2 del ejemplo 8 (5,3 mg) y el compuesto obtenido en la etapa 4 anterior (4,5 mg), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 1 del ejemplo 23, y el producto resultante se purificó después por HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 25 %-35 % (0 min-30 min)] para obtener el compuesto del título (5,1 mg). MS (ESI) m/z: 1359 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,37 (1H, sa), 8,02 (1H, s), 7,66-7,13 (9H, m), 6,33 (1H, d, J = 6,7 Hz), 6,13 (1H, d, J = 9,1 Hz), 5,49-5,42 (2H, m), 5,13-5,04 (1H, m), 4,83-4,80 (1H, m), 4,51-3,63 (14H, m), 3,51-3,37 (4H, m), 3,14 (12H, q, J = 7,3 Hz), 2,90-2,72 (5H, m), 2,36-1,96 (6H, m), 1,34-1,25 (21H, m), 0,98-0,86 (6H, m).

Ejemplo 69: Síntesis del fármaco-conector 9

[Esquema de síntesis]



(Etapa 1)

5 Trifluoroacetato de N-(azaniolilacetyl)glicil-L-prolil-L-isoleucina

Usando N-(terc-butoxicarbonil)glicilglicil-L-prolil-L-isoleucina (1,00 g) disponible en el mercado (Hangzhou Peptide Biochem Co., Ltd.), la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 1 del ejemplo 21 para proporcionar una forma bruta del compuesto del título (1,02 g).

MS (ESI) m/z: 343 (M+H)⁺.

- 10 RMN de ¹H (DMSO-d₆) δ: 12,61 (1H, s), 8,51 (0,7H, t, J = 5,1 Hz), 8,48 (0,3H, t, J = 4,9 Hz), 8,35 (0,3H, d, J = 8,8 Hz), 8,05 (0,7H, d, J = 8,3 Hz), 7,99 (3H, sa), 4,55 (0,3H, dd, J = 8,3, 2,4 Hz), 4,46 (0,7H, dd, J = 8,8, 2,9 Hz), 4,23 (0,3H, dd, J = 8,5, 5,6 Hz), 4,15 (0,7H, dd, J = 8,3, 5,9 Hz), 4,06 (0,7H, dd, J = 17,6, 5,4 Hz), 3,99-3,95 (1H, m), 3,63-3,36 (4,3H, m), 2,28-2,20 (0,3H, m), 2,07-2,00 (0,7H, m), 1,96-1,74 (4H, m), 1,46-1,36 (1H, m), 1,26-1,13 (1H, m), 0,89-0,83 (6H, m).

15 (Etapa 2)

N-[4-(11,12-Dideshidrodibenzo[b,f]azocin-5(6H)-il)-4-oxobutanoil]glicilglicil-L-prolil-L-isoleucina

Usando el compuesto obtenido en la etapa 1 anterior (1,02 g), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 2 del ejemplo 21 para obtener el compuesto del título (993 mg).

MS (ESI) m/z: 630 (M+H)⁺.

- 20 RMN de ¹H (DMSO-d₆) δ: 12,57 (1H, s), 8,30 (0,3H, dd, J = 8,5, 3,6 Hz), 8,14-8,06 (1H, m), 8,00 (0,7H, d, J = 7,9 Hz), 7,88-7,80 (1H, m), 7,70-7,66 (1H, m), 7,63-7,60 (1H, m), 7,53-7,27 (6H, m), 5,04 (0,7H, d, J = 14,5 Hz), 5,02 (0,3H, d, J = 14,5 Hz), 4,56 (0,3H, dd, J = 8,5, 2,4 Hz), 4,47-4,43 (0,7H, m), 4,20 (0,3H, dd, J = 8,2, 5,7 Hz), 4,12 (0,7H, m), 3,99-3,36 (7H, m), 2,68-2,58 (1H, m), 2,34-2,18 (1,3H, m), 2,09-1,74 (6,7H, m), 1,44-1,34 (1H, m), 1,25-1,12 (1H, m), 0,87-0,80 (6H, m).

25 (Etapa 3)

N-[4-(11,12-dideshidrodibenzo[b,f]azocin-5(6H)-il)-4-oxobutanoil]glicilglicil-L-prolil-L-isoleucinato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo

Usando el compuesto obtenido en la etapa 2 anterior (300 mg), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 3 del ejemplo 21 para obtener el compuesto del título (287 mg).

5 MS (ESI) m/z: 727 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (DMSO-d₆) δ: 8,77-8,67 (0,3H, m), 8,50 (0,5H, d, J = 8,3 Hz), 8,31 (0,2H, m), 8,10-8,04 (1H, m), 7,88-7,79 (1H, m), 7,68-7,57 (2H, m), 7,49-7,26 (6H, m), 5,01 (1H, d, J = 14,2 Hz), 4,80-4,42 (2H, m), 3,97-3,84 (1H, m), 3,79-3,34 (6H, m), 2,78 (4H, s), 2,64-2,57 (1H, m), 2,30-1,74 (8H, m), 1,56-1,17 (2H, m), 1,00-0,80 (6H, m).

(Etapa 4)

10 N-[4-(11,12-Dideshidrodibenzo[b,f]azocin-5(6H)-il)-4-oxobutanoil]glicilglicil-L-prolil-N-[2-({6-amino-9-[(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-15,16-dihidroxi-2,10-dioxo-2,10-disulfuro-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzoc[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-1][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciotetradecin-7-il]-9H-purin-2-il)amino)etil]-L-isoleucinamida de bis(N,N-dietiletanaminio)

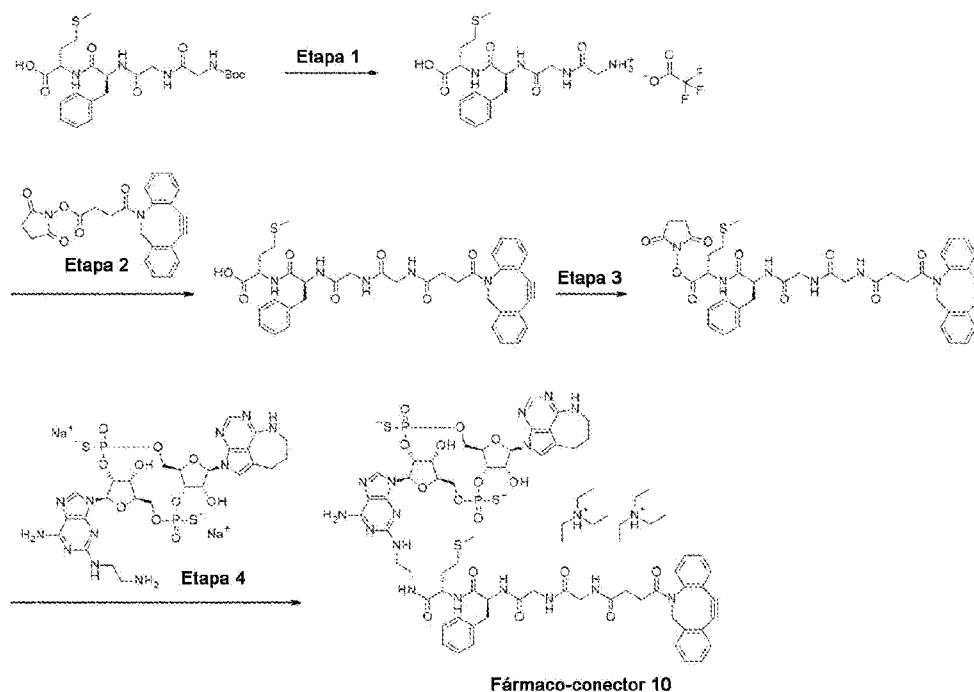
15 (Fármaco-conector 9)

Usando el compuesto obtenido en la etapa 8-2 del ejemplo 8 (51,8 mg) y el compuesto obtenido en la etapa 3 anterior (36,9 mg), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 1 del ejemplo 23, y el producto resultante se purificó después por HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 20 %-35 % (0 min-30 min)] para obtener el compuesto del título (62,5 mg).

20 MS (ESI) m/z: 1397 (M-H)⁻.

Ejemplo 70: Síntesis del fármaco-conector 10

[Esquema de síntesis]



(Etapa 1)

25 Trifluoroacetato de N-(azanioilacetil)glicil-L-fenilalanil-L-metionina

Usando N-(terc-butoxicarbonil)glicilglicil-L-fenilalanil-L-metionina (1,00 g) disponible en el mercado (Hangzhou Peptide Biochem Co., Ltd.), la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 1 del ejemplo 21 para proporcionar una forma bruta del compuesto del título (1,19 g).

MS (ESI) m/z: 411 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (DMSO-d₆) δ: 8,48 (1H, t, J = 5,4 Hz), 8,41 (1H, d, J = 7,8 Hz), 8,27 (1H, d, J = 8,3 Hz), 7,97 (3H, m), 7,28-7,18 (5H, m), 4,58 (1H, m), 4,32 (1H, m), 3,85 (1H, dd, J = 17,1, 5,9 Hz), 3,68 (1H, dd, J = 16,6, 5,4 Hz), 3,56 (2H, m), 3,04 (1H, dd, J = 13,9, 3,7 Hz), 2,74 (1H, dd, J = 13,7, 10,3 Hz), 2,47 (1H, m), 2,05 (3H, s), 2,00 (1H, m), 1,88 (1H, m), 1,48 (1H, d, J = 10,3 Hz) (sólo se muestran los picos observables)

(Etapa 2)

N-[4-(11,12-Dideshidrodibenzo[b,f]azocin-5(6H)-il)-4-oxobutanoil]glicilglicil-L-fenilalanil-L-metionina

Usando el compuesto obtenido en la etapa 1 anterior (1,03 g), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 2 del ejemplo 21 para obtener el compuesto del título (652 mg).

10 MS (ESI) m/z: 698 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (DMSO-d₆) δ: 12,67 (1H, sa), 8,28 (0,7H, d, J = 7,9 Hz), 8,25 (0,3H, d, J = 7,9 Hz), 8,17 (0,7H, t, J = 5,7 Hz), 8,10 (0,3H, t, J = 5,7 Hz), 8,04-7,93 (2H, m), 7,73-7,15 (13H, m), 5,00 (1H, d, J = 13,9 Hz), 4,56-4,49 (1H, m), 4,35-4,28 (1H, m), 3,74-3,49 (5H, m), 3,03 (1H, dd, J = 13,9, 3,6 Hz), 2,79-2,22 (5H, m), 2,11-1,76 (4H, m), 2,02 (2,1H, s), 2,02 (0,9H, s).

15 (Etapa 3)

N-[4-(11,12-Dideshidrodibenzo[b,f]azocin-5(6H)-il)-4-oxobutanoil]glicilglicil-L-fenilalanil-L-metioninato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo

Usando el compuesto obtenido en la etapa 2 anterior (201 mg), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 3 del ejemplo 21 para obtener el compuesto del título (95 mg).

20 MS (ESI) m/z: 795 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (DMSO-d₆) δ: 8,84-8,59 (1H, m), 8,17-7,96 (3H, m), 7,72-7,15 (13H, m), 5,01 (0,55H, d, J = 14,5 Hz), 5,00 (0,45H, d, J = 13,9 Hz), 4,86-4,74 (1H, m), 4,56-4,48 (1H, m), 3,75-3,50 (5H, m), 3,05-2,52 (6H, m), 2,82 (4H, sa), 2,33-1,73 (4H, m), 2,05 (3H, s).

(Etapa 4)

25 N-[4-(11,12-Dideshidrodibenzo[b,f]azocin-5(6H)-il)-4-oxobutanoil]glicilglicil-L-fenilalanil-N-[2-({6-amino-9-[(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-15,16-dihidroxi-2,10-dioxo-2,10-disulfuro-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-1][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfociclotetradecin-7-il]-9H-purin-2-il}amino)etil]-L-metioninamida de bis(N,N-dietiletanaminio)

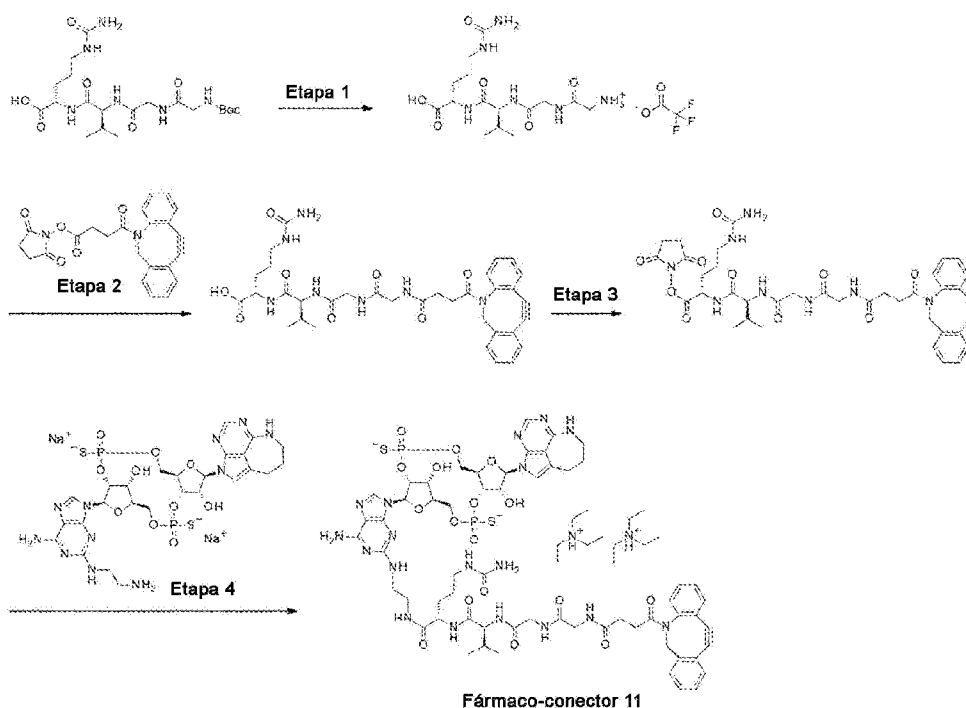
30 (Fármaco-conector 10)

Usando el compuesto obtenido en la etapa 8-2 del ejemplo 8 (6,0 mg) y el compuesto obtenido en la etapa 3 anterior (5,5 mg), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 1 del ejemplo 23, y el producto resultante se purificó después por HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 20 %-40 % (0 min-30 min)] para obtener el compuesto del título (2,0 mg). MS (ESI) m/z: 1467 (M+H)⁺.

35 RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,23 (1H, sa), 7,93 (1H, s), 7,54-7,07 (14H, m), 6,23 (1H, d, J = 6,7 Hz), 6,05-5,98 (1H, m), 5,41-5,31 (2H, m), 5,00-4,93 (1H, m), 4,73-4,69 (1H, m), 4,41-3,52 (14H, m), 3,44-2,62 (12H, m), 3,08 (12H, q, J = 7,3 Hz), 2,38-2,13 (3H, m), 2,02-1,80 (8H, m), 1,19 (18H, t, J = 7,3 Hz).

Ejemplo 71: Síntesis del fármaco-conector 11

[Esquema de síntesis]



(Etapa 1)

Trifluoroacetato de N-(azaniolilacetyl)glicil-L-valil-N⁵-carbamoil-L-ornitina

- 5 Usando N-(terc-butoxicarbonil)glicilglicil-L-valil-N⁵-carbamoil-L-ornitina disponible en el mercado (Hangzhou Peptide Biochem Co., Ltd.) (1,00 g), la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 1 del ejemplo 21 para proporcionar una forma bruta del compuesto del título (1,02 g).

MS (ESI) m/z: 389 (M+H)⁺.

- 10 RMN de ¹H (DMSO-d₆) δ: 12,52 (1H, sa), 8,55 (1H, t, J = 5,4 Hz), 8,29 (1H, d, J = 7,3 Hz), 8,03-7,96 (4H, m), 5,97 (1H, sa), 5,40 (1H, sa), 4,26 (1H, t, J = 7,8 Hz), 4,11 (1H, m), 3,93-3,85 (2H, m), 3,60 (2H, d, J = 5,9 Hz), 2,95 (2H, sa), 1,97 (1H, m), 1,69 (1H, m), 1,56 (1H, m), 1,39 (2H, m), 0,88 (3H, d, J = 6,8 Hz), 0,84 (3H, d, J = 6,8 Hz). (sólo se muestran los picos observables)

(Etapa 2)

N-[4-(11,12-Dideshidrodibenzo[b,f]azocin-5(6H)-il)-4-oxobutanoil]glicilglicil-L-valil-N⁵-carbamoil-L-ornitina

- 15 Usando el compuesto obtenido en la etapa 1 anterior (1,02 g), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 2 del ejemplo 21 para obtener el compuesto del título (795 mg).

MS (ESI) m/z: 676 (M+H)⁺.

- 20 RMN de ¹H (DMSO-d₆) δ: 12,49 (1H, s), 8,28-8,22 (1H, m), 8,18 (0,5H, t, J = 6,0 Hz), 8,13 (0,5H, t, J = 5,7 Hz), 8,06 (0,5H, t, J = 5,7 Hz), 8,01 (0,5H, t, J = 6,0 Hz), 7,75-7,71 (1H, m), 7,69-7,65 (1H, m), 7,62-7,59 (1H, m), 7,52-7,43 (3H, m), 7,40-7,28 (3H, m), 5,93 (1H, t, J = 5,7 Hz), 5,38 (2H, sa), 5,02 (0,5H, d, J = 13,9 Hz), 5,01 (0,5H, d, J = 13,9 Hz), 4,24 (1H, dd, J = 8,8, 7,0 Hz), 4,10 (1H, m), 3,79-3,54 (5H, m), 2,93 (2H, q, J = 6,4 Hz), 2,73-2,60 (1H, m), 2,29 (1H, m), 2,09-1,91 (2H, m), 1,79 (1H, m), 1,72-1,63 (1H, m), 1,60-1,50 (1H, m), 1,43-1,33 (2H, m), 0,86 (3H, d, J = 6,7 Hz), 0,81 (1,5H, d, J = 6,7 Hz), 0,80 (1,5H, d, J = 6,7 Hz).

(Etapa 3)

- 25 N-[4-(11,12-dideshidrodibenzo[b,f]azocin-5(6H)-il)-4-oxobutanoil]glicilglicil-L-valil-N⁵-carbamoil-L-ornitinato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo

Usando el compuesto obtenido en la etapa 2 anterior (300 mg), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 3 del ejemplo 21 para obtener el compuesto del título (177 mg).

MS (ESI) m/z: 773 (M+H)⁺.

RMN de ^1H (DMSO-d_6) δ : 8,75 (1H, t, J = 6,1 Hz), 8,20 (0,5H, t, J = 6,1 Hz), 8,15 (0,5H, t, J = 5,6 Hz), 8,06 (0,5H, t, J = 5,9 Hz), 8,02 (0,5H, t, J = 5,9 Hz), 7,83 (0,5H, d, J = 8,8 Hz), 7,77 (0,5H, d, J = 8,8 Hz), 7,72 (0,5H, d, J = 7,8 Hz), 7,67 (0,5H, d, J = 6,3 Hz), 7,62-7,59 (1H, m), 7,52-7,44 (3H, m), 7,39-7,29 (3H, m), 6,03 (1H, sa), 5,43 (2H, sa), 5,03 (0,5H, d, J = 13,7 Hz), 5,01 (0,5H, d, J = 14,2 Hz), 4,59-4,54 (1H, m), 4,25 (1H, m), 3,79-3,68 (5H, m), 2,97 (2H, q, J = 6,5 Hz), 2,80 (4H, s), 2,71-2,60 (1H, m), 2,28 (1H, m), 2,10-2,03 (1H, m), 2,00-1,93 (1H, m), 1,88-1,72 (3H, m), 1,54-1,49 (2H, m), 0,85 (3H, d, J = 5,4 Hz), 0,81 (1,5H, d, J = 4,9 Hz), 0,80 (1,5H, d, J = 6,8 Hz).

(Etapa 4)

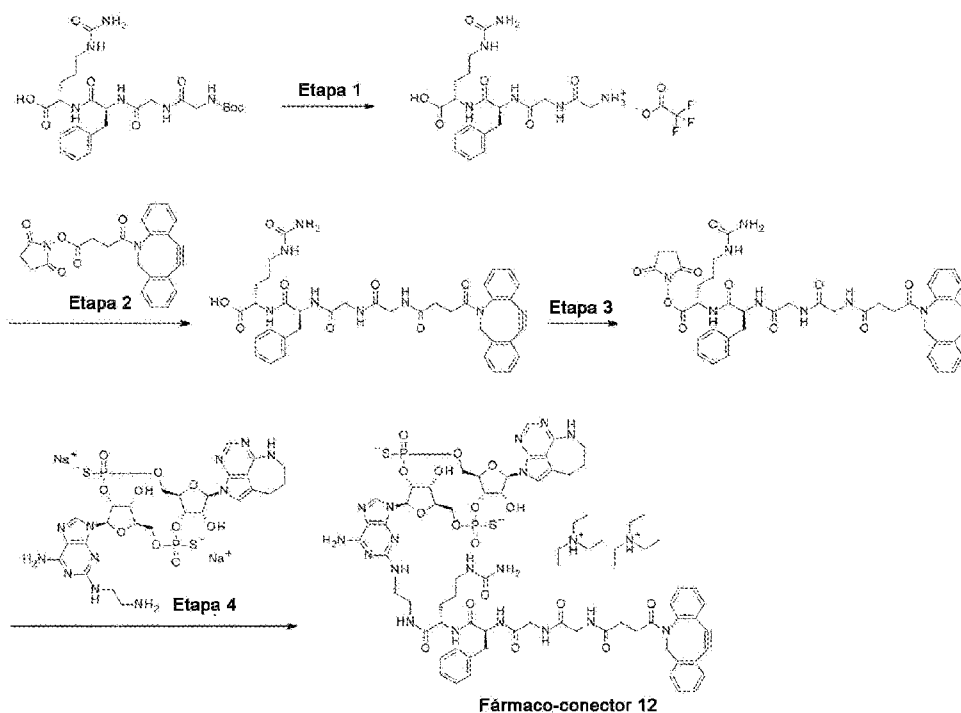
N-[4-(11,12-Dideshidrodibenzo[b,f]azocin-5(6H)-il)-4-oxobutanoil]glicilglicil-L-valil-N-[2-({6-amino-9-[(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-15,16-dihidroxi-2,10-dioxo-2,10-disulfuro-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2 λ^5 ,10 λ^5 -furo[3,2-1][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciotetradecin-7-il]-9H-purin-2-il}amino)etil]-N⁵-carbamoil-L-ornitinamida de bis(N,N-dietiletanaminio)

(Fármaco-conector 11)

Usando el compuesto obtenido en la etapa 8-2 del ejemplo 8 (5,0 mg) y el compuesto obtenido en la etapa 3 anterior (3,8 mg), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 1 del ejemplo 23, y el producto resultante se purificó después por HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 20 %-35 % (0 min-30 min)] para obtener el compuesto del título (3,0 mg). MS (ESI) m/z: 1443 (M-H).

Ejemplo 72: Síntesis del fármaco-conector 12

[Esquema de síntesis]



(Etapa 1)

Trifluoroacetato de N-(azaniolacetil)glicil-L-fenilalanil-N⁵-carbamoil-L-ornitina

Usando N-(terc-butoxicarbonil)glicilglicil-L-fenilalanil-N⁵-carbamoil-L-ornitina (1,00 g) disponible en el mercado (Hangzhou Peptide Biochem Co., Ltd.), la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 1 del ejemplo 21 para proporcionar una forma bruta del compuesto del título (1,05 g).

MS (ESI) m/z: 437 (M+H)⁺.

RMN de ^1H (DMSO-d_6) δ : 12,63 (1H, sa), 8,49 (1H, t, J = 5,4 Hz), 8,40 (1H, d, J = 7,8 Hz), 8,26 (1H, d, J = 8,3 Hz), 7,97 (3H, sa), 7,28-7,17 (5H, m), 6,00 (1H, sa), 5,41 (2H, sa), 4,60 (1H, m), 4,17 (1H, m), 3,85 (1H, dd, J = 16,6, 5,4 Hz), 3,67 (1H, dd, J = 16,6, 5,4 Hz), 3,56 (2H, d, J = 5,9 Hz), 3,03 (1H, dd, J = 13,9, 3,7 Hz), 2,96 (2H, sa), 2,73 (1H, dd, J = 13,9, 10,5 Hz), 1,73 (1H, m), 1,58 (1H, m), 1,40 (2H, m).

(Etapa 2)

N-[4-(11,12-Dideshidrodibenzo[b,f]azocin-5(6H)-il)-4-oxobutanoil]glicilglicil-L-fenilalanil-N⁵-carbamoil-L-ornitina

Usando el compuesto obtenido en la etapa 1 anterior (1,05 g), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 2 del ejemplo 21 para obtener el compuesto del título (550 mg).

5 MS (ESI) m/z: 724 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (DMSO-d₆) δ: 12,60 (1H, s), 8,29 (1H, t, J = 9,1 Hz), 8,17 (0,5H, t, J = 5,7 Hz), 8,10 (0,5H, t, J = 5,7 Hz), 8,04-7,94 (2H, m), 7,72-7,14 (13H, m), 5,94 (1H, a), 5,39 (2H, s), 5,01 (0,5H, d, J = 13,9 Hz), 5,00 (0,5H, d, J = 14,5 Hz), 4,56 (1H, m), 4,15 (1H, m), 3,74-3,49 (5H, m), 3,04-2,93 (3H, m), 2,77-2,58 (2H, m), 2,28 (1H, m), 2,05 (1H, m), 1,83-1,70 (2H, m), 1,62-1,52 (1H, m), 1,46-1,32 (2H, m).

10 (Etapa 3)

N-[4-(11,12-Dideshidrodibenzo[b,f]azocin-5(6H)-il)-4-oxobutanoil]glicilglicil-L-fenilalanil-N⁵-carbamoil-L-ornitinato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo

Usando el compuesto obtenido en la etapa 2 anterior (225 mg), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 3 del ejemplo 21 para obtener el compuesto del título (226 mg).

15 MS (ESI) m/z: 821 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (DMSO-d₆) δ: 8,80 (1H, t, J = 7,6 Hz), 8,19-7,96 (3H, m), 7,72-7,15 (13H, m), 6,03-5,89 (1H, a), 5,43 (2H, sa), 5,01 (0,5H, d, J = 14,0 Hz), 4,99 (0,5H, d, J = 14,0 Hz), 4,65-4,53 (2H, m), 3,74-3,50 (5H, m), 3,03-2,95 (3H, m), 2,81 (4H, s), 2,78-2,58 (2H, m), 2,28 (1H, m), 2,07 (1H, m), 1,91-1,73 (3H, m), 1,56-1,49 (2H, m).

(Etapa 4)

20 N-[4-(11,12-Dideshidrodibenzo[b,f]azocin-5(6H)-il)-4-oxobutanoil]glicilglicil-L-fenilalanil-N-[2-({6-amino-9-[(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-15,16-dihidroxi-2,10-dioxo-2,10-disulfuro-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzoc[d]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-1][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-7-il]-9H-purin-2-il}amino)etil]-N⁵-carbamoil-L-ornitinamida de Bis(N,N-dietiletanaminio)

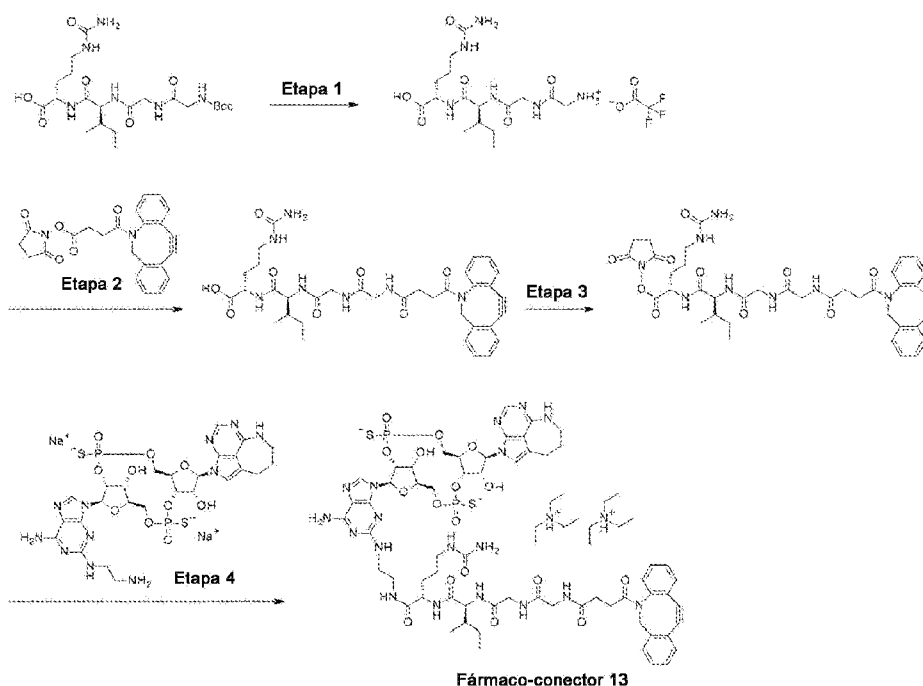
25 (Fármaco-conector 12)

Usando el compuesto obtenido en la etapa 8-2 del ejemplo 8 (5,1 mg) y el compuesto obtenido en la etapa 3 anterior (4,0 mg), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 1 del ejemplo 23, y el producto resultante se purificó después por HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 20 %-35 % (0 min-30 min)] para obtener el compuesto del título (4,6 mg). MS (ESI) m/z: 1493 (M+H)⁺.

30 RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,31 (1H, sa), 8,02 (1H, s), 7,62-7,14 (14H, m), 6,32 (1H, dd, J = 6,0 Hz), 6,11 (1H, da, J = 5,4 Hz), 5,55-5,41 (2H, m), 5,06 (1H, dd, J = 13,9, 11,5 Hz), 4,86-2,73 (28H, m), 3,19 (12H, q, J = 7,5 Hz), 2,39-2,16 (2H, m), 2,04-1,94 (3H, m), 1,84-1,74 (1H, m), 1,73-1,62 (1H, m), 1,51-1,37 (2H, m), 1,29 (18H, t, J = 7,3 Hz).

Ejemplo 73: Síntesis del fármaco-conector 13

[Esquema de síntesis]



(Etapa 1)

Trifluoroacetato de N-(azaniolacetil)glicil-L-isoleucil-N⁵-carbamoil-L-ornitina

- 5 Usando N-(terc-butoxicarbonil)glicilglicil-L-isoleucil-N⁵-carbamoil-L-ornitina disponible en el mercado (Hangzhou Peptide Biochem Co., Ltd.) (1,00 g), la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 1 del ejemplo 21 para proporcionar una forma bruta del compuesto del título (1,09 g).

MS (ESI) m/z: 403 (M+H)⁺.

- 10 RMN de ¹H (DMSO-d₆) δ: 8,54 (1H, t, J = 5,4 Hz), 8,30 (1H, d, J = 7,3 Hz), 8,03 (1H, d, J = 9,3 Hz), 7,99 (3H, sa), 5,99 (1H, sa), 4,27 (1H, t, J = 8,1 Hz), 4,11 (1H, m), 3,92-3,83 (2H, m), 3,60 (2H, m), 2,95 (2H, m), 1,71 (2H, m), 1,56 (1H, m), 1,48-1,33 (3H, m), 1,08 (1H, m), 0,86 (3H, d, J = 6,8 Hz), 0,81 (3H, t, J = 7,3 Hz) (sólo se muestran los picos observables)

(Etapa 2)

N-[4-(11,12-Dideshidrodibenzo[b,f]azocin-5(6H)-il)-4-oxobutanoil]glicilglicil-L-isoleucil-N⁵-carbamoil-L-ornitina

- 15 Usando el compuesto obtenido en la etapa 1 anterior (1,08 g), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 2 del ejemplo 21 para obtener el compuesto del título (524 mg).

MS (ESI) m/z: 690 (M+H)⁺.

- 20 RMN de ¹H (DMSO-d₆) δ: 12,47 (1H, sa), 8,25 (1H, t, J = 6,0 Hz), 8,17 (0,5H, t, J = 5,7 Hz), 8,12 (0,5H, t, J = 6,0 Hz), 8,04 (0,5H, t, J = 6,0 Hz), 7,99 (0,5H, t, J = 6,0 Hz), 7,76-7,66 (2H, m), 7,62-7,59 (1H, m), 7,52-7,29 (6H, m), 5,92 (1H, t, J = 5,4 Hz), 5,38 (2H, s), 5,02 (0,5H, d, J = 14,5 Hz), 5,01 (0,5H, d, J = 13,9 Hz), 4,25 (1H, t, J = 8,2 Hz), 4,09 (1H, m), 3,78-3,54 (5H, m), 2,93 (2H, q, J = 6,4 Hz), 2,73-2,59 (1H, m), 2,33-2,24 (1H, m), 2,10-2,02 (1H, m), 1,79 (1H, ddd, J = 16,6, 7,3, 5,7 Hz), 1,74-1,63 (2H, m), 1,60-1,50 (1H, m), 1,45-1,33 (3H, m), 1,09-1,00 (1H, m), 0,84 (3H, d, J = 6,7 Hz), 0,79 (1,5H, t, J = 6,7 Hz), 0,77 (1,5H, t, J = 7,0 Hz).

(Etapa 3)

- 25 N-[4-(11,12-Dideshidrodibenzo[b,f]azocin-5(6H)-il)-4-oxobutanoil]glicilglicil-L-isoleucil-N⁵-carbamoil-L-ornitinato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo

Usando el compuesto obtenido en la etapa 2 anterior (250 mg), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 3 del ejemplo 21 para obtener el compuesto del título (224 mg).

MS (ESI) m/z: 787 (M+H)⁺.

RMN de ^1H (DMSO-d_6) δ : 8,75 (1H, t, J = 6,4 Hz), 8,19 (0,5H, t, J = 5,8 Hz), 8,14 (0,5H, t, J = 5,8 Hz), 8,06 (0,5H, t, J = 5,8 Hz), 8,01 (0,5H, t, J = 5,8 Hz), 7,89-7,65 (2H, m), 7,63-7,58 (1H, m), 7,53-7,27 (6H, m), 5,96 (1H, m), 5,42 (2H, sa), 5,02 (0,5H, d, J = 14,0 Hz), 5,01 (0,5H, d, J = 14,0 Hz), 4,64-4,51 (1H, m), 4,26 (1H, t, J = 8,2 Hz), 3,79-3,55 (5H, m), 3,01-2,93 (2H, m), 2,80 (4H, sa), 2,73-2,58 (1H, m), 2,28 (1H, m), 2,12-2,02 (1H, m), 1,87-1,68 (4H, m), 1,54-1,38 (3H, m), 1,11-1,02 (1H, m), 0,83 (3H, d, J = 6,7 Hz), 0,78 (1,5H, t, J = 6,7 Hz), 0,76 (1,5H, t, J = 6,7 Hz).

(Etapa 4)

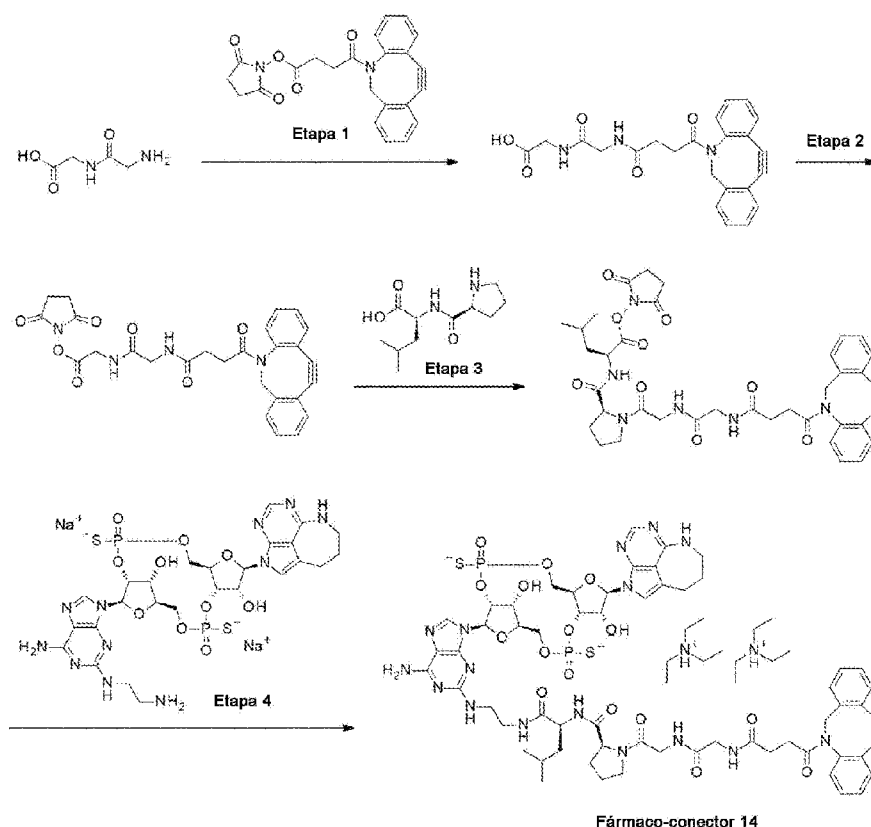
N-[4-(11,12-Dideshidrodibenzo[b,f]azocin-5(6H)-il)-4-oxobutanoil]glicilglicil-L-isoleucil-N-[2-({6-amino-9-[(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-15,16-dihidroxi-2,10-dioxo-2,10-disulfuro-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzoc[d]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2 λ^5 ,10 λ^5 -furo[3,2-1][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxadifosfacilotetradecin-7-il]-9H-purin-2-il]amino)etil]-N ^{5} -carbamoil-L-ornitinamida de bis(N,N-dietiletanaminio)

(Fármaco-conector 13)

Usando el compuesto obtenido en la etapa 8-2 del ejemplo 8 (5,4 mg) y el compuesto obtenido en la etapa 3 anterior (4,0 mg), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 1 del ejemplo 23, y el producto resultante se purificó después por HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 20 %-35 % (0 min-30 min)] para obtener el compuesto del título (4,7 mg). MS (ESI) m/z: 1457 (M-H) $^-$.

Ejemplo 74: Síntesis del fármaco-conector 14

[Esquema de síntesis]



20 (Etapa 1)

N-[4-(11,12-Dideshidrodibenzo[b,f]azocin-5(6H)-il)-4-oxobutanoil]glicilglicina

Usando glicilglicina (0,61 g) disponible en el mercado (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.), la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 2 del ejemplo 21 para obtener el compuesto del título (1,08 g).

MS (ESI) m/z: 420 (M+H) $^+$.

RMN de ^1H (DMSO- d_6) δ : 12,57 (1H, s), 8,12 (1H, t, J = 6,0 Hz), 8,07 (1H, t, J = 5,7 Hz), 7,69-7,67 (1H, m), 7,62-7,60 (1H, m), 7,52-7,29 (6H, m), 5,03 (1H, d, J = 13,9 Hz), 3,73 (2H, d, J = 6,0 Hz), 3,70-3,55 (3H, m), 2,64 (1H, m), 2,28 (1H, m), 2,06 (1H, ddd, J = 15,3, 7,7, 5,6 Hz), 1,79 (1H, ddd, J = 16,5, 7,4, 5,6 Hz).

(Etapa 2)

5 N-[4-(11,12-Dideshidrodibenzo[b,f]azocin-5(6H)-il)-4-oxobutanoil]glicilglicinato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo

Usando el compuesto obtenido en la etapa 1 anterior (1,07 g), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 3 del ejemplo 21 para obtener el compuesto del título (942 mg).

MS (ESI) m/z: 517 (M+H) $^+$.

10 RMN de ^1H (DMSO- d_6) δ : 8,40 (1H, t, J = 6,0 Hz), 8,19 (1H, t, J = 6,0 Hz), 7,69-7,67 (1H, m), 7,64-7,62 (1H, m), 7,53-7,29 (6H, m), 5,05 (1H, dd, J = 14,5 Hz), 4,26 (1H, dd, J = 18,1, 6,0 Hz), 4,19 (1H, dd, J = 18,1, 6,0 Hz), 3,72-3,59 (3H, m), 2,81 (4H, sa), 2,68-2,59 (1H, m), 2,33-2,24 (1H, m), 2,07 (1H, ddd, J = 15,4, 7,6, 5,7 Hz), 1,80 (1H, ddd, J = 16,3, 7,3, 5,4 Hz).

(Etapa 3)

15 N-[4-(11,12-Dideshidrodibenzo[b,f]azocin-5(6H)-il)-4-oxobutanoil]glicilglicil-L-prolil-L-leucinato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo

A una suspensión del compuesto obtenido en la etapa 2 anterior (250 mg) y L-prolil-L-leucina (166 mg) disponible en el mercado (KOKUSAN CHEMICAL Co., Ltd.) en N,N-dimetilformamida (5,0 ml) se le añadió N,N-diisopropiletilamina (0,25 ml), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2,5 horas. A continuación, se añadió L-prolil-L-leucina (833 mg) y la mezcla de reacción se agitó durante toda la noche. Tras concentrar la mezcla de reacción a presión reducida, se añadieron al residuo cloroformo (50 ml) y una solución acuosa al 10 % de ácido cítrico (10 ml), y el producto resultante se sometió a extracción con cloroformo. La capa orgánica se concentró a presión reducida y el residuo se purificó parcialmente mediante cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo/capa inferior de (cloroformo:metanol:agua = 7:3:1)]. A una solución del producto bruto en N,N-dimetilformamida (5,0 ml) se le añadieron N-hidroxisuccinimida (67 mg) y clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (111 mg), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 horas. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida, se añadieron cloroformo (40 ml) y agua (15 ml) al residuo, y el producto resultante se sometió a extracción con cloroformo. Tras secar la capa orgánica sobre sulfato de sodio anhidro, se eliminó el agente desecante por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo/metanol], [acetato de etilo/metanol] en este orden para obtener el compuesto del título (127 mg).

30 MS (ESI) m/z: 727 (M+H) $^+$.

RMN de ^1H (DMSO- d_6) δ : 8,85 (0,3H, m), 8,56 (0,5H, d, J = 7,3 Hz), 8,33 (0,2H, m), 8,09 (1H, m), 7,91-7,79 (1H, m), 7,70-7,28 (8H, m), 5,04 (0,7H, d, J = 14,5), 5,03 (0,3H, d, J = 13,9), 4,71-4,29 (2H, m), 4,01-3,30 (7H, m), 2,79 (4H, sa), 2,63 (1H, m), 2,33-1,64 (10H, m), 0,93-0,83 (6H, m).

(Etapa 4)

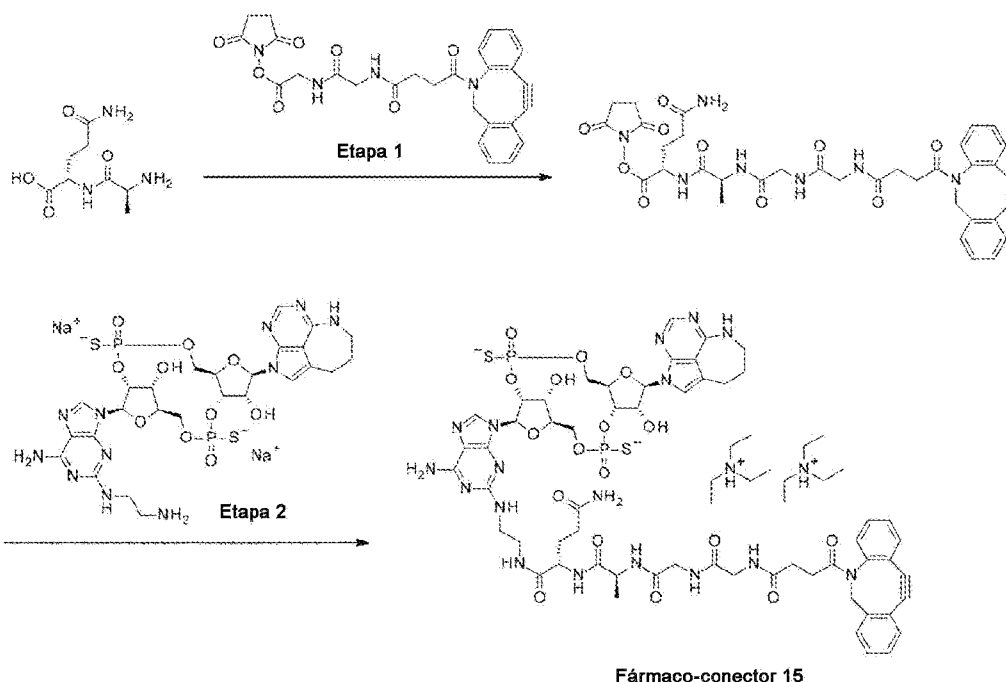
35 N-[4-(11,12-Dideshidrodibenzo[b,f]azocin-5(6H)-il)-4-oxobutanoil]glicilglicil-L-prolil-N-[2-({6-amino-9-[(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-15,16-dihidroxi-2,10-dioxo-2,10-disulfuro-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzoc[d]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2 λ^5 ,10 λ^5 -furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidofosfaciotetradecin-7-il]-9H-purin-2-il)amino)etil]-L-isoleucinamida de bis(N,N-dietiletanaminio)

40 (Fármaco-conector 14)

Usando el compuesto obtenido en la etapa 8-2 del ejemplo 8 (6,9 mg) y el compuesto obtenido en la etapa 3 anterior (4,7 mg), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 1 del ejemplo 23, y el producto resultante se purificó después por HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 20 %-40 % (0 min-30 min)] para obtener el compuesto del título (7,2 mg). MS (ESI) m/z: 1397 (M-H) $^-$.

45 Ejemplo 75: Síntesis del fármaco-conector 15

[Esquema de síntesis]



(Etapa 1)

N-[4-(11,12-Dideshidrodibenzo[b,f]azocin-5(6H)-il)-4-oxobutanoil]glicilglicil-L-alanil-L-glutaminato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo

- 5 Usando L-alanil-L-glutamina disponible en el mercado (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) (263 mg) y el compuesto obtenido en la etapa 2 del ejemplo 74 (250 mg), la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 3 del ejemplo 74 para obtener el compuesto del título (90 mg).

MS (ESI) m/z: 716 (M+H)⁺.

- 10 RMN de ¹H (DMSO-d₆) δ: 8,59 (0,8H, d, J = 7,3 Hz), 8,48 (0,2H, m), 8,20-7,92 (3H, m), 7,70-7,25 (9H, m), 6,85 (1H, sa), 5,02 (1H, d, J = 13,9 Hz), 4,62 (1H, m), 4,33 (1H, m), 3,75-3,56 (5H, m), 2,80 (4H, sa), 2,64 (1H, m), 2,33-2,21 (3H, m), 2,15-2,03 (2H, m), 1,99-1,87 (1H, m), 1,83-1,76 (1H, m), 1,24-1,17 (3H, m).

(Etapa 2)

- 15 N-[4-(11,12-Dideshidrodibenzo[b,f]azocin-5(6H)-il)-4-oxobutanoil]glicilglicil-L-alanil-N¹-[2-({6-amino-9-[(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-15,16-dihidroxi-2,10-dioxo-2,10-disulfuro-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidofosfaciotetradecin-7-il]-9H-purin-2-il}amino)etil]-L-glutamamida de bis(N,N-dietiletanaminio)

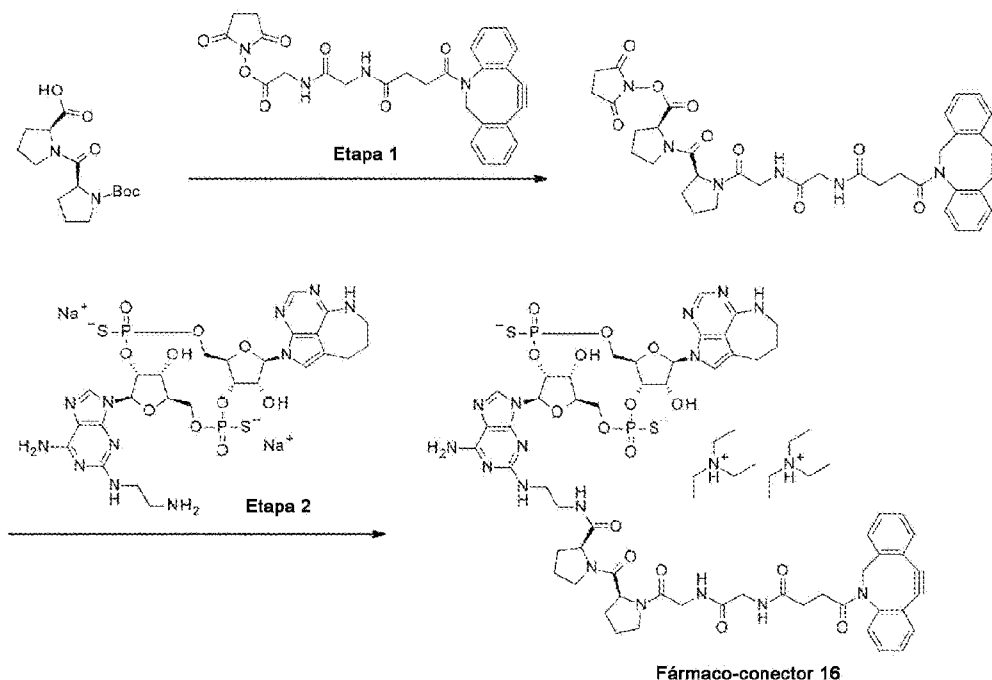
(Fármaco-conector 15)

- 20 Usando el compuesto obtenido en la etapa 8-2 del ejemplo 8 (6,9 mg) y el compuesto obtenido en la etapa 1 anterior (4,7 mg), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 1 del ejemplo 23, y el producto resultante se purificó después por HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 20 %-40 % (0 min-30 min)] para obtener el compuesto del título (3,9 mg). MS (ESI) m/z: 1388 (M+H)⁺.

- 25 RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,38-8,35 (1H, m), 8,02 (1H, s), 7,66-7,13 (9H, m), 6,33 (1H, d, J = 6,7 Hz), 6,14-6,10 (1H, m), 5,51-5,42 (2H, m), 5,14-5,06 (1H, m), 4,84-4,79 (1H, m), 4,53-3,64 (14H, m), 3,56-3,11 (6H, m), 3,15 (12H, q, J = 7,5 Hz), 2,92-2,69 (4H, m), 2,42-1,93 (8H, m), 1,45-1,24 (3H, m), 1,27 (18H, t, J = 7,3 Hz).

Ejemplo 76: Síntesis del fármaco-conector 16

[Esquema de síntesis]



(Etapa 1)

N-[4-(11,12-Dideshidrodibenzo[b,f]azocin-5(6H)-il)-4-oxobutanoil]glicilglicil-L-prolil-L-prolinato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo

- 5 Usando 1-(terc-butoxicarbonil)-L-prolil-L-prolina (777 mg) disponible en el mercado (Cool Pharm Ltd.), la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 1 del ejemplo 21 para proporcionar una forma bruta de trifluoroacetato de 1-[(2S)-pirrolidin-1-ilo-2-carbonil]-L-prolina. Utilizando este producto bruto y el compuesto obtenido en la etapa 2 del ejemplo 74 (428 mg), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 3 del ejemplo 74 para obtener el compuesto del título (238 mg).

- 10 MS (ESI) m/z: 711 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (DMSO-d₆) δ: 8,12-8,08 (1H, m), 7,90 (0,2H, s), 7,82 (0,8H, d, J = 4,8 Hz), 7,70-7,61 (2H, m), 7,52-7,29 (6H, m), 5,07-5,01 (1H, m), 4,88-4,86 (0,2H, m), 4,77-4,74 (0,2H, m), 4,69-4,62 (0,8H, m), 4,60-4,56 (0,8H, m), 4,02-3,38 (9H, m), 2,79 (4H, sa), 2,68-2,58 (1H, m), 2,37-2,24 (2H, m), 2,16-1,73 (9H, m).

(Etapa 2)

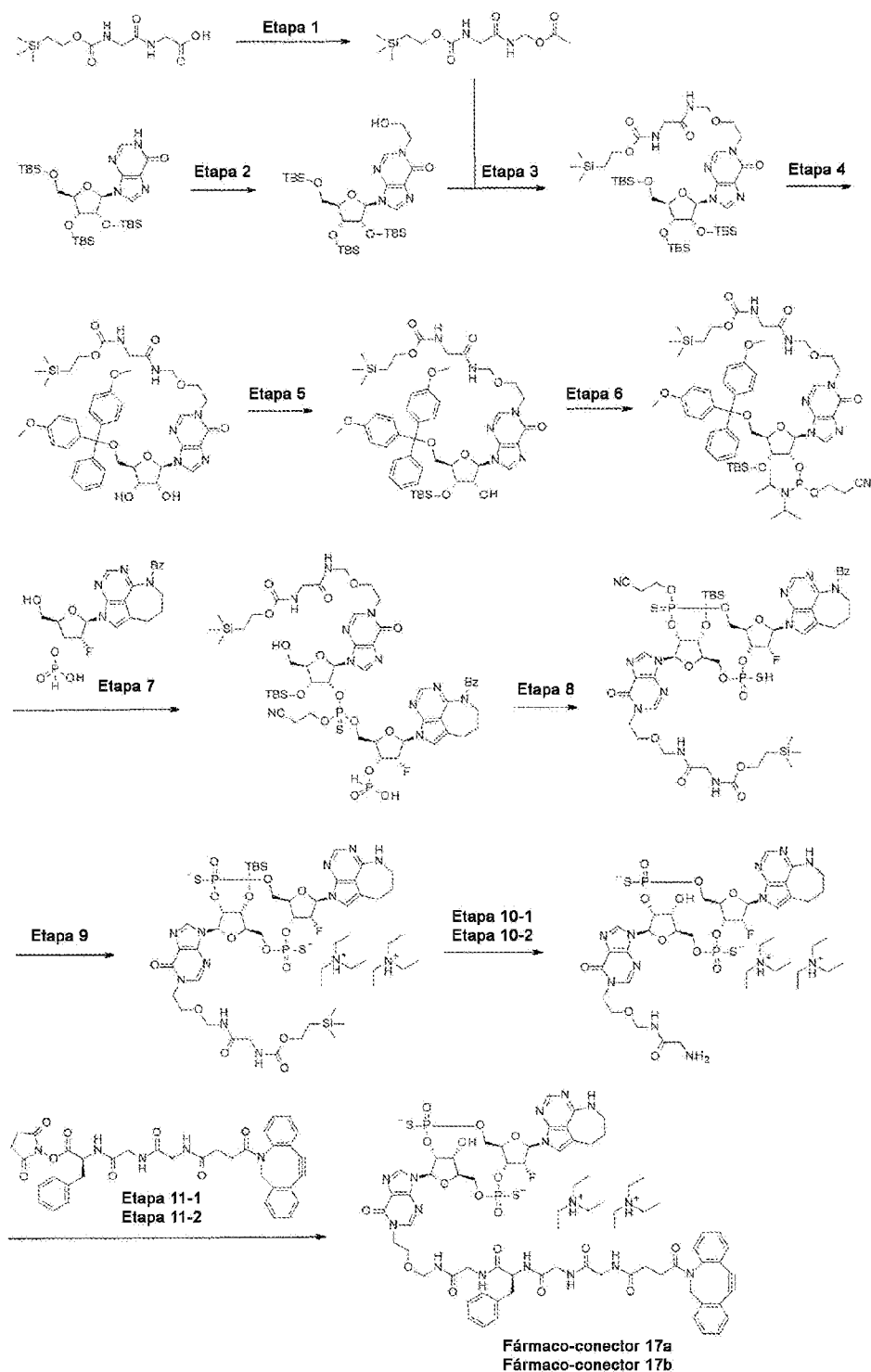
- 15 N-[4-(11,12-Dideshidrodibenzo[b,f]azocin-5(6H)-il)-4-oxobutanoil]glicilglicil-L-prolil-N-[2-({6-amino-9-[(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-15,16-dihidroxi-2,10-dioxo-2,10-disulfuro-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzoc[d]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-1][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-7-il]-9H-purin-2-il)amino)etil]-L-prolinamida de bis(N,N-dietiletanaminio)

- 20 (Fármaco-conector 16)

Usando el compuesto obtenido en la etapa 8-2 del ejemplo 8 (6,9 mg) y el compuesto obtenido en la etapa 1 anterior (4,6 mg), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 1 del ejemplo 23, y el producto resultante se purificó después por HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 20 %-40 % (0 min-30 min)] para obtener el compuesto del título (5,8 mg). MS (ESI) m/z: 1383 (M+H)⁺.

- 25 Ejemplo 77: Síntesis del fármaco-conector 17

[Esquema de síntesis]



(Etapa 1)

[(N-{[2-(Trimetilsilil)etoxi]carbonil}glicil)amino]acetato de metilo

5 Usando N-{[2-(trimetilsilil)etoxi]carbonil}glicilglicina disponible en el mercado (Sundia) (9,32 g), la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 1 del ejemplo 67 para obtener el compuesto del título (8,24 g). RMN de ^1H (CDCl_3) δ : 7,14 (1H, sa), 5,27 (2H, d, $J = 7,3$ Hz), 5,20 (1H, sa), 4,22-4,16 (2H, m), 3,88 (2H, d, $J = 6,0$ Hz), 2,08 (3H, s), 1,04-0,97 (2H, m), 0,05 (9H, s).

(Etapa 2)

2',3',5'-Tris-O-[terc-butil(dimetil)silil]-1-(2-hidroxietil)inosina

A una solución mixta de 2',3',5'-tris-O-[terc-butil(dimetil)silil]inosina (31,3 g) como compuesto conocido en la bibliografía (Chem. Pharm. Bull., 1987, 35(1), 72-79) en tetrahidrofurano (75 ml)-N,N-dimetilacetamida (75 ml) se le añadieron 2-bromoetanol (4,82 ml) y 1,8-diazabicyclo[5.4.0]-7-undeceno (7,65 ml), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 23 horas. Se añadieron agua y acetato de etilo a la mezcla de reacción, que se sometió a extracción con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se eliminó el agente desecante por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo] para obtener el compuesto del título (29,4 g). MS (ESI) m/z: 655 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 8,16 (1H, s), 7,99 (1H, d, J = 2,4 Hz), 5,97 (1H, d, J = 4,2 Hz), 4,40-4,25 (3H, m), 4,18-4,06 (3H, m), 4,03-3,92 (2H, m), 3,79 (1H, dd, J = 11,5, 2,4 Hz), 3,08-2,83 (1H, ma), 0,96 (9H, s), 0,92 (9H, s), 0,82 (9H, s), 0,15 (3H, s), 0,14 (3H, s), 0,09 (3H, s), 0,08 (3H, s), -0,02 (3H, s), -0,15 (3H, s).

(Etapa 3)

2',3',5'-Tris-O-[terc-butil(dimetil)silil]-1-(2-[(N-[2-(trimetilsilil)etoxi]carbonil)glicil]amino]metoxi)etil)inosina

A una disolución del compuesto obtenido en la etapa 2 anterior (15,6 g) en tolueno (46,8 ml) se le añadió el compuesto obtenido en la etapa 1 anterior (10,4 g) y piridina (9,63 ml), y la mezcla de reacción se agitó a 110 °C durante 12 horas. El compuesto obtenido en la etapa 1 anterior (3,46 g) se añadió de nuevo a la mezcla de reacción, que se agitó a 110 °C durante 1 día. Se añadieron una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio y diclorometano a la mezcla de reacción, que se sometió a extracción con diclorometano. Tras secar la capa orgánica sobre sulfato de sodio anhidro, se eliminó el agente desecante por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo] para obtener el compuesto del título (20,6 g: con impurezas).

MS (ESI) m/z: 885 (M+H)⁺.

(Etapa 4)

5'-O-[Bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-1-(2-[(N-[2-(trimetilsilil)etoxi]carbonil)glicil]amino]metoxi)etil)inosina

A una solución del compuesto obtenido en la etapa 3 anterior (20,6 g) en tetrahidrofurano (50 ml) se le añadió trifluorhidrato de trietilamina (10 ml), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 17 horas. A la mezcla de reacción se le añadió lentamente una mezcla de una solución 1 M de hidrogenocarbonato de trietilamonio (50 ml) y trietilamina (10 ml) con refrigeración por hielo, y la mezcla de reacción se concentró a presión reducida. El residuo se purificó parcialmente mediante cromatografía en columna de gel de sílice C18 [agua/acetonitrilo] y, a continuación, se liofilizó. La forma bruta obtenida se destiló azeotrópicamente con piridina, y se añadió cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (4,73 g) a una solución del residuo en piridina (50 ml) a 0 °C, y la mezcla de reacción se agitó a 4 °C durante 17 horas. Se añadió metanol (2 ml) a la mezcla de reacción, que se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos, y después se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano/acetato de etilo/metanol/trietilamina al 0,1 %] para obtener el compuesto del título (9,18 g: con impurezas).

MS (ESI) m/z: 845 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 7,94 (1H, s), 7,88 (1H, s), 7,65 (1H, sa), 7,41-7,36 (2H, m), 7,32-7,15 (7H, m), 6,83-6,76 (4H, m), 5,96 (1H, d, J = 6,1 Hz), 5,73-5,65 (2H, m), 4,87-4,80 (1H, m), 4,76-4,61 (2H, m), 4,44-4,39 (1H, m), 4,35-4,30 (1H, m), 4,22-4,05 (4H, m), 3,83-3,73 (2H, m), 3,77 (6H, s), 3,72-3,67 (2H, m), 3,48-3,32 (3H, m), 0,99-0,91 (2H, m), 0,02 (9H, s).

(Etapa 5)

5'-O-[Bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-3'-O-[terc-butil(dimetil)silil]-1-(2-[(N-[2-(trimetilsilil)etoxi]carbonil)glicil]amino]metoxietil)etil)inosina

Usando el compuesto obtenido en la etapa 4 anterior (5,96 g), la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 3 del ejemplo 5 para obtener el compuesto del título (2,33 g) y 5'-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-2'-O-[terc-butil(dimetil)silil]-1-(2-[(N-[2-(trimetilsilil)etoxi]carbonil)glicil]amino]metoxietil)etil)inosina (2,45 g) en forma de un regioisómero del compuesto del título.

MS (ESI) m/z: 959 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 7,99 (1H, s), 7,93 (1H, s), 7,45-7,39 (2H, m), 7,35-7,18 (7H, m), 7,05 (1H, sa), 6,84-6,77 (4H, m), 5,92 (1H, d, J = 5,4 Hz), 5,46 (1H, sa), 4,71-4,61 (3H, m), 4,54-4,51 (1H, m), 4,22-4,10 (5H, m), 3,81-3,76 (2H, m), 3,78 (3H, s), 3,78 (3H, s), 3,74 (2H, d, J = 6,0 Hz), 3,48 (1H, dd, J = 10,9, 4,2 Hz), 3,26 (1H, dd, J = 10,9, 4,2 Hz), 3,16 (1H, dd, J = 6,7 Hz), 1,00-0,93 (2H, m), 0,89 (9H, s), 0,09 (3H, s), 0,02 (9H, s), 0,02 (3H, s).

Regioisómero (forma 2'-O-TBS)

MS (ESI) m/z: 959 (M+H)⁺.

5 RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 7,99 (1H, s), 7,91 (1H, s), 7,48-7,42 (2H, m), 7,37-7,18 (8H, m), 6,85-6,78 (4H, m), 5,96 (1H, d, J = 5,4 Hz), 5,63 (1H, sa), 4,88 (1H, t, J = 5,1 Hz), 4,66 (2H, d, J = 6,7 Hz), 4,36-4,32 (1H, m), 4,27-4,19 (2H, m), 4,18-4,10 (3H, m), 3,81-3,74 (4H, m), 3,78 (3H, s), 3,78 (3H, s), 3,50 (1H, dd, J = 10,9, 3,6 Hz), 3,38 (1H, dd, J = 10,9, 3,6 Hz), 2,73 (1H, dd, J = 4,2 Hz), 0,97-0,90 (2H, m), 0,86 (9H, s), 0,02 (3H, s), 0,01 (9H, s), -0,09 (3H, s).

(Etapa 6)

5'-O-[Bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-3'-O-[terc-butil(dimetil)silil]-2'-O-[(2-cianoetoxi)[di(propan-2-il)amino]fosfanil]-1-(2-[[N-[[2-(trimetilsilil)etoxi]carbonil]glicil]amino]metoxi)etil)inosina

10 Usando el compuesto obtenido en la etapa 5 anterior (2,33 g), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 4 del ejemplo 5 para obtener el compuesto del título (2,72 g) en forma de una mezcla de diastereómeros en el átomo de fósforo (proporción de diastereómeros = 6:4).

MS (ESI) m/z: 1159 (M+H)⁺.

15 RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 8,03 (0,4H, s), 8,02 (0,6H, s), 7,95 (0,6H, s), 7,92 (0,4H, s), 7,46-7,40 (2H, m), 7,35-7,17 (7H, m), 6,88 (1H, sa), 6,84-6,78 (4H, m), 6,15 (0,6H, d, J = 4,2 Hz), 6,10 (0,4H, d, J = 4,8 Hz), 5,34 (1H, sa), 4,86-4,61 (3H, m), 4,48-4,42 (1H, m), 4,29-4,09 (5H, m), 3,83-3,44 (9H, m), 3,79 (3H, s), 3,78 (3H, s), 3,32-3,23 (1H, m), 2,58-2,49 (1H, m), 2,44-2,38 (1H, m), 1,15 (3,6H, d, J = 6,7 Hz), 1,11 (6H, d, J = 6,7 Hz), 1,04-0,92 (2H, m), 0,97 (2,4H, d, J = 6,7 Hz), 0,85 (3,6H, s), 0,84 (5,4H, s), 0,09 (1,2H, s), 0,06 (1,8H, s), 0,03 (9H, s), 0,00 (3H, s).

(Etapa 7)

20 Usando el compuesto obtenido en la etapa 8 del ejemplo 44 (2,15 g), la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 7 del ejemplo 1 para proporcionar una solución en acetonitrilo de 6-benzoil-2-{2-desoxi-2-fluoro-3-O-[hidroxi(oxo)-λ⁵-fosfanil]-β-D-ribofuranosil}-6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzoc[d]azuleno. Utilizando la solución en acetonitrilo obtenida y el compuesto obtenido en la etapa 6 anterior (2,72 g), se llevó a cabo la reacción de la misma manera que en la etapa 8 del ejemplo 1, y el producto bruto resultante se utilizó directamente para la

25 reacción posterior.

(Etapa 8)

30 (2-[[[2-{9-[(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-14-(6-Benzoil-6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzoc[d]azulen-2-il)-16-[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-10-(2-cianoetoxi)-15-fluoro-2-oxo-2-sulfanil-10-sulfanilidenooctahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxadifosfacilotetradecin-7-il]-6-oxo-6,9-dihidro-1H-purin-1-il]etoxi)metil]amino]-2-oxoetil]carbamato de 2-(trimetilsilil)etilo

Usando el producto bruto obtenido en la etapa 7 anterior, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 9 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (1,47 g: con impurezas) en forma de una mezcla de diastereómeros en el átomo de fósforo. MS (ESI) m/z: 1278 (M+H)⁺.

(Etapa 9)

35 (5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-16-[[Terc-butil(dimetil)silil]oxi]-15-fluoro-2,10-dioxo-7-[6-oxo-1-(2-[[[2-(trimetilsilil)etoxi]carbonil]glicil]amino]methoxi)etil]-1,6-dihidro-9H-purin-9-il]-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzoc[d]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxadifosfacilotetradecin-2,10-bis(tiolato) de bis(N,N-dietiletanaminio)

40 A una solución mixta del compuesto obtenido en la etapa 8 anterior (1,47 g) en metanol (10 ml)-tetrahidrofurano (10 ml) se le añadió amoniaco líquido al 28 % (10 ml), y la mezcla de reacción se agitó a 50 °C durante 6 horas. Tras concentrar la mezcla de reacción a presión reducida, el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo] para obtener el diastereómero 1 (204 mg: con impurezas) y el diastereómero 2 (205 mg: con impurezas) del compuesto del título.

Diastereómero 1 (menos polar)

45 MS (ESI) m/z: 1121 (M+H)⁺.

Diastereómero 2 (más polar)

MS (ESI) m/z: 1121 (M+H)⁺.

(Etapa 10-1)

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-15-fluoro-7-(1-{2-[(glicilamino)metoxi]etil}-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il)-16-hidroxi-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd)azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) de bis(N,N-dietiletanaminio)

- 5 Usando el compuesto obtenido en la etapa 9 anterior (diastereómero 1) (204 mg), la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 9-1 del ejemplo 11, y el producto resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo] y HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/solución de acetonitrilo-metanol (1:1), solución de acetonitrilo-metanol (1:1): del 10 %-50 % (0 min-40 min)] para obtener el compuesto del título (40,7 mg: con impurezas).

MS (ESI) m/z: 863 (M+H)⁺.

10 (Etapa 10-2)

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-15-Fluoro-7-(1-{2-[(glicilamino)metoxi]etil}-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il)-16-hidroxi-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd)azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2,10-bis(tiolato) de bis(N,N-dietiletanaminio)

- 15 Usando el compuesto obtenido en la etapa 9 anterior (diastereómero 2) (205 mg), la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 9-1 del ejemplo 11, y el producto resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo] y HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/solución de acetonitrilo-metanol (1:1), solución de acetonitrilo-metanol (1:1): del 10 %-50 % (0 min-40 min)] para obtener el compuesto del título (50,8 mg: con impurezas).

MS (ESI) m/z: 863 (M+H)⁺.

20 (Etapa 11-1)

N-[4-(11,12-Dideshidrodibenzo[b,f]azocin-5(6H)-il)-4-oxobutanoil]glicilglicil-L-fenilalanil-N-[(2-{9-[(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-15-fluoro-16-hidroxi-2,10-dioxo-2,10-disulfuro-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd)azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-7-il]-6-oxo-6,9-dihidro-1H-purin-1-il}etoxi)metil]glicinamida de bis(N,N-dietiletanaminio)

(Fármaco-conector 17a: diastereómero 1)

- 30 Usando el compuesto obtenido en la etapa 10-1 anterior (40,7 mg), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 9-1 del ejemplo 22, y el producto resultante se purificó a continuación mediante cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo], HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 20 %-45 % (0 min-40 min)], y HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/metanol, metanol: del 40 %-90 % (0 min-40 min)] para obtener el compuesto del título (25,1 mg).

MS (ESI) m/z: 1411 (M+H)⁺.

- 35 RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,58 (1H, s), 8,09 (1H, s), 8,04 (1H, s), 7,57-7,49 (2H, m), 7,43-7,34 (3H, m), 7,32-7,08 (9H, m), 6,47 (1H, d, J = 16,9 Hz), 6,23 (1H, d, J = 7,9 Hz), 5,56-5,37 (2H, m), 5,31-5,17 (1H, m), 5,03 (1H, d, J = 13,9 Hz), 4,79 (1H, d, J = 4,2 Hz), 4,64-4,38 (6H, m), 4,36-4,21 (4H, m), 4,05-3,60 (10H, m), 3,53-3,42 (3H, m), 3,18 (12H, q, J = 7,3 Hz), 3,01-2,92 (1H, m), 2,86-2,73 (1H, m), 2,70-2,54 (2H, m), 2,37-2,16 (2H, m), 2,06-1,77 (3H, m), 1,28 (18H, t, J = 7,3 Hz).

(Etapa 11-2)

- 40 N-[4-(11,12-Dideshidrodibenzo[b,f]azocin-5(6H)-il)-4-oxobutanoil]glicilglicil-L-fenilalanil-N-[(2-{9-[(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-15-fluoro-16-hidroxi-2,10-dioxo-2,10-disulfuro-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd)azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-7-il]-6-oxo-6,9-dihidro-1H-purin-1-il}etoxi)metil]glicinamida de bis(N,N-dietiletanaminio)

45 (Fármaco-conector 17b: diastereómero 2)

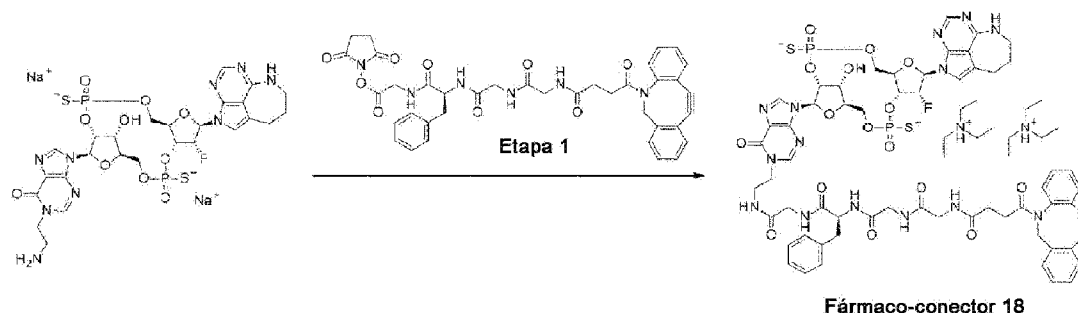
- 50 Usando el compuesto obtenido en la etapa 10-2 anterior (50,8 mg), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 9-1 del ejemplo 22, y el producto resultante se purificó a continuación mediante cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo], HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 25 %-45 % (0 min-40 min)], y HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/metanol, metanol: del 45 %-90 % (0 min-40 min)] para obtener el compuesto del título (23,4 mg).

MS (ESI) m/z: 1411 (M+H)⁺.

RMN de ^1H (CD_3OD) δ : 8,67 (1H, s), 8,14 (1H, s), 8,02 (1H, s), 7,67-7,50 (2H, m), 7,43-7,36 (3H, m), 7,34-7,12 (9H, m), 6,48 (1H, d, $J = 15,1$ Hz), 6,26 (1H, t, $J = 8,8$ Hz), 5,60-5,31 (3H, m), 5,09-5,00 (1H, m), 4,61-4,22 (9H, m), 4,11-3,59 (13H, m), 3,50-3,44 (2H, m), 3,18 (12H, q, $J = 7,3$ Hz), 3,04-2,93 (1H, m), 2,87-2,74 (3H, m), 2,39-2,22 (2H, m), 2,06-1,85 (3H, m), 1,28 (18H, t, $J = 7,3$ Hz).

5 Ejemplo 78: Síntesis del fármaco-conector 18

[Esquema de síntesis]



(Etapa 1)

- 10 N-[4-(11,12-Dideshidrodibenzo[b,f]azocin-5(6H)-il)-4-oxobutanoil]glicilglicil-L-fenilalanil-N-(2-{9-[(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-15-fluoro-16-hidroxi-2,10-dioxo-2,10-disulfuro-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzoc[d]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2 λ^5 ,10 λ^5 -furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfacilotetradecin-7-il]-6-oxo-6,9-dihidro-1H-purin-1-il}etil)glicinamida de bis(N,N-dietiletanaminio)

(Fármaco-conector 18)

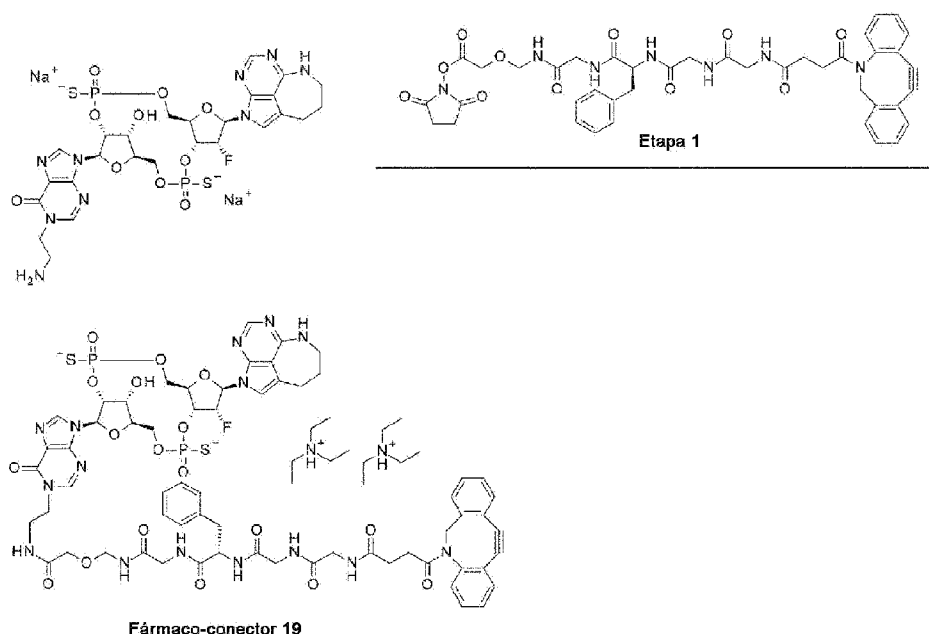
- 15 Usando el compuesto obtenido en la etapa 7-2 del ejemplo 45 (10,0 mg) y el compuesto obtenido en la etapa 3 del ejemplo 21 (8,8 mg), la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 4 del ejemplo 21, y el producto resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo], HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 25 %-50 % (0 min-40 min)], y HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/metanol, metanol: del 45 %-90 % (0 min-40 min)] para obtener el compuesto del título (10,9 mg).

MS (ESI) m/z : 1381 ($M+H$) $^+$.

- 25 RMN de ^1H (CD_3OD) δ : 8,61 (1H, s), 8,03 (1H, s), 8,02 (1H, s), 7,64-7,49 (2H, m), 7,44-7,37 (3H, m), 7,35-7,11 (9H, m), 6,48 (1H, dd, $J = 15,1, 1,8$ Hz), 6,24 (1H, dd, $J = 8,5$ Hz), 5,62-5,39 (3H, m), 5,03 (1H, dd, $J = 18,4, 14,2$ Hz), 4,55-4,37 (5H, m), 4,29-4,18 (2H, m), 4,04-3,91 (3H, m), 3,87-3,52 (8H, m), 3,50-3,41 (3H, m), 3,19 (12H, q, $J = 7,3$ Hz), 3,18-3,10 (1H, m), 3,02-2,92 (1H, m), 2,86-2,66 (3H, m), 2,40-2,21 (2H, m), 2,06-1,84 (3H, m), 1,29 (18H, t, $J = 7,3$ Hz).

Ejemplo 79: Síntesis del fármaco-conector 19

[Esquema de síntesis]



(Etapa 1)

- 5 N-[4-(11,12-Dideshidrodibenzo[b,f]azocin-5(6H)-il)-4-oxobutanoil]glicilglicil-L-fenilalanil-N-({2-[(2-{9-[(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-15-fluoro-16-hidroxi-2,10-dioxo-2,10-disulfuro-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-I][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciotetradecin-7-il]-6-oxo-6,9-dihidro-1H-purin-1-il}etil)amino]-2-oxoetoxi)metil)glicinamida de bis(N,N-dietiletanaminio)

(Fármaco-conector 19)

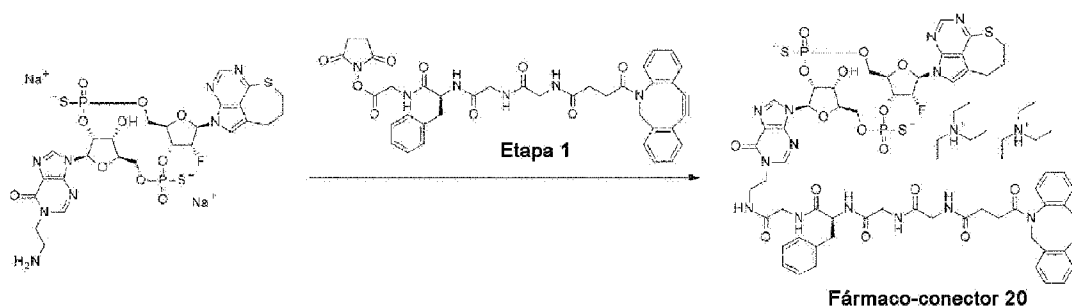
- 10 Usando el compuesto obtenido en la etapa 7-2 del ejemplo 45 (20,0 mg) y el compuesto obtenido en la etapa 1 del ejemplo 66 (19,8 mg), la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 4 del ejemplo 21, y el producto resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo], HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 20 %-45 % (0 min-40 min)], y HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/metanol, metanol: del 30 %-80 % (0 min-40 min)] para obtener el compuesto del título (22,1 mg).

- 15 MS (ESI) m/z: 1468 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,66 (1H, sa), 8,10 (1H, sa), 8,04-7,96 (1H, m), 7,66-7,35 (5H, m), 7,33-7,12 (9H, m), 6,52-6,41 (1H, m), 6,28-6,22 (1H, m), 5,64-5,31 (3H, m), 5,07-4,99 (1H, m), 4,70-4,20 (9H, m), 4,11-3,51 (14H, m), 3,50-3,30 (3H, m), 3,27-3,10 (1H, m), 3,19 (12H, q, J = 7,3 Hz), 3,07-2,93 (1H, m), 2,89-2,65 (3H, m), 2,41-2,18 (2H, m), 2,05-1,82 (2H, m), 1,29 (18H, t, J = 7,3 Hz).

- 20 Ejemplo 80: Síntesis del fármaco-conector 20

[Esquema de síntesis]



(Etapa 1)

N-[4-(11,12-Dideshidrodibenzo[b,f]azocin-5(6H)-il)-4-oxobutanoil]glicilglicil-L-fenilalanil-N-(2-{9-[(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-14-(8,9-dihidro-6-tia-2,3,5-triazabenz[cd]azulen-2(7H)-il)-15-fluoro-16-hidroxi-2,10-dioxo-2,10-disulfurooctahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciotetradecin-7-il]-6-oxo-6,9-dihidro-1H-purin-1-il}etil)glicinamida de bis(N,N-dietiletanaminio)

(Fármaco-conector 20)

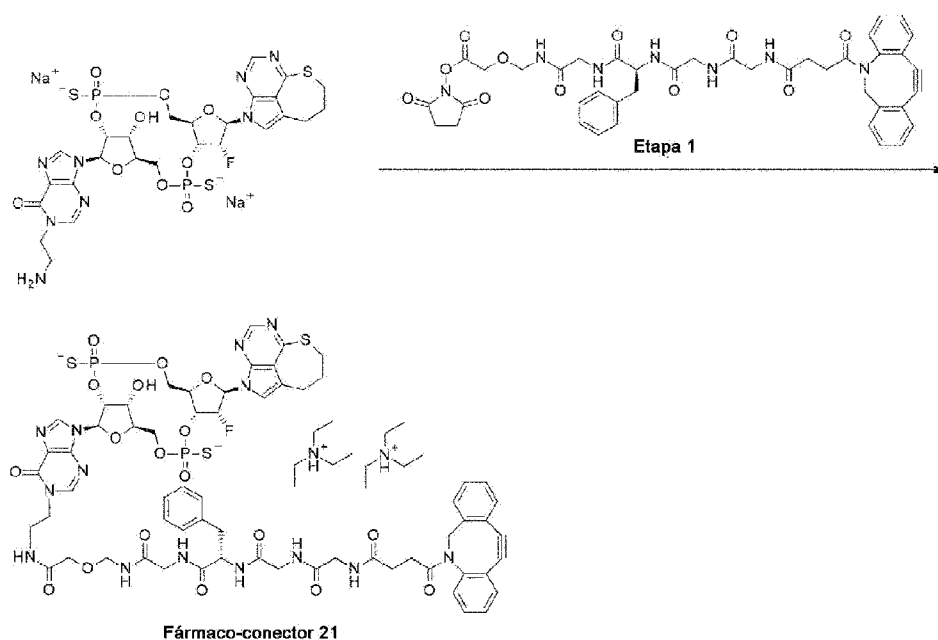
Usando el compuesto obtenido en la etapa 4-2 del ejemplo 59 (25,0 mg) y el compuesto obtenido en la etapa 3 del ejemplo 21 (25,8 mg), la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 4 del ejemplo 21, y el producto resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo], HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 30 %-50 % (0 min-40 min)], y HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/metanol, metanol: del 50 %-90 % (0 min-40 min)] para obtener el compuesto del título (33,1 mg).

MS (ESI) m/z: 1398 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,58 (1H, sa), 8,39 (1H, d, J = 8,5 Hz), 8,00 (1H, sa), 7,71 (1H, sa), 7,64-7,49 (2H, m), 7,44-7,37 (3H, m), 7,32-7,10 (8H, m), 6,59 (1H, dd, J = 15,1 Hz), 6,23 (1H, d, J = 8,5 Hz), 5,65-5,36 (3H, m), 5,03 (1H, dd, J = 16,6, 14,2 Hz), 4,57-4,38 (5H, m), 4,30-4,17 (2H, m), 4,07-3,95 (2H, m), 3,94-3,50 (9H, m), 3,50-3,35 (1H, m), 3,19 (12H, q, J = 7,3 Hz), 3,18-3,07 (3H, m), 3,04-2,73 (4H, m), 2,40-2,11 (4H, m), 2,05-1,92 (1H, m), 1,29 (18H, t, J = 7,3 Hz).

Ejemplo 81: Síntesis del fármaco-conector 21

[Esquema de síntesis]



(Etapa 1)

N-[4-(11,12-Dideshidrodibenzo[b,f]azocin-5(6H)-il)-4-oxobutanoil]glicilglicil-L-fenilalanil-N-(2-{2-{9-[(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-14-(8,9-dihidro-6-tia-2,3,5-triazabenz[cd]azulen-2(7H)-il)-15-fluoro-16-hidroxi-2,10-dioxo-2,10-disulfurooctahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciotetradecin-7-il]-6-oxo-6,9-dihidro-1H-purin-1-il}etil)amino]-2-oxoetoxi)metil)glicinamida de bis(N,N-dietiletanaminio)

(Fármaco-conector 21)

Usando el compuesto obtenido en la etapa 4-2 del ejemplo 59 (15,0 mg) y el compuesto obtenido en la etapa 1 del ejemplo 66 (17,4 mg), la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 4 del ejemplo 21, y el producto resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo], HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 25 %-50 % (0 min-40 min)], y HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/metanol, metanol: del 40 %-90 % (0 min-40 min)] para obtener el compuesto del título (21,8 mg).

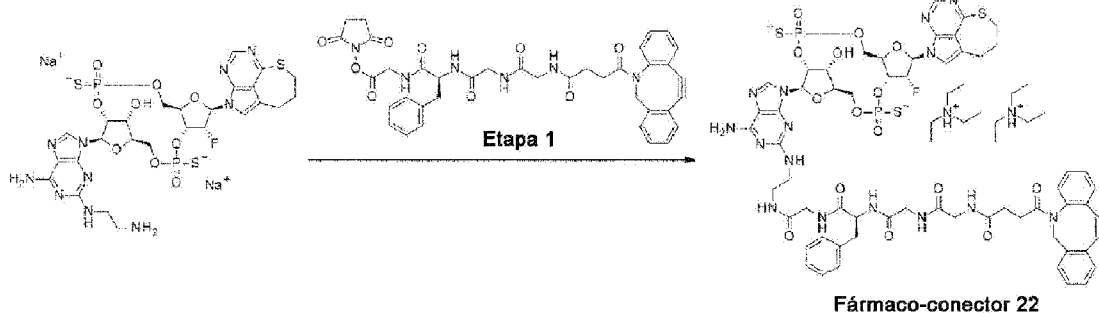
MS (ESI) m/z: 1485 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,61 (1H, sa), 8,41-8,34 (1H, m), 8,10-8,05 (1H, m), 7,72-7,37 (6H, m), 7,32-7,12 (8H, m), 6,63-6,50 (1H, m), 6,27-6,22 (1H, m), 5,65-5,31 (3H, m), 5,07-4,94 (1H, m), 4,68-4,20 (10H, m), 4,11-3,53 (14H, m), 3,26-3,08 (2H, m), 3,19 (12H, q, J = 7,3 Hz), 3,06-2,67 (4H, m), 2,40-2,11 (4H, m), 2,05-1,88 (1H, m), 1,29 (18H, t, J = 7,3 Hz).

5

Ejemplo 82: Síntesis del fármaco-conector 22

[Esquema de síntesis]



(Etapa 1)

- 10 N-[4-(11,12-Dideshidrodibenzo[b,f]azocin-5(6H)-il)-4-oxobutanoil]glicilglicil-L-fenilalanil-N-[2-({6-amino-9-[(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-14-(8,9-dihidro-6-tia-2,3,5-triazabenz[cd]azulen-2(7H)-il)-15-fluoro-16-hidroxi-2,10-dioxo-2,10-disulfurooctahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciotetradecin-7-il]-9H-purin-2-il}amino)etil]glicinamida de bis(N,N-dietiletanaminio)

(Fármaco-conector 22)

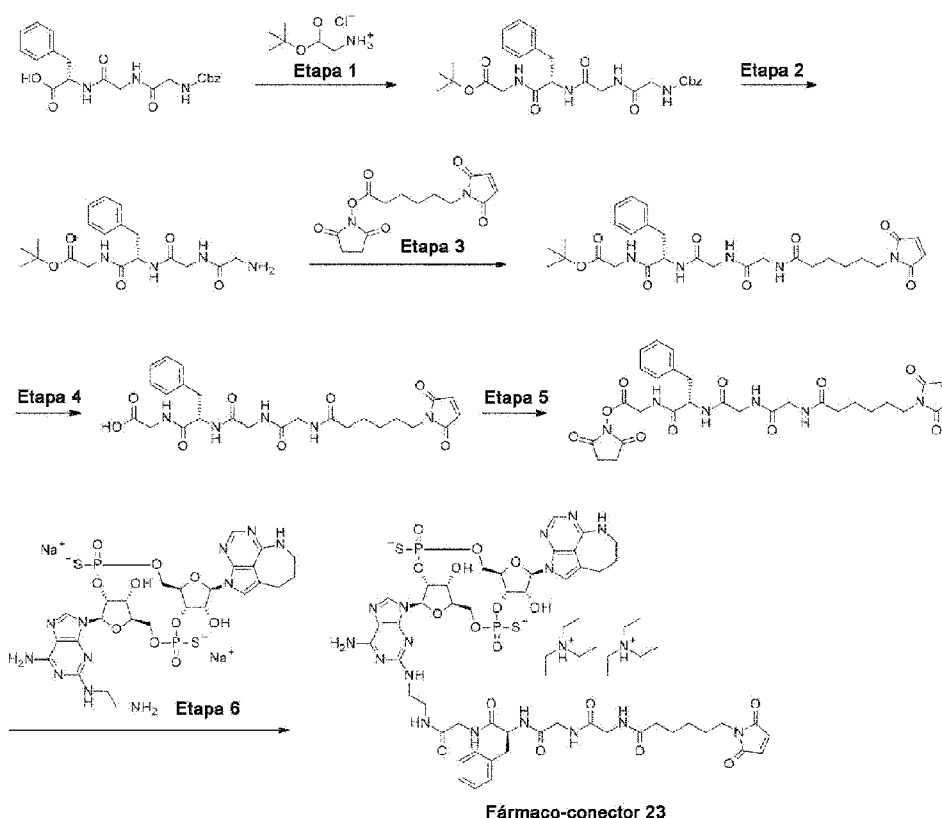
- 15 Usando el compuesto obtenido en la etapa 4-2 del ejemplo 61 (4,4 mg) y el compuesto obtenido en la etapa 3 del ejemplo 21 (3,5 mg), la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 4 del ejemplo 21, y el producto resultante se purificó después por HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, del 25 %-45 % (0 min-30 min)] para obtener el compuesto del título (6,4 mg).

MS (ESI) m/z: 1412 (M+H)⁺.

- 20 RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,37 (1H, d, J = 1,2 Hz), 8,10-7,98 (1H, m), 7,75 (1H, s), 7,62-7,13 (13H, m), 6,59 (1H, d, J = 16,3 Hz), 6,01 (1H, sa), 5,82-5,62 (1H, m), 5,54-5,33 (2H, m), 5,04 (1H, d, J = 14,5 Hz), 4,57-3,48 (14H, m), 3,35-2,65 (12H, m), 3,17 (12H, q, J = 7,3 Hz), 2,35-2,11 (4H, m), 2,00-1,92 (1H, m), 1,28 (18H, t, J = 7,3 Hz).

Ejemplo 83: Síntesis del fármaco-conector 23

[Esquema de síntesis]



(Etapa 1)

N-[(Benzoiloxi)carbonyl]glicilglicil-L-fenilalanilglicinato de terc-butilo

- 5 A una solución de N-[(benciloxi)carbonyl]glicilglicil-L-fenilalanina (5,00 g) disponible en el mercado (Bachem Holding AG) y clorhidrato de éster terc-butilico de glicina (2,03 g) en N,N-dimetilformamida (50 ml) se le añadieron N,N-diisopropiletilamina (4,11 ml) y clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (3,01 g) con refrigeración por hielo y la mezcla de reacción se agitó aumentando la temperatura hasta la temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción se vertió en una mezcla de dos capas de cloroformo y una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio, y se sometió a extracción con cloroformo. La capa orgánica se lavó con agua y salmuera, y después se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El agente desecante se eliminó por filtración, y el filtrado se concentró a presión reducida y se destiló azeotrópicamente dos veces con tolueno. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [diclorometano/metanol] para obtener el compuesto del título (4,51 g). MS (ESI) m/z: 527 (M+H)⁺.

- 15 RMN de ¹H (DMSO-d₆) δ: 8,40 (1H, t, J = 5,7 Hz), 8,15 (1H, d, J = 9,1 Hz), 8,00 (1H, t, J = 5,7 Hz), 7,51 (1H, t, J = 6,0 Hz), 7,38-7,16 (10H, m), 5,03 (2H, s), 4,52 (1H, m), 3,80-3,54 (6H, m), 3,05 (1H, dd, J = 13,9, 3,6 Hz), 2,76 (1H, dd, J = 14,2, 10,6 Hz), 1,41 (9H, s).

(Etapa 2)

Glicilglicil-L-fenilalanilglicinato de terc-butilo

- 20 A una mezcla del compuesto obtenido en la etapa 1 anterior (4,51 g) en metanol (20 ml)-diclorometano (80 ml) se le añadió paladio al 10 %-carbono (M) húmedo (750 mg), y la mezcla de reacción se agitó en una atmósfera de hidrógeno a temperatura ambiente durante toda la noche. A continuación, se añadió paladio al 10 %-carbono (M) húmedo (1,5 g) y la mezcla de reacción se agitó en una atmósfera de hidrógeno a temperatura ambiente durante toda la noche. La mezcla de reacción se filtró con Celite y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice amino [diclorometano/metanol] para obtener el compuesto del título (3,18 g).

- 25 MS (ESI) m/z: 393 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (DMSO-d₆) δ: 8,42 (1H, t, J = 6,1 Hz), 8,20 (1H, d, J = 8,8 Hz), 8,00 (1H, sa), 7,28-7,16 (5H, m), 4,53 (1H, m), 3,78-3,73 (3H, m), 3,61 (1H, da, J = 16,1 Hz), 3,06 (3H, dd, J = 15,4, 5,6 Hz), 2,76 (1H, dd, J = 14,2, 10,3 Hz), 1,88 (2H, a), 1,41 (9H, s).

(Etapa 3)

N-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]glicilglicil-L-fenilalanilglicinato de terc-butilo

5 El compuesto obtenido en la etapa 2 anterior (2,65 g) y 6-maleimidahexanoato de N-succinimidilo disponible en el mercado (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (2,20 g) se disolvieron en N,N-dimetilformamida (20 ml), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 7 horas. Tras concentrar la mezcla de reacción a presión reducida, el residuo se vertió en una mezcla de dos capas de diclorometano y agua, y se sometió a extracción con diclorometano. La capa orgánica se lavó tres veces con agua y una con salmuera y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El agente desecante se eliminó por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [diclorometano/metanol] para obtener el compuesto del título (3,52 g).

10 MS (ESI) m/z: 586 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 7,28-7,17 (5H, m), 7,09 (1H, t, J = 5,1 Hz), 6,96 (1H, t, J = 5,1 Hz), 6,91 (1H, d, J = 8,3 Hz), 6,68 (2H, s), 6,52 (1H, t, J = 4,9 Hz), 4,86 (1H, q, J = 7,3 Hz), 4,02-3,88 (5H, m), 3,82 (1H, dd, J = 18,1, 4,9 Hz), 3,51 (2H, t, J = 7,1 Hz), 3,15 (1H, dd, J = 14,2, 6,3 Hz), 3,04 (1H, dd, J = 13,7, 7,3 Hz), 2,25 (2H, t, J = 7,6 Hz), 1,70-1,57 (4H, m), 1,45 (9H, s), 1,32 (2H, s).

15 (Etapa 4)

N-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]glicilglicil-L-fenilalanilglicina

20 A una solución del compuesto obtenido en la etapa 3 anterior (1,00 g) en diclorometano (9,0 ml) se le añadió ácido trifluoroacético (4,5 ml) a 0 °C, y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2,5 horas. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida y se destiló azeotrópicamente dos veces con tolueno. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [diclorometano/metanol] para obtener el compuesto del título (534 mg).

MS (ESI) m/z: 530 (M+H)⁺.

25 RMN de ¹H (DMSO-d₆) δ: 12,59 (1H, a), 8,34 (1H, t, J = 5,9 Hz), 8,10 (1H, d, J = 8,8 Hz), 8,07 (1H, t, J = 5,9 Hz), 7,99 (1H, t, J = 5,6 Hz), 7,27-7,16 (5H, m), 7,00 (2H, s), 4,52 (1H, m), 3,76 (2H, d, J = 5,9 Hz), 3,74 (1H, m), 3,66 (2H, dd, J = 5,4 Hz), 3,57 (1H, dd, J = 16,8, 5,6 Hz), 3,36 (2H, t, J = 7,1 Hz), 3,04 (1H, dd, J = 13,9, 4,1 Hz), 2,77 (1H, dd, J = 13,9, 10,0 Hz), 2,10 (2H, t, J = 7,3 Hz), 1,51-1,43 (4H, m), 1,19 (2H, m).

(Etapa 5)

N-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]glicilglicil-L-fenilalanilglicinato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo

30 Usando el compuesto obtenido en la etapa 4 anterior (462 mg), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 3 del ejemplo 21 para obtener el compuesto del título (258 mg).

MS (ESI) m/z: 627 (M+H)⁺.

35 RMN de ¹H (DMSO-d₆) δ: 8,70 (0,85H, t, J = 6,1 Hz), 8,44 (0,15H, t, J = 5,9 Hz), 8,17 (0,85H, d, J = 8,8 Hz), 8,11 (0,15H, d, J = 8,8 Hz), 8,06 (1H, t, J = 5,6 Hz), 7,99-7,95 (1H, m), 7,27-7,16 (5H, m), 6,99 (2H, s), 4,53 (1H, m), 4,28 (1,7H, d, J = 5,9 Hz), 3,85 (0,3H, d, J = 5,9 Hz), 3,74 (1H, dd, J = 17,1, 5,9 Hz), 3,66 (2H, d, J = 5,9 Hz), 3,58 (1H, dd, J = 16,8, 5,6 Hz), 3,36 (2H, t, J = 7,1 Hz), 3,04 (1H, dd, J = 13,9, 4,1 Hz), 2,81 (4H, sa), 2,77 (1H, dd, J = 10,0, 3,7 Hz), 2,10 (2H, t, J = 7,3 Hz), 1,51-1,44 (4H, m), 1,20 (2H, d, J = 7,3 Hz).

(Etapa 6)

40 N-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]glicilglicil-L-fenilalanil-N-[2-({6-amino-9-[(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aS,16R)-15,16-dihidroxi-2,10-dioxo-2,10-disulfuro-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzoc[d]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxadifosfaciotetradecin-7-il]-9H-purin-2-il}amino)etil]glicinamida de bis(N,N-dietiletanaminio)

(Fármaco-conector 23)

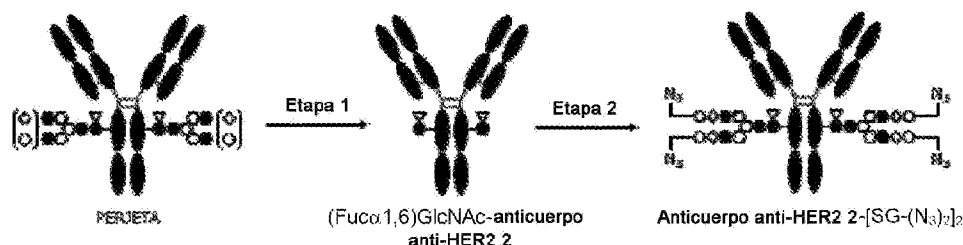
45 Usando el compuesto obtenido en la etapa 8-2 del ejemplo 8 (9,5 mg) y el compuesto obtenido en la etapa 5 anterior (7,5 mg), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 1 del ejemplo 23, y el producto resultante se purificó después por HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 10 %-30 % (0 min-30 min)] para obtener el compuesto del título (7,8 mg). MS (ESI) m/z: 1299 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,35 (1H, s), 8,02 (1H, s), 7,29-7,15 (6H, m), 6,76 (2H, s), 6,32 (1H, d, J = 6,7 Hz), 6,11 (1H, d, 8,5 Hz), 5,48-5,36 (2H, m), 4,82-4,79 (1H, m), 4,50-4,25 (6H, m), 4,06-3,81 (7H, m), 3,61-3,37 (9H, m), 3,17-2,89 (4H, m), 3,14 (12H, q, J = 7,3 Hz), 2,21-1,96 (4H, m), 1,58-1,48 (4H, m), 1,30-1,21 (2H, m), 1,27 (18H, t, J = 7,3 Hz).

50 Ejemplo 84: Síntesis del anticuerpo con glucano remodelado 3

Preparación del anticuerpo anti-HER2 2-[SG-(N₃)₂]₂

[Esquema de síntesis]



(Etapa 1)

5 Preparación del anticuerpo (Fucα1,6)GlcNAc-Anti-HER2 2

El goteo de infusión intravenosa disponible en el mercado PERJETA (R) 420 mg/14 ml (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.) (3,5 ml) se sometió a intercambio de tampón de acuerdo con el procedimiento común C para proporcionar una solución salina tamponada con fosfato (6,0 ml, 15,39 mg/ml, pH 6,0). Se realizaron los mismos procedimientos que en la etapa 1 del ejemplo 25 para obtener una solución tampón fosfato 20 mM del anticuerpo del título (12,96 mg/ml, 7,5 ml, pH 6,0).

(Etapa 2)

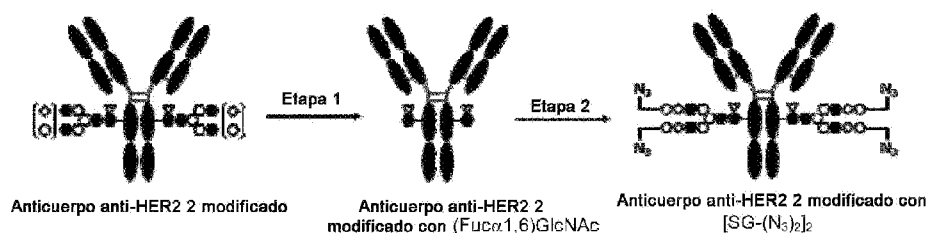
Preparación del anticuerpo anti-HER2 2-[SG-(N₃)₂]₂

Usando la solución de tampón fosfato 20 mM del anticuerpo obtenido en la etapa 1 anterior (12,96 mg/ml, 7,5 ml, pH 6,0) y [N₃-PEG(3)]₂-SG(10)Ox (22,5 mg), se realizaron los mismos procedimientos que en la etapa 2 del ejemplo 25 para obtener una solución salina tamponada con fosfato del anticuerpo del título (10,21 mg/ml, 9,0 ml, pH 6,0).

Ejemplo 85: Síntesis del anticuerpo con glucano remodelado 4

Preparación del anticuerpo anti-HER2 modificado con [SG-(N₃)₂]₂ 2

[Esquema de síntesis]



(Etapa 1)

Preparación del anticuerpo anti-HER2 modificado con (Fucα1,6)GlcNAc 2

Usando una solución salina tamponada con fosfato de un anticuerpo anti-HER2 modificado 2 preparado de acuerdo con el ejemplo de referencia 5 (24 ml, 12,25 mg/ml, pH 6,0), se realizaron los mismos procedimientos que en la etapa 1 del ejemplo 25 para proporcionar una solución tampón fosfato 20 mM del anticuerpo del título (20,86 mg/ml, 12,5 ml, pH 6,0).

(Etapa 2)

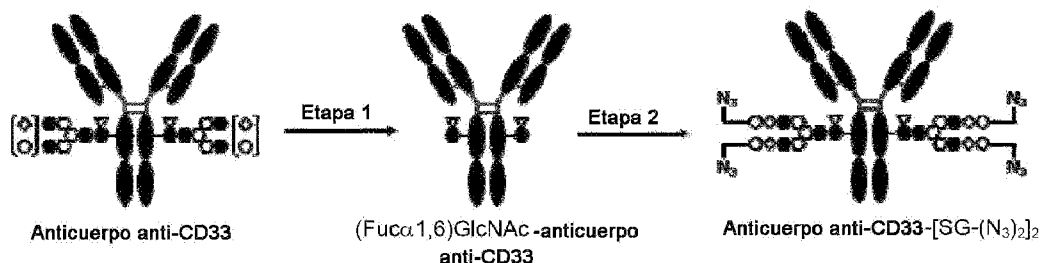
Preparación del anticuerpo anti-HER2 modificado con [SG-(N₃)₂]₂ 2

Usando la solución de tampón fosfato 20 mM del anticuerpo obtenido en la etapa 1 anterior (20,86 mg/ml, 12,5 ml, pH 6,0) y [N₃-PEG(3)]₂-SG(10)Ox (52 mg), se realizaron los mismos procedimientos que en la etapa 2 del ejemplo 25 para obtener una solución salina tamponada con fosfato del anticuerpo del título (10,87 mg/ml, 22 ml, pH 6,0).

Ejemplo 86: Síntesis del anticuerpo con glucano remodelado 5

Preparación del anticuerpo anti-CD33 [SG-(N₃)₂]₂

[Esquema de síntesis]



(Etapa 1)

5 Preparación del anticuerpo anti-CD33 (Fucα1,6)GlcNAc

Usando una solución salina tamponada con fosfato de un anticuerpo anti-CD33 preparado de acuerdo con el ejemplo de referencia 6 (9,0 ml, 11,56 mg/ml, pH 6,0), se realizaron los mismos procedimientos que en la etapa 1 del ejemplo 25 para obtener una solución tampón fosfato 20 mM del anticuerpo del título (11,62 mg/ml, 8 ml, pH 6,0).

(Etapa 2)

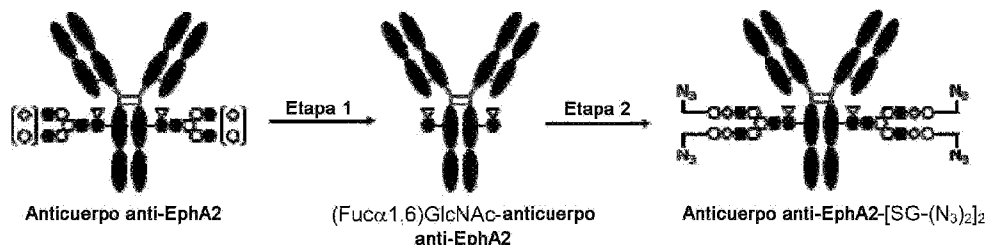
10 Preparación del anticuerpo anti-CD33 [SG-(N₃)₂]₂

Usando la solución tampón fosfato 20 mM del anticuerpo obtenido en la etapa 1 anterior (11,62 mg/ml, 8 ml, pH 6,0) y [N₃-PEG(3)]₂-SG(10)Ox (21,5 mg), se realizaron los mismos procedimientos que en la etapa 2 del ejemplo 25 para obtener una solución salina tamponada con fosfato del anticuerpo del título (10,01 mg/ml, 8 ml, pH 6,0).

Ejemplo 87: Síntesis del anticuerpo con glucano remodelado 6

15 Preparación del anticuerpo anti-EphA2 [SG-(N₃)₂]₂

[Esquema de síntesis]



(Etapa 1)

Preparación del anticuerpo anti-EphA2 (Fucα1,6)GlcNAc

20 Usando una solución salina tamponada con fosfato de un anticuerpo anti-EphA2 preparado de acuerdo con el ejemplo de referencia 7 (8,0 ml, 12,83 mg/ml, pH 6,0), se realizaron los mismos procedimientos que en la etapa 1 del ejemplo 25 para obtener una solución tampón fosfato 20 mM del anticuerpo del título (13,51 mg/ml, 7 ml, pH 6,0).

(Etapa 2)

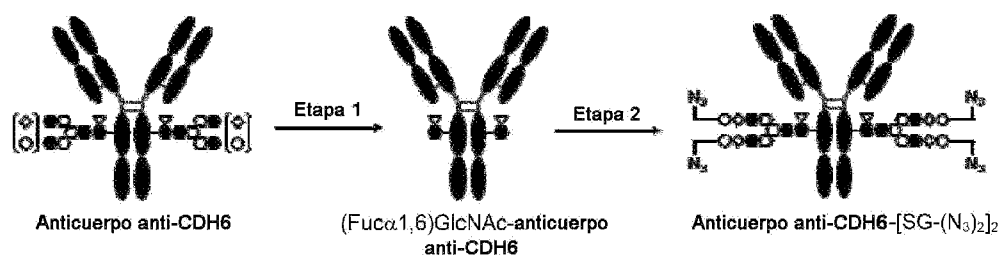
Preparación del anticuerpo anti-EphA2 [SG-(N₃)₂]₂

25 Usando la solución de tampón fosfato 20 mM del anticuerpo obtenido en la etapa 1 anterior (13,51 mg/ml, 7 ml, pH 6,0) y [N₃-PEG(3)]₂-SG(10)Ox (21,7 mg), se realizaron los mismos procedimientos que en la etapa 2 del ejemplo 25 para obtener una solución salina tamponada con fosfato del anticuerpo del título (8,91 mg/ml, 7,5 ml, pH 6,0).

Ejemplo 88: Síntesis del anticuerpo con glucano remodelado 7

Preparación del anticuerpo anti-CDH6 [SG-(N₃)₂]₂

30 [Esquema de síntesis]



(Etapa 1)

Preparación del anticuerpo anti-CDH6 (Fuc α 1,6)GlcNAc

- 5 El tampón HBSor (histidina 25 mM/sorbitol al 5 %, pH = 6,0) (5,0 ml, 20,0 mg/ml) de un anticuerpo anti-CDH6 preparado de acuerdo con el ejemplo de referencia 8 se sometió a intercambio de tampón contra solución salina tamponada con fosfato (pH = 6,0) de acuerdo con el procedimiento común C y, a continuación, se realizaron los mismos procedimientos que en la etapa 1 del ejemplo 25 para obtener una solución tampón fosfato 20 mM del anticuerpo del título (9,58 mg/ml, 9,0 ml, pH 6,0).

(Etapa 2)

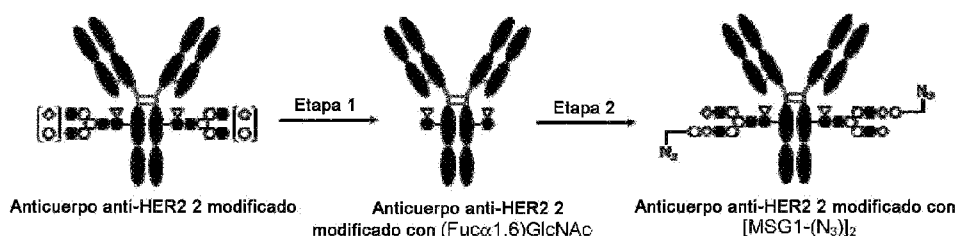
- 10 Preparación del anticuerpo anti-CDH6 [SG-(N₃)₂]₂

Usando la solución de tampón fosfato 20 mM del anticuerpo obtenido en la etapa 1 anterior (9,58 mg/ml, 9,0 ml, pH 6,0) y [N₃-PEG(3)]₂-SG(10)Ox (24,5 mg), se realizaron los mismos procedimientos que en la etapa 2 del ejemplo 25 para obtener una solución salina tamponada con fosfato del anticuerpo del título (10,69 mg/ml, 7,5 ml, pH 6,0).

Ejemplo 89: Síntesis del anticuerpo con glucano remodelado 8

- 15 Preparación del anticuerpo anti-HER2 modificado 2 con [MSG1-(N₃)₂]₂

[Esquema de síntesis]



(Etapa 1)

Preparación del anticuerpo anti-HER2 modificado con (Fuc α 1,6)GlcNAc 2

- 20 Se realizó la misma reacción que en la etapa 1 del ejemplo 85 para una solución tampón del anticuerpo de materia prima (10 ml, 12,25 mg/ml, pH 6,0) para proporcionar una solución tampón de fosfato 20 mM del anticuerpo del título (14,84 mg/ml, 7,5 ml, pH 6,0).

(Etapa 2)

Preparación del anticuerpo anti-HER2 modificado 2 con [MSG1-(N₃)₂]₂

- 25 Usando la solución de tampón fosfato 20 mM del anticuerpo obtenido en la etapa 1 anterior (14,84 mg/ml, 7,5 ml, pH 6,0) y [N₃-PEG(3)]-MSG1(9)-Ox (compuesto 1-11 en el documento WO 2018/003983) (19 mg), se realizaron los mismos procedimientos que en la etapa 2 del ejemplo 25 para obtener una solución salina tamponada con fosfato del anticuerpo del título (10,48 mg/ml, 9,25 ml, pH 6,0).

Ejemplo 90: Síntesis del conjugado de anticuerpo-fármaco 5 (síntesis del conjugado de anticuerpo anti-HER2-CDN 4)

- 30 Se diluyó una solución salina tamponada con fosfato del anticuerpo con glucano remodelado 1 (pH 6,0) (10,97 mg/ml, 0,500 ml) con propilenglicol (0,250 ml). A esta solución se le añadió una mezcla de una solución en dimetilsulfóxido del fármaco-conector 1 (10 mM, 0,091 ml, 24 equivalentes por molécula de anticuerpo) y propilenglicol (0,159 ml), y el producto resultante se hizo reaccionar con un rotador de tubos (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura

ambiente durante 3 días. La mezcla de reacción se purificó de acuerdo con el procedimiento descrito en el procedimiento común D para obtener una solución del conjugado de anticuerpo diana-fármaco en ABS (3,5 ml).

El análisis se realizó de acuerdo con los procedimientos descritos en los procedimientos comunes E y G para adquirir los siguientes resultados.

- 5 Concentración de anticuerpo: 0,49 mg/ml
 Rendimiento del anticuerpo: 1,71 mg (31 %)
 Número promedio de moléculas de fármaco conjugado: 3,6

Ejemplo 91: Síntesis del conjugado de anticuerpo-fármaco 6 (síntesis del conjugado de anticuerpo anti-HER2-CDN 5)

- 10 Se diluyó una solución salina tamponada con fosfato del anticuerpo con glucano remodelado 1 (pH 6,0) (10,97 mg/ml, 0,500 ml) con propilenglicol (0,250 ml). A esta solución se le añadió una mezcla de una solución en dimetilsulfóxido del fármaco-conector 2a (10 mM, 0,091 ml, 24 equivalentes por molécula de anticuerpo) y propilenglicol (0,159 ml), y el producto resultante se hizo reaccionar con un rotador de tubos (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente durante 2 días. La mezcla de reacción se purificó de acuerdo con el procedimiento descrito en el procedimiento común D para obtener una solución del conjugado de anticuerpo diana-fármaco en ABS (3,5 ml).

- 15 El análisis se realizó de acuerdo con los procedimientos descritos en los procedimientos comunes E y G para adquirir los siguientes resultados.

 Concentración de anticuerpo: 0,91 mg/ml
 Rendimiento del anticuerpo: 3,17 mg (58 %)
 Número promedio de moléculas de fármaco conjugado: 3,6

- 20 Ejemplo 92: Síntesis del conjugado de anticuerpo-fármaco 7 (síntesis del conjugado de anticuerpo anti-HER2-CDN 6)

- Se diluyó una solución salina tamponada con fosfato del anticuerpo con glucano remodelado 1 (pH 6,0) (10,70 mg/ml, 4,00 ml) con propilenglicol (2,00 ml). A esta solución se le añadió una mezcla de una solución en dimetilsulfóxido del fármaco-conector 2b (10 mM, 0,707 ml, 24 equivalentes por molécula de anticuerpo) y propilenglicol (1,293 ml), y el producto resultante se hizo reaccionar con un rotador de tubos (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente durante 3 días. La mezcla de reacción se purificó de acuerdo con el procedimiento descrito en el procedimiento común D para obtener una solución del conjugado de anticuerpo diana-fármaco en ABS (24,5 ml).

El análisis se realizó de acuerdo con los procedimientos descritos en los procedimientos comunes E y G para adquirir los siguientes resultados.

- Concentración de anticuerpo: 0,96 mg/ml
 30 Rendimiento del anticuerpo: 23,57 mg (59 %)
 Número promedio de moléculas de fármaco conjugado: 3,7

Ejemplo 93: Síntesis del conjugado de anticuerpo-fármaco 8 (síntesis del conjugado de anticuerpo anti-HER2-CDN 7)

- 35 Se diluyó una solución salina tamponada con fosfato del anticuerpo con glucano remodelado 1 (pH 6,0) (10,70 mg/ml, 4,00 ml) con propilenglicol (2,00 ml). A esta solución se le añadió una mezcla de una solución en dimetilsulfóxido del fármaco-conector 5 (10 mM, 0,707 ml, 24 equivalentes por molécula de anticuerpo) y propilenglicol (1,293 ml), y el producto resultante se hizo reaccionar con un rotador de tubos (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente durante 2 días. La mezcla de reacción se purificó de acuerdo con el procedimiento descrito en el procedimiento común D para obtener una solución del conjugado de anticuerpo diana-fármaco en ABS (24,5 ml).

- 40 El análisis se realizó de acuerdo con los procedimientos descritos en los procedimientos comunes E y G para adquirir los siguientes resultados.

 Concentración de anticuerpo: 1,10 mg/ml
 Rendimiento del anticuerpo: 26,86 mg (67 %)
 Número promedio de moléculas de fármaco conjugado: 3,7

Ejemplo 94: Síntesis del conjugado de anticuerpo-fármaco 9 (síntesis del conjugado de anticuerpo anti-HER2-CDN 8)

- 45 Se diluyó una solución salina tamponada con fosfato del anticuerpo con glucano remodelado 1 (pH 6,0) (10,70 mg/ml, 4,00 ml) con propilenglicol (2,00 ml). A esta solución se le añadió una mezcla de una solución en dimetilsulfóxido del fármaco-conector 6 (10 mM, 0,707 ml, 24 equivalentes por molécula de anticuerpo) y propilenglicol (1,293 ml), y el

producto resultante se hizo reaccionar con un rotador de tubos (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente durante 2 días. La mezcla de reacción se purificó de acuerdo con el procedimiento descrito en el procedimiento común D para obtener una solución del conjugado de anticuerpo diana-fármaco en ABS (24,5 ml).

- 5 El análisis se realizó de acuerdo con los procedimientos descritos en los procedimientos comunes E y G para adquirir los siguientes resultados.

Concentración de anticuerpo: 1,34 mg/ml

Rendimiento del anticuerpo: 32,92 mg (82 %)

Número promedio de moléculas de fármaco conjugado: 3,7

Ejemplo 95: Síntesis del conjugado de anticuerpo-fármaco 10 (síntesis del conjugado de anticuerpo anti-LPS-CDN 2)

- 10 Se diluyó una solución salina tamponada con fosfato del anticuerpo con glucano remodelado 1 (pH 6,0) (10,55 mg/ml, 0,500 ml) con propilenglicol (0,250 ml). A esta solución se le añadió una mezcla de una solución en dimetilsulfóxido del fármaco-conector 2a (10 mM, 0,087 ml, 24 equivalentes por molécula de anticuerpo) y propilenglicol (0,163 ml), y el producto resultante se hizo reaccionar con un rotador de tubos (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente durante 2 días. La mezcla de reacción se purificó de acuerdo con el procedimiento descrito en el procedimiento común D para obtener una solución del conjugado de anticuerpo diana-fármaco en ABS (3,5 ml).
- 15

El análisis se realizó de acuerdo con los procedimientos descritos en los procedimientos comunes E y G para adquirir los siguientes resultados.

Concentración de anticuerpo: 0,88 mg/ml

Rendimiento del anticuerpo: 3,08 mg (62 %)

- 20 Número promedio de moléculas de fármaco conjugado: 3,6

Ejemplo 96: Síntesis del conjugado de anticuerpo-fármaco 11 (síntesis del conjugado de anticuerpo anti-EphA2-CDN 1)

- 25 Se diluyó una solución salina tamponada con fosfato del anticuerpo con glucano remodelado 1 (pH 6,0) (8,91 mg/ml, 0,500 ml) con propilenglicol (0,250 ml). A esta solución se le añadió una mezcla de una solución en dimetilsulfóxido del fármaco-conector 2b (10 mM, 0,073 ml, 24 equivalentes por molécula de anticuerpo) y propilenglicol (0,177 ml), y el producto resultante se hizo reaccionar con un rotador de tubos (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente durante 2 días. La mezcla de reacción se purificó de acuerdo con el procedimiento descrito en el procedimiento común D para obtener una solución del conjugado de anticuerpo diana-fármaco en ABS (3,5 ml).

- 30 El análisis se realizó de acuerdo con los procedimientos descritos en los procedimientos comunes E y F para adquirir los siguientes resultados.

Concentración de anticuerpo: 0,60 mg/ml

Rendimiento del anticuerpo: 2,10 mg (47 %)

Número promedio de moléculas de fármaco conjugado: 3,8

- 35 Ejemplo 97: Síntesis del conjugado de anticuerpo-fármaco 12 (síntesis del conjugado de anticuerpo anti-CD33-CDN 1)

- 40 Se diluyó una solución salina tamponada con fosfato del anticuerpo con glucano remodelado 1 (pH 6,0) (10,01 mg/ml, 0,500 ml) con propilenglicol (0,250 ml). A esta solución se le añadió una mezcla de una solución en dimetilsulfóxido del fármaco-conector 2b (10 mM, 0,083 ml, 24 equivalentes por molécula de anticuerpo) y propilenglicol (0,167 ml), y el producto resultante se hizo reaccionar con un rotador de tubos (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente durante 2 días. La mezcla de reacción se purificó de acuerdo con el procedimiento descrito en el procedimiento común D para obtener una solución del conjugado de anticuerpo diana-fármaco en ABS (3,5 ml).

El análisis se realizó de acuerdo con los procedimientos descritos en los procedimientos comunes E y G para adquirir los siguientes resultados.

Concentración de anticuerpo: 0,73 mg/ml

- 45 Rendimiento del anticuerpo: 2,57 mg (51 %)

Número promedio de moléculas de fármaco conjugado: 3,9

Ejemplo 98: Síntesis del conjugado de anticuerpo-fármaco 13 (síntesis del conjugado de anticuerpo anti-CDH6-CDN 1)

Se diluyó una solución salina tamponada con fosfato del anticuerpo con glucano remodelado 1 (pH 6,0) (10,69 mg/ml, 0,500 ml) con propilenglicol (0,250 ml). A esta solución se le añadió una mezcla de una solución en dimetilsulfóxido del fármaco-conector 2b (10 mM, 0,088 ml, 24 equivalentes por molécula de anticuerpo) y propilenglicol (0,162 ml), y el producto resultante se hizo reaccionar con un rotador de tubos (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente durante 3 días. La mezcla de reacción se purificó de acuerdo con el procedimiento descrito en el procedimiento común D para obtener una solución del conjugado de anticuerpo diana-fármaco en ABS (3,5 ml).

El análisis se realizó de acuerdo con los procedimientos descritos en los procedimientos comunes E y G para adquirir los siguientes resultados.

Concentración de anticuerpo: 0,96 mg/ml

Rendimiento del anticuerpo: 3,37 mg (63 %)

Número promedio de moléculas de fármaco conjugado: 3,8

Ejemplo 99: Síntesis del conjugado de anticuerpo-fármaco 14 (síntesis del conjugado de anticuerpo anti-HER2 2-CDN 1)

Se diluyó una solución salina tamponada con fosfato del anticuerpo con glucano remodelado 1 (pH 6,0) (10,21 mg/ml, 1,50 ml) con propilenglicol (0,750 ml). A esta solución se le añadió una mezcla de una solución en dimetilsulfóxido del fármaco-conector 3 (10 mM, 0,253 ml, 24 equivalentes por molécula de anticuerpo) y propilenglicol (0,497 ml), y el producto resultante se hizo reaccionar con un rotador de tubos (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente durante 2 días. La mezcla de reacción se purificó de acuerdo con el procedimiento descrito en el procedimiento común D para obtener una solución del conjugado de anticuerpo diana-fármaco en ABS (9,5 ml).

El análisis se realizó de acuerdo con los procedimientos descritos en los procedimientos comunes E y G para adquirir los siguientes resultados.

Concentración de anticuerpo: 1,02 mg/ml

Rendimiento del anticuerpo: 9,73 mg (64 %)

Número promedio de moléculas de fármaco conjugado: 3,7

Ejemplo 100: Síntesis del conjugado de anticuerpo-fármaco 15 (síntesis del conjugado de anticuerpo anti-HER2-CDN 9)

Se diluyó una solución salina tamponada con fosfato del anticuerpo con glucano remodelado 1 (pH 6,0) (10,70 mg/ml, 0,500 ml) con propilenglicol (0,250 ml). A esta solución se le añadió una mezcla de una solución en dimetilsulfóxido del fármaco-conector 8 (10 mM, 0,088 ml, 24 equivalentes por molécula de anticuerpo) y propilenglicol (0,162 ml), y el producto resultante se hizo reaccionar con un rotador de tubos (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente durante 2 días. La mezcla de reacción se purificó de acuerdo con el procedimiento descrito en el procedimiento común D para obtener una solución del conjugado de anticuerpo diana-fármaco en ABS (3,5 ml).

El análisis se realizó de acuerdo con los procedimientos descritos en los procedimientos comunes E y G para adquirir los siguientes resultados.

Concentración de anticuerpo: 0,93 mg/ml

Rendimiento del anticuerpo: 3,24 mg (61 %)

Número promedio de moléculas de fármaco conjugado: 3,6

Ejemplo 101: Síntesis del conjugado de anticuerpo-fármaco 16 (síntesis del conjugado de anticuerpo anti-HER2-CDN 10)

Se diluyó una solución salina tamponada con fosfato del anticuerpo con glucano remodelado 1 (pH 6,0) (10,35 mg/ml, 13,50 ml) con propilenglicol (6,750 ml). A esta solución se le añadió una mezcla de una solución en dimetilsulfóxido del fármaco-conector 9 (10 mM, 2,310 ml, 24 equivalentes por molécula de anticuerpo) y propilenglicol (4,440 ml), y el producto resultante se hizo reaccionar con un rotador de tubos (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente durante 2 días. La mezcla de reacción se purificó de acuerdo con el procedimiento descrito en el procedimiento común D para obtener una solución del conjugado de anticuerpo diana-fármaco en ABS (74,3 ml).

El análisis se realizó de acuerdo con los procedimientos descritos en los procedimientos comunes E y G para adquirir los siguientes resultados.

Concentración de anticuerpo: 1,36 mg/ml

Rendimiento del anticuerpo: 100,8 mg (72 %)

Número promedio de moléculas de fármaco conjugado: 3,7

Ejemplo 102: Síntesis del conjugado de anticuerpo-fármaco 17 (síntesis del conjugado de anticuerpo anti-HER2-CDN 11)

5 Se diluyó una solución salina tamponada con fosfato del anticuerpo con glucano remodelado 1 (pH 6,0) (10,70 mg/ml, 0,500 ml) con propilenglicol (0,250 ml). A esta solución se le añadió una mezcla de una solución en dimetilsulfóxido del fármaco-conector 10 (10 mM, 0,088 ml, 24 equivalentes por molécula de anticuerpo) y propilenglicol (0,162 ml), y el producto resultante se hizo reaccionar con un rotador de tubos (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente durante 3 días. La mezcla de reacción se purificó de acuerdo con el procedimiento descrito en el procedimiento común D para obtener una solución del conjugado de anticuerpo diana-fármaco en ABS (3,5 ml).

10 El análisis se realizó de acuerdo con los procedimientos descritos en los procedimientos comunes E y G para adquirir los siguientes resultados.

Concentración de anticuerpo: 0,63 mg/ml

Rendimiento del anticuerpo: 2,22 mg (42 %)

Número promedio de moléculas de fármaco conjugado: 3,5

15 Ejemplo 103: Síntesis del conjugado de anticuerpo-fármaco 18 (síntesis del conjugado de anticuerpo anti-HER2-CDN 12)

20 Se diluyó una solución salina tamponada con fosfato del anticuerpo con glucano remodelado 1 (pH 6,0) (10,70 mg/ml, 0,500 ml) con propilenglicol (0,250 ml). A esta solución se le añadió una mezcla de una solución en dimetilsulfóxido del fármaco-conector 11 (10 mM, 0,088 ml, 24 equivalentes por molécula de anticuerpo) y propilenglicol (0,162 ml), y el producto resultante se hizo reaccionar con un rotador de tubos (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente durante 3 días. La mezcla de reacción se purificó de acuerdo con el procedimiento descrito en el procedimiento común D para obtener una solución del conjugado de anticuerpo diana-fármaco en ABS (3,5 ml).

El análisis se realizó de acuerdo con los procedimientos descritos en los procedimientos comunes E y G para adquirir los siguientes resultados.

25 Concentración de anticuerpo: 0,94 mg/ml

Rendimiento del anticuerpo: 3,29 mg (62 %)

Número promedio de moléculas de fármaco conjugado: 3,6

Ejemplo 104: Síntesis del conjugado de anticuerpo-fármaco 19 (síntesis del conjugado de anticuerpo anti-HER2-CDN 13)

30 Se diluyó una solución salina tamponada con fosfato del anticuerpo con glucano remodelado 1 (pH 6,0) (10,70 mg/ml, 0,500 ml) con propilenglicol (0,250 ml). A esta solución se le añadió una mezcla de una solución en dimetilsulfóxido del fármaco-conector 12 (10 mM, 0,088 ml, 24 equivalentes por molécula de anticuerpo) y propilenglicol (0,162 ml), y el producto resultante se hizo reaccionar con un rotador de tubos (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente durante 3 días. La mezcla de reacción se purificó de acuerdo con el procedimiento descrito en el procedimiento común D para obtener una solución del conjugado de anticuerpo diana-fármaco en ABS (3,5 ml).

35 El análisis se realizó de acuerdo con los procedimientos descritos en los procedimientos comunes E y G para adquirir los siguientes resultados.

Concentración de anticuerpo: 0,92 mg/ml

Rendimiento del anticuerpo: 3,20 mg (60 %)

40 Número promedio de moléculas de fármaco conjugado: 3,5

Ejemplo 105: Síntesis del conjugado de anticuerpo-fármaco 20 (síntesis del conjugado de anticuerpo anti-HER2-CDN 14)

45 Se diluyó una solución salina tamponada con fosfato del anticuerpo con glucano remodelado 1 (pH 6,0) (10,70 mg/ml, 0,500 ml) con propilenglicol (0,250 ml). A esta solución se le añadió una mezcla de una solución en dimetilsulfóxido del fármaco-conector 13 (10 mM, 0,088 ml, 24 equivalentes por molécula de anticuerpo) y propilenglicol (0,162 ml), y el producto resultante se hizo reaccionar con un rotador de tubos (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente durante 3 días. La mezcla de reacción se purificó de acuerdo con el procedimiento descrito en el procedimiento común D para obtener una solución del conjugado de anticuerpo diana-fármaco en ABS (3,5 ml).

50 El análisis se realizó de acuerdo con los procedimientos descritos en los procedimientos comunes E y G para adquirir los siguientes resultados.

Concentración de anticuerpo: 1,01 mg/ml

Rendimiento del anticuerpo: 3,52 mg (66 %)

Número promedio de moléculas de fármaco conjugado: 3,5

5 Ejemplo 106: Síntesis del conjugado de anticuerpo-fármaco 21 (síntesis del conjugado de anticuerpo anti-HER2-CDN 15)

10 Se diluyó una solución salina tamponada con fosfato del anticuerpo con glucano remodelado 1 (pH 6,0) (10,70 mg/ml, 0,500 ml) con propilenglicol (0,250 ml). A esta solución se le añadió una mezcla de una solución en dimetilsulfóxido del fármaco-conector 14 (10 mM, 0,088 ml, 24 equivalentes por molécula de anticuerpo) y propilenglicol (0,162 ml), y el producto resultante se hizo reaccionar con un rotador de tubos (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente durante 2 días. La mezcla de reacción se purificó de acuerdo con el procedimiento descrito en el procedimiento común D para obtener una solución del conjugado de anticuerpo diana-fármaco en ABS (3,5 ml).

El análisis se realizó de acuerdo con los procedimientos descritos en los procedimientos comunes E y G para adquirir los siguientes resultados.

Concentración de anticuerpo: 0,78 mg/ml

15 Rendimiento del anticuerpo: 2,74 mg (51 %)

Número promedio de moléculas de fármaco conjugado: 3,6

Ejemplo 107: Síntesis del conjugado de anticuerpo-fármaco 22 (síntesis del conjugado de anticuerpo anti-HER2-CDN 16)

20 Se diluyó una solución salina tamponada con fosfato del anticuerpo con glucano remodelado 1 (pH 6,0) (10,70 mg/ml, 0,500 ml) con propilenglicol (0,250 ml). A esta solución se le añadió una mezcla de una solución en dimetilsulfóxido del fármaco-conector 15 (10 mM, 0,088 ml, 24 equivalentes por molécula de anticuerpo) y propilenglicol (0,162 ml), y el producto resultante se hizo reaccionar con un rotador de tubos (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente durante 2 días. La mezcla de reacción se purificó de acuerdo con el procedimiento descrito en el procedimiento común D para obtener una solución del conjugado de anticuerpo diana-fármaco en ABS (3,5 ml).

25 El análisis se realizó de acuerdo con los procedimientos descritos en los procedimientos comunes E y G para adquirir los siguientes resultados.

Concentración de anticuerpo: 1,32 mg/ml

Rendimiento del anticuerpo: 4,61 mg (86 %)

Número promedio de moléculas de fármaco conjugado: 3,6

30 Ejemplo 108: Síntesis del conjugado de anticuerpo-fármaco 23 (síntesis del conjugado de anticuerpo anti-HER2-CDN 17)

35 Se diluyó una solución salina tamponada con fosfato del anticuerpo con glucano remodelado 1 (pH 6,0) (10,70 mg/ml, 0,500 ml) con propilenglicol (0,250 ml). A esta solución se le añadió una mezcla de una solución en dimetilsulfóxido del fármaco-conector 16 (10 mM, 0,088 ml, 24 equivalentes por molécula de anticuerpo) y propilenglicol (0,162 ml), y el producto resultante se hizo reaccionar con un rotador de tubos (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente durante 2 días. La mezcla de reacción se purificó de acuerdo con el procedimiento descrito en el procedimiento común D para obtener una solución del conjugado de anticuerpo diana-fármaco en ABS (3,5 ml).

El análisis se realizó de acuerdo con los procedimientos descritos en los procedimientos comunes E y G para adquirir los siguientes resultados.

40 Concentración de anticuerpo: 0,93 mg/ml

Rendimiento del anticuerpo: 3,25 mg (61 %)

Número promedio de moléculas de fármaco conjugado: 3,6

Ejemplo 109: Síntesis del conjugado de anticuerpo-fármaco 24 (síntesis del conjugado de anticuerpo anti-HER2-CDN 18)

45 Se diluyó una solución salina tamponada con fosfato del anticuerpo con glucano remodelado 1 (pH 6,0) (10,70 mg/ml, 4,00 ml) con propilenglicol (2,00 ml). A esta solución se le añadió una mezcla de una solución en dimetilsulfóxido del fármaco-conector 7 (10 mM, 0,707 ml, 24 equivalentes por molécula de anticuerpo) y propilenglicol (1,293 ml), y el producto resultante se hizo reaccionar con un rotador de tubos (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura

ambiente durante 3 días. La mezcla de reacción se purificó de acuerdo con el procedimiento descrito en el procedimiento común D para obtener una solución del conjugado de anticuerpo diana-fármaco en ABS (24,5 ml).

El análisis se realizó de acuerdo con los procedimientos descritos en los procedimientos comunes E y G para adquirir los siguientes resultados.

- 5 Concentración de anticuerpo: 1,33 mg/ml
 Rendimiento del anticuerpo: 32,64 mg (82 %)
 Número promedio de moléculas de fármaco conjugado: 3,7

Ejemplo 110: Síntesis del conjugado de anticuerpo-fármaco 25 (síntesis del conjugado de anticuerpo anti-HER2 2-CDN 2)

- 10 Se diluyó una solución salina tamponada con fosfato del anticuerpo con glucano remodelado 1 (pH 6,0) (10,87 mg/ml, 8,00 ml) con propilenglicol (4,00 ml). A esta solución se le añadió una mezcla de una solución en dimetilsulfóxido del fármaco-conector 17a (10 mM, 1,079 ml, 18 equivalentes por molécula de anticuerpo) y propilenglicol (2,921 ml), y el producto resultante se hizo reaccionar con un rotador de tubos (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente durante 3 días. La mezcla de reacción se purificó de acuerdo con el procedimiento descrito en el procedimiento común D para obtener una solución del conjugado de anticuerpo diana-fármaco en ABS (44,5 ml).
- 15 El análisis se realizó de acuerdo con los procedimientos descritos en los procedimientos comunes E y G para adquirir los siguientes resultados.

 Concentración de anticuerpo: 1,16 mg/ml
 Rendimiento del anticuerpo: 51,5 mg (59 %)

- 20 Número promedio de moléculas de fármaco conjugado: 3,8

Ejemplo 111: Síntesis del conjugado de anticuerpo-fármaco 26 (síntesis del conjugado de anticuerpo anti-HER2 2-CDN 3)

- 25 Se diluyó una solución salina tamponada con fosfato del anticuerpo con glucano remodelado 1 (pH 6,0) (10,87 mg/ml, 8,00 ml) con propilenglicol (4,00 ml). A esta solución se le añadió una mezcla de una solución en dimetilsulfóxido del fármaco-conector 17b (10 mM, 1,079 ml, 18 equivalentes por molécula de anticuerpo) y propilenglicol (2,921 ml), y el producto resultante se hizo reaccionar con un rotador de tubos (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente durante 3 días. La mezcla de reacción se purificó de acuerdo con el procedimiento descrito en el procedimiento común D para obtener una solución del conjugado de anticuerpo diana-fármaco en ABS (44,5 ml).

- 30 El análisis se realizó de acuerdo con los procedimientos descritos en los procedimientos comunes E y G para adquirir los siguientes resultados.

 Concentración de anticuerpo: 1,24 mg/ml
 Rendimiento del anticuerpo: 54,99 mg (63 %)
 Número promedio de moléculas de fármaco conjugado: 3,9

- 35 Ejemplo 112: Síntesis del conjugado de anticuerpo-fármaco 27 (síntesis del conjugado de anticuerpo anti-HER2 2-CDN 4)

- 40 Se diluyó una solución salina tamponada con fosfato del anticuerpo con glucano remodelado 1 (pH 6,0) (10,89 mg/ml, 1,00 ml) con propilenglicol (0,500 ml). A esta solución se le añadió una mezcla de una solución en dimetilsulfóxido del fármaco-conector 19 (10 mM, 0,180 ml, 24 equivalentes por molécula de anticuerpo) y propilenglicol (0,320 ml), y el producto resultante se hizo reaccionar con un rotador de tubos (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente durante 3 días. La mezcla de reacción se purificó de acuerdo con el procedimiento descrito en el procedimiento común D para obtener una solución del conjugado de anticuerpo diana-fármaco en ABS (7,0 ml).

El análisis se realizó de acuerdo con los procedimientos descritos en los procedimientos comunes E y G para adquirir los siguientes resultados.

- 45 Concentración de anticuerpo: 0,79 mg/ml
 Rendimiento del anticuerpo: 5,53 mg (51 %)
 Número promedio de moléculas de fármaco conjugado: 3,9

Ejemplo 113: Síntesis del conjugado de anticuerpo-fármaco 28 (síntesis del conjugado de anticuerpo anti-HER2 2-CDN 5)

Se diluyó una solución salina tamponada con fosfato del anticuerpo con glucano remodelado 1 (pH 6,0) (10,89 mg/ml, 1,00 ml) con propilenglicol (0,500 ml). A esta solución se le añadió una mezcla de una solución en dimetilsulfóxido del fármaco-conector 21 (10 mM, 0,180 ml, 24 equivalentes por molécula de anticuerpo) y propilenglicol (0,320 ml), y el producto resultante se hizo reaccionar con un rotador de tubos (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente durante 3 días. La mezcla de reacción se purificó de acuerdo con el procedimiento descrito en el procedimiento común D para obtener una solución del conjugado de anticuerpo diana-fármaco en ABS (7,0 ml).

El análisis se realizó de acuerdo con los procedimientos descritos en los procedimientos comunes E y G para adquirir los siguientes resultados.

Concentración de anticuerpo: 0,84 mg/ml

Rendimiento del anticuerpo: 5,91 mg (54 %)

Número promedio de moléculas de fármaco conjugado: 3,9

Ejemplo 114: Síntesis del conjugado de anticuerpo-fármaco 29 (síntesis del conjugado de anticuerpo anti-HER2 2-CDN 6)

Se diluyó una solución salina tamponada con fosfato del anticuerpo con glucano remodelado 1 (pH 6,0) (10,89 mg/ml, 1,00 ml) con propilenglicol (0,500 ml). A esta solución se le añadió una mezcla de una solución en dimetilsulfóxido del fármaco-conector 22 (10 mM, 0,180 ml, 24 equivalentes por molécula de anticuerpo) y propilenglicol (0,320 ml), y el producto resultante se hizo reaccionar con un rotador de tubos (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente durante 2 días. La mezcla de reacción se purificó de acuerdo con el procedimiento descrito en el procedimiento común D para obtener una solución del conjugado de anticuerpo diana-fármaco en ABS (5,0 ml).

El análisis se realizó de acuerdo con los procedimientos descritos en los procedimientos comunes E y G para adquirir los siguientes resultados.

Concentración de anticuerpo: 0,92 mg/ml

Rendimiento del anticuerpo: 4,60 mg (42 %)

Número promedio de moléculas de fármaco conjugado: 3,5

Ejemplo 115: Síntesis del conjugado de anticuerpo-fármaco 30 (síntesis del conjugado de anticuerpo anti-HER2 2-CDN 7)

Se diluyó una solución salina tamponada con fosfato del anticuerpo con glucano remodelado 1 (pH 6,0) (10,89 mg/ml, 1,00 ml) con propilenglicol (0,500 ml). A esta solución se le añadió una mezcla de una solución en dimetilsulfóxido del fármaco-conector 18 (10 mM, 0,180 ml, 24 equivalentes por molécula de anticuerpo) y propilenglicol (0,320 ml), y el producto resultante se hizo reaccionar con un rotador de tubos (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente durante 2 días. La mezcla de reacción se purificó de acuerdo con el procedimiento descrito en el procedimiento común D para obtener una solución del conjugado de anticuerpo diana-fármaco en ABS (7,0 ml).

El análisis se realizó de acuerdo con los procedimientos descritos en los procedimientos comunes E y G para adquirir los siguientes resultados.

Concentración de anticuerpo: 1,08 mg/ml

Rendimiento del anticuerpo: 7,53 mg (69 %)

Número promedio de moléculas de fármaco conjugado: 3,9

Ejemplo 116: Síntesis del conjugado de anticuerpo-fármaco 31 (síntesis del conjugado de anticuerpo anti-HER2 2-CDN 8)

Se diluyó una solución salina tamponada con fosfato del anticuerpo con glucano remodelado 1 (pH 6,0) (10,89 mg/ml, 1,00 ml) con propilenglicol (0,500 ml). A esta solución se le añadió una mezcla de una solución en dimetilsulfóxido del fármaco-conector 20 (10 mM, 0,180 ml, 24 equivalentes por molécula de anticuerpo) y propilenglicol (0,320 ml), y el producto resultante se hizo reaccionar con un rotador de tubos (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente durante 2 días. La mezcla de reacción se purificó de acuerdo con el procedimiento descrito en el procedimiento común D para obtener una solución del conjugado de anticuerpo diana-fármaco en ABS (7,0 ml).

El análisis se realizó de acuerdo con los procedimientos descritos en los procedimientos comunes E y G para adquirir los siguientes resultados.

Concentración de anticuerpo: 1,09 mg/ml

Rendimiento del anticuerpo: 7,62 mg (70 %)

Número promedio de moléculas de fármaco conjugado: 3,8

Ejemplo 117: Síntesis del conjugado de anticuerpo-fármaco 32 (síntesis del conjugado de anticuerpo anti-HER2 2-CDN 9)

5 Se diluyó una solución salina tamponada con fosfato del anticuerpo con glucano remodelado 1 (pH 6,0) (10,48 mg/ml, 1,00 ml) con propilenglicol (0,500 ml). A esta solución se le añadió una mezcla de una solución en dimetilsulfóxido del fármaco-conector 17a (10 mM, 0,087 ml, 12 equivalentes por molécula de anticuerpo) y propilenglicol (0,413 ml), y el producto resultante se hizo reaccionar con un rotador de tubos (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente durante 2 días. La mezcla de reacción se purificó de acuerdo con el procedimiento descrito en el procedimiento común D para obtener una solución del conjugado de anticuerpo diana-fármaco en ABS (7,0 ml).

10 El análisis se realizó de acuerdo con los procedimientos descritos en los procedimientos comunes E y G para adquirir los siguientes resultados.

Concentración de anticuerpo: 0,77 mg/ml

Rendimiento del anticuerpo: 5,36 mg (51 %)

Número promedio de moléculas de fármaco conjugado: 1,8

15 Ejemplo 118: Síntesis del conjugado de anticuerpo-fármaco 33 (síntesis del conjugado de anticuerpo anti-HER2 2-CDN 10)

20 Se diluyó una solución salina tamponada con fosfato del anticuerpo con glucano remodelado 1 (pH 6,0) (10,48 mg/ml, 1,00 ml) con propilenglicol (0,500 ml). A esta solución se le añadió una mezcla de una solución en dimetilsulfóxido del fármaco-conector 17b (10 mM, 0,087 ml, 12 equivalentes por molécula de anticuerpo) y propilenglicol (0,413 ml), y el producto resultante se hizo reaccionar con un rotador de tubos (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente durante 2 días. La mezcla de reacción se purificó de acuerdo con el procedimiento descrito en el procedimiento común D para obtener una solución del conjugado de anticuerpo diana-fármaco en ABS (7,0 ml).

El análisis se realizó de acuerdo con los procedimientos descritos en los procedimientos comunes E y G para adquirir los siguientes resultados.

25 Concentración de anticuerpo: 0,91 mg/ml

Rendimiento del anticuerpo: 6,34 mg (61 %)

Número promedio de moléculas de fármaco conjugado: 1,8

Ejemplo 119: Síntesis del conjugado de anticuerpo-fármaco 34 (síntesis del conjugado de anticuerpo anti-HER2-CDN 19)

30 Una solución de tampón fosfato de un anticuerpo anti-HER2 preparado de acuerdo con el ejemplo de referencia 1 se sometió a intercambio de tampón de acuerdo con el procedimiento común C para preparar una solución de anticuerpo en solución salina tamponada con fosfato/EDTA 5 mM (7,69 mg/ml). A esta solución de anticuerpo (0,65 ml) se le añadieron una solución acuosa de clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina (10 mM, 20,7 µl) y una solución acuosa de hidrogenofosfato dipotásico (1 M, 9,8 µl). Tras confirmar que el pH de la mezcla de reacción estaba dentro de $7,4 \pm 1,0$, la mezcla de reacción se agitó a 37 °C durante 2 horas. Se añadió una solución en DMSO del fármaco-conector 23 (10 mM, 0,0689 ml), y el producto resultante se hizo reaccionar con un rotador de tubos (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente durante 1 hora. Se añadió una solución acuosa de N-acetil-L-cisteína (100 mM, 6,9 µl) a la mezcla de reacción para inactivar la reacción. La mezcla de reacción se sometió a intercambio tampón de acuerdo con el procedimiento descrito en el procedimiento común C para obtener una solución en ABS del conjugado de anticuerpo diana-fármaco (1,6 ml).

El análisis se realizó de acuerdo con los procedimientos descritos en los procedimientos comunes E y G para adquirir los siguientes resultados.

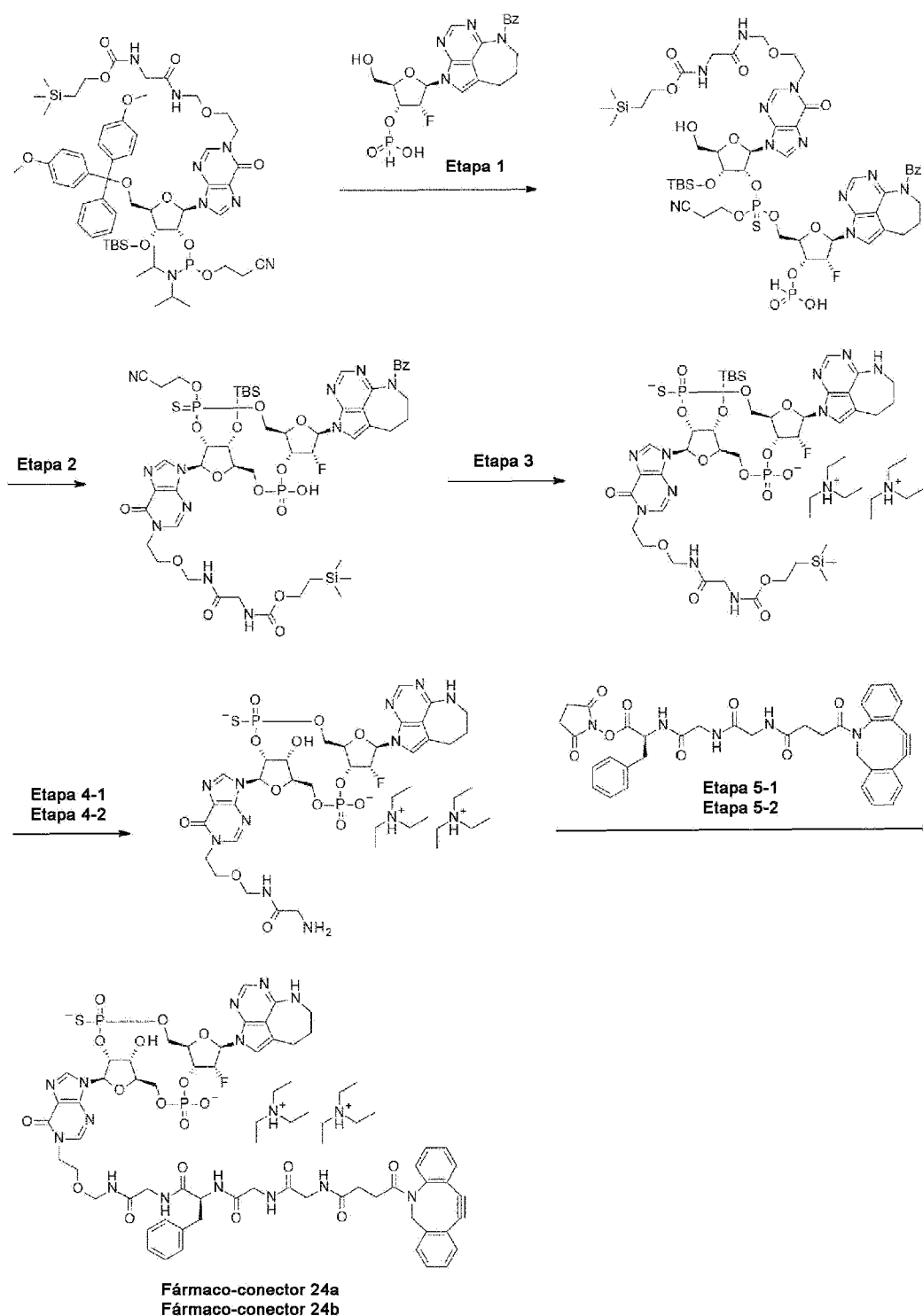
Concentración de anticuerpo: 1,46 mg/ml

Rendimiento del anticuerpo: 2,34 mg (47 %)

45 Número promedio de moléculas de fármaco conjugado: 6,5

Ejemplo 120: Síntesis del fármaco-conector 24

[Esquema de síntesis]



(Etapa 1)

Usando el compuesto obtenido en la etapa 8 del ejemplo 44 (1,55 g), la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 7 del ejemplo 1 para obtener una solución en acetonitrilo de 6-benzoyl-2-{2-desoxi-2-fluoro-3-O-[hidroxi(oxo)-λ⁵-fosfani]-β-D-ribofuranosil}-6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azuleno. Utilizando la solución en acetonitrilo obtenida y el compuesto obtenido en la etapa 6 del ejemplo 77 (1,96 g), se llevó a cabo la reacción del mismo modo que en la etapa 8 del ejemplo 1, y el producto bruto resultante se utilizó directamente para la reacción posterior.

(Etapa 2)

(2-[(2-{9-[(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-14-(6-Benzoi-6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)-16-[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-10-(2-cianoetoxi)-15-fluoro-2-hidroxi-2-oxo-10-sulfanilidenoctahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-7-il]-6-oxo-6,9-dihidro-1H-purin-1-il} etoxi)metil] amino}-2-oxoetil)carbamato de 2-(trimetilsilil)etilo

- 5 Usando el producto bruto obtenido en la etapa 1 anterior, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 2 del ejemplo 62 para obtener el compuesto del título (1,07 g: con impurezas) en forma de una mezcla de diastereómeros en el átomo de fósforo. MS (ESI) m/z: 1262 (M+H)⁺.

(Etapa 3)

- 10 (5R,7R,8R,12aR,14R,15R,16R)-16-[[Terc-butil(dimetil)silil]oxi]-15-fluoro-2,10-dioxo-7-[6-oxo-1-(2-[(N-[(2-(trimetilsilil)etoxi]carbonil)glicil]amino]methoxi)etil]-1,6-dihidro-9H-purin-9-il]-10-sulfuro-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2-olato de bis(N,N-dietiletanaminio)

- 15 Usando el compuesto (1,07 g) obtenido en la etapa 2 anterior, la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 10 del ejemplo 1, y el producto resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo] y HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo-metanol (1:1), acetonitrilo-metanol (1:1): del 25 %-90 % (0 min-40 min)] para obtener el diastereómero 1 (67,8 mg: con impurezas) y el diastereómero 2 (56,6 mg: con impurezas) del compuesto del título.

Diastereómero 1 (menos polar)

- 20 MS (ESI) m/z: 1105 (M+H)⁺.

Diastereómero 2 (más polar)

MS (ESI) m/z: 1105 (M+H)⁺.

(Etapa 4-1)

- 25 (5R,7R,8R,12aR,14R,15R,16R)-15-Fluoro-7-(1-{2-[(glicilamino)metoxi]etil}-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il)-16-hidroxi-2,10-dioxo-10-sulfuro-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2-olato de bis(N,N-dietiletanaminio)

- 30 Usando el compuesto obtenido en la etapa 3 anterior (diastereómero 1) (67,8 mg), la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 9-1 del ejemplo 11, y el producto resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo] y HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo-metanol (1:1), acetonitrilo-metanol (1:1): del 10 %-60 % (0 min-30 min)] para obtener el compuesto del título (33,7 mg: con impurezas).

MS (ESI) m/z: 847 (M+H)⁺.

(Etapa 4-2)

- 35 (5R,7R,8R,12aR,14R,15R,16R)-15-Fluoro-7-(1-{2-[(glicilamino)metoxi]etil}-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il)-16-hidroxi-2,10-dioxo-10-sulfuro-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-2-olato de bis(N,N-dietiletanaminio)

- 40 Usando el compuesto obtenido en la etapa 3 anterior (diastereómero 2) (56,6 mg), la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 9-1 del ejemplo 11, y el producto resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo] y HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo-metanol (1:1), acetonitrilo-metanol (1:1): del 10 %-60 % (0 min-30 min)] para obtener el compuesto del título (32,6 mg: con impurezas).

MS (ESI) m/z: 847 (M+H)⁺.

(Etapa 5-1)

- 45 N-[4-(11,12-Dideshidrodibenzo[b,f]azocin-5(6H)-il)-4-oxobutanoil]glicilglicil-L-fenilalanil-N-[(2-{9-[(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-15-fluoro-16-hidroxi-2-óxido-2,10-dioxo-10-sulfuro-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-7-il]-6-oxo-6,9-dihidro-1H-purin-1-il} etoxi)metil]glicinamida de bis(N,N-dietiletanaminio)

(Diastereómero 1)

Usando el compuesto obtenido en la etapa 4-1 anterior (33,7 mg) y el compuesto obtenido en la etapa 11 del ejemplo 22 (21,3 mg), la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 9-1 del ejemplo 22, y la purificación se realizó según las siguientes condiciones de purificación para obtener el compuesto del título (11,2 mg).

- 5 [Condiciones de purificación] Cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetronitrilo] y HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/metanol, metanol: del 40 %-90 % (0 min-40 min)].

MS (ESI) m/z: 1395 (M+H)⁺.

- 10 RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,57-8,54 (1H, m), 8,16-8,10 (1H, m), 8,04 (1H, s), 7,64-7,49 (2H, m), 7,44-7,34 (3H, m), 7,33-7,11 (9H, m), 6,46 (1H, d, J = 18,1 Hz), 6,26 (1H, d, J = 8,5 Hz), 5,54-5,30 (2H, m), 5,18-5,00 (2H, m), 4,75-4,71 (1H, m), 4,65-4,20 (10H, m), 4,13-3,93 (2H, m), 3,88-3,60 (8H, m), 3,55-3,40 (2H, m), 3,26-3,15 (1H, m), 3,18 (12H, q, J = 7,3 Hz), 3,02-2,91 (1H, m), 2,87-2,61 (3H, m), 2,38-2,18 (2H, m), 2,06-1,80 (3H, m), 1,28 (18H, t, J = 7,3 Hz).

(Etapas 5-2)

- 15 N-[4-(11,12-Dideshidrodibenzo[b,f]azocin-5(6H)-il)-4-oxobutanoil]glicilglicil-L-fenilalanil-N-[(2-{9-[(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-15-fluoro-16-hidroxi-2-óxido-2,10-dioxo-10-sulfuro-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzoc[d]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-1][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-7-il]-6-oxo-6,9-dihidro-1H-purin-1-il} etoxi)metil]glicinamida de bis(N,N-dietiletanaminio)

(Diastereómero 2)

- 20 Usando el compuesto obtenido en la etapa 4-2 anterior (32,6 mg) y el compuesto obtenido en la etapa 11 del ejemplo 22 (20,6 mg), la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 9-1 del ejemplo 22, y la purificación se realizó según las siguientes condiciones de purificación para obtener el compuesto del título (16,7 mg).

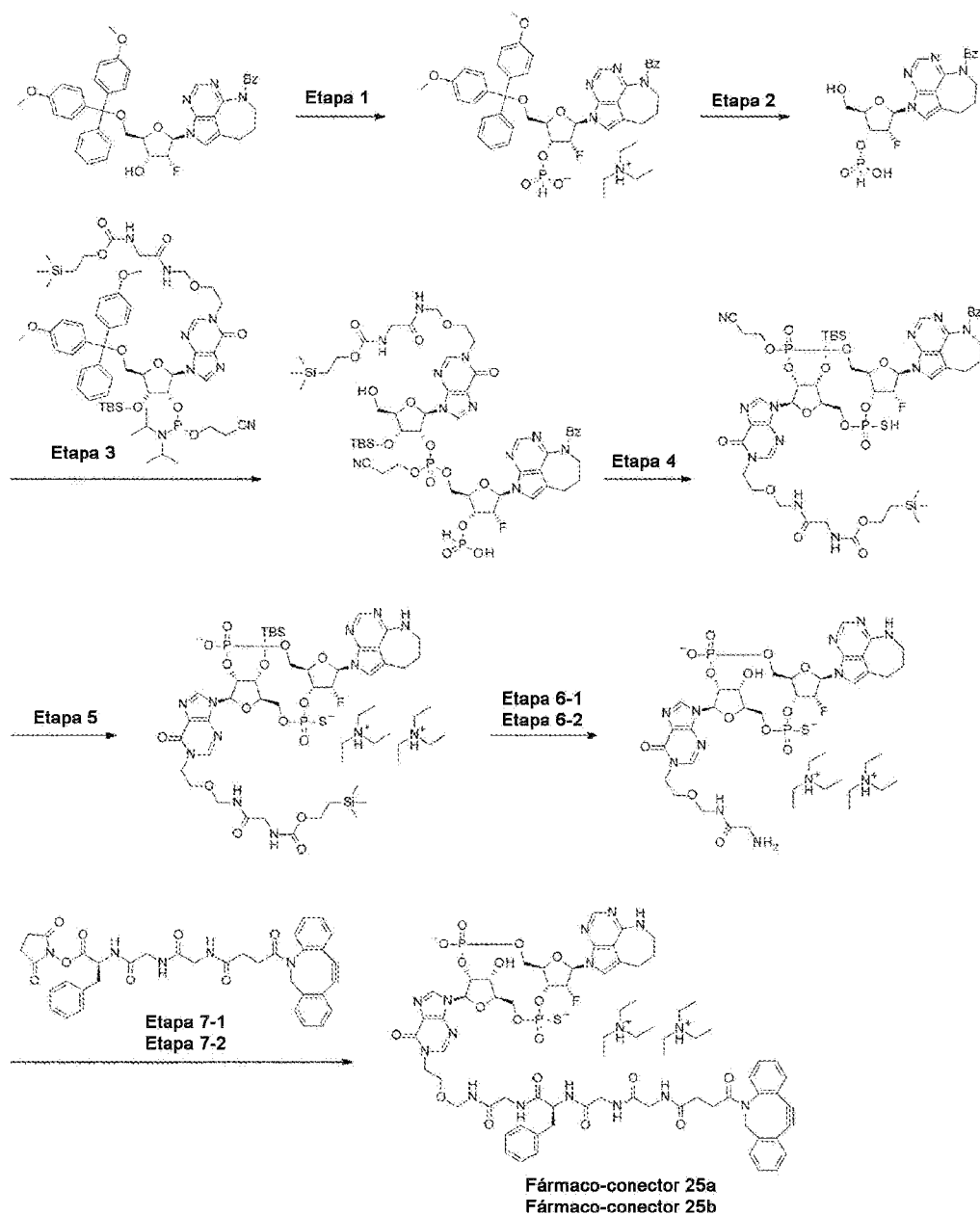
- 25 [Condiciones de purificación] Cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetronitrilo], HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/metanol, metanol: del 40 %-90 % (0 min-40 min)], y HPLC preparativa [100 mM hexafluoro-2-propanol, solución acuosa 8 mM de trietilamina/acetronitrilo, acetronitrilo: del 10 %-45 % (0 min-40 min)].

MS (ESI) m/z: 1395 (M+H)⁺.

- 30 RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,58 (1H, s), 8,17-8,13 (1H, m), 8,02 (1H, s), 7,64-7,50 (2H, m), 7,42-7,35 (4H, m), 7,32-7,12 (8H, m), 6,49 (1H, dd, J = 16,3 Hz), 6,27 (1H, dd, J = 8,2, 6,3 Hz), 5,50-5,21 (3H, m), 5,08-5,00 (1H, m), 4,66-4,23 (9H, m), 4,14-3,98 (3H, m), 3,91-3,52 (9H, m), 3,48-3,41 (2H, m), 3,23-3,12 (1H, m), 3,18 (12H, q, J = 7,3 Hz), 3,03-2,94 (1H, m), 2,85-2,75 (3H, m), 2,40-2,23 (2H, m), 2,06-1,87 (3H, m), 1,28 (18H, t, J = 7,3 Hz).

Ejemplo 121: Síntesis del fármaco-conector 25

[Esquema de síntesis]



(Etapa 1)

6-Benzoil-2-{5-O-[bis(4-metoxifenil)(fenil)metil]-2-desoxi-2-fluoro-3-O-[óxido(oxo)-λ⁵-fosfanil]-β-D-ribofuranosil]-6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzoc[cd]azuleno de N,N-dietiletanaminio

- 5 A una disolución del compuesto obtenido en la etapa 7 del ejemplo 44 (1,49 g) en piridina (10,4 ml) se le añadió fosfito de difenilo (599 µl) con refrigeración por hielo, se aumentó la temperatura hasta temperatura ambiente y se agitó la mezcla de reacción durante 30 minutos. Se añadió fosfito de difenilo (200 µl) y la mezcla de reacción se agitó durante 2 horas. Se añadió agua (1,5 ml) a la mezcla de reacción con enfriamiento con hielo, se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [acetato de etilo/metanol/trietilamina al 0,1 %] para obtener el compuesto del título (1,41 g). MS (ESI) m/z: 779 (M+H)⁺.
- 10

RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,01 (1H, s), 7,54 (1H, s), 7,42-7,39 (2H, m), 7,32-7,19 (10H, m), 7,14-7,09 (2H, s), 6,84 (1H, dd, J = 628,7, 1,8 Hz), 6,83-6,79 (4H, m), 6,53 (1H, dd, J = 17,5, 1,8 Hz), 5,54 (1H, ddd, J = 52,1, 4,0, 2,0 Hz), 5,37-5,27 (1H, m), 4,31-4,21 (3H, m), 3,55 (1H, dd, J = 11,2, 2,1 Hz), 3,38 (1H, dd, J = 10,9, 3,0 Hz), 3,34 (6H, s), 3,19 (6H, q, J = 7,5 Hz), 2,84-2,69 (2H, m), 2,18-2,12 (2H, m), 1,29 (9H, t, J = 7,3 Hz).

15

(Etapa 2)

6-Benzoil-2-{2-desoxi-2-fluoro-3-O-[hidroxi(oxo)- λ^5 -fosfani]- β -D-ribofuranosil}-6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azuleno

A una disolución del compuesto obtenido en la etapa 1 anterior (1,41 g) en diclorometano (20,0 ml) se le añadieron agua (289 μ l) y una disolución de ácido dicloroacético (1,14 ml) en diclorometano (20,0 ml), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se añadió piridina (2,19 ml) a la mezcla de reacción para inactivar la reacción, y la mezcla de reacción se concentró a presión reducida. Se añadió una sal de piridina de ácido trifluoroacético (402 mg) al residuo, y el producto resultante se destiló azeotrópicamente tres veces con acetonitrilo deshidratado (15 ml), dejando aproximadamente 10 ml de acetonitrilo tras el último procedimiento. La solución de acetonitrilo obtenida se utilizó directamente para la reacción posterior.

10 MS (ESI) m/z: 477 (M+H)⁺.

(Etapas 3)

Usando el compuesto obtenido en la etapa 6 del ejemplo 77 (2,15 g) y la disolución en acetonitrilo del compuesto obtenido en la etapa 2 anterior, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 1 del ejemplo 63, y el producto bruto resultante se usó directamente para la reacción posterior.

15 (Etapas 4)

(2-[[2-{9-[(SR,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-14-(6-Benzoil-6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)-16-[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-10-(2-cianoetoxi)-15-fluoro-2,10-dioxo-2-sulfaniloctahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2 λ^5 ,10 λ^5 -furo[3,2-1]]1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-7-il]-6-oxo-6,9-dihidro-1H-purin-1-il]etoxi)metil]amino]-2-oxoetil]carbamato de 2-(trimetilsilil)etilo

20 Usando el producto bruto obtenido en la etapa 3 anterior, la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 9 del ejemplo 1 para obtener el compuesto del título (1,00 g: con impurezas).

MS (ESI) m/z: 1262 (M+H)⁺.

(Etapas 5)

25 (5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-16-[[Terc-butil(dimetil)silil]oxi]-15-fluoro-2,10-dioxo-7-[6-oxo-1-(2-[[N-[[2-(trimetilsilil)etoxi]carbonil]glicil]amino]methoxi)etil]-1,6-dihidro-9H-purin-9-il]-2-sulfuro-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2 λ^5 ,10 λ^5 -furo[3,2-1]]1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-10-olato de bis(N,N-dietiletanaminio)

30 Usando el compuesto obtenido en la etapa 4 anterior (1,00 g), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 10 del ejemplo 1 para obtener el diastereómero 1 (191 mg: con impurezas) y el diastereómero 2 (369 mg: con impurezas) del compuesto del título.

Diastereómero 1 (menos polar)

MS (ESI) m/z: 1105 (M+H)⁺.

Diastereómero 2 (más polar)

MS (ESI) m/z: 1105 (M+H)⁺.

35 (Etapas 6-1)

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-15-Fluoro-7-(1-{2-[(glicilamino)metoxi]etil}-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il)-16-hidroxi-2,10-dioxo-2-sulfuro-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2 λ^5 ,10 λ^5 -furo[3,2-1]]1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-10-olato de bis(N,N-dietiletanaminio)

40 Usando el compuesto obtenido en la etapa 5 anterior (diastereómero 1) (191 mg), la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 5 del ejemplo 40 para obtener el compuesto del título (21,9 mg: con impurezas).

MS (ESI) m/z: 847 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CD₃OD) δ : 8,39 (1H, s), 8,03 (1H, s), 7,71 (1H, s), 7,24 (1H, s), 6,45 (1H, d, J = 17,5 Hz), 6,15 (1H, d, J = 8,5 Hz), 5,79-5,65 (2H, m), 5,46-5,36 (1H, m), 4,63-4,23 (9H, m), 4,01-3,95 (1H, m), 3,65-3,57 (2H, m), 3,52-3,37 (5H, m), 3,15 (12H, q, J = 7,3 Hz), 2,76-2,68 (1H, m), 2,39-2,30 (1H, m), 1,92-1,82 (2H, m), 1,28 (18H, t, J = 7,6 Hz).

45 (Etapas 6-2)

(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-15-Fluoro-7-(1-{2-[(glicilamino)metoxi]etil}-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il)-16-hidroxi-2,10-dioxo-2-sulfuro-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2 λ^5 ,10 λ^5 -furo[3,2-1]]1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfaciclotetradecin-10-olato de bis(N,N-dietiletanaminio)

Usando el compuesto obtenido en la etapa 5 anterior (diastereómero 2) (369 mg), la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 5 del ejemplo 40 para obtener el compuesto del título (137 mg: con impurezas).

MS (ESI) m/z: 847 (M+H)⁺.

- 5 RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,96 (1H, s), 8,14 (1H, s), 8,02 (1H, s), 7,04 (1H, s), 6,46 (1H, d, J = 19,3 Hz), 6,28 (1H, d, J = 8,5 Hz), 5,61 (1H, dd, J = 52,0, 4,2 Hz), 5,38-5,23 (2H, m), 4,69-4,63 (2H, m), 4,56 (1H, d, J = 10,3 Hz), 4,39-4,30 (4H, m), 4,26-4,17 (3H, m), 3,97-3,91 (1H, m), 3,84-3,72 (2H, m), 3,52-3,46 (2H, m), 3,32-3,25 (2H, m), 2,97 (12H, q, J = 7,3 Hz), 2,74-2,63 (2H, m), 2,03-1,84 (2H, m), 1,21 (18H, t, J = 7,3 Hz).

(Etapa 7-1)

- 10 N-[4-(11,12-Dideshidrodibenzo[b,f]azocin-5(6H)-il)-4-oxobutanoil]glicilglicil-L-fenilalanil-N-[(2-{9-[(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-15-fluoro-16-hidroxi-10-óxido-2,10-dioxo-2-sulfuro-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-1][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidofosfacilotetradecin-7-il]-6-oxo-6,9-dihidro-1H-purin-1-il} etoxi)metil]glicinamida de bis(N,N-dietiletanaminio)

(Fármaco-conector 25a: diastereómero 1)

- 15 Usando el compuesto obtenido en la etapa 6-1 anterior (21,9 mg), la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 9-1 del ejemplo 22, y la purificación se realizó a continuación según las siguientes condiciones de purificación para obtener el compuesto del título (26,3 mg).

[Condiciones de purificación] HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 30 %-50 % (0 min-30 min)] y Sep-Pak (R) C18 [agua/acetonitrilo/trietilamina al 0,1 %].

- 20 MS (ESI) m/z: 1395 (M+H)⁺.

RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,58 (1H, d, J = 4,2 Hz), 8,08-8,02 (2H, m), 7,64-7,13 (14H, m), 6,46 (1H, d, J = 18,1 Hz), 6,26-6,21 (1H, m), 5,45 (1H, d, J = 53,2 Hz), 5,35-5,18 (2H, m), 5,07-5,01 (1H, m), 4,62-4,13 (10H, m), 4,09-3,90 (2H, m), 3,87-3,43 (11H, m), 3,21-3,09 (1H, m), 3,18 (12H, q, J = 7,3 Hz), 3,00-2,89 (1H, m), 2,83-2,52 (3H, m), 2,37-2,21 (2H, m), 2,03-1,79 (3H, m), 1,28 (18H, t, J = 7,3 Hz).

- 25 (Etapa 7-2)

- 30 N-[4-(11,12-Dideshidrodibenzo[b,f]azocin-5(6H)-il)-4-oxobutanoil]glicilglicil-L-fenilalanil-N-[(2-{9-[(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-15-fluoro-16-hidroxi-10-óxido-2,10-dioxo-2-sulfuro-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenzocd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-1][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidofosfacilotetradecin-7-il]-6-oxo-6,9-dihidro-1H-purin-1-il}etoxi)metil]glicinamida de bis(N,N-dietiletanaminio)

(Fármaco-conector 25b: diastereómero 2)

Usando el compuesto obtenido en la etapa 6-2 anterior (47,5 mg), la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 9-1 del ejemplo 22, y la purificación se realizó a continuación según las siguientes condiciones de purificación para obtener el compuesto del título (15,1 mg).

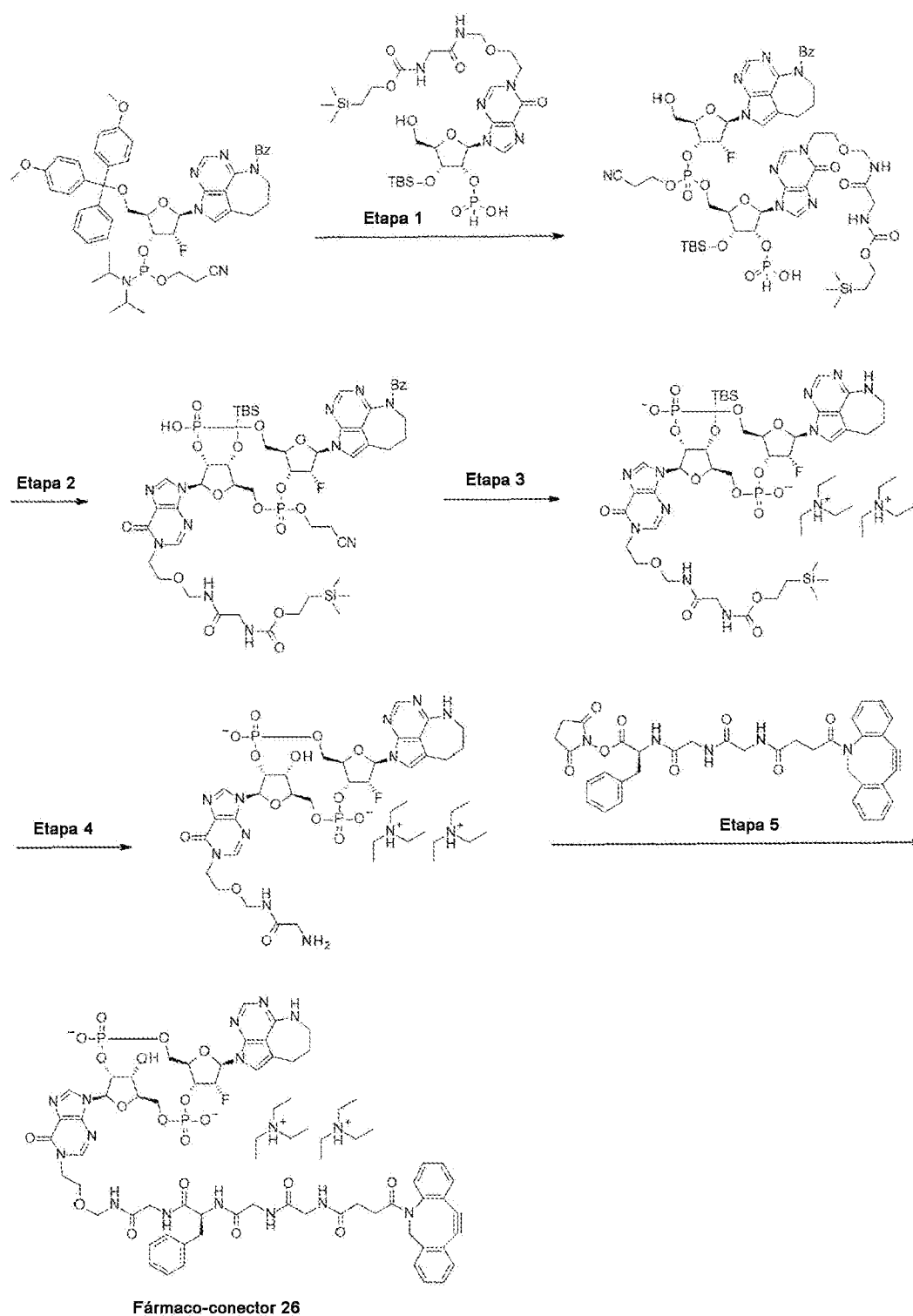
- 35 [Condiciones de purificación] HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo, acetonitrilo: del 30 %-50 % (0 min-30 min)] y Sep-Pak (R) C18 [agua/acetonitrilo/trietilamina al 0,1 %].

MS (ESI) m/z: 1395 (M+H)⁺.

- 40 RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,99 (1H, dd, J = 3,6 Hz), 8,14 (1H, d, J = 1,8 Hz), 8,02-8,00 (1H, m), 7,64-7,13 (13H, m), 7,01-6,98 (1H, m), 6,47 (1H, dd, J = 19,0, 2,7 Hz), 6,27 (1H, dd, J = 8,5, 4,2 Hz), 5,67-5,52 (1H, m), 5,37-5,16 (2H, m), 5,08-5,01 (1H, m), 4,67-4,14 (11H, m), 4,10-3,61 (10H, m), 3,47-3,42 (2H, m), 3,17-3,10 (1H, m), 3,15 (12H, q, J = 7,5 Hz), 3,00-2,92 (1H, m), 2,84-2,75 (1H, m), 2,63-2,54 (2H, m), 2,32-2,20 (2H, m), 2,03-1,79 (3H, m), 1,28 (18H, t, J = 7,3 Hz).

Ejemplo 122: Síntesis del fármaco-conector 26

[Esquema de síntesis]



(Etapa 1)

Usando el compuesto obtenido en la etapa 6 del ejemplo 77 (1,26 g), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 7 del ejemplo 1 para obtener una solución en acetonitrilo de 3'-O-[terc-butil(dimetil)silil]-2'-O-[hidroxi(oxo)-λ⁵-fosfanil]-1-(2-[[[N-{2-(trimetilsilil)etoxi]carbonil]glicil]amino]metoxi]etil)inosina. Utilizando la solución en acetonitrilo obtenida y el compuesto obtenido en la etapa 8 del ejemplo 44 (1,00 g), se llevó a cabo la reacción del mismo modo que en la etapa 1 del ejemplo 63, y el producto bruto resultante se utilizó directamente para la reacción posterior.

(Etapa 2)

(2-[(2-{9-[(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-14-(6-Benzoil-6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)-16-[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-10-(2-cianoetoxi)-15-fluoro-2-hidroxi-2,10-dioxooctahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-1][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfacilotetradecin-7-il]-6-oxo-6,9-dihidro-1H-purin-1-il}etoxi)metil] amino}-2-oxoetil)carbamato de 2-(trimetilsilil)etilo

- 5 Usando el producto bruto obtenido en la etapa 1 anterior, la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 2 del ejemplo 62 para obtener el compuesto del título (678 mg: con impurezas).

MS (ESI) m/z: 1246 (M+H)⁺.

(Etapa 3)

- 10 (2-[(2-{9-[(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-14-(6-Benzoil-6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)-16-[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-10-(2-cianoetoxi)-15-fluoro-2-hidroxi-2,10-dioxooctahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-1][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfacilotetradecin-7-il]-6-oxo-6,9-dihidro-1H-purin-1-il}etoxi)metil] amino}-2-oxoetil)carbamato de 2-(trimetilsilil)etilo

- 15 Usando el compuesto obtenido en la etapa 2 anterior (678 mg), la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 10 del ejemplo 1, y el producto resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo] y HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/solución de acetonitrilo-metanol (1:1), solución de acetonitrilo-metanol (1:1): del 25 %-90 % (0 min-30 min)] para obtener el compuesto del título (99,6 mg: con impurezas).

MS (ESI) m/z: 1089 (M+H)⁺.

(Etapa 4)

- 20 (5R,7R,8R,12aR,14R,15R,16R)-15-Fluoro-7-(1-{2-[(glicilamino)metoxi]etil}-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il)-16-hidroxi-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-1][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfacilotetradecin-2,10-bis(olato) de bis(N,N-dietiletanaminio)

- 25 Usando el compuesto obtenido en la etapa 3 anterior (99,6 mg), la reacción se llevó a cabo de la misma manera que en la etapa 9-1 del ejemplo 11, y el producto resultante se purificó entonces mediante cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo] y HPLC preparativa [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/solución de acetonitrilo-metanol (1:1), solución de acetonitrilo-metanol (1:1): del 10 %-60 % (0 min-30 min)] para obtener el compuesto del título (60,8 mg: con impurezas).

MS (ESI) m/z: 831 (M+H)⁺.

(Etapa 5)

- 30 N-[4-(11,12-Dideshidrodibenzo[b,f]azocin-5(6H)-il)-4-oxobutanoil]glicilglicil-L-fenilalanil-N-[(2-{9-[(5R,7R,8R,12aR,14R,15R,15aR,16R)-15-fluoro-16-hidroxi-2,10-dióxido-2,10-dioxo-14-(6,7,8,9-tetrahidro-2H-2,3,5,6-tetraazabenz[cd]azulen-2-il)octahidro-2H,10H,12H-5,8-metano-2λ⁵,10λ⁵-furo[3,2-1][1,3,6,9,11,2,10]pentaoxidifosfacilotetradecin-7-il]-6-oxo-6,9-dihidro-1H-purin-1-il}etoxi)metil]glicinamida de bis(N,N-dietiletanaminio)

- 35 Usando el compuesto obtenido en la etapa 4 anterior (60,8 mg) y el compuesto obtenido en la etapa 11 del ejemplo 22 (21,3 mg), la reacción se realizó de la misma manera que en la etapa 9-1 del ejemplo 22, y la purificación se realizó según las siguientes condiciones de purificación para obtener el compuesto del título (30,5 mg).

- 40 [Condiciones de purificación] Cromatografía en columna de gel de sílice C18 [solución acuosa 10 mM de acetato de trietilamonio/acetonitrilo] y HPLC preparativa [hexafluoro-2-propanol 100 mM, solución acuosa 8 mM de trietilamina/acetonitrilo, acetonitrilo: del 10 %-45 % (0 min-40 min)].

MS (ESI) m/z: 1379 (M+H)⁺.

- 45 RMN de ¹H (CD₃OD) δ: 8,56 (1H, s), 8,16-8,10 (1H, m), 8,05 (1H, s), 7,63-7,49 (2H, m), 7,45-7,35 (3H, m), 7,33-7,12 (9H, m), 6,45 (1H, d, J = 18,3 Hz), 6,27 (1H, d, J = 9,8 Hz), 5,55-4,99 (4H, m), 4,65-4,42 (5H, m), 4,38-4,01 (8H, m), 3,89-3,60 (9H, m), 3,52-3,42 (2H, m), 3,18 (12H, q, J = 7,3 Hz), 3,00-2,91 (1H, m), 2,87-2,60 (3H, m), 2,38-2,19 (2H, m), 2,04-1,81 (3H, m), 1,28 (18H, t, J = 7,3 Hz).

Ejemplo 123: Síntesis del conjugado de anticuerpo-fármaco 35 (síntesis del conjugado de anticuerpo anti-HER2 2-CDN 11)

- 50 Se diluyó una solución salina tamponada con fosfato del anticuerpo con glucano remodelado 1 (pH 6,0) (10,87 mg/ml, 1,00 ml) con propilenglicol (0,500 ml). A esta solución se le añadió una mezcla de una solución en dimetilsulfóxido del fármaco-conector 24a (10 mM, 0,135 ml, 18 equivalentes por molécula de anticuerpo) y propilenglicol (0,365 ml), y el producto resultante se hizo reaccionar con un rotador de tubos (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura

ambiente durante 2 días. La mezcla de reacción se purificó de acuerdo con el procedimiento descrito en el procedimiento común D para obtener una solución del conjugado de anticuerpo diana-fármaco en ABS (7,0 ml).

El análisis se realizó de acuerdo con los procedimientos descritos en los procedimientos comunes E y F para adquirir los siguientes resultados.

- 5 Concentración de anticuerpo: 1,08 mg/ml
 Rendimiento del anticuerpo: 7,54 mg (69 %)
 Número promedio de moléculas de fármaco conjugado: 3,8

Ejemplo 124: Síntesis del conjugado de anticuerpo-fármaco 36 (síntesis del conjugado de anticuerpo anti-HER2 2-CDN 12)

- 10 Se diluyó una solución salina tamponada con fosfato del anticuerpo con glucano remodelado 1 (pH 6,0) (10,87 mg/ml, 1,00 ml) con propilenglicol (0,500 ml). A esta solución se le añadió una mezcla de una solución en dimetilsulfóxido del fármaco-conector 24b (10 mM, 0,135 ml, 18 equivalentes por molécula de anticuerpo) y propilenglicol (0,365 ml), y el producto resultante se hizo reaccionar con un rotador de tubos (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente durante 2 días. La mezcla de reacción se purificó de acuerdo con el procedimiento descrito en el
 15 procedimiento común D para obtener una solución del conjugado de anticuerpo diana-fármaco en ABS (7,0 ml).

El análisis se realizó de acuerdo con los procedimientos descritos en los procedimientos comunes E y F para adquirir los siguientes resultados.

- Concentración de anticuerpo: 1,12 mg/ml
 Rendimiento del anticuerpo: 7,85 mg (72 %)
 20 Número promedio de moléculas de fármaco conjugado: 3,8

Ejemplo 125: Síntesis del conjugado de anticuerpo-fármaco 37 (síntesis del conjugado de anticuerpo anti-HER2 2-CDN 13)

- Se diluyó una solución salina tamponada con fosfato del anticuerpo con glucano remodelado 1 (pH 6,0) (10,87 mg/ml, 2,00 ml) con propilenglicol (1,00 ml). A esta solución se le añadió una mezcla de una solución en dimetilsulfóxido del fármaco-conector 26 (10 mM, 0,270 ml, 18 equivalentes por molécula de anticuerpo) y propilenglicol (0,730 ml), y el
 25 producto resultante se hizo reaccionar con un rotador de tubos (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente durante 2 días. La mezcla de reacción se purificó de acuerdo con el procedimiento descrito en el procedimiento común D para obtener una solución del conjugado de anticuerpo diana-fármaco en ABS (14,0 ml).

- 30 El análisis se realizó de acuerdo con los procedimientos descritos en los procedimientos comunes E y F para adquirir los siguientes resultados.

- Concentración de anticuerpo: 1,05 mg/ml
 Rendimiento del anticuerpo: 14,71 mg (68 %)
 Número promedio de moléculas de fármaco conjugado: 3,8

- 35 Ejemplo 126: Síntesis del conjugado de anticuerpo-fármaco 38 (síntesis del conjugado de anticuerpo anti-HER2 2-CDN 14)

- Se diluyó una solución salina tamponada con fosfato del anticuerpo con glucano remodelado 1 (pH 6,0) (10,89 mg/ml, 3,00 ml) con propilenglicol (1,50 ml). A esta solución se le añadió una mezcla de una solución en dimetilsulfóxido del fármaco-conector 25a (10 mM, 0,540 ml, 24 equivalentes por molécula de anticuerpo) y propilenglicol (0,960 ml), y el
 40 producto resultante se hizo reaccionar con un rotador de tubos (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente durante 3 días. La mezcla de reacción se purificó de acuerdo con el procedimiento descrito en el procedimiento común D para obtener una solución del conjugado de anticuerpo diana-fármaco en ABS (19 ml).

El análisis se realizó de acuerdo con los procedimientos descritos en los procedimientos comunes E y G para adquirir los siguientes resultados.

- Concentración de anticuerpo: 1,38 mg/ml
 45 Rendimiento del anticuerpo: 26,28 mg (80 %)
 Número promedio de moléculas de fármaco conjugado: 3,7

Ejemplo 127: Síntesis del conjugado de anticuerpo-fármaco 39 (síntesis del conjugado de anticuerpo anti-HER2 2-CDN 15)

Se diluyó una solución salina tamponada con fosfato del anticuerpo con glucano remodelado 1 (pH 6,0) (10,89 mg/ml, 0,500 ml) con propilenglicol (0,250 ml). A esta solución se le añadió una mezcla de una solución en dimetilsulfóxido del fármaco-conector 25b (10 mM, 0,090 ml, 24 equivalentes por molécula de anticuerpo) y propilenglicol (0,160 ml), y el producto resultante se hizo reaccionar con un rotador de tubos (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente durante 2 días. La mezcla de reacción se purificó de acuerdo con el procedimiento descrito en el procedimiento común D para obtener una solución del conjugado de anticuerpo diana-fármaco en ABS (3,5 ml).

El análisis se realizó de acuerdo con los procedimientos descritos en los procedimientos comunes E y G para adquirir los siguientes resultados.

Concentración de anticuerpo: 0,93 mg/ml

Rendimiento del anticuerpo: 3,25 mg (60 %)

Número promedio de moléculas de fármaco conjugado: 3,5

(Ejemplo de referencia 1: Producción del anticuerpo anti-HER2)

En el presente documento, "trastuzumab", que también se denomina HERCEPTINA (R), huMAb4D5-8 o rhuMAb4D5-8, es un anticuerpo IgG1 humanizado que incluye una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 y una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2. Para la secuencia de aminoácidos, se tomó como referencia el documento US 5821337. La figura 4 muestra las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera (SEQ ID NO: 1) y la cadena pesada (SEQ ID NO: 2) del trastuzumab.

A partir del anticuerpo anti-HER2 usado en el presente documento, se diseñó y produjo un anticuerpo IgG1 de trastuzumab con modificación en la región constante (en el presente documento, también denominado anticuerpo anti-HER2 modificado) causando la mutación de leucina (L) en alanina (A) en las posiciones 234 y 235 especificadas por la numeración del índice EU en la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de trastuzumab (en el presente documento, también denominada mutación LALA). La figura 5 muestra las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera (SEQ ID NO: 1) y la cadena pesada (SEQ ID NO: 3) del anticuerpo anti-HER2 modificado.

(Ejemplo de referencia 2: Producción del anticuerpo anti-LPS)

Se produjo un anticuerpo anti-LPS con referencia al documento WO 2015/046505. El isotipo del anticuerpo anti-LPS utilizado en los ejemplos es IgG1, y el anticuerpo anti-LPS tiene la mutación LALA (en lo sucesivo, también denominado anticuerpo anti-LPS modificado). SEQ ID NO: 26 y SEQ ID NO: 27 muestran respectivamente las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera y la cadena pesada del anticuerpo anti-LPS modificado utilizado en los ejemplos.

(Ejemplo de referencia 3: Síntesis de ML-RR-CDA-2Na⁺)

El ML-RR-CDA-2Na⁺ utilizado en el presente documento como compuesto de referencia se sintetizó de acuerdo con un procedimiento descrito en la bibliografía de patentes 3 (documento WO 2014/189805).

(Ejemplo de referencia 4: Síntesis de 2',3'-cGAMP)

Utilizando cGAS, el 2',3'-cGAMP utilizado en el presente documento como compuesto de referencia se sintetizó enzimáticamente a partir de ATP y GTP. La preparación de cGAS y la reacción enzimática se realizaron mediante un procedimiento descrito en la bibliografía (Immunity, 2013, 39, 1019-1031, Cell Rep., 2014, 6, 421-430) con las modificaciones oportunas. La purificación se realizó mediante cromatografía en columna utilizando una resina de intercambio aniónico débilmente básica (DIAION WA10) y un adsorbente sintético (SEPABEADS SP207SS).

(Ejemplo de referencia 5: Producción del anticuerpo anti-HER2 2)

Pertuzumab", que también se denomina PERJETA (R), es un anticuerpo IgG1 humanizado que incluye una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 28 y una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 29. Para la secuencia de aminoácidos, se tomó como referencia el documento WO 2004/008099. En el presente documento, el pertuzumab también se denomina anticuerpo anti-HER2 2. La figura 17 muestra las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera (SEQ ID NO: 28) y la cadena pesada (SEQ ID NO: 29) del pertuzumab.

En este caso, se diseñó y produjo el anticuerpo anti-HER2 2 que tenía no solo la mutación LALA, sino también una región constante de alotipo G1m3 con una mutación de lisina (K) en arginina (R) en la posición 214 especificada por la numeración del índice EU en la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada (en el presente documento, también denominado anticuerpo anti-HER2 modificado 2). La figura 18 muestra las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera (SEQ ID NO: 28) y la cadena pesada (SEQ ID NO: 30) del anticuerpo anti-HER2 modificado 2 utilizado en los ejemplos.

(Ejemplo de referencia 6: Producción del anticuerpo anti-CD33)

Se produjo un anticuerpo anti-CD33 con referencia al documento WO 2014/057687. El isotipo del anticuerpo anti-CD33 utilizado en los ejemplos es IgG1, y el anticuerpo anti-CD33 tiene la mutación LALA. La figura 19 muestra las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera (SEQ ID NO: 31) y la cadena pesada (SEQ ID NO: 32) del anticuerpo anti-CD33 utilizado en los ejemplos.

5 (Ejemplo de referencia 7: Producción del anticuerpo anti-EphA2)

Se produjo un anticuerpo anti-EphA2 con referencia al documento WO 2009/028639. El isotipo del anticuerpo anti-EphA2 utilizado en los ejemplos es IgG1. La figura 20 muestra las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera (SEQ ID NO: 33) y la cadena pesada (SEQ ID NO: 34) del anticuerpo anti-EphA2 utilizado en los ejemplos.

(Ejemplo de referencia 8: Producción del anticuerpo anti-CDH6)

10 Se produjo un anticuerpo anti-CDH6 con referencia al documento WO 2018/212136. El isotipo del anticuerpo anti-CDH6 utilizado en los ejemplos es IgG1, y el anticuerpo anti-CDH6 tiene no sólo la mutación LALA, sino también la mutación de prolina (P) en glicina (G) en la posición 329 especificada por la numeración del índice EU en la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada. La figura 21 muestra las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera (SEQ ID NO: 35) y la cadena pesada (SEQ ID NO: 36) del anticuerpo anti-CDH6 utilizado en los ejemplos.

15 (Ejemplo de ensayo 1) Evaluación de la actividad agonista de STING con células indicadoras

<Ensayo de genes indicadores>

La actividad agonista de STING humano se evaluó utilizando células THP1-Dual (TM) (con mutación HAQ) (InvivoGen, CA, EE. UU.), con las que se puede confirmar la activación de la vía del factor regulador del interferón-3 (IRF3), que está presente en sentido descendente de la vía de STING. La actividad agonista de STING de ratón se evaluó utilizando células RAW-Dual (TM) (InvivoGen).

El ensayo se realizó como sigue. En primer lugar, se formaron partes alícuotas de un compuesto de ensayo diluido con PBS en una placa transparente de 96 pocillos (Corning Incorporated, NY, EE.UU.) a 20 µl/pocillo. Posteriormente, se añadieron células indicadoras suspendidas en tampón de ensayo (un medio RPMI1640 o un medio DMEM con seroalbúmina bovina al 10 %) a 180 µl/pocillo (1×10^5 células/pocillo) para iniciar la estimulación. Después de cultivar las células en un entorno a 37 °C y 5 % de CO₂ durante 24 horas, se centrifugó el producto resultante para recoger el sobrenadante. A una placa blanca de 384 pocillos se le añadieron 6 µl del sobrenadante recogido y 15 µl de solución QUANTI-Luc (InvivoGen). Después de mezclar bien el producto resultante, se midió la emisión con un lector de placas (PerkinElmer, Inc., MA, EE. UU.). El valor de recuento máximo para las células tratadas con ML-RR-CDA-2Na⁺ de 1,37 a 100 µM (compuesto 21 en el documento WO 2014/189805) se definió como el 100 % y el recuento para las células tratadas con PBS como el 0 %, y se calculó una concentración necesaria para que el compuesto de ensayo produjera un recuento del 50 % como el valor de CE50 (µM) mediante GraphPad Prism (GraphPad Software, CA, EE. UU.). La tabla 1 muestra los resultados de la prueba de actividad agonista de STING humano.

Tabla 1

Número de compuesto	Células THP1-Dual IRF CE50 (µM)
1a	5,9
1b	0,3
2a	4,7
4a	2,1
4b	1,5
5a	2,4
6a	0,6
6b	2,1
7a	3,5
7b	6,1

Número de compuesto	Células THP1-Dual IRF CE50 (μM)
8a	3,1
8b	6,6
9a	5,7
9b	2,4
10a	6,3
11a	4,0
12b	1,8
17a	4,4
17b	1,0
20b	0,40
21b	0,70
22b	4,3
23a	2,6
23b	0,055
25a	1,3
25b	0,9
26a	1,4
26b	1,2
32a	1,2
32b	6,4
33a	0,18
34a	0,20
34b	0,55
35a	2,0
35b	3,4
36a	2,0
36b	2,0
37a	0,98

ES 3 017 008 T3

Número de compuesto	Células THP1-Dual IRF CE50 (μM)
37b	4,5
38a	0,45
38b	1,6
39a	0,19
39b	0,41
40a	3,4
40b	3,2
41a	1,1
41b	3,6
42a	4,2
42b	4,7
44a	0,21
44b	0,35
45a	1,2
45b	3,1
46a	3,9
46b	0,87
47a	0,58
48a	0,035
48b	0,039
49a	0,33
49b	0,41
50a	0,34
50b	0,20
51a	0,32
51b	0,43
52a	0,31
52b	0,46

Número de compuesto	Células THP1-Dual IRF CE50 (μM)
53a	6,0
54	4,0
ML-RR-CDA•2Na ⁺	4,2
2',3' -cGAMP	21,8

Estos resultados revelaron que los presentes compuestos tienen actividad agonista frente a STING humano. Además, se confirmó que los presentes compuestos tenían una actividad agonista comparable o superior a la de los CDN existentes contra STING de ratón.

- 5 (Ejemplo de ensayo 2) Ensayo de desplazamiento térmico de proteínas con proteína recombinante del dominio de unión C-terminal de STING

(i) Construcción de plásmidos de expresión

<Construcción del plásmido de expresión para TMEM173 humano>

- 10 Para un plásmido para la expresión de STING humano (en lo sucesivo, denominado a veces TMEM173 humano) en células de mamífero, se adquirió un clon de ADNc de TMEM173 humano (n.º de registro NM_198282.3, un plásmido de expresión para STING con mutación H232 (REF)) (GeneCopoeia, Inc, MD, EE.UU.) con una mutación de arginina (R) en histidina (H) en la posición 232 (en lo sucesivo, mutación H232 o mutación REF). SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 muestran, respectivamente, la secuencia de aminoácidos de STING humano con mutación H232(REF) y la secuencia de nucleótidos correspondiente. Además, se produjeron un plásmido de expresión para el STING de tipo salvaje y otro para el STING mutado mediante mutagénesis específica de sitio basada en un procedimiento de PCR inversa utilizando como plantilla el plásmido de expresión para el STING con mutación H232. En concreto, la PCR se realizó en primer lugar utilizando dos cebadores (5'-CGTGCTGGCATCAAGGATCGGGTTTAC-3'(H232R (WT) directo) (SEQ ID NO: 12) y 5'-GTCACCGGTCTGCTGGGGCAGTTTATC-3'(H232R (WT) inverso)) (SEQ ID NO: 13) y un kit de mutagénesis KOD-Plus (SMK-101) (TOYOBO CO., LTD.), y se confirmó mediante secuenciación de ADN que el plásmido de expresión deseado para el STING de tipo salvaje (R232) se había construido con éxito. SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 7 muestran respectivamente la secuencia de aminoácidos del STING humano de tipo salvaje y la secuencia de nucleótidos correspondiente.

- 25 A continuación, se produjo una forma con mutación HAQ (R71H, G230A y R293Q) de la misma manera que para el plásmido de expresión para el STING de tipo salvaje. En concreto, la PCR se realizó utilizando dos cebadores (5'-GCTGACCGTGCTGGCATCAAGGATCGGGTTTAC-3' (H232R/G230A directo) (SEQ ID NO: 14) y 5'-GGTCTGCTGGGGCAGTTTATCCAGG-3' (H232R/G230A inverso) (SEQ ID NO: 15)) y el kit de mutagénesis con el plásmido de expresión para STING con mutación H232 como plantilla. Se obtuvo un plásmido para STING con mutación G230A introduciendo la mutación simultáneamente en dos posiciones. Además, se realizó la PCR utilizando dos cebadores (5'-CACCACATCCACTCCAGGTACCGG-3' (R71H directo) (SEQ ID NO: 16) y 5'-CAGCTCCTCAGCCAGGCTGCAGAC-3' (R71H inverso) (SEQ ID NO: 17)) y el kit de mutagénesis con el plásmido de expresión para el plásmido STING con mutación G230A como plantilla para obtener un plásmido de expresión para STING con mutación R71H/G230A.

- 35 Posteriormente, se realizó la PCR utilizando dos cebadores (5'-CAGACACTTGAGGACATCCTGGCAG-3' (R293Q directo) (SEQ ID NO: 18) y 5'-GCAGAAGAGTTTGGCCTGCTCAA-3' (R293Q inverso) (SEQ ID NO: 19)) y el kit de mutagénesis con el plásmido de expresión para STING con mutación R71H/G230A como plantilla para obtener un plásmido de expresión para la forma con mutación HAQ (R71H/G230A/R293Q). SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9 muestran respectivamente la secuencia de aminoácidos de STING humano con mutación HAQ y la secuencia de nucleótidos del mismo.

- 40 La figura 6 muestra las secuencias de aminoácidos de STING humano de tipo salvaje, STING de tipo REF y STING de tipo HAQ.

<Construcción del plásmido de expresión para la proteína del dominio de unión C-terminal de STING, etc.>

- 45 El ADNc de la proteína del dominio de unión C-terminal (aa139-342) del STING humano (entrada UniProt Q86WV6) se produjo a partir de un plásmido de expresión para cada clon de ADNc de TMEM173 humano de longitud completa (tipo salvaje, con mutación H232 y con mutación HAQ) mediante PCR con dos cebadores (5'-ACCTGTATTTTCAGGGCCTGGCCCCAGCTGAGATCTCTG-3' (hST Fw_v2) (SEQ ID NO: 20) y 5'-CAGAATTCGCAAGCTTTTAAGTAACCTTCCTTTTCCTCCTGC-3' (hST Rv_V3) (SEQ ID NO: 21)). Cada producto de PCR se insertó en pET15b, un vector para la expresión con *Escherichia coli*, utilizando un kit de clonación In-Fusion

HD (Takara Bio Inc.), de modo que se incluyeran en el extremo N un marcador 6xHis que consiste en seis nucleótidos de histidina, un marcador de avidina y un sitio de corte de la proteasa TEV para construir plásmidos de expresión para las formas pET15b-ElisAviTEV-hSTING (139-342) humano de tipo salvaje, pET15b-HisAviTEV-hSTING (139-342) humano con mutación REF y pET15b-HisAviTEV-hSTING (139-342) humano con mutación AQ.

- 5 Para elADNc para la expresión de la proteína del dominio de unión C-terminal (aa138-341) de STING de ratón (entrada UniProt Q3TBT3), el ADNc correspondiente a los aminoácidos en las posiciones 138 a 341 en la secuencia del ADNc de TMEM173 de ratón fue sintetizado artificialmente por Eurofins Genomics K. K. y utilizado. SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11 muestran respectivamente la secuencia de aminoácidos de STING de ratón y la secuencia de nucleótidos del mismo. El ADNc sintetizado se insertó en pET15b, un vector para la expresión con *Escherichia coli*, utilizando un kit de clonación In-Fusion HD, de modo que se incluyeron en el extremo N un marcador 6xHis que consiste en seis nucleótidos de histidina, un marcador de avidina y un sitio de corte de la proteasa TEV para construir un plásmido de expresión para la forma salvaje de ratón pET15b-HisAviTEV-mSTING (138-341).

Se insertó ADNc de BirA de *E. coli* sintetizado artificialmente (entrada UniProt P06709) en un vector pCDF_Duet-1 para construir un plásmido de expresión para BirA pCDF_Duet-1 (1-321).

- 15 (ii) Procedimiento para preparar la proteína del dominio de unión C-terminal de STING

- Los plásmidos de expresión producidos para pET15b-HisAviTEV-hSTING (139-342) (proteínas de dominio de unión C-terminal de STING humano de tipo silvestre, humano con mutación REF y humano con mutación AQ) y el plásmido de expresión para pET15b-HisAviTEV-mSTING (138-341) (proteína del dominio de unión C-terminal de STING de tipo silvestre de ratón) se transformaron cada uno con *E. coli* Rosetta 2 (DE3) competentes (Merck Millipore, MA, US) concomitantemente con el plásmido de expresión para pCDF_Duet-1 BirA (1-321) para producir cepas que expresan HisAviTEV-STING. Cada una de estas cepas de expresión se añadió a un medio TB que contenía ampicilina 100 µg /ml, estreptomicina 50 µg/ml y kanamicina 30 µg/ml, se cultivó a 37 °C, luego se expuso a IPTG 100 µM para la expresión inducible y se siguió cultivando a 16 °C.

- 25 La solución de cultivo se centrifugó y las células bacterianas resultantes se suspendieron en HEPES 50 mM, pH 8,0, NaCl 500 mM, imidazol 20 mM, DTT 1 mM, glicerol al 5 % (p/v), sin EDTA completo, y después se sometieron a congelación-descongelación. Tras añadir lisozima y ADNasa I, se extrajeron las proteínas por disgregación ultrasónica, se centrifugó y se recogió el sobrenadante resultante. El sobrenadante obtenido se purificó utilizando un sistema de cromatografía exprés AKTA (GE Healthcare, IL, EE.UU.) con una columna HisTrap FF (GE Healthcare), y se eluyó con tampón (HEPES 20 mM, pH 7,5, NaCl 120 mM, glicerol al 20 %, DTT 0,8 mM) a través de una columna Superdex 200 16/60 (GE Healthcare). Las fracciones que contenían las proteínas con los pesos moleculares deseados se recogieron con SEC como proteína de His-Avi-TEV-hSTING (139-342) humano de tipo salvaje, proteína de HisAviTEV-hSTING (139-342) humano con mutación REF, proteína de HisAviTEV-hSTING (139-342) humano con mutación AQ y proteína de His-Avi-TEV-mSTING (138-341) de ratón de tipo salvaje. Las concentraciones de proteínas se midieron utilizando un NanoDrop2000 (Thermo Fisher Scientific, MA, EE.UU.), y las proteínas se crioconservaron a -80 °C hasta su uso.
- 30 SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 y SEQ ID NO: 25 muestran respectivamente las secuencias de aminoácidos de la proteína His-Avi-TEV-hSTING (139-342) humano de tipo salvaje, la proteína de HisAviTEV-hSTING (139-342) humano con mutación REF, la proteína de HisAviTEV-hSTING (139-342) humano con mutación AQ y la proteína de His-Avi-TEV-mSTING (138-341) de ratón de tipo salvaje.

(iii) Prueba de unión de STING

- 40 La capacidad de unión de cada compuesto a las proteínas del dominio de unión C-terminal de STING se evaluó mediante el ensayo de desplazamiento térmico de proteínas, que utiliza la elevación de la temperatura de desnaturalización térmica de la proteína como índice.

- En concreto, 3 µl de un compuesto de ensayo (concentración final: 0,5 mM), 3 µl de tinte SYPRO Orange Protein Gel Stain (Thermo Fisher Scientific) (concentración final: 20 veces) y 6 µl de una proteína STING se mezclaron con tampón de ensayo (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, NaCl 120 mM) en una placa de PCR en tiempo real de 384 pocillos, y se mezclaron con un agitador de placas. Con un sistema de PCR en tiempo real (Thermo Fisher Scientific), se aumentó la temperatura de 25 °C a 95 °C a un ritmo de 0,03 °C/s, y se midió la temperatura de desnaturalización térmica de la proteína utilizando en forma de un índice empleando la fluorescencia emitida por SYPRO Orange. A partir de la medición adquirida, se determinó la T_m (el punto medio de la transición de desplegamiento) (°C) como la temperatura a la que se maximizaba la tasa de aumento de la intensidad de fluorescencia mediante el programa informático de análisis Protein Thermal Shift (Thermo Fisher Scientific). El valor de T_m de un pocillo sin compuesto se restó del valor de T_m de cada compuesto de ensayo para calcular el desplazamiento de T_m causado por el compuesto en forma de ΔT_m (°C). La tabla 2 muestra los resultados de la prueba de unión a las proteínas STING.

Tabla 2

ES 3 017 008 T3

Número de compuesto	ΔT_m (°C)			
	Hu-WT	Hu-REF	Hu-AQ	Ms-WT
1a	8,4	3,4	12,0	14,3
4a	11,5	5,2	17,0	17,5
4b	9,8	3,5	13,1	14,9
6a	10,6	5,7	14,8	15,7
6b	8,4	3,4	11,3	12,9
7a	8,0	3,9	9,7	11,5
7b	7,2	2,8	9,5	13,2
8a	7,6	2,8	10,8	11,5
12a	8,0	3,0	9,6	11,9
17a	7,3	2,7	10,7	12,6
17b	7,4	2,2	10,4	12,6
20a	7,5	3,7	9,7	12,4
23a	9,7	4,2	12,2	15,6
25a	11,4	6,2	15,0	16,0
25b	10,6	4,6	13,1	15,8
26b	9,1	3,9	11,5	14,1
34a	14,7	8,8	18,9	20,3
34b	12,0	6,5	14,0	16,7
35a	11,0	6,6	13,1	13,5
35b	10,3	5,8	12,6	14,2
36a	10,8	5,8	13,3	15,4
36b	10,1	5,5	11,8	19,3
37a	11,2	5,2	13,6	15,3
37b	8,1	3,4	9,4	12,3
39a	10,4	5,7	12,9	15,0
39b	8,9	3,7	10,5	13,1
42a	6,5	2,8	9,0	11,2

Número de compuesto	ΔT_m (°C)			
	Hu-WT	Hu-REF	Hu-AQ	Ms-WT
42b	5,3	1,4	7,4	10,6
44a	13,4	8,7	18,2	19,3
44b	11,4	6,2	14,3	17,0
45a	8,9	4,4	10,8	12,3
45b	7,5	3,1	9,1	12,1
48a	15,9	9,3	22,2	16,0
48b	14,0	7,3	17,8	15,8
49b	12,6	6,6	16,1	19,3
50a	12,3	6,5	15,6	13,0
50b	12,3	6,3	15,3	7,4
51b	9,9	4,3	11,6	17,0
52a	10,9	5,6	13,5	14,3
52b	9,2	4,4	10,8	12,3
53a	9,6	5,4	11,6	14,3
54	8,3	3,4	9,8	12,1
ML-RR-CDA·2Na ⁺	7,0	2,7	12,7	15,2
2',3'-cGAMP	13,7	4,1	24,3	25,8

Estos resultados revelaron que los presentes compuestos tienen actividad de unión a STING de tipo salvaje humano y STING mutado, y STING de tipo salvaje de ratón.

(Ejemplo de prueba 3) Prueba antitumoral (1)

- 5 Ratones: Antes de utilizarlos para el experimento, se habituaron ratones BALB/c hembra de 5 semanas de edad (BALB/cAnNCrIrlj) (Charles River Laboratories Japan, Inc.) a las condiciones de SPF durante 4 días o más.

Medición, fórmula de cálculo: En todos los estudios, el eje mayor y el eje menor de un tumor se midieron dos o tres veces por semana utilizando un calibrador digital electrónico (CD15-CX, Mitutoyo Corporation) para calcular el volumen tumoral (mm³). La fórmula de cálculo es la siguiente:

- 10 Volumen tumora (mm³) = 0,5 x Eje mayor (mm) x [Eje menor (mm)]²

Cada compuesto de ensayo se diluyó con solución salina fisiológica (Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc.) para su uso. Para su administración, se administraron 50 μ l por vía intratumoral.

- 15 Se utilizaron células de la línea celular de cáncer colorrectal de ratón CT26.WT (CRL2638) adquiridas en la American Type Culture Collection. Las células CT26.WT se suspendieron en solución salina fisiológica, 1,0 $\times$ 10⁶ células se trasplantaron por vía subcutánea en la axila derecha de cada ratón BALB/c (día 0), y 7 días después los ratones se agruparon aleatoriamente. Cada compuesto de ensayo en una dosis de 10 μ g se administró intratumoralmente los

días 7, 9 y 11, tres veces en total. Se estableció un grupo con administración de solución salina fisiológica como grupo con vehículo. El número de ratones en cada grupo fue de cinco o seis.

Los resultados se muestran en las figuras 7a y 7b. En cada gráfico, la línea con cuadrados negros corresponde al grupo con vehículo, la línea con cuadrados blancos al grupo con administración del compuesto n.º 6a, la línea con triángulos invertidos blancos al grupo con administración del compuesto n.º 8b, y la línea con círculos blancos al grupo con administración del compuesto n.º 9b. El eje vertical representa el volumen tumoral (mm^3) y el eje horizontal representa los días tras el trasplante tumoral. El crecimiento tumoral progresó en el grupo con vehículo. En cambio, el crecimiento tumoral se redujo significativamente en los grupos con administración de un compuesto.

Estos resultados confirmaron el efecto antitumoral de la intratumoral de los derivados de dinucleótidos cíclicos.

10 (Ejemplo de prueba 4) Prueba antitumoral (2)

Se introdujo un gen HER2 humano en la línea celular de cáncer colorrectal de ratón CT26.WT (CRL2638) adquirida en la American Type Culture Collection para producir células CT26.WT-hHER2. En concreto, el ADNc se amplificó utilizando un plásmido que incluía ADNc para HER2 humano (Clone ID IOH82145; Thermo Fisher Scientific), y se insertó en un vector retroviral pQCXIN (Takara Bio Inc.) utilizando un kit de clonación In-Fusion HD (Clontech Laboratories, Inc.). El vector retroviral pQCXIN con inserción de HER2 humano se transfectó en una línea celular EcoPack2-293 (Takara Bio Inc.) con Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific), se recogió el sobrenadante que contenía el virus y se infectaron las células CT26.WT con el virus. Las células se mantuvieron en un medio con geneticina 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Thermo Fisher Scientific).

20 Cada conjugado de anticuerpo-CDN se diluyó con tampón acetato (tampón acetato 10 mM, sorbitol al 5 %, pH 5,5) (NACALAI TESQUE, INC.) para su uso. Para su administración, se introdujeron 200 μl en la vena de la cola.

25 Las células CT26.WT-hHER2 se suspendieron en solución salina fisiológica, $5,0 \times 10^6$ células se trasplantaron por vía subcutánea en la axila derecha de cada ratón BALB/c (Día 0), y 7 días después los ratones se agruparon aleatoriamente. Cada conjugado de anticuerpo-CDN en una dosis de 30 μg se administró en la vena de la cola el día 7, una vez en total. Se estableció un grupo con administración de tampón acetato como grupo con vehículo. El número de ratones en cada grupo fue de ocho.

30 Los resultados se muestran en la figura 8. En cada gráfico, la línea con cuadrados negros corresponde al grupo con un vehículo, la línea con triángulos blancos al grupo con administración de conjugado de anticuerpo anti-HER2-CDN (1), que se formó conjugando el compuesto del ejemplo 8b con el anticuerpo anti-HER2 modificado producido en el ejemplo de referencia 1, y la línea con triángulos negros al grupo con administración del conjugado de anticuerpo anti-LPS-CDN (1), que se formó de forma similar conjugando el compuesto del ejemplo 8b con el anticuerpo anti-LPS modificado producido en el ejemplo de referencia 2. El eje vertical representa el volumen tumoral (mm^3) y el eje horizontal representa los días tras el trasplante tumoral. El crecimiento tumoral progresó en el grupo con vehículo y en el grupo con administración del conjugado de anticuerpo anti-LPS-CDN (1), que no se une a HER2. En cambio, el crecimiento tumoral se redujo significativamente en el grupo con administración del conjugado de anticuerpo anti-HER2-CDN (1).

Estos resultados confirmaron el efecto antitumoral dependiente de la diana del anticuerpo de la administración intravenosa del conjugado de anticuerpo anti-HER2-CDN (1).

(Ejemplo de prueba 5) Prueba antitumoral (3)

40 Las células CT26.WT-hHER2 se suspendieron en solución salina fisiológica, $5,0 \times 10^6$ células se trasplantaron por vía subcutánea en la axila derecha de cada ratón BALB/c (Día 0), y 6 días después los ratones se agruparon aleatoriamente. Cada conjugado de anticuerpo-CDN en una dosis de 30 μg se administró en la vena de la cola el día 6, una vez en total. Se estableció un grupo con administración de tampón acetato como grupo con vehículo. El número de ratones en cada grupo fue de seis u ocho.

45 Los resultados se muestran en la figura 9. En el gráfico, la línea con cuadrados negros corresponde al grupo con vehículo, la línea con cuadrados blancos al grupo con administración del conjugado de anticuerpo anti-HER2-CDN (2), y la línea con triángulos blancos al grupo con administración del conjugado de anticuerpo anti-HER2-CDN (3). El eje vertical representa el volumen tumoral (mm^3) y el eje horizontal representa los días tras el trasplante tumoral. El crecimiento tumoral progresó en el grupo con vehículo. En cambio, el crecimiento tumoral se redujo significativamente en los grupos con administración de conjugados de anticuerpo anti-HER2-CDN (2) y (3).

50 Estos resultados confirmaron un potente efecto antitumoral de los conjugados de anticuerpo anti-HER2-CDN.

(Ejemplo de prueba 6) Prueba antitumoral (4)

Las células CT26.WT-hHER2 se suspendieron en solución salina fisiológica, $5,0 \times 10^6$ células se trasplantaron por vía subcutánea en la axila derecha de cada ratón BALB/c (Día 0), y 7 días después los ratones se agruparon aleatoriamente. El conjugado de anticuerpo-CDN (19) en una dosis de 30 μg se administró en la vena de la cola el día

7, una vez en total. Se estableció un grupo con administración de tampón acetato como grupo con vehículo. El número de ratones en cada grupo fue de seis.

Los resultados se muestran en la figura 10. En el gráfico, la línea con cuadrados negros corresponde al grupo con vehículo, y la línea con triángulos blancos al grupo con administración del conjugado de anticuerpo anti-HER2-CDN (19). En el conjugado de anticuerpo anti-HER2-CDN (19), se conjugó un fármaco-conector con el anticuerpo mediante conjugación de cisteína. El eje vertical representa el volumen tumoral (mm^3) y el eje horizontal representa los días tras el trasplante tumoral. El crecimiento tumoral progresó en el grupo con vehículo. En cambio, el crecimiento tumoral se redujo significativamente en el grupo con administración del conjugado de anticuerpo anti-HER2-CDN (19).

Estos resultados confirmaron el potente efecto antitumoral del conjugado de anticuerpo anti-HER2-CDN con conjugación por cisteína del anticuerpo y el fármaco-conector.

(Ejemplo de prueba 7) Prueba antitumoral (5)

Las células CT26.WT-hHER2 se suspendieron en solución salina fisiológica, $5,0 \times 10^6$ células se trasplantaron por vía subcutánea en la axila derecha de cada ratón BALB/c (Día 0), y 6 días después los ratones se agruparon aleatoriamente. Cada conjugado de anticuerpo-CDN en una dosis de $30 \mu\text{g}$ se administró en la vena de la cola el día 6, una vez en total. Se estableció un grupo con administración de tampón acetato como grupo con vehículo. El número de ratones en cada grupo fue de cinco.

Los resultados se muestran en la figura 11. En el gráfico, la línea con cuadrados negros corresponde al grupo con vehículo, la línea con triángulos blancos al grupo con administración del conjugado de anticuerpo anti-HER2-CDN (9), la línea con triángulos invertidos blancos al grupo con administración del conjugado de anticuerpo anti-HER2-CDN (10), la línea con rombos blancos al grupo con administración del conjugado de anticuerpo anti-HER2-CDN (11), la línea con círculos blancos al grupo con administración del conjugado de anticuerpo anti-HER2-CDN (12), y la línea con cuadrados blancos al grupo con administración del conjugado de anticuerpo anti-HER2-CDN (1). En cada uno de los conjugados de anticuerpo anti-HER2-CDN (9), (10), (11), (12) y (1), el compuesto del ejemplo 8b se conjugó mediante un conector, y los conectores son diferentes entre sí. El eje vertical representa el volumen tumoral (mm^3) y el eje horizontal representa los días tras el trasplante tumoral. El crecimiento tumoral progresó en el grupo con vehículo. En cambio, el crecimiento tumoral se redujo significativamente en los grupos con administración de los conjugados de anticuerpo anti-HER2-CDN (9), (10), (11) y (12), al igual que en el caso del grupo con administración del conjugado de anticuerpo anti-HER2-CDN (1).

Estos resultados confirmaron que los conjugados de anticuerpo anti-HER2-CDN presentan efecto antitumoral incluso para diferentes conectores.

(Ejemplo de prueba 8) Prueba antitumoral (6)

Las células CT26.WT-hHER2 se suspendieron en solución salina fisiológica, $5,0 \times 10^6$ células se trasplantaron por vía subcutánea en la axila derecha de cada ratón BALB/c (Día 0), y 7 días después los ratones se agruparon aleatoriamente. Cada muestra para la administración se administró en la vena de la cola el día 7, una vez en total. Se estableció un grupo con administración de tampón acetato como grupo con vehículo. El número de ratones en cada grupo fue de cinco.

Los resultados se muestran en la tabla 12. En el gráfico, la línea con cuadrados negros corresponde al grupo con vehículo, la línea con triángulos blancos al grupo con administración de $60 \mu\text{g}$ de conjugado de anticuerpo anti-HER2 2-CDN (1), la línea con triángulos negros invertidos al grupo con administración de $59 \mu\text{g}$ de anticuerpo 2 anti-HER2, y la línea con círculos negros al grupo con administración de $1,2 \mu\text{g}$ del compuesto n.º 8b. Cada una de las dosis del anticuerpo anti-HER2 2 y del compuesto n.º 8b es equivalente al componente correspondiente que constituye el conjugado de anticuerpo anti-HER2 2-CDN (1). El eje vertical representa el volumen tumoral (mm^3) y el eje horizontal representa los días tras el trasplante tumoral. El crecimiento tumoral progresó en el grupo con vehículo. En cambio, el crecimiento tumoral se redujo significativamente en el grupo con administración del conjugado de anticuerpo anti-HER2 2-CDN (1). Sin embargo, el crecimiento tumoral no se redujo en los grupos con la administración del equivalente del anticuerpo anti-HER2 2 o del compuesto n.º 8b.

Estos resultados confirmaron que el conjugado de anticuerpo anti-HER2 2-CDN (1) presenta efecto antitumoral, y que el equivalente del anticuerpo anti-HER2 2 y el equivalente del compuesto n.º 8b no presentan efecto antitumoral cuando se administran en la vena de la cola.

(Ejemplo de prueba 9) Prueba antitumoral (7)

Las células CT26.WT-hHER2 se suspendieron en solución salina fisiológica, $5,0 \times 10^6$ células se trasplantaron por vía subcutánea en la axila derecha de cada ratón BALB/c (Día 0), y 7 días después los ratones se agruparon aleatoriamente. Cada conjugado de anticuerpo-CDN en una dosis de $30 \mu\text{g}$ se administró en la vena de la cola el día 7, una vez en total. Se estableció un grupo con administración de tampón acetato como grupo con vehículo. El número de ratones en cada grupo fue de cinco o seis.

Los resultados se muestran en las figuras 13(a) a 13(c). En cada gráfico, la línea con cuadrados negros corresponde al grupo con vehículo, y cada línea con símbolos blancos a un grupo con administración a un sujeto evaluado de los conjugados de anticuerpo anti-HER2 2-CDN (2), (3), (4), (5), (6), (7) y (8). El eje vertical representa el volumen tumoral (mm^3) y el eje horizontal representa los días tras el trasplante tumoral. El crecimiento tumoral progresó en el grupo con vehículo. En cambio, el crecimiento tumoral se redujo significativamente en los grupos con administración de los conjugados de anticuerpos anti-HER2 2-CDN (2), (3), (4), (5), (6), (7) y (8).

Estos resultados confirmaron un potente efecto antitumoral de los conjugados de anticuerpo anti-HER2 2-CDN.

(Ejemplo de prueba 10) Prueba antitumoral (8)

Las células CT26.WT-hHER2 se suspendieron en solución salina fisiológica, $5,0 \times 10^6$ células se trasplantaron por vía subcutánea en la axila derecha de cada ratón BALB/c (Día 0), y 7 días después los ratones se agruparon aleatoriamente. Cada conjugado de anticuerpo-CDN en una dosis de 60 μg se administró en la vena de la cola el día 7, una vez en total. Se estableció un grupo con administración de tampón acetato como grupo con vehículo. El número de ratones en cada grupo fue de cinco.

Los resultados se muestran en la figura 14. En el gráfico, la línea con cuadrados negros corresponde al grupo con vehículo, la línea con triángulos blancos al grupo con administración del conjugado de anticuerpo anti-HER2 2-CDN (9), y la línea con círculos blancos al grupo con administración del conjugado de anticuerpo anti-HER2 2-CDN (10). Los conjugados de anticuerpo anti-HER2 2-CDN (9) y (10) son conjugados de anticuerpo-CDN que utilizan un anticuerpo con glucano remodelado de tipo MSG, con un número promedio de moléculas de fármaco conjugado de aproximadamente 2. El eje vertical representa el volumen tumoral (mm^3) y el eje horizontal representa los días tras el trasplante tumoral. El crecimiento tumoral progresó en el grupo con vehículo. En cambio, el crecimiento tumoral se redujo significativamente en los grupos con administración de los conjugados de anticuerpo anti-HER2 2-CDN (9) y (10).

Estos resultados confirmaron un potente efecto antitumoral de los conjugados de anticuerpos anti-HER2 2-CDN con un número promedio de moléculas de fármaco conjugado de aproximadamente 2.

(Ejemplo de prueba 11) Prueba antitumoral (9)

Se introdujo un gen EphA2 humano en la línea celular de cáncer colorrectal de ratón CT26.WT (CRL2638) adquirida en la American Type Culture Collection para producir células CT26.WT-hEphA2. En concreto, el ADNc se amplificó utilizando pDONR221, que incluía ADNc para EphA2 humano (Thermo Fisher Scientific), y se insertó en un vector retroviral pLNCX (Takara Bio Inc.) mediante un sistema de conversión de vectores Gateway (Thermo Fisher Scientific). El vector retroviral pLNCX con inserción de EphA2 humano se transfectó en una línea celular EcoPack2-293 (Takara Bio Inc.) con Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific), se recogió el sobrenadante que contenía el virus y se infectaron células CT26.WT con el virus. Las células se mantuvieron en un medio con geneticina 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Thermo Fisher Scientific).

Las células CT26.WT-hEphA2 se suspendieron en tampón fosfato, $1,9 \times 10^6$ células se trasplantaron por vía subcutánea en la axila derecha de cada ratón BALB/c (Día 0), y 7 días después los ratones se agruparon aleatoriamente. Cada uno de los anticuerpos anti-EphA2 y el conjugado de anticuerpo anti-EphA2-CDN (1) en una dosis de 60 μg se administró en la vena de la cola el día 7, una vez en total. Se estableció un grupo con administración de tampón acetato como grupo con vehículo. El número de ratones en cada grupo fue de ocho.

Los resultados se muestran en la figura 15. En el gráfico, la línea con cuadrados negros corresponde al grupo con vehículo, la línea con círculos blancos al grupo con administración del anticuerpo anti-EphA2, y la línea con triángulos blancos al grupo con administración del conjugado de anticuerpo anti-EphA2-CDN (1). El eje vertical representa el volumen tumoral (mm^3) y el eje horizontal representa los días tras el trasplante tumoral. El crecimiento tumoral progresó en el grupo con vehículo. El crecimiento tumoral no se redujo en el grupo con administración del anticuerpo anti-EphA2. En cambio, el crecimiento tumoral se redujo significativamente en el grupo con administración del conjugado de anticuerpo anti-EphA2-CDN (1).

Estos resultados, utilizando un modelo en el que el anticuerpo anti-EphA2 no muestra efecto antitumoral, confirmaron un potente efecto antitumoral del conjugado de anticuerpo anti-EphA2-CDN.

(Ejemplo de prueba 12) Prueba antitumoral (10)

Se introdujo un gen CD33 humano en la línea celular linfóide de ratón P388D1 (CCL-46) adquirida de la American Type Culture Collection para producir células P388D1-hCD33. En concreto, se produjo un vector lentiviral pLVSI (Takara Bio Inc.) con ADNc para CD33 humano insertado en él, y se transfectó en una línea celular Lenti-X293T (Takara Bio Inc.) utilizando una mezcla de encapsidación lentiviral con valoración alta (Takara Bio Inc.), se recogió el sobrenadante que contenía el virus y se infectaron células P388D1 con el virus. Las células se mantuvieron en un medio con puromicina 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Thermo Fisher Scientific).

Se adquirieron ratones hembra DBA/2 (DBA/2NcrJ) de cuatro semanas de edad (Charles River Laboratories Japan, Inc.), y se habituaron a las condiciones de SPF durante 5 días antes de utilizarlos para el experimento.

Las células P388D1-hCD33 se suspendieron en tampón fosfato, $1,0 \times 10^6$ células se trasplantaron por vía subcutánea en la axila derecha de cada ratón DBA/2 (Día 0), y 4 días después los ratones se agruparon aleatoriamente. Cada uno de los anticuerpos anti-CD33 y el conjugado de anticuerpo anti-CD33-CDN (1) en una dosis de 60 µg se administró en la vena de la cola el día 4, una vez en total. Se estableció un grupo con administración de tampón acetato como grupo con vehículo. El número de ratones en cada grupo fue de 10.

Los resultados se muestran en la figura 16. En el gráfico, la línea con cuadrados negros corresponde al grupo con vehículo, la línea con círculos blancos al grupo con administración del anticuerpo anti-CD33, y la línea con triángulos blancos al grupo con administración del conjugado de anticuerpo anti-CD33-CDN (1). El eje vertical representa el volumen tumoral (mm^3) y el eje horizontal representa los días tras el trasplante tumoral. El crecimiento tumoral progresó en el grupo con vehículo. El crecimiento tumoral no se redujo en el grupo con administración del anticuerpo anti-CD33. En cambio, el crecimiento tumoral se redujo significativamente en el grupo con administración del conjugado de anticuerpo anti-CD33-CDN (1).

Estos resultados, utilizando un modelo en el que el anticuerpo anti-CD33 no muestra efecto antitumoral, confirmaron un potente efecto antitumoral del conjugado de anticuerpo anti-CD33-CDN.

(Ejemplo de prueba 13) Prueba antitumoral (11)

Las células CT26.WT-hHER2 se suspendieron en solución salina fisiológica, $5,0 \times 10^6$ células se trasplantaron por vía subcutánea en la axila derecha de cada ratón BALB/c (Día 0), y 7 días después los ratones se agruparon aleatoriamente. Cada conjugado de anticuerpo-CDN en una dosis de 60 µg se administró en la vena de la cola el día 7, una vez en total. Se estableció un grupo con administración de tampón acetato como grupo con vehículo. El número de ratones en cada grupo fue de seis.

Los resultados se muestran en la figura 22. En el gráfico, la línea con cuadrados negros corresponde al grupo con vehículo, la línea con triángulos blancos al grupo con administración del conjugado de anticuerpo anti-HER2 2-CDN (11), y la línea con círculos blancos al grupo con administración del conjugado de anticuerpo anti-HER2 2-CDN (12). El compuesto n.º 52a y el compuesto n.º 52b conjugados con los conjugados de anticuerpo anti-HER2 2-CDN (11) y (12), respectivamente, son cada uno un CDN que tiene un grupo fosfato. El eje vertical representa el volumen tumoral (mm^3) y el eje horizontal representa los días tras el trasplante tumoral. El crecimiento tumoral progresó en el grupo con vehículo. En cambio, el crecimiento tumoral se redujo significativamente en los grupos con administración de los conjugados de anticuerpo anti-HER2 2-CDN (11) y (12).

Estos resultados confirmaron un potente efecto antitumoral de los conjugados de anticuerpo anti-HER2 2-CDN (11) y (12) con un CDN que tiene un grupo fosfato conjugado.

Aplicabilidad industrial

Se divulgan nuevos derivados de CDN que tienen una potente actividad agonista de STING y presentan un potente efecto antitumoral. La presente invención proporciona conjugados de anticuerpo-fármaco que incluyen los nuevos derivados de CDN. Son útiles como agentes terapéuticos para enfermedades asociadas a la actividad agonista de STING (por ejemplo, el cáncer).

Texto libre del listado de secuencias

SEQ ID NO: 1: Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de trastuzumab

SEQ ID NO: 2: Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de trastuzumab

SEQ ID NO: 3: Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER2 modificado

SEQ ID NO: 4: Secuencia de aminoácidos de STING humano con mutación H232(REF)

SEQ ID NO: 5: Secuencia de ácido nucleico de STING humano con mutación H232(REF)

SEQ ID NO: 6: Secuencia de aminoácidos de STING humano de tipo salvaje

SEQ ID NO: 7: Secuencia de ácido nucleico de STING humano de tipo salvaje

SEQ ID NO: 8: Secuencia de aminoácidos de STING humano con mutación HAQ

SEQ ID NO: 9: Secuencia de ácido nucleico de STING humano con mutación HAQ

SEQ ID NO: 10: Secuencia de aminoácidos de STING de ratón

SEQ ID NO: 11: Secuencia de ácido nucleico de STING de ratón

SEQ ID NO: 12 a 21: Secuencias de cebadores

	SEQ ID NO: 22: Secuencia de aminoácidos de la proteína de HisAviTEV-hSTING (139-342) humano de tipo salvaje
	SEQ ID NO: 23: Secuencia de aminoácidos de la proteína de HisAviTEV-hSTING (139-342) humano con mutación REF
5	SEQ ID NO: 24: Secuencia de aminoácidos de la proteína de HisAviTEV-hSTING (139-342) humano con mutación REF
	SEQ ID NO: 25: Secuencia de aminoácidos de la proteína de His-Avi-TEV-mSTING (138-341) de ratón de tipo salvaje
	SEQ ID NO: 26: Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo anti-LPS modificado
10	SEQ ID NO: 27: Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo anti-LPS modificado
	SEQ ID NO: 28: Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de pertuzumab
	SEQ ID NO: 29: Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de pertuzumab
	SEQ ID NO: 30: Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER2 modificado 2
	SEQ ID NO: 31: Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo anti-CD33
15	SEQ ID NO: 32: Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo anti-CD33
	SEQ ID NO: 33: Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo anti-EphA2
	SEQ ID NO: 34: Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo anti-EphA2
	SEQ ID NO: 35: Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo anti-CDH6
	SEQ ID NO: 36: Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo anti-CDH6
20	

$$\text{Ab}-\left[\text{L}-\text{D}\right]_{m^1} \quad (\text{II})$$

5 m^1 está en el intervalo de 1 a 10;

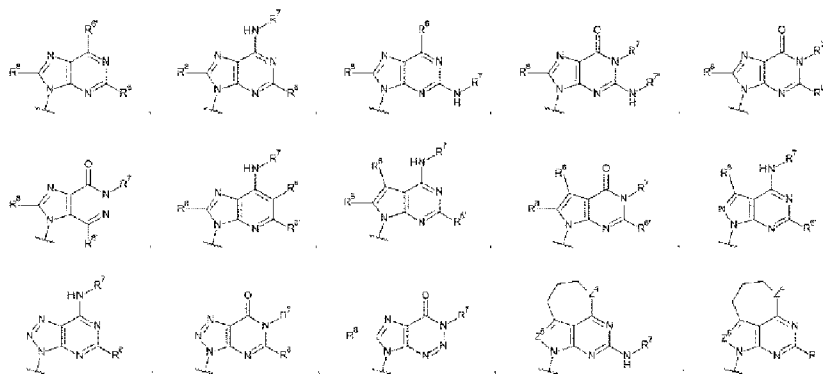
L representa un conector que une A_b y D:

10 Ab se une directamente desde un residuo de aminoácido de Ab a L; u opcionalmente se une a través de un glucano o glucano remodelado de Ab a L; y

(I)

L se une a cualquier grupo -NH₂ o hidroxilo incluido en L¹ o L²;

15 L¹ representa un grupo seleccionado del grupo que consiste en las siguientes fórmulas:

O=C1NC(=O)C(R2)C(R1)N(R3)C1=O

en las que:

25 R⁶ y R^{6'} representan cada uno independientemente un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, un grupo hidroxilo, -NH₂, un grupo alquilo C1-C6, un grupo alqueno C2-C6 o un grupo alquino C2-C6;

R^7 y R^7 representan cada uno independientemente un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C1-C6, en el que el grupo alquilo C1-C6 está opcionalmente sustituido con uno o dos sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en un átomo de halógeno y un grupo oxo;

R^8 y R^8 representan cada uno independientemente un átomo de hidrógeno o un átomo de halógeno;

5 Z^4 representa $-CH_2-$, $-NH-$ o un átomo de oxígeno; y

Z^5 representa un átomo de nitrógeno o $-CH=$,

L^2 representa un grupo seleccionado entre (i) y (ii):

10 (i) cuando se une a L, L^2 representa $-NHR'$, un grupo hidroxialquilo C1-C6, o un grupo aminoalquilo C1-C6, en el que R' representa un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C1-C6, un grupo alqueno C2-C6, un grupo alquino C2-C6 o un grupo cicloalquilo C3-C6, y el grupo alquilo C1-C6, el grupo alqueno C2-C6 o el grupo alquino C2-C6 está opcionalmente sustituido con uno a seis átomos de halógeno; y

(ii) cuando no se une a L, L^2 representa un átomo de hidrógeno o un átomo de halógeno;

Q^1 y Q^1 representan cada uno independientemente un grupo hidroxilo, un grupo tiol o un grupo borano (BH_3);

Q^2 y Q^2 representan cada uno independientemente un átomo de oxígeno o un átomo de azufre;

15 X^1 y X^2 representan cada uno independientemente un átomo de oxígeno, un átomo de azufre o $-CH_2-$;

Y^1 y Y^2 representan cada uno un átomo de oxígeno o $-CH_2-$;

X^3 y X^4 representan un grupo seleccionado entre (iii) y (iv):

(iii) cuando Y^1 es un átomo de oxígeno, X^3-X^4 representa $-CH_2-O-$, $-CH_2-S-$, $-CH_2-CH_2-$ o $-CH_2-CF_2-$; y

(iv) cuando Y^1 es $-CH_2-$, X^3-X^4 representa $-O-CH_2-$;

20 X^5 y X^6 representan un grupo seleccionado entre (v) y (vi):

(v) cuando Y^2 es un átomo de oxígeno, X^5-X^6 representa $-CH_2-O-$, $-CH_2-S-$, $-CH_2-CH_2-$ o $-CH_2-CF_2-$; y

(vi) cuando Y^2 es $-CH_2-$, X^5-X^6 representa $-O-CH_2-$;

25 R^1 , R^2 y R^3 representan cada uno independientemente un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, $-OR'$, $-OC(=O)R'$, $-N_3$, $-NHR'$, $-NR'R''$ o $-NHC(=O)R'$, en los que R' es como se ha definido anteriormente, y R'' representa un grupo alquilo C1-C6, un grupo alqueno C2-C6, un grupo alquino C2-C6 o un grupo cicloalquilo C3-C6;

W^1 representa un átomo de nitrógeno, un átomo de oxígeno, un átomo de azufre o $-CH-$;

W^2 representa un átomo de nitrógeno o $-CH=$;

R^4 representa un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno o $-NH_2$;

30 R^5 representa un grupo seleccionado entre (vii) y (x):

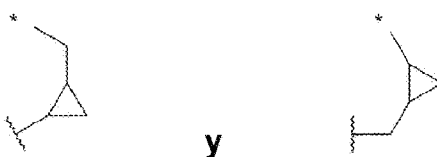
(vii) cuando W^1 es un átomo de nitrógeno, R^5 representa un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C1-C6, un grupo hidroxialquilo C1-C6 o un grupo aminoalquilo C1-C6;

(viii) cuando W^1 es un átomo de oxígeno, R^5 está ausente;

(ix) cuando W^1 es un átomo de azufre, R^5 está ausente; y

35 (x) cuando W^1 es $-CH-$, R^5 representa un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, un grupo hidroxilo, $-NH_2$ o un grupo alquilo C1-C6;

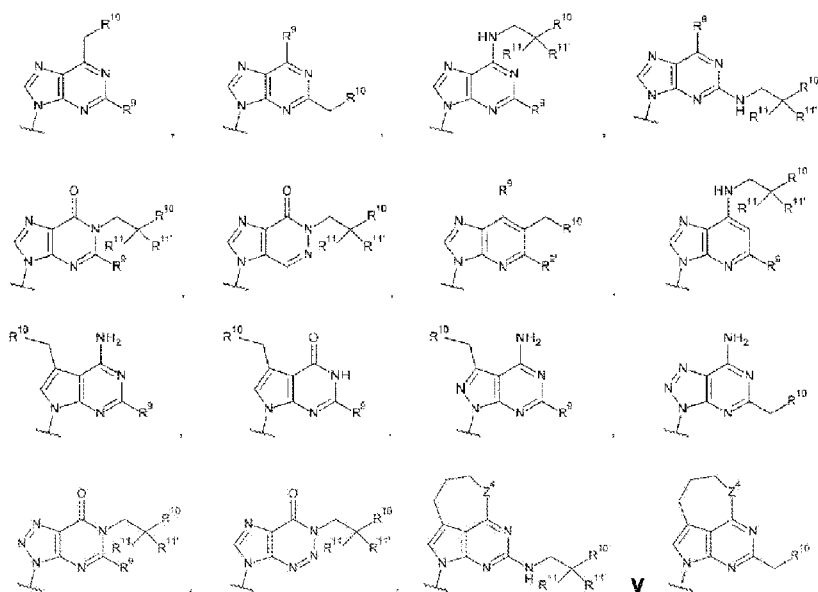
40 $Z^1-Z^2-Z^3$ juntos representan $-CH_2-CH_2-CH_2-$, $-CH_2-CH_2-R'''$, $-CH=CH-CH_2-$, $-CH=CX-CH_2-$, $-CX=CH-CH_2-$, $-CX=CX-CH_2-$, $-C(=O)-CH_2-CH_2-$, $-CH_2-CH_2-C(=O)-$, $-CH_2-CH(CH_3)-CH_2-$ o $-CH_2-CH_2-CH(CH_3)-$, en los que R''' representa $-O-$ o $-CH_2-CH_2-$ y X representa un átomo de halógeno, o un grupo representado por una de las siguientes fórmulas:



en las que:

cada asterisco indica unión a W^1 , y cada línea ondulada indica unión al átomo de carbono de $=C-$.

2. El conjugado de anticuerpo-fármaco según la reivindicación 1, en el que W^1 es un átomo de nitrógeno, y preferentemente en el que W^1 es un átomo de nitrógeno y R^5 es un átomo de hidrógeno.
3. El conjugado de anticuerpo-fármaco según la reivindicación 1, en el que W^1 es un átomo de oxígeno o en el que W^1 es un átomo de azufre.
4. El conjugado de anticuerpo-fármaco según la reivindicación 1, en el que W^1 es $-CH-$, y preferentemente en el que W^1 es $-CH-$ y R^5 es un átomo de hidrógeno.
5. El conjugado de anticuerpo-fármaco según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que Z^1 , Z^2 y Z^3 juntos forman $-CH_2-CH_2-CH_2-$ o $-CH=CH-CH_2-$, o en el que Z^1 , Z^2 y Z^3 juntos forman $-CH_2-CH(CH_3)-CH_2-$ o $-CH_2-CH_2-CH(CH_3)-$, o en el que Z^1 , Z^2 y Z^3 juntos forman $-CH_2-CH_2-R'''$, en el que R''' representa $-O-$ o $-CH_2-CH_2-$.
6. El conjugado de anticuerpo-fármaco según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que W^2 es $-CH=$ o en el que W^2 es un átomo de nitrógeno.
7. El conjugado de anticuerpo-fármaco según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que R^4 representa un átomo de hidrógeno o en el que R^4 representa un átomo de flúor.
8. El conjugado de anticuerpo-fármaco según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que R^8 y $R^{8'}$ en L^1 son cada uno independientemente un átomo de hidrógeno.
9. El conjugado de anticuerpo-fármaco según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que L^1 es un grupo seleccionado del grupo que consiste en las siguientes fórmulas:



en las que:

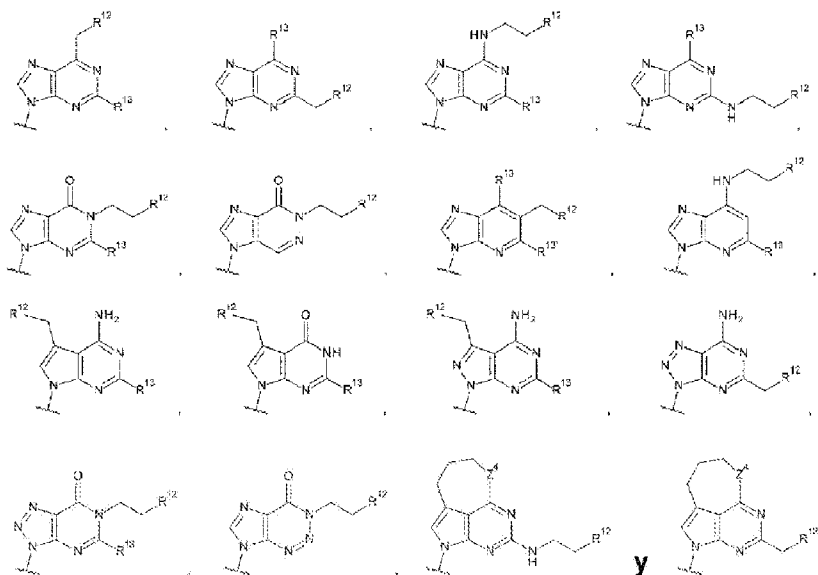
R^9 y $R^{9'}$ representan cada uno un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, un grupo hidroxilo o $-NH_2$;

R^{10} representa un grupo hidroxilo, $-NH_2$, $-NHC(=O)CH_2OH$, $-CH_2NHC(=O)CH_2OH$, $-CH_2CH_2NHC(=O)CH_2OH$, un grupo hidroxialquilo C1-C3 o un grupo aminoalquilo C1-C3;

R^{11} y $R^{11'}$ representan cada uno independientemente un átomo de hidrógeno, un átomo de flúor o un grupo metilo, o R^{11} y $R^{11'}$ se unen para formar ciclopropano; y

Z^4 representa $-CH_2-$, $-NH-$, o un átomo de oxígeno,

o en el que L¹ es un grupo seleccionado del grupo que consiste en las siguientes fórmulas:



5

en las que:

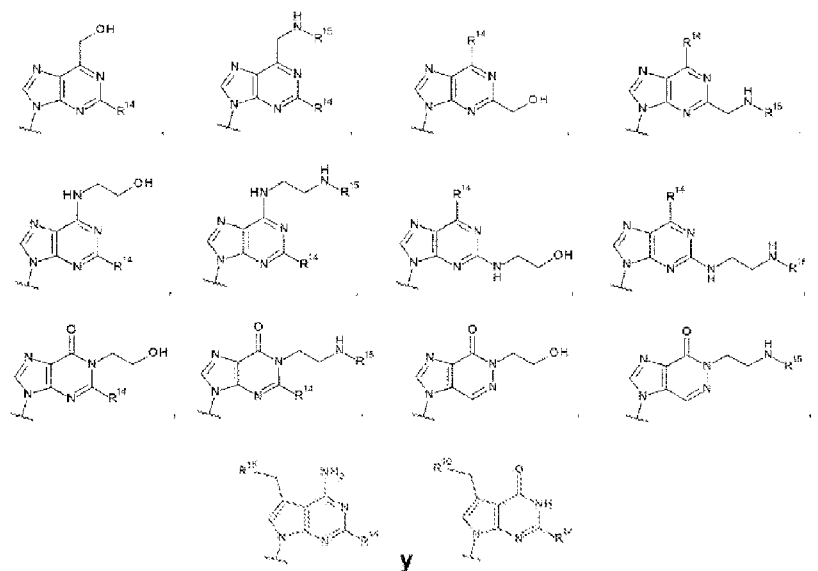
R¹³ y R^{13'} representan cada uno independientemente un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo o -NH₂;

R¹² representa un grupo hidroxilo, -NH₂, -CH₂OH, -NHC(=O)CH₂OH, -CH₂NHC(=O)CH₂OH o -CH₂CH₂NHC(=O)CH₂OH; y

10

Z⁴ es como se ha definido anteriormente,

o en el que L¹ es un grupo seleccionado del grupo que consiste en las siguientes fórmulas:



15

en las que:

R¹⁴ representa un átomo de hidrógeno o -NH₂;

R¹⁵ representa un átomo de hidrógeno o -C(=O)CH₂OH; y

R¹⁶ representa un grupo hidroxilo, -NH₂, -CH₂OH, -CH₂CH₂OH, -CH₂NH₂, o -CH₂CH₂NH₂.

20 10. El conjugado de anticuerpo-fármaco según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que L² se une a L y representa -NH₂, -CH₂NH₂ o -CH₂OH, o en el que L² no se une a L y representa un átomo de hidrógeno o un átomo de flúor.

11. El conjugado de anticuerpo-fármaco según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que Q¹ y Q^{1'} representan cada uno independientemente un grupo hidroxilo o un grupo tiol.

12. El conjugado de anticuerpo-fármaco según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que X¹ y X² representan cada uno un átomo de oxígeno.

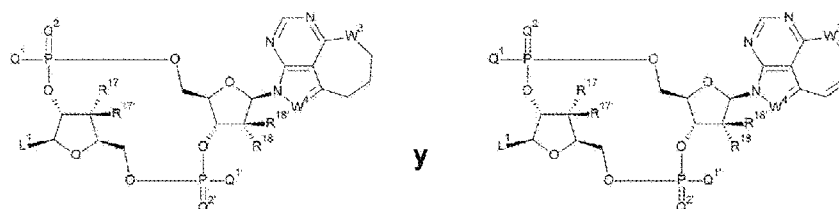
5 13. El conjugado de anticuerpo-fármaco según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que Y¹ e Y² representan cada uno un átomo de oxígeno.

14. El conjugado de anticuerpo-fármaco según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que X³ y X⁴ representan -CH₂-O-.

10 15. El conjugado de anticuerpo-fármaco según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que X⁵ y X⁶ representan -CH₂-O-.

16. El conjugado de anticuerpo-fármaco según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en el que R¹, R², y R³ son cada uno independientemente un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo o un átomo de flúor.

17. El conjugado de anticuerpo-fármaco según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en el que D se representa con una de las dos fórmulas siguientes:



15

en las que:

L¹, Q¹, Q^{1'}, Q² y Q^{2'} son como se han definido anteriormente;

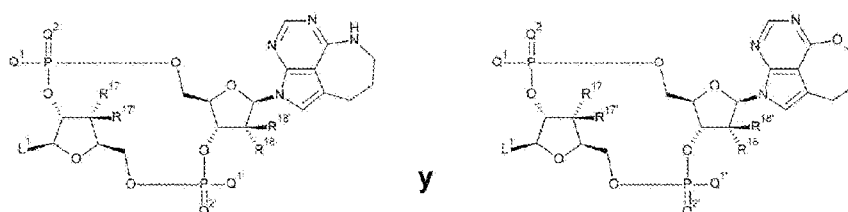
R¹⁷, R^{17'}, R¹⁸ y R^{18'} representan cada uno independientemente un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, un grupo hidroxilo o -NH₂;

20

W³ representa -NH-, un átomo de oxígeno, un átomo de azufre o -CH₂-; y

W⁴ representa -CH= o un átomo de nitrógeno,

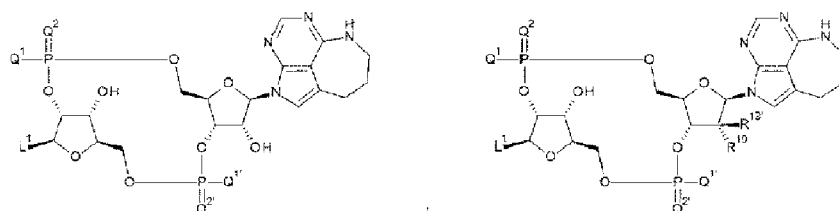
preferentemente en el que D se representa con una de las dos fórmulas siguientes:

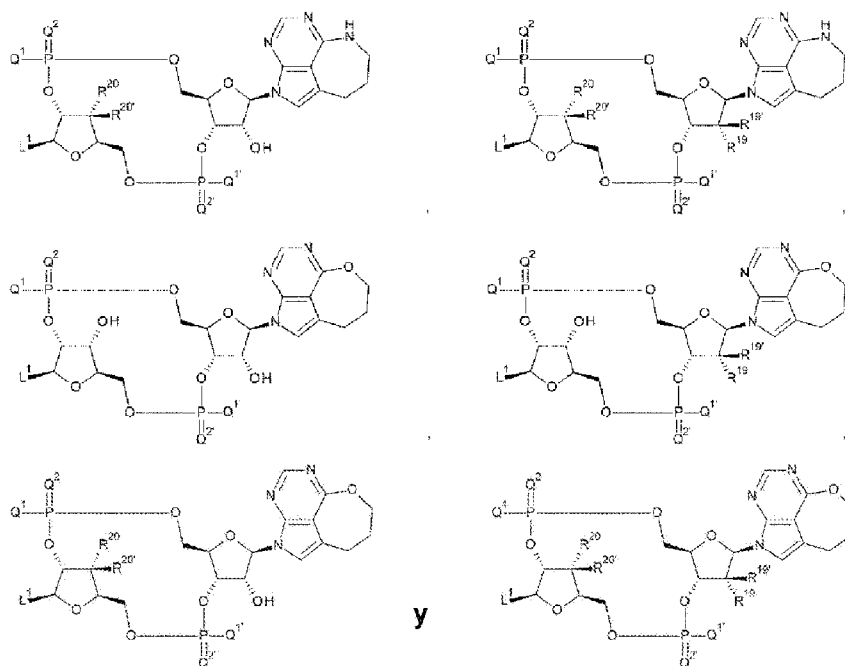


en las que:

25

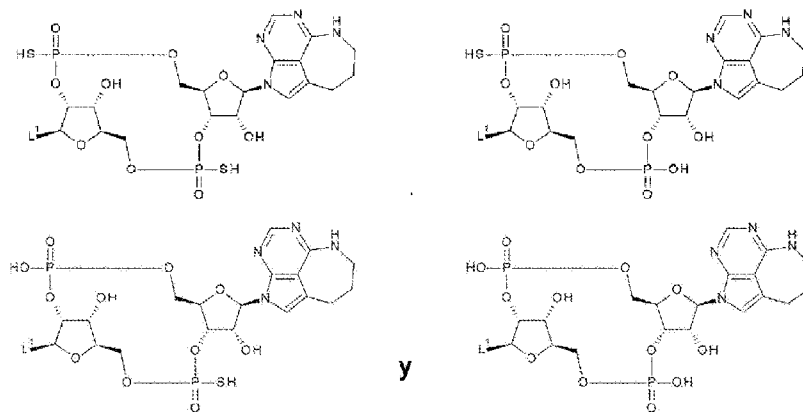
L¹, Q¹, Q^{1'}, Q², Q^{2'}, R¹⁷, R^{17'}, R¹⁸ y R^{18'} son como se han definido anteriormente, más preferentemente en el que D se representa con una cualquiera de las ocho fórmulas siguientes:



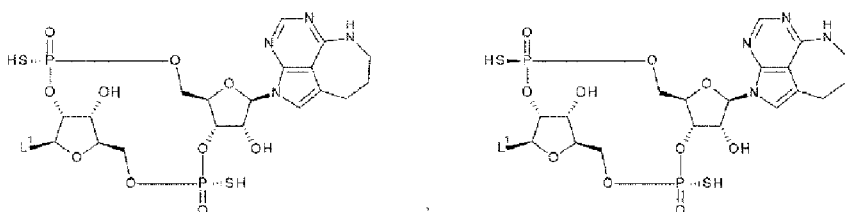


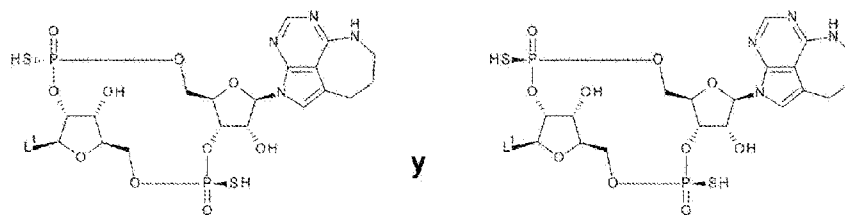
en las que:

- 5 L^1 , Q^1 , $Q^{1'}$, Q^2 y $Q^{2'}$ son como se han definido anteriormente; y
- R^{19} , $R^{19'}$, R^{20} y $R^{20'}$ representan cada uno independientemente un átomo de hidrógeno o un átomo de flúor, aún más preferentemente, en el que D se representa con una cualquiera de las cuatro fórmulas siguientes:



- 10 en las que:
- L^1 es como se ha definido anteriormente,
- y aún más preferentemente, en el que D se representa con una cualquiera de las cuatro fórmulas siguientes:



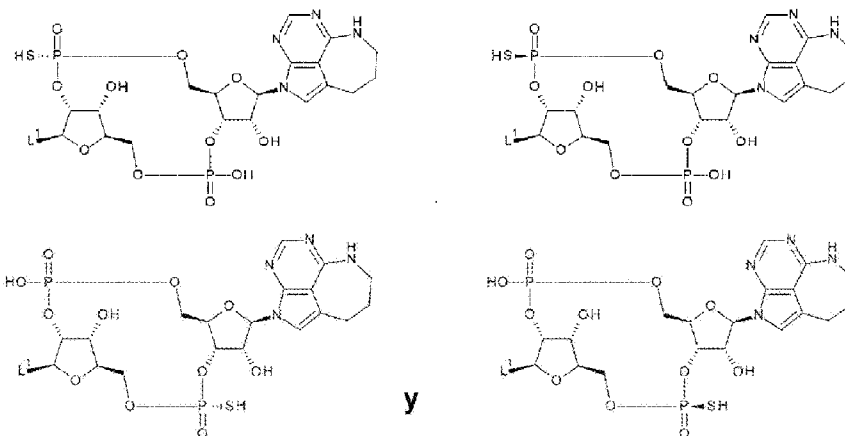


en las que:

L¹ es como se ha definido anteriormente,

o en el que D se representa con una de las cuatro fórmulas siguientes:

5

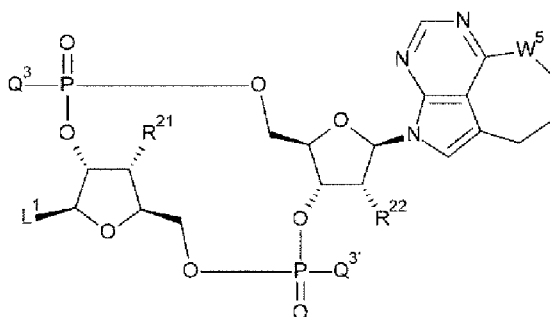


en las que:

L¹ es como se ha definido anteriormente.

10

18. El conjugado de anticuerpo-fármaco según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en el que D se representa con la siguiente fórmula:



en la que:

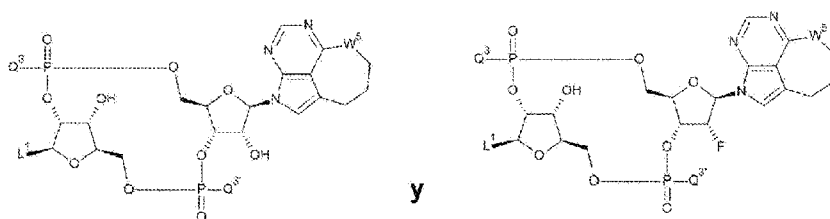
L¹ es como se ha definido anteriormente;

Q³ y Q^{3'} representan cada uno independientemente un grupo hidroxilo o un grupo tiol;

15

R²¹ y R²² representan cada uno independientemente un grupo hidroxilo o un átomo de flúor; y

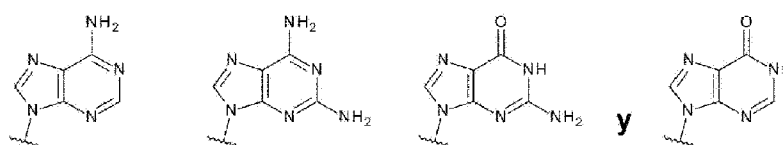
W⁵ representa -NH- o un átomo de azufre, preferentemente en el que D se representa con una de las dos fórmulas siguientes:



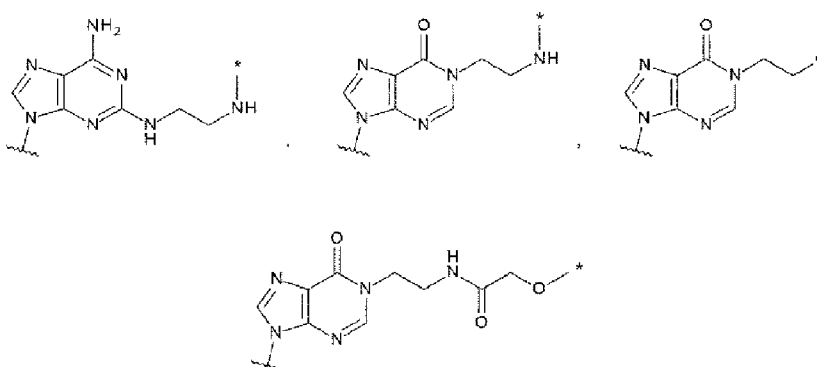
en las que:

L^1 , Q^3 , Q^{3i} y W^5 son como se han definido anteriormente.

- 5 19. El conjugado de anticuerpo-fármaco según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, en el que L^1 se representa con una cualquiera de las cuatro fórmulas siguientes:



20. El conjugado de anticuerpo-fármaco según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, en el que L^1 se representa con una cualquiera de las cuatro fórmulas siguientes:

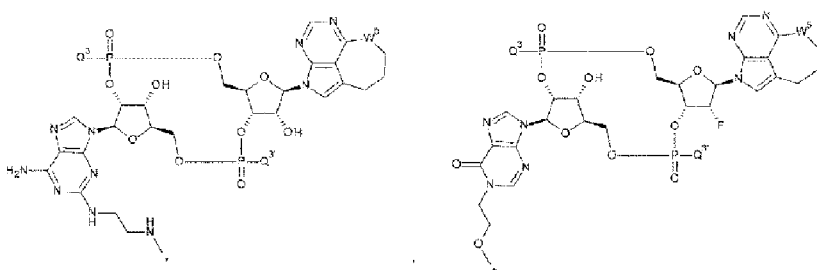


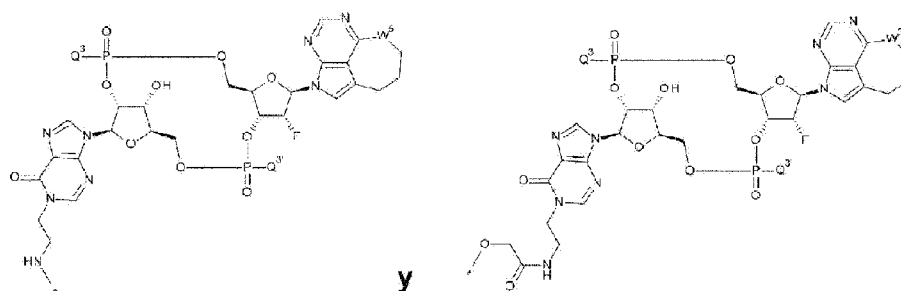
10 y

en las que:

cada asterisco indica unión a L.

- 15 21. El conjugado de anticuerpo-fármaco según una cualquiera de las reivindicaciones 18 y 20, en el que D se representa con una cualquiera de las cuatro fórmulas siguientes:



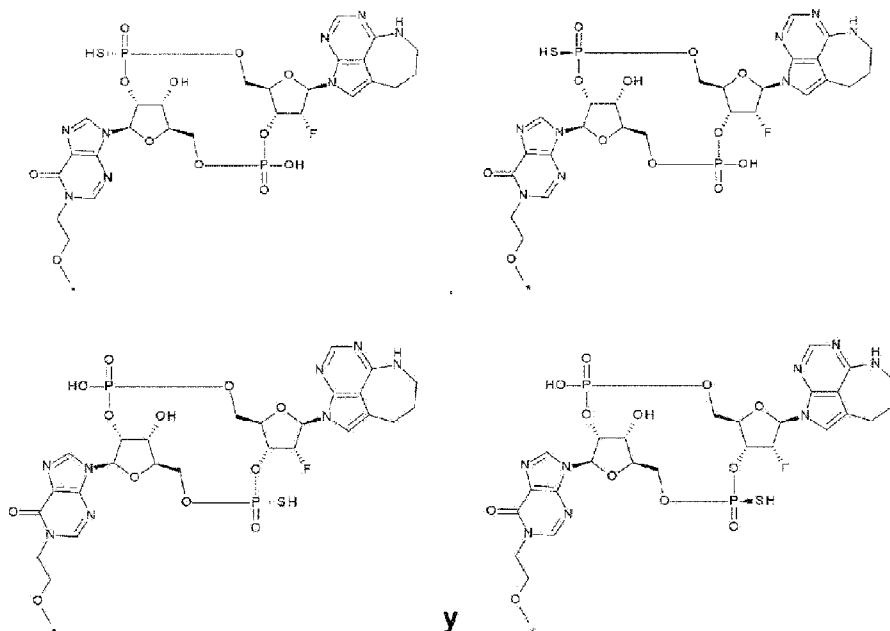


en las que:

cada asterisco indica unión a L; y

Q³, Q^{3'} y W⁵ son como se han definido anteriormente, preferentemente en el que D se representa con una cualquiera de las cuatro fórmulas siguientes:

5

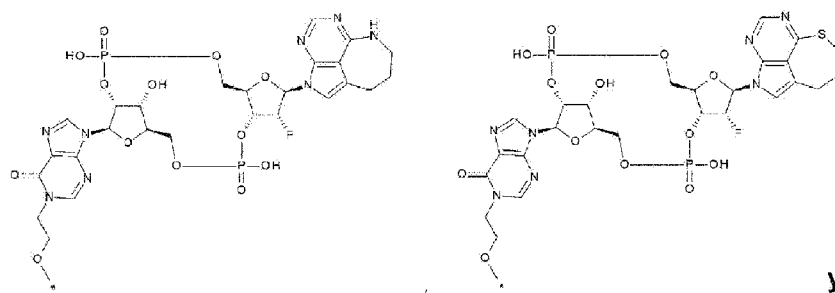


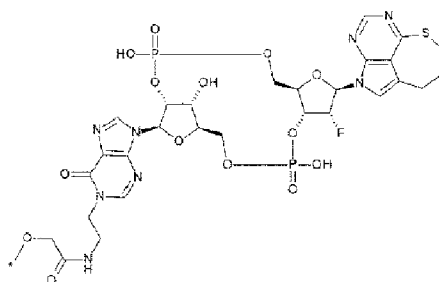
en las que:

cada asterisco indica unión a L,

o en el que D se representa con una de las tres fórmulas siguientes:

10

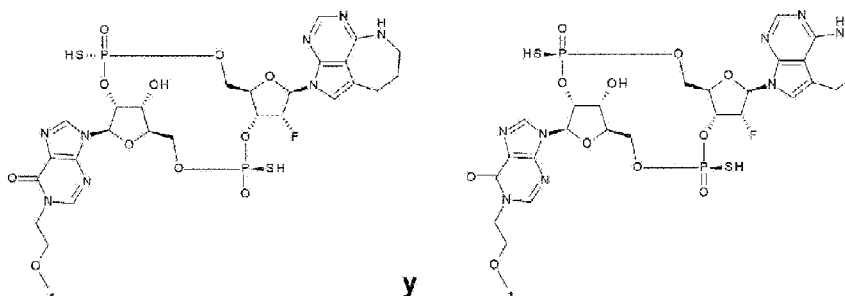
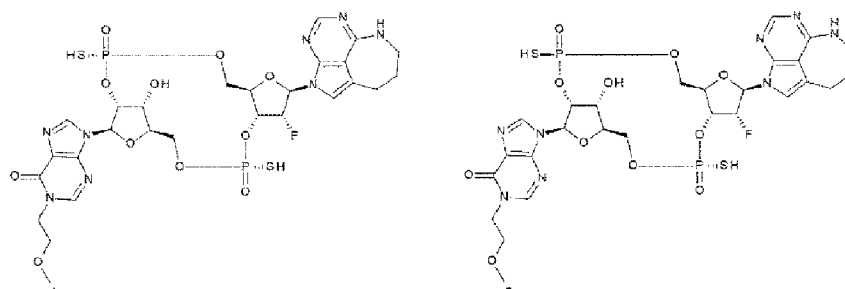




en las que:

cada asterisco indica unión a L,

o en el que D se representa con una de las cuatro fórmulas siguientes:



en las que:

cada asterisco indica unión a L.

22. El conjugado de anticuerpo-fármaco según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, en el que el conector L se representa con -Lb-La-Lp-Lc-*, en el que:

el asterisco indica unión al fármaco D;

Lp representa un conector que consiste en una secuencia de aminoácidos escindible en una célula diana, o está ausente;

La representa uno cualquiera seleccionado del grupo siguiente:

- C(=O)-(CH₂CH₂)_n²-C(=O)-,
- C(=O)-(CH₂CH₂)_n²-CH₂-C(=O)-,
- C(=O)-(CH₂CH₂)_n²-C(=O)-NH-(CH₂CH₂)_n³-C(=O)-,
- C(=O)-(CH₂CH₂)_n²-C(=O)-NH-(CH₂CH₂)_n³-CH₂-C(=O)-,
- C(=O)-(CH₂CH₂)_n²-C(=O)-NH-(CH₂CH₂O)_n³-CH₂-C(=O)-,
- (CH₂)_n⁴-O-C(=O)-,

y

- (CH₂)_n⁹-C(=O)-,

en las que:

n^2 representa un número entero de 1 a 3, n^3 representa un número entero de 1 a 5, n^4 representa un número entero de 0 a 2, y n^9 representa un número entero de 2 a 7;

5 Lb representa un espaciador que une La y un glucano o glucano remodelado de Ab o un espaciador que une La y un residuo de cisteína de Ab; y

Lc representa -NH-CH₂-, -NH-grupo fenilo-CH₂-O(C=O)- o -NH-grupo heteroarilo-CH₂-O(C=O)-, o está ausente.

23. El conjugado de anticuerpo-fármaco según la reivindicación 22, en el que Lc está ausente o en el que Lc es -NH-CH₂-.

10 24. El conjugado de anticuerpo-fármaco según la reivindicación 22 o la reivindicación 23, en el que Lp representa uno cualquiera seleccionado del grupo que consiste en: -GGVA-, -VA-, -GGFG-, -FG-, -GGPI-, -PI-, -GGVCit-, -VCit-, -GGVK-, -VK-, -GGFCit-, -FCit-, -GGFM-, -FM-, -GGLM-, -LM-, -GGICit- y -ICit-, preferentemente en el que Lp es uno cualquiera de -GGVA-, -VA-, -GGFG-, -FG-, -GGVCit-, -VCit-, -GGFCit- y -FCit-.

15 25. El conjugado de anticuerpo-fármaco según la reivindicación 22 o la reivindicación 23, en el que Lp es uno cualquiera de -GGFG-, -GGPI-, -GGVA-, -GGFM-, -GGVCit-, -GGFCit-, -GGICit-, -GGPL-, -GGAQ- y -GGPP-, preferentemente en el que Lp es -GGFG- o -GGPI-.

26. El conjugado de anticuerpo-fármaco según una cualquiera de las reivindicaciones 22 a 25, en el que La representa uno cualquiera seleccionado del grupo que consiste en:

-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-,

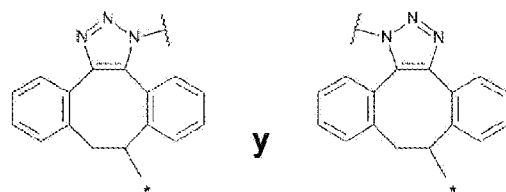
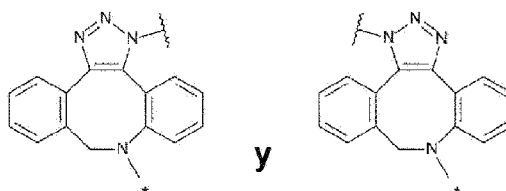
20 -C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-(CH₂CH₂O)₃-CH₂-C(=O)-,

-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-(CH₂CH₂O)₄-CH₂-C(=O)-,

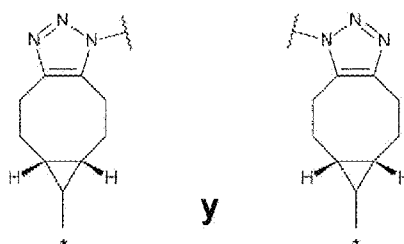
y

-(CH₂)₅-C(=O)-.

25 27. El conjugado de anticuerpo-fármaco según una cualquiera de las reivindicaciones 22 a 26, en el que Lb se representa con una cualquiera de las siguientes fórmulas:



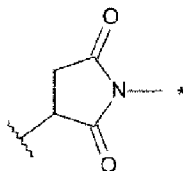
y



en las que, en las fórmulas estructurales para Lb mostradas anteriormente,

cada asterisco indica unión a La, y cada línea ondulada indica unión a un glucano o glucano remodelado de Ab.

28. El conjugado de anticuerpo-fármaco según una cualquiera de las reivindicaciones 22 a 26, en el que Lb es -(succinimida-3-il-N)-, en el que -(succinimida-3-il-N)- representa la siguiente fórmula estructural:



en la que el asterisco indica unión a La, y la línea ondulada indica unión a una cadena lateral de un residuo de cisteína del anticuerpo mediante la formación de tioéter.

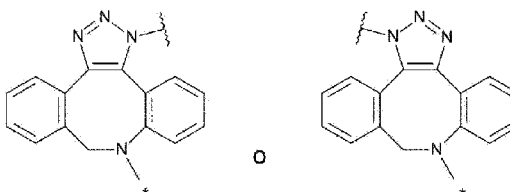
29. El conjugado de anticuerpo-fármaco según una cualquiera de las reivindicaciones 22 y 25 a 27, en el que el conector L se representa con -Lb-La-Lp-Lc-*, en el que:

el asterisco indica unión al fármaco D;

Lp es -GGFG- o -GGPI-;

La representa -C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-;

Lb representa la fórmula siguiente:



en la que, en las fórmulas estructurales para Lb mostradas anteriormente,

cada asterisco indica unión a La, y cada línea ondulada indica unión a un glucano o glucano remodelado de Ab; y

Lc representa -NH-CH₂-.

30. El conjugado de anticuerpo-fármaco según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29, en el que el número promedio de moléculas de fármaco conjugado por molécula de anticuerpo en el conjugado de anticuerpo-fármaco está en el intervalo de 1 a 10, preferentemente en el intervalo de 1 a 5.

31. El conjugado de anticuerpo-fármaco según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 27, 29 y 30, en el que el anticuerpo se une a través de un glucano de unión a Asn297 del anticuerpo (glucano N297) a L, preferentemente en el que el glucano N297 es un glucano remodelado, y más preferentemente en el que el glucano N297 es N297-(Fuc)MSG1 o N297-(Fuc)SG.

32. El conjugado de anticuerpo-fármaco según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 31, en el que el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del anticuerpo es una proteína producida en una célula hospedadora utilizando un gen de anticuerpo modificado por ingeniería genética.

33. El conjugado de anticuerpo-fármaco según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 32, en el que el anticuerpo es un anticuerpo anti-HER2, un anticuerpo anti-HER3, un anticuerpo anti-DLL3, un anticuerpo anti-FAP, un anticuerpo anti-CDH11, un anticuerpo anti-CDH6, un anticuerpo anti-A33, un anticuerpo anti-CanAg, un anticuerpo anti-CD19, un anticuerpo anti-CD20, un anticuerpo anti-CD22, un anticuerpo anti-CD30, un anticuerpo anti-CD33, un anticuerpo anti-CD56, un anticuerpo anti-CD70, un anticuerpo anti-CD98, un anticuerpo anti-TROP2, un anticuerpo anti-CEA, un anticuerpo anti-Cripto, un anticuerpo anti-EphA2, un anticuerpo anti-G250, un anticuerpo anti-MUC1, un anticuerpo anti-GPNMB, un anticuerpo contra la integrina, un anticuerpo anti-PSMA, un anticuerpo contra la tenascina-C, un anticuerpo anti-SLC44A4, un anticuerpo contra la mesotelina, un anticuerpo anti-ENPP3, un anticuerpo anti-CD47, un anticuerpo anti-EGFR, un anticuerpo anti-GPR20 o un anticuerpo anti-DR5, o un fragmento de unión al antígeno del anticuerpo.

34. El conjugado de anticuerpo-fármaco según la reivindicación 33, en el que el anticuerpo es un anticuerpo anti-HER2 o un fragmento de unión al antígeno del anticuerpo,

preferentemente en el que el anticuerpo se selecciona entre los siguientes (i) a (iv):

- 5 (i) un anticuerpo que comprende una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 y una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2 o un fragmento de unión al antígeno del anticuerpo, o un anticuerpo que comprende una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 y una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 3 o un fragmento de unión al antígeno del anticuerpo;
- (ii) un anticuerpo IgG1 o un fragmento de unión al antígeno del anticuerpo definido en (i), en el que una parte de los residuos de aminoácidos de la región constante está sustituida;
- 10 (iii) un anticuerpo IgG1 o un fragmento de unión al antígeno del anticuerpo definido en (i) que comprende Ala y Ala en las posiciones 234 y 235 especificadas por la numeración del índice EU, respectivamente; y
- 15 (iv) una proteína producida en una célula hospedadora utilizando un gen modificado por ingeniería genética a partir de un gen del anticuerpo o de un fragmento de unión al antígeno del anticuerpo definido en (i); o

en el que el anticuerpo se selecciona entre los siguientes (v) a (viii):

- 20 (v) un anticuerpo que comprende una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 28 y una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 29 o un fragmento de unión al antígeno del anticuerpo, o un anticuerpo que comprende una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 28 y una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 30 o un fragmento de unión al antígeno del anticuerpo;
- (vi) un anticuerpo IgG1 o un fragmento de unión al antígeno del anticuerpo definido en (v) en el que una parte de los residuos de aminoácidos de la región constante está sustituida;
- 25 (vii) un anticuerpo IgG1 o un fragmento de unión al antígeno del anticuerpo definido en (v) que comprende Ala y Ala en las posiciones 234 y 235 especificadas por la numeración del índice EU, respectivamente; y
- 30 (viii) una proteína producida en una célula hospedadora utilizando un gen modificado por ingeniería genética a partir de un gen del anticuerpo o de un fragmento de unión al antígeno del anticuerpo definido en (v),

preferentemente en el que se suprimen uno o dos aminoácidos en el extremo carboxilo de la cadena pesada del anticuerpo o de un fragmento de unión al antígeno del anticuerpo.

- 35 35. El conjugado de anticuerpo-fármaco según la reivindicación 33, en el que el anticuerpo es un anticuerpo que comprende una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 31 y una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 32 o un fragmento de unión al antígeno del anticuerpo, un anticuerpo que comprende una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 33 y una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 34 o un fragmento de unión al antígeno del anticuerpo, o un anticuerpo que comprende una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 35 y una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 36 o un fragmento de unión al antígeno del anticuerpo,
- 40

- 45 preferentemente un anticuerpo IgG1 o un fragmento de unión al antígeno del anticuerpo como se ha definido anteriormente, en el que una parte de los residuos de aminoácidos de la región constante está sustituida, o un anticuerpo IgG1 o un fragmento de unión al antígeno del anticuerpo que comprende Ala y Ala en las posiciones 234 y 235 especificadas por la numeración del índice EU, respectivamente.

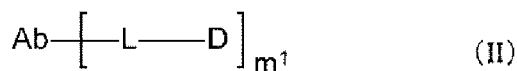
- 50 36. El conjugado de anticuerpo-fármaco según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 32, en el que el anticuerpo es uno cualquiera seleccionado del grupo que consiste en IgG que comprende IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, IgE, IgM, IgD, IgA que comprende IgA1 e IgA2 e IgY o un fragmento de unión al antígeno del anticuerpo, preferentemente en el que el anticuerpo es IgG1 o un fragmento de unión al antígeno del anticuerpo, más preferentemente en el que una parte de los residuos de aminoácidos de la región constante están sustituidos, y aún más preferentemente en el que la sustitución comprende la sustitución de leucina por alanina en las posiciones 234 y 235 especificadas por la numeración del índice EU.

- 55 37. El conjugado de anticuerpo-fármaco según la reivindicación 36, en el que el anticuerpo es un anticuerpo IgG1 que comprende una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 28 y una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 29 o un fragmento de

unión al antígeno del anticuerpo, o un anticuerpo IgG1 que comprende una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 28 y una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 30 o un fragmento de unión al antígeno del anticuerpo, en el que la secuencia de cadena pesada comprende la sustitución de leucina por alanina en las posiciones 234 y 235 especificadas por la numeración del índice EU.

38. El conjugado de anticuerpo-fármaco según la reivindicación 37, en el que se suprimen uno o dos aminoácidos en el extremo carboxilo de la cadena pesada del anticuerpo o de un fragmento de unión al antígeno del anticuerpo.

39. El conjugado de anticuerpo-fármaco según la reivindicación 1, en el que el conjugado de anticuerpo-fármaco se representa con la fórmula (II):



en la que:

m^1 está en el intervalo de 3 a 5;

Ab representa un anticuerpo anti-HER2, en el que un glucano del anticuerpo está remodelado;

L representa un conector que une Ab y D;

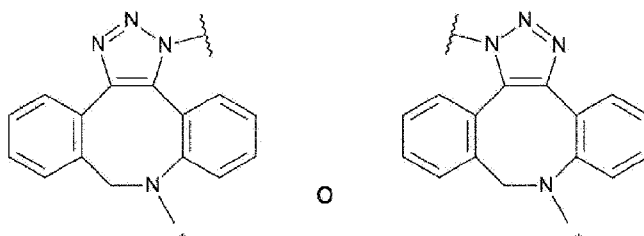
en el que el conector L se representa con -Lb-La-Lp-Lc-*, en el que:

el asterisco indica unión al fármaco D;

Lp es -GGFG-;

La representa -C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-;

Lb representa la siguiente fórmula:



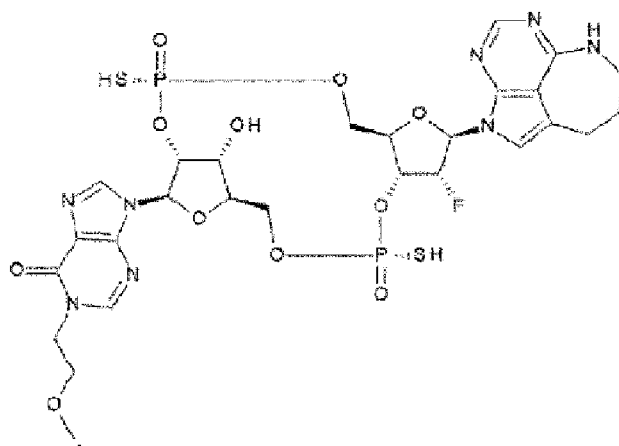
en la que, en las fórmulas estructurales para Lb mostradas anteriormente,

cada asterisco indica unión a La, y cada línea ondulada indica unión a un glucano remodelado de Ab; y

Lc representa -NH-CH₂-;

Ab se une a través de un glucano de unión a Asn297 del anticuerpo (N297-(Fuc) SG) a L; y

D representa un compuesto representado por la fórmula (I):



(I)

en la que:

el asterisco indica unión a L.

40. El conjugado de anticuerpo-fármaco según la reivindicación 39, en el que el anticuerpo es uno cualquiera de los siguientes (i) a (iii):

(i) un anticuerpo IgG1 que comprende una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 28 y una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 29, o un anticuerpo IgG1 que comprende una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 28 y una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 30;

(ii) el anticuerpo definido en (i), en el que una parte de los residuos de aminoácidos de la región constante está sustituida; y

(iii) una proteína producida en células hospedadoras utilizando un gen (a) modificado por ingeniería genética a partir de un gen (b) del anticuerpo definido en (i).

41. El conjugado de anticuerpo-fármaco según la reivindicación 40, en el que la sustitución comprende la sustitución de leucina por alanina en las posiciones 234 y 235 especificadas por la numeración del índice EU.

42. El conjugado de anticuerpo-fármaco según la reivindicación 39 o 40,

en el que el anticuerpo es un anticuerpo IgG1 que comprende una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 28 y una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 29,

en el que se sustituye una parte de los residuos de aminoácidos de la región constante del anticuerpo.

43. El conjugado de anticuerpo-fármaco según la reivindicación 39 o 40,

en el que el anticuerpo es un anticuerpo IgG1 que comprende una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 28 y una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 29,

en el que la región constante del anticuerpo comprende la sustitución de leucina por alanina en las posiciones 234 y 235 especificadas por la numeración del índice EU.

44. El conjugado de anticuerpo-fármaco según la reivindicación 39 o 40,

en el que el anticuerpo es un anticuerpo IgG1 que comprende una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 28 y una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 30,

en el que se sustituye una parte de los residuos de aminoácidos de la región constante del anticuerpo.

45. El conjugado de anticuerpo-fármaco según la reivindicación 39 o 40,

en el que el anticuerpo es un anticuerpo IgG1 que comprende una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 28 y una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 30,

en el que la región constante del anticuerpo comprende la sustitución de leucina por alanina en las posiciones 234 y 235 especificadas por la numeración del índice EU.

46. El conjugado de anticuerpo-fármaco según una cualquiera de las reivindicaciones 39 a 45, en el que se suprimen uno o dos aminoácidos en el extremo carboxilo de la cadena pesada del anticuerpo.

5 47. Un agonista de STING que comprende el conjugado de anticuerpo-fármaco según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 46.

48. Una composición farmacéutica que comprende el conjugado de anticuerpo-fármaco según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 46.

10 49. Un agente antitumoral que comprende el conjugado de anticuerpo-fármaco según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 46.

50. El conjugado de anticuerpo-fármaco según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 46, el agonista de STING según la reivindicación 47, la composición farmacéutica según la reivindicación 48, o el agente antitumoral según la reivindicación 49 para su uso en el tratamiento del cáncer.

15 51. El conjugado de anticuerpo-fármaco, el agonista de STING, la composición farmacéutica o el agente antitumoral para su uso según la reivindicación 50, en el que el cáncer es cáncer de pulmón, cáncer de riñón, cáncer urotelial, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, glioblastoma multiforme, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de mama, melanoma, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer gástrico, cáncer de esófago, cáncer de endometrio, cáncer de testículo, cáncer de cuello uterino, coriocarcinoma placentario, glioblastoma multiforme, tumor cerebral, cáncer de cabeza y cuello, cáncer tiroideo, mesotelioma, tumor del estroma gastrointestinal (GIST), cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares, cáncer suprarrenal, carcinoma de células escamosas, leucemia, linfoma maligno, plasmacitoma, mieloma o sarcoma.

20

Figura 1

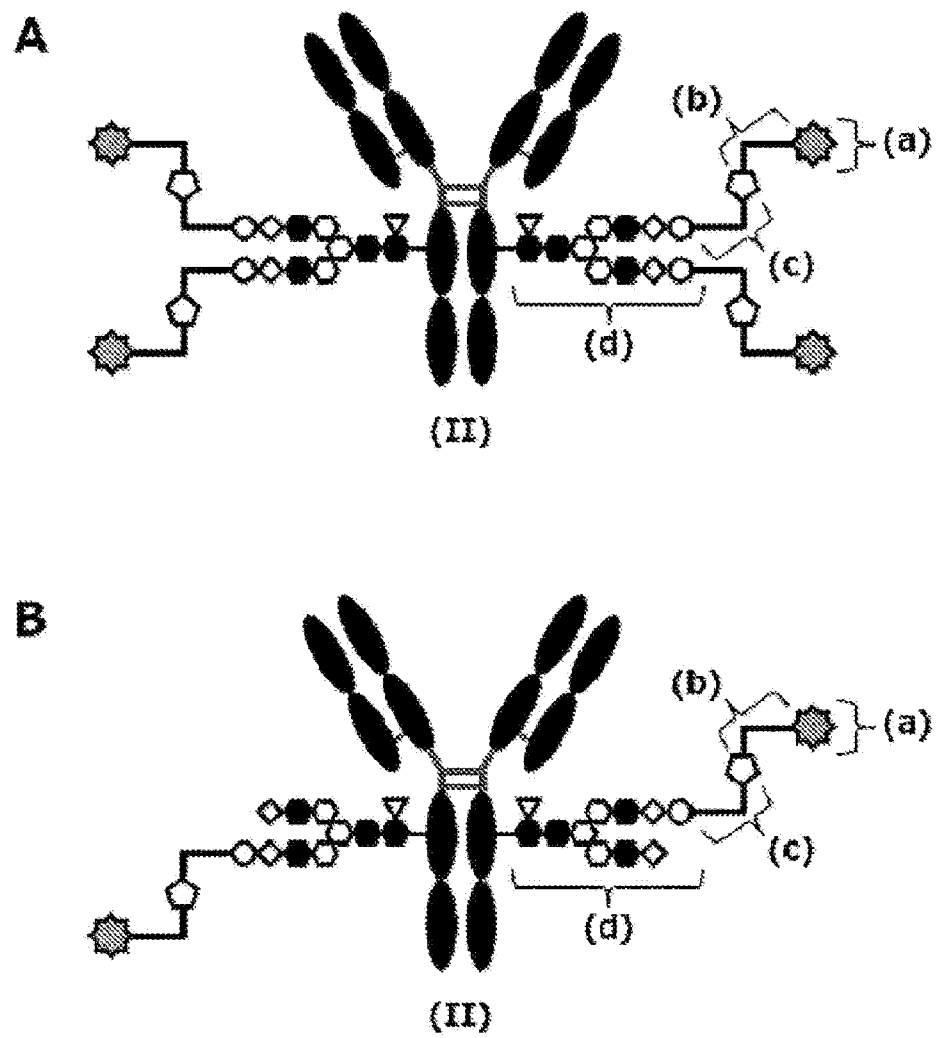


Figura 2

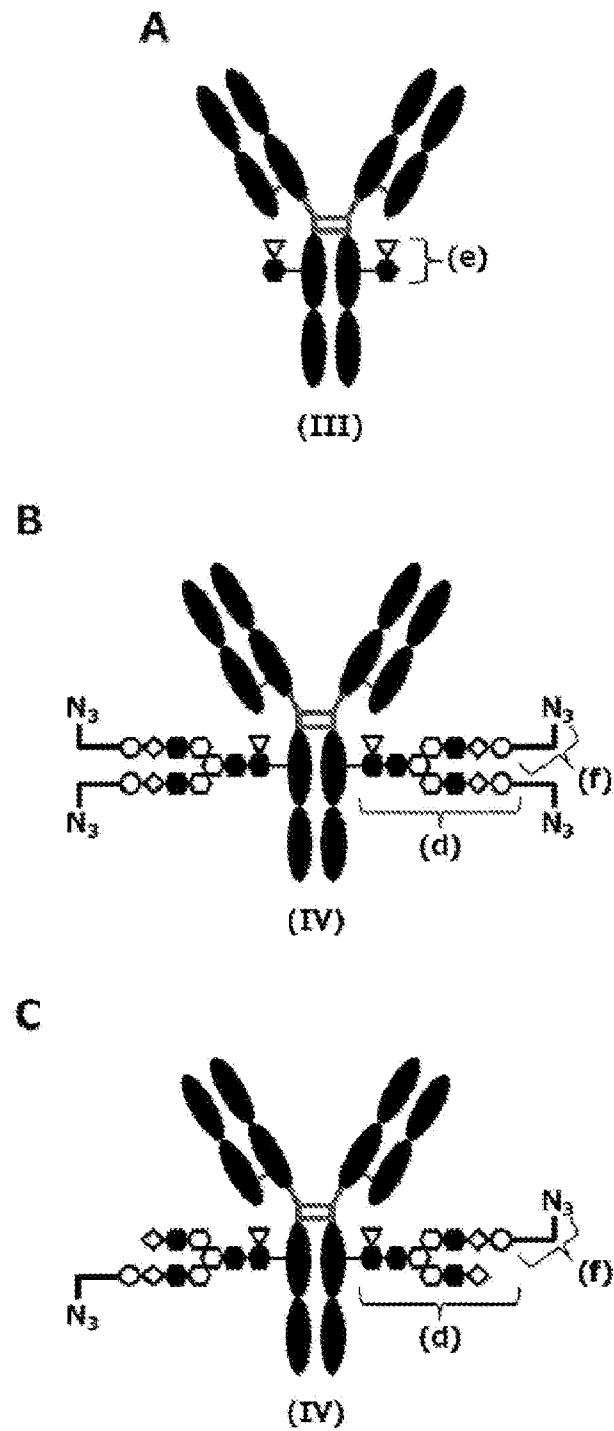


Figura 3

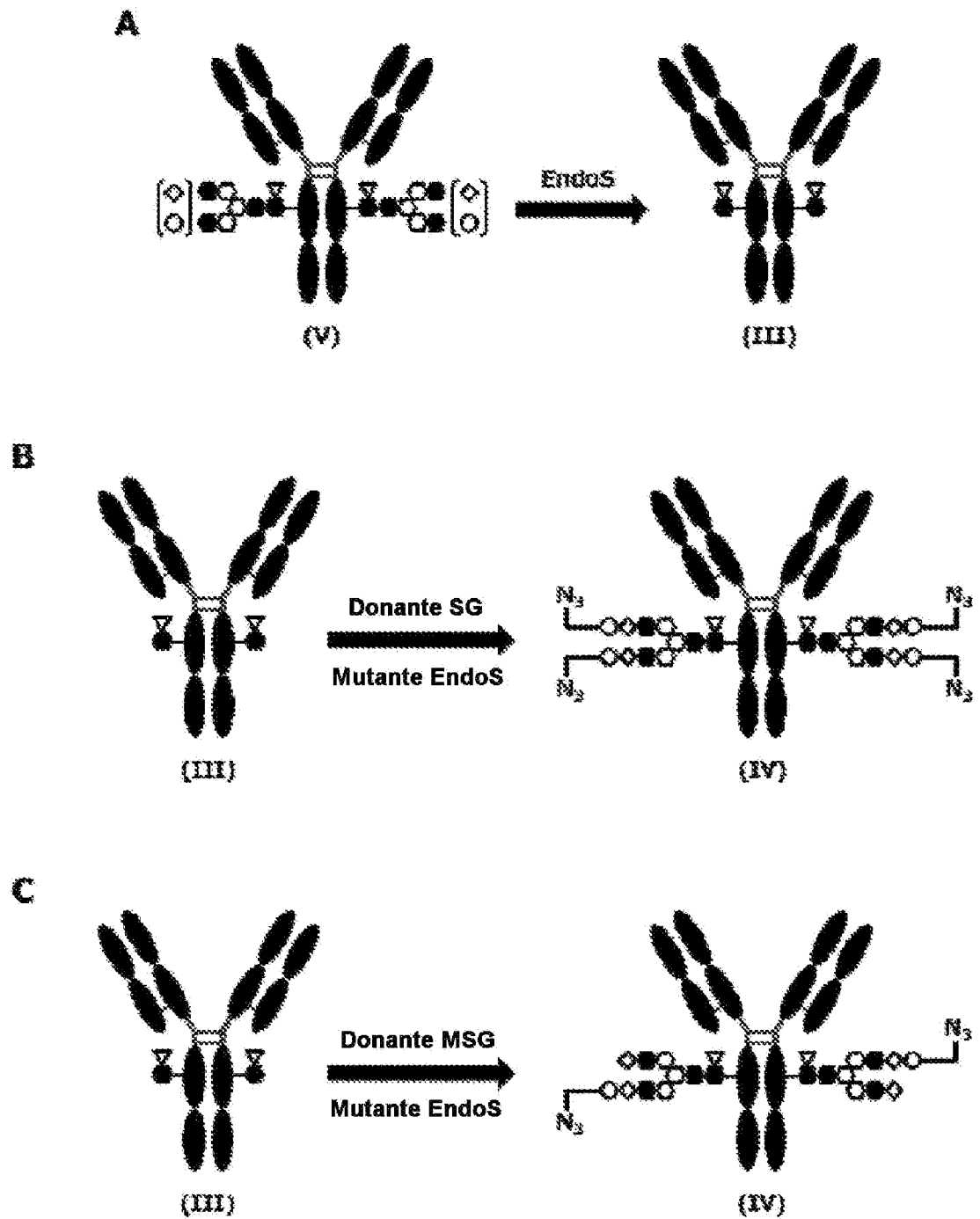


Figura 4

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de trastuzumab (SEQ ID NO:1)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPS
RFSGSRSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLT
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de trastuzumab (SEQ ID NO:2)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIDKYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRY
ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSS
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Figura 5

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER2 modificado (SEQ ID NO:1)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPS
RFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLT
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER2 modificado (SEQ ID NO:3)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRY
ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSS
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE
EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(El subrayado indica la posición de la mutación LALA)

Figura 6

(a) Secuencia de aminoácidos de STING humano de tipo salvaje

MPHSSLHPSIPCPRGHGAQKAALVLLSACLVTWGLGEPPEHTLRYLVLHLASLQLGLLL
 NGVCSLAEELRHHHSRYRGSYWRTVRACLGCP LRRGALLLLSIYFYYSLPNAVGPFTWM
 LALLGLSQALNILLGLKGLAPAEISAVCEKGNFNVAHGLAWSYYIGYLRLILPELQARIR
 TYNQHYNLLRGAVSQRLYILLPLDCGVDPNLSMADPNIRFLDKLPQQTGD~~RAG~~IKDRVY
 SNSIYELLENGQRAGTCVLEYATPLQTLFAMSQYSQAGFSREDRLEQAKLFCRTLEDILA
 DAPESQNNCRLLIAYQEPADDSSFSLSQEVLRHLRQEEKEEVTVGSLKTSAVPSTSTMSQE
 PELLISGMEKPLPLRTDFS

(b) Secuencia de aminoácidos de STING humano con mutación REF (R232H)

MPHSSLHPSIPCPRGHGAQKAALVLLSACLVTWGLGEPPEHTLRYLVLHLASLQLGLLL
 NGVCSLAEELRHHHSRYRGSYWRTVRACLGCP LRRGALLLLSIYFYYSLPNAVGPFTWM
 LALLGLSQALNILLGLKGLAPAEISAVCEKGNFNVAHGLAWSYYIGYLRLILPELQARIR
 TYNQHYNLLRGAVSQRLYILLPLDCGVDPNLSMADPNIRFLDKLPQQTGDHAGIKDRVY
 SNSIYELLENGQRAGTCVLEYATPLQTLFAMSQYSQAGFSREDRLEQAKLFCRTLEDILA
 DAPESQNNCRLLIAYQEPADDSSFSLSQEVLRHLRQEEKEEVTVGSLKTSAVPSTSTMSQE
 PELLISGMEKPLPLRTDFS

(El subrayado indica la posición de la mutación R232H)

(c) Secuencia de aminoácidos de STING humano con mutación HAQ (R71H, G230A, R293Q)

MPHSSLHPSIPCPRGHGAQKAALVLLSACLVTWGLGEPPEHTLRYLVLHLASLQLGLLL
 NGVCSLAEELHHHHSRYRGSYWRTVRACLGCP LRRGALLLLSIYFYYSLPNAVGPFTWM
 LALLGLSQALNILLGLKGLAPAEISAVCEKGNFNVAHGLAWSYYIGYLRLILPELQARIR
 TYNQHYNLLRGAVSQRLYILLPLDCGVDPNLSMADPNIRFLDKLPQQTADRAGIKDRVY
 SNSIYELLENGQRAGTCVLEYATPLQTLFAMSQYSQAGFSREDRLEQAKLFCQTLEDILA
 DAPESQNNCRLLIAYQEPADDSSFSLSQEVLRHLRQEEKEEVTVGSLKTSAVPSTSTMSQE
 PELLISGMEKPLPLRTDFS

(Los tres subrayados indican las posiciones de la mutación R71H, la mutación G230A y la mutación R293Q, respectivamente)

Figura 7

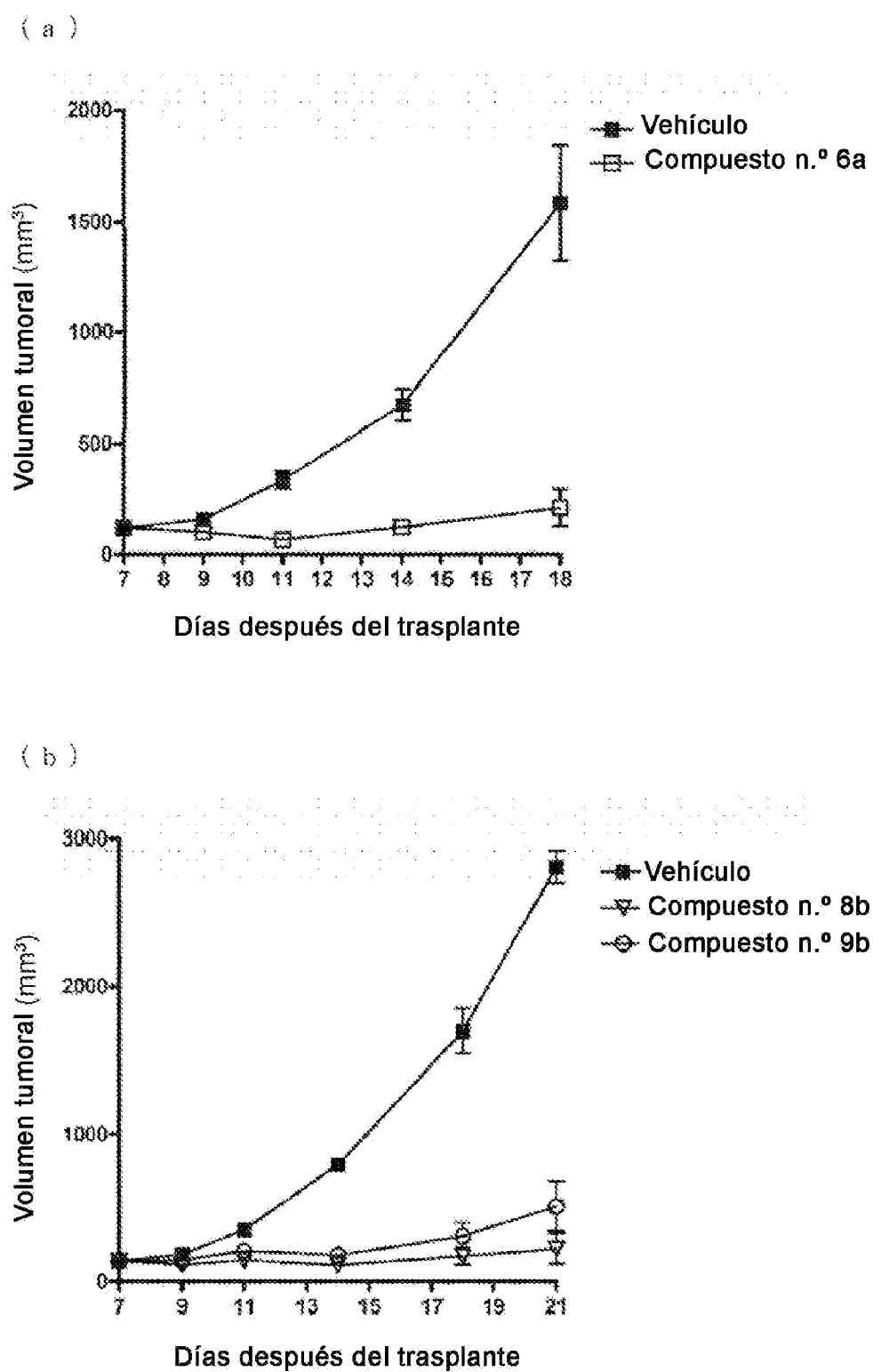


Figura 8

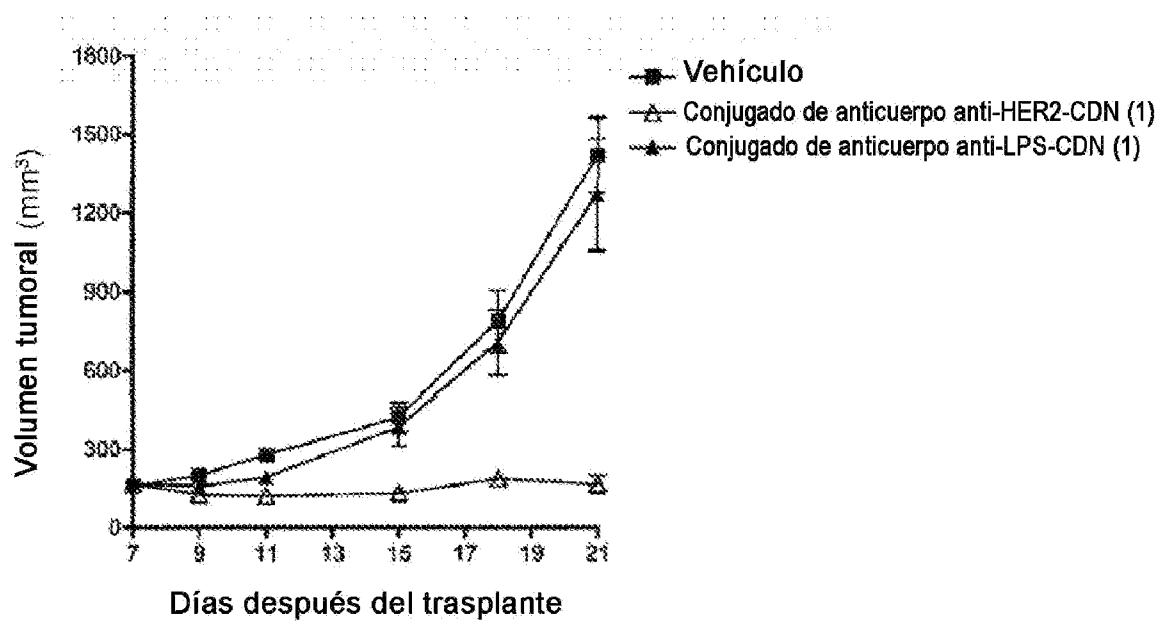


Figura 9

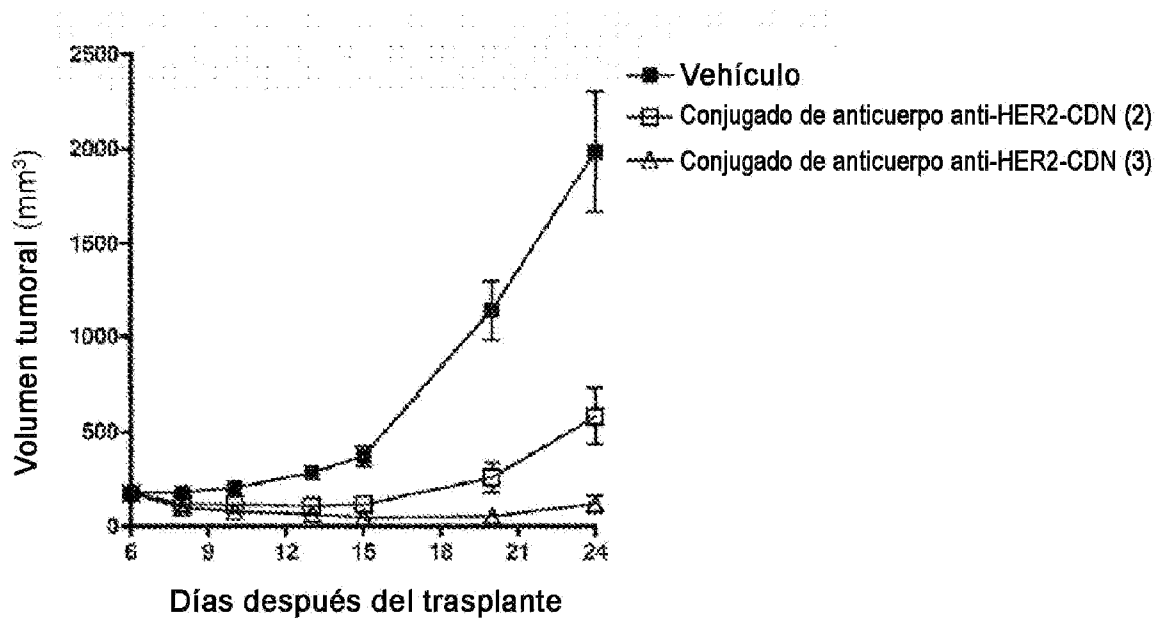


Figura 10

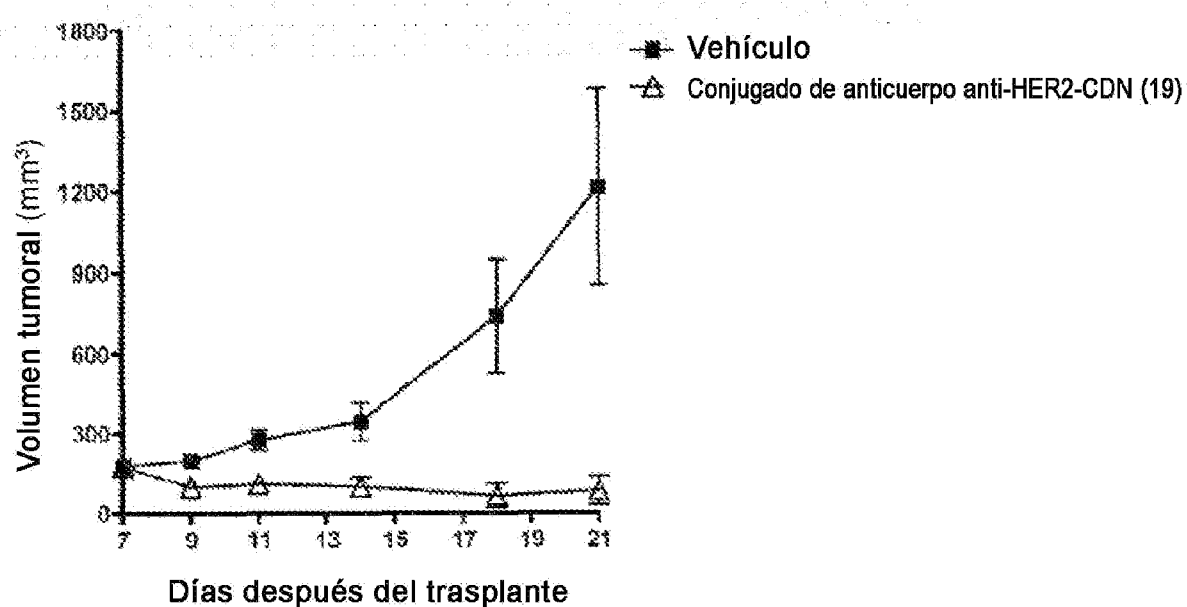


Figura 11

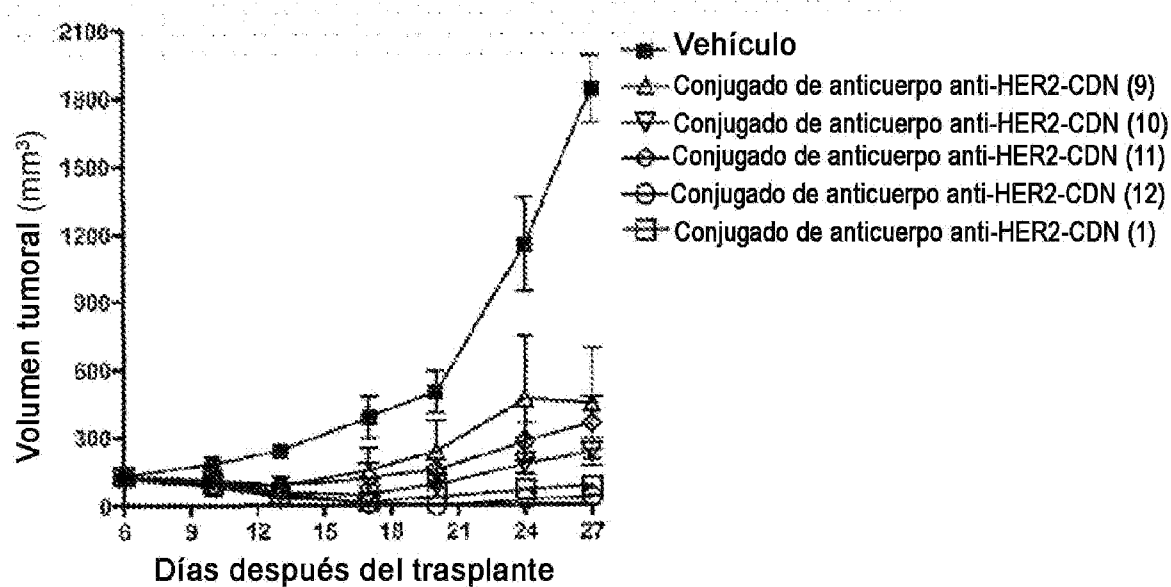


Figura 12

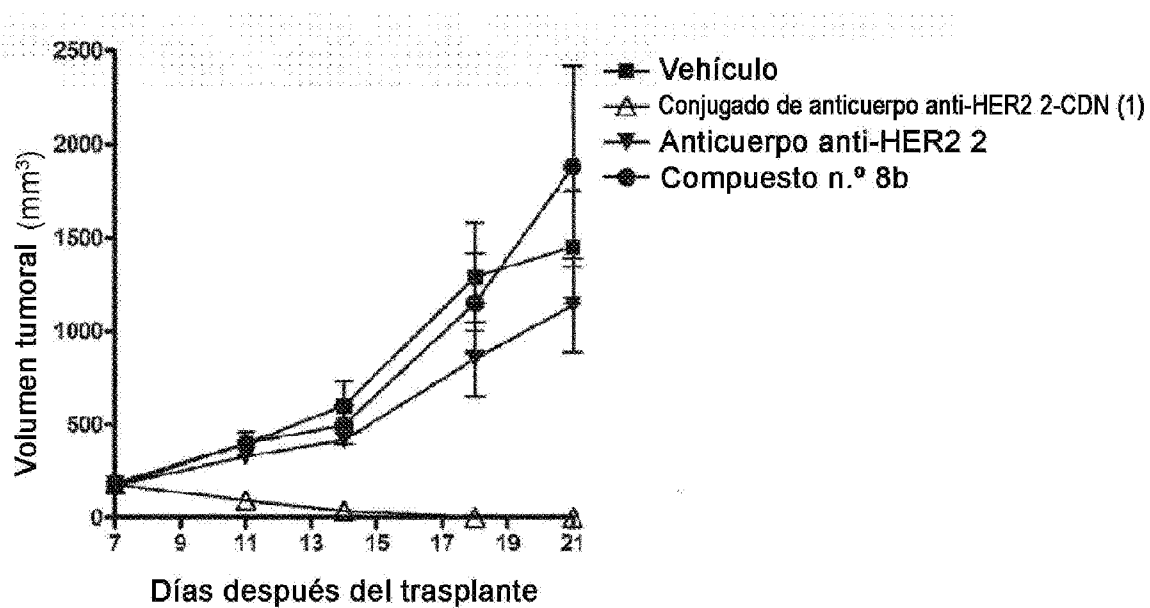


Figura 13a

(a)

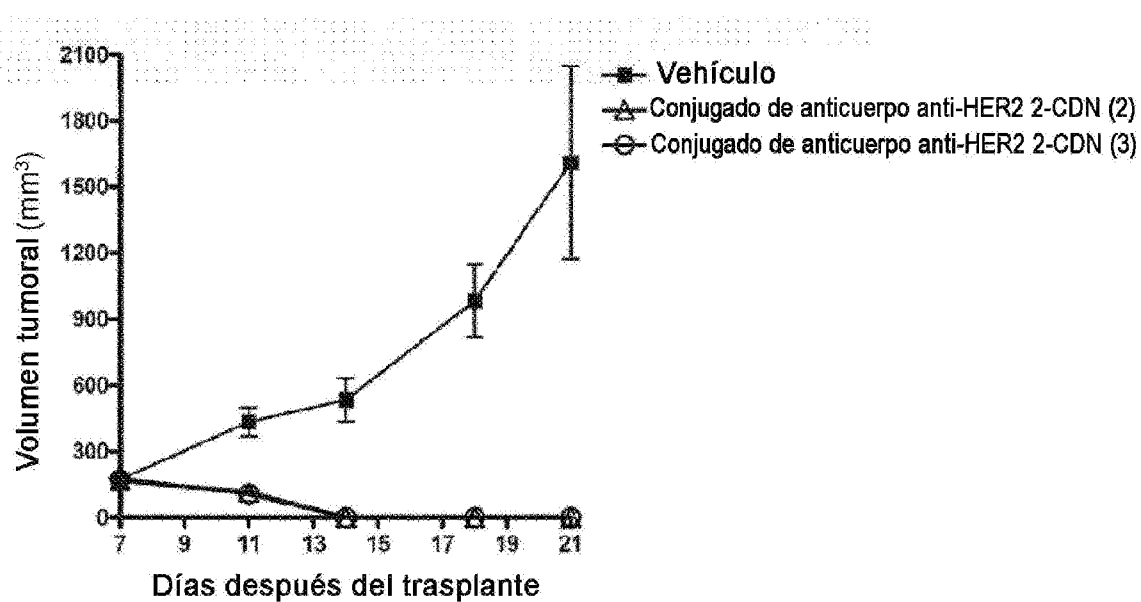


Figura 13b

(b)

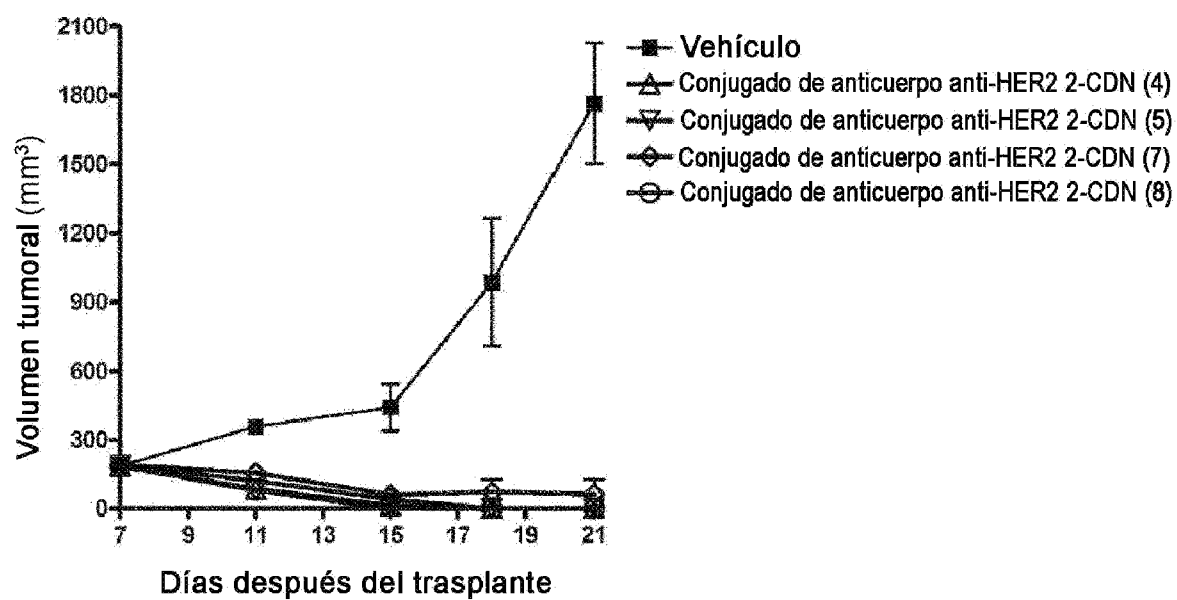


Figura 13c

(c)

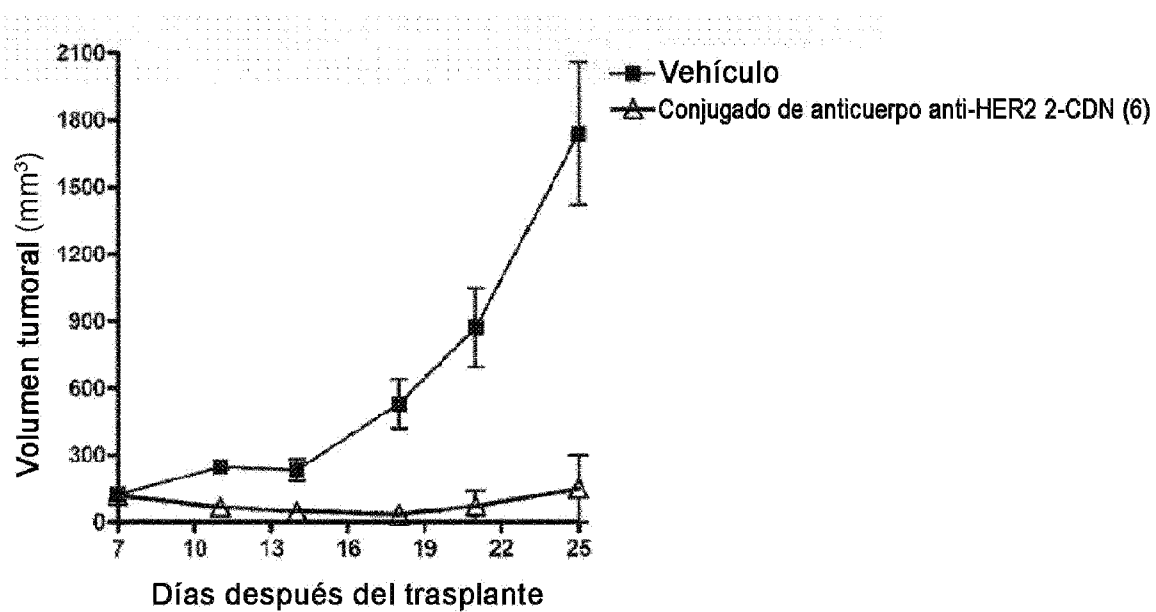


Figura 14

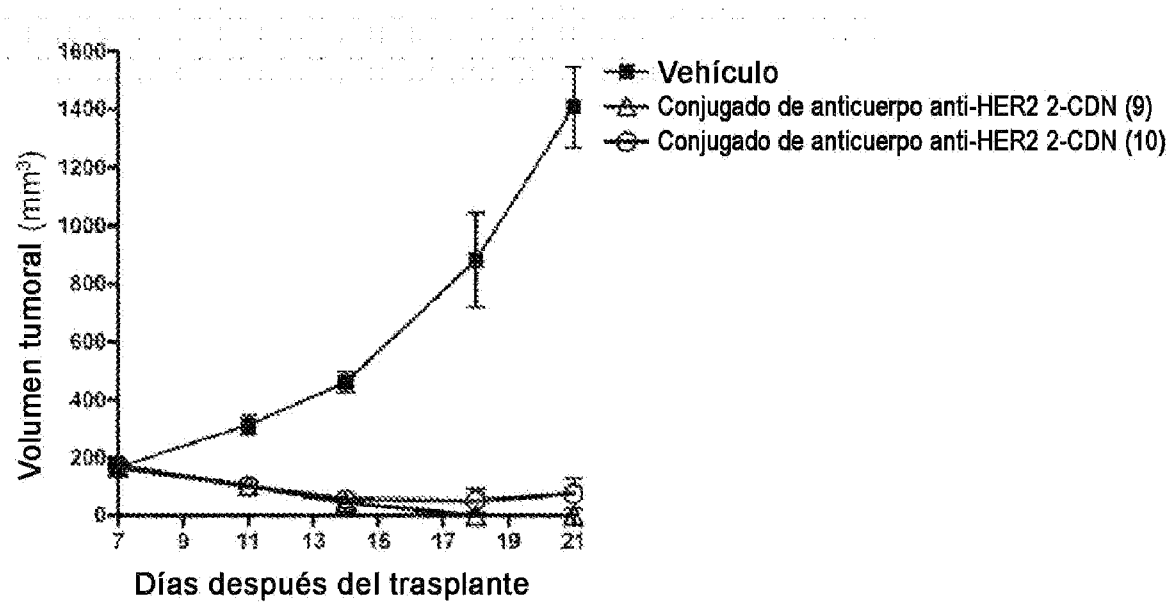


Figura 15

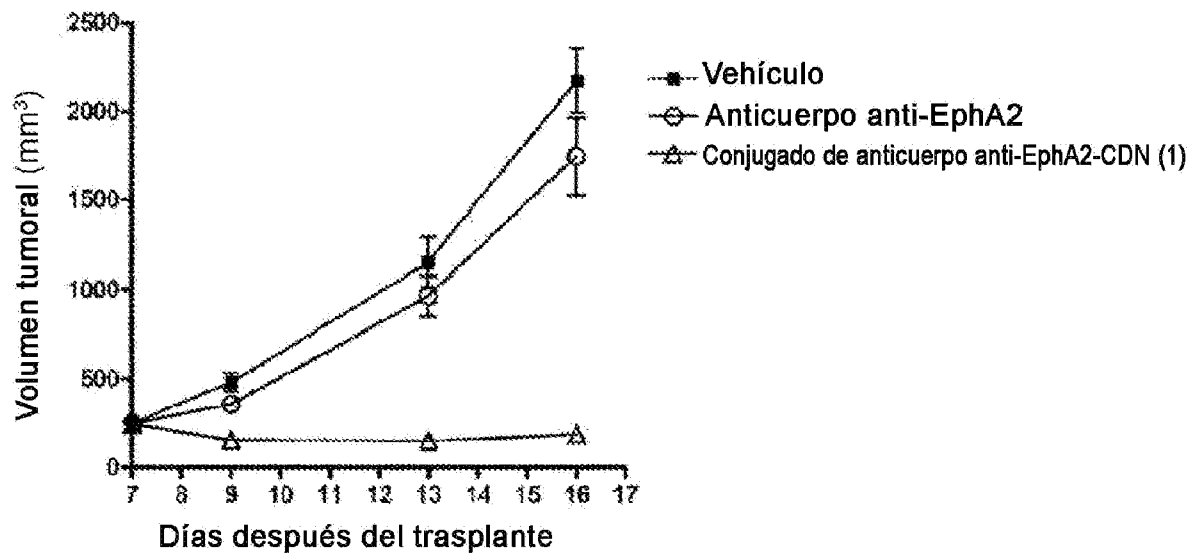


Figura 16

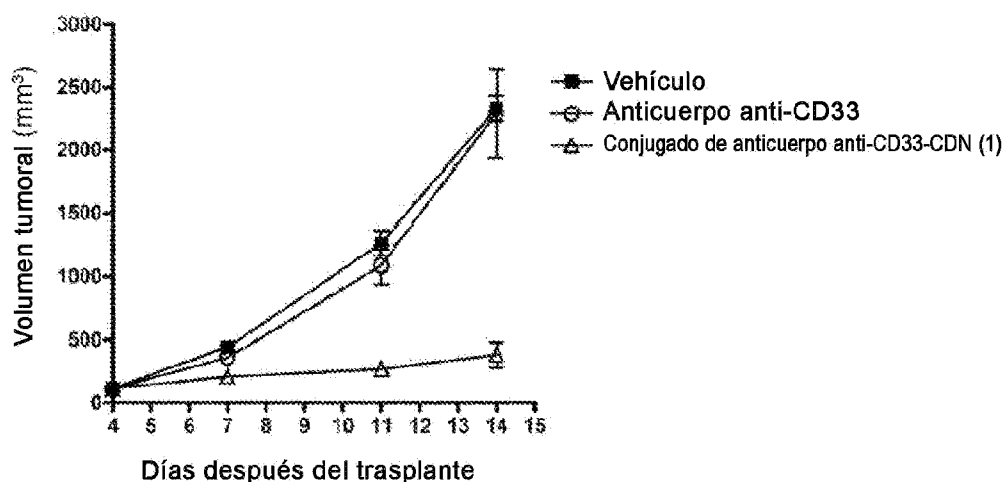


Figura 17

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de pertuzumab (SEQ ID NO:28)
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVP
 RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP
 SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLT
 LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de pertuzumab (SEQ ID NO:29)
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYMWDVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIY
 NQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGGTLTVSSA
 STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
 LYSLSVSVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGP
 SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
 TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM
 TKNQVSLTCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
 QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Figura 5

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER2 2 modificado (SEQ ID NO:28)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVP
RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLT
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER2 2 modificado (SEQ ID NO:30)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTEMDWVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIY
NQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGGTLVTVSSA
STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAAGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(El subrayado indica la posición de la mutación K214R y la mutación LALA)

Figura 19

**Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo anti-CD33
(SEQ ID NO:31)**

DIQLTQSPSTLSASVGDRVITICRASESLDNYGIRFLTWFAQKPGKAPKLLMYAASNQGS
GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQTKEVPWSFGQGTKVEVKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLS
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

**Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo anti-CD33
(SEQ ID NO:32)**

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGYTITDSNIHWVRQAPGQSLEWIGYIYPYNGGTDY
NQKFKNRATLTVDNPTNTAYMELSSLRSEDTAFYYCVNGNPWLAYWGQGTLLTVSSASTK
GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR
VVSVELTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHREALHNHYTQKSLSLSPGK

Figura 20

**Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo anti-EphA2
(SEQ ID NO:33)**

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSI VHSSGITYLEWYLQKPGQSPQLLIYKVS NRF
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSV
FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSL
SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

**Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo anti-EphA2
(SEQ ID NO:34)**

QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFIDYSMHWVRQAPGGGLEWMGWINTYTGEPTY
SDDFKGRVTITADTSTSTAYLELSSLRSED TAVYYCATYYRYERDFDYWGQGT LVTVSSA
STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Figura 21

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo anti-CDH6

(SEQ ID NO:35)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNIYKNLAWYQQKPGKAPKLLIYDANTLQTGVPS
RFSGSGSGSDFTLTISLQPEDFATYFCQQYYSGWAFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS
DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTL
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo anti-CDH6

(SEQ ID NO:36)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRNFMHWVRQAPGGGLEWMGWIYPGDGETEY
AQKFQGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGVYGGFAGGYFDWGGGTLVTV
SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Figura 22

