(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 402 850**

(51) Int. CI.:

C07C 269/06 (2006.01)
C07C 271/18 (2006.01)
C07K 7/06 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.02.2009 E 09715782 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.01.2013 EP 2268609**

(54) Título: **Síntesis de un resto de PEG-6 a partir de productos químicos comerciales de bajo coste**

(30) Prioridad:

28.02.2008 US 32256

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.05.2013

(73) Titular/es:

GE HEALTHCARE LIMITED (100.0%)
Amersham Place Little Chalfont
Buckinghamshire HP7 9NA , GB

(72) Inventor/es:

ENGELL, TORGRIM

(74) Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

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

Síntesis de un resto de PEG-6 a partir de productos químicos comerciales de bajo coste

Campo de la invención

La presente invención proporciona nuevas síntesis para obtener un engarce PEGilado de aminoxi a partir de materiales y de productos químicos rentables, y fácilmente disponibles o polietilenglicoles modificados. Más específicamente, se consiguieron nuevas síntesis para obtener un engarce de PEG-6 con aminoxi modificado protegido con Boc de modo que dicho engarce se puede unir a un vector tal como un fragmento basado en un péptido.

Antecedentes de la invención

La preparación de biomoléculas, tales como péptidos u oligonucleótidos, y otros compuestos orgánicos en una matriz sólida se realiza mejor usando moléculas espaciadoras bifuncionales conocidas como engarces. Una de las dos funcionalidades reactivas de un engarce está unida permanentemente a una resina funcionalizada adecuadamente, lo más a menudo a través de un enlace de amida estable, mientras que la molécula creciente está temporalmente unida a la otra posición reactiva del engarce.

Aunque la mayoría de los engarces dependen de la acidólisis para la liberación de la molécula final desde el soporte, el uso de diferentes mecanismos (por ejemplo, fotólisis, fluorosis, y Beta-eliminación catalizada con bases) se ha aprovechado para la escisión final.

Además, las moléculas biológicamente activas que se relacionan selectivamente con tipos celulares específicos son útiles para el reparto de radioactividad a los tejidos diana. Por ejemplo, los péptidos radiomarcados tienen un potencial significativo para el reparto de radionucleidos en tumores, infartos, y tejidos infectados para la formación de imágenes para diagnóstico y radioterapia. ^{18}F, con su vida media de aproximadamente 110 minutos, es el núclido emisor de positrones de elección para muchos estudios de formación de imágenes del receptor. Por lo tanto, los péptidos bioactivos marcados con ^{18}F tienen gran potencial clínico debido a su utilidad en PET para detectar y caracterizar cuantitativamente una gran diversidad de enfermedades.

Se pueden formar nuevos vasos sanguíneos mediante dos mecanismos diferentes: vasculogénesis o angiogénesis. La angiogénesis es la formación de nuevos vasos sanguíneos por ramificación de los vasos existentes. El estímulo primario para este proceso puede ser un suministro inadecuado de nutrientes y de oxígeno (hipoxia) a las células de un tejido. Las células pueden responder secretando factores angiogénicos, de los cuales existen muchos; un ejemplo, al que se hace mención frecuentemente, es el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Estos factores inician la secreción de enzimas proteolíticas que descomponen las proteínas de la membrana basal, así como de inhibidores que limitan la acción de estas enzimas potencialmente nocivas. El otro efecto importante de los factores angiogénicos es hacer que las células endoteliales migren y se dividan. Las células endoteliales que están unidas a la membrana basal, que forma una lámina contínua alrededor de los vasos sanguíneos en el lado contraluminal, no experimentan mitosis. El efecto combinado de pérdida de unión y de señales a partir de los receptores para los factores angiogénicos es hacer que las células endoteliales se muevan, se multipliquen, y se reorganicen por sí mismas, y finalmente sintetizar una membrana basal alrededor de los nuevos vasos.

La angiogénesis es importante en el crecimiento y en la remodelación de tejidos, incluyendo la cicatrización de heridas y procesos inflamatorios. Los tumores deben iniciar la angiogénesis cuando alcanzan un tamaño milimétrico para mantener su velocidad de crecimiento. La angiogénesis está acompañada por cambios característicos en las células endoteliales y su entorno. La superficie de estas células se remodela durante la preparación para la migración, y las estructuras crípticas se exponen cuando la membrana basal se degrada, además de la diversidad de proteínas que están implicadas en efectuar y controlar la proteolisis. En el caso de los tumores, la red de vasos sanguíneos resultante normalmente está desorganizada, con la formación de pliegues agudos y también derivaciones arteriovenosas. También se considera que la inhibición de la angiogénesis es una estrategia prometedora para la terapia antitumoral. Las transformaciones que acompañan a la angiogénesis también son muy prometedoras para el diagnóstico, siendo un ejemplo las enfermedades malignas, aunque el concepto también muestra una gran esperanza en la inflamación y en una diversidad de enfermedades relacionadas con la inflamación, incluyendo aterosclerosis, siendo los macrófagos de las lesiones ateroscleróticas anteriores fuentes potenciales de factores angiogénicos.

Muchos ligandos implicados en la adhesión celular contienen la secuencia tripeptídica arginina-glicina-ácido aspártico (RGD). La secuencia RGD parece que actúa como un sitio de reconocimiento primario entre los ligandos que presentan esta secuencia y los receptores en la superficie de las células. Generalmente se cree que las interacciones secundarias entre el ligando y el receptor potencian la especificidad de la interacción. Estas interacciones secundarias podrían tener lugar entre restos del ligando y del receptor que son inmediatamente adyacentes a la secuencia RGD o a sitios que están alejados de la secuencia RGD.

La dirección y la formación de imágenes eficaz de los receptores de integrina asociados con la angiogénesis in vivo exige por lo tanto un vector basado en RGD de alta afinidad, selectivo que es químicamente resistente y estable.

Además, la vía de excreción es un factor importante cuando se diseñan agentes de formación de imágenes con el fin de reducir problemas con el fondo.

El documento WO 06/030291 se refiere al uso de compuestos basados en un péptido como vectores de dirección que se unen a receptores asociados con la angiogénesis. Además, el documento WO 2006/030291 describe compuestos basados un péptido que tienen utilidad para la formación de imágenes para diagnóstico que se pueden preparar fácilmente. El documento WO 06/030291 describe (Ejemplo 2) la síntesis de grupos de polietilenglicol funcionalizados con amino en los extremos *mediante* compuestos intermedios de azida. Dichas azidas no son ideales, ya que pueden ser peligrosamente inestables.

Indrevoll y col. [Bioorg. Med. Chem. Lett, 16, 6190-6193 (2006)] describen un péptido RGD radiomarcado para la formación de imágenes de la angiogénesis. Ellos indican que un espaciador corto de tipo PEG en el extremo C tiene la función dual de actuar como un biomodificador, y de proteger frente al metabolismo de la carboxipeptidasa. Indrevoll *y col.* muestran la estructura química del espaciador de tipo PEG, pero no describen su síntesis.

La presente invención describe la nueva síntesis para obtener un engarce de PEG-6, con aminoxi modificado protegido con Boc, -COOCH $(CH_3)_3$. Este engarce de PEG-6 se puede unir después a un fragmento basado en un péptido para formar un compuesto basado en un péptido con aminoxi protegido con Boc. A partir de ese momento, el compuesto basado en un péptido con aminoxi protegido con Boc se sintetiza para obtener un compuesto radiomarcado basado en un péptido que se puede usar en la angiogénesis.

Sumario de la Invención

La presente invención describe materiales de partida y productos químicos fácilmente disponibles, y rentables en un procedimiento eficaz de preparación de un engarce de PEG-6 con diversos grupos protectores tales como un grupo aminoxi modificado protegido con Boc, -$COOCH(CH_3)_3$, unidos a un extremo del engarce. La presente invención también describe una nueva síntesis para obtener un engarce de PEG-6 por síntesis de polietilenglicoles modificados.

El término "modificado" usado en el presente documento se refiere a una molécula que se ha modificado con un grupo funcional que permite que esta molécula se una a un fragmento basado en un péptido.

Se usaron espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN), espectroscopía de masas (MS) y HPLC-MS (cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) en combinación con MS) para identificar los compuestos intermedios en el nuevo procedimiento reivindicado para obtener un engarce de PEG-6 con diversos grupos protectores tales como una unión del grupo aminoxi modificado protegido con Boc.

Todas las etapas sintéticas de la invención actual se realizaron con materiales de partida y productos químicos fácilmente disponibles, rentables. Una ventaja importante del uso de este procedimiento para preparar un engarce de PEG-6 con cualquiera de los grupos protectores que se describen a continuación tales como una unión al grupo aminoxi modificado protegido con Boc es que cuando se usa en combinación, ninguna de las estructuras identificadas en las etapas de reacción es inestable. Todas las estructuras identificadas en las etapas de reacción son fácilmente reproducibles.

Descripción Detallada de las Estructuras

La Tabla 1 representa las estructuras clave seleccionadas y los nombres de la estructura de un engarce y de los compuestos intermedios para preparar el engarce, y los materiales de partida.

Descripción Detallada de la Invención

En la preparación de productos radiomarcados para la angiogénesis, un componente esencial importante en la síntesis para obtener un compuesto radiomarcado basado un péptido es la identificación de un engarce fiable y eficaz. En la presente invención, incluso cuando no existe un reactivo disponible en el mercado para el engarce de PEG-6, se divulgan en el presente documento síntesis cortas y convenientes a partir de reactivos rentables y disponibles.

Existen ventajas en el uso de las síntesis reivindicadas para obtener el engarce de PEG-6 reivindicado. Una ventaja es que la síntesis reivindicada es un procedimiento rápido para obtener el engarce de PEG-6. Otra ventaja es la síntesis conveniente usada cuando los reactivos son productos químicos ampliamente disponibles en el mercado y rentables. Más específicamente, usando el engarce A o 1, divulgado en el presente documento, es ventajoso para la producción a gran escala desde un punto de vista del coste cuando se usan compuestos de partida tales como el compuesto B o 2, respectivamente. Por ejemplo, si se fuera a empezar una reacción para preparar un engarce A o 1, no se comenzaría con el compuesto divulgado E o 5 ya que este compuesto es muy caro y mucho más difícil de aislar. Sería mucho más rentable, especialmente en una producción a gran escala, el uso del compuesto B o 2 como un compuesto de partida que se describe en el presente documento.

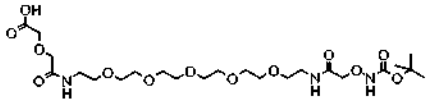
La presente invención también se refiere a una nueva síntesis para obtener un engarce de PEG-6 mediante la síntesis de polietilenglicoles modificados.

Existen varias ventajas para sintetizar polietilenglicoles modificados para obtener el engarce de PEG-6 reivindicado.

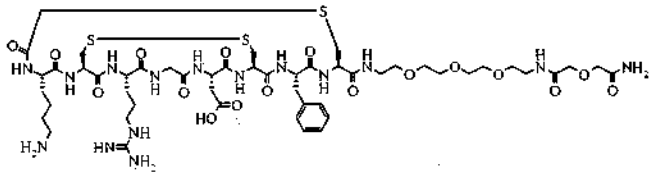
Una ventaja es que la síntesis reivindicada es un procedimiento corto y rápido para obtener el resto de PEG-6. La síntesis conveniente usada en el presente documento se puede realizar en un día haciendo posible producir el resto de PEG-6 en menos de dos semanas.

Un PEG 6 definido en el presente documento es un PEG (polietilenglicol) que consiste en una cadena de seis etilen glicoles individuales.

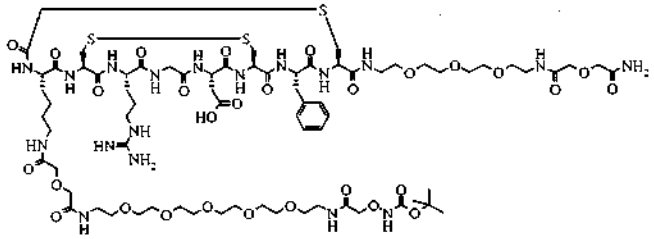
Como se ha mencionado anteriormente, el engarce de PEG-6 con aminoxi modificado protegido con Boc obtenido en el presente documento, figura (I), se puede unir a un vector. Específicamente, ese vector puede ser un fragmento basado en un péptido, figura (II), que forma un compuesto basado en un péptido de aminoxi protegido con Boc, figura (III). A partir de ese momento, el compuesto basado en un péptido de aminoxi protegido con Boc se sintetiza para obtener un compuesto radiomarcado basado en un péptido, por ejemplo, un compuesto de péptido basado en ^{18}F, como se muestra en la figura (IV), que se puede usar en la angiogénesis.



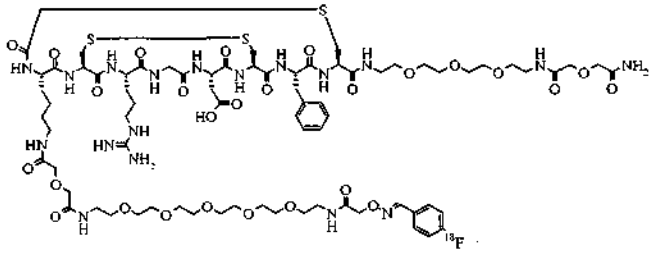
(I)



(II)



(III)



(IV)

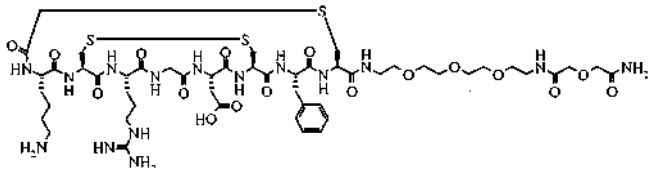
El término engarce como se usa en el presente documento se refiere a un resto que une entre sí al menos otros dos restos, tales como un vector y un indicador. El uso de grupos de engarces con diferentes lipofilias y/o carga pueden cambiar significativamente la farmacocinética *in vivo* de un péptido para adaptarse a la necesidad de diagnóstico. Se puede usar una amplia variedad de engarces, incluyendo engarces y biopolímeros biodegradables. El engarce es, en su forma más simple, un enlace entre el vector y el grupo aminoxi. Más generalmente, el engarce proporcionará

una cadena principal mono o multimolecular, por ejemplo una cadena principal lineal, cíclica, o ramificada. El engarce puede desempeñar adicionalmente la función de distanciar el vector del indicador. El engarce descrito en el presente documento comprende específicamente estructuras macromoleculares tales como dextrano y preferentemente poli(etilenglicoles), denominados PEG. Se ha descubierto que los engarces que incluyen un resto de PEG retrasan la depuración de la sangre que es deseable en algunas circunstancias. El engarce puede tener su origen en un resto basado en ácido glutárico y/o succínico y/o un polietilenglicol.

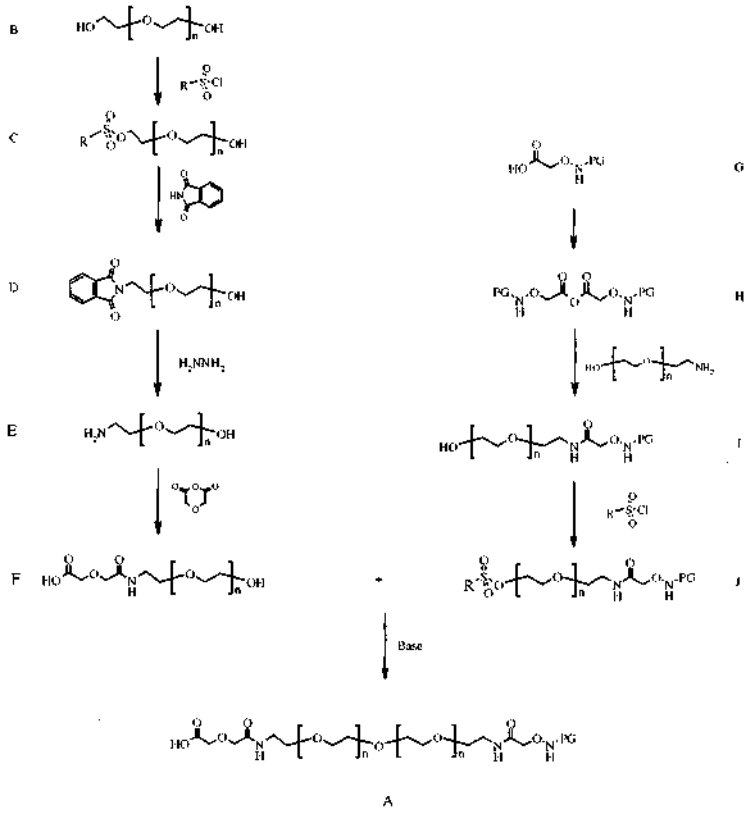
Todas las moléculas que tienen un resto central de PEG de diferentes longitudes y un ácido aminoxi acético protegido en un lado y un espaciador conectado como una amida a la otra parte terminal del resto de PEG se pueden sintetizar siguiendo el protocolo sintético descrito en consecuencia para la preparación de la fórmula (1) sin el uso de una azida, el anión con la fórmula N_3^-.

Además, el protocolo de síntesis que se describe a continuación permite la formación de restos de PEG de diferentes longitudes, es decir, el número de etilen glicoles acoplados en serie.

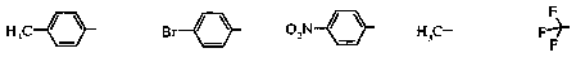
En el presente documento un vector se define como un fragmento de un compuesto o un resto que tiene afinidad por una molécula receptora, preferentemente una especie peptídica o más preferentemente una especie que dirige la angiogénesis tal como un péptido RGD. Un ejemplo específico de un vector usado en el presente documento es un péptido Arg-Gly-Asp o un análogo del mismo. Un ejemplo de dicho vector usado en el presente documento comprende el fragmento



Una realización de la presente invención representa un procedimiento para preparar un engarce. Más específicamente, se puede preparar un grupo protector ("PG") tal como un engarce de aminoxi protegido con Boc, fórmula (A), de acuerdo con el siguiente procedimiento:



en las que R representa una de las siguientes estructuras



y
en las que PG puede ser cualquier carbamato de la forma

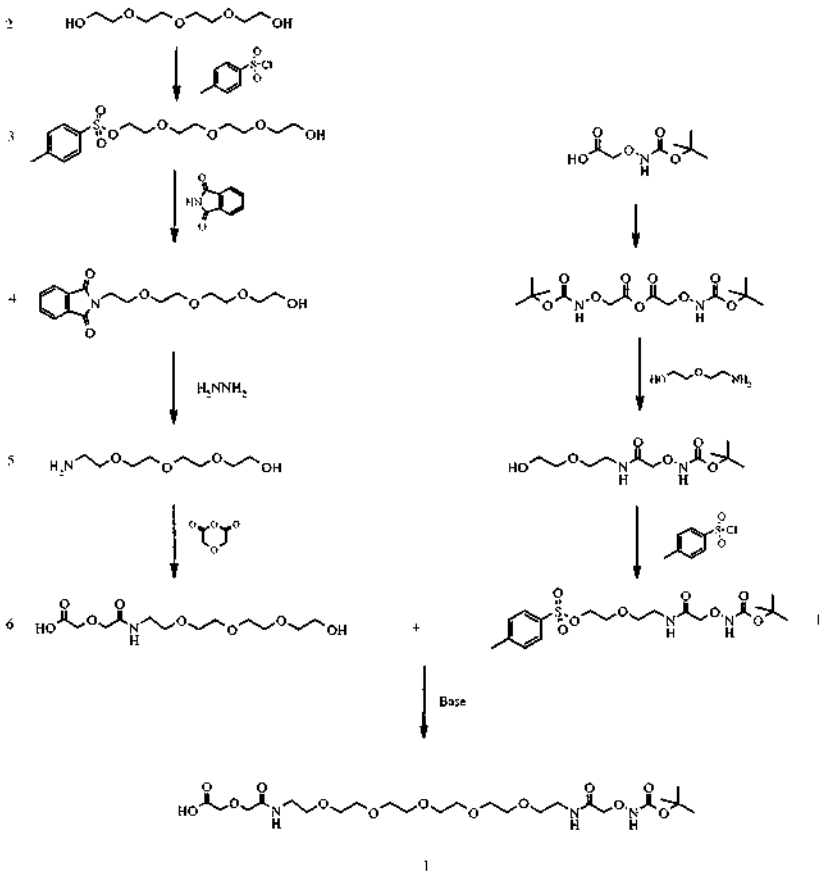
en la que R1 es alquilo o arilo y más preferentemente R1 = 9-fluorenilmetilo lo que significa que PG es 9-fluorenilmetoxicarbonilo y más preferentemente R1= *terc*-butilo lo que significa que PG es Boc, *t*-butoxicarbonilo (-$COOCH(CH_3)$), o en la que PG representa

en la que R2 = alquilo o arilo y más preferentemente R2 = H lo que significa que PG es formilo o R2 es un metilo lo que significa que PG es acetilo y más preferentemente donde R2 = fenilo lo que significa que PG es benzoílo o adicionalmente donde PG puede ser alquilo o arilo y más preferentemente alilo o lo más preferentemente bencilo, y n representa 1-19.

Es importante indicar aquí que los compuestos intermedios clave son D a E y H a I de este procedimiento. El término clave se define en el presente documento como crucial y necesario para preparar dicho engarce.

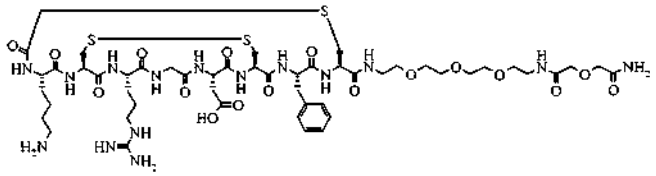
El tiempo del procedimiento para preparar 1 kilogramo del engarce A comenzando con los compuestos intermedios B y G puede estar en el intervalo de aproximadamente 1 semana a aproximadamente 5 semanas. Además, si los compuestos intermedios F y J se preparan paralelamente entre sí de modo que el tiempo total de síntesis para preparar I kilogramo del engarce A necesitará entre 3 y 4 semanas. La última etapa, el acoplamiento de F con J, seguido de purificación por HPLC (cromatografía líquida de alto rendimiento) no necesita más de I semana para completarse. La nueva síntesis que se desvela en el presente documento no solamente es más corta en el tiempo en comparación con otras etapas alternativas de síntesis sino que también es mucho más viable comercialmente para los usuarios.

Otra realización de la presente invención representa un procedimiento para preparar un engarce de fórmula (1), que comprende las siguientes reacciones:



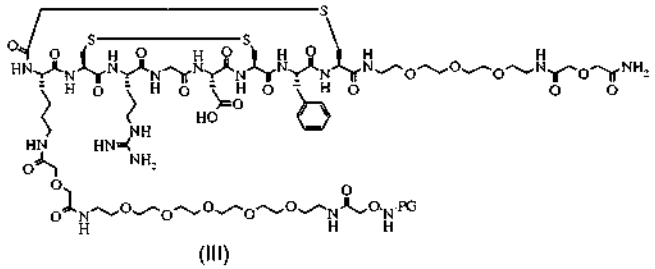
en las que la fórmula del engarce (1) es un engarce de aminoxi protegido con Boc y la base que combina 6 y 10 es diisopropilamida de litio.

Otra realización más de la invención presenta un procedimiento donde un vector tal como un fragmento de péptido, el compuesto (II):



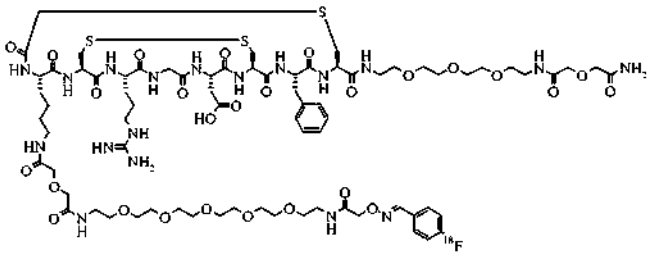
(II)

está conectado al engarce de fórmula (A) para formar el compuesto (III):



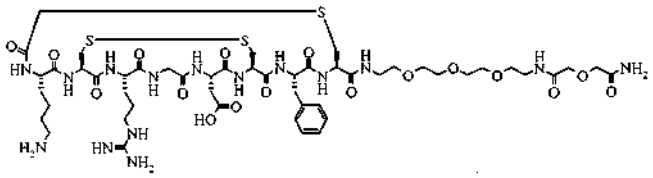
(III)

y a partir de ese momento el compuesto (III) reacciona con 4-^{18}F fluorobenceno para formar el compuesto (IV)



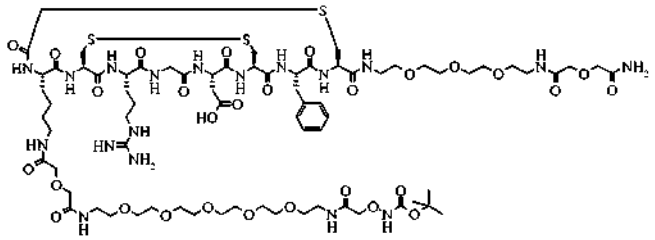
(IV).

Otra realización más de la invención presenta un procedimiento donde un vector tal como un fragmento de péptido, el compuesto (II):



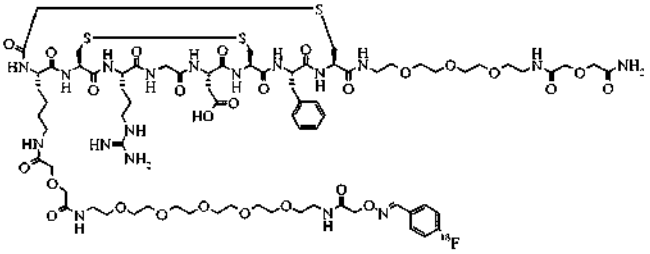
(II)

está conectado con un engarce de fórmula (1) para formar el compuesto (IIIa):



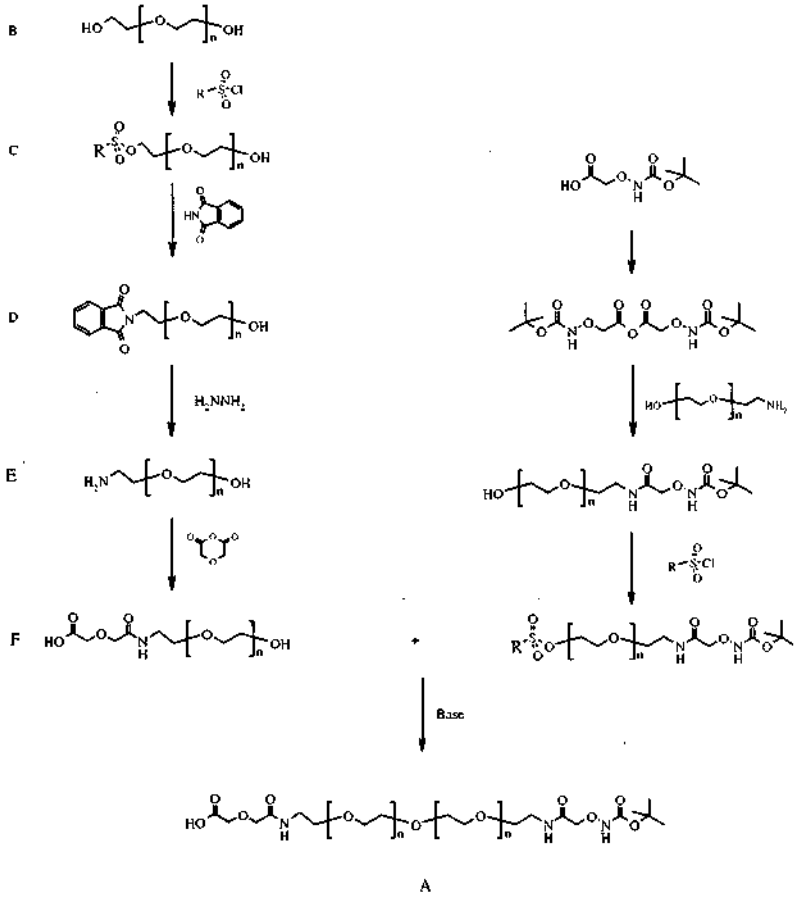
(IIIa)

y a partir de ese momento el compuesto (IIIa) reacciona con 4-^{18}F fluorobenceno para formar el compuesto (IV)



(IV).

Una realización adicional de la invención muestra el procedimiento para obtener la fórmula (A) a partir de la siguiente reacción:



en las que se usa sulfonilcloruro de *p*-tolueno para reaccionar con 1,11-dihidroxi-3,6,8-trioxa-undecano, (B). Estos dos compuestos se mezclaron juntos a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 15 ºC a aproximadamente 27 ºC durante aproximadamente 6 horas a aproximadamente 15 horas para formar 11-*O*-tosil-3,6,9-trioxa-1-hidroxi-undecano, (C) adicionalmente donde la temperatura preferente es aproximadamente 22 ºC y el tiempo preferente es aproximadamente 8 horas.

Otra realización de la presente invención de acuerdo con la reacción anterior para obtener la fórmula (A) es disolver 11-*O*-tosil-3,6,9-trioxa-1-hidroxi-undecano, (C), en dimetil formamida y ftalimida de potasio se agitó en (C) durante aproximadamente 6 horas a aproximadamente 15 horas en un intervalo de temperatura de aproximadamente 70 ºC a aproximadamente 100 ºC para formar *N*-(3,6,9-trioxa-11-hidroxi-undecano)-ftalimida, (D).

Una realización adicional de la invención de acuerdo con la reacción anterior para obtener la fórmula (A) es disolver (D) en tetrahidrofurano en un intervalo de temperatura de aproximadamente 30 ºC a aproximadamente 70 ºC para obtener la purificación de (D).

Otra realización más de la invención de acuerdo con la reacción anterior para obtener la fórmula (A) es disolver aproximadamente 80 a aproximadamente 120 miligramos del compuesto (D) en metanol y después añadir monohidrato de hidrazina al compuesto (D) y después calentar el compuesto (D) de aproximadamente 30 ºC a aproximadamente 80 ºC durante aproximadamente 1 a aproximadamente 5 horas y después enfriar la mezcla a temperatura ambiente y agitar la mezcla durante aproximadamente 6 horas a aproximadamente 15 horas formando de este modo 11-amino-3,6,9-trioxa-hidroxi-undecano, (E).

Otra realización de la invención de acuerdo con la reacción anterior para obtener la fórmula (A) es mezclar (E) con aproximadamente 1,0 mol de diclorometano, 1,0 mol de dimetil formamida, y 1,5 moles de anhídrido diglicólico y calentar la mezcla en un intervalo de temperatura de aproximadamente 30 ºC a aproximadamente 50 ºC durante aproximadamente 1 a aproximadamente 3 horas.

Otra realización más de la presente invención de acuerdo con la reacción anterior para obtener la fórmula (A) es ajustar el pH del compuesto (E) de aproximadamente 9 a aproximadamente 15 con aproximadamente 1 mol de NaOH (ac.) formando de este modo el ácido 17-hidroxi-3,9,12,15-tetraoxa-6-aza-5-oxo-heptadecanoico, (F).

Una realización adicional de la invención de acuerdo con la reacción anterior para obtener la fórmula (A) es disolver ácido (Boc-aminoxi)acético, (G), en anhídrido acético y calentar la mezcla a una temperatura en el intervalo de

aproximadamente 40 ºC a aproximadamente 70 ºC durante aproximadamente 48 horas a aproximadamente 72 horas para formar anhídrido (Boc-aminoxi)acético, (H).

Otra realización más de la invención de acuerdo con la reacción anterior para obtener la fórmula (A) es disolver la fórmula (H) en tetrahidrofurano y 2(2-aminoetil)etanol y después agitar la mezcla a temperatura ambiente durante aproximadamente 2 a 4 días.

Otra realización de la presente invención de acuerdo con la reacción anterior para obtener la fórmula (A) es mezclar la fórmula (H) con agua y ajustar el pH de aproximadamente 9 a 12 con NaOH (ac.) y después agitar dicha mezcla durante aproximadamente 6 horas a aproximadamente 15 horas para formar 5-N-(Boc-aminoxi-acetamida)-3-oxa-1-hidroxipentano, (I).

Otra realización más de la presente invención de acuerdo con la reacción anterior para obtener la fórmula (A) combina las fórmulas (F) y (J) mediante la base, diisopropilamida de litio.

Ejemplos

La invención se describe adicionalmente en los siguientes ejemplos, que de modo algunopretenden limitar el alcance de la invención.

La invención se ilustra por medio de ejemplos en los que se usan las siguientes abreviaturas:

p: para
o: orto
HPLC: cromatografía líquida de alto rendimiento
MS: Espectrometría de Masas
LC-MS: Cromatografía Líquida/Espectrometría de Masas
TEG: tetraetilenglicol
DMF: Dimetil formamida
RMN ^{1}H: resonancia magnética nuclear de protón
THF: Tetrahidrofurano
DMA: Dimetil acetamida
h(s) : hora u horas
min(s) : minuto o minutos
mg: miligramos
Boc: $-COOCH(CH_3)_3$
TA: temperatura ambiente
C: temperatura en Celsius
$M+H^+$: definido en el presente documento como Masa de un ión detectado en espectrometría de masas como el aducto entre una molécula y un protón.
$M+Na^+$: definido en el presente documento como Masa de un ión detectado en espectrometría de masas como el aducto entre una molécula y un ión de sodio.
UV: ultravioleta

Ruta sintética para la síntesis de un engarce de aminoxi protegido con Boc

Una ruta sintética para la síntesis de un engarce de aminoxi protegido con Boc se ve en la figura 1 que sigue a continuación. MS y LS-MS fueron las herramientas analíticas principales usadas para la identificación de los compuestos intermedios.

Todas las etapas sintéticas se realizaron usando materiales de partida y productos químicos relativamente baratos y fácilmente disponibles. Estas etapas se realizaron usando procedimientos sintéticos orgánicos establecidos. Ninguna de las etapas se puede identificar como costosa o ineficaz.

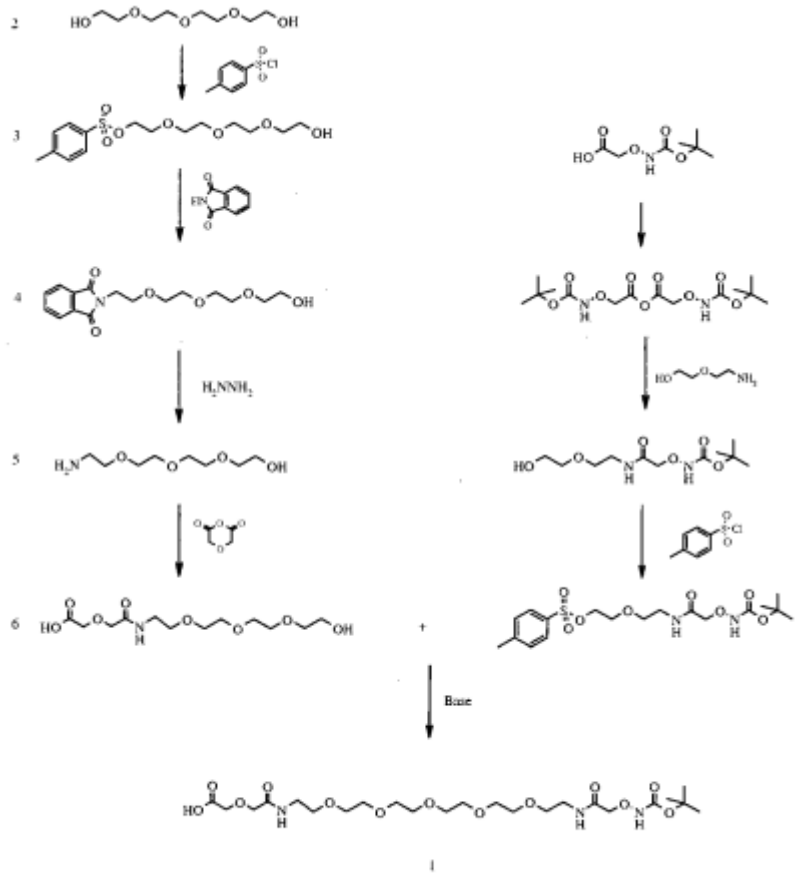
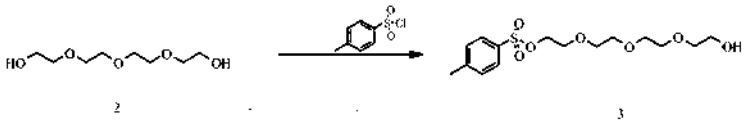


Figura 1 *Síntesis del engarce de aminoxi protegido con Boc*

Datos experimentales para cada etapa del procedimiento para la síntesis del engarce de aminoxi protegido con Boc

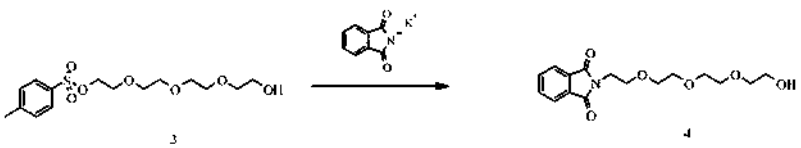
i. 11-*O*-tosil-3,6,9-trioxa-1-hidroxi-undecano (3)



Una solución de sulfonilcloruro de p-tolueno preparada previamente se añadió gota a gota durante 60 min a una solución de trietilamina y 1,11-dihidroxi-3,6,9-trioxa-undecano (TEG) (2) cloroformo. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente (20-23 ºC) durante una noche. La mezcla de reacción se filtró a partir de ese momento y el filtrado se evaporó a presión reducida. El residuo se mezcló primero y se agitó con hexano, después con acetato de etilo/hexano a 1:1 y finalmente el producto se extrajo a partir del residuo por suspensión del residuo en acetato de etilo. La suspensión se filtró y el producto se recogió en el filtrado. El filtrado se evaporó a presión reducida y el residuo se analizó por MS.

La MS confirmó una mezcla de compuesto monotosilado ($M+H^+$ 349,14) y ditosilado ($M+H^+$ 503,15), sin reaccionar

ii. Formación de *N*-(3,6,9-trioxa-11-hidroxi-undecano)-ftalimida (4)



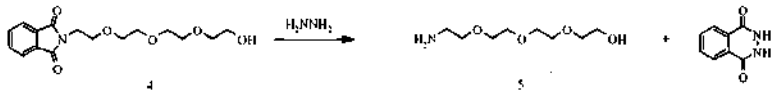
El TEG tosilado (3) de la primera etapa se disolvió en DMF y se añadió ftalimida de potasio. La mezcla de reacción se agitó a 80 ºC durante una noche. A la mañana siguiente la temperatura se elevó a 90 ºC durante dos horas.

Después de enfriar a temperatura ambiente, la mezcla se filtró y el filtrado se evaporó a presión reducida. El residuo se mezcló con metanol y se filtró y el filtrado se evaporó a presión reducida. Este procedimiento se repitió con éter dietílico.

iii. Purificación de *N*-(3,6,9-trioxa-11-hidroxi-undecano)-ftalimida (4)

La *N*-(3,6,9-trioxa-11-hidroxi-undecano)-ftalimida en bruto que contenía bis-*N*-ftalimida se disolvió en tan poco THF como fue posible. La solución de THF se añadió gota a gota a agua a 40-60 ºC. La bisamida precipitó a partir de agua y se retiró por filtración después de refrigeración. El filtrado se evaporó a presión reducida y se añadió el éter dietílico al residuo y el producto se extrajo del residuo sólido en el éter dietílico. El éter se decantó y el procedimiento se repitió una vez. El residuo se mezcló con agua y se extrajo 1x con éter dietílico y 2x con acetato de etilo. Las fases combinadas de acetato de etilo se evaporaron a presión reducida. Las fases de éter se combinaron, se decantaron y se evaporaron. El residuo se disolvió en acetato de etilo y la solución se añadió al producto aislado a partir de extracción enérgica. Esta segunda solución de acetato de etilo se evaporó a presión reducida. La estructura de 4 se confirmó por RMN ^{1}H. La relación entre el producto 4 : bisimida : TEG fue 86:2:12 (RMN).

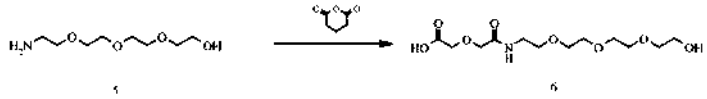
iv. 11-Amino-3,6,9-trioxa-hidroxi-undecano



Se disolvieron 100 mg del compuesto 4 en metanol y se añadió monohidrato de hidrazina. La mezcla se calentó a 50 ºC durante 3 horas, se enfrió a temperatura ambiente y se agitó a temperatura ambiente durante una noche.

MS confirmó el producto deseado (M+H$^+$ 194,1).

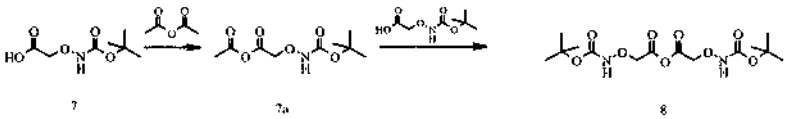
v. Ácido 17-hidroxi-3,9,12,15-tetraoxa-6-aza-5-oxo-heptadecanoico (6)



La amina 5 se mezcló con diclorometano y un poco de DMF como codisolvente. Se añadieron 1,5 equivalentes molares de anhídrido diglicólico y la mezcla se calentó a 40 ºC durante un par de horas. Después de enfriar a temperatura ambiente y de agitar durante el fin de semana, la mezcla de reacción se evaporó a presión reducida. El residuo se mezcló con agua y el pH se ajustó a un pH entre 11-12 con IN $NaOH_{(ac.)}$ para la hidrólisis del éster. La solución se dejó en agitación durante una noche y después se acidificó con HCl a pH 1-2 y se evaporó a presión reducida.

LC-MS del residuo mostró un pico principal con las masas esperadas M+H$^+$ 310,15 y M+Na$^+$ 332,13.

vi. Anhídrido (Boc-aminoxi)acético (8)

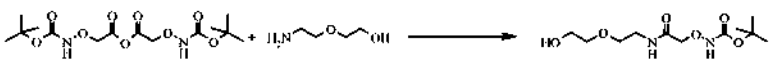


El ácido (Boc-aminoxi)acético (7) se disolvió en anhídrido acético y se calentó a 50-60 ºC durante el fin de semana. LC-MS de la mezcla de reacción mostró varios productos diferentes incluyendo el anhídrido mixto 7a y el anhídrido simétrico 8.

El anhídrido 7a fue originalmente el compuesto diana, sin embargo, se encontró 8 en la mezcla de reacción y es un reactivo mejor que 7a para la siguiente etapa (véase anteriormente) ya que la *N*-acilación con 7a puede dar dos productos diferentes; *N*-(boc-aminoxi)acetamida como el producto deseado y N-acetamida como producto secundario.

La estructura del compuesto 8 se confirmó mediante fragmentos por LC-MS (M+H$^+$ 365) con M+H$^+$ 265,1 y M+H$^+$ 165 indicó la pérdida de uno de los dos grupos Boc.

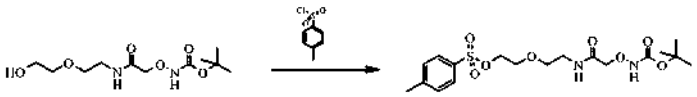
vii. 5-*N*-(Boc-aminoxi-acetamida)-3-oxa-1-hidroxipentano (9)



8 9

Una mezcla que contenía el compuesto 8 se disolvió en THF y se añadió 2(2-aminoetil)etanol. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 días. La mezcla de reacción se mezcló con agua y el pH se ajustó por encima de 10 con $NaOH_{(ac.)}$ y se agitó durante una noche. La mezcla de reacción se añadió a THF y salmuera y se extrajo. La fase de THF evaporada se usó directamente en la siguiente etapa. El producto se identificó usando LC-MS.

viii. 5-*N*-(Boc-aminoxi-acetamida)-3-oxa-1-(O-tosil)pentano(9)



9 10

<u>Discusión/Resultados</u>

El compuesto diana, un engarce de aminoxi protegido con Boc, se debe preparar por acoplamiento entre los compuestos intermedios 6 y 10. Los resultados de los experimentos muestran que tanto el compuesto 6 (4 etapas sintéticas) como el 10 (3 etapas sintéticas) se pueden preparar mediante procedimientos sintéticos sencillos. El compuesto 10 se preparó en tres etapas sintéticas sin ningún tipo de purificación. La formación de éter usando el procedimiento sugerido se confirmó en el experimento ix anterior.

Una etapa importante en la síntesis es la formación del compuesto 9. Existen varias aproximaciones para realizar esto. Una es preparar el haluro de ácido del compuesto 7, sin embargo, el grupo Boc no es estable durante, por ejemplo, la cloración del ácido. Otro procedimiento es el uso de reactivos de acoplamiento. Un problema al usar reactivos de acoplamiento son los bajos pesos moleculares del producto y de los reactivos.

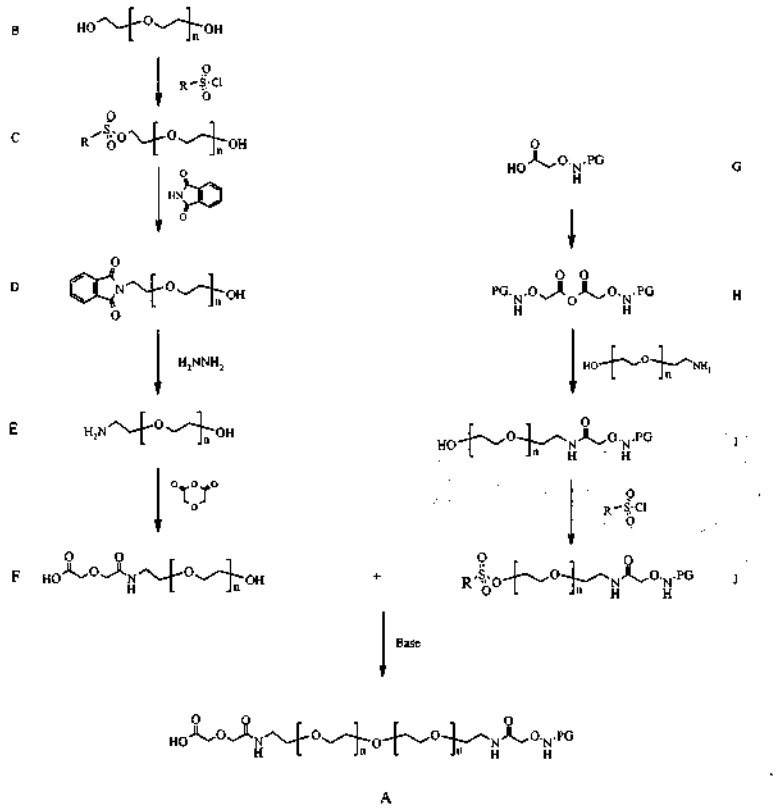
La formación del compuesto 8 podría ser la mejor solución y la formación se demuestra en el experimento vi, véase anteriormente. El ajuste de esta síntesis para dar un compuesto 8 relativamente puro parece ser la clave para el éxito. Se hace un seguimiento de esta etapa usando un anhídrido mixto preparado *in-situ* entre ácido fórmico y acético. La mayor reactividad del formilo sobre el acetilo daría un anhídrido mixto entre 7 y el formilo. El grupo formilo es menos estable que el acetilo y la formación de 8 se debería favorecer si 7 está presente. El anhídrido 8 se considera como la estructura termodinámica preferente sobre los anhídridos mixtos.

<u>Realizaciones Específicas, Cita de Referencias</u>

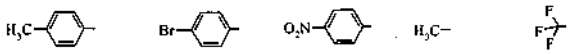
La presente invención no debe estar limitada en su alcance por las realizaciones específicas que se describen en el presente documento. De hecho, diversas modificaciones de las invenciones, además de las que se han descrito en el presente documento, serán evidentes para los expertos en a partir de la descripción anterior y figuras anteriores. Se pretende que dichas modificaciones estén comprendidas dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REVINDICACIONES

1. Un procedimiento para preparar un engarce de fórmula (A), que comprende las siguientes reacciones:



en las que R representa una de las siguientes estructuras

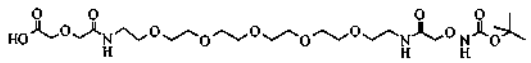


y
en las que PG puede ser cualquier carbamato de la forma

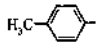
en la que R1 es alquilo o arilo y más preferentemente R1 = 9-fluorenilmetilo donde PG es 9-fluorenilmetoxicarbonilo y más preferentemente R1= *terc*-butilo donde PG es Boc, *t*-butoxicarbonilo (-COOCH(CH_3))
o donde PG representa

en la que R2 = alquilo o arilo y más preferentemente R2 = H donde PG es formilo o R2 es un metilo donde PG es acetilo y más preferentemente donde R2 = fenilo donde PG es benzoílo
o adicionalmente donde PG puede ser alquilo o arilo y más preferentemente alilo o más preferentemente bencilo
y n representa 1-19.

2. El procedimiento de acuerdo con la Reivindicación 1 en el que dicho engarce de fórmula (A) es un engarce de fórmula (1):

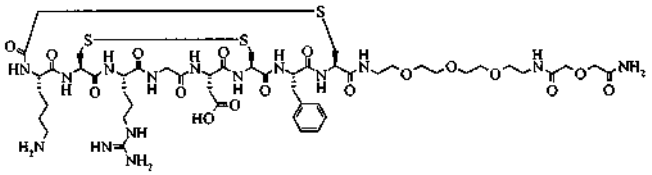


y en la que R es



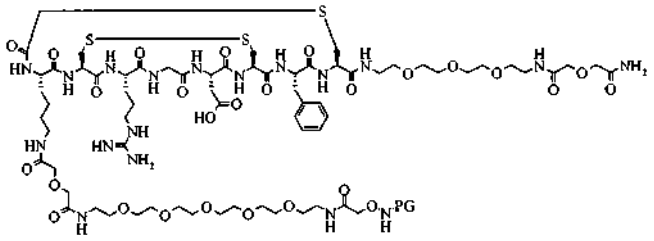
R1 es terc-butilo y n es 1 para los compuestos intermedios de fórmulas I y J, y n es 3 para los compuestos intermedios de fórmulas B-F.

3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el engarce de fórmula (A) reacciona con el compuesto (II):



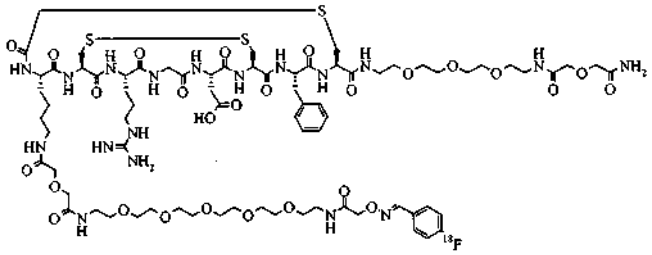
(II).

4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el engarce de fórmula (A) se une al compuesto (II) para formar el compuesto (III):



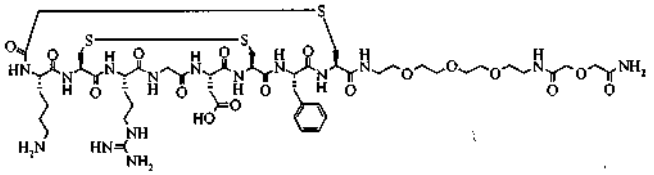
(III)

y a continuación el compuesto (III) reacciona con 4-^{18}F fluorobenceno para formar el compuesto (IV)



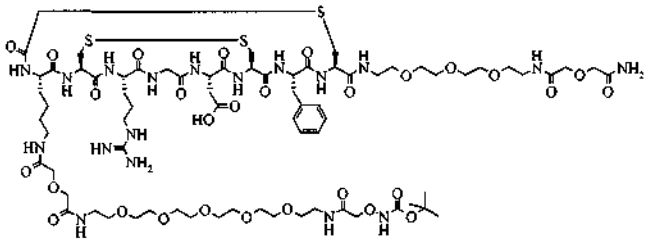
(IV).

5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el engarce de fórmula (1) reacciona con el compuesto (II):



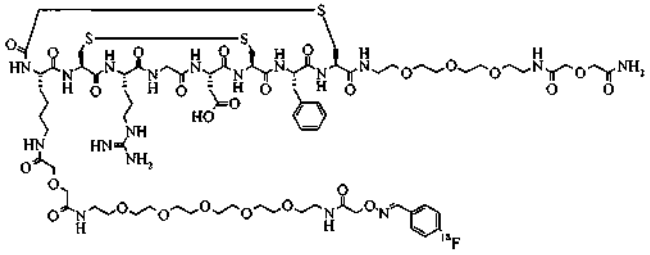
(II).

6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el engarce de fórmula (1) se une al compuesto (II) para formar el compuesto (IIIa):



(IIIa)

y a continuación el compuesto (IIIa) reacciona con 4-^{18}F fluorobenceno para formar el compuesto (IV)



(IV).

7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que 11-*O*-tosil-3,6,9-trioxa-1-hidroxi-undecano, (C), se disolvió en dimetil formamida y ftalimida de potasio se agitó en (C) durante 6 horas a 15 horas en un intervalo de temperatura de 70 ºC a 100 ºC para formar *N*-(3,6,9-trioxa-11-hidroxi-undecano)-ftalimida, (D).

8. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que (D) se disolvió en tetrahidrofurano en un intervalo de temperatura de 30 ºC a 70 ºC para obtener la purificación de (D).

9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que 80 a 120 miligramos del compuesto (D) se disolvieron en metanol y se añadió monohidrato de hidrazina al compuesto (D) y después el compuesto (D) se calentó de 30 ºC a 80 ºC durante 1 a 5 horas y después se enfrió a temperatura ambiente y se agitó durante 6 horas a 15 horas formando de este modo 11-amino-3,6,9-trioxa-hidroxi-undecano, (E).

10. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que (E) se mezcló con 1,0 mol de diclorometano, 1,0 mol de dimetil formamida, y 1,5 moles de anhídrido diglicólico y se calentó en un intervalo de temperatura de 30 ºC a 50 ºC durante 1 a 3 horas.

11. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el compuesto (E) se ajustó a un pH de 9 a 15 con 1 mol de NaOH(ac.) formando de este modo ácido 17-hidroxi-3,9,12,15-tetraoxa-6-aza-5-oxo-heptadecanoico, (F).

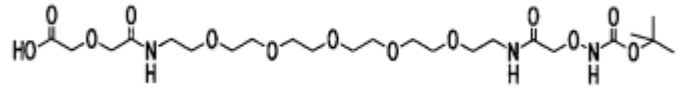
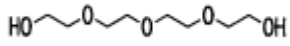
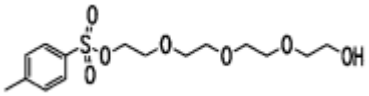
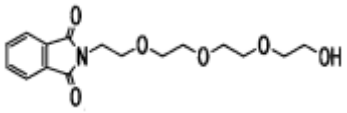
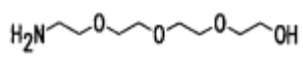
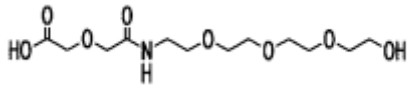
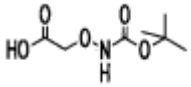
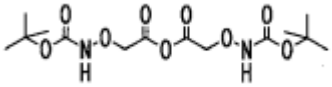
12. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el ácido (PG-aminoxi)acético, (G), se disuelve en anhídrido acético y se calienta a una temperatura en el intervalo de 40 ºC a 70 ºC durante 48 horas a 72 horas para formar anhídrido (PG-aminoxi)acético, (H).

13. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el compuesto intermedio de fórmula (H) se disolvió en tetrahidrofurano y 2 (2-aminoetil)etanol y se agitó a temperatura ambiente durante 2 a 4 días.

14. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13, en el que el compuesto intermedio de fórmula (H) se mezcló a continuación con agua y el pH se ajustó de 9 a 12 con NaOH(ac.) y se agitó durante 6 horas a 15 horas para formar 5-*N*-(PG-aminoxi-acetamida)-3-oxa-1-hidroxipentano, (I).

15. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los compuestos intermedios de fórmulas (F) y (J) son combinados con la base, diisopropilamida de litio.

Tabla 1: Estructuras seleccionadas y nombres estructurales de productos, materiales de partida y compuestos intermedios

 Ácido 23-(Boc-aminoxiacetil-amino)-5-oxo-6-aza-3,9,12,15,18,21-hexaoxatriconsanoico
 1,11-dihidroxi-3,6,8-trioxa-undecano
 11-*O*-tosil-3,6,9-trioxa-1-hidroxi-undecano
 *N*-(3,6,9-trioxa-11-hidroxi-undecano)-ftalimida
 11-amino-3,6,9-trioxa-hidroxi-undecano
 Ácido 17-hidroxi-3,9,12,15-tetraoxa-6-aza-5-oxo-heptadecanoico
 Ácido (Boc-aminoxi) acético
 Anhídrido (Boc-aminoxi) acético

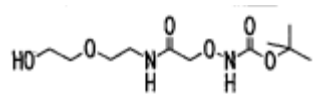
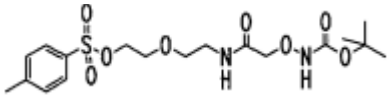
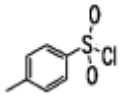
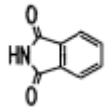
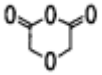
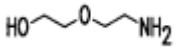
 5-*N*-(Boc-aminoxi-acetamida)-3-oxa-1-hidroxipentano
 *N*-(Boc-aminoxi-acetamida)-3-oxa-1-(*0*-tosil)pentano
 sulfonilcloruro de *p*-tolueno
 Ftalimida de potasio
 Hidrazina
 anhídrido diglicólico
 2(2-aminoetil)etanol
Base a usar en la etapa final: LDA Diisopropilamida de litio
Reactivos: (incluidos solamente los implicados directamente en la reacción, bases, disolvente, etc.)

FIGURA 1B