

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 537 623**

51 Int. Cl.:

G01N 33/533 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.08.2010 E 12189317 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.02.2015 EP 2549276**

54 Título: **Enlace covalente reversible de moléculas funcionales**

30 Prioridad:

10.08.2009 GB 0913965

10.08.2009 GB 0913967

14.08.2009 GB 0914321

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

10.06.2015

73 Titular/es:

UCL BUSINESS PLC (100.0%)

**The Network Building, 97 Tottenham Court Road
London, W1T 4TP, GB**

72 Inventor/es:

**SMITH, MARK;
CADDICK, STEPHEN y
BAKER, JAMES**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 537 623 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

Enlace covalente reversible de moléculas funcionales

Introducción

5 Es bien sabido que puede resultar deseable unir dos o más moléculas entre sí, que posean cada una propiedades específicas. De esta manera, se hace posible generar nuevas moléculas, conocidas como conjugados, que tienen las características combinadas de sus componentes. Esta técnica proporciona un medio atractivo para modificar las propiedades existentes de moléculas funcionalmente útiles, o para añadir aspectos funcionales completamente nuevos a tales moléculas, de una manera controlada y de aplicación amplia.

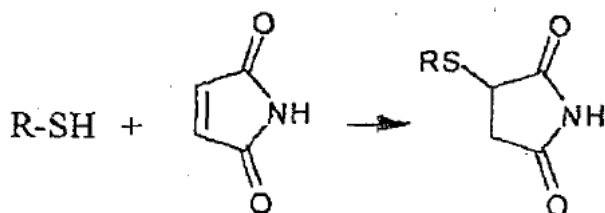
10 La posibilidad de conjugar entre sí dos o más compuestos funcionales ha potenciado un interés, particularmente alto, en el campo de la biotecnología. La conjugación de biomoléculas tales como proteínas o moléculas biológicamente activas, tales como fármacos, a un compuesto funcional secundario ha sido utilizada en una extensa variedad de aplicaciones, incluyendo técnicas de detección, estudios de proteómica, métodos de purificación y en el diagnóstico y tratamiento de una enfermedad. Es tal la omnipresencia de estas metodologías que actualmente se encuentran disponibles manuales estándar dedicados por completo a este tema. Un manual de este tipo es "Bioconjugate Techniques" (Greg T. Hermanson, Academic Press Inc., 1996), cuyo contenido se incorpora a la presente patente a modo de referencia en su totalidad.

15 Los métodos para unir entre sí diversos compuestos funcionales se focalizan, habitualmente, en el uso de moléculas entrecruzadoras pequeñas. Un reactivo de unión de este tipo contiene al menos dos grupos funcionales. Cada uno de estos grupos funcionales es capaz de reaccionar con una molécula funcional para generar una molécula conjugada entrecruzada final.

20 Una amplia variedad de grupos funcionales para reactivos entrecruzadores han sido desarrollados para reaccionar con grupos funcionales diana específicos presentes en las moléculas funcionales que van a ser unidas entre sí. Por ejemplo, entrecruzadores que contienen grupos éster activados tales como los ésteres de N-hidroxisuccinimida han sido utilizados durante mucho tiempo para reaccionar con fracciones funcionales que contienen grupos amina reactivos, tales como proteínas. Los entrecruzadores que contienen hidrazida (por ejemplo, dihidrazida de ácido adípico), han sido utilizados para funcionalizar moléculas funcionales que contienen carboxilo tales como glicoproteínas.

25 El entrecruzamiento de una molécula funcional con otra puede además lograrse estableciendo como diana un grupo tiol reactivo en una molécula funcional. Este enfoque puede resultar particularmente atractivo cuando la molécula funcional en cuestión es un péptido o una proteína. Una razón para ello está basada en que los residuos de cisteína que contienen tiol habitualmente tienen una baja presencia natural en las proteínas, abriendo, por tanto, la posibilidad a procedimientos de modificación sumamente selectivos. Las técnicas estándar de mutagénesis dirigida también permiten la fácil inserción de un residuo de cisteína en una localización específica en una proteína, generando así un grupo tiol reactivo, que puede entonces ser modificado por una fracción funcional mediante un entrecruzador adecuado.

30 Diversos compuestos han sido utilizados como reactivos de unión capaces de reaccionar con un grupo tiol. Estos reactivos incluyen derivados de eteno 1,2-dicarbonílico, compuestos α -halo carbonilo y tiosulfonatos. De estos, los derivados de eteno 1,2-dicarbonílico, tales como las maleimidias, son reconocidos por ser los reactivos más selectivos para la reacción con un tiol, en particular con una fracción de cisteína. El grupo tiol en una molécula funcional que contiene tiol ("R-SH") reacciona con la maleimida para producir un enlace tioéter tal como sigue a continuación:



35 La fracción de amida reactiva en la maleimida está disponible para reaccionar con un compuesto funcional adicional, para producir un conjugado en el que la molécula funcional que contiene tiol se une a una fracción funcional adicional. Los reactivos de maleimida son por lo tanto útiles para conjugar proteínas que contienen cisteína con

varias moléculas secundarias (por ejemplo, un fluoróforo, biotina, un polietilenglicol o un carbohidrato). Estas moléculas secundarias están a menudo unidas al anillo de maleimida mediante una especie químicamente inerte de conector.

Desafortunadamente, sin embargo, esta aproximación a la generación de conjugados presenta varias desventajas. Por ejemplo, habitualmente la manipulación química del producto de reacción únicamente es posible en la fracción de amida. Esto significa que puede ser difícil añadir más de un grupo funcional adicional al compuesto que contiene tiol con un único conector de maleimida. Además, el enlace tioéter formado entre la molécula funcional que contiene tiol y el entrecruzador de maleimida es irreversible. Por consiguiente, la derivatización efectuada mediante el entrecruzador es permanente y no es posible regenerar el reactivo nativo que contiene tiol.

La irreversibilidad de la reacción de derivatización conocida entre el reactivo que contiene tiol y un entrecruzador puede poner serias limitaciones en lo referente a su utilidad práctica en áreas tales como purificación de proteínas, análisis proteómico cuantitativo, en la hibridación de sitios de unión, en posibilitar estudios estructurales y en la administración de fármacos. Por ejemplo, en un método de purificación que implique la generación de un conjugado entre una proteína que contenga tiol y una etiqueta de afinidad (tal como la biotina), no sería posible regenerar la proteína nativa después de la purificación mediante el desprendimiento de la maleimida. La incapacidad para regenerar los reactivos que contienen tiol puede ser también un problema serio cuando se llevan a cabo procedimientos que implican proteínas que son difíciles de expresar, tales como muchos GPCRs (receptores acoplados a proteínas G). La irreversibilidad del proceso de entrecruzamiento también impide la explotación de la metodología de bioconjugados en áreas donde la labilidad del enlace entre el entrecruzador y la proteína es importante (por ejemplo, donde la entidad de entrecruzamiento se diseña para bloquear la actividad de una enzima durante únicamente un periodo limitado y preferiblemente controlable).

La presente invención se basa en el sorprendente hallazgo de que es ventajoso incorporar un grupo saliente electrófilo al enlace doble C=C de un conocido reactivo de entrecruzamiento de eteno 1,2-dicarbonílico. Esa modificación química permite que una fracción funcional que contenga tiol, tal como un péptido o una proteína, se enlace al reactivo de entrecruzamiento a la vez que conserva el enlace doble C=C. Esto presenta las siguientes ventajas:

- La reacción entre el entrecruzador y el compuesto tiol puede ser realizada a menudo rápidamente y con un elevado rendimiento, utilizando únicamente una cantidad sustancialmente estequiométrica del entrecruzador.
- El enlace tioéter entre el entrecruzador y la molécula que contiene tiol es fácilmente reversible, y en particular puede escindirarse de forma controlada en un momento elegido por el experto en el arte.
- El mantenimiento del enlace doble en el compuesto obtenido después de enlazar la fracción que contiene tiol al entrecruzador, constituye un sitio de reacción para el enlace a compuestos funcionales adicionales. Puede por lo tanto resultar más sencillo añadir fracciones funcionales al conjugado.

La nueva metodología de entrecruzamiento se puede aplicar fácilmente a través de todo el espectro completo de métodos conocidos que implican la conjugación de fracciones funcionales, que actualmente se están realizando de forma rutinaria en el arte.

La patente de Estados Unidos 4.680.272 describe el uso de maleimidias halogenadas y derivados de las mismas como un "colorante" fluorescente para detectar proteínas que tienen grupos amina o tiol. La patente de Estados Unidos 4.680.272 no revela, sin embargo, el uso de reactivos de entrecruzamiento de eteno 1,2-dicarbonílico que tengan un grupo saliente electrófilo en el enlace doble C=C para construir moléculas conjugadas, ni que el enlace formado entre un compuesto tiol y un entrecruzador de ese tipo sea fácilmente reversible y puede a menudo realizarse a un elevado rendimiento utilizando una cantidad sustancialmente estequiométrica del entrecruzador.

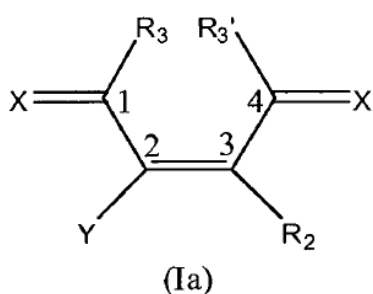
En Hong et al. (J. Am. Chem. Soc., 2009, 131 (29), págs. 9986-9994) se describe una nueva clase de sondas fluorogénicas para tioles basada en una estructura 7-oxanorbomadieno. En un experimento específico descrito en el presente ensayo, un reactivo de 7-oxanorbomadieno que porta una fracción fluorogénica de dansilo se hizo reaccionar con albúmina de suero bovino. El producto resultante se sometió a una reacción retro-Diels-Alder para generar un producto que comprendía una fracción de entrecruzamiento de maleimida que portaba la albúmina de suero bovino en un átomo de carbono del enlace doble C=C y un átomo de hidrógeno del enlace doble C=C. En Hong et al. no se describe, sin embargo, el uso de etenos 1,2-dicarbonílicos que portan un grupo saliente electrófilo como reactivos para construir una molécula conjugada.

Lorey et al; The Journal of Biological Chemistry (2002) Vol 277, No 36, páginas 33170-33177 revela la conjugación del sustrato fluorescente Ala-Pro-R110 de la dipeptidil peptidasa IV a los grupos SH de una superficie celular a través de un compuesto dicloro-maleimidilo.

5 En la patente de Estados Unidos 7.504.430 B2 y en Kar et al. (Mol. Cancer Ther 2006;5(6) Junio 2006 págs. 1511-1519) se describe un proceso para realizar compuestos farmacéuticos que contienen maleimida en los que un derivado de 3,4-dibromomaleimida se hace reaccionar con compuestos mercapto-alquílicos pequeños, opcionalmente sustituidos. Estos documentos no describen, sin embargo, procesos para construir moléculas conjugadas que comprenden al menos dos fracciones funcionales según se definen en la presente patente, ni que el enlace formado entre un compuesto tiol y un entrecruzador de acuerdo a la presente invención, sea fácilmente reversible y pueda a menudo ser realizado con un elevado rendimiento utilizando una cantidad esencialmente estequiométrica del entrecruzador.

Resumen de la invención

10 La presente invención proporciona (1) el uso de un compuesto de la fórmula (Ia) como un reactivo para enlazar un compuesto de la fórmula R_1-H que comprende una primera fracción funcional de fórmula F_1 a una segunda fracción funcional de fórmula F_2



en donde:

- 15 - X y X' cada una representan oxígeno;
- Y es un grupo saliente electrófilo;
- R₃ y R₃' juntos forman un grupo de fórmula -N(R₃₃'), en donde R₃₃' representa un átomo de hidrógeno o un grupo de fórmula Y, Nu, -L(Z)_n o IG;
- R₂ representa un átomo de hidrógeno o un grupo de fórmula Y, Nu, -L(Z)_n o IG;
- 20 - cada grupo de fórmula Y es el mismo o diferente y representa un grupo saliente electrófilo;
- cada grupo de fórmula Nu es el mismo o diferente y representa un nucleófilo seleccionado de -OH, -SH, -NH₂ y -NH(alquilo C₁₋₆);
- cada grupo de fórmula L es el mismo o diferente y representa un grupo conector;
- cada grupo de fórmula Z es el mismo o diferente y representa un grupo reactivo unido a un grupo de fórmula L que es capaz de reaccionar con un compuesto que contienen una segunda fracción funcional, según se define en la reivindicación 1, de tal manera que dicha segunda fracción funcional se enlaza a dicho grupo de fórmula L;
- 25 - n es 1, 2 o 3; y
- cada grupo de fórmula IG es el mismo o diferente y representa una fracción que es un grupo alquilo C₁₋₂₀, un grupo C₂₋₂₀ alqueno o un grupo C₂₋₂₀ alquino, que es sustituido o no sustituido por uno o más sustituyentes seleccionados de átomos de halógeno y grupos de ácido sulfónico, y en los que (a) 0, 1 o 2 átomos de carbono se reemplazan por grupos seleccionados de arileno C₆₋₁₀, heteroarileno de 5- a 10- miembros, carbociclileno C₃₋₇ y grupos heterociclileno de 5- a 10- miembros, y (b) 0, 1 o 2 grupos -CH₂- se reemplazan por grupos seleccionados de grupos -O-, -S-, -S-S-, -C(O)- y -N(alquilo C₁₋₆)-, en donde:
- 30 (i) dichos grupos arileno, heteroarileno, carbociclileno y heterociclileno son no sustituidos o sustituidos por uno o más sustituyentes seleccionados de átomos de halógeno y grupos alquilo C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆, alquiltiol C₁₋₆, -N(alquilo C₁₋₆) (alquilo C₁₋₆), nitro y ácido sulfónico; y
- 35

(ii) 0, 1 o 2 átomos de carbono en dichos grupos carbocíclico y heterocíclico se reemplazan por grupos -C(O)-; y

- o bien:

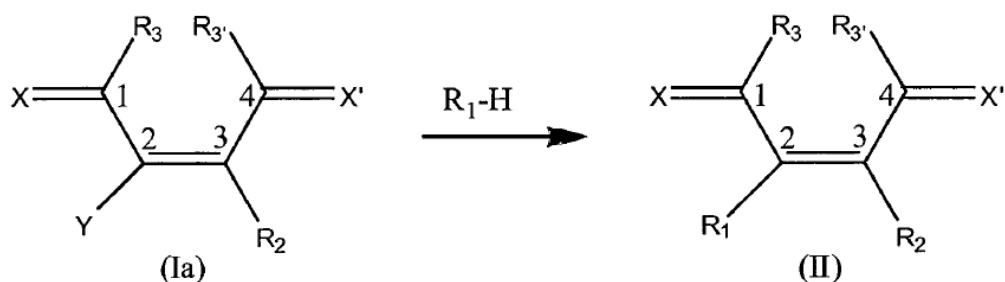
5 - la primera fracción funcional o la segunda fracción funcional es una proteína que es un anticuerpo o fragmento de un anticuerpo que es capaz de unirse a un antígeno específico a través de un epítipo en el antígeno, y la otra de entre la primera fracción funcional y la segunda fracción funcional es un fármaco, o bien

10 - la primera fracción funcional o la segunda fracción funcional es una fracción polimérica seleccionada a partir de péptidos, proteínas, polisacáridos, poliéteres, poliaminoácidos, alcoholes polivinílicos, polivinilpirrolidonas, ácido poli(met)acrílico y derivados del mismo, poliuretanos y polifosfacenos, y la otra de entre la primera fracción funcional y la segunda fracción funcional es un fármaco;

en donde el grupo R_1 se enlaza al compuesto de la fórmula (Ia) a través del ataque nucleófilo del primer grupo SH en el compuesto de fórmula R_1-H en la posición 2 del compuesto de la fórmula (Ia), de tal manera que el grupo Y en la posición 2 es reemplazado por el grupo R_1 .

15 La presente invención también proporciona (2) un proceso para producir un conjugado, cuyo proceso comprende

(i) hacer reaccionar un compuesto de la fórmula (Ia) con un compuesto de fórmula R_1-H , produciendo de este modo un compuesto de la fórmula (II);

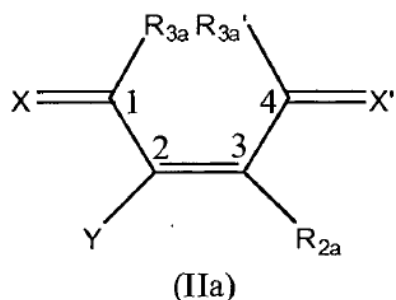


(ii) posteriormente enlazando una fracción de fórmula F_2 a dicho compuesto de la fórmula (II);

20 en donde la etapa (i) implica unir el grupo R_1 a través de un ataque nucleófilo del primer grupo SH en el compuesto de fórmula R_1-H en la posición 2 del compuesto de la fórmula (Ia), de tal manera que el grupo Y en la posición 2 es reemplazado por el grupo R_1 ,

y en donde X, X', Y, R_1 , R_2 , R_3 , R_3' y F_2 son todos tal como se define en la referencia (1) anterior.

25 La presente invención también proporciona (3) un proceso para producir un conjugado, cuyo proceso comprende hacer reaccionar un compuesto de fórmula R_1-H con un compuesto de la fórmula (IIa)



- en donde:

- R_{3a} y $R_{3a'}$ juntos forman un grupo de fórmula $-N(R_{33a'})$, en donde $R_{33a'}$ representa un grupo de fórmula R_{33} o un grupo de fórmula F_2 o $-L(F_2)_m(Z)_{n-m}$;

- R_{2a} representa un grupo de fórmula R_2 o un grupo de fórmula F_2 o $-L(F_2)_m(Z)_{n-m}$;

- m es un número entero que tiene un valor de cero a n ;

5 - el compuesto de la fórmula (IIa) comprende al menos un grupo de fórmula F_2 ;

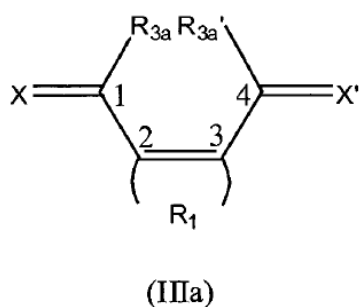
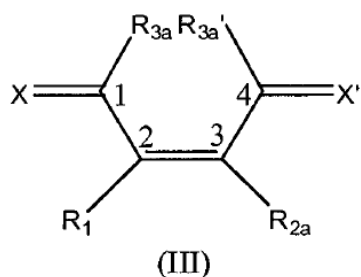
- R_1 , F_2 , X , X' , R_3 , R_3' , R_{33} , R_2 , L , Z y n son todos tal como se define en la referencia (1) anterior; y

- el proceso implica unir el grupo R_1 a través del ataque nucleófilo del primer grupo SH en el compuesto de fórmula R_1-H en la posición 2 del compuesto de la fórmula (IIa), de tal manera que el grupo Y en la posición 2 se reemplaza por el grupo R_1 .

10 La presente invención también proporciona (4) un proceso que comprende

(i) proporcionar un compuesto de la fórmula (III) o (IIIa); y

(ii) escindir el enlace entre el grupo R_1 y el átomo de carbono en la posición 2 del compuesto de la fórmula (III) o (IIIa)



15

en donde:

- R_{3a} y $R_{3a'}$ juntos forman un grupo de fórmula $-N(R_{33a'})$, en donde $R_{33a'}$ representa un grupo de fórmula R_{33} , o un grupo de fórmula F_2 o $-L(F_2)_m(Z)_{n-m}$;

- R_{2a} representa un grupo de fórmula R_2 o un grupo de fórmula F_2 o $-L(F_2)_m(Z)_{n-m}$;

20 - m es un número entero que tiene un valor de cero a n ;

- R_1 , F_2 , X , X' , R_3 , R_3' , R_{33} , R_2 , L , Z y n son todos según se define en (1) anteriormente;

y en donde cuando el proceso implica el compuesto de la fórmula (IIIa):

- R_1 del compuesto de la fórmula (IIIa) comprende al menos un primer grupo tiol y un segundo grupo tiol, donde dicho primer grupo tiol está unido a la posición 2 en el compuesto de la fórmula (IIIa) y donde el segundo grupo tiol está unido a la posición 3 en el compuesto de la fórmula (IIIa); y

25

- la etapa (ii) además implica escindir el enlace entre el grupo R₁ y el átomo de carbono en la posición 3 de la fracción de la fórmula (IIIa).

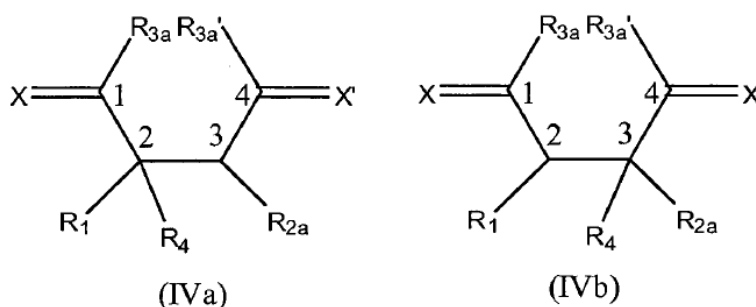
La presente invención aún proporciona además (5) un compuesto, cuyo compuesto es:

(A) un compuesto de la fórmula (IIa) según se define en (3) anteriormente; o

5 (B) un compuesto de la fórmula (III) según se define en (4) anteriormente, que comprende al menos un grupo de fórmula F₂ y en el que R_{2a} no es un átomo de hidrógeno.

La presente invención también proporciona (6) un compuesto de la fórmula (IIIa) según se define anteriormente en el punto (4).

La presente invención también proporciona (7) un compuesto de la fórmula (IVa) o (IVb)



10

en donde

- R₁ es según se define en (1) anteriormente;

- X, X', R_{2a}, R_{3a} y R_{3a'} son según se define en (4) anteriormente;

15 - R₄ es un átomo de halógeno, un grupo hidroxilo, alcoxi C₁₋₆, tiol, alquiltiol C₁₋₆ o alquilcarboniloxi C₁₋₆, o un grupo de fórmula F₂;

- al menos uno de los grupos R_{2a} y R₄ comprende un grupo de fórmula F₂; y

- F₂ es según se define en (1) anteriormente.

20 La presente invención además proporciona (8) un compuesto según se define en: (B) de la referencia (5) anterior; en (6) anteriormente y que comprende al menos un grupo de fórmula F₂; o en (7) anteriormente; para su uso en un método de tratamiento del organismo humano o animal mediante cirugía o terapia o un método de diagnóstico practicado en el organismo animal o humano.

Más aún, la presente invención proporciona (9) un proceso según se define en cualquiera de las referencias (2) y (3) anteriores, en donde dicho conjugado comprende un anillo de maleimida y dicho proceso además comprende efectuar la apertura del anillo del mencionado anillo de maleimida.

25 Breve descripción de las figuras

30 La figura 1 muestra el resultado del protocolo descrito en el Ejemplo 31 en donde un aducto de proteína / biotina-PEG-bromomaleimida y soluciones proteicas modelo no modificadas (In) se añadieron a perlas de agarosa recubiertas de neutravidina, fueron centrifugadas, las fracciones no retenidas o "flow-through" (FT) fueron recogidas, las perlas se lavaron con PBS y ambas fracciones de lavado se recogieron (W1 y W2), se liberó proteína de las perlas mediante incubación en PBS con contenido de β-mercaptoetanol, la muestra fue centrifugada y se recogió el eluyente (E1) que contenía la proteína escindida.

35 La Figura 2 muestra la generación de aductos de somatostatina-maleimida a partir de halomaleimidias, de acuerdo al protocolo descrito en el Ejemplo 39 según se mide mediante LC-MS (eje-y = %señal; eje-x = tiempo/min). Parte superior izquierda: generación de un aducto de somatostatina a partir de dicloromaleimida (círculo), dibromomaleimida (cuadrado) y diyodo-maleimida (triángulo). Parte superior derecha: Generación de un aducto de

somatostatina a partir de monobromomaleimida (círculo), N-metilmonobromomaleimida (cuadrado) y N-metildibromomaleimida (triángulo). Parte inferior izquierda: Generación de un aducto de somatostatina a partir de N-fluoresceín-dibromomaleimida (círculo), N-biotin-dibromomaleimida (cuadrado), N-PEG 5000-dibromomaleimida (triángulo), NPEG-5000-ditiofenolmaleimida (rombo) y N-PEG 300-dibromomaleimida (óvalo).

5 La Figura 3 muestra la generación de aductos de somatostatina-maleimida a partir de ditiomaleimidias de acuerdo con el protocolo descrito en el Ejemplo 39 según se mide mediante LC-MS (eje-y = %señal; eje-x = tiempo/min). Parte superior izquierda: Generación de un aducto de somatostatina a partir de di-2-mercaptoetanolmaleimida a 1 eq. (círculo), 5 eq. (cuadrado) y 10 eq. (triángulo). Parte superior derecha: Generación de un aducto de somatostatina a partir de dicisteinmaleimida a 1 eq. (círculo), 5 eq. (cuadrado) y 10 eq. (triángulo). Parte inferior izquierda: Generación de un aducto de somatostatins a partir de ditiofenolmaleimida a 1 eq. (círculo), 5 eq. (cuadrado) y 10 eq. (triángulo). Parte inferior derecha: Generación de un aducto de somatostatina a partir de di-2-mercaptopiridinmaleimida a 1 eq. (círculo), 5 eq. (cuadrado) and 10 eq. (triángulo).

15 La Figura 4 muestra la escisión de somatostatina unida por un puente de maleimida con diversos agentes reductores, de acuerdo con el protocolo descrito en el Ejemplo 39 según se mide mediante LC-MS (eje-y = %señal; eje-x = tiempo en minutos (min), horas (h) y días (d)). Parte superior izquierda: Somatostatina-maleimida total modificada con DTT (círculo hueco) y cantidad total de subproductos (círculo con relleno). Parte superior central: Somatostatina-maleimida toal modificada con 2-mercaptoetanol (círculo hueco) y cantidad total de subproductos (círculo con relleno). Parte superior derecha: Somatostatina-maleimida total modificada con GSH (círculo hueco) y cantidad total de subproductos (círculo con relleno). Parte inferior izquierda: Somatostatina-maleimida total modificada con TCEP (círculo hueco) y cantidad total de subproductos (círculo con relleno). Parte inferior derecha: Somatostatina-maleimida total modificada con 1,2-etanoditiol (círculo hueco) y cantidad total de subproductos (círculo con relleno).

25 La Figura 5 muestra la escisión de somatostatina unida por un puente de maleimida con diversas cantidades de DTT y 2-mercaptoetanol de acuerdo con el protocolo descrito en el Ejemplo 39 según se mide mediante LC-MS (eje-y = %señal; eje-x = tiempo/min). Izquierda: Regeneración de somatostatina mediante DTT a 50 eq. (círculo hueco), 20 eq. (triángulo hueco) y 10 eq. (cuadrado hueco). Derecha: Regeneración de somatostatina mediante 2-mercaptoetanol a 50 eq. (círculo hueco), 20 eq. (triángulo hueco) y 10 eq. (cuadrado hueco) y cantidad total de subproductos a 50 eq. (círculo con relleno), 20 eq. (triángulo con relleno) y 10 eq. (cuadrado con relleno).

30 La Figura 6 muestra la escisión catalizada de la somatostatina unida por puente de acuerdo al protocolo descrito en el Ejemplo 39 según se mide mediante LC-MS (eje-y = %señal; eje-x = tiempo/min). En la figura se muestra la regeneración de la somatostatina mediante 2-mercaptoetanol (círculo hueco), 2-mercaptoetanol con Nal (cuadrado hueco) y 2-mercaptoetanol con bencenoselenol (triángulo hueco), además de los subproductos totales cuando se utiliza 2-mercaptoetanol (círculo relleno), 2-mercaptoetanol con Nal (cuadrado con relleno) y 2-mercaptoetanol con bencenoselenol (triángulo con relleno).

35 Figure 7 muestra la escisión de somatostatina unida por un puente de maleimida N-functionalizada mediante 2-mercaptoetanol de acuerdo con el protocolo descrito en el Ejemplo 39 según se mide por LC-MS (eje-y = %señal; eje-x = tiempo en minutos (min), horas (h) y días (d)). Parte superior izquierda: escisión del aducto N-metilmaleimida somatostatina para obtener somatostatina (círculo hueco) y subproductos totales (círculo con relleno). Parte superior central: escisión del aducto N-biotina maleimida somatostatina para proporcionar somatostatina (círculo hueco) y subproductos totales (círculo con relleno). Parte superior derecha: escisión del aducto N-fluoresceína maleimida somatostatina para proporcionar somatostatina (círculo hueco) y subproductos totales (círculo con relleno). Parte inferior izquierda: escisión del aducto N-PEG 5000 maleimida somatostatina para proporcionar somatostatina (círculo hueco) y subproductos totales (círculo con relleno). Parte inferior central: escisión del aducto N-PEG 300 maleimida somatostatina para proporcionar somatostatina (círculo hueco) y subproductos totales (círculo con relleno).

45 La Figura 8 muestra la escisión del producto de diadición de monobromomaleimida con somatostatina de acuerdo con el protocolo descrito en el Ejemplo 39 según se mide por LC-MS (eje-y = %señal; eje-x = tiempo/horas). Parte superior izquierda: Somatostatina-maleimida (círculo hueco), somatostatina-bis-maleimida (círculo con relleno) y subproductos totales (triángulo) utilizando 2-mercaptoetanol. Parte superior derecha: Somatostatina-maleimida (círculo hueco), somatostatina-bis-maleimida (círculo con relleno) y subproductos totales (triángulo) utilizando DTT. Parte inferior izquierda: Somatostatina-maleimida (círculo hueco), somatostatina-bis-maleimida (círculo con relleno) y subproductos totales (triángulo) utilizando TCEP.

55 La Figura 9 muestra la unión por puente *in situ* de la somatostatina comparable con diversas cantidades de ditiomaleimidias de acuerdo con el protocolo descrito en el Ejemplo 39 según se mide por LC-MS (eje-y = %señal; eje-x = tiempo/min). La figura muestra la generación de somatostatina unida por puente utilizando un iniciador TCEP y tiofenol en una relación de 3:5 (círculo), iniciador de selenol con tiofenol en una relación de 5:10 (cuadrado) y un iniciador selenol con 2-mercaptoetanol en una relación de 10:20 (triángulo).

La Figura 10 muestra la PEGilación *in situ* de somatostatina de acuerdo con el protocolo descrito en el Ejemplo 39 según se mide por LC-MS (eje-y = %señal, eje-x = tiempo/min). La Figura muestra la generación de somatostatina PEGilada utilizando 5 eq. de N-PEG5000-ditiofenolmaleimida y 3 eq. de TCEP (círculo) y utilizando 10 eq. de N-PEG5000-ditiofenolmaleimida y 5 eq. de bencenoselenol (cuadrado).

- 5 La Figura 11 muestra todos los registros de corrientes de pinzamiento zonal o "patch-clamp" de célula entera obtenidos en el ensayo de pinzamiento zonal (patch clamp) descrito en el Ejemplo 39. La Figura muestra trazas representativas registradas a partir de la línea celular GIRK 1/2A que expresa SSTR2. Las células se fijaron a -60mV, y 20µM de somatostatina o sus derivados se aplicaron durante 20s. Parte superior izquierda: somatostatina (en los ejes que se muestran la línea vertical representa 1000 pA y la línea horizontal representa 20 ms). Parte superior derecha: somatostatina unida por un puente de dibromomaleimida- (en los ejes que se muestran la línea vertical representa 1000 pA y la línea horizontal representa 20 ms). Parte inferior izquierda: somatostatina unida por un puente de fluoresceína dibromomaleimida (en los ejes que se muestran la línea vertical representa 1000 pA y la línea horizontal representa 20 ms). Parte inferior derecha: somatostatina unida por un puente de dibromomaleimida pegilada (en los ejes que se muestran la línea vertical representa 1000 pA y la línea horizontal representa 20 ms).
- 10
- 15 La Figura 12 muestra las amplitudes de las corrientes activadas por la somatostatina y sus análogos en el ensayo de pinzamiento zonal descrito en el Ejemplo 39. El eje-x representa la amplitud de corriente en pA/pF. Las dos barras superiores son de la somatostatina unida por un puente de fluoresceína dibromomaleimida (la barra de color negro es después del pre-tratamiento de la célula con toxina Pertussis durante 24 horas; la barra de color gris es sin pre-tratamiento) las siguientes dos barras corresponden a somatostatina unida por un puente de dibromomaleimida pegilada (la barra de color negro es después del pre-tratamiento de la célula con toxina Pertussis durante 24 horas; la barra de color gris es sin pre-tratamiento), las siguientes tres barras corresponden a somatostatina unida por un puente de dibromomaleimida (la barra de color blanco es después de la preincubación con el inhibidor de los canales GIRK, la Tertiapina Q, 100nM durante 5 minutos; la barra de color negro es después del pre-tratamiento de la célula con toxina Pertussis durante 24 horas; la barra de color gris es sin pre-tratamiento) y las dos barras inferiores corresponden a somatostatina (la barra de color negro es después del pre-tratamiento de la célula con toxina Pertussis durante 24 horas; la barra de color gris es sin pre-tratamiento).
- 20
- 25

Descripción detallada de la invención

Tal como se utiliza en la presente patente "fracción funcional" significa una fracción que forma parte de un conjugado y que es una de entre una fracción detectable, una fracción enzimáticamente activa, una etiqueta de afinidad, un hapteno, soportes inmunogénicos, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, un antígeno, un ligando, una fracción biológicamente activa, un liposoma, una fracción polimérica, un aminoácido, un péptido, una proteína, una célula, un carbohidrato, un ADN y un ARN.

30

Como se entenderá fácilmente por parte de los expertos en el arte, una fracción funcional comprendida en un compuesto (por ejemplo, en una molécula conjugada) se puede obtener uniendo un correspondiente "compuesto funcional" a la misma. Cuando un compuesto funcional se une a un compuesto secundario, es necesario que un enlace en algún lugar de ese compuesto funcional se rompa, de manera que pueda formarse un nuevo enlace con el compuesto secundario. Ejemplos de tales procesos incluyen la pérdida de un grupo saliente del compuesto funcional cuando se convierte en una fracción funcional enlazada a la molécula secundaria, la pérdida de un protón cuando el compuesto funcional reacciona a través de un grupo nucleófilo que contiene un átomo de hidrógeno, tal como un grupo OH o SH, o la conversión de un enlace doble en el compuesto funcional a un enlace único cuando el compuesto funcional reacciona con el compuesto secundario a través de una reacción adicional electrófila o nucleófila. Los expertos en el arte entenderían, por tanto, que una fracción funcional que es, por ejemplo, una "proteína" significa una fracción que se forma por la incorporación de un compuesto proteico a una molécula secundaria, con pérdida concomitante de un enlace interno en comparación con el correspondiente compuesto proteico (por ejemplo, pérdida de un protón de una fracción -OH, -SH o -NH₂ cuando tal fracción forma el enlace con la molécula secundaria).

35

40

45

Una fracción funcional es habitualmente una fracción que tiene una significación biológica discreta en su forma nativa (es decir, cuando no es parte de un bioconjugado). Preferiblemente, cualquier fracción funcional utilizada en la presente invención tiene un peso molecular relativo de al menos 200, más preferiblemente al menos 500, de mayor preferencia al menos 1000. Preferiblemente, una fracción funcional según se describe en la presente patente es una biomolécula.

50

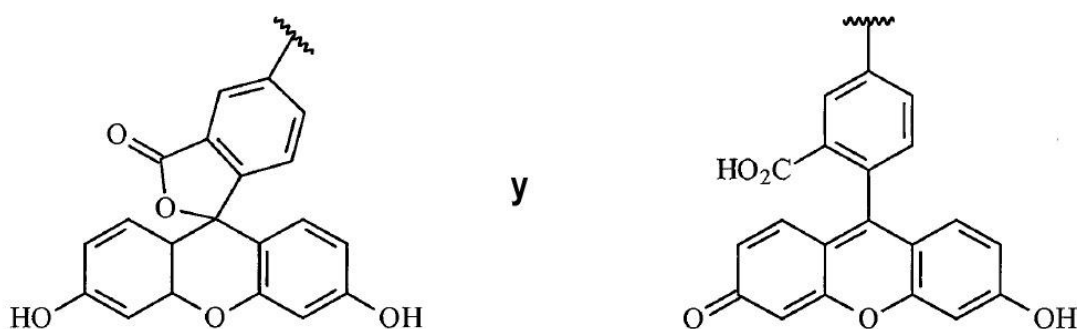
Tal como se utiliza en la presente patente, el término "fracción detectable" significa una fracción que es capaz de generar señales detectables en una muestra de ensayo. Claramente, puede entenderse que la fracción detectable es una fracción que se obtiene de un correspondiente "compuesto detectable" y que mantiene su habilidad para generar una señal detectable cuando está enlazada a otra fracción funcional a través de un entrecruzador en un conjugado de la presente invención. Las fracciones detectables son también comúnmente conocidas en el arte como "etiquetas", "sondas" y "marcadores". Ejemplos de fracciones detectables incluyen fracciones cromogénicas, fracciones fluorescentes, fracciones radiactivas y fracciones electroquímicamente activas. Fracciones detectables

55

preferidas son fracciones cromogénicas y fracciones fluorescentes. Las fracciones fluorescentes son de mayor preferencia.

5 Una fracción cromogénica es una fracción que está coloreada, que se colorea cuando se incorpora a un conjugado, o que se colorea cuando se incorpora a un conjugado y el conjugado posteriormente interactúa con una especie diana secundaria (por ejemplo, cuando el conjugado comprende una proteína que entonces interactúa con otra molécula diana).

10 Habitualmente, el término "fracción cromogénica" hace referencia a un grupo de átomos asociados que pueden existir en al menos dos estados de energía, un estado fundamental de energía relativamente baja y un estado excitado al que puede elevarse mediante la absorción de energía luminosa de una región específica del espectro de radiación. A menudo, el grupo de átomos asociados contiene electrones deslocalizados. Las fracciones cromogénicas incluyen fracciones de conjugados que contienen sistemas π y complejos metálicos. Ejemplos de ello incluyen porfirinas, polienos, poliínos y poliarilos. Las fracciones cromogénicas preferidas son



15 Una fracción fluorescente es una fracción que comprende un fluoróforo, que es una fracción química fluorescente. Ejemplos de compuestos fluorescentes que se incorporan comúnmente como fracciones fluorescentes a moléculas secundarias tales como conjugados incluyen:

- la familia de colorantes Alexa Fluor®, disponible a través de Invitrogen;
- 20 - cianina y merocianina;
- la familia de colorantes BODIPY (boro-dipirrometeno), disponible a través de Invitrogen;
- la familia de colorantes ATTO fabricada por ATTO-TEC GmbH;
- fluoresceína y sus derivados;
- rodamina y sus derivados;
- 25 - derivados del naftaleno tales como sus derivados dansilo y prodan;
- piridiloxazol, nitrobenzoxadiazol y derivados del benzoxadiazol;
- cumarina y sus derivados;
- derivados de pireno; y
- Verde Oregón, eosina, rojo Texas, Cascade blue y rojo Nilo, disponible a través de Invitrogen.
- 30 Las fracciones fluorescentes preferidas incluyen fluoresceína, rodamina, cumarina, cloruro ácido de sulforodamina 101 (rojo Texas) y dansilo. La Fluoresceína y el dansilo se prefieren especialmente.

Una fracción radiactiva es una fracción que comprende un radionucleido. Ejemplos de radionucleidos incluyen yodo-131, yodo-125, bismuto-212, itrio-90, itrio-88, tecnecio-99m, cobre-67, renio-188, renio-186, galio-66, galio-67, indio-

111, indio-114m, indio-114, boro-10, tritio (hidrógeno-3), carbono-14, azufre-35, flúor-18 y carbono-11. El flúor-18 y el carbono-11, por ejemplo, se utilizan con frecuencia en la tomografía por emisión de positrones.

5 Una fracción radiactiva puede consistir tan solo en el radionucleido, o un radionucleido puede incorporarse en una fracción radiactiva mayor, por ejemplo mediante un enlace covalente a un grupo conector (tal como un conector que contiene un grupo tiol), o formando un complejo de coordinación con un agente quelante. Agentes quelantes adecuados conocidos en el arte incluyen DTPA (anhídrido dietilentriamina pentaacético), NOTA (ácido 1,4,7-triazaciclono-nano-N,N',N"-triacético), DOTA (ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N",N""-tetraacético), TETA (ácido 1,4,8,11-tetraazaciclotetra-decano-N,N',N",N""-tetraacético), DTTA (ácido N1-(p-isotiocianatobencil)-dietilentriamina-N1,N2,N3-tetraacético) y DFA (N'-[5-[[5-acetilhidroxiamino]pentil]amino]-1,4-dioxobutil]hidroxiamino]pentil] -N-(5-aminopentil)-N-hidroxi-butanodiamida).

Una fracción electroquímicamente activa es una fracción que comprende un grupo que es capaz de generar una señal electroquímica en un método electroquímico tal como un método amperométrico o voltamétrico. Habitualmente, una fracción electroquímicamente activa es capaz de existir en al menos dos estados redox distintos.

15 Tal como se utiliza en la presente patente, el término "fracción enzimáticamente activa" significa una enzima, un sustrato para una enzima o un cofactor para una enzima. Preferiblemente, la fracción enzimáticamente activa es una enzima.

20 Tal como se utiliza en la presente patente, el término "etiqueta de afinidad" significa una fracción química que es capaz de interactuar con un "compañero de afinidad", que es una segunda fracción química, cuando tanto la etiqueta de afinidad como el compañero de afinidad están presentes en una única muestra. Habitualmente, la etiqueta de afinidad es capaz de formar una interacción de unión específica con el compañero de afinidad. Una interacción de unión específica es una interacción de unión que es más fuerte que cualquier interacción de unión que puede ocurrir entre el compañero de afinidad y cualquiera otra sustancia química presente en una muestra. Una interacción de unión específica puede ocurrir, por ejemplo, entre una enzima y su sustrato.

25 Las etiquetas de afinidad pueden ser útiles en aplicaciones tales como la detección o purificación de biomoléculas tales como proteínas. En tales aplicaciones, un conjugado que comprende la biomolécula y la etiqueta de afinidad puede ser detectado o purificado explotando la interacción de unión específica entre la etiqueta de afinidad y su compañero de afinidad.

30 Un par etiqueta de afinidad/compañero de afinidad que se utiliza de manera particularmente amplia en bioquímica, es el par biotina/(estrept)avidina. La avidina y la estreptavidina son proteínas que pueden utilizarse como compañeros de afinidad para unirse con alta afinidad y especificidad a una etiqueta de afinidad obtenida a partir de biotina (ácido 5-[(3aS,4S,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il]pentanoico). Otros pares etiqueta de afinidad/compañero de afinidad utilizados comúnmente en el arte incluyen la proteína de unión a amilasa/maltosa, glutatión/glutatión-S-transferasa y metal (por ejemplo, níquel o cobalto)/poli(His). Como apreciaría un experto en el arte, cualquier miembro del par podría funcionar como la "etiqueta de afinidad", con el otro miembro del par que funciona como el "compañero de afinidad". Los términos "etiqueta de afinidad" y "compañero de afinidad" son por tanto intercambiables.

Un experto en el arte sería consciente del uso rutinario de las interacciones de la etiqueta de afinidad/compañero de afinidad en bioquímica, y en particular en el contexto de la tecnología de conjugados.

40 Etiquetas de afinidad preferidas son biotina, amilasa, glutatión y poli(His). Una etiqueta de afinidad particularmente preferida es la biotina.

45 Tal como se utiliza en la presente patente, el término "hapteno" significa una fracción que comprende un epítipo, que no es capaz de estimular una respuesta inmune *in vivo* en su forma nativa, sino que es capaz de estimular una respuesta inmune *in vivo* cuando está unido a una molécula portadora inmunogénica. Habitualmente, un hapteno es una fracción no proteica de peso molecular relativamente bajo (por ejemplo, un peso molecular de menos de 1000). Un epítipo es la parte de una molécula o fracción que es reconocida por el sistema inmunológico y estimula una respuesta inmune.

50 Tal como se utilizan en la presente patente, el término "soporte inmunogénico" significa un antígeno que es capaz de facilitar una respuesta inmune cuando se administra *in vivo* y que es capaz de acoplarse a una hapteno. Ejemplos de soportes inmunogénicos incluyen proteínas, liposomas, fracciones poliméricas naturales o sintéticas (tales como fracciones de dextrano, agarosa, polilisina y ácido poliglútamico) y fracciones orgánicas diseñadas mediante síntesis. Soportes inmunogénicos proteicos utilizados comúnmente han incluido hemocianina extraída de lapa californiana, albúmina sérica bovina, albúmina sérica bovina aminoetilada o cationizada, tiroglobulina, ovoalbúmina y diversas proteínas toxoides como el toxoide tetánico y el toxoide diftérico. Soportes de moléculas orgánicas diseñadas mediante síntesis bien conocidos incluyen el péptido antigénico múltiple (MAP).

Como un experto en el arte de la bioquímica sabría, los conjugados soportes inmunogénicos-hapteno se utilizan ampliamente en, por ejemplo, inmunología y proteómica.

5 Tal como se utiliza en la presente patente, el término “anticuerpo o fragmento de anticuerpo” significa una proteína que es capaz de unirse a un antígeno específico a través de un epítipo en el antígeno, o un fragmento de una proteína de ese tipo. Entre los anticuerpos se incluyen anticuerpos monoclonales y anticuerpos policlonales. Se prefieren anticuerpos monoclonales.

Tal como se utiliza en la presente patente, el término “antígeno” significa una sustancia que es capaz de promover una respuesta inmune cuando se administra *in vivo* y que es capaz de unirse a un anticuerpo producido durante dicha respuesta inmune.

10 Tal como se utiliza en la presente patente, el término “ligando” significa una fracción que es capaz de interactuar con una biomolécula (por ejemplo, una proteína) de tal manera que modifica las propiedades funcionales de la biomolécula. Habitualmente, el ligando es una fracción que se une a un sitio en una proteína diana. La interacción entre el ligando y la biomolécula es habitualmente no covalente. Por ejemplo, la interacción puede ser a través de enlace iónico, enlace de hidrógeno o interacciones de van der Waals. Sin embargo, es también posible que algunos
15 ligandos formen enlaces covalentes con biomoléculas. Habitualmente, un ligando es capaz de modificar la conformación química de la biomolécula cuando interactúa con ella. Ejemplos de ligandos capaces de interactuar con una proteína incluyen sustratos (sobre los que actúa la enzima al unirse, por ejemplo tomando parte en una reacción química catalizada por la enzima), inhibidores (que inhiben la actividad proteica sobre la unión), activadores (que aumentan la actividad proteica sobre la unión) y neurotransmisores.

20 Tal como se utiliza en la presente patente, el término “fracción biológicamente activa” significa una fracción que es capaz de inducir una respuesta bioquímica cuando se administra *in vivo*.

Una fracción biológicamente activa puede ser un fármaco. En la presente invención, la primera fracción funcional o la segunda fracción funcional es un fármaco. Entre los fármacos se incluyen agentes citotóxicos tales como doxorrubicina, metotrexato y derivados del mismo, precursores de la citotoxina que son capaces de metabolización
25 *in vivo* para producir un agente citotóxico, agentes anti-neoplásicos, antihipertensivos, agentes cardioprotectores, anti-arrítmicos, inhibidores de ACE, antiinflamatorios, diuréticos, relajantes musculares, anestésicos locales, hormonas, fármacos reductores del colesterol, anticoagulantes, antidepresivos, tranquilizantes, neurolépticos, analgésicos tales como analgésicos narcóticos o anti-piréticos, anti-virales, antibacterianos, antifúngicos, bacteriostatos, agentes activos del SNC, anti-convulsionantes, ansiolíticos, antiácidos, narcóticos, antibióticos, agentes respiratorios, antihistamínicos, inmunosupresores, agentes inmunoactivadores, aditivos nutricionales, antitusivos, agentes de diagnóstico, eméticos y anti-eméticos, carbohidratos, glucosaminoglucanos, glicoproteínas y polisacáridos, lípidos, por ejemplo fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina y derivados de las mismas, esfingosina, esteroides, vitaminas, antibióticos, incluyendo lantibióticos, agentes bacteriostáticos y bactericidas, antifúngicos, antihelmínticos y otros agentes efectivos contra agentes infecciosos que incluyen patógenos unicelulares, moléculas
35 efectoras pequeñas tales como noradrenalina, ligandos de receptores alfa-adrenérgicos, ligandos de los receptores de la dopamina, ligandos de los receptores de histaminas, ligandos de los receptores GABA/benzodiacepina, ligandos de los receptores de serotonina, leucotrienos y triyodotironina, y derivados de los mismos.

Más generalmente, una fracción biológicamente activa puede también ser una fracción obtenida a partir de un compuesto que es capaz de atravesar fácilmente membranas biológicas y que, cuando forman una molécula conjugada con una fracción funcional secundaria, es capaz de aumentar la habilidad de la fracción funcional secundaria para atravesar la membrana biológica. Por ejemplo, una fracción biológicamente activa puede ser un “dominio de transducción de proteínas” (PTD, por sus siglas en inglés) o un soporte de molécula pequeña (“SMC”, por sus siglas en inglés o “etiqueta molecular”) tal como las descritas en WO 2009/027679.

En la presente invención, la fracción biológicamente activa es un fármaco.

45 Tal como se utiliza en la presente patente, el término “liposoma” significa una estructura compuesta de bicapas de fosfolípidos que tienen propiedades anfífilas. Los liposomas incluyen vesículas unilamelares y vesículas multilamelares.

Tal como se utiliza en la presente patente, el término “fracción polimérica” significa una cadena polimérica única (ramificada o no ramificada), que se obtiene a partir de una molécula polimérica única correspondiente. Las fracciones poliméricas pueden ser polímeros naturales o polímeros sintéticos. Habitualmente, sin embargo, las moléculas poliméricas no son polinucleótidos.
50

Tal como se conoce bien en el área de la bioquímica, la creación de conjugados que comprenden una fracción polimérica es útil en muchas aplicaciones *in vivo* e *in vitro*. Por ejemplo, diversas propiedades de una macromolécula tal como una proteína pueden ser modificadas uniendo una fracción polimérica a la misma, incluyendo propiedades

de solubilidad, características de la superficie y estabilidad en la solución o ante la congelación. Otra aplicación común implica conjugar una fracción polimérica con un compuesto biológicamente activo tal como un fármaco, con la finalidad de aumentar la biocompatibilidad, reducir o eliminar la respuesta inmune en la administración, y/o aumentar la estabilidad *in vivo*.

- 5 Una persona experta en el arte reconocería, por lo tanto, que la metodología de la presente invención puede ser utilizada para preparar un conjugado que comprenda una fracción polimérica. Una persona experta en el arte podría seleccionar fácilmente fracciones poliméricas adecuadas para su uso de acuerdo con la presente invención, sobre la base de que esas fracciones poliméricas se utilizan de forma rutinaria en el arte.

10 La naturaleza de la fracción polimérica dependerá, por lo tanto, en el uso que se desea de la molécula conjugada. Ejemplos de fracciones poliméricas para su uso de acuerdo con la presente invención incluyen polisacáridos, poliéteres, poliaminoácidos (tales como la polilisina), alcoholes polivinílicos, polivinilpirrolidonas, ácido poli(met)acrílico y derivados del mismo, poliuretanos y polifosfacenos. Habitualmente, tales polímeros contienen al menos diez unidades monoméricas. Por tanto, por ejemplo, un polisacárido comprende habitualmente al menos diez unidades de monosacáridos.

15 Dos moléculas poliméricas particularmente preferidas son el dextrano y el polietilenglicol ("PEG"), además de derivados de estas moléculas (tales como monometoxipolietilenglicol, "mPEG"). Preferiblemente, el PEG o derivado del mismo tiene un peso molecular de menos de 20.000. Preferiblemente, el dextrano o derivado del mismo tiene un peso molecular de 10.000 a 500.000. En un modo de realización preferido, los compuestos de la presente invención comprenden un fármaco y un PEG o derivado del mismo.

20 Tal como se utiliza en la presente patente, el término "aminoácido" significa una fracción que contiene tanto un grupo funcional amina como un grupo funcional carboxilo. Sin embargo, preferiblemente el aminoácido es un α -aminoácido. Preferiblemente, el aminoácido es un aminoácido proteínogénico, es decir un aminoácido seleccionado de entre alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, prolina, fenilalanina, pirrolisina, selenocisteína, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina. Sin embargo, el aminoácido puede también ser un aminoácido no proteínogénico. Ejemplos de aminoácidos no proteínogénicos incluyen lantionina, ácido 2-aminoisobutírico, dehidroalanina, ácido gamma-aminobutírico, ornitina, citrulina, canavanina y mimosina. Un aminoácido particularmente preferido es la cisteína.

25 Tal como se utiliza en la presente patente, los términos "péptido" y "proteína" significan una fracción polimérica compuesta de residuos de aminoácidos. Como una persona experta en el arte sabrá, el término "péptido" se utiliza habitualmente en el arte para designar un polímero de una longitud relativamente corta, y el término proteína se utiliza habitualmente en el arte para designar un polímero de longitud relativamente grande. Tal como se utiliza en la presente patente, la convención es que un péptido comprende hasta 50 residuos de aminoácidos, mientras que una proteína comprende más de 50 aminoácidos. Sin embargo, podrá apreciarse que esta distinción no es de vital importancia ya que las fracciones funcionales identificadas en la presente solicitud pueden representar de forma habitual o bien un péptido o una proteína.

30 Tal como se utiliza en la presente patente, el término "polipéptido" se utiliza de forma intercambiable con "proteína".

35 Tal como se utiliza en la presente patente, un péptido o una proteína pueden comprender cualquier aminoácido natural o no natural. Por ejemplo, un péptido o una proteína. Por ejemplo, un péptido o una proteína puede contener solamente residuos de α -aminoácidos, por ejemplo correspondientes a α -aminoácidos naturales. De manera alternativa, el péptido o proteína puede contener adicionalmente una o más modificaciones químicas. Por ejemplo, la modificación química puede corresponder a una modificación post-traduccionales, que es una modificación que ocurre a una proteína *in vivo* a continuación de su traducción, tal como una acilación (por ejemplo, una acetilación), una alquilación (por ejemplo, una metilación), una amidación, una biotinylation, una formilación, glicosilación, glicación, una hidroxilación, yodinación, oxidación, una sulfatación o una fosforilación. Un experto en el arte por supuesto reconocería que tales péptidos o proteínas modificados de forma post-traduccionales aún constituyen un "péptido" o una "proteína" dentro del significado de la presente invención. Por ejemplo, está bien establecido en el arte que una glicoproteína (una proteína que lleva una o más cadenas laterales de oligosacáridos) es un tipo de proteína.

Tal como se utiliza en la presente patente, el término "célula" significa célula de un organismo vivo.

40 Tal como se utiliza en la presente patente, el término "carbohidrato" incluye monosacáridos y oligosacáridos. Habitualmente, un oligosacárido contiene de dos a nueve unidades de monosacáridos. Por tanto, tal como se utiliza en la presente patente, un polisacárido se clasifica como una "fracción polimérica" más que como un carbohidrato.

Tal como se utiliza en la presente patente, el término "ADN" significa un ácido desoxirribonucleico compuesto de uno o más nucleótidos. El ADN puede ser de cadena única o de doble cadena. Preferiblemente, el ADN comprende más de un nucleótido.

5 Tal como se utiliza en la presente patente, el término "ARN" significa un ácido ribonucleico que comprende uno o más nucleótidos. Preferiblemente, el ARN comprende más de un nucleótido.

Tal como se utiliza en la presente patente, "conjugado" significa una molécula que comprende una primera fracción funcional y una segunda fracción funcional. La primera fracción funcional y la segunda fracción funcional están enlazadas de forma covalente entre sí a través de una fracción entrecruzadora, tal como se describe en la presente patente.

10 Tal como se utiliza en la presente patente, los términos "grupo" y "fracción" se utilizan de forma intercambiable.

Tal como se utiliza en la presente patente, un "grupo reactivo" significa un grupo funcional en una primera molécula que es capaz de tomar parte en una reacción química con un grupo funcional en una segunda molécula de tal manera que un enlace covalente se forme entre la primera molécula y la segunda molécula. Los grupos reactivos incluyen grupos salientes, grupos nucleófilos, y otros grupos reactivos tal como se describe en la presente patente.

15 Tal como se utiliza en la presente patente, el término "grupo saliente electrófilo" significa un sustituyente unido a un átomo de carbono saturado o insaturado que puede ser reemplazado por un nucleófilo, a continuación de un ataque nucleófilo en ese átomo de carbono. Los expertos en el arte pueden seleccionar de forma rutinaria grupos salientes electrófilos que serían adecuados para situar en un compuesto en particular y para reaccionar con un nucleófilo en particular.

20 Tal como se utiliza en la presente patente, el término "nucleófilo" significa un grupo o compuesto funcional que es capaz de formar un enlace químico donando un par de electrones.

25 Tal como se utiliza en la presente patente, el término "grupo conector" significa un grupo que es capaz de unir una fracción química con otra. La naturaleza de los grupos conectores utilizados de acuerdo con la presente invención no es importante. Un experto en el arte reconocería que los grupos conectores se utilizan de forma rutinaria en la construcción de moléculas conjugadas. Habitualmente, un grupo conector para su uso en la presente invención es un grupo orgánico. Habitualmente, un grupo conector de ese tipo tiene un peso molecular de 50 a 1000, preferiblemente 100 a 500. Ejemplos de grupos conectores apropiados para su uso de acuerdo con la presente invención son de conocimiento general en el arte y están descritos en publicaciones de referencia estándar, tales como "Bioconjugate Techniques" (Greg T. Hermanson, Academic Press Inc., 1996), el contenido del cual se
30 incorpora a la presente patente a modo de referencia en su totalidad.

35 Tal como se utiliza en la presente patente, el término "alquilo" incluye grupos alquilo tanto de cadena lineal como ramificados. Preferiblemente, un grupo alquilo es un grupo alquilo C₁₋₂₀, más preferiblemente un grupo alquilo C₁₋₁₅, más preferiblemente aún un grupo alquilo C₁₋₁₂, más preferiblemente aún un grupo alquilo C₁₋₆, y de mayor preferencia un grupo alquilo C₁₋₄. Los grupos alquilo particularmente preferidos incluyen, por ejemplo, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, terc-butilo, pentilo y hexilo. El término "alquilenilo" ha de ser interpretado consecuentemente.

40 Tal como se utiliza en la presente patente, el término "alquenilo" hace referencia a un grupo que contiene uno o más enlaces dobles carbono-carbono, que pueden ser ramificados o no ramificados. Preferiblemente, un grupo alquenilo C₂₋₂₀, más preferiblemente un grupo alquenilo C₂₋₁₅, más preferiblemente aún un grupo C₂₋₁₂ alquenilo, o preferiblemente un grupo alquenilo C₂₋₆, y de mayor preferencia un grupo alquenilo C₂₋₄. El término "alquenileno" debe ser interpretado consecuentemente.

45 Tal como se utiliza en la presente patente, el término "alquinilo" hace referencia a una cadena de carbono que contiene uno o más enlaces triples, que pueden ser ramificados o no ramificados. Preferiblemente, el grupo alquinilo es un grupo alquinilo C₂₋₂₀, más preferiblemente un grupo alquinilo C₂₋₁₅, más preferiblemente aún un grupo alquinilo C₂₋₁₂, o preferiblemente un grupo alquinilo C₂₋₆ y de mayor preferencia un grupo alquinilo C₂₋₄. El término "alquinileno" debe interpretarse consecuentemente.

50 A menos que se especifique de otro modo, un grupo alquilo, alquenilo o alquinilo es habitualmente no sustituido. Sin embargo, cuando se indica que un grupo de este tipo es no sustituido o sustituido, uno o más átomos de hidrógeno se reemplazan de manera opcional por átomos de halógeno o grupos de ácido sulfónico. Preferiblemente, un grupo alquilo, alquenilo o alquinilo sustituido tiene de 1 a 10 sustituyentes, más preferiblemente 1 a 5 sustituyentes, más preferiblemente aún 1, 2 o 3 sustituyentes y de mayor preferencia 1 o 2 sustituyentes, por ejemplo 1 sustituyente. Preferiblemente, un grupo alquilo, alquenilo o alquinilo sustituido lleva más de 2 sustituyentes de ácido sulfónico. Los

átomos de halógeno son sustituyentes preferidos. Preferiblemente, sin embargo, un grupo alquilo, alqueno o alquino es no sustituido.

En la fracción que es un grupo alquilo, alqueno o alquino o un grupo alqueno, alqueno o alquino, en la cual (a) 0, 1 o 2 átomos de carbono pueden ser reemplazados por grupos seleccionados de grupos arileno C₆₋₁₀, heteroarileno de 5- a 10- miembros, carbociclileno C₃₋₇ y heterociclileno de 5- a 10- miembros, y (b) 0, 1 o 2 grupos -CH₂- pueden ser reemplazados por grupos seleccionados de grupos -O-, -S-, -S-S-, -C(O)- y -N(alquilo C₁₋₆-), un total de 0, 1 o 2 de dichos átomos de carbono y grupos -CH₂- son preferiblemente reemplazados, más preferiblemente un total de 0 o 1. De mayor preferencia, ninguno de los átomos de carbono o grupos -CH₂- es reemplazado.

Grupos preferidos para reemplazar un grupo -CH₂- son grupos -O-, -S- y -C(O)-. Grupos preferidos para reemplazar un átomo de carbono son grupos fenileno, heteroarileno de 5- a 6- miembros, carbociclileno C₅₋₆ y heterociclileno de 5- a 6- miembros. Tal como se utiliza en la presente patente, la referencia a "0, 1 o 2 átomos de carbono" significa cualquier átomo de carbono terminal o no terminal en la cadena de alquilo, alqueno o alquino, incluyendo cualquier átomo de hidrógeno unido a ese átomo de carbono. Tal como se utiliza en la presente patente, la referencia a "grupos 0, 1 o 2 -CH₂-" hace referencia a un grupo que no corresponde a un átomo de carbono terminal en la cadena de alquilo, alqueno o alquino.

Tal como se utiliza en la presente patente, un grupo arilo C₆₋₁₀ es un sistema de anillos de hidrocarburo aromático de 6 a 10 miembros monocíclico o policíclico que tiene de 6 a 10 átomos de carbono. El fenilo se prefiere. El término "arileno" debe ser interpretado consecuentemente.

Tal como se utiliza en la presente patente, un grupo heteroarilo de 5 a 10 miembros es un sistema de anillos aromático de 5 a 10 miembros monocíclico o policíclico, tal como un anillo de 5 o 6 miembros, que contiene al menos un heteroátomo, por ejemplo 1, 2, 3 o 4 heteroátomos, seleccionados de O, S y N. Cuando el anillo contiene 4 heteroátomos estos son preferiblemente todos átomos de nitrógeno. El término "heteroarileno" debe interpretarse consecuentemente.

Ejemplos de grupos heteroarilo monocíclico incluyen grupos tienilo, furilo, pirrolilo, imidazolilo, tiazolilo, isotiazolilo, pirazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, triazolilo, tiadiazolilo, oxadiazolilo, piridinilo, piridazinilo, pirimidinilo, pirazinilo, triazinilo y tetrazolilo.

Ejemplos de grupos heteroarilo policíclicos incluyen grupos benzotienilo, benzofurilo, bencimidazolilo, benzotiazolilo, bencisotiazolilo, benzoxazolilo, bencisoxazolilo, benzotriazolilo, indolilo, isoindolilo y indazolilo. Grupos policíclicos preferidos incluyen grupos indolilo, isoindolilo, bencimidazolilo, indazolilo, benzofurilo, benzotienilo, benzoxazolilo, bencisoxazolilo, benzotiazolilo y bencisotiazolilo, más preferiblemente bencimidazolilo, benzoxazolilo y benzotiazolilo, de mayor preferencia benzotiazolilo. Sin embargo, se prefieren grupos heteroarilo monocíclicos.

Preferiblemente, el grupo heteroarilo es un grupo heteroarilo de 5 a 6 miembros. Los grupos heteroarilo particularmente preferidos son grupos tienilo, pirrolilo, imidazolilo, tiazolilo, isotiazolilo, pirazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, triazolilo, piridinilo, piridazinilo, pirimidinilo y pirazinilo. Grupos de más preferencia son tienilo, piridinilo, piridazinilo, pirimidinilo, pirazinilo, pirrolilo y triazinilo, de mayor preferencia piridinilo.

Tal como se utiliza en la presente patente, un grupo heterociclilo de 5- a 10- miembros es un sistema de anillos no aromático, saturado o insaturado, monocíclico o carbocíclico C₅₋₁₀ policíclico en el que uno o más, por ejemplo 1, 2, 3 o 4, de los átomos de carbono se reemplazan con una fracción seleccionada de N, O, S, S(O) y S(O)₂. Preferiblemente, el grupo heterociclilo de 5- a 10- miembros es un anillo de 5- a 6- miembros. El término "heterociclileno" debe interpretarse consecuentemente.

Ejemplos de grupos heterociclilo incluyen grupos y fracciones azetidino, oxetano, tietano, pirrolidinilo, imidazolidinilo, oxazolidinilo, isoxazolidinilo, tiazolidinilo, isotiazolidinilo, tetrahydrofuranilo, tetrahydrotienilo, tetrahydropiranilo, tetrahydrotiopiranilo, ditiolano, dioxolano, pirazolidinilo, piperidinilo, piperazinilo, hexahidropirimidinilo, metilendioxifenilo, etilendioxifenilo, tiomorfolinilo, S-oxo-tiomorfolinilo, S,S-dioxo-tiomorfolinilo, morfolinilo, 1,3-dioxolano, 1,4-dioxolano, trioxolano, tritiano, imidazolinilo, piranilo, pirazolinilo, tioxolano, tioxtiazolidinilo, 1H-pirazol-5-(4H)-onilo, 1,3,4-tiadiazol-2(3H)-tionilo, oxopirrolidinilo, oxtiazolidinilo, oxopirazolidinilo, succinimido y maleimido. Grupos heterociclilo preferido son grupos y fracciones pirrolidinilo, imidazolidinilo, oxazolidinilo, isoxazolidinilo, tiazolidinilo, isotiazolidinilo, tetrahydrofuranilo, tetrahydrotienilo, tetrahydropiranilo, tetrahydrotiopiranilo, ditiolano, dioxolano, pirazolidinilo, piperidinilo, piperazinilo, hexahidropirimidinilo, tiomorfolinilo y morfolinilo. Grupos heterociclilo preferidos son grupos tetrahydropiranilo, tetrahydrotiopiranilo, tiomorfolinilo, tetrahydrofuranilo, tetrahydrotienilo, piperidinilo, morfolinilo y pirrolidinilo.

Para evitar cualquier duda, aunque las anteriores definiciones de grupos heteroarilos y heterociclilo hacen referencia a una fracción "N" que puede estar presente en el anillo, como será evidente para un químico experto, el átomo N

será protonado (o portará un sustituyente tal como se define más adelante) si está unido a cada uno de los átomos del anillo adyacente a través de un enlace único.

Tal como se utiliza en la presente patente, un grupo carbociclilo C₃₋₇ es un anillo de hidrocarburo no aromático saturado o insaturado que tiene de 3 a 7 átomos de carbono. Preferiblemente, es un anillo de hidrocarburo saturado o mono-insaturado (es decir, una fracción cicloalquilo una fracción cicloalquenilo) que tiene de 3 a 7 átomos de carbono, más preferiblemente que tenga de 5 a 6 átomos de carbono. Ejemplos incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo y ciclohexilo y sus variantes mono-insaturadas. Grupos carbocíclicos particularmente preferidos son ciclopentilo y ciclohexilo. El término "carbociclileno" debe interpretarse consecuentemente.

Cuando se especifique, 0, 1 o 2 átomos de carbono en un grupo carbociclilo o heterociclilo pueden ser reemplazados por grupos -C(O)-. Tal como se utiliza en la presente patente, se entiende que los "átomos de carbono" que se reemplazan incluyen los átomos de hidrógeno a los que están unidos. Cuando 1 o 2 átomos de carbono son reemplazados, preferiblemente dos de tales átomos de carbonos se reemplazan. Grupos carbociclilo de este tipo preferidos incluyen un grupo benzoquinona y grupos heterociclilo de este tipo preferidos incluyen grupos succinimido y maleimido groups.

A menos que se especifique de otro modo, un grupo arilo, heteroarilo, carbociclilo o heterociclilo es habitualmente no sustituido. Sin embargo, cuando se indica que un grupo de este tipo es no sustituido o sustituido, uno o más átomos de hidrógeno son reemplazados opcionalmente por átomos de halógeno o grupos alquilo C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆, alquiltiol C₁₋₆, -N(alquilo C₁₋₆)(alquilo C₁₋₆), nitro o ácido sulfónico. Preferiblemente, un grupo arilo, heteroarilo, carbociclilo o heterociclilo sustituido tiene de 1 a 4 sustituyentes, más preferiblemente 1 a 2 sustituyentes y de mayor preferencia 1 sustituyente. Preferiblemente, un grupo arilo, heteroarilo, carbociclilo o heterociclilo sustituido porta más de 2 sustituyentes nitro y no más de 2 sustituyentes de ácido sulfónico. Sustituyentes preferidos son átomos de halógeno y grupos alquilo C₁₋₄ y alcoxi C₁₋₄. Sustituyentes particularmente preferidos son átomos de halógeno. Preferiblemente, sin embargo, un grupo arilo, heteroarilo, carbociclilo o heterociclilo es no sustituido.

Tal como se utiliza en la presente patente, los átomos de halógeno son habitualmente átomos de F, Cl, Br o I, más preferiblemente átomos de Br.

Tal como se utiliza en la presente patente, un grupo alcoxi C₁₋₆ es un grupo alquilo C₁₋₆ (por ejemplo, un alquilo C₁₋₄) que está unido a un átomo de oxígeno.

Tal como se utiliza en la presente patente, un grupo alquiltiol C₁₋₆ es un grupo alquilo C₁₋₆ (por ejemplo, un alquilo C₁₋₄) que está unido a un átomo de azufre.

Tal como se utiliza en la presente patente, un heterocicliol de 5- a 10- miembros es un grupo heterociclilo de 5- a 10- miembros que está unido a un átomo de azufre.

Tal como se utiliza en la presente patente, un ariltiol C₆₋₁₀ es un grupo arilo C₆₋₁₀ (por ejemplo, un fenilo) que está unido a un átomo de azufre.

Tal como se utiliza en la presente patente, un carbocicliol C₃₋₇ es un grupo carbociclilo C₃₋₇ (por ejemplo, un carbociclilo C₅₋₆) que está unido a un átomo de azufre.

En la presente invención el compuesto de la fórmula (Ia) constituye una fracción reactiva de entrecruzamiento que es capaz de enlazar entre sí una primera fracción funcional y una segunda fracción funcional que contienen tiol.

Y es preferiblemente un átomo de halógeno o un grupo triflato, tosilato, mesilato, N-hidroxisuccinimidilo, N-hidroxisulfosuccinimidilo, alquiltiol C₁₋₆, heterocicliol de 5- a 10- miembros, ariltiol C₆₋₁₀, carbocicliol C₃₋₇, -OC(O)CH₃, -OC(O)CF₃, feniloxi, -NR_xR_yR_z⁺ o -PR_xR_yR_z⁺. Más preferiblemente, Y es un átomo de halógeno o un triflato, tosilato, mesilato, N-hidroxisuccinimidilo, N-hidroxisulfosuccinimidilo, alquiltiol C₁₋₆, heterocicliol de 5- a 10- miembros, ariltiol C₆₋₁₀ o carbocicliol C₃₋₇. Más preferiblemente aún, Y es un átomo de halógeno o un grupo alquiltiol C₁₋₆, heterocicliol de 5- a 10- miembros, ariltiol C₆₋₁₀ o carbocicliol C₃₋₇. Más preferiblemente, Y es un átomo de halógeno, en particular un átomo de bromo.

R_x, R_y y R_z se seleccionan cada uno preferiblemente de átomos de hidrógeno y grupos alquilo C₁₋₆. Más preferiblemente, R_x, R_y y R_z se seleccionan cada uno preferiblemente de átomos de hidrógeno y grupos metilo y etilo. Preferiblemente, en un grupo -NR_xR_yR_z⁺ o -PR_xR_yR_z⁺ en particular, R_x, R_y y R_z son los mismos.

El compuesto de fórmula R₁-H comprende al menos un primer grupo tiol, SH. En la presente invención, el primer grupo tiol es capaz de reaccionar con el compuesto de la fórmula (Ia) por ataque nucleófilo en la posición 2-. La consecuencia de hacer reaccionar el compuesto de fórmula R₁-H con el compuesto de la fórmula (Ia) es un compuesto en el que un grupo saliente electrófilo de fórmula Y en la posición 2- en el compuesto de la fórmula (Ia)

es reemplazado por el grupo de fórmula R_1 . Más específicamente, el grupo de fórmula R_1 se une en la posición 2-a través de un enlace tiol de fórmula -S- que se obtiene del primer grupo SH en el compuesto correspondiente de fórmula R_1 -H. Quedará claro, por lo tanto, que el átomo de hidrógeno en el primer grupo tiol SH de R_1 -H constituye el átomo de hidrógeno unido al grupo de fórmula R_1 . Por tanto, cuando R_1 se une al entrecruzador, el átomo de hidrógeno en este primer grupo tiol se pierde para formar el enlace -S- entre R_1 y el entrecruzador.

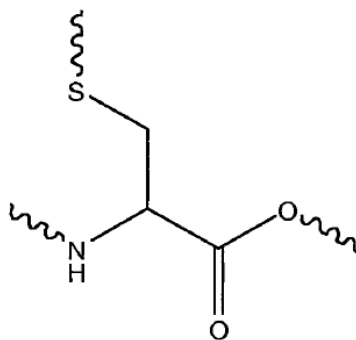
R_1 puede ser un grupo de fórmula -S-L- F_1 , en cuyo caso el átomo de sulfuro del primer grupo tiol se une al grupo conector de fórmula L. En este modo de realización, por lo tanto, resultará claro que el conector puede ser utilizado para proporcionar un grupo tiol capaz de reaccionar con el compuesto de la fórmula (Ia), grupo conector que entonces se une a una primera fracción funcional que no contiene un grupo tiol de ese tipo. Sin embargo, preferiblemente R_1 es un grupo de fórmula F_1 , y más particularmente una primera fracción funcional que, junto con el átomo H- al que está unido en el compuesto de fórmula R_1 -H, contiene un primer grupo SH.

Combinaciones de la primera fracción funcional/segunda fracción funcional de acuerdo con la presente invención se exponen en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1

Primera o segunda Fracción funcional	Segunda o primera fracción funcional
Anticuerpo o fragmento de anticuerpo	Fracción biológicamente activa que es un fármaco, por ejemplo un agente citotóxico o precursor de citotoxina
Fracción biológicamente activa	Fracción polimérica seleccionada de péptidos, proteínas, polisacáridos, poliéteres, poliaminoácidos, alcoholes polivinílicos, polivinilpirrolidonas, ácido poli(met)acrílico y derivados del mismo, poliuretanos y polifosfacenos

En un modo de realización particularmente preferido, R_1 es un grupo de fórmula F_1 , y F_1 es un péptido o proteína que comprende al menos un primer residuo de cisteína. Para evitar cualquier duda, un residuo de cisteína en un péptido o proteína es un residuo de fórmula



en donde, en el compuesto de fórmula R_1 -H el péptido o proteína se une al átomo de hidrógeno a través del átomo de azufre del residuo de cisteína. En este modo de realización, se entenderá que el "primer residuo de cisteína" significa un residuo de cisteína que está situado en una posición de ese tipo en el péptido o proteína, de tal manera que puede reaccionar con el compuesto de la fórmula (Ia). Más específicamente, el grupo R_1 se une al compuesto de la fórmula (Ia) a través del ataque nucleófilo del grupo tiol del primer residuo de cisteína en la posición 2 del compuesto de la fórmula (Ia), de tal manera que el grupo Y es reemplazado por el grupo tiol en el primer residuo de cisteína en el grupo R_1 .

En un modo de realización particularmente preferido de la invención en el que R_1 es un grupo de fórmula F_1 y F_1 es un péptido o proteína que comprende al menos un primer residuo de cisteína, R_1 además comprende al menos un segundo residuo de cisteína. Para evitar cualquier duda, el segundo residuo de cisteína se sitúa en una posición de ese tipo en el péptido o proteína, de tal manera que también puede reaccionar con el compuesto de la fórmula (Ia). Además, en este modo de realización el compuesto de la fórmula (Ia) es un compuesto en donde el grupo R_2 es un grupo saliente electrófilo de fórmula Y. El grupo R_1 entonces se une adicionalmente al compuesto de la fórmula (Ia) a través de ataque nucleófilo del grupo tiol del segundo residuo de cisteína en la posición 3 del compuesto de la fórmula (Ia), de tal manera que el grupo R_2 es reemplazado por el grupo tiol en el segundo residuo de cisteína en el grupo R_1 . Este modo de realización de la invención es particularmente útil cuando la primera fracción funcional es un péptido o proteína que contiene un puente de disulfuro, ya que permite que el agente intrecruzador sea añadido a

través del puente de disulfuro. Preferiblemente, cuando un péptido o proteína que contiene un puente de disulfuro se va a hacer reaccionar con el compuesto de la fórmula (Ia), el puente de disulfuro se reduce primero utilizando técnicas conocidas en el arte. Por ejemplo, la reducción puede realizarse utilizando reactivos de fosfina estándar, tales como (tris(2-carboxietil)fosfina) o realizando una reacción de intercambio tiol-disulfuro.

5 La reducción de un grupo disulfuro puede realizarse mediante reacción con un agente reductor tal como una fosfina, tiol o un agente hidruro. Agentes reductores preferidos son tris(2-carboxietil)fosfina, glutatión, 2-mercaptoetanol y ditiotreitól. Un grupo preferido de reactivos es 1,2-etanoditiol, 2-mercaptoetanol, ditiotreitól, glutatión y tris(2-carboxietil)fosfina.

10 Quedará claro que el compuesto de la fórmula (Ia) representa la fracción reactiva clave que de acuerdo con la presente invención permite que una fracción funcional que contiene tiol sea conjugada con una fracción funcional secundaria. Por consiguiente, un compuesto de la fórmula (Is) puede ser utilizado como un reactivo para enlazar una primera fracción funcional con una segunda fracción funcional.

15 Como sería bien conocido para los expertos en el arte, se diseñan de forma rutinaria reactivos de entrecruzamiento que portan grupos funcionales adaptados para reaccionar con fracciones funcionales que tienen grupos reactivos particulares que se separan mediante grupos conectores (que habitualmente no cumplen una función significativa en las reacciones). Un experto en el arte entendería inmediatamente que el compuesto de la fórmula (Ia) podría fácilmente ser incorporado en reactivos de entrecruzamiento habituales, por ejemplo, reemplazando fracciones convencionales diseñadas para reaccionar con grupos tiol (por ejemplo, grupos maleimida). Información detallada sobre el diseño de reactivos de entrecruzamiento adecuados para su adaptación de esta manera puede encontrarse, por ejemplo, en "Bioconjugate Techniques" (Greg T. Hermanson, Academic Press Inc., 1996), el contenido del cual se incorpora a la presente patente a modo de referencia en su totalidad.

20 El compuesto de la fórmula (Ia) es capaz de enlazar entre sí al menos una primera fracción funcional y una segunda fracción funcional. La primera fracción funcional puede reaccionar en la posición 2 reemplazando el grupo saliente Y, y la segunda fracción funcional puede entonces añadirse por adición electrófila a través del enlace doble de carbono-carbono entre las posiciones 2- y 3-. De forma alternativa, el reactivo entrecruzador puede comprender uno o más grupos reactivos capaces de reaccionar con fracciones funcionales adicionales.

25 En un modo de realización adicional, la segunda fracción funcional puede ser una fracción que contiene una fracción alqueno y que puede unirse al compuesto de la fórmula (Ia) acoplándose en una cicloadición [2+2] fotocatalítica con el enlace doble de carbono-carbono entre las posiciones 2- y 3- del compuesto de la fórmula (Ia). Este procedimiento da como resultado una fracción de anillo de ciclobutano que contiene los 2- y 3- átomos de carbono del compuesto de la fórmula (Ia) y en el que el enlace doble de carbono-carbono ha sido saturado.

Grupos Y preferidos en la fórmula (Ia) son tal como se define anteriormente.

35 $R_{33'}$ preferiblemente representa un átomo de hidrógeno o un grupo de fórmula $-L(Z)_n$ o IG. Grupos $R_{33'}$ particularmente preferidos son átomos de hidrógeno y grupos de fórmula IG. De mayor preferencia, $R_{33'}$ es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C_{1-6} .

R_2 es preferiblemente un átomo de hidrógeno o un grupo de fórmula Y, $-L(Z)_n$ o IG. Más preferiblemente, R_2 es preferiblemente un átomo de hidrógeno o un grupo de fórmula Y o IG. De mayor preferencia, R_2 es un átomo de hidrógeno o halógeno o un grupo alquilo C_{1-6} .

40 E es preferiblemente un átomo de halógeno o un grupo alcoxi C_{1-6} , tiol, alquiltiol C_{1-6} , $-N(\text{alquilo } C_{1-6})(\text{alquilo } C_{1-6})$, triflato, tosilato, mesyilato, N-hidroxisuccinimidilo, N-hidroxisulfosuccinimidilo, imidazolilo, feniloxi o nitrofeniloxi. Grupos de fórmula E de más preferencia son átomos de halógeno y grupos triflato, tosilato y mesilato.

Nu es preferiblemente un grupo de fórmula $-OH$ o $-SH$. En otro modo de realización, Nu es preferiblemente un grupo de fórmula $-OH$, $-NH_2$ o $-SH$, más preferiblemente $-NH_2$ o $-SH$.

45 La fracción conectora L enlaza entre sí otras dos fracciones en los compuestos de la presente invención (es decir, es al menos una fracción divalente). Sin embargo, en algunas realizaciones ciertas fracciones conectoras L pueden enlazar entre sí más de otras dos fracciones (por ejemplo, cuando R_2 , R_3 , $R_{3'}$ o $R_{33'}$ representa $-L(Z)_n$ en donde n es 2 o 3), en cuyo caso se ha de entender que la otra tercera fracción y cualquier otra fracción, cada una reemplaza un átomo de hidrógeno en la correspondiente fracción conectora L divalente.

50 L representa preferiblemente una fracción que es un grupo alquilenilo C_{1-20} , un grupo alquenileno C_{2-20} o un grupo alquinileno C_{2-20} , que es no sustituido o sustituido por uno o más sustituyentes seleccionados de grupos de átomos de halógenos y ácido sulfónico, y en la que (a) 0, 1 o 2 átomos de carbono son reemplazados por grupos seleccionados de arileno C_{6-10} , heteroarileno de 5- a 10- miembros, carbociclileno C_{3-7} y grupos heterociclileno de 5-

a 10- miembros, y (b) 0, 1 o 2 grupos $-CH_2-$ son reemplazados por grupos seleccionados de los grupos $-O-$, $-S-$, $-S-$, $-C(O)-$ y $-N(\text{alquilo } C_{1-6})-$, en donde:

5 (i) dichos grupos arileno, heteroarileno, carbociclileno y heterociclileno son no sustituidos o sustituidos por uno o más sustituyentes seleccionados de átomos de halógeno y grupos alquilo C_{1-6} , alcoxi C_{1-6} , alquiltiol C_{1-6} , $-N(\text{alquilo } C_{1-6})(\text{alquilo } C_{1-6})$, nitro y ácido sulfónico; y

(ii) 0, 1 o 2 átomos de carbono en dichos grupos carbociclileno y heterociclileno son reemplazados por grupos $-C(O)-$.

10 Más preferiblemente, L representa una fracción que es un grupo alquileno C_{1-6} no sustituido, un grupo alquenileno C_{2-6} o un grupo alquinileno C_{2-6} , en el que (a) 0 o 1 átomo de carbono es reemplazado por un grupo seleccionado de grupos fenileno, heteroarileno de 5 a 6- miembros, carbociclileno C_{5-6} y heterociclileno de 5- a 6- miembros, en donde dichos grupos fenileno, heteroarileno, carbociclileno y heterociclileno son no sustituidos o sustituidos por uno o dos sustituyentes seleccionados de átomos de halógeno y grupos alquilo C_{1-4} y alcoxi C_{1-4} , y (b) 0,1 o 2 grupos $-CH_2-$ son reemplazados por grupos seleccionados de grupos $-O-$, $-S-$ y $-C(O)-$.

15 De mayor preferencia, L es una fracción que es un grupo alquileno C_{1-4} no sustituido, en el que 0 o 1 átomo de carbono es reemplazado por un grupo fenileno no sustituido.

20 Z representa un grupo reactivo unido a un grupo de fórmula L que es capaz de reaccionar con una fracción funcional, de tal manera que la fracción funcional se enlace al grupo de fórmula L. Como entenderían los expertos en el arte, la naturaleza del propio grupo reactivo no es importante. En la actualidad se utiliza una amplia gama de grupos reactivos de forma rutinaria en el arte para conectar una fracción funcional a un reactivo de entrecruzamiento. Tales grupos reactivos pueden ser capaces de, por ejemplo, unir un compuesto amina, un compuesto tiol, un compuesto carboxilo, un compuesto hidroxilo, un compuesto carbonilo, o un compuesto que contiene un hidrógeno reactivo a un entrecruzador. Los expertos en el arte reconocerían, por supuesto, inmediatamente que cualquier grupo reactivo de ese tipo sería adecuado para su uso de acuerdo con la presente invención. Los expertos en el arte podrían seleccionar un grupo reactivo apropiado a partir del conocimiento de la práctica habitual, en referencia a manuales estándar tales como "Bioconjugate Techniques" (Greg T. Hermanson, Academic Press Inc., 1996), el contenido del cual se incorpora a la presente patente a modo de referencia en su totalidad.

Z es preferiblemente:

30 (a) un grupo de fórmula $-LG$, $-C(O)-LG$, $-C(S)-LG$ o $-C(NH)-LG$ en donde LG es un grupo saliente electrófilo;

(b) un nucleófilo Nu' seleccionado de grupos $-OH$, $-SH$, $-NH_2$, $-NH(\text{alquilo } C_{1-6})$ y $-C(O)NHNH_2$;

(c) una fracción cíclica Cyc, que es capaz de una reacción electrófila por la apertura del anillo con un nucleófilo;

(d) un grupo de fórmula $-S(O_2)(Hal)$ en donde Hal es un átomo de halógeno;

(e) un grupo de fórmula $-N=C=O$ o $-N=C=S$;

35 (f) un grupo de fórmula $-S-S(IG')$ en donde IG' representa un grupo de fórmula IG según se define en la presente patente;

(g) un grupo AH, que es un grupo arilo C_{6-10} que es sustituido por uno o más átomos de halógenos;

(h) un grupo fotoreactivo que es capaz de activarse por la exposición a la luz ultravioleta;

(i) un grupo de fórmula $-C(O)H$ o $-C(O)(\text{alquilo } C_{1-6})$;

40 (j) un grupo maleimido;

(k) un grupo de fórmula $-C(O)CHCH_2$;

(l) un grupo de fórmula $-C(O)C(N_2)H$ o $-\text{PhN}_2^+$, donde Ph representa un grupo fenilo; o

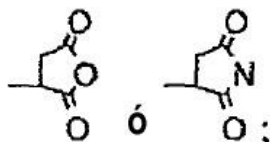
(m) un grupo epóxido.

De mayor preferencia, Z se selecciona de:

(a) grupos de fórmula -LG, -C(O)-LG y -C(S)-LG, en donde LG se selecciona de átomos de halógeno y grupos -O(alquilo C₁₋₆), -SH, -S(alquilo C₁₋₆), triflato, tosilato, mesilato, N-hidroxisuccinimidilo y N-hidroxisulfosuccinimidilo;

5 (b) grupos de fórmula -OH, -SH y -NH₂;

(c) un grupo de fórmula



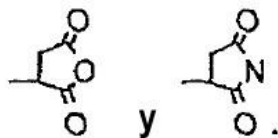
y

(d) un grupo maleimido.

10 LG se selecciona preferentemente de átomos de halógeno y -O(IG'), -SH, -S(IG'), -NH₂, NH(IG'), -N(IG')(IG''), -N₃, triflato, tosilato, mesilato, N-hidroxisuccinimidilo, N-hidroxisulfosuccinimidilo, imidazolilo y grupos azido, en donde IG' e IG'' son los mismos o diferentes y cada uno representa un grupo de fórmula IG.

Nu' se selecciona preferiblemente de grupos -OH, -SH y -NH₂.

Cyc se selecciona preferiblemente de los grupos



15

Hal es preferiblemente un átomo de cloro.

AH es preferiblemente un grupo fenilo que es sustituido por al menos un átomo de flúor.

El grupo fotoreactivo se selecciona preferiblemente de:

20 (a) un grupo arilo C₆₋₁₀ que es sustituido por al menos un grupo de fórmula -N₃ y que es de manera opcional sustituido adicionalmente por uno o más átomos de halógeno;

(b) un grupo benzofenona;

(c) un grupo de fórmula -C(O)C(N₂)CF₃; y

(d) un grupo de fórmula -PhC(N₂)CF₃, en donde Ph representa un grupo fenilo.

n es preferiblemente 1 o 2, y de mayor preferencia 1.

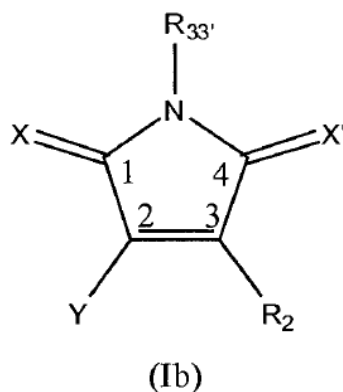
25 IG representa preferiblemente una fracción que es un grupo alquilo C₁₋₆, un grupo alqueno C₂₋₆ o un grupo alquino C₂₋₆ no sustituido, en el que (a) 0 o 1 átomo de carbono es reemplazado por un grupo seleccionado de grupos fenileno, heteroarileno de 5- a 6- miembros, carbociclileno C₅₋₆ y heterociclileno de 5- a 6- miembros, en donde dichos grupos fenileno, heteroarileno, carbociclileno y heterociclileno son no sustituidos o sustituidos por uno o dos sustituyentes seleccionados de átomos de halógeno y grupos alquilo C₁₋₄ y alcoxi C₁₋₄, y (b) 0, 1 o 2 grupos -CH₂- son reemplazados por grupos seleccionados de grupos -O-, -S- y -C(O)-.

30

Más preferiblemente, IG representa una fracción que es un grupo alquilo C1-6 no sustituido, en el que (a) 0 o 1 átomo de carbono es reemplazado por un grupo seleccionado de grupos fenileno, heteroarileno de 5 a 6 miembros, carbociclileno C5-6 y heterociclileno de 5- a 6- miembros no sustituidos.

De mayor preferencia, IG representa un grupo alquilo C₁₋₆ no sustituido.

- 5 Preferiblemente, el compuesto de la fórmula (Ia) es un compuesto de la fórmula (Ib):



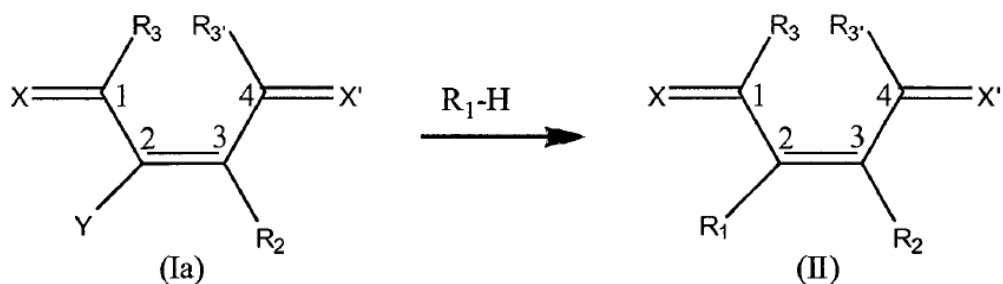
en donde X, X', Y, R₂ y R_{33'} son todos según se define en la presente patente.

En el compuesto de la fórmula (Ib), preferiblemente:

- X y X' cada una representan un átomo de oxígeno;
- 10 - R_{33'} representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C₁₋₆;
- Y representa un átomo de halógeno; y
- R₂ representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C₁₋₆.

- 15 La realización (1) de la presente invención hace referencia al uso de un compuesto de la fórmula (Ia), según se ha definido anteriormente, como un reactivo para enlazar el compuesto de fórmula R₁-H que comprende una primera fracción funcional de fórmula F₁ a una segunda fracción funcional de fórmula F₂. Habitualmente, este uso implica llevar a cabo un proceso de la presente invención, según se define en la realización (2) o realización (3) descritas más adelante.

- 20 La realización (2) de la presente invención hace referencia a un proceso para producir un conjugado. En una etapa (i) de este proceso, un compuesto de la fórmula (Ia) se hace reaccionar con un compuesto de fórmula R₁-H para producir un compuesto que contiene una fracción de la fórmula (II):



Esta etapa (i) implica unir el grupo R₁ a través de ataque nucleófilo del primer grupo SH en el compuesto de fórmula R₁-H en la posición 2- del compuesto de la fórmula (Ia), de tal manera que el grupo Y en la posición 2 es reemplazado por el grupo R₁.

En una etapa (ii) del proceso de la realización (2), una fracción de fórmula F_2 se enlaza al compuesto de fórmula (II), produciendo de este modo el conjugado. Diversos procedimientos pueden ser utilizados para llevar a cabo esta etapa (ii), por ejemplo aquellas expuestas en los párrafos (a), (b) y (c) a continuación:

5 (a) El proceso puede comprender enlazar F_2 al compuesto de fórmula (II) a través de una reacción de adición electrófila de F_2 a través del enlace doble de carbono-carbono entre la posición 2 y la posición 3 de la fórmula (II).

(b) Cuando $R_{33'}$ representa un átomo de hidrógeno o un grupo de fórmula Y, Nu o $-L(Z)_n$, el proceso puede comprender enlazar F_2 al compuesto de fórmula (II) a través de una reacción entre F_2 y (i) el átomo de nitrógeno de la fracción de fórmula $-N(R_{33'})$ o (ii) dicho grupo de fórmula Y, Nu o $-L(Z)_n$.

10 (c) Cuando R_2 representa un grupo de fórmula Y, Nu o $-L(Z)_n$, el proceso puede comprender enlazar F_2 a la fracción de fórmula (II) a través de una reacción entre F_2 y dicho grupo de fórmula Y, Nu o $-L(Z)_n$.

15 En un modo de realización adicional, la fracción de fórmula F_2 se enlaza al compuesto de fórmula (II) efectuando una cicloadición [2+2] fotocatalítica entre un grupo alqueno en la fracción de fórmula F_2 y el enlace doble de carbono-carbono entre la posición 2 y la posición 3 de la fórmula (II). Este procedimiento da como resultado una fracción de anillo de ciclobutano que contiene los 2- y 3- átomos de carbono del compuesto de la fórmula (II) y en el que el enlace doble de carbono-carbono ha sido saturado.

20 Un proceso alternativo para producir un conjugado es proporcionado por la realización (3) de la presente invención. En este proceso, un compuesto de fórmula R_1-H se hace reaccionar con un compuesto de fórmula (IIa). El proceso implica unir el grupo R_1 a través de un ataque nucleófilo del primer grupo SH en el compuesto de fórmula R_1-H en la posición 2 del compuesto de fórmula (IIa), de tal manera que el grupo Y en la posición 2 es reemplazado por el grupo R_1 .

Como quedará claro para los expertos en el arte, el compuesto de fórmula (IIa) está relacionado con el compuesto de fórmula (II), según se describe anteriormente. Sin embargo, el compuesto de fórmula (IIa) comprende al menos una fracción funcional F_2 . Por consiguiente, el compuesto de fórmula (IIa) puede prepararse fácilmente enlazando una fracción funcional F_2 .

25 Preferiblemente, de acuerdo con el proceso descrito anteriormente de la realización (3), el compuesto de fórmula (IIa) es uno en el que:

- $R_{33a'}$ representa un grupo de fórmula $R_{33'}$ o un grupo de fórmula F_2 ; y

- R_{2a} representa un grupo de fórmula R_2 o un grupo de fórmula F_2 .

30 Preferiblemente, el compuesto de la fórmula (IIa) comprende como máximo tres grupos de fórmula F_2 , más preferiblemente uno o dos grupos de fórmula F_2 , y de mayor preferencia un grupo de fórmula F_2 .

35 Claramente, después de llevar a cabo el proceso de la realización (2) o (3) de la presente invención uno o más grupos reactivos adicionales pueden permanecer en el producto conjugado (incluyendo un enlace doble de carbono-carbono situado en una posición correspondiente a las posiciones 2- y 3- del reactivo de entrecruzamiento además de grupos nucleófilos adicionales, grupos electrófilos, y grupos reactivos de fórmula Z). Por consiguiente, en aspectos adicionales, los procesos de las realizaciones (2) y (3) de la presente invención comprenden además enlazar una o más fracciones funcionales adicionales a dicho conjugado, en donde cada fracción funcional adicional es la misma o diferente y se selecciona de una fracción detectable, una fracción enzimáticamente activa, una etiqueta de afinidad, un hapteno, un soporte inmunogénico, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, un antígeno, un ligando, una fracción biológicamente activa, un liposoma, una fracción polimérica, un aminoácido, un péptido, una proteína, una célula, un carbohidrato, un ADN y un ARN.

45 Las reacciones químicas que tienen lugar en los procesos de las realizaciones (2) y (3) pueden ser realizadas utilizando técnicas de rutina en el arte para unir reactivos de entrecruzamiento a fracciones funcionales, tales como las descritas en "Bioconjugate Techniques" (Greg T. Hermanson, Academic Press Inc., 1996), el contenido del cual se incorpora en la presente patente a modo de referencia en su totalidad. Ejemplos adicionales de condiciones adecuadas para realizar tales reacciones pueden encontrarse en la sección de Ejemplos de la presente especificación.

50 Como se entendería por parte de los expertos en el arte, cuando un reactivo (por ejemplo, un compuesto que porta una fracción funcional o un reactivo de entrecruzamiento) porta más de un grupo reactivo, puede ser deseable efectuar la protección química de los grupos reactivos que no se pretende que formen parte en la reacción. Por ejemplo, puede ser necesario proteger grupos tales como grupos hidroxilo, amino y carboxi, cuando éstos se desean en el producto final, para evitar su participación no deseada en las reacciones (ver, por ejemplo, Greene, T.W.,

"Protecting Groups in Organic Synthesis", John Wiley and Sons, 1999). Pueden utilizarse grupos protectores convencionales en conjunción con la práctica estándar. En algunos ejemplos, puede utilizarse la desprotección en una etapa intermedia o final, y por tanto se entiende que los procesos de las realizaciones (2) y (3), de acuerdo con la invención, descritos en la presente patente abarcan la adición y la eliminación de tales grupos protectores.

5 El conjugado producido de acuerdo al proceso de la realización (2) o (3) contiene un anillo de maleimida. El proceso de la realización (2) o (3) puede además comprender la realización de una apertura de anillo del mencionado anillo de maleimida. La apertura del anillo de los anillos de maleimida puede efectuarse mediante reacciones de hidrólisis que son conocidas en el arte. Efectuar la apertura del anillo de la maleimida puede ser ventajoso en ciertas aplicaciones, ya que puede dejar las fracciones funcionales enlazadas al conjugado de forma irreversible.

10 En la realización (4), la presente invención hace referencia a un proceso para **escindir** el enlace entre una fracción funcional que contiene tiol y la fracción del entrecruzador (que puede adicionalmente estar enlazada a una o más fracciones funcionales).

15 En un modo de realización preferido del proceso de la realización (4), la primera fracción funcional de fórmula F₁ es un fármaco ya que aquí la metodología puede ser explotada en, por ejemplo, métodos para la administración de fármacos.

En un primer modo de realización preferido del proceso de la realización (4), el compuesto es un compuesto de fórmula (III).

En un segundo modo de realización preferido del proceso de la realización (4), el compuesto es un compuesto de fórmula (IIIa).

20 Por consiguiente, este segundo modo de realización preferido proporciona un proceso para **escindir** una fracción de entrecruzamiento de una fracción funcional que contiene al menos dos grupos tiol. Un ejemplo de una fracción funcional de ese tipo es una fracción que contiene un grupo disulfuro, tal como una proteína que contiene dos residuos de cisteína que están enlazados entre sí a través de un puente disulfuro.

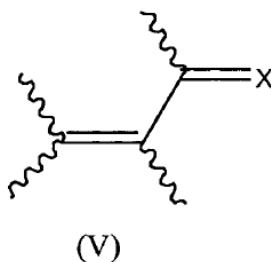
25 Preferiblemente, en el proceso de la realización (4) el compuesto además comprende al menos una fracción funcional de fórmula F₂.

En el proceso de la realización (4), la etapa (ii) de **escisión** del o de los enlaces al grupo de fórmula R₁ puede realizarse utilizando métodos de rutina para **escindir** un enlace tiol en un centro de carbono insaturado, por ejemplo utilizando métodos de rutina para escindir un tiol unido a un alqueno deficiente en electrones.

30 Preferiblemente, la etapa (ii) del proceso de la realización (4) se efectúa incubando el compuesto con un reactivo que es capaz de actuar como un nucleófilo en una reacción de Michael. Ejemplos de reactivos que se conoce bien que son capaces de actuar como un nucleófilo en una reacción de Michael incluyen compuestos de fosfina, compuestos de fosfito, tioles, selenoles, aminas y compuestos de nucleófilos de carbono suaves. Los compuestos de fosfina y compuestos de fosfito contienen ambos un átomo de fósforo trivalente. En una fosfina, el átomo de fósforo está unido a los átomos de hidrógeno o carbono, mientras que en un fosfito el átomo de fósforo está unido a átomos de oxígeno (entendiéndose que los propios átomos de carbono y átomos de oxígeno están unidos a su vez a otros grupos en los respectivos compuestos). Los tioles son compuestos orgánicos que contienen un grupo tiol -SH. Los Selenoles son compuestos orgánicos que contienen un grupo -SeH. Las aminas son compuestos que contienen un grupo funcional amina. Los nucleófilos de carbono suaves son compuestos que contienen un centro nucleófilo de carbono suave. Nucleófilos de carbono suaves a modo ejemplo se revelan en la US 5.414.074. Los expertos en el arte podrían por supuesto seleccionar reactivos apropiados que son capaces de actuar como un nucleófilo en una reacción de Michael como parte de su rutina, por ejemplo seleccionando de forma rutinaria un reactivo adecuado de entre la lista de ejemplos de tipos de reactivo descritos en la presente patente.

45 Los reactivos actualmente preferidos son los compuestos de fosfina y tioles. Una fosfina particularmente preferida es tris(2-carboxietil)fosfina, que se conoce comúnmente como "TCEP" y se utiliza comúnmente en el arte para reducir los puentes disulfuro en los compuestos, por ejemplo en proteínas. La tris(2-carboxietil)fosfina puede suministrarse en forma de una sal, tal como su sal de hidrocioruro. Un tiol particularmente preferido es el glutatión. Tioles adicionalmente preferidos son 1,2-etanoditiol, 2-mercaptoetanol y ditiotreitól (es decir, HSCH₂CH(OH)CH(OH)CH₂SH, conocido comúnmente como DTT). Un grupo de reactivos preferido es 1,2-etanoditiol, 2-mercaptoetanol, ditiotreitól, glutatión y tris(2-carboxietil)fosfina.

50 Para evitar cualquier duda, tal como se utiliza en la presente patente, el término "reactivo que es capaz de actuar como un nucleófilo en una reacción de Michael" quiere decir un reactivo que es capaz de reaccionar con una fracción α,β -insaturada en un compuesto, y en particular una fracción de la fórmula (V)



en donde X es tal como se define en la presente patente. Tales reactivos algunas veces se conocen como "reactivos que son capaces de actuar como un nucleófilo en una reacción de adición conjugada". Claramente, los reactivos no se limitan a reactivos que reaccionan a través de un centro de carbono nucleófilo (por ejemplo, nucleófilos de carbono suaves), sino que también incluyen reactivos que reaccionan a través de un centro no carbónico nucleófilo, tal como los ejemplos de reactivos que se describen en la presente patente.

Se puede llevar a cabo un proceso que comprende:

- (i) llevar a cabo un proceso para producir un conjugado tal como se define en la realización (2) o (3); y
- (ii) posteriormente regenerar el compuesto de fórmula R_1-H a partir de dicho conjugado.

Habitualmente, en este proceso la etapa (ii) se efectúa incubando el compuesto con un reactivo que es capaz de actuar como un nucleófilo en una reacción de Michael, por ejemplo un reactivo tal como se define en conexión con la realización (4).

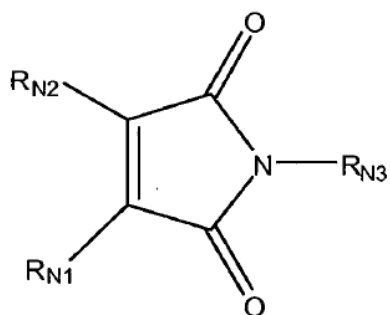
La metodología de la presente invención además da lugar a una serie de compuestos, que constituyen las realizaciones (5A), (5B), (6) y (7) de la presente invención.

La realización (5A) de la presente invención hace referencia a un compuesto de la fórmula (IIa). Este compuesto puede ser utilizado para funcionalizar un compuesto funcional que contiene tiol (de aquí en adelante denominado como el compuesto R_1-H) con una fracción de fórmula F_2 , utilizándolo específicamente como un reactivo a la hora de llevar a cabo el proceso de la realización (3).

Preferiblemente, en la realización (5A) el compuesto de la fórmula (IIa) no es un N-fenil 3,4-dibromomaleimida, en donde los grupos N-fenilo son sustituidos o no sustituidos.

La realización (5B) de la presente invención hace referencia al compuesto de la fórmula (III), que comprende al menos un grupo de fórmula F_2 y en el que R_{2a} no es un átomo de hidrógeno. Claramente, por lo tanto, este compuesto constituye un conjugado que puede obtenerse de acuerdo con el uso y procesos de la presente invención, el cual comprende tanto la primera fracción funcional como la segunda fracción funcional entrecruzada a través de la fracción de entrecruzamiento de la presente invención. Un experimento descrito en Hong et al. (J. Am. Chem. Soc., 2009, 131 (29), págs. 9986-9994) utiliza una fracción de 7-oxanorbornadieno sustituida como un entrecruzador y genera un conjugado que contiene un entrecruzador de maleimida. Sin embargo, esta metodología genera necesariamente un átomo de hidrógeno en la posición de sustituyente correspondiente al sustituyente R_{2a} . En contraste, resultará inmediatamente claro para los expertos en el arte que la metodología de la presente invención puede ser aplicada fácilmente para obtener un sustituyente R_{2a} que no sea hidrógeno, sencillamente seleccionando un grupo que no sea un átomo de hidrógeno para ser unido al compuesto de la fórmula (Ia) cuando se realiza un proceso adecuado para sintetizar el conjugado. El compuesto de la fórmula (III) de acuerdo con la realización (5B) puede por tanto ser utilizado, por ejemplo, para efectuar funcionalizaciones adicionales (cuando R_{2a} es un grupo saliente electrófilo, un grupo nucleófilo o un grupo conector que porta un grupo reactivo). De manera alternativa, la propia segunda fracción funcional F_2 puede situarse en esta posición sustituyente (ya sea uniéndose directamente a la posición 3 o bien uniéndose a la misma a través de un grupo conector). Aún más, el grupo de fórmula R_{2a} puede constituir un grupo inerte de fórmula IG, por ejemplo un sustituyente voluminoso químicamente no reactivo que dificulta que ocurran reacciones adicionales a la molécula conjugada.

Preferiblemente en la realización (5B) el compuesto de fórmula (III) no es un compuesto de fórmula (N):



(N)

en donde

5 R_{N1} y R_{N2} se seleccionan independientemente de hidrógeno, amino, hidroxilo, ciano, nitro, carboxilato, carboxamida, alquilo opcionalmente sustituido, alqueno opcionalmente sustituido, alquino opcionalmente sustituido, arilo carbocíclico opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido, mercaptoalquilo opcionalmente sustituido, mono- o di-alquil amino opcionalmente sustituido, cicloalquilo opcionalmente sustituido, heteroalíclico opcionalmente sustituido, o aminoalquilo opcionalmente sustituido;

10 R_{N3} es un grupo alquilo opcionalmente sustituido, alqueno opcionalmente sustituido, alquino opcionalmente sustituido, arilo carbocíclico opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, cicloalquilo opcionalmente sustituido, o heteroalíclico opcionalmente sustituido; y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

15 La realización (6) de la presente invención está dirigida a un compuesto de la fórmula (IIIa). En particular, este compuesto comprende una primera fracción funcional que tiene al menos un primer y un segundo grupo tiol que están unidos al reactivo de entrecruzamiento. El compuesto además comprende de forma opcional al menos una fracción funcional adicional. Preferiblemente, el compuesto de la fórmula (IIIa) comprende al menos una fracción funcional de fórmula F_2 . Preferiblemente, el grupo de fórmula R_1 es un péptido o proteína que comprende al menos dos residuos de cisteína, por ejemplo dos residuos de cisteína que en el péptido o proteína no enlazados forman habitualmente un puente disulfuro interno en el péptido o proteína.

20 La realización (7) de la presente invención hace referencia a un compuesto de fórmula (IVa) o (IVb). Podrá apreciarse que estos compuestos constituyen una molécula conjugada, ya que comprenden tanto una primera fracción funcional como una segunda fracción funcional y además comprenden un enlace simple, en vez de doble, de carbono-carbono entre la posición 2 y la posición 3. Sin embargo, al contrario que los conjugados preparados utilizando reactivos de maleimida convencionales, los compuestos de la fórmula (IVa) y (IVb) portan un total de al menos dos fracciones funcionales en las posiciones 2 y 3.

25 Los compuestos de la fórmula (IVa) y (IVb) pueden prepararse utilizando métodos directos. En un método de ese tipo, la molécula conjugada se prepara realizando un proceso de la realización (2) de la presente invención, en la que la etapa (ii) implica una reacción de adición electrófila de F_2 a través del enlace doble de carbono-carbono entre la posición 2 y la posición 3 de la fórmula (II). En otro método, se prepara en primer lugar un conjugado que aún contiene el enlace doble de carbono-carbono entre la posición 2 y la posición 3 y a continuación se realiza una reacción de adición electrófila para saturar el enlace doble. Esta reacción de adición electrófila puede implicar la adición de una fracción funcional adicional (por ejemplo, una fracción funcional adicional que contiene tiol). De manera alternativa, puede implicar cualquier otro reactivo que se utilice de forma rutinaria para realizar reacciones de adición electrófilas en centros de carbono-carbono insaturados. Por ejemplo, el reactivo puede ser un halógeno de hidrógeno, un dihalógeno, ácido sulfúrico, agua, un alcohol, H_2S , un mercaptano o un ácido carboxílico.

35 Un proceso para producir un compuesto de la fórmula (IVa) o (IVb) es un proceso que comprende: (i) proporcionar un compuesto de la fórmula (III); y (ii) hacer reaccionar el compuesto de la fórmula (III) con un compuesto de fórmula R_4-H . Podrá apreciarse que la posición en la que el grupo R_4 del compuesto de fórmula R_4-H se añade al compuesto de la fórmula (III) dependerá de la estructura precisa del compuesto de la fórmula (III), la naturaleza del reactivo de R_4-H y las condiciones de reacción bajo las cuales la reacción se lleva a cabo. Habitualmente, el grupo de fórmula R_4 se añadirá al átomo de carbono que es capaz de formar el intermedio catiónico más estable tras la adición de un protón al compuesto de la fórmula (III) (es decir, de acuerdo con la regla de Markovnikov). Un experto en el arte apreciaría que si se desea una localización específica para la adición del grupo de fórmula R_4 , una selección de rutina

de las condiciones de reacción y la identidad de los otros grupos en el compuesto de la fórmula (III) puede lograr una regioselectividad de este tipo.

5 Como resultará claro para los expertos en el arte, la metodología de la presente invención puede aplicarse ampliamente a procesos y métodos conocidos que implican la conjugación de fracciones funcionales. Habitualmente, los procesos y métodos convencionales de este tipo pueden ser modificados directamente reemplazando un grupo reactivo a tiol conocido convencionalmente en una molécula de entrecruzamiento que enlaza entre sí dos moléculas funcionales (tales como un grupo maleimida) mediante el compuesto de la fórmula (Ia).

10 Los conjugados de la presente invención, específicamente aquellos de las realizaciones, son adecuados para el tratamiento o el diagnóstico médico. La presente invención proporciona por lo tanto, en la realización (8), un compuesto de este tipo para su uso en un método o tratamiento del organismo humano o animal mediante cirugía o terapia, o un método de diagnóstico practicado en el organismo humano o animal.

15 En un modo de realización preferida, la primera fracción funcional es un fármaco y la segunda fracción funcional es una fracción polimérica (por ejemplo, una fracción capaz de aumentar la biodisponibilidad y/o estabilidad in vivo, tal como una fracción de polietilenglicol) o un anticuerpo (por ejemplo, para formar un conjugado de inmunotoxinas para su uso en fijar como dianas antígenos específicos, tal como en el tratamiento del cáncer).

20 Se entenderá que el nivel de dosis específica para cualquier paciente en particular dependerá de una variedad de factores que incluyen la actividad del compuesto específico empleado, la edad, el peso corporal, salud general, sexo, dieta, tiempo de administración, vía de administración, velocidad de excreción, combinación del fármaco y la gravedad de la enfermedad en particular que se someta a tratamiento. Los niveles de dosificación y frecuencia de dosificación óptimos serán determinados por el ensayo clínico, pero un ejemplo de dosis sería 0,1-1000 mg por día. Los compuestos médicos que son interés de la invención pueden ser preparados para su administración por cualquier vía consistente con sus propiedades farmacocinéticas. Las composiciones administrables por vía oral pueden ser en forma de comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos, grageas, preparaciones líquidas o en gel, tales como soluciones o suspensiones parenterales estériles por vía oral y tópica. Los comprimidos y cápsulas para su administración oral pueden encontrarse en una forma presentación de dosificación unitaria, y pueden contener excipientes convencionales tales como agentes aglutinantes, por ejemplo jarabe, goma arábiga, gelatina, sorbitol, tragacanto, o polivinilpirrolidona; sustancias de relleno, por ejemplo lactosa, azúcar, almidón de maíz, fosfato cálcico, sorbitol o glicina; lubricante para la elaboración de comprimidos, por ejemplo estearato de magnesio, talco, polietilenglicol o sílice; desintegrantes, por ejemplo almidón de patata, o agentes humectantes aceptables tales como laurilsulfato de sodio. Los comprimidos pueden ser recubiertos de acuerdo con métodos bien conocidos en la práctica farmacéutica habitual. Las preparaciones líquidas orales pueden estar en forma de, por ejemplo, suspensiones, soluciones, emulsiones, jarabes o elixires acuosos u oleosos, o pueden presentarse como un producto seco para su reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Tales preparaciones líquidas pueden contener aditivos convencionales tales como agentes de suspensión, por ejemplo sorbitol, jarabe, metilcelulosa, jarabe de glucosa, grasas comestibles hidrogenadas de gelatina; agentes emulsionantes, por ejemplo lecitina, monooleato de sorbitano, o goma arábiga; vehículos no acuosos (que pueden incluir aceites comestibles), por ejemplo aceite de almendra, aceite de coco fraccionado, ésteres oleosos, tales como glicerina, propilenglicol, o alcohol etílico; conservantes, por ejemplo p-hidroxibenzoato de metilo o propilo o ácido sórbico, y se desea agentes colorantes o aromatizantes convencionales.

Para su aplicación tópica en la piel, los compuestos médicos pueden convertirse en una crema, loción o pomada. Las formulaciones en crema o pomada que pueden ser utilizadas para el fármaco son formulaciones convencionales bien conocidas en el arte, por ejemplo tal como se describe en manuales estándar de farmacéutica, tales como la Farmacopea.

45 Para la aplicación tópica por inhalación, los compuestos médicos pueden ser formulados para su administración por aerosol por ejemplo, mediante boquillas nebulizadoras o atomizadores ultrasónicos presurizados, o preferiblemente mediante aerosoles medidores impulsados por propelente o administración libre de propelente de polvos micronizados, por ejemplo, cápsulas de inhalación u otros sistemas de administración de "polvo seco" diferentes. Excipientes tales como, por ejemplo, propelentes (por ejemplo, Frigen en el caso de aerosoles medidores), sustancias tensioactivas, emulsionantes, estabilizantes, conservantes, aromatizantes, y sustancias de relleno (por ejemplo, lactosa en el caso de inhaladores de polvo), pueden estar presentes en tales formulaciones inhaladas. Para propósitos de inhalación, se encuentran disponibles una gran cantidad de aparatos con los que pueden generarse y administrarse aerosoles de tamaño de partícula óptimo, utilizando una técnica de inhalación que sea apropiada para el paciente. Además del uso de adaptadores (espaciadores, alargadores) y envases en forma de pera (por ejemplo Nebulator®, Volumatic®), y dispositivos automáticos que emiten una pulverización de inhalador (Autohaler®), para aerosoles medidores, en particular en el caso de inhaladores de polvo, una cantidad de soluciones técnicas se encuentran disponibles (por ejemplo, Diskhaler®, Rotadisk®, Turbohaler® o los inhaladores por ejemplo según se describen en la solicitud de patente europea EP 0 505 321).

Para su aplicación tópica en el ojo, los compuestos médicos pueden convertirse en una solución o suspensión en un vehículo acuoso o no acuoso estéril adecuado. Pueden también incluirse aditivos, por ejemplo tampones tales como metabisulfito de sodio o edeato disódico; conservantes incluyendo agentes bactericidas y fungicidas tales como acetato o nitrato fenilmercurio; cloruro de benzalconio, y agentes espesantes tales como hipromelosa.

- 5 El ingrediente activo puede también administrarse por vía parenteral en un medio estéril. Dependiendo del vehículo y la concentración utilizada, el fármaco puede bien ser suspendido o disuelto en el vehículo. De manera ventajosa, los adyuvantes tales como un anestésico local, conservante y agentes tampón pueden ser disueltos en el vehículo.

Los compuestos médicos de la invención pueden ser utilizados en conjunción con una cantidad de sustancias farmacéuticamente activas conocidas.

10 Ejemplos

- Los siguientes Ejemplos ilustran los principios científicos que sustentan la presente invención. Muchos de los Ejemplos son ejemplos de referencia ya que no implican el enlace de dos fracciones funcionales. Sin embargo, el enlace de una fracción funcional a grupos conectores relevantes para la invención, la escisión de las fracciones funcionales de los mismos, y el enlace de una fracción funcional a través de grupos conectores relevantes para la invención, a otras numerosas fracciones secundarias (incluyendo otras fracciones funcionales), ha sido demostrado de forma exhaustiva. Se demuestra que se tolera bien un gran grado de variación estructural, lo que evidencia la amplia aplicabilidad de la presente invención.

A) Ejemplos preliminares

- 20 Se registraron los espectros ^1H y ^{13}C de RMN a temperatura ambiente en un instrumento Bruker Avance 500 que funcionaba a una frecuencia de 500 MHz para ^1H y 125 MHz para ^{13}C . Para los espectros ^1H de RMN se tomó como referencia la señal de CDCl_3 (7,26 ppm). Para los espectros ^{13}C de RNM se tomó como referencia la señal de CDCl_3 (77,67 ppm).

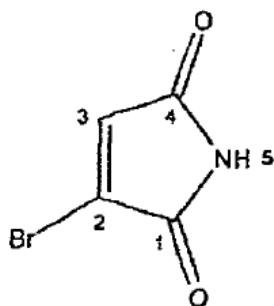
- 25 Los espectros de infra rojo se ejecutaron en un espectrómetro PerkinElmer Spectrum 100 FT-IR que funcionaba en modo ATR con frecuencias dadas en centímetros recíprocos (cm^{-1}). Los espectros de masas y los datos de masa de alta resolución se registraron en un espectrómetro de masas VG70-SE (modo EI y modo CI).

Los puntos de fusión (p.f.) se tomaron en un bloque de calentamiento Gallenkamp y no se corrigen. Las medidas de rotación óptica se realizaron utilizando un polarímetro PerkinElmer 343 con una longitud de célula de 10 cm.

Abreviaturas

- | | |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------|
| Boc | grupo terc-butiloxycarbonilo. |
| 30 Cys | Cisteína |
| Mal | Maleimida |
| DMF | Dimetilformamida |
| TCEP | (tris(2-carboxietil)fosfina) |
| LC-ESI-MS | Espectroscopia de masas con ionización por electrospray de cromatografía líquida |

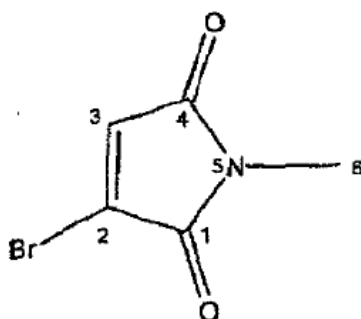
- 35 **Ejemplo de referencia 1: Preparación de bromomaleimida (compuesto 1)**



- 5 A maleimida (2,00 g, 0,02 mol) en cloroformo (15 mL), se añadió bromo (1,16 mL, 0,02 mol) en cloroformo (15 mL) gota a gota. La mezcla de reacción se sometió a reflujo durante 2 horas y se dejó enfriar a temperatura ambiente durante 1 hora. El precipitado sólido de color amarillo se filtró y se lavó con cloroformo frío (2 x 50 mL) para proporcionar cristales de color blanco de 2,3-dibromosuccinimida crudo (4,09 g, 0,016 mol). La succinimida cruda se disolvió en tetrahidrofurano (50 mL) y se añadió trietilamina (2,4 mL, 0,017 mol) en tetrahidrofurano (10 mL) durante 5 minutos a 0 °C. La mezcla de reacción se dejó templar a temperatura ambiente y se agitó durante 48 horas. El sólido se filtró y se lavó con tetrahidrofurano (50 mL) para proporcionar un polvo de color amarillo claro (2,14 g, 0,012 mol) en un rendimiento del 59 %.
- 10 ^1H RMN (500MHz, CDCl_3): δ = 7.67 (br s, 1H, NH), 6.89 (s, 1H, C=CH); ^{13}C RMN (125MHz, CDCl_3): δ = 173.8 (C=O), 170.5 (C=O), 136.9 (-Br)C=C-, 135.4 (-C=CH-); IR (sólido, cm^{-1}): 3235 (s), 1709 (s); MS (CI+) m/z , (%): 178 ($^{81}\text{M}+$, 32), 176 ($^{79}\text{M}+$, 32), 125 (25), 86 (100); Masa calculada para $\text{C}_4\text{H}_3\text{O}_2\text{N}^{79}\text{Br}$: 175.93472. Hallada: 175.93493; p.f. 148 – 151°C.

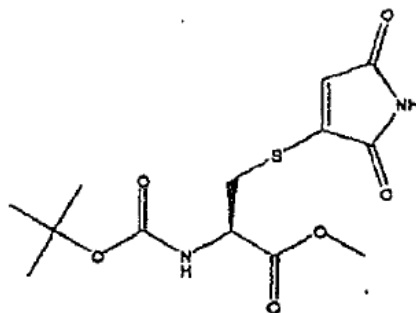
Ejemplo de referencia 2: Preparación de N-metilbromomaleimida (compuesto 2)

15



- 20 A N-metil maleimida (0,5 g, 4,5 mmol) en metanol (22,5 mL), se añadió bromo (0,52 mL, 10 mmol) gota a gota. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. El disolvente se eliminó en vacío y la reacción se disolvió en tetrahidrofurano (20 mL) y se añadió trietilamina (0,8 mL, 5,85 mmol), a continuación se agitó durante 24 horas a temperatura ambiente. El material fue purificado mediante cromatografía flash en gel de sílice (éter de petróleo: acetato de etilo, 7:3) para proporcionar un polvo de color blanco claro (0,761 g, 4,0 mmol) en un rendimiento del 89 %.
- 25 ^1H RMN (500MHz, CDCl_3): δ = 6.90 (s, 1H, C=CH), 3.09 (s, 3H, N- CH_3); ^{13}C RMN (125MHz, CDCl_3): δ = 168.6 (C=O), 165.4 (C=O), 131.9 (-C=CH-), 131.4 ((Br)C=C-), 24.7 (-N- CH_3); IR (sólido, cm^{-1}): 3106 (s), 1708 (s); MS (CI) m/z , (%): 192 ($^{81}\text{M}+$, 99), 190 ($^{79}\text{M}+$, 100); Masa calculada para $\text{C}_5\text{H}_5\text{O}_2\text{N}^{79}\text{Br}$: 189.95037. Hallada: 189.95052; p.f.: 77-79°C

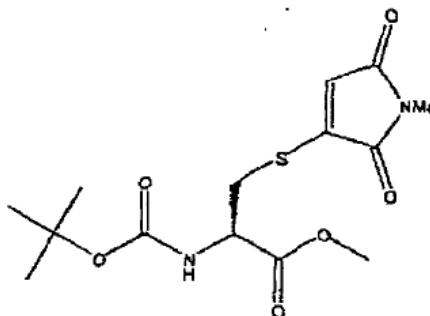
Ejemplo de referencia 3: Preparación de N-Boc-Cys(Mal)-OMe (compuesto 4)



5 A una solución en agitación de N-Boc-Cys-OMe (compuesto 3) (36 mg, 0,153 mmol) y acetato de sodio (13 mg, 0,153 mmol) en metanol (3mL), se añadió bromomaleimida (30 mg, 0,169 mmol) en metanol (3 mL). Después de 1 minuto se eliminó el disolvente en vacío. El material se purificó mediante cromatografía flash en gel de sílice (éter de petróleo: acetato de etilo, gradiente de elución desde 9:1 a 7:3) para proporcionar un polvo de color amarillo claro (51 mg, 0,153 mmol) en un rendimiento del 100 %.

10 ^1H RMN (500MHz, CDCl_3): δ = 7.63 (s, 1H, NH), 6.27 (s, 1H, C=CH), 5.40 (d, 1H, J = 6.8, NH), 4.67 (ddd, 1H, J = 6.8, 5.4 y 5.1, -HN-CH-C(O)-), 3.80 (s, 3H, O-CH₃), 3.48 (dd, 1H, J = 13.8 y 5.1, -S-CHH-), 3.62 (dd, 1H, J = 14.1 y 5.4, -S-CHH-) 1.45 (s, 9H, 3 x CH₃); ^{13}C RMN (125MHz, CDCl_3): δ = 170.2 (C=O), 168.9 (C=O), 167.6 (C=O), 155.2 (C=O), 155.9 (-C=CH-), 119.7 (-C=CH-), 81.1 ((CH₃)CO-), 53.3 (O-CH₃), 52.7 (CH), 34.0 (CH₂), 28.3 (3 x CH₃); IR (sólido, cm^{-1}) 3236 (w), 1715 (s); MS (CI+) m/z , (%): 331 (M+H, 5), 275 (20), 231 (100); Masa calculada para [C₁₃H₁₈O₆N₂S]+H: 331.09638. Hallada: 331.09684; $^{20}\alpha_D$: -41.9° (c = 1.0, Metanol); p.f. 145-147°C.

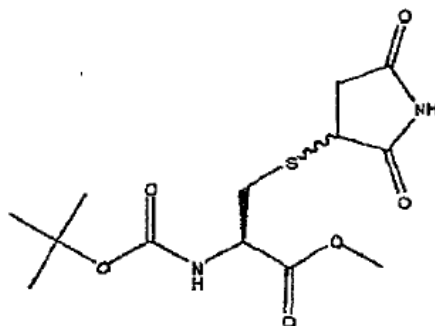
Ejemplo de referencia 4: Preparación de N-Boc-Cys(N-Me-Mal)-OMe (compuesto 5)



15 A una solución en agitación de N-Boc-Cys-OMe (32 mg, 0,136 mmol) en metanol (4 mL), se añadió acetato de sodio (82 mg, 0,408 mmol). A esto se añadió N-metil bromomaleimida (25,8 mg, 0,136 mmol) en metanol (4 mL) durante 10 minutos. La reacción se volvió de color amarillo claro. El disolvente se eliminó en vacío y el residuo se purificó mediante cromatografía flash en gel de sílice (éter de petróleo: acetato de etilo, gradiente de elución desde 9:1 a 7:3) para proporcionar un polvo de color blanco claro (39,3 mg, 0,114 mmol) en un rendimiento del 84 %.

25 ^1H RMN (500MHz, CDCl_3): δ = 6.26 (s, 1H, C=CH), 5.36 (d, 1H, J = 6.3, NH), 4.66 (m, 1H, -HN-CH-), 3.79 (s, 3H, OCH₃), 3.46 (dd, 1H, J = 5.2 y 5.0, -S-CHH-), 3.35 (dd, 1H, J = 13.7 y 5.1, -S-CHH-), 3.00 (s, 3H, N-CH₃), 1.44 (s, 9H, 3 x CH₃); ^{13}C RMN (125MHz, CDCl_3): δ = 170.2 (C=O), 169.5 (C=O), 167.9 (C=O), 155.0 (C=O), 149.9(-C=CH-), 118.7 (-C=CH-), 80.9 ((CH₃)₃CO-), 53.1 (O-CH₃), 52.7 (CH), 33.8 (CH₂), 28.3 (3 x CH₃), 24.1 (-N-CH₃); IR (sólido, cm^{-1}) 3367.8, 2977.1, 1694.7; MS (ES+) m/z , (%): 367(46), 311 (M, 100); Masa calculada para C₁₄H₂₀N₂O₆NaS: 367.0940. Hallada: 367.0931; $^{20}\alpha_D$: -18.55° (c = 1.0, Metanol); p.f. 101-103°C.

Ejemplo de referencia 5: Preparación de N-Boc-Cys(Succ)-OMe (compuesto 6)



5 A una solución en agitación de N-Boc-Cys-OMe (36 mg, 0,153 mmol) en metanol (3 mL) se añadió maleimida (17 mg, 0,169 mmol) en metanol (3 mL). Después de 1 minuto, se eliminó el disolvente *en vacío*. El material fue purificado mediante cromatografía flash en gel de sílice (diclorometano:metanol, gradiente de elución desde 99:1 a 7:3) para proporcionar un aceite incoloro (51 mg, 0,153 mmol) en un rendimiento del 100 % que era una mezcla 1:1 de diastereómeros.

10 ¹H RMN (500MHz, CDCl₃): δ =9.00 (s, 1H, NH), 8.95 (s, 1H, NH), 5.59 (1H, d, J = 7.6, NH), 5.41 (d, 1H, J = 7.6, NH), 4.65 - 4.56 (m, 2H, 2 x -HN-HC-C(O)-) C=CHH), 3.93 (dd, 1H, J = 9.3 y 3.9, CH), 3.86 (dd, 1H, J = 9.2 y 4.2, CH), 3.76 (s, 3H, OCH₃), 3.76 (s, 3H, OCH₃), 3.51 (dd, 1H, J = 13.8 y 4.6, -CHH-), 3.36 (dd, 1H, J = 14.1 y 6.0, -CHH-), 3.19-3.11 (m, 3H, 3 x -CHH-), 2.96 (dd, 1H, J =13.1 y 7.1, -CHH-), 2.54-2.02 (m, 2H, -CHH) 1.43 (s, 18H, 9 x CH₃); ¹³C RMN (125MHz, CDCl₃): δ = 177.2 (C=O), 177.1 (C=O), 175.1 (C=O), 175.0 (C=O), 172.0 (C=O), 171.5 (C=O), 155.5 (C=O), 155.3 (C=O), 80.6(2 x -OCCH₃), 53.6 (CH), 52.91 (OCH₃), 52.85 (OCH₃), 50.8 (CH), 40.6 (CH), 40.0 (CH), 37.3 (CH₂), 37.0 (CH₂), 34.6 (CH₂), 34.1 (CH₂), 28.3 (6 x CH₃); IR (aceite, cm⁻¹) 3233 (w), 2980 (w), 1783 (w), 1709 (s); MS (CI+) m/z, (%): 333 (M+H, 15), 277 (50), 233 (100); Masa calculada para C₁₃H₂₀O₆N₂S: 332.10420. Hallada: 15 332.10475;

Ejemplo de referencia 6: Demostración de que la maleimida no desplaza el tiol de N-Boc-Cys(Mal)-OMe y de que la bromomaleimida no desplaza el tiol de N-Boc-Cys(Succ)-OMe

20 A una solución en agitación de N-Boc-Cys-OMe (36 mg, 0,153 mmol) y acetato de sodio (13 mg, 0,153 mmol) en metanol (3m L), se añadió bromomaleimida (30 mg, 0,169 mmol) en metanol (3 mL). Después de 10 minutos se añadió maleimida (17 mg, 0,169 mmol). Se eliminó el disolvente *en vacío* y el análisis por ¹H RMN mostró únicamente el compuesto **4** y la maleimida sin reaccionar.

25 A una solución en agitación de N-Boc-Cys-OMe (36 mg, 0,153 mmol) y acetato de sodio (13 mg, 0,153 mmol) en metanol (3m L) se añadió maleimida (17 mg, 0,169 mmol) en metanol (3 mL). Después de 10 minutos se añadió bromomaleimida (30 mg, 0,169 mmol). El disolvente se eliminó *en vacío* y el análisis por ¹H RMN mostró únicamente el compuesto **6** y la bromomaleimida sin reaccionar.

Ejemplo de referencia 7: Reacción de competición entre bromomaleimida y maleimida para N-Boc-Cys-OMe

30 A una solución en agitación de N-Boc-Cys-OMe (36 mg, 0,153 mmol) y acetato de sodio (13 mg, 0,153 mmol) en metanol (3m L), se añadió una mezcla de bromomaleimida (30 mg, 0,169 mmol) y maleimida (17 mg, 0,169 mg) en metanol (3 mL). Después de 1 minuto, el disolvente se eliminó *en vacío*. El material fue purificado mediante cromatografía flash en gel de sílice (éter de petróleo: acetato de etilo, gradiente de elución desde 9:1 a 7:3) para proporcionar un polvo de color amarillo claro **4** (36 mg, 0,108 mmol) en un rendimiento del 70% y un aceite incoloro **6** (15 mg, 0,045 mmol) en un rendimiento del 30%.

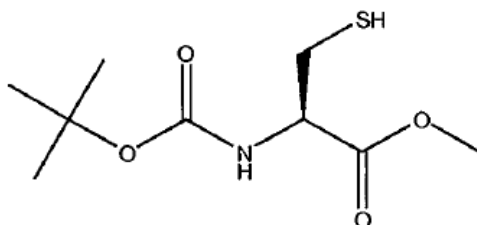
35 El ejemplo de referencia 6 demostró que, una vez unida a una fracción de succinimida o maleimida, la fracción de cisteína no es capaz de separarse en presencia de estos reactivos. El ejemplo de referencia 7, por lo tanto, demuestra que el reactivo de cisteína reacciona más rápidamente con bromomaleimida que con maleimida es decir, la cinética de la reacción es más favorable para la formación del compuesto **4**).

Ejemplo de referencia 8(a): Demostración de la selectividad del reactivo de bromomaleimida para N-Boc-Cys-OMe en comparación con propilamina

40 A una solución en agitación de N-Boc-Cys-OMe (36 mg, 0,153 mmol) y propilamina (10 mL, 0,153 mmol) en metanol (3m L), se añadió bromomaleimida (30 mg, 0,169 mmol) en metanol (3 mL). Después de 1 minuto se eliminó el disolvente *en vacío*. El material fue purificado mediante cromatografía flash en gel de sílice (éter de petróleo: acetato

de etilo, gradiente de elución desde 9:1 a 7:3) para proporcionar un polvo de color amarillo claro (51 mg, 0,153 mmol) en 100%. Los datos coincidieron con los obtenidos anteriormente para N-Boc-Cys(Mal)-OMe **4**.

Ejemplo de referencia 8(b): Escisión de N-Boc-Cys(Mal)-OMe para regenerar N-Boc-Cys-OMe



5

A una solución en agitación de **4** (50 mg, 0,151 mmol) en dimetilformamida (2 mL), se añadieron 20 mL de un tampón acuoso (150 mM NaCl, 100 mM NaH₂PO₄, pH 8,0). Se añadió a la solución tris(2-carboxietil)fosfina (430 mg 1,51 mmol) en 20 mL de un tampón acuoso (150 mM NaCl, 100 mM NaH₂PO₄, pH 8,0). Después de 5 minutos la solución acuosa se extrajo con acetato de etilo (3 x 25 mL), se lavó con una solución de cloruro de litio saturado (5 x 25 mL), agua (25 mL) y salmuera (25 mL) y se secó sobre MgSO₄. El disolvente se eliminó *en vacío* para proporcionar un aceite incoloro (34,5 mg, 0,148 mmol) en un rendimiento del 98%. ¹H y ¹³CRMN de este aceite mostró que éste era el comercialmente disponible N-Boc-cysteine metil-éster **3**.

10

Ejemplo 1: Reacción de 2,3-dibromomaleimida with somatostatina

La somatostatina es una hormona peptídica que se sabe existe en una forma en la que dos residuos de cisteína dentro de la molécula están unidos a través de un puente de disulfuro.

15

1 mg de somatostatina liofilizada (Sigma-Aldrich) fue resolubilizada en 2 ml de 50 mM NaHPO₄⁻, pH 6,2, MeCN al 40 %, DMF al 2,5 %. Se transfirieron 500 µl a un tubo de reacción Eppendorf y se diluyeron en el mismo tampón a una concentración final de 0,25 mg/ml (152,6 µM). Se añadieron 2,0 equivalentes de TCEP (100x de solución madre en 50 mM de NaHPO₄⁻, pH 6,2, MeCN al 40 %) y la reacción fue incubada durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de la reducción del enlace disulfuro bond se añadieron 1,4 equivalentes de 2,3-dibromomaleimida (Sigma-Aldrich, 100x de solución madre en 50 mM de NaHPO₄⁻, pH 6,2, MeCN al 40 %, DMF al 2,5 % DMF), la solución se mezcló suavemente y se incubó durante 12 h más a 4 °C.

20

La somatostatina unida por un puente de maleimida se detectó mediante LC-ESI-MS (ES+/ES-). Los controles incluían un péptido no tratado y somatostatina tratada con 2,3-dibromomaleimida o TCEP únicamente. La reducción completa fue detectada mediante la reacción del péptido tratado con TCEP con la maleimida (Sigma-Aldrich, 100x de solución madre en 50 mM NaHPO₄⁻, pH 6,2, MeCN al 40 %, DMF al 2,5 %).

25

Datos Experimentales

Somatostatina no tratada: [ES+] 1638.04 (m/z 1), 819.82 (m/z 2), 546.95 (m/z 3). Somatostatina unida por un puente de maleimida: [ES+] 1734.14 Da (m/z 1), 867.40 Da (m/z 2), 578.73 (m/z 3).

Ejemplo de referencia 9: Expresión de GrB2-dominio SH2 L111C

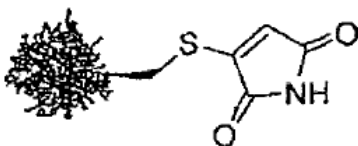
30



La proteína GrB2-dominio SH2 L111C fue utilizada como una proteína modelo. Esta proteína modelo contiene un único residuo de cisteína.

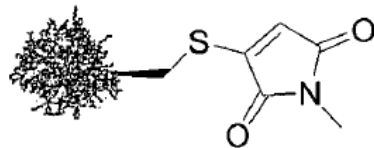
- Se realizó LC-MS en una columna Acquity uPLC (del inglés "Ultra Performance Liquid Chromatography", cromatografía líquida de ultra rendimiento) de Waters, conectada a un Detector Acquity Single Quad (detector de un solo cuadrupolo) de Waters (SQD). Columna: Acquity uPLC BEH C18 1,7mm 2,1 x 50 mm. Longitud de onda: 254 nm. Fase móvil: 95:5 agua (0,1% Ácido fórmico): MeCN (Ácido fórmico al 0,1%) Gradiente durante 4 min (a 5:95 Agua (Ácido fórmico al 0,1%): MeCN (Ácido fórmico al 0,1 %). Tasa de flujo: 0,6 mL/min. Modo de MS: ES+. Rango de escaneo: m/z = 85-2000. Tiempo de escaneo: 0,25 sec. Datos obtenidos en modo continuo. La fuente de electrospray de la MS operaba con voltaje del capilar de 3,5 kV y un voltaje del cono de 50 V. El nitrógeno se utilizó como el nebulizador y gas de desolvatación a un flujo total de 600 L/h. Los espectros de masas totales fueron reconstruidos a partir de la serie de iones utilizando el algoritmo MaxEnt 1 pre-instalado en el software MassLynx.
- La proteína modelo fue sobre-expresada en E. coli, y la proteína marcada con hexa-His- fue purificada utilizando tanto cromatografía de afinidad a Ni y cromatografía de exclusión por tamaño, mediante técnicas estándar. Un análisis utilizando LC-MS mostró una única especie de proteína de masa 14169 que se corresponde con la proteína deseada.
- A una solución de la proteína modelo (100 mL, [Proteína] 2,0 mg/mL, 100 mM de fosfato de sodio, 150 mM NaCl, pH 8,0) a 0°C, se añadió un reactivo de Ellman (5 µL, 282 mM de solución en H₂O) a 0°C. La mezcla se vortizó durante 1 s y se mantuvo a 0°C durante 10 minutos, después de lo cual la mezcla se analizó mediante LC-MS. El análisis mostró que una reacción única había ocurrido produciendo un único producto con una masa de 14366, mostrando que C111 estaba disponible para su funcionalización.

Ejemplo de referencia 10: Reacción de GrB2-dominio SH2 L111C con bromomaleimida

- 20
- 
- A una solución de proteína modelo (100 µL, [Proteína] 2,0 mg/mL, 100 mM de fosfato de sodio, 150 mM NaCl, pH 8,0) a 0 °C, se añadió bromomaleimida (5 µL, 2,82 mM de solución en DMF). La mezcla se vortizó durante 1 s y a continuación se mantuvo a 0 °C durante 1 h. El análisis utilizando LC-MS mostró una única especie de proteína de masa 14265 que se corresponde con la proteína deseada.

La mezcla fue tratada con reactivo de Ellman (5 µL, 282 mM de solución en H₂O) a 0 °C. La mezcla se vortizó durante 1 s y se mantuvo a 0 °C durante 10 minutos después de lo cual la mezcla fue analizada mediante LC-MS. El análisis mostró que no se manifestó ninguna reacción con el reactivo de Ellman, lo que puso de relieve que había tenido lugar la funcionalización de la bromomaleimida en C111.

- 30 **Ejemplo de referencia 11(a):** Reacción de GrB2-dominio SH2 L111C con N-metilbromomaleimida

- 35
- 
- A una solución de la proteína modelo (100 µL, [Proteína] 2,0 mg/mL, 100 mM de fosfato de sodio, 150 mM NaCl, pH 8,0) a 0 °C se añadió N-metilbromomaleimida (5 µL, 2,82 mM de solución en DMF). La mezcla se vortizó durante 1 s y a continuación se mantuvo a 0 °C durante 1 h. El análisis utilizando LC-MS mostró una única especie de proteína de masa 14278 que se corresponde con la proteína deseada.

La mezcla fue tratada con un reactivo de Ellman (5 µL, 282 mM de solución en H₂O) a 0 °C. La mezcla se vortizó durante 1 s y se mantuvo a 00 °C durante 10 minutos después de lo cual la mezcla fue analizada mediante LC-MS.

El análisis mostró que no se manifestó ninguna reacción con el reactivo de Ellman, lo que puso de relieve que había tenido lugar la funcionalización de la N-metilbromomaleimida en C 111.

Ejemplo de referencia 11(b): escisión reductora mediada por fosfina del aducto de GrB2-dominio SH2 L111C / Bromomaleimida

5



10 A una solución de proteína modelo (100 μ L, [Proteína] 2,0 mg/mL, 100 mM de fosfato de sodio, 150 mM de NaCl, pH 8,0) a 0 $^{\circ}$ C, se añadió bromomaleimida (5 μ L, 2,82 mM de solución en DMF). La mezcla se vortizó durante 1 s a continuación se mantuvo a 0 $^{\circ}$ C durante 1 h. El análisis utilizando LC-MS mostró una única especie de proteína de masa 14265 que se corresponde con el aducto de proteína / bromomaleimida.

15 La mezcla fue tratada con TCEP.HCl (5 μ L, 282 mM de solución en H_2O) a 0 $^{\circ}$ C. La mezcla se vortizó durante 1 s y se mantuvo a 0 $^{\circ}$ C durante 3 h después de lo cual la mezcla fue analizada mediante LC-MS. El análisis mostró que el aducto de proteína / bromomaleimida había sido escindido limpiamente produciendo la GrB2-dominio SH2 L111C (masa = 14168) en un rendimiento del 85%. El material restante fue un aducto de proteína / bromomaleimida sin reaccionar.

Ejemplo de referencia 11(c): escisión reductora mediada por fosfina del aducto de GrB2-dominio SH2 L111C / N-metilbromomaleimida

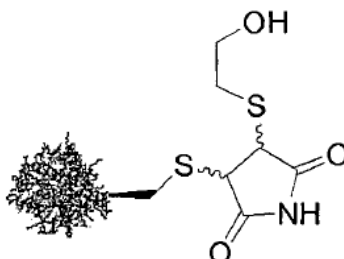


20 A una solución de proteína modelo (100 μ L, [Proteína] 2,0 mg/mL, 100 mM de fosfato de sodio, 150 mM sw NaCl, pH 8,0) a 0 $^{\circ}$ C, se añadió N-metilbromomaleimida (5 μ L, 2,82 mM de solución en DMF). La mezcla se vortizó durante 1 s y a continuación se mantuvo a 0 $^{\circ}$ C durante 1 h. El análisis utilizando LC-MS mostró una única especie de proteína de masa 14278 que se corresponde con el aducto de proteína / N-metilbromomaleimida.

25 La mezcla fue tratada con TCEP.HCl (5 μ L, 282 mM de solución en H_2O) a 0 $^{\circ}$ C. La mezcla se vortizó durante 1 s y se mantuvo a 0 $^{\circ}$ C durante 3 h, después de lo cual la mezcla se analizó mediante LC-MS. El análisis mostró que el aducto de proteína / N-metilbromomaleimida había sido escindido limpiamente produciendo GrB2-dominio SH2 L111C (masa = 14168) en un rendimiento del 85%. El material restante era aducto de proteína / N-metilbromomaleimida sin reaccionar.

Ejemplo de referencia 11(d): Síntesis del aducto GrB2-dominio SH2 L111C / bromomaleimida / 2-Mercaptoetanol

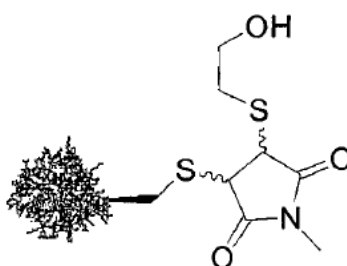
30



A una solución de proteína modelo (100 μ L, [Proteína] 2,0 mg/mL, 100 mM de fosfato de sodio, 150 mM de NaCl, pH 8,0) a 0°C, se añadió bromomaleimida (5 μ L, 2,82 mM de solución en DMF). La mezcla se vortizó durante 1 s y a continuación se mantuvo a 0°C durante 1 h. El análisis utilizando LC-MS mostró una única especie de proteína de masa 14265 que corresponde al aducto proteína / bromomaleimida.

- 5 La mezcla fue tratada con 2-mercaptoetanol (5 μ L, 2,82 mM de solución en H₂O) a 0°C. La mezcla se vortizó durante 1 s y se mantuvo a 0°C durante 3 h, después de lo cual la mezcla fue analizada mediante LC-MS. El análisis mostró que el aducto de proteína / bromomaleimida / 2-mercaptoetanol se había formado (masa = 14339) en un rendimiento del 55%. El material restante fue GrB2-dominio SH2 L111C.

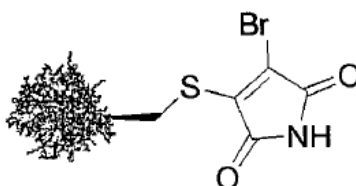
10 **Ejemplo de referencia 11(e): Síntesis del aducto de GrB2-dominio SH2 L111C / N-Metilbromomaleimida / 2-Mercaptoetanol**



- 15 A una solución de proteína modelo (100 μ L, [Proteína] 2,0 mg/mL, 100 mM de fosfato de sodio, 150 mM de NaCl, pH 8,0) a 0°C, se añadió N-metilbromomaleimida (5 μ L, 2,82 mM de solución en DMF). La mezcla se vortizó durante 1 s y a continuación se mantuvo a 0 °C durante 1 h. El análisis utilizando LC-MS mostró una única especie de proteína de masa 14278 que se corresponde con el aducto de proteína / N-metilbromomaleimida.

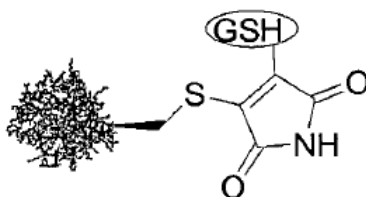
- 20 La mezcla fue tratada con 2-mercaptoetanol (5 μ L, 2,82 mM de solución en H₂O) a 0 °C. La mezcla se vortizó durante 1 s y se mantuvo a 0 °C durante 3 h, después de lo cual la mezcla se analizó mediante LC-MS. El análisis mostró que el aducto de proteína / N-metilbromomaleimida / 2-mercaptoetanol se había formado (masa = 14356) en un rendimiento del 61%. El material restante fue GrB2-dominio SH2 L111C.

Ejemplo de referencia 12(a): Síntesis del aducto de GrB2-dominio SH2 L111C / Dibromomaleimida



- 25 A una solución de proteína modelo (100 μ L, [Proteína] 2,0 mg/mL, 100 mM de fosfato de sodio, 150 mM de NaCl, pH 8,0) a 0°C, se añadió dibromomaleimida (5 μ L, 2,82 mM de solución en DMF). La mezcla se vortizó durante 1 s y a continuación se mantuvo a 0°C durante 4 h. El análisis usando LC-MS mostró una especie de proteína única de masa 14346 que se corresponde con el aducto proteína / dibromomaleimida.

Ejemplo de referencia 12(b): Síntesis del aducto de GrB2-dominio SH2 L111C / Dibromomaleimida / Glutación



5 A una solución de proteína modelo (100 μ L, [Proteína] 2,0 mg/mL, 100 mM de fosfato de sodio, 150 mM de NaCl, pH 8,0) a 0°C, se añadió dibromomaleimida (5 μ L, 2,82 mM de solución en DMF). La mezcla se vortizó durante 1 s y a continuación se mantuvo a 0°C durante 4 h. El análisis usando LC-MS mostró una especie de proteína única de masa 14346 que se corresponde con el aducto proteína / dibromomaleimida.

La mezcla fue tratada con glutatión (5 μ L, 2,82 mM de solución en H₂O) a 0 °C. La mezcla se vortizó durante 1 s y se mantuvo a 0 °C durante 2 h, después de lo cual la mezcla se analizó mediante LC-MS. El análisis mostró que el aducto de proteína / dibromomaleimida / glutatión fue la única especie de proteína presente (masa = 14572).

10 **Ejemplo de referencia 12(c): Escisión mediada por glutatión del aducto de GrB2-dominio SH2 L111C / Dibromomaleimida / Glutatión en una concentración de glutatión fisiológicamente relevante (5 mM)**



15 A una solución de proteína modelo (100 μ L, [Proteína] 2,0 mg/mL, 100 mM de fosfato de sodio, 150 mM de NaCl, pH 8,0) a 0°C, se añadió dibromomaleimida (5 μ L, 2,82 mM de solución en DMF). La mezcla se vortizó durante 1 s y a continuación se mantuvo a 0°C durante 4 h. El análisis utilizando LC-MS mostró una especie de proteína única de masa 14346 que se corresponde con el aducto proteína / dibromomaleimida.

La mezcla fue tratada con glutatión (5 μ L, 2,82 mM de solución en H₂O) a 0 °C. La mezcla se vortizó durante 1 s y se mantuvo a 0 °C durante 2 h, después de lo cual la mezcla se analizó mediante LC-MS. El análisis mostró que el aducto de proteína / dibromomaleimida / glutatión fue la única especie de proteína presente (masa = 14572).

20 La mezcla fue tratada con glutatión (solución de 5 μ L, de 100 mM en H₂O) a 0 °C. La mezcla se vortizó durante 1 s y se mantuvo a 0 °C durante 4 h, después de lo cual la mezcla se analizó mediante LC-MS. El análisis mostró que la GrB2-dominio SH2 L111C fue la única especie de proteína presente (masa = 14173).

B) EJEMPLOS ADICIONALES

Procedimientos generales

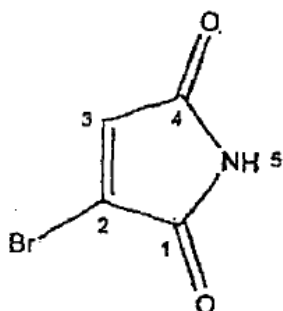
25 Los espectros ¹H y ¹³C de la RMN se registraron a temperatura ambiente en un instrumento Bruker Avance 500 funcionando a una frecuencia de 500 MHz para ¹H y 125 MHz para ¹³C. Para los espectros ¹H de RMN se tomó como referencia la señal de CDCl₃ (7,26 ppm). Para los espectros ¹³C de RNM se tomó como referencia la señal de CDCl₃ (77,67 ppm). Los espectros en infra-rojo se ejecutaron en un espectrómetro PerkinElmer Spectrum 100 FT-IR funcionando en modo ATR con frecuencias proporcionadas en centímetros recíprocos (cm⁻¹). Los espectros de masas y los datos de masas de alta resolución para pequeñas moléculas fueron registrados en un espectrómetro de masas VG70-SE (modo EI y modo CI). Los puntos de fusión se tomaron en un bloque de calentamiento Gallenkamp y no se corrigen. Se adquirió 3,4-Dibromomaleimida, somatostatina liofilizada, PEG5000, TCEP y bencenoselenol de Sigma-Aldrich y se utilizaron sin purificación adicional.

Espectrometría de masas de proteínas y péptidos

35 Se realizó la LC-MS en muestras de proteínas utilizando una columna Acquity uPLC de Waters conectada a un detector Acquity Single Quad de Waters (SQD). Columna: Acquity uPLC BEH C18 1,7 μ m 2,1 x 50 mm. Longitud de onda: 254 nm. Fase móvil: 95:5 Agua (ácido fórmico al 0,1 %): MeCN (Ácido Fórmico al 0,1 %) Gradiente durante 4 min (a 5:95 Agua (Ácido fórmico al 0,1%): MeCN (Ácido fórmico al 0,1%). Tasa de flujo: 0,6 mL/min. Modo de MS:

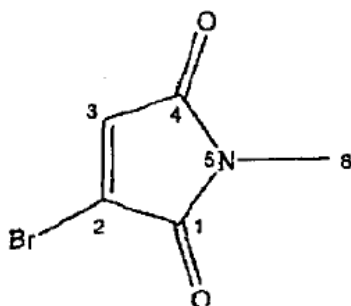
ES+. Rango de escaneo: $m/z = 85-2000$. Tiempo de escaneo: 0,25 sec. Datos obtenidos en modo continuo. La fuente de electrospray de la MS operaba con voltaje del capilar de 3,5 kV y un voltaje del cono de 50 V. El nitrógeno se utilizó como el nebulizador y gas de desolvatación a un flujo total de 600 L/h. Los espectros de masas totales fueron reconstruidos a partir de la serie de iones utilizando el algoritmo MaxEnt 1 pre-instalado en el software MassLynx. Se realizó un análisis MALDI-TOF en un MALDI micro MX (Micromasa). Los datos fueron obtenidos en un reflectrón o espejo de iones en modo de ión positivo, con un voltaje de la fuente de 12 kV y un voltaje del reflectrón de 5 kV a una longitud de onda del láser de 337 nm. Las muestras se prepararon tal como se explican más adelante, y las que contenían péptido fueron dializadas durante 24 h en H₂O desionizada. El péptido y sus derivados (0,1-0,3 mg/ml) se colocaron en una placa de MALDI en 2 ml de ácido sinapínico (10 mg/ml) después de la pre-colocación de ácido de trifluoroacético (10 mg/ml). Se utilizó ACTH (10 ng/ml) para la calibración de masas.

Ejemplo de referencia 13:-Preparación de bromomaleimida



A maleimida (2,00 g, 0,02 mol) en cloroformo (15 mL) se añadió bromo (1,16 mL, 0,02 mol) gota a gota en cloroformo (15 mL). La mezcla de reacción se sometió a reflujo durante 2 horas y se dejó enfriar a temperatura ambiente durante 1 hora. El precipitado sólido de color amarillo se filtró y se lavó con cloroformo frío (2 x 50 mL) para proporcionar cristales blancos de 2,3-dibromosuccinimida cruda (4,09 g, 0,016 mol). La succinimida cruda se disolvió en tetrahidrofurano (50 mL) y trietilamina 2,4 mL, 0,017 mol) en tetrahidrofurano (10 mL) se añadió durante 5 minutos a 0°C. La mezcla de reacción se dejó templar a temperatura ambiente y se agitó durante 48 horas. El sólido se filtró y se lavó con tetrahidrofurano (50 mL). La purificación mediante cromatografía flash (acetato de etilo al 5% en éter de petróleo) proporcionó el compuesto deseado en forma de un polvo de color amarillo claro (2,14 g, 0,012 mol) en un rendimiento del 59%. δ_H (500 MHz, CDCl₃) 7.67 (br s, 1H, NH), 6.89 (s, 1H, H-3); δ_C (125 MHz, CDCl₃) 173.8 (C=O), 170.5 (C=O), 136.9 (C2), 135.4 (C3); IR (sólido, cm⁻¹) 3235 (s), 1709 (s); MS (Cl⁺) m/z , (intensidad relativa): 178 ([⁸¹M+H], 32), 176 ([⁷⁹M+H], 32), 125 (25), 86 (100); Masa calculada para [C₄H₂O₂N⁷⁹Br]+H: 175.9347 Hallada 175.9349 (Cl⁺); p.f. 148 - 151°C; UV (Acetonitrilo) $\epsilon_{242} = 13800$ and $\epsilon_{276} = 1700$ cm⁻¹M⁻¹d³.

Ejemplo de referencia 14: Preparación de N-Metilbromomaleimida

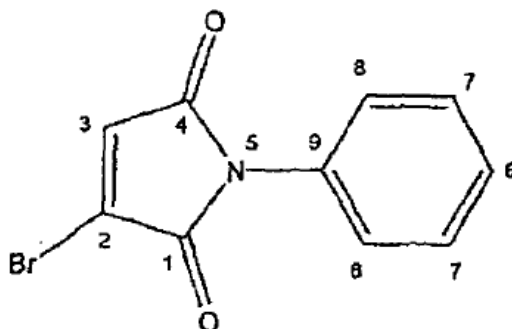


A N-metilmaleimida (0,5 g, 4,5 mmol) en metanol (10 mL) se añadió bromo (232 μ L, 4,5 mmol) gota a gota en metanol (5 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 12 horas. El disolvente se eliminó *en vacío* y se disolvió en tetrahidrofurano (20 mL). Se añadió trietilamina (815 μ L, 5,9 mmol) en tetrahidrofurano (5 mL) durante 5 minutos, después de lo cual se formó un precipitado. La mezcla de reacción se agitó durante 24 horas. El sólido se filtró y se lavó con tetrahidrofurano (50 mL). La purificación mediante cromatografía flash (acetato de etilo al 10% en éter de petróleo) proporcionó el compuesto deseado en forma de un polvo de color amarillo claro

(563 mg, 2,96 mmol) en un rendimiento del 66%. δ_H (500 MHz, $CDCl_3$) 6.90 (s, 1H, H-3), 3.09 (s, 3H, H₃-6); δ_C (125 MHz, $CDCl_3$) 168.6 (C=O), 165.4 (C=O), 131.9 (C3), 131.4 (C2), 24.7 (C6); IR (sólido, cm^{-1}) 3106 (s), 1708 (s); MS (Cl⁺) m/z , (intensidad relativa): 192 ([⁸¹M+H], 99), 190 ([⁷⁹M+H], 100); masa exacta calculada para $[C_5H_4O_2N^{79}Br]+H$ requiere 189.9504 Hallada 189.9505 (Cl⁺); p.f.: 77-79°C; UV (Acetonitrilo) $\epsilon_{209} = 17100$, $\epsilon_{238} = 13200$, $\epsilon_{299} = 290$ $cm^{-1}M^{-1}d^3$.

5

Ejemplo de referencia 15: Preparación de *N*-Fenilbromomaleimida

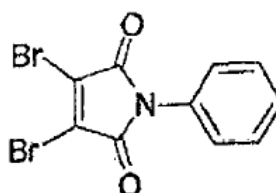


A *N*-fenilmaleimida (2 g, 11,50 mmol) en cloroformo (15 mL), se añadió bromo (0,65 mL, 12,70 mmol) gota a gota en cloroformo (5 mL). La mezcla de reacción se sometió a reflujo durante 1 hora, y a continuación se dejó enfriar a temperatura ambiente. El precipitado se filtró y se lavó con cloroformo (50 mL). Este sólido (2,70g, 8,10 mmol) se disolvió en tetrahidrofurano (50 mL) y a éste se añadió gota a gota una solución de trietilamina (1,2 mL, 8,9 mmol) en tetrahidrofurano (10 mL) a 0 °C, y la mezcla de reacción se agitó durante 2 horas. La mezcla se dejó templar a temperatura ambiente y el disolvente se eliminó *en vacío*. El residuo se disolvió en acetato de etilo y se lavó con H₂O (50 mL), salmuera (50 mL) y se secó (Na₂SO₄). El disolvente se eliminó *en vacío* para proporcionar el compuesto deseado en forma de un sólido de color amarillo claro (1,80 g, 7,14 mmol) en un rendimiento del 62%. Literatura coincidente con los datos: Sahoo et al., Synthesis, 2003, 346

10

15

Ejemplo de referencia 16: Preparación de *N*-fenildibromomaleimida

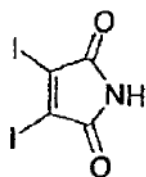


20

25

Se añadió anilina (72 μ L, 0,788 mmol) a una solución de anhídrido dibromomaleico (200 mg, 0,788 mmol) en AcOH (10 mL). La mezcla se agitó durante 3 h a T_a y a 130°C durante 90 minutos. Después de enfriarla, la mezcla se concentró hasta secarla, y las trazas de AcOH se eliminaron mediante mezcla azeotrópica con tolueno. El residuo de color marrón fue purificado utilizando cromatografía flash de sílice (5% EtOAc/95% éter de petróleo) para producir el compuesto deseado en forma de un sólido de color amarillo claro (166 mg, 60%). δ_H (600 MHz, $CDCl_3$) 7.48 (m, 2H, ArH), 7.41 (tt, 1H, J = 7.4 and 1.1 Hz, ArH), 7.33 (m, 2H, ArH); δ_C (150 MHz, $CDCl_3$) 163.0, 131.0, 130.0, 129.5, 128.8, 126.2.

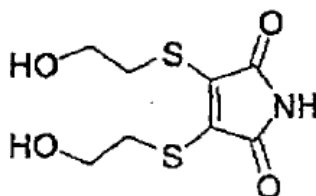
Ejemplo de referencia 17: Preparación de 3,4-Diiodo-pirrol-2,5-diona



5 A dibromomaleimida (500,0 mg, 2,0 mmol) en ácido acético (50 ml) se añadió yoduro de sodio (886,5 mg, 5,9 mmol). La mezcla de reacción se calentó a 120 °C y se sometió a reflujo durante 2 h. La reacción se dejó enfriar a T_a, se añadió H₂O (50 ml) y se mantuvo a 4 °C durante 15 h. El precipitado se filtró y se secó al aire para proporcionar el compuesto deseado en forma de un polvo cristalino de color naranja (415 mg, 60 %). ¹H RMN (500MHz, MeOD): sin señales; ¹³C RMN (125MHz, MeOD): δ = 169.3 (C), 119.5 (C); IR (sólido, cm⁻¹): 3244(s), 2944 (m), 2833(m); MS (EI) m/z, (%): 349 (M, 83), 179 (100); Masa calculada para C₄H₁₂O₂N: 348.80912. Hallada: 348.81026. p.f. 238-241°C (Literatura: 254-255 °C).

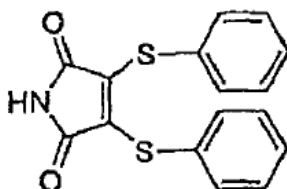
Ejemplo de referencia 18: Preparación de 3,4-Bis-(2-hidroxi-etilsulfanil)-pirrol-2,5-diona

10



15 A 2-mercaptoetanol (683,8 μl, 9,8 mmol) en un tampón (100 ml, 150 mM de NaCl, 100 mM de fosfato de sodio, pH 8,0, DMF al 5,0 %) se añadió di-bromomaleimida (1g, 3,9 mmol) en DMF (2,5 ml, concentración final de DMF 7,5 %). La mezcla de reacción se agitó durante 30 min a T_a y se añadió cloruro de litio (20 g). La mezcla de reacción acuosa se extrajo con acetato de etilo (7 x 150 ml). Las capas orgánicas se combinaron, el disolvente se eliminó *en vacío* y el material residual fue purificado mediante cromatografía flash en gel de sílice (éter de petróleo : acetato de etilo, gradiente de elución desde 1 : 1 a 1 : 9). Las fracciones que contienen el producto se recogieron y el disolvente se eliminó *en vacío*. El producto aún impuro fue purificado mediante cromatografía flash en gel de sílice (metanol : diclorometano, gradiente de elución de 0,5 – 10,0 % de metanol) para proporcionar el compuesto deseado en forma de un sólido de color amarillo (518 mg, 53 %). λ_{max} (50 mM de fosfato de sodio, pH 6,2, MeCN al 40 %, DMF al 2,5 %)/318 nm (ε/dm³ mol⁻³ cm⁻¹ 1855); ¹H RMN (500MHz, MeOD): δ = 3.74 (t, 4H, J = 5.4, 2x HO-CH₂), 3.41 (t, 4H, J = 6.3, 2x S-CH₂) ¹³C RMN (125MHz, MeOD): δ = 168.5 (C), 137.2 (C), 62.3 (CH₂), 34.4 (CH₂); IR (sólido, cm⁻¹): 3344 (s), 2500 (m), 2078 (w); MS (EI) m/z, (%): 250 (M, 43), 232 (100), 161 (37); Masa calculada para C₈H₁₁O₄NS₂: 250.02077. Hallada: 250.02126; p.f. 46-50 °C.

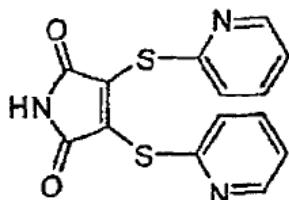
25 **Ejemplo de referencia 19:** Preparación de 3,4-Bis-fenilsulfanil-pirrol-2,5-diona



30 A dibromomaleimida (80,0 mg, 0,3 mmol) y bicarbonato de sodio (130,2 mg, 1,6 mmol) en metanol (6 ml) se añadió lentamente bencenotiol (66,6 μl, 0,7 mmol) en metanol (1 ml). La mezcla de reacción se agitó durante 15 min a T_a. El disolvente se eliminó *en vacío* y el material residual se purificó mediante cromatografía flash en gel de sílice (éter de petróleo: acetato de etilo, gradiente de elución desde 9:1 a 7:3) para proporcionar el producto deseado en forma de cristales de color amarillo brillante (73 mg, 75 %). λ_{max} (50 mM de fosfato de sodio, pH 6,2, MeCN al 40 %, DMF al 2,5 %)/ 412 nm (ε/ dm³ mol⁻¹ cm⁻¹ 2245); ¹H RMN (500MHz, MeOD): δ = 7.27-7.22 (m, 6H, Ar-H), 7.16-7.14 (m, 4H, Ar-H); ¹³C RMN (125MHz, MeOD): δ = 169.3 (C), 137.6 (C), 135.4 (C), 132.4 (CH), 130.1 (CH), 129.1 (CH); IR

(sólido, cm^{-1}): 3285 (m), 3059 (w), 2924 (w), 1774 (m), 1715 (s); MS (CI) m/z , (%): 314 (M+H, 100), 206 (13), 111 (12); Masa calculada para $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{O}_2\text{NS}_2[\text{+H}]$: 314.0231. Hallada: 314.0309; p.f. 102-104 °C (Literatura: 123-126 °C).

Ejemplo de referencia 20: Preparación de 3,4-Bis-(piridin-2-ilsulfanil)-pirrol-2,5-diona



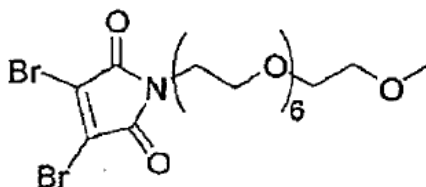
5

A dibromomaleimida (300,0 mg, 1,2 mmol) y acetato de sodio (480,0 mg, 5,9 mmol) en metanol (15 ml) se añadió lentamente 1*H*-piridin-2-tiona (275,8 mg, 2,5 mmol) en metanol (4 ml). La reacción se agitó durante 15 min a T_a . El disolvente fue eliminado *en vacío* y el material residual fue purificado mediante cromatografía flash en gel de sílice (metanol: diclorometano, gradiente de elución de 0,5 – 3,0 %) para proporcionar el producto deseado en forma de un polvo de color amarillo oscuro (190 mg, 51 %). λ_{max} (50 mM de fosfato de sodio, pH 6,2, MeCN al 40 %, DMF al 2,5 %)/395 nm ($\epsilon/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 3508); ^1H RMN (500MHz, MeOD): δ = 8.37 (d, 2H, J = 3.8, 2x N-CH), 7.70 (t, 2H, J = 6.9, 2x C-CH-CH), 7.38 (d, 2H, J = 7.9, 2x C-CH), 7.26 (t, 2H, J = 6.5, 2x N-CH-CH); ^{13}C RMN (125MHz, MeOD): δ = 168.5 (C), 154.7 (C), 150.9 (CH), 140.0 (C), 139.0 (CH), 126.8 (CH), 123.7 (CH); IR (sólido, cm^{-1}): 2926 (m), 2734 (w), 1771 (w), 1726 (s), 1619 (m); MS (CI) m/z , (%): 316 (M+H, 5), 152 (10), 126 (34), 112 (100); Masa calculada para $\text{C}_{14}\text{H}_9\text{O}_2\text{N}_3\text{S}_2[\text{+H}]$: 316.0214. Hallada: 316.0223.; p.f. 70-72 °C.

10

15

Ejemplo de referencia 21: Preparación de N-PEG300 dibromomaleimida



20

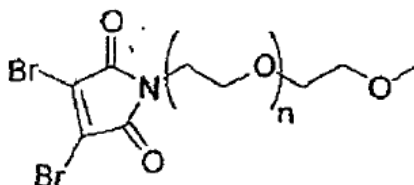
25

30

La reacción se realizó bajo condiciones estrictamente secas. A trifenilfosfina (193,9 mg, 0,7 mmol) en THF (5 mL) se añadió gota a gota diisopropil azodicarboxilato (145,6 μl , 0,7 mmol) a -78 °C. La reacción se agitó durante 5 min y se añadió PEG300 (200,0 mg, 0,6 mmol) en THF (4 mL) gota a gota. La reacción se agitó durante 5 min y se añadió alcohol neopentílico (45,8 mg, 0,5 mmol) en THF (1 ml). La reacción se agitó durante 5 min y se añadió 3,4-dibromomaleimida (189,4 mg, 0,7 mmol) en THF (2 ml). La reacción se agitó durante 10 min, el baño frío se eliminó y se agitó durante 20 h a temperatura ambiente. El disolvente se eliminó *en vacío* y el material residual fue purificado mediante cromatografía flash en gel de sílice (metanol : diclorometano, gradiente de elución desde 0,5-5,0 % metanol). Las fracciones que contienen el producto fueron recogidas y el disolvente se eliminó *en vacío*. El producto aún impuro fue purificado mediante cromatografía flash en gel de sílice (éter de petróleo: acetato de etilo, gradiente de elución desde 7:3 a 2:8) para proporcionar el compuesto deseado en forma de un aceite amarillo (137 mg, 40 %) con 97,5 % de pureza. ^1H RMN (500MHz, CDCl_3): δ = 3.76 (t, 2H, J = 5.6, NCH_2), 3.64-3.52 (m, 24H, 12x $\text{CH}_2\text{-O}$), 3.49 (t, 2H, J = 4.4, $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2$), 3.32 (s, 3H, O-CH_3); ^{13}C RMN (125MHz, CDCl_3): δ = 163.8 (2x C), 129.5 (2x C), 72.0 (CH_2), 70.7-70.5 (9x CH_2), 70.1 (2x CH_2), 67.5 (CH_2), 59.1 (CH_3), 39.0 (CH_2); IR (sólido, cm^{-1}): 3496 (w), 2869 (m), 1786 (m), 1720 (s), 1594 (m); MS (CI) m/z , (%): 580 ($^{81}\text{M}+\text{H}$, 12), 578 ($^{81,79}\text{M}+\text{H}$, 23), 576 ($^{79}\text{M}+\text{H}$, 12), 279 (100), 84 (61); Masa calculada para $\text{C}_{19}\text{H}_{31}^{79}\text{Br}_2\text{O}_9\text{N}[\text{+H}]$: 576.0444. Hallada: 576.0437.

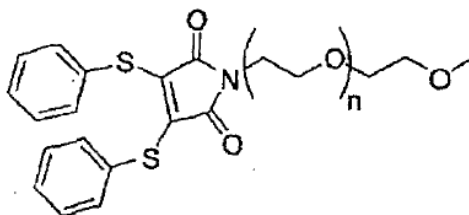
Ejemplo de referencia 22: Preparación de N-PEG5000 dibromomaleimida

35



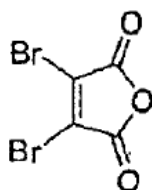
La reacción se realizó bajo condiciones estrictamente secas. A trietilfosfina (154,6 mg, 0,6 mmol) en una mezcla de THF (8 mL) y DCM (3 mL), se añadió gota a gota diisopropil azodicarboxilato (116,0 μ l, 0,6 mmol) a -78 °C. La reacción se agitó durante 5 min y se añadió PEG5000 (2950,0 mg, 0,6 mmol) en diclorometano (7 mL) gota a gota. La reacción se agitó durante 5 min y se añadió alcohol neopentílico (26,5 mg, 0,3 mmol) en una mezcla de THF (1 ml) y DCM (1 ml). La reacción se agitó durante 5 min y se añadió 3,4-dibromomaleimida (150,0 mg, 0,6 mmol) en THF (2 ml). La reacción se agitó durante 5 min, el baño frío se eliminó y se agitó durante 20 h a temperatura ambiente. El disolvente se eliminó *en vacío* y el material residual fue purificado mediante cromatografía flash en gel de sílice (metanol : diclorometano, gradiente de elución desde 0,5-5,0 % metanol). Las fracciones que contienen el producto fueron recogidas y el disolvente se eliminó *en vacío*. El producto aún impuro fue purificado mediante cromatografía flash en gel de sílice muy lenta (metanol: diclorometano, gradiente de elución desde 0,5-6,0%) para proporcionar el compuesto deseado en forma de un polvo cristalino de color verde claro (417 mg, 13 %). ^1H RMN (500MHz, CDCl_3): δ = 3.58 (s, 4x n H, CH_2); ^{13}C RMN (125MHz, CDCl_3): δ = 163.8 (C), 129.5 (C), 70.6 (CH_2); IR (sólido, cm^{-1}): 3517 (w), 2872 (s), 1977 (w), 1727 (m), 1641 (w); p.f. 51-55°C.

15 **Ejemplo de referencia 23:** Preparación de N-PEG5000 ditiofenolmaleimida



La reacción se realizó bajo condiciones estrictamente secas. A trietilfosfina (167,7 mg, 0,6 mmol) en una mezcla de THF (8 ml) y DCM (3 mL), se añadió gota a gota diisopropil azodicarboxilato (125,9 μ l, 0,6 mmol) a -78 °C. La reacción se agitó durante 5 min y se añadió PEG5000 (1600,0 mg, 0,3 mmol) en DCM (7 ml) gota a gota. La reacción se agitó durante 5 min y se añadió alcohol neopentílico (56,3 mg, 0,6 mmol) en una mezcla de THF (1 ml) y DCM (1 ml). La reacción se agitó durante 5 min y se añadió 3,4-dibromomaleimida (200,0 mg, 0,6 mmol) en THF (3 ml). La reacción se agitó durante 5 min, el baño frío se eliminó y se agitó durante 20 h a temperatura ambiente. El disolvente se eliminó *en vacío* y el material residual fue purificado mediante cromatografía flash en gel de sílice (metanol : diclorometano, gradiente de elución desde 0,5-10,0 % metanol). Las fracciones que contienen el producto fueron recogidas y el disolvente se eliminó *en vacío*. El producto aún impuro fue purificado mediante cromatografía sobre gel de sílice para TLC (metanol): diclorometano, gradiente de elución desde 0,0-10,0% metanol) para proporcionar el compuesto deseado en forma de un polvo cristalino de color amarillo brillante (1,24 g, 73%). ^1H RMN (500MHz, CDCl_3): δ = 7.26 (dd, H, J = 7.7, J = 4.5, CH), 7.23 (dd, 2H, J = 8.4, J = 6.6, CH), 7.19 (dd, 2H, J = 8.4, J = 6.8, CH), 3.63 (s, 4x n H, CH_2); ^{13}C RMN (125MHz, CDCl_3): δ = 166.7 (C), 135.7 (C), 131.9 (CH), 129.1 (C), 129.0 (CH), 128.4 (CH), 70.6 (CH_2); IR (sólido, cm^{-1}): 3498 (w), 2881 (s), 1959 (w), 1711 (m); p.f. 57-59 °C.

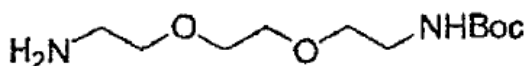
Ejemplo de referencia 24: Preparación de anhídrido 2,3-dibromo-maleico



Bajo una atmosfera inerte, una solución de anhídrido maleico (1,50 g, 15,3 mmol, 1 eq), tricloruro de aluminio (300 mg, 0,21 mmol, cat.) y bromo (4,95 g, 30,6 mmol, 2 eq) se calentó a 160 °C en una ampolla sellada (*nota – protección contra explosión*) durante 16 h. Tras enfriarla a 21 °C, la mezcla de reacción se agitó durante 24 horas más y se abrió al aire cuidadosamente. Se añadió EtOAc y el sólido se filtró y se lavó repetidamente con EtOAc adicional. El filtrado se concentró finalmente *en vacío* para proporcionar el compuesto del título, que resultó un sólido de color amarillo que se utilizó sin purificación adicional (3,05 g, 11,9 mmol), rendimiento del 78%). P.f. 107-110 °C; ¹³C RMN (150 MHz, CD₃OD) δ 163.33 (s), 125.28 (s); IR (MeOH) 1769, 1706, 1590 cm⁻¹; HRMS (CI) calculada para C₄O₃Br₂ [M]⁺ 253.82087, observado 253.82082.

Ejemplo de referencia 25: Preparación de *terc*-Butil *N*-(2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etil)carbamato

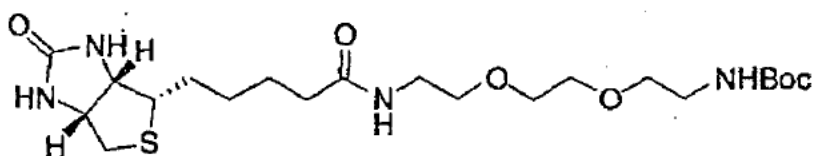
10



Se añadió una solución de di-*terc*-butil-dicarbonato (1,10 g, 5,00 mmol, 1 eq) en CH₂Cl₂ (5 mL) gota a gota a una solución de 2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]etanamina (7,32 mL, 50,0 mmol, 10 eq) en CH₂Cl₂ (15 mL). La mezcla de reacción resultante se agitó a 21 °C durante 24 h. El CH₂Cl₂ se eliminó a continuación *en vacío* para dejar un residuo incoloro. La adición de EtOAc (125 mL) originó la formación de un precipitado de color blanco, que se lavó con una solución saturada de Na₂CO₃ (3 x 50 mL), se secó sobre MgSO₄, y se concentró *en vacío*. La purificación adicional mediante cromatografía en columna (8:2 CH₂Cl₂/Me-OH) proporcionó la amina mono-protégida deseada en forma de un aceite incoloro (0,69 g, 2,80 mmol, rendimiento de un 56%). ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 5.27 (bs, 1H, NH), 3.54-3.52 (m, 4H, OCH₂), 3.47-3.42 (m, 4H, OCH₂), 3.23-3.22 (m, 2H, NCH₂), 2.80 (t, J = 5.0, 2H, NCH₂), 2.05 (bs, 2H, NH), 1.35 (s, 9H, CH₃); ¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ 156.08 (s), 79.09 (s), 73.19 (t), 70.21 (t), 70.16 (t), 41.59 (t), 40.32 (t), 28.40 (q), *1 t falta; IR (neto) 3344, 2869, 1692 cm⁻¹; HRMS (CI) calculado para C₁₁H₂₅N₂O₄ [M + H]⁺ 249.18143, observado 249.18251.

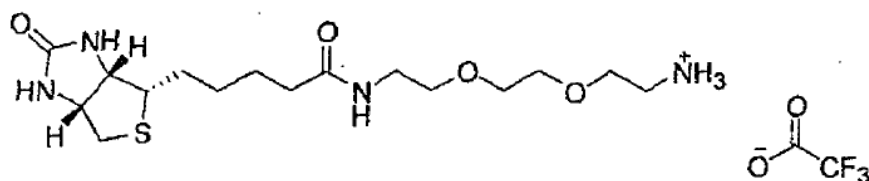
Ejemplo de referencia 26: Preparación de *terc*-Butil-*N*-(2-(2-(2-(5-(2-oxo-1,3,3a,4,6,6a-hexahidrotieno(3,4-d)imidazol-6-il)pentanoilamino)etoxi)etoxi)etil)carbamato

25



Se agitó una solución de biotina (0,59 g, 2,42 mmol, 1,5 eq), HBTU (0,79 g, 2,10 mmol, 1,3 eq) y DIEA (0,45 mL, 2,60 mmol, 1,6 eq) en DMF (15 mL) durante 20 min a 21 °C antes de ser añadida gota a gota a una solución de *terc*-butyl-*N*-(2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etil)carbamato (400 mg, 1,61 mmol, 1 eq) en DMF (10 mL). La mezcla de reacción se agitó durante 2 h a 21 °C, después de lo cual el DMF se eliminó *en vacío* para proporcionar un residuo de color amarillo. El producto crudo fue purificado mediante cromatografía en columna (gradiente 2-10% MeOH/CH₂Cl₂) para producir el compuesto deseado en forma de un sólido de color blanco (0,61 g, 1,29 mmol, rendimiento de un 80%). P.f. 106-108 °C; [α]_D^{20.0} +23.0 (c 0.6, CH₂Cl₂); ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 4.55 (dd, J = 5.0, 7.5 Hz, 1H, NHC(O)NHCH), 4.36 (dd, J = 5.0, 7.5 Hz, 1H, NHC(O)NHCH), 3.62 (bs, 6H, OCH₂), 3.59-3.55 (m, 2H, OCH₂), 3.46 (m, 2H, NCH₂), 3.31 (m, 2H, NCH₂), 3.17 (dt, 3.0, 5.0 Hz, 1H, SCH), 2.92 (dd, J = 5.0, 13.0 Hz, 1H, SCHH), 2.79 (d, J = 13.0 Hz, 1H, SCHH), 2.27 (t, J = 7.0 Hz, 2H, NHC(O)CH₂CH₂CH₂), 1.71 (m, 4H, NHC(O)CH₂CH₂CH₂CH₂), 1.47 (br, 11H, C(CH₃)₃ & NHC(O)CH₂CH₂CH₂CH₂); ¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ 173.69 (s), 163.92 (s), 155.99 (s), 79.14 (s), 70.03 (t), 69.69 (br t), 61.58 (d), 60.06 (d), 55.19 (d), 40.16 (t), 39.96 (t), 38.91 (t), 35.44 (t), 28.09 (q), 27.80 (t), 27.67 (t), 25.23 (t), * 2 t ausente; IR (neto) 33 07, 2933, 1691 cm⁻¹; HRMS (ES) calculado para C₂₁H₃₈N₄O₆NaS [M+Na]⁺ 497.2410, observado 497.2423.

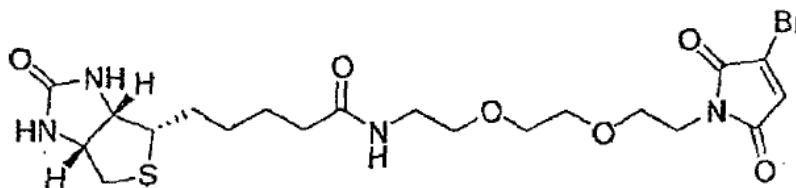
Ejemplo de referencia 27: Preparación de 2-(2-(2-(5-(2-oxo-1,3,3a,4,6,6a-hexahidrotieno(3,4-d)imidazol-6-il)pentanoilamino)etoxi)etoxi)etilammonio: 2,2,2-trifluoroacetato



Se agitó una solución de *tert*-butil *N*-(2-(2-(2-(5-(2-oxo-1,3,3a,4,6,6a-hexahidrotieno(3,4-d)imidazol-6-il)pentanoilamino)etoxi)etoxi)etil)carbamato)etilammonio (0,61 g, 1,29 mmol) en CH₂Cl₂ (5 mL) y TFA (5 mL) a 21 °C durante 24 h. A continuación se añadió tolueno (x2) y el disolvente se eliminó *en vacío* para producir el compuesto deseado en forma de un aceite (0,63 g, 1,29 mmol, rendimiento del 100%). [α]_D^{20.0} +41.0 (c 0.49, MeOH); ¹H RMN (400 MHz, CD₃OD) δ 4.53 (dd, J = 5.0, 7.5 Hz, 1H, NHC(O)NHCH), 4.33 (dd, J = 5.0, 7.5 Hz, 1H, NHC(O)NHCH), 3.71 (t, J = 5.0 Hz, 2H, OCH₂CH₂NH₃), 3.65 (br, 4H, OCH₂), 3.57 (t, J = 5.0 Hz, 2H, OCH₂), 3.38 (t, J = 5.0 Hz, 2H, OCH₂), 3.22 (dt, J = 5.0, 8.5 Hz, 1H, SCH), 3.13 (t, J = 5.0 Hz, 2H, C(O)NHCH₂CH₂O), 2.94 (dd, J = 5.0, 13.0 Hz, 1H, SCHH), 2.74 (d, J = 13.0 Hz, 1H, SCHH), 2.24 (t, J = 7.5 Hz, 2H, NHC(O)CH₂CH₂CH₂), 1.76-1.43 (m, 6H, NHC(O)CH₂CH₂CH₂CH₂); ¹³C RMN (100 MHz, CD₃OD) δ 174.98 (s), 164.76 (s), 69.92 (t), 69.83 (t), 69.22 (t), 66.46 (t), 62.08 (d), 60.36 (d), 55.59 (d), 39.65 (t), 39.24 (t), 38.77 (t), 35.29 (t), 28.29 (t), 28.06 (t), 25.44 (t); IR (MeOH) 3300, 2941, 1686 cm⁻¹; HRMS (ES) calculada para C₁₆H₃₁N₄O₄S [M+H]⁺ 375.2066, observado 375.2060.

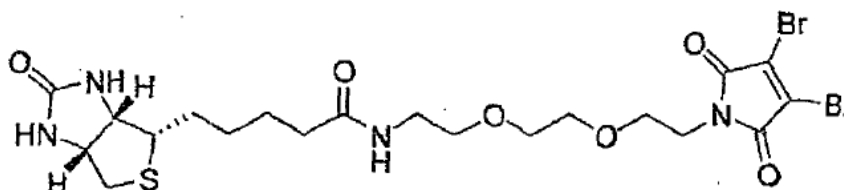
Ejemplo de referencia 28: Preparación de *N*-(2-(2-(2-(3-bromo-2,5-dioxo-pirrol-1-il)etoxi)etoxi)etil)-5-(2-oxo-1,3,3a,4,6,6a-hexahidrotieno(3,4-d)imidazol-6-il)pentanamida

15



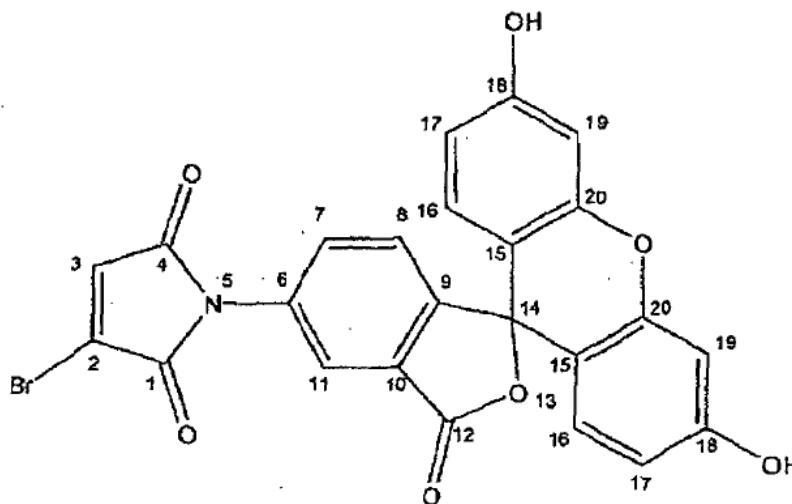
Se añadió anhídrido monobromomaleico (45,0 mg, 0,25 mmol, 1 eq) en una parte a una solución de 2-(2-(2-(5-(2-oxo-1,3,3a,4,6,6a-hexahidrotieno(3,4-d)imidazol-6-il)pentanoilamino)etoxi)etoxi)etilammonio 2,2,2-trifluoroacetato (124 mg, 0,25 mmol, 1 eq) en AcOH (10 mL) y la mezcla de reacción se calentó a 170 °C durante 3 h. Tras enfriarla a 21 °C, se añadió tolueno y el AcOH se eliminó por mezcla azeotrópica *en vacío* (x2) para proporcionar el producto crudo. La cromatografía en columna (gradiente 2-10% MeOH/CH₂Cl₂) produjo el compuesto deseado en forma de un sólido de color blanco (70,0 mg, 0,13 mmol, rendimiento del 52%). P.f. 95-98 °C; [α]_D^{20.0} +65.1 (c 0.15, MeOH); ¹H RMN (600 MHz, CD₃OD) δ 7.17 (s, 1H, CHCBr), 4.51 (dd, J = 5.0, 8.0 Hz, 1H, NHC(O)NHCH), 4.33 (dd, J = 5.0, 8.0 Hz, 1H, NHC(O)NHCH), 3.77 (t, J = 5.5 Hz, 2H, OCH₂), 3.68 (t, J = 5.5 Hz, 2H, OCH₂), 3.63 (m, 2H, OCH₂), 3.58 (m, 2H, OCH₂), 3.53 (t, J = 5.5 Hz, 2H, NCH₂), 3.37 (t, J = 5.5 Hz, 2H, NCH₂), 3.24 (td, J = 5.0, 8.0 Hz, 1H, SCH), 2.95 (dd, J = 5.0, 12.5 Hz, 1H, SCHH), 2.73 (d, J = 12.5 Hz, 1H, SCHH), 2.26 (t, J = 7.0 Hz, 2H, NHC(O)CH₂CH₂CH₂), 1.69 (m, 4H, CH₂CH₂CH₂), 1.47 (quinteto, J = 7.0 Hz, 2H, CH₂CH₂CH₂); ¹³C RMN (150 MHz, CD₃OD) δ 176.12 (s), 170.13 (s), 166.97 (s), 166.08 (s), 133.63 (s), 132.05 (d), 71.22 (t), 71.11 (t), 70.61 (t), 68.69 (t), 63.35 (d), 61.61 (d), 57.03 (d), 41.09 (t), 40.31 (t), 39.09 (t), 36.75 (t), 29.78 (t), 29.50 (t), 26.87 (t); IR (MeOH) 3355, 2970, 1737 cm⁻¹; HRMS (ES) calculado para C₂₀H₂₉N₄O₆NaSBr [M+Na]⁺ 555.0889, observado 555.0905.

Ejemplo de referencia 29: Preparación de *N*-(2-(2-(2-(3,4-dibromo-2,5-dioxo-pirrol-1-il)etoxi)etoxi)etil)-5-(2-oxo-1,3,3a,4,6,6a-hexahidrotieno(3,4-d)imidazol-6-il)pentanamida



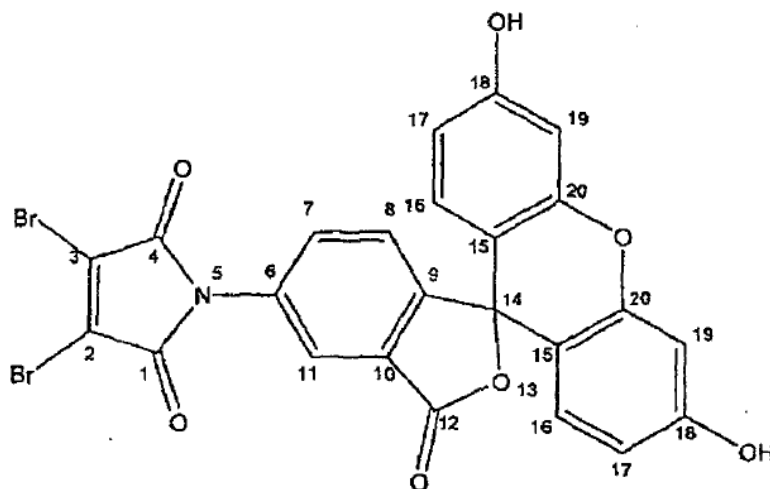
Se añadió anhídrido dibromomaleico (108 mg, 0,42 mmol, 1 eq) en una parte a una solución de 2-(2-(2-(5-(2-oxo-1,3,3a,4,6,6a-hexahidrotieno(3,4-d)imidazol-6-il)pentanoilamino)etoxi)etoxi)etilamonio 2,2,2-trifluoroacetato (205 mg, 0,42 mmol, 1 eq) en AcOH (10 mL) y la mezcla de reacción se calentó a 170 °C durante 2 h. tras enfriarla a 21 °C, se añadió tolueno y el AcOH se eliminó por mezcla azeotrópica *en vacío* (x2) para proporcionar un producto crudo. La cromatografía en columna (gradiente 2-7% MeOH/CH₂Cl₂) produjo el compuesto deseado en forma de un sólido de color blanco (123 mg, 0,20 mmol, rendimiento del 48%). P.f. 100-102 °C; [α]_D^{20.0} +71.0 (c 0.15, MeOH); ¹H RMN (600 MHz, CD₃OD) δ 4.53 (dd, J = 5.0, 8.0 Hz, 1H, NHC(O)NHCH), 4.34 (dd, J = 5.0, 8.0 Hz, 1H, NHC(O)NHCH), 3.82 (t, J = 5.5 Hz, 2H, OCH₂), 3.70 (t, J = 5.5 Hz, 2H, OCH₂), 3.63 (m, 2H, OCH₂), 3.59 (m, 2H, OCH₂), 3.53 (t, J = 5.5 Hz, 2H, NCH₂), 3.37 (t, J = 5.5 Hz, 2H, NCH₂), 3.24 (dt, J = 5.0, 8.0 Hz, 1H, SCH), 2.96 (dd, J = 5.0, 13.0 Hz, 1H, SCHH), 2.73 (d, J = 13.0 Hz, 1H, SCHH), 2.26 (t, J = 7.5 Hz, 2H, NHC(O)CH₂CH₂CH₂), 1.74 (m, 4H, CH₂CH₂CH₂), 1.49 (quinteto, J = 7.5 Hz, 2H, CH₂CH₂CH₂); ¹³C RMN (150 MHz, CD₃OD) δ 174.83 (s), 164.71 (s), 164.06 (s), 129.00 (s), 69.80 (t), 69.72 (t), 69.24 (t), 67.19 (t), 61.97 (d), 60.22 (d), 55.64 (d), 39.67 (t), 39.03 (t), 38.56 (t), 35.42 (t), 28.39 (t), 28.11 (t), 25.47 (t); IR (MeOH) 2970, 1724, 1365, 1217 cm⁻¹; HRMS (ES) calculado para C₂₀H₂₈N₄O₆NaSBr₂ [M+Na]⁺ 631.9916, observado 631.9937.

15 **Ejemplo de referencia 30:** Preparación de *N*-Fluoresceína bromomaleimida



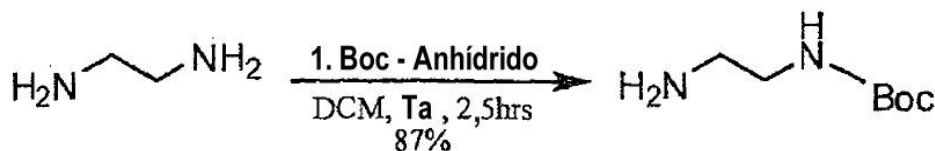
Se añadió anhídrido dibromomaleico (346 mg, 1,95 mmol) en una parte a una solución de fluoresceinamina isómero 1 (678 mg, 1,95 mmol) en ácido acético (65 mL) y la mezcla de reacción se agitó durante 12 horas a temperatura ambiente en un tubo sellado. La mezcla de reacción se calentó a continuación a 150°C durante 3 h. Tras enfriarla a temperatura ambiente el sólido se filtró y se secó (azeótropo de tolueno) para proporcionar el compuesto deseado en forma de un sólido de color naranja (722 mg, 1,43 mmol, rendimiento del 73%). ¹H RMN (600 MHz, DMSO) δ 7.99 (d, 1H, J = 1.7, 1H, H-11), 7.77 (dd, 1H, J = 1.9 y 8.2, 1H, H-7), 7.73 (s, 1H, H-3), 7.43 (d, J = 8.2, 1H, H-8), 6.69 (m, 6H, 2 x H-16, 2 x H-17, 2 x H-18); ¹³C RMN (175 MHz, DMSO) δ 167.93 (C=O), 167.63 (C=O), 164.48 (C=O), 159.62 (2 x C18), 151.79 (2 x C20), 151.52 (C6), 133.68 (C7), 133.02 (Ar), 132.90 (C3), 131.23(C), 129.15 (2 x Ar-H), 126.73 (C), 124.82 (C11), 122.29 (C8), 112.77 (2 x Ar-H), 109.08 (2 x Ar), 102.30 (2 x Ar-H), 83.36 (C14); IR (sólido, cm-1) 3064 (w), 1726 (s); MS (ES+) *m/z*, (intensidad relativa): 508 ([⁸¹M], 95), 506([⁷⁹M], 100); Masa exacta calculada para [C₂₄H₁₃O₇N⁷⁹Br] requiere 505.9875 Hallada 505.9833 (ES+).

30 **Ejemplo de referencia 31:** Preparación de *N*-Fluoresceína dibromomaleimida



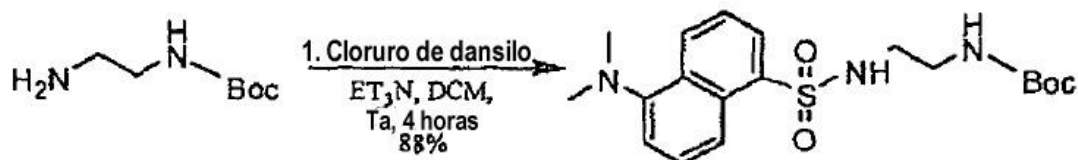
Se añadió anhídrido dibromomaleico (77,0 mg, 0,30 mmol) en un parte a una solución de fluoresceinamina isómero 1 (105 mg, 0,30 mmol) en ácido acético (10 mL) y la mezcla de reacción se agitó durante 6 h a temperatura ambiente. El sólido se filtró a continuación, se lavó con acetato de etilo, y se redisolvió en ácido acético (10 mL). La mezcla de reacción se añadió entonces a reflujo durante 3 h. Tras enfriarla a temperatura ambiente, se añadió tolueno (10 ml) y se eliminó el disolvente *en vacío*, proporcionando el compuesto deseado en forma de un sólido de color naranja (148 mg, 0,25 mmol, rendimiento del 84%). δ ^1H RMN (400 MHz, CD_3OD) δ 8.07 (d, 1H, $J = 1.5$, H-11), 7.81 (dd, 1H, $J = 1.5$ y 8.0, H-7), 7.34 (d, 1H, $J = 8.5$, H-8), 6.71-6.58 (m, 6H, 6 x Ar-H); ^{13}C RMN (100 MHz, CD_3OD) δ 170.23 (C=O), 164.34 (2 x C=O), 161.63 (2 x C), 154.18 (2 x C), 152.93 (C), 134.59 (C), 134.19 (Ar-H), 131.01 (C), 130.35 (Ar-H), 129.25 (2 x C), 126.25 (2 x Ar-H), 123.63 (Ar-H), 113.84 (2 x Ar-H), 111.02 (2 x C), 103.55 (2 x Ar-H); IR (sólido, cm^{-1}) 3064 (w), 1732 (s); MS (ES+) m/z , (intensidad relativa): 586 ($[\text{M}^{81+81}]$, 30), 584 ($[\text{M}^{79+81}]$, 100), 582 ($[\text{M}^{79+79}]$, 100); Masa exacta calculada para $[\text{C}_{24}\text{H}_{10}\text{O}_7\text{N}^{79}\text{Br}_2]$ requiere 581.8824 Hallada 581.8824 (ES+).

Ejemplo de referencia 32: Preparación de terc-butil 2-aminoetilcarbamato



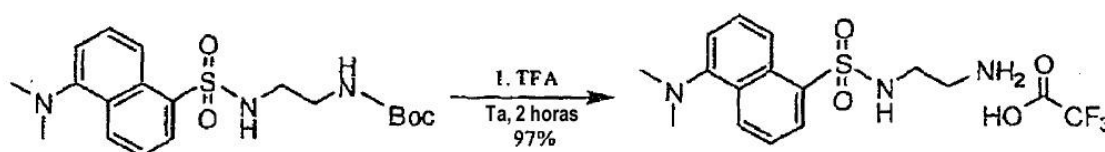
Se añadió di-terc-butildicarbonato (3,26g, 15mmol, 1eq en DCM (30 mL), gota a gota, a una solución de etilendiamina (10ml, 150mmol, 10eq) en DCM (30 mL) bajo atmósfera de argón durante dos horas utilizando un autoinyector. En base a un análisis de TLC (eluyente: 90% de EtOAc;10% de MeOH Rf(8)= 0,23) la reacción logró completarse 30 minutos después del final de la adición. El DCM se eliminó bajo presión reducida utilizando un sistema Büchi. El residuo resultante se recuperó en EtOAc (40 mL) y se lavó con Na_2CO_3 saturado (3 x 20 mL), se secó sobre MgSO_4 , y se concentró en vacío para obtener el producto deseado (2,08g; 12,98 mmol, 87%) en forma de una espuma blanca. Pf. (104-106°C), δ_{H} ^1H RMN (300MHz CDCl_3): 4.95 (singlete ancho, 1H, NH), 3.12(q, $J=6.4\text{Hz}$, 2H, CH_2), 2.78(t, $J=5.9\text{Hz}$, 2H, CH_2), 1.42(s, 9H, 3 CH_3). ^{13}C RMN (CDCl_3): 28.06, 41.51, 43.02, 78.82, 155.9 IR: 3354.9 cm^{-1} , $[\text{M} + \text{H}]^+$: 161.00

Ejemplo de referencia 33: Preparación de terc-butil 2-(5-(dimetilamino)naftaleno-1-sulfonamido)etilcarbamato



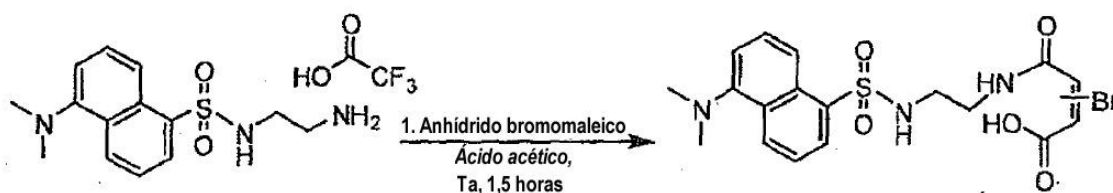
Un matraz se secó con llama y se equipó con una barra de agitación y una solución de amina (0,57g, 3,6mmol, 1 eq) en DCM seco (150 mL) bajo una atmósfera de argón. Cloruro de dansilo (1,05g, 3,92mmol, 1,1eq) en DCM seco (150 mL) y trietilamina (1,3ml), 9,29mmol, 2,5eq) se añadieron a través de un septum en una parte. La reacción fue monitorizada mediante TLC (eluyente: EtOAc al 35%: éter de petróleo al 65% Rf(9)= 0,27, verde fluorescente bajo UV largo), la reacción se completó después de 4 horas. A continuación de la purificación mediante cromatografía en columna (eluyente: EtOAc al 35%: éter de petróleo al 65%), se formó el compuesto deseado (1,24g, 3,15mmol, 88%) en forma de un aceite pegajoso y transparente. δ_{H} ^1H RMN (CDCl₃): 8.55(d, J=8.55Hz, 1H, CH), 8.46(d, J=8.51Hz, 1H, CH), 8.33(d, J=8.67Hz, 1H, CH), 7.57(m, 2H, 2xCH), 7.26(d, J=7.08Hz, 1H, CH), 3.07(cuarteto, J=6,8Hz, 2H, CH₂), 2.89(m, 2H, CH₂), 2.85(s, 6H, 2xCH₃), 1.35(s, 9H, 3xCH₃). ^{13}C NMR (CDCl₃): 158.01, 153.05, 136.5, 131.49, 131.09, 130.02, 129.54, 124.48, 120.59, 116.41, 80.41, 45.9, 43.81, 41.5, 28.5. MS: [M+H]⁺:393.16.

Ejemplo de referencia 34: Preparación de 5-(3-aminopropilsulfonil)-N,N-dimetilnaftaleno-1-amina 2,2,2-trifluoroacetato



A un matraz que contenía BOC-carbamato (1,24g, 3,15mmol), se añadió TFA (40ml) en una parte. La solución gris resultante se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente (ca. 25°C). Tras completarse, la solución se concentró en vacío y se formó una mezcla azeotrópica con tolueno (5 x 10ml). El producto crudo resultante se purificó mediante cromatografía en columna (eluyente: EtOAc 1 : 2 éter de petróleo Rf(10) = 0,20). Después de concentrar las fracciones relevantes en vacío, al aceite de color amarillo que se obtuvo se añadió DCM (100ml) y la solución se colocó en un baño de hielo durante 2 horas, esta solución era fluorescente bajo UV de onda larga. El compuesto deseado (1,25g, 3,10mmol, 97%) se extrajo de la solución como un sólido de color blanco y se filtró y se lavó con éter dietílico bajo gravedad. P.f. (114-116°C); δ_{H} ^1H RMN (500MHz MeOD): 8.64(d, J=8.3Hz, 1H, CH), 8.35(d, J=8.45Hz, 1H, CH), 8.32(d, J=8.65Hz, 1H, CH), 7.67(m, 2H, 2xCH), 7.34(d, J=7.3Hz, 1H, CH), 3.03(cuarteto, 4H, 2 xCH₂), 2.84(s, 6H, 2 x CH₃). δ_{C} ^{13}C RMN (500 MHz MeOD): 153.41, 135.78, 131.69, 131.32, 130.81, 130.56, 129.48, 124.29, 120.07, 116.635, 66.91, 45.79, 41.27, 40.78, 15.45. ^{19}F RMN(300 MHz CDCl₃); -76.89; IR: 3092cm⁻¹, 2901.5cm⁻¹, MS: [M + H]⁺: 294

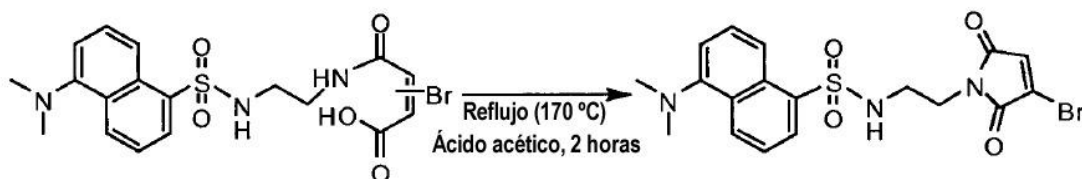
Ejemplo de referencia 35: Preparación de ácido (E)-2-bromo-4-(2-(5-(dimetilamino)naftaleno-1-sulfonamido)etilamino)-4-oxo-but-2-enoico



Un matraz de fondo redondo de 500 ml secado en horno, se equipó con una barra de agitación. Una sal de amina (1,09g,) se disolvió en 25ml de ácido acético y se añadió al matraz. A la solución de color amarillo claro resultante, se añadió anhídrido Bromomaleico y la reacción se monitorizó mediante TLC (eluyente; metanol al 10%: EtOAc al 90%, Rf(11) = 0,7). Después de 1,5 horas de agitación a temperatura ambiente (25°C) el ácido acético se eliminó en vacío. El compuesto deseado se utilizó sin purificación adicional. ^1H RMN (500Mz CDCl₃ (Crudo)): δ_{H} 8.6(d, J=8.56Hz, 1H, CH), 8.35(d, 1H, J=8.27Hz, CH), 8.22(d, 1H, J=8.57Hz, CH), 7.64(m, 2H, 2 x CH), 7.30(d, J=7.60Hz, 1H, CH), 5.48(s, 1H, CH)/5.03(s, 1H, CH), 3.00(m, 4H, 2x CH₂), 2.88(s, 9H, 2 x CH₃)

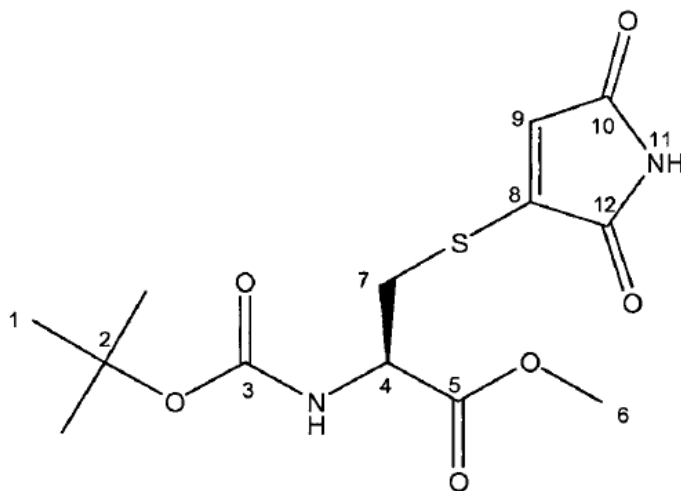
Ejemplo de referencia 36: Preparación de N-(2-(3-bromo-2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etil)-5-(dimetilamino)naphthaleno-1-sulfonamida

40



El ácido se disolvió en ácido acético (25 mL) y se cargó en un matraz de fondo redondo. Se acopló un condensador (o refrigerante) y la reacción se colocó bajo reflujo (170°C) durante 2 horas. El ácido acético se eliminó a continuación de la mezcla cruda en vacío y con el aceite resultante se formó una mezcla azeotrópica con tolueno (5 x 10ml). El aceite resultante fue purificado mediante cromatografía en columna (eluyente: acetato de etilo al 30%: éter de petróleo al 70%, Rf(2) = 0,2 en el sistema eluyente anterior). Una vez que se completó la columna muy lenta, la fracción más móvil se recogió y el disolvente se eliminó. El aceite de color marrón resultante se dejó puesto en acetato de etilo puro (50ml) durante 1 hora en un baño de hielo. El producto deseado (0,961g, 80%) se extrajo de la solución como un sólido de color marrón (con una textura similar al polvo), éste fue filtrado bajo gravedad y se lavó con éter dietílico (20ml). P.f. (166-170°C); ^1H RMN (600 MHz DMSO): δ_{H} 8.53(d, J=8.46Hz, 1H, CH), 8.21(d, 1H, J=8.40Hz, CH), 8.17(d, 1H, J=8.58Hz, CH), 7.56(m, 2H, 2 x CH), 7.18(d, J=7.50Hz, 1H, CH), 6.46 (s, 1H, maleimida-olefina C-H), 5.11(t, J=6.24, 1H, NH), 3.56(m, 2H, CH₂), 3.2(m, 2H, CH₂), 3.91(s, 6H, 2 xCH₃). $\delta_{\text{C}}^{13}\text{C}$ RMN (600 MHz DMSO): 168.62, 165.33, 151.38, 151.38, 135.62, 132.33, 130.13, 129.60, 129.09, 128.85, 128.30, 127.96, 123.61, 118.99, 115.22, 45.11, 40.05, 39.37, 38.47.

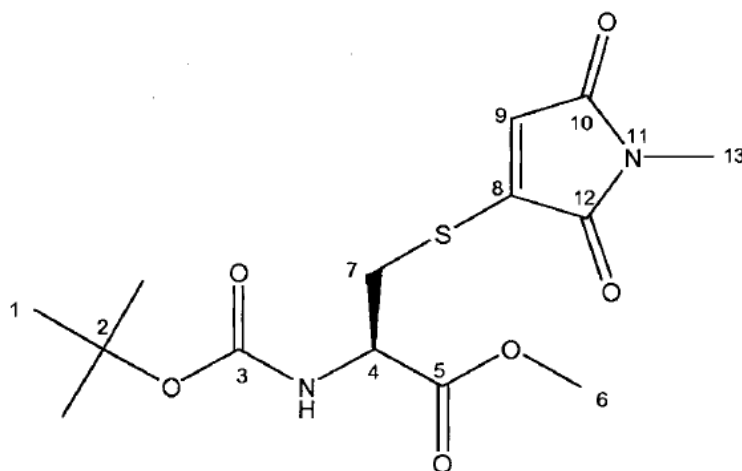
15 Ejemplo de referencia 37: Preparación de N-Boc-Cys(Mal)-OMe



A una solución en agitación de N-Boc-Cys-OMe (36 mg, 0,15 mmol) y acetato de sodio (13 mg, 0,15 mmol) en metanol (3 mL) se añadió bromomaleimida (30 mg, 0,17 mmol) en metanol (3 mL). Después de 1 minute el disolvente se eliminó *en vacío*. La purificación mediante cromatografía flash (gradiente de elución en acetato de etilo al 50% en éter de petróleo a acetato de etilo) proporcionó un polvo de color amarillo claro **N-Boc-Cys(Mal)-OMe** (51 mg, 0,15 mmol) en 100%. δ_{H} (500 MHz, CDCl₃) 7.63 (s, 1H, mal-NH), 6.27 (s, 1H, 9-H), 5.40 (d, 1H, J = 6.8, NH), 4.67 (ddd, 1H, J = 5.1, 5.4 y 6.8, H-4), 3.80 (s, 3H, H₃-1), 3.48 (dd, 1H, J = 5.1 y 13.8, HH-7), 3.62 (dd, 1H, J = 5.4 y 14.1, HH-7) 1.45 (s, 9H, 3 x H₃-1); δ_{C} (125 MHz, CDCl₃) 170.2 (C=O), 168.9 (C=O), 167.6 (C=O), 155.2 (C=O), 155.9 (C8), 119.7 (C9), 81.1 (C2), 53.3 (C6), 52.7 (C4), 34.0 (C7), 28.3 (3 x C1); IR (sólido, cm⁻¹) 3236 (w), 1715 (s); MS (Cl⁺) m/z, (intensidad relativa): 331 ([M+H], 5), 275 (20), 231 (100); Masa calculada para [C₁₃H₁₈O₆N₂S]+H requiere 331.0964 Hallada 331.0968 (Cl⁺); $^{20}\alpha_{\text{D}}$: -41.9° (c = 1.0, Metanol); p.f. 145-147°C; UV (Acetonitrilo) ϵ_{245} = 14200 and ϵ_{339} = 8600 cm⁻¹M⁻¹d³.

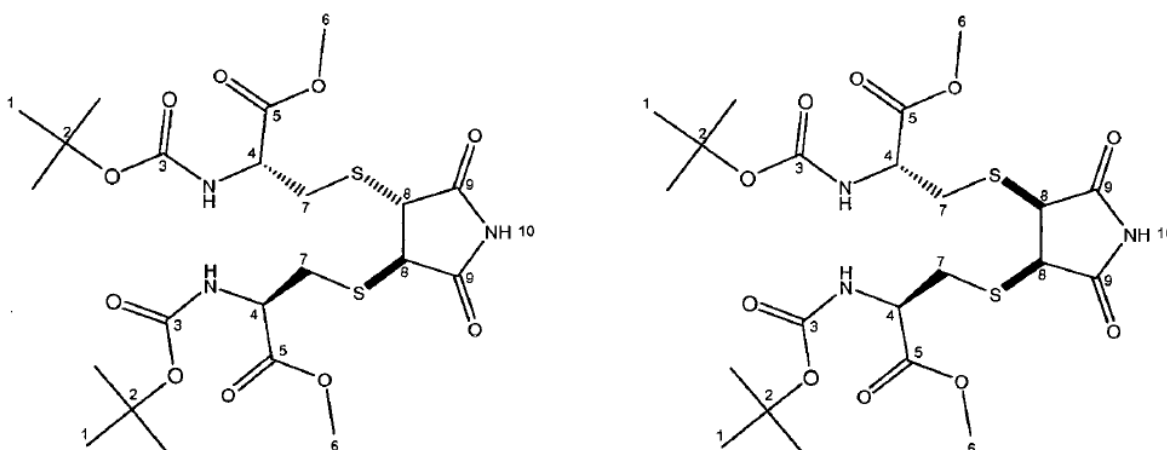
Ejemplo de referencia 38(a): Preparación de N-Boc-Cys(N'-Me-Mal)-OMe

30



5 A una solución en agitación de *N*-Boc-Cys-OMe (32 mg, 0,136 mmol) en metanol (4 mL) se añadió acetato de sodio (82 mg, 0,408 mmol). A ésta se añadió *N*-metil bromomaleimida (25,8 mg, 0,136 mmol) en metanol (4 mL) durante 10 minutos. El disolvente se eliminó por purificación *en vacío* mediante cromatografía flash (gradiente de elución en acetato de etilo al 10% en éter de petróleo, a acetato de etilo al 30% en éter de petróleo) para proporcionar el compuesto deseado en forma de un polvo de color blanco (39,3 mg, 0,114 mmol) en un rendimiento del 84%. δ_{H} (500MHz, CDCl₃) 6.26 (s, 1H, H-9), 5.36 (d, 1H, *J* = 6.3, 'Boc' NH), 4.66 (m, 1H, H-4), 3.79 (s, 3H, H₃-6), 3.46 (dd, 1H, *J* = 5.0 y 5.2, *HH*-7), 3.35 (dd, 1H, *J* = 5.1 y 13.7, *HH*-7), 3.00 (s, 3H, H₃-13), 1.44 (s, 9H, 3 x H₃-1); δ_{C} (125MHz, CDCl₃) 170.2 (C=O), 169.5 (C=O), 167.9 (C=O), 155.0 (C=O), 149.9 (C8), 118.7 (C9), 80.9 (C2), 53.1 (C6), 52.7 (C4), 33.8 (C7), 28.3 (3 x C1), 24.1 (C13); IR (sólido, cm⁻¹) 3368 (m), 2977 (m), 1695 (s); MS (ES⁺) *m/z* (intensidad relativa): 311 (M⁺, 100); Masa calculada para C₁₄H₂₀N₂O₆NaS requiere 367.0940. Hallada: 367.0931; $^{20}\alpha_{\text{D}}$: - 18.550 (c = 1.0, Metanol); p.f. 101-103°C.

Ejemplo de referencia 38(b): Preparación de 2,3-Di(*N*-Boc-Cys-OMe)succinimida (mezcla de diastereómeros)

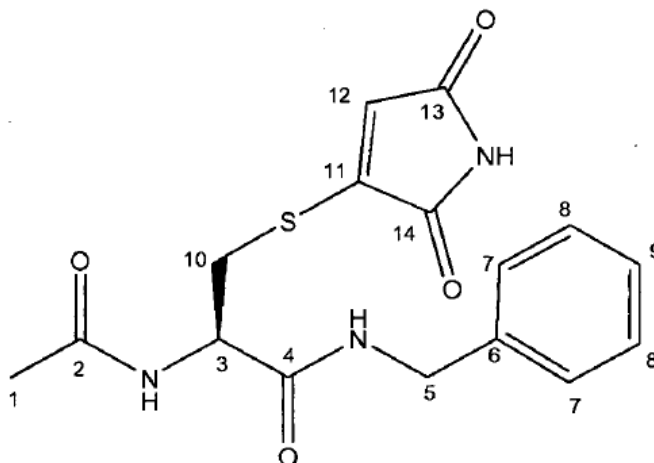


15
 20 A una solución de bromomaleimida (50 mg, 0,28 mmol) en tampón acuoso (100mM de fosfato de sodio, 150 mM de NaCl, pH 8,0):DMF, 95:5 (9,25 mL) se añadió *N*-Boc-Cys-OMe (660 mg, 2,81 mmol) en DMF (0,25 mL). Después de 5 minutos la mezcla de reacción acuosa se extrajo con acetato de etilo (3 x 25 mL) y las capas orgánicas combinadas se lavaron con solución de cloruro de litio saturado (aq) (5 x 25 mL), agua (25 mL) y salmuera (25 mL), se secaron (MgSO₄), se filtraron y el disolvente se eliminó *en vacío*. La purificación mediante cromatografía en columna (acetato de etilo al 10-40% en éter de petróleo) proporcionaron **2,3-Di(*N*-Boc-Cys-OMe)succinimida (mezcla de diastereómeros)** en forma de un aceite ceroso de color amarillo (150 mg, 0,27 mmol, rendimiento del 94%), una mezcla no separable en una relación 1:1 de dos diastereómeros simétricos; δ_{H} (400 MHz, CDCl₃) 8.62 (s, 1H, maleimida NH de un diastereómero simétrico), 8.66 (s, 1H, maleimida NH de un diastereómero simétrico), 5.62 (d, 2H, *J* = 8.4, 2 x 'Boc' NH de un diastereómero simétrico), 5.51 (d, 2H, *J* = 8.0, 2 x 'Boc' NH de un diastereómero

simétrico), 4.72-4.58 (m, 4 x H-4 de ambos diastereómeros), 3.80 (s, 6H, 2 x H₃-6 de un diastereómero simétrico), 3.79 (s, 6H, 2 x H₃-6 de un diastereómero simétrico), 3.68 (s, 2H, 2 x H-8 de un diastereómero simétrico), 3.64 (s, 2H, 2 x H-8 de un diastereómero simétrico), 3.46 (dd, 2H, $J = 4.8$ y 12.0 Hz, 2 x $HH-7^*$ de un diastereómero simétrico), 3.37 (dd, 2H, $J = 6.0$ y 14.4 , 2 x $HH-7^{\dagger}$ de un diastereómero simétrico), 3.21 (dd, 2H, $J = 4.8$ y 14.0 Hz, 2 x $HH-7^{\dagger}$ de un diastereómero simétrico), 3.11 (dd, 2H, $J = 6.4$ y 14.0 Hz, 2 x $HH-7^*$ de un diastereómero simétrico), 1.463 (s, 18H, 6 x H₃-1 de un diastereómero simétrico), 14.460 (s, 18H, 6 x H₃-1 de un diastereómero simétrico); * - las señales se muestran como parte del mismo sistema AB mediante datos HMQC [†]-las señales se muestran como parte del mismo sistema AB mediante datos HMQC data δ_c (125 MHz, CDCl₃) 174.32 (2 x C=O), 171.25 (2 x C=O), 155.33 (2 x C=O), 80.61 (2 x C2), 80.58 (2 x C2), 53.51 (2 x C4), 53.18 (2 x C4), 52.91 (2 x C6), 52.90 (2 x C6), 48.45 (2 x C8), 47.89 (2 x C8), 34.66 (2 x C7), 34.59 (2 x C7), 28.37 (6 x C1), 28.36 (6 x C1) Faltan diversas señales de carbono debido al solapamiento de diastereómeros; IR (película fina, neta) 3348, 2978, 1719 cm⁻¹; MS (EI) m/z (intensidad relativa): 566 ([M+H], 20), 564 ([M-H], 100); Masa exacta calculada para [C₂₂H₃₅N₃O₁₀S₂]-H requiere 564.1669 Hallada 564.1686.

Ejemplo de referencia 39: Preparación de *N*-Ac-Cys(Mal)-Bencilamina

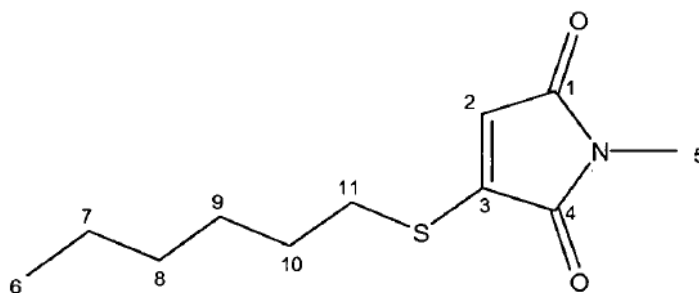
15



A *N*-Ac-Cys-Bencilamina (1,00 g, 4,00 mmol) arriba en metanol (42 mL), se añadió bromomaleimida (777 mg, 4,37 mmol) en metanol (42 mL) gota a gota, durante 5 minutos. Después de 10 minutos, el disolvente eliminado en vacío y el residuo sometido a cromatografía flash utilizando acetato de etilo al 10 % en éter de petróleo, proporcionan el compuesto deseado como un sólido de color hueso (429 mg, 1,2 mmol) en un rendimiento del 100%, en base al 69 % de recuperación de bromomaleimida. δ_H (500 MHz, MeOD) 7.32-7.20 (m, 5H, 5 x Ar-H), 6.45 (s, 1H, H-12), 4.71 (t, 1H, $J = 7.3$, H-3), 4.38 (d, 2H, $J = 2.7$, H₂-5), 3.40 (dd, 1H, $J = 7.0$ y 13.6 , $HH-10$), 3.25 (dd, 1H, $J = 7.2$ y 13.6 , $HH-10$), 1.99 (s, 3H, H₃-1); δ_c (125 MHz, MeOD) 173.51 (C=O), 172.22 (C=O), 171.44 (C=O), 170.51 (C=O), 151.58 (C11), 139.48 (C6), 129.54 (2 x Ar-H), 128.51 (2 x Ar-H), 128.26 (C9), 121.01 (C12) 53.04 (C3), 44.25 (C5), 33.72 (C10), 22.42 (C1); IR (película, cm⁻¹) 3187 (w), 1717 (s), 1646 (s); MS (ES+) m/z (intensidad relativa): 370 ([M+Na], 20), 337 (50), 325 (90), 309(100); Masa exacta calculada para [C₁₆H₁₇N₃O₄SN]+Na requiere m/z 370.0873 Hallada 370.0852 (ES+); UV (Acetonitrilo) $\epsilon_{213} = 19400$, $\epsilon_{247} = 4800$ and $\epsilon_{337} = 2700$ cm⁻¹M⁻¹d³, el sólido blanco se descompone a 180°C.

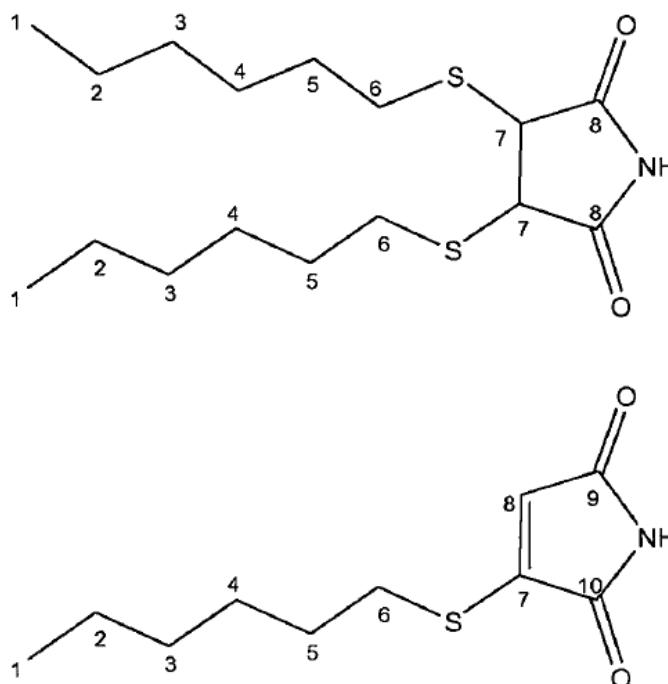
Ejemplo de referencia 40: Preparación de *N*-Metil hexilsulfanilmaleimida

30



5 A N-metil bromomaleimida (100 mg, 0,53 mmol) y trihidrato de acetato de sodio (70 mg, 0,53 mmol) en metanol (15 mL), se añadió hexanotiol (74 μ L, 0,58 mmol) en metanol (100 mL) gota a gota durante 1 hora con agitación enérgica. Después de 5 minutos el disolvente se eliminó *en vacío*. La purificación mediante cromatografía en columna (gradiente de elución en acetato de etilo al 10% en éter de petróleo, a acetato de etilo al 30% en éter de petróleo) proporcionó el compuesto deseado en forma de un sólido de color amarillo (99 mg, 0,44 mmol) en un rendimiento del 83%. δ_H (600 MHz, $CDCl_3$) 6.03 (s, 1H, H-2), 3.01 (s, 3H, H₃-5), 2.89 (t, 2H, J = 7.6, 2H, H₂-11), 1.76-1.71 (m, 2H, H₂-10), 1.46-1.41 (m, 2H, H₂-9), 1.33-1.27 (m, 4H, H₂-7 y CH₂-8), 0.89 (t, 3H, J = 6.5, H₃-6); δ_C (125 MHz, $CDCl_3$) 171.47 (C=O), 169.94 (C=O), 151.84 (C3), 117.27 (C2), 31.92 (C11), 31.31 (CH₂), 28.64 (CH₂), 27.75 (CH₂), 24.10 (C5), 24.10 (C7), 14.09 (C6); IR (aceite, cm^{-1}) 2727 (w), 1708 (s); MS (FAB+) *m/z* (intensidad relativa): 250 ([M+Na], 40), 228 (35), 199 (30), 176 (100); Masa exacta calculada para $[C_{11}H_{17}NO_2S]^+Na$ requiere *m/z* 250.0878 Hallada 250.0880 (FAB+)

Ejemplo de referencia 41: Preparación de 2,3 Dihexilsulfanilsuccinimida y Hexilsulfanilmaleimida



15 **Método A**

A bromomaleimida (300mg, 1,69 mmol) y acetato de sodio (138 mg, 1,69 mmol) en metanol (60 mL), se añadió hexanotiol (356 μ L, 2,50 mmol). Después de 5 minutos el disolvente se eliminó *en vacío* y la purificación mediante cromatografía flash (acetato de etilo al 10% en éter de petróleo) proporcionó **2,3 dihexanotiosuccinimida** en forma de una pasta de color amarillo brillante (13 mg, 0,04 mmol) en 2% y **hexilsulfanilmaleimida** como un polvo color crema (alqueno 310 mg, 1,46 mmol) en un rendimiento del 86%.

2,3 Dihexilsulfanilsuccinimida

δ_H (500 MHz, $CDCl_3$) 8.21 (s, 1H, NH), 3.49 (s, 2H, 2 x H-7), 2.89-2.83 (m, 2H, 2 x HH-6), 2.79-2.83 (m, 2H, 2 x HH-6), 1.71-1.57 (m, 4H, 2 x CH_2), 1.44-1.37 (m, 4H, 2 x CH_2), 1.34-1.26 (m, 8H, 4 x CH_2), 0.89 (t, 6H, $J = 6.8$, 2 x H_3-1); δ_C (125 MHz, $CDCl_3$) 174.60 (2 x C=O), 48.23 (2 x C7), 32.34 (2 x CH_2), 31.26 (2 x CH_2), 28.99 (2 x CH_2), 28.46 (2 x CH_2), 22.56 (2 x CH_2), 14.27 (2 x C1); IR (sólido, cm^{-1}) 3198 (m), 2928 (m), 1703 (s); Ninguna masa de iones encontrada.

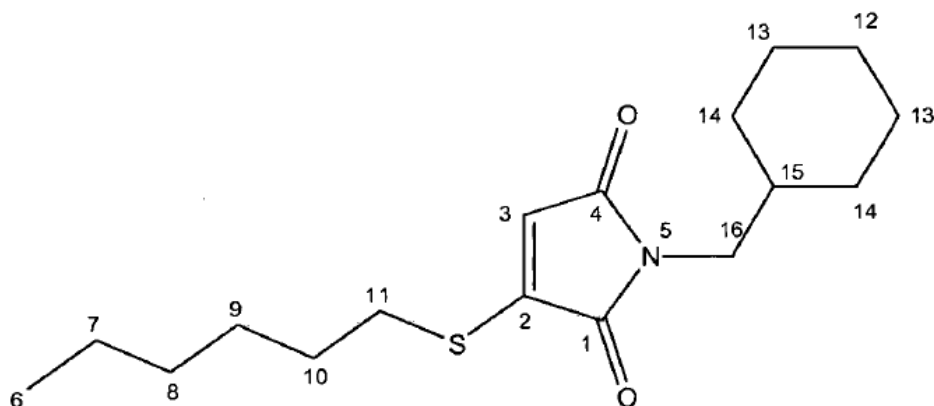
Hexilsulfanilmaleimida

δ_H (500 MHz, $CDCl_3$) 7.35 (s, 1H, NH), 6.04 (s, 1H, H-8), 2.91 (t, 2H, H_2-6), 1.78-1.72 (m, 2H, H_2-5), 1.48-1.42 (m, 2H, CH_2), 1.33-1.30 (m, 4H, 2 x CH_2), 0.90 (t, 3H, $J = 6.9$, H_3-1); δ_C (125 MHz, $CDCl_3$) 169.06 (C=O), 167.69 (C=O), 152.74 (C7), 118.24 (C8), 32.06 (C6), 31.26 (CH_2), 28.58 (CH_2), 27.70 (CH_2), 22.52 (CH_2), 14.03 (C1); IR (sólido, cm^{-1}) 3200 (m), 2918 (m), 1703 (s); MS (ES-) m/z (intensidad relativa): 212 ([M-H], 100); Masa exacta calculada para $[C_{10}H_{15}NO_2S]-H$ requiere m/z 212.0745 Hallada 212.0753 (ES-); p.f. 99-101°C; UV (Acetonitrilo) $\epsilon_{247} = 12000$ y $\epsilon_{347} = 9500$ $cm^{-1}M^{-1}d^3$.

Método B

A bromomaleimida (300mg, 1,69 mmol) y acetato de sodio (138 mg, 1,69 mmol) en metanol (100 mL), se añadió hexanotiol (237 μL , 1,69 mmol). Después de 5 minutos el disolvente se eliminó *en vacio* y la purificación mediante cromatografía flash (acetato de etilo al 10% en éter de petróleo) proporcionó hexilsulfanilmaleimida como un polvo color crema (362 mg, 1,69 mmol) en un rendimiento del 100%.

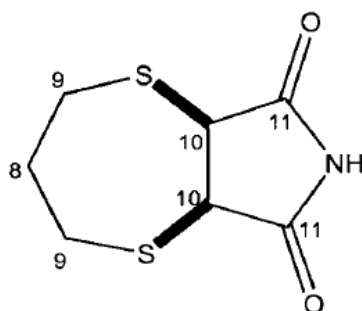
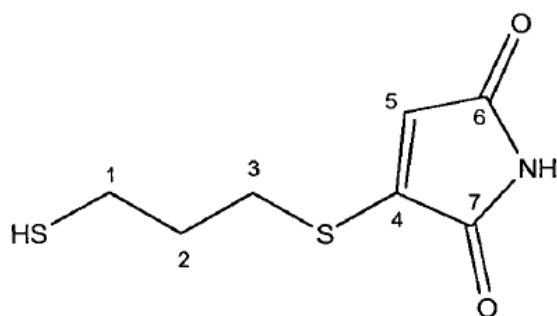
Ejemplo de referencia 42: Preparación de N-Metilenociclohexano hexilsulfanilmaleimida



A N-metilenociclohexano bromomaleimida (50 mg, 0,19 mmol) en metanol (50 mL), se añadió hexanotiol (52 mL, 0,37 mmol) y acetato de sodio (50 mg, 0,37 mmol) en metanol (50 mL) gota a gota durante 5 minutos. Después de 10 minutos, el disolvente se eliminó en vacío y el residuo se sometió a cromatografía flash (éter de petróleo) para proporcionar el compuesto deseado como un sólido de color hueso (29 mg, 0,09 mmol) en un rendimiento del 84%.

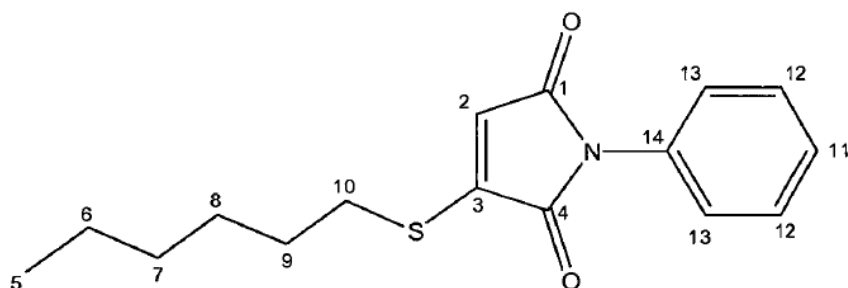
δ_H (600 MHz, $CDCl_3$) 6.01 (s, 1H, H-3), 6.27 (s, 1H, 9-H), 3.42 (d, 1H, $J = 6.8$, NH), 4.67 (ddd, 1H, $J = 5.1$, 5.4 y 6.8, H-4), 3.80 (s, 3H, H_3-6), 3.48 (dd, 1H, $J = 5.1$ y 13.8, HH-7), 3.62 (dd, 1H, $J = 5.4$ and 14.1, HH-7) 1.45 (s, 9H, 3 x H_3-1); δ_C (125 MHz, $CDCl_3$) 170.23 (C=O), 168.44 (C=O), 151.49 (C2), 117.08 (C3), 44.36 (C16), 37.00 (C15), 31.91 (2 x CH_2), 31.32 (2 x CH_2), 30.73 (CH_2), 28.66 (CH_2), 27.78 (CH_2), 26.33 (CH_2), 25.73 (2 x CH_2), 22.58 (CH_2), 14.10 (C6); IR (sólido, cm^{-1}) 2927 (m), 1700 (s); MS (ES+) m/z , (intensidad relativa): 310 ([M+H], 100), 180 (40); Masa calculada para $[C_{17}H_{27}O_2NS]+H$ requiere 310.1841 Hallada 310.1828 (ES+).

Reference Example 43: Preparation of 3-Mercaptopropylthiomaleimide and 1,5-Dithio-8-aza-bicyclo[5,3,0]decan-7,9-dione



5 A bromomaleimida (30 mg, 0,17 mmol) y acetato de sodio (14 mg, 0,17 mmol) en metanol (6 mL) se añadió 1,3-
 propanoditiol (17 μ l, 0,17 mmol). Después de cinco minutos el disolvente se *eliminó en vacío* y la purificación
 mediante cromatografía flash (acetato de etilo al 10% en éter de petróleo) proporcionó **3-
 10 mercaptopropiltiomaleimida** y **1,5-ditio, 8-azabicyclo[5,3,0]decan-7,9-diona** en forma de un polvo de color
 amarillo claro que era una mezcla de dos isómeros inseparables **3-mercaptopropiltiomaleimida** (7 mg, 0,03 mmol)
 en un rendimiento del 21%, **1,5-ditio, 8-aza-bicyclo[5,3,0]decan-7,9-diona** (12 mg, 0,06 mmol) en un rendimiento
 del 34%. δ_{H} (500 MHz, MeOD) 6.28 (s, 1H, H-5), 4.41 (s, 3.2H, 2 x H-10), 3.15 (t, 2H, $J = 7.3$, H₂-3), 2.82-2.77 (m,
 3.2H, CH₂), 2.35 (t, 3.2H, $J = 13.1$, CH₂), 2.30-2.25 (m, 2H, CH₂), 2.20-2.13 (m, 2H, CH₂), 1.91-1.83 (m, 3.2H, CH₂);
 10 δ_{C} (125 MHz, MeOD) 177.79 (2 x C11), 172.33 (C=O), 170.56 (C=O), 152.37 (C4), 120.30 (C5), 54.52 (2 x C10),
 34.94 (2 x C9), 32.16 (CH₂), 31.10 (CH₂) 30.96 (CH₂), 27.49 (CH₂); IR (sólido, cm^{-1}) 3246 (m), 1703 (s); MS (ES-)
m/z (intensidad relativa): 202 ([M-H], 100); Masa exacta calculada para [C₇H₉NO₂S₂]-H requiere *m/z* 201.9996
 Hallada 201.9996 (ES-).

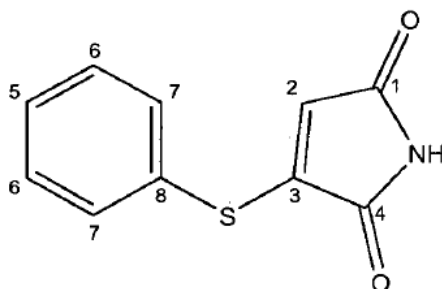
15 **Ejemplo de referencia 44:** Preparación de *N*-Fenilsulfanilmaleimida



20 A hexanotiol (111 μ l, 0,79 mmol) y trihidrato de acetato de sodio (108 mg, 0,79 mmol) en metanol (60 mL) se añadió
 en *N*-fenil monobromomaleimida (200 mg, 0,79 mmol) en metanol (60 mL) gota a gota durante 1 hora con agitación
 enérgica. Después de 5 minutos se *eliminó el disolvente en vacío*. La purificación mediante cromatografía en
 columna (gradiente de elución en acetato de etilo al 10% en éter de petróleo, a acetato de etilo al 30% en éter de
 petróleo) proporcionó el compuesto deseado en forma de un sólido de color amarillo claro (109 mg, 0,38 mmol) en
 un rendimiento del 48%. δ_{H} (600 MHz, CDCl₃) 7.45 (dd, 2H, $J = 7.1$ y 8.0, 2 x H-12), 7.36 (d, 2H, $J = 6.0$, H-11), 7.35
 (d, 2H, $J = 8.1$, 2 x H-13), 6.19 (s, 1H, H-2), 2.96 (t, 2H, $J = 7.9$, H₂-10), 1.81-1.76 (m, 2H, H₂-9), 1.50-1.45 (m, 2H,
 25 H₂-8), 1.34-1.32 (m, 4H, H₂-6 y H₂-7), 0.91 (t, 3H, $J = 6.9$, H₃-5); δ_{C} (125 MHz, CDCl₃) 168.59 (C=O), 166.96 (C=O),

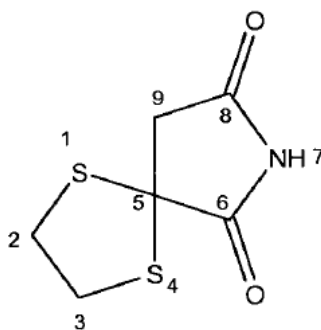
152.20 (C3), 131.53 (C14), 129.21 (2 x Ar-H), 127.93 (C11), 126.09 (2 x Ar-H), 117.24 (C2), 32.03 (C10), 31.33 (CH₂), 28.68 (CH₂), 27.78 (CH₂), 22.59 (CH₂), 14.11 (C5); IR (aceite, cm⁻¹) 2931 (w), 1703 (s); MS (Cl⁺) *m/z* (intensidad relativa): 290 ([M+H], 100); Masa exacta calculada para [C₁₆H₂₀NO₂S]+H requiere *m/z* 290.1215 Hallada 290.1224 (Cl⁺);

5 **Ejemplo de referencia 45:** Preparación de feniltiomaleimida



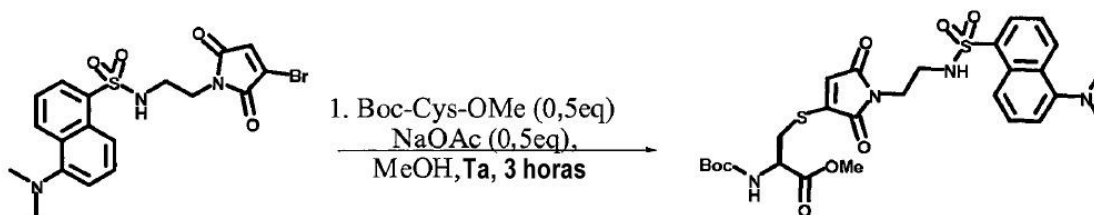
A tiofenol (57 μ L, 0,56 mmol) y trihidrato de acetato de sodio (136 mg, 0,56 mmol) en metanol (30 mL) se añadió en monobromomaleimida (100 mg, 0,56 mmol) en metanol (30 mL) gota a gota durante 1 hora con agitación enérgica. Después de 5 minutos el disolvente se *eliminó en vacío*. La purificación mediante cromatografía en columna (gradiente de elución en acetato de etilo al 10% en éter de petróleo, a acetato de etilo al 30% en éter de petróleo) proporcionó el compuesto deseado en forma de un sólido de color amarillo claro (22 mg, 0,11 mmol) en un rendimiento del 19%. δ_{H} (600 MHz, CDCl₃) 7.56 (dd, 2H, *J* = 1,6 y 7.8, 2 x H-7), 7.50-7.48 (m, 3H, 3 x Ar), 5.63 (s, 1H, H-2); δ_{C} (125 MHz, CDCl₃) 169.42 (C=O), 167.98 (C=O), 153.60 (C3), 134.45 (2 x Ar-H), 130.68 (C5), 130.42 (2 x Ar-H), 127.27 (C8), 119.91 (C2); IR (aceite, cm⁻¹) 3265 (m), 1770 (m), 1701 (s); MS (Cl⁺) *m/z* (intensidad relativa): 206 ([M+H], 100), 111 (40); Masa exacta calculada para [C₁₀H₇NO₂S]+H requiere *m/z* 206.0276 Hallada 206.0273 (Cl⁺);

Ejemplo de referencia 46: Preparación de 1,4-Ditio-7-aza-espiro[4.4]nonano-6,8-diona



A bromomaleimida (30 mg, 0,17 mmol) y acetato de sodio (14 mg, 0,17 mmol) en metanol (6 mL) se añadió 1,2-etanoditiol (17 μ l, 0,17 mmol). Después de cinco minutos el disolvente se eliminó en vacío y la purificación mediante cromatografía flash (acetato de etilo al 10% en éter de petróleo) proporcionó el compuesto deseado en forma de un polvo de color amarillo claro (13 mg, 0,07 mmol) en un rendimiento del 41%. δ_{H} (500 MHz, CDCl₃) 8.39 (s, 1H, NH), 3.75-3.69 (m, 2H, *HH-2* y *HH-3*), 3.60-3.53 (m, 2H, *HH-2* y *HH-3*), 3.30 (s, 2H, H₂-9); δ_{C} (125 MHz, CDCl₃) 177.93 (C=O), 172.76 (C=O), 61.23 (C5), 43.12 (C9), 41.05 (C2 y C3); IR (sólido, cm⁻¹) 3290 (m), 1703 (m), 1629 (s); MS (ES⁻) *m/z* (intensidad relativa): 188 ([M-H], 100); Masa exacta calculada para [C₆H₇NO₂S₂]-H requiere *m/z* 187.9840 Hallada 187.9839 (ES⁻); P.f. 112-115°C.

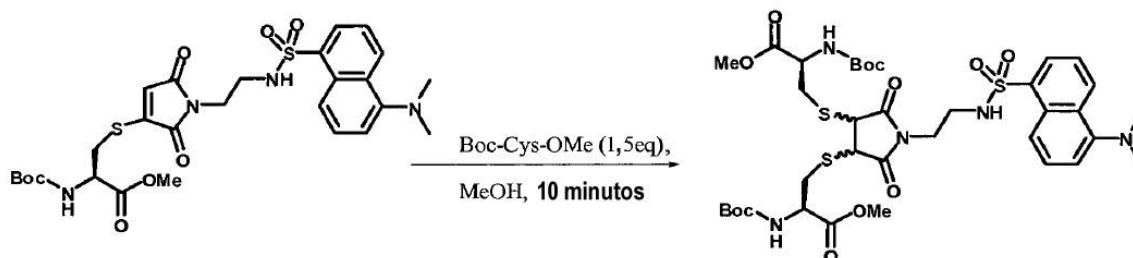
Ejemplo de referencia 47(a): Preparación de (S)-metil 2-(terc-butoxicarbonilamino)-3-(1-(2-(5-(dimetilamino)naftaleno-1-sulfonamido)etil)-2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-3-iltio)propanoato



Se disolvió Dansil-bromomaleimida (100mg) en metanol (200ml) calentando brevemente la solución en agitación utilizando una pistola térmica. A la solución resultante de color amarillo claro, se añadió *N*-Boc-Cys-OMe (22μl, 0,1mmol, 0,5eq) y acetato de sodio (14,5mg, 0,1mmol, 0,5eq) durante 3 horas. La reacción fue monitorizada mediante TLC (eluyente: EtOAc al 40%: éter de petróleo al 60%). Una vez que la adición se completó, el metanol se eliminó *en vacío* para producir un aceite de color amarillo. La purificación mediante cromatografía flash produjo el producto deseado (48,29mg, 0,08 mmol, 79,7%). ¹H RMN (600MHz CDCl₃): δ_H 8.54(d, J=8.56Hz, 1H, CH), 8.21(d, 1H, J=8.27Hz, CH), 8.13(d, 1H, J=8.57Hz, CH), 7.55(m, 2H, 2 x CH), 7.25(d, J=7.60Hz, 1H, CH), 5.92(s, 1H, CH), 4.44(m, 1H, HN-CH-CO), 3.77(s, 3H, OMe), 3.48(m, 2H, CH₂), 3.44(m, 2H, CH₂), 3.38(s, 6H, 2 xCH₃), 3.13(t, J=5.79, 2H, S-CH₂) 2.88(s, 9H, 3 x CH₃). ¹³C RMN (600MHz CDCl₃): 173.08, 170.52, 169.69, 168.96 (4x C=O), 157.73 (-C=CH), 153.16, 150.71, 136.48, 131.39, 131.25, 131.18, 130.74, 130.65, 129.31, 124.35, 120.61, 119.22, 81.12, 53.58, 52.95, 45.89, 41.53, 33.98, 28.66. IR: 3324.7 cm⁻¹, 1775 cm⁻¹. [M + H]⁺: 605.1756, calculada; 605.1740

Ejemplo de referencia 47(b): Preparación de (2*R*,2'*R*)-dimetil3,3'-(1-(2-(5-(dimetilamino)naftaleno-1-sulfonamido)etil)-2,5-dioxopirrolidina-3,4-diil)bis(sulfanodil)bis(2-(*t*butoxicarbonilamino)propanoato)

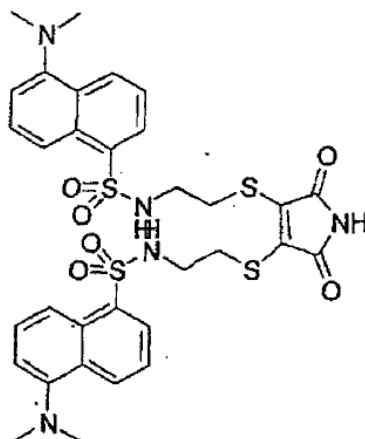
15



El aducto de Dansilo / maleimida / cisteína (15mg, 0,0247mmol, 1eq) se disolvió en metanol (100ml). A la solución transparente resultante se añadió *N*-Boc-Cys-OMe (3,1μl, 0,0247mmol, 1eq) durante 1 hora. La reacción fue monitorizada mediante TLC (eluyente: EtOAc al 40%: éter de petróleo al 60%). Una vez que la adición se completó el metanol se eliminó *en vacío* para producir el producto deseado (12,51mg, 0,08 mmol, 60%). ¹H RMN (600MHz CDCl₃): δ_H 8.44(d, J=8.56Hz, 1H, CH), 8.13(m, 2H, 2 x CH), 7.49(m, 2H, 2x CH), 7.17(m, 2H, 2 x CH), 4.49(bs,1H, HN-CH-CO), 3.77(s, 3H, OMe), 3.48(m, 2H, CH₂), 3.44(m, 2H, CH₂), 3.38(s, 6H, 2 xCH₃), 3.13(t, J=5.79, 2H, S-CH₂) 2.88(s, 9H, 3 x CH₃).

Ejemplo de referencia 48: Preparación de Di-dansilo-cistamina-maleimida

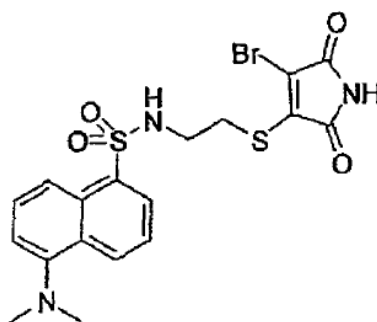
25



Se cargó un matraz de fondo redondo con di-dansilo cistamina (100mg, 0,16mmol), TCEP (46mg, 1 eq) y MeOH (10ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente bajo argón durante 3horas. Se añadió a continuación dibromomaleimida (36mg, 0,9eq), en MeOH (5ml) a la mezcla de reacción. Después de 30 minutos se añadió NaOAc (56mg, 4eq) a la mezcla de reacción y el disolvente se evaporó en vacío. El residuo se trató con DCM y salmuera. Las capas orgánicas fueron combinadas, se secaron (MgSO₄), se filtraron y se concentraron en vacío. La purificación mediante cromatografía flash (gel de sílice, EtOAc-DCM al 0-20%) proporcionó el compuesto deseado en forma de una goma de color amarillo (40mg, 40%). ¹HRMN (CDCl₃, 600MHz), δ8.5 (2H, d, J 8.5 Hz aromático H's), δ8.2 (4H, m aromático H's), δ7.53 (1H, s CONH), δ7.46 (4H, m, aromático H's), δ7.1 (2H, d, J 7.4 Hz aromático H's), δ5.65 (2H, t, J 6.27 SO₂NH), δ3.3 (4H, t, J 6.0 SCH₂), δ3.17 (4H, q, J 6.0 NHCH₂), δ2.8 (12H, s NCH₃); ¹³CRMN (CDCl₃, 150MHz), δ165.9, 152.0, 136.5, 134.7, 130.7, 129.94, 129.85, 129.62, 129.57, 128.63, 123.3, 118.8, 115.4, 45.5, 43.6, 31.8; IR (cm⁻¹) 3288 (br) 1720 (s) MS (Na⁺) m/z intensidad relativa: 736 (M, 100); Masa exacta calculada para [C₃₂H₃₅N₅O₆NaS₄] requiere m/z 735.1368, Hallada 736.1390 (Na⁺).

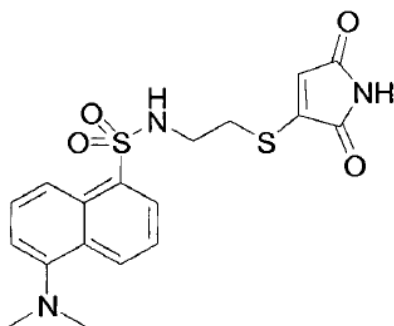
Ejemplo de referencia 49: Preparación de Bromo-dansilo-cistamina-maleimida

15



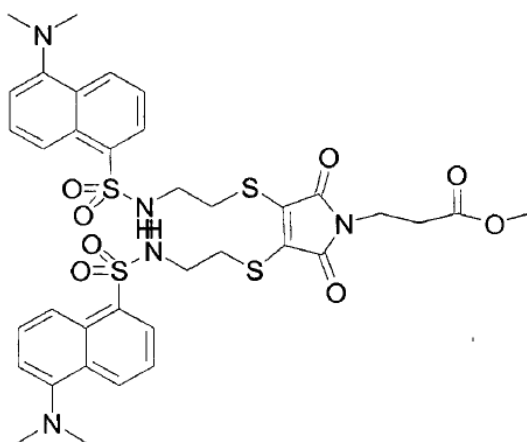
Se cargó un matraz de fondo redondo con di-dansilo cistamina (48mg, 0,08mmol), TCEP (23mg, 1eq), y MeOH (10ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente bajo argón durante 3 horas. Se añadió dibromomaleimida (41mg, 2eq) en MeOH (10ml), a la mezcla de reacción. Después de 16 horas, la mezcla de reacción se concentró en vacío. El residuo se trató con DCM y salmuera. Las capas orgánicas se combinaron, se secaron (MgSO₄) y se purificaron mediante cromatografía flash (gel de sílice, EtOAc-DCM al 0-15%) para producir el compuesto deseado (17mg, 22%). ¹HNMR (CDCl₃, 600MHz), δ8.5 (1H, d, J 8.5 Hz aromático H's), δ8.2 (2H, m aromático H's), δ7.6 (1H, s CONH), δ7.53 (2H, m, aromático H's), δ7.15 (1H, d, J 7.4 Hz aromático H's), δ5.30 (1H, t, J 5.6 SO₂NH), δ3.38 (2H, t, J 6.3 SCH₂), δ3.26 (2H, q, J 6.3 NHCH₂), δ2.88 (6H, s NCH₃); ¹³CRMN (CDCl₃, 150MHz), δ165.5, 162.9, 152.2, 142.5, 134.5, 130.95, 129.94, 129.92, 129.5, 128.7, 123.3, 119.0, 118.5, 115.4, 45.5, 43.7, 30.5; IR (cm⁻¹) 3295 (br) 1726 (s) MS (ES⁺) m/z intensidad relativa: 485 (M, 100); Masa exacta calculada para [C₁₈H₁₉N₃O₄S₂Br] requiere m/z 484.0000, Hallada 783.9982.

Ejemplo de referencia 50(a): Preparación de Dansilo-cistamina-maleimida



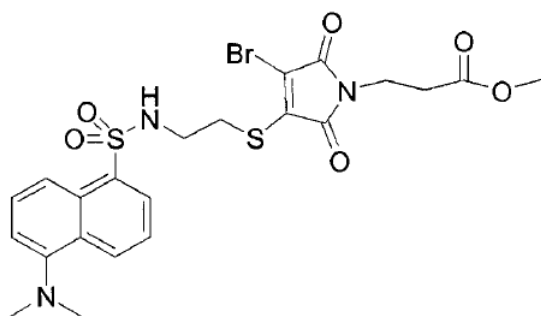
5 Se cargó un matraz de fondo redondo con di-dansilo cistamina (100mg, 0,16mmol), TCEP (46mg, 1eq), y MeOH (10ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente bajo argón durante 3 horas. Se añadió bromomaleimida (56mg, 2eq) en MeOH (5ml), a la mezcla de reacción. Después de 16 horas, la mezcla de reacción se concentró en vacío. El residuo se trató con DCM y salmuera. Las capas orgánicas se combinaron, se secaron (MgSO₄) y se purificaron mediante cromatografía flash (gel de sílice, EtOAc-CHCl₃ al 0-30%) para producir el compuesto deseado (73mg, 55%). ¹HRMN (CDCl₃, 600MHz), δ8.5 (1H, d, *J* 8.5 Hz aromático H's), δ8.2 (2H, m aromático H's), δ8.1 (1H, s CONH), δ7.5 (2H, m, aromático H's), δ7.15 (1H, d, *J* 7.5 Hz aromático H's), δ6.0 (1H, s, CO₂CH) δ5.89 (1H, t, *J* 6.4 SO₂NH), δ3.20 (2H, q, *J* 6.7 NHCH₂), δ3.99 (2H, t, *J* 6.9 SCH₂), δ2.86 (6H, s NCH₃); ¹³CRMN (CDCl₃, 150MHz), δ169.6, 168.0, 152.0, 150.7, 134.4, 131.0, 129.9, 129.7, 129.5, 128.8, 123.4, 119.3, 118.7, 115.6, 45.5, 41.0, 31.8; IR (cm⁻¹) 3277 (br) 1720 (s) MS (ES-) *m/z* intensidad relativa: 404 (M, 100); Masa exacta calculada para [C₁₈H₁₈N₃O₄S₂] requiere *m/z* 404.0739, Hallada 404.0733.

Ejemplo de referencia 50(b): Preparación de metil-éster-di-dansilo-cistamina-maleimida del ácido N-propiónico



15 Un matraz de fondo redondo se cargó con di-dansilo cistamina (132mg, 0,214mmol), TCEP (61mg, 1 eq) y MeOH (10ml). La mezcla de reacción fue agitada a temperatura ambiente bajo argón durante 3 horas. La dibromomaleimida (70mg, 1eq), en MeOH (5ml) se añadió a continuación a la mezcla de reacción. Después de 30 minutos se añadió NaOAc (88mg, 5eq) a la mezcla de reacción y el disolvente se evaporó en vacío. El residuo se trató con DCM y salmuera. Las capas orgánicas se combinaron, se secaron (MgSO₄), se filtraron y concentraron en vacío. La purificación mediante cromatografía flash (gel de sílice, EtOAc-DCM al 0-20%) proporcionó el compuesto deseado en forma de una goma de color amarillo (32mg, 20%). ¹HRMN (CDCl₃, 300MHz), δ8.5 (2H, d, *J* 8.5 Hz aromático H's), δ8.2 (4H, m aromático H's), δ7.53 (1H, s CONH), δ7.45 (4H, m, aromático H's), δ7.1 (2H, d, *J* 17.5 Hz aromático H's), δ5.7 (2H, t, *J* 6.1 SO₂NH), δ3.75 (2H, t, *J* 7.0 CONCH₂), δ3.6(3H, s, OCH₃), δ3.2 (4H, m, SCH₂), δ3.18 (4H, m, NHCH₂), δ2.9 (12H, s, NCH₃), δ2.6 (2H, t, *J* 7.1 NHCH₂); ¹³CRMN (CDCl₃, 75MHz), δ171.3, 165.9, 135.8, 134.8, 130.5, 129.8, 129.5, 129.4, 128.4, 123.3, 119.0, 115.3, 51.9, 45.5, 43.5, 34.3, 32.6 31.9; IR (cm⁻¹) 3295 (br) 2948 (br) 1702 (s) MS (ES-) *m/z* intensidad relativa: 798 (M, 100); Masa exacta calculada para [C₃₆H₄₀N₅O₈S₄] requiere *m/z* 798.1760, Hallada 798.1715.

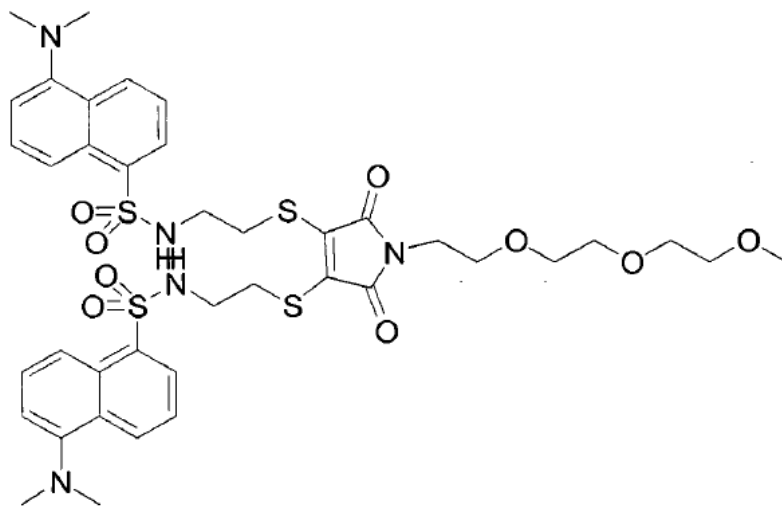
30 **Ejemplo de referencia 51 (a):** Preparación de metil-éster-bromo-dansilo-cistamina-maleimida del ácido N-propiónico.



Se cargó un matraz de fondo redondo con di-dansilo cistamina (66mg, 0,107mmol), TCEP (31mg, 1 eq) y MeOH (10ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente bajo argón durante 3 horas. Se añadió a continuación dibromomaleimida (70 mg, 0,5 eq), en MeOH (5ml) a la mezcla de reacción. Después de 16 horas se añadió NaOAc (88mg, 4eq) a la mezcla de reacción y el disolvente se evaporó en vacío. El residuo se trató con DCM y salmuera. Las capas orgánicas fueron combinadas, se secaron (MgSO_4), se filtraron y se concentraron en vacío. La purificación mediante cromatografía flash (gel de sílice, MeOH-CHCl_3 al 0-2%) proporcionó el compuesto deseado en forma de una goma de color amarillo (20mg, 16%). $^1\text{HRMN}$ (CDCl_3 , 300MHz), δ 8.5 (1H, m, aromático H), δ 8.2 (2H, m aromático H's), δ 7.5 (2H, m, aromático H's), δ 7.2 (1H, d, J 7.5 Hz aromático H), δ 5.2 (1H, t, J 6.1 SO_2NH), δ 3.8 (2H, t, J 7.0 CONCH_2), δ 3.7(3H, s, OCH_3), δ 3.4 (2H, m, SCH_2), δ 3.3 (2H, m, NHCH_2), δ 2.9 (6H, s, NCH_3), δ 2.6 (2H, t, J 7.1 NHCH_2) ; $^{13}\text{CRMN}$ (CDCl_3 , 75MHz), δ 170.95, 165.5, 163.3, 141.6, 134.5, 130.8, 129.8, 129.5, 128.5, 123.2, 118.6, 115.3, 52.0, 45.4, 43.6, 34.8, 32.5 30.6; IR (cm^{-1}) 3296 (br) 2948 (br) 1713 (s)

Ejemplo de referencia 51 (b): Preparación de N-dietilen-glicol-monometil-éter-di-dansilo-cistamina-maleimida

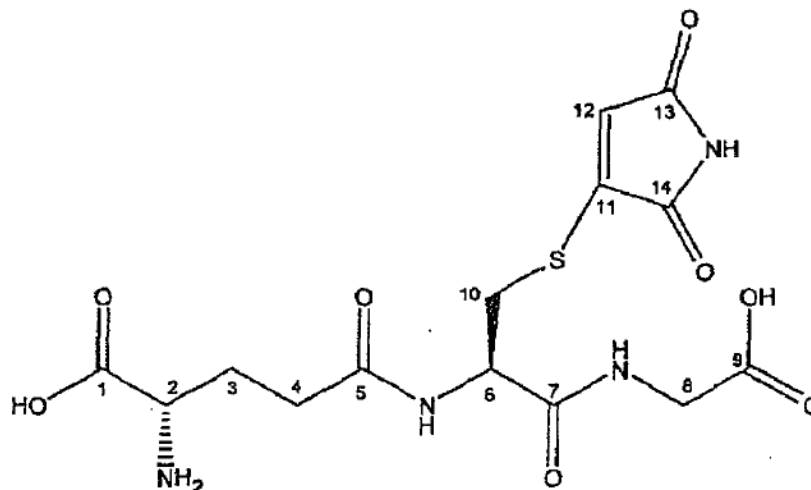
15



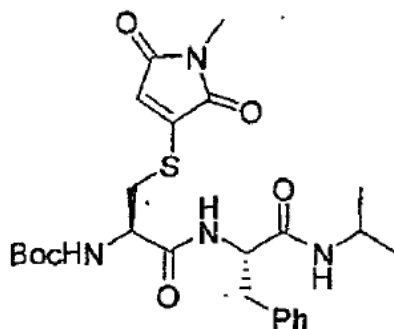
Se cargó un matraz de fondo redondo con di-dansilo cistamina (155mg, 0,25mmol), TCEP (72mg, 1 eq) y MeOH (10ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente bajo argón durante 3 horas. Se añadió a continuación PEG-dibromomaleimida (100 mg, 1 eq), en MeOH (5ml) a la mezcla de reacción. Después de 16 horas se añadió NaOAc (102mg, 5eq) a la mezcla de reacción y el disolvente se evaporó en vacío. El residuo se trató con DCM y salmuera. Las capas orgánicas fueron combinadas, se secaron (MgSO_4), se filtraron y se concentraron en vacío. La purificación mediante cromatografía flash (gel de sílice, THF-DCM al 0-10%) proporcionó el compuesto deseado en forma de una goma de color amarillo (13mg, 6%). $^1\text{HRMN}$ (MeOH , 300MHz), δ 8.5 (2H, m, aromático H's), δ 8.3 (2H, m aromático H's), δ 8.13 (2H, m, aromático H's), δ 7.5 (4H, m, aromático H's), δ 7.2 (2H, m, aromático H's), δ 3.5 (12H, m, CONCH_2 , OCH_2), δ 3.3(3H, s, OCH_3), δ 3.1 (8H, m, SCH_2 , NHCH_2), δ 2.8 (12H, s, NCH_3); $^{13}\text{CRMN}$ (CDCl_3 , 150MHz), δ 167.4, 153.2, 136.9, 136.2, 131.3, 131.2, 130.9, 130.2, 129.6, 129.6, 124.3, 120.5, 116.4, 72.9, 71.4, 71.3, 71.1, 68.7, 59.1, 45.8, 44.5, 38.98, 36.97; IR (cm^{-1}) 3323 (br) 2946 (br) 2946 (s) 1017 (s) MS (Na^+) m/z intensidad relativa: 882 (M, 100); Masa exacta calculada para $[\text{C}_{39}\text{H}_{49}\text{N}_5\text{O}_9\text{NaS}_4]$ requiere m/z 882.2311, Hallada 882.2294 (Na^+).

20

25

Ejemplo de referencia 52: Preparación de Glu-Cys(Mal)-Gly

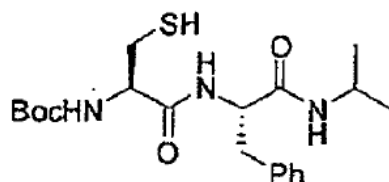
5 A glutatión (47 mg, 0,15 mmol) en metanol (3 mL) se añadió bromomaleimida (30 mg, 0,15 mmol) en metanol (3 mL). Después de cinco minutos el disolvente se eliminó *en vacio* para proporcionar el compuesto deseado como un aceite incoloro (62 mg, 0,15 mmol) en un rendimiento del 100%. δ_H (500 MHz, MeOD) 6.47 (s, 1H, H-12), 4.79 (dd, 1H, $J = 5.7$ y 8.2 , H-6), 4.06 (t, 1H, $J = 6.5$, H-2), 3.95 (s, 2H, H₂-8), 3.49 (dd, 1H, $J = 5.8$ y 13.9 , HH-10), 3.29 (dd, 1H, $J = 8.3$ y 13.5 , HH-10), 2.61 (t, 2H, $J = 7.1$, H₂-4), 2.29-2.15 (m, 2H, H₂-3); δ_C (125 MHz, MeOD) 174.68 (C=O), 172.81 (C=O), 172.39 (C=O), 171.89 (C=O), 171-62 (C=O), 170.59 (C=O), 151.75 (C11), 120.91 (C12), 53.79 (C6), 52.76 (C2), 42.01 (C8), 33.92 (C10) 32.42 (C4), 27.03 (C3); IR (aceite, cm^{-1}) 3259 (m), 2928 (m), 1717 (s); MS (ES-) m/z (intensidad relativa): 401 ([M-H], 100), 272 (30); Masa exacta calculada para [C₁₄H₁₈N₄O₈S]-H requiere m/z 401.0767 Hallada 401.0773 (ES-); UV (Acetonitrilo) $\epsilon_{204} = 8100$, $\epsilon_{253} = 5600$ y $\epsilon_{342} = 1900 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}\text{d}^3$.

Ejemplo de referencia 53: Preparación de Boc-Cys(MeMal)-Phe-ⁱPr

15 O-(Benzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio hexafluorofosfato (344 mg, 0,82 mmol) se añadió a una solución agitada de ácido (2*R*)-2-[(*tert*-butoxicarbonil)amino]-3-[(1-metil-2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-3-il)sulfanil]propanoico (313 mg, 0,95 mmol) e hidrato de 1-hidroxibenzotriazol (13,9 mg) en DMF (2 mL) y la reacción se agitó a 21 °C durante 3 minutos. Se añadió una solución de trifluoroacetato de (2*S*)-1-oxo-3-fenil-1-(propan-2-ilamino)propan-2-ammonio (262 mg, 0,82 mmol) en DMF (1,5 mL) a la mezcla de reacción, seguido de *N,N*-diisopropiletilamina (294 μL , 1,64 mmol) y la reacción se agitó a 21 °C durante 4 h. El disolvente se eliminó *en vacio* y el residuo se disolvió en EtOAc (60 mL) y se lavó con 1 M HCl (x3), H₂O (x1), sat NaHCO₃ (x3), 10% LiCl (x1) y Nad (x1) sat., se secó (MgSO₄), se filtró y el disolvente se eliminó *en vacio*. La purificación mediante precipitación (CHCl₃/éter de petróleo 40-60) proporcionó el compuesto deseado en forma de un sólido de color marrón claro (359 mg, 0,69 mmol, rendimiento del 84%): ^1H RMN (600 MHz, CD₃CN, 25 °C) δ 7.32-7.28 (m, 2H), 7.25-7.21 (m, 3H), 7.11 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 6.46 (d, $J = 6.3$ Hz, 1H), 6.42 (s, 1H), 4.46 (td, $J = 7.6$, 6.5 Hz, 1H), 4.31 (td, $J = 7.3$, 6.4 Hz), 3.88 (septetos de doblete, $J = 6.6$, 6.3 Hz, 1H), 3.30 (dd, $J = 13.7$, 5.8 Hz, 1H), 3.16 (dd, $J = 13.7$, 7.4 Hz, 1H), 2.95 (dd, $J = 13.8$, 7.5 Hz, 1H), 2.93 (s, 3H), 1.43 (s, 9H), 1.07 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H), 1.02 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H); ^{13}C RMN (151 MHz, CD₃CN, 25

$^{\circ}\text{C}$) δ 169.39, 168.84, 168.77, 167.85, 155.17, 149.33, 136.77, 129.10, 127.98, 126.30, 118.57, 79.49, 54.10, 52.62, 40.91, 37.44, 32.43, 27.15, 22.95, 21.24, 21.17; IR (película fina) 3301, 2973, 1770, 1701, 1674, 1641, 1525 cm^{-1} ; LRMS (EI) 518 (24%, [M]⁺), 432 (23), 219 (33), 149 (21) 110 (27), 86 (37), 84 (100); HRMS (EI) calculada para $\text{C}_{25}\text{H}_{34}\text{N}_4\text{O}_6\text{S}$ [M]⁺. 518.2194, observado 518.2199.

5 **Ejemplo de referencia 54:** Desprotección de Boc-Cys(MeMal)-Phe-ⁱPr



10 Se añadió clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina (138 mg, 0,48 mmol) en un tampón de fosfatos de 150 mM (pH 8, 25 mL) a una solución agitada de Boc-Cys(MeMal)-Phe-ⁱPr (50 mg, 97 μmol) en MeCN (25 mL), y la reacción se agitó a 21 $^{\circ}\text{C}$ durante 10 min. La síntesis de Boc-Cys-Phe-ⁱPr se confirmó mediante LCMS (ES⁺) 408.7 (100%).

Ejemplo de referencia 55: Clonación y expresión de Grb2-SH2 L111C Mutante



15 La secuencia de Grb2-SH2 L111C (residuos 53-163): M G I E M K P H P W F F G K I P R A K A E E M L S K Q R H D G A F L I R E S E S A P G D F S L S V K F G N D V Q H F K V C R D G A G K Y F L W V V K F N S L N E L V D Y H R S T S V S R N Q Q I F L R D I E Q V P Q Q P T Y V Q A G S R S H H H H H Terminación.

Masa calculada = 14171

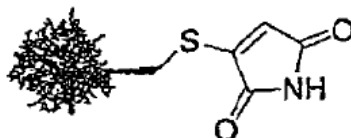
20 El constructo de ADN para el dominio SH2 de Grb2 contenía la secuencia de aminoácidos primarios 53-163 y se clonó en el plásmido QE-60 (Qiagen). El Grb2 SH2 L111C mutante se construyó por mutagénesis dirigida al sitio (kit de Stratagene) utilizando oligonucleótidos que codifican el residuo mutante. Ambos constructos fueron expresados en *Escherichia coli* (M15[pREP4], de Qiagen) utilizando un promotor T5, y se incorporó una etiqueta C-terminal 6-His para la purificación. Los cultivos (1 L) se cultivaron a 37 $^{\circ}\text{C}$ en T.B. procedentes de una única colonia, y se indujo la expresión con 1,0 mM de IPTG cuando se alcanzó un O.D.₆₀₀ de 0,9. Se permitió que los cultivos expresaran proteínas durante aproximadamente 3 h antes de que las células fueran peletizadas. Los pellets o gránulos fueron lisados en 0,1M de fosfato de sodio, 300 mM de NaCl, 50 mM imidazol, pH 7,2 que contenía un cóctel inhibidor de la proteasa (Roche). El lisado se centrifugó, y el sobrenadante se aplicó a una columna de Ni-NTA (Qiagen). El Grb2-SH2 L111C se eluyó de la columna de Ni-NTA con 0,1M de fosfato de sodio, 300 mM de NaCl, 200 mM de imidazol a un pH 7,2. La Grb2 SH2 L111C recogida era ~95% pura según se visualizó mediante SDS-PAGE con tinción de Coomassie. La dimerización del dominio SH2 de Grb2 a través del intercambio de dominios (domain-swapping) se ha observado previamente. La Grb2-SH2 dimérica y monomérica se separaron en una columna Sephacryl S-100 (320 mL) que había sido pre-equilibrada con 0,1 M de fosfato de sodio y 150 mM de NaCl a un pH 8,0. Dos picos se eluyeron, correspondientes a los pesos moleculares del monómero (~14 kDa) y dímero (~28 kDa) de Grb2-SH2. Casi un 60% del dominio Grb2-SH2 L111C se eluyó de la columna como un monómero. Se observó que monómero y dímero separados son sorprendentemente cinéticamente estables, ya que se observó muy poca interconversión durante el transcurso de meses a 4 $^{\circ}\text{C}$. El monómero se concentró utilizando unidades de filtros centrífugos Amicon® Ultra-4 (Millipore) y la concentración final de proteína fue determinada mediante absorbancia a 280nm, utilizando el coeficiente de extinción obtenido por McNemar y colaboradores (15,600M⁻¹). La proteína se congeló a una concentración de 2 mg/mL en alícuotas de 100 μL que fueron descongeladas según se requería para los experimentos. La masa de la proteína monomérica (masa 14170) fue obtenida utilizando ESI-MS.

40 A una solución de proteína modelo (100 μL , [Proteína] 2,0 mg/mL, 100 mM de fosfato de sodio, 150 mM de NaCl pH 8,0) a 0 $^{\circ}\text{C}$ se añadió un reactivo de Ellman (5 μL , 282 mM de solución en H₂O) a 0 $^{\circ}\text{C}$. La mezcla se vortizó durante 1

s y se mantuvo a 0°C durante 10 minutos después de lo cual la mezcla fue analizada mediante LC-MS. El análisis mostró que había ocurrido una única reacción produciendo un único producto con una masa de 14370, lo que mostraba que C111 estaba disponible para su funcionalización.

Ejemplo de referencia 55: Preparación del aducto de GrB2-dominio SH2 L111C/ Bromomaleimida

5



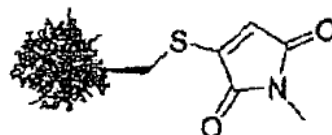
10

A una solución de proteína modelo (100 μ L, [Proteína] 2,0 mg/mL, 100 mM de fosfato de sodio, 150 mM de NaCl, pH 8,0) a 0°C, se añadió bromomaleimida (5 μ L, 2,82 mM de solución en DMF). La mezcla se vortizó durante 1 s y a continuación se mantuvo a 0°C durante 1 h. El análisis utilizando LC-MS mostró que el producto deseado se había formado en conversión cuantitativa (masa 14266).

La mezcla fue tratada con reactivo de Ellman (5 μ L, 282 mM de solución en H₂O) a 0°C. La mezcla se vortizó durante 1 s y se mantuvo a 0°C durante 10 minutos, después de lo cual la mezcla fue analizada mediante LC-MS. El análisis mostró que no se manifestó ninguna reacción con el reactivo de Ellman, lo que puso de relieve que había tenido lugar la funcionalización de la bromomaleimida en C111.

15

Ejemplo de referencia 57: Preparación del aducto GrB2-dominio SH2 L111C/N-Metilbromomaleimida



20

A una solución de proteína modelo (100 μ L, [Proteína] 2,0 mg/mL, 100 mM de fosfato de sodio, 150 mM de NaCl, pH 8,0) a 0°C, se añadió N-metilbromomaleimida (5 μ L, 2,82 mM de solución en DMF). La mezcla se vortizó durante 1 s y a continuación se mantuvo a 0°C durante 1 h. El análisis utilizando LC-MS mostró que el producto deseado se había formado en conversión cuantitativa (masa 14280).

25

La mezcla fue tratada con reactivo de Ellman (5 μ L, 282 mM de solución en H₂O) a 0°C. La mezcla se vortizó durante 1 s y se mantuvo a 0°C durante 10 minutos, después de lo cual la mezcla fue analizada mediante LC-MS. El análisis mostró que no se manifestó ninguna reacción con el reactivo de Ellman, lo que puso de relieve que había tenido lugar la funcionalización de la N-metilbromomaleimida en C111.

Ejemplo de referencia 58: Escisión reductora mediada por fosfina del aducto de GrB2-domino SH2 L111C / Bromomaleimida

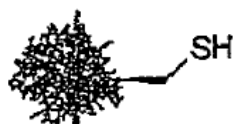


30

A una solución de proteína modelo (100 μ L, [Proteína] 2,0 mg/mL, 100 mM de fosfato de sodio, 150 mM de NaCl, pH 8,0) a 0°C, se añadió bromomaleimida (5 μ L, 2,82 mM de solución en DMF). La mezcla se vortizó durante 1 s y a continuación se mantuvo a 0°C durante 1 h. El análisis utilizando LC-MS mostró una única especie de proteína de masa 14265 que correspondía al aducto proteína / bromomaleimida.

La mezcla fue tratada con TCEP.HCl (5 μ L, 282 mM de solución en H₂O) a 0 °C. La mezcla se vortizó durante 1 s y se mantuvo a 0 °C durante 3 h después de lo cual la mezcla fue analizada mediante LC-MS. El análisis mostró que el aducto de proteína / bromomaleimida había sido escindido limpiamente produciendo el producto deseado (masa = 14169) en una conversión del 80%.

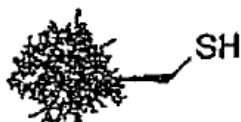
5 **Ejemplo de referencia 59: Escisión reductora mediada por β -Mercaptoetanol del aducto de GrB2-dominio SH2 L111C / Bromomaleimida**



10 A una solución de proteína modelo (100 μ L, [Proteína] 2,0 mg/mL, 100 mM de fosfato de sodio, 150 mM de NaCl, pH 8,0) a 0°C, se añadió bromomaleimida (5 μ L, 2,82 mM de solución en DMF). La mezcla se vortizó durante 1 s y a continuación se mantuvo a 0°C durante 1 h. El análisis utilizando LC-MS mostró una única especie de proteína de masa 14265 que correspondía al aducto proteína / bromomaleimida.

15 La mezcla fue tratada con β -mercaptoetanol (5 μ L, 282 mM de solución en H₂O), se vortizó durante 1 s y se mantuvo a 0 °C durante 4 h. El análisis mostró que el aducto de proteína / bromomaleimida había sido escindido limpiamente produciendo el producto deseado (masa = 14173) en una conversión cuantitativa.

Ejemplo de referencia 60: Escisión reductora mediada por glutatión del aducto de GrB2-dominio SH2 L111C / Bromomaleimida



20 A una solución de proteína modelo (100 μ L, [Proteína] 2,0 mg/mL, 100 mM de fosfato de sodio, 150 mM de NaCl, pH 8,0) a 0°C, se añadió bromomaleimida (5 μ L, 2,82 mM de solución en DMF). La mezcla se vortizó durante 1 s y a continuación se mantuvo a 0°C durante 1 h. El análisis utilizando LC-MS mostró una única especie de proteína de masa 14265 que correspondía al aducto proteína / bromomaleimida.

25 La mezcla fue tratada con glutatión (5 μ L, 282 mM de solución en H₂O) a 0 °C, se vortizó durante 1 s y se mantuvo a 0 °C durante 4 h. El análisis mostró que el aducto de proteína / bromomaleimida había sido escindido limpiamente produciendo el producto deseado (masa = 14173) en una conversión cuantitativa.

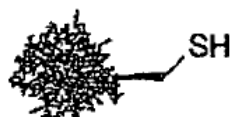
Ejemplo de referencia 61: Escisión reductora mediada por fosfina del aducto de GrB2-dominio SH2 L111C / N-Metilbromomaleimida



30 A una solución de proteína modelo (100 μ L, [Proteína] 2,0 mg/mL, 100 mM de fosfato de sodio, 150 mM de NaCl, pH 8,0) a 0°C, se añadió N-metilbromomaleimida (5 μ L, 2,82 mM de solución en DMF). La mezcla se vortizó durante 1 s y a continuación se mantuvo a 0°C durante 1 h. El análisis utilizando LC-MS mostró una única especie de proteína de masa 14278 que correspondía al aducto proteína / N-metilbromomaleimida.

La mezcla fue tratada con TCEP.HCl (5 μ L, 282 mM de solución en H₂O) a 0 °C. La mezcla se vortizó durante 1 s y se mantuvo a 0 °C durante 3 h después de lo cual la mezcla fue analizada mediante LC-MS. El análisis mostró que el aducto de proteína / N-metilbromomaleimida había sido escindido limpiamente produciendo el producto deseado (masa = 14168) en una conversión del 85%.

5 **Ejemplo de referencia 62: Escisión reductora mediada por β -Mercaptoetanol del aducto de GrB2-dominio SH2 L111C / N-Metilbromomaleimida**



10 A una solución de proteína modelo (100 μ L, [Proteína] 2,0 mg/mL, 100 mM de fosfato de sodio, 150 mM de NaCl, pH 8,0) a 0°C, se añadió N-metilbromomaleimida (5 μ L, 2,82 mM de solución en DMF). La mezcla se vortizó durante 1 s y a continuación se mantuvo a 0°C durante 1 h. El análisis utilizando LC-MS mostró una única especie de proteína de masa 14280 que correspondía al aducto proteína / N-metilbromomaleimida.

15 La mezcla fue tratada con β -Mercaptoetanol (5 μ L, 282 mM de solución en H₂O), se vortizó durante 1 s y se mantuvo a 0 °C durante 4 h. El análisis mostró que el aducto de proteína / N-metilbromomaleimida había sido escindido limpiamente produciendo el producto deseado (masa = 14173) en una conversión cuantitativa.

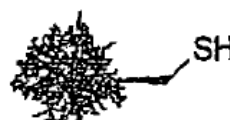
Ejemplo de referencia 63: Escisión mediada por glutatión del aducto de GrB2-dominio SH2 L111C / N-Metilbromomaleimida



20 A una solución de proteína modelo (100 μ L, [Proteína] 2,0 mg/mL, 100 mM de fosfato de sodio, 150 mM de NaCl, pH 8,0) a 0°C, se añadió N-metilbromomaleimida (5 μ L, 2,82 mM de solución en DMF). La mezcla se vortizó durante 1 s y a continuación se mantuvo a 0°C durante 1 h. El análisis utilizando LC-MS mostró una única especie de proteína de masa 14280 que correspondía al aducto de proteína / N-metilbromomaleimida.

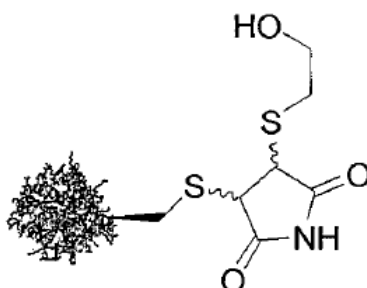
25 La mezcla fue tratada con glutatión (5 μ L, 282 mM de solución en H₂O), se vortizó durante 1 s y se mantuvo a 0 °C durante 4 h. El análisis mostró que el aducto de proteína / N-metilbromomaleimida había sido escindido limpiamente produciendo el producto deseado (masa = 14173) en una conversión cuantitativa.

Ejemplo de referencia 64: Escisión mediada por Etanoditiol del aducto de GrB2-dominio SH2 L111C / bromomaleimida



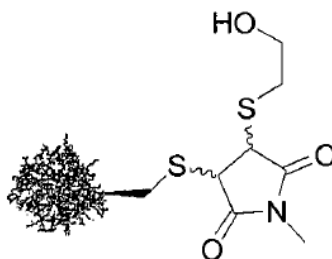
30 A una solución de proteína modelo (100 μ L, [Proteína] 2,0 mg/mL, 100 mM de fosfato de sodio, 150 mM de NaCl, pH 8,0) a 0°C, se añadió bromomaleimida (5 μ L, 2,82 mM de solución en DMF). La mezcla se vortizó durante 1 s y a continuación se mantuvo a 0°C durante 1 h. El análisis utilizando LC-MS mostró una única especie de proteína de masa 14265 que correspondía al aducto proteína / bromomaleimida.

35 La mezcla fue tratada con etanoditiol (5 μ L, 282 mM de solución en H₂O), se vortizó durante 1 s y se mantuvo a 37 °C durante 4 h. El análisis mostró que el aducto de proteína / bromomaleimida había sido escindido limpiamente produciendo el producto deseado (masa = 14173) en una conversión cuantitativa.

Ejemplo de referencia 65: Preparación del aducto de Grb2-dominio SH2 L111C / Bromomaleimida / 2-Mercaptoetanol

5 A una solución de proteína modelo (100 μ L, [Proteína] 2,0 mg/mL, 100 mM de fosfato de sodio, 150 mM de NaCl, pH 8,0) a 0°C, se añadió bromomaleimida (5 μ L, 2,82 mM de solución en DMF). La mezcla se vortizó durante 1 s y a continuación se mantuvo a 0°C durante 1 h. El análisis utilizando LC-MS mostró una única especie de proteína de masa 14265 que correspondía al aducto proteína / bromomaleimida.

10 La mezcla fue tratada con 2-mercaptoetanol (5 μ L, 2,82 mM de solución en H₂O) a 0 °C. La mezcla se vortizó durante 1 s y se mantuvo a 0 °C durante 3 h, después de lo cual la mezcla se analizó mediante LC-MS. El análisis mostró que el aducto de proteína / bromomaleimida / 2-mercaptoetanol se había formado (masa = 14345) en un rendimiento del 54%. El material restante era GrB2-dominio SH2 L111C.

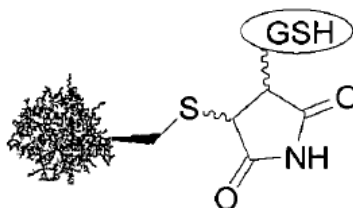
Ejemplo de referencia 66(a): Preparación del aducto de GrB2-dominio SH2 L111C / N-Metilbromomaleimida / 2-mercaptoetanol

15 A una solución de proteína modelo (100 μ L, [Proteína] 2,0 mg/mL, 100 mM de fosfato de sodio, 150 mM de NaCl, pH 8,0) a 0°C, se añadió N-metilbromomaleimida (5 μ L, 2,82 mM de solución en DMF). La mezcla se vortizó durante 1 s y a continuación se mantuvo a 0°C durante 1 h. El análisis utilizando LC-MS mostró una única especie de proteína de masa 14278 que correspondía al aducto proteína / N-metilbromomaleimida.

20 La mezcla fue tratada con 2-mercaptoetanol (5 μ L, 2,82 mM de solución en H₂O) a 0°C. La mezcla se vortizó durante 1 s y se mantuvo a 0 °C durante 3 h, después de lo cual la mezcla se analizó mediante LC-MS. El análisis mostró que el producto deseado (masa 14359) se había formado en un rendimiento del 90%. El material restante era GrB2-dominio SH2 L111C.

Ejemplo de referencia 66(b): Preparación del aducto de GrB2-dominio SH2 L111C / Bromomaleimida / Glutatión

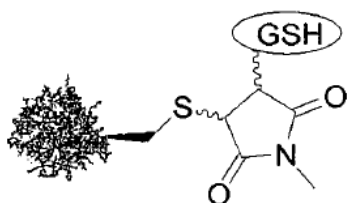
25



5 A una solución de proteína modelo (100 μ L, [Proteína] 2,0 mg/mL, 100 mM de fosfato de sodio, 150 mM de NaCl, pH 8,0) a 0°C, se añadió bromomaleimida (5 μ L, 2,82 mM de solución en DMF). La mezcla se vortizó durante 1 s y a continuación se mantuvo a 0°C durante 1 h. El análisis utilizando LC-MS mostró una única especie de proteína de masa 14265 que corresponde al aducto proteína / bromomaleimida.

La mezcla fue tratada con glutatión (5 μ L, 2,82 mM de solución en H₂O) a 0°C. La mezcla se vortizó durante 1 s y se mantuvo a 0 °C durante 3 h, después de lo cual la mezcla se analizó mediante LC-MS. El análisis mostró que el aducto de proteína / bromomaleimida / glutatión se había formado (masa = 14574) en una conversión del 44%. El material restante era GrB2-dominio SH2 L111C.

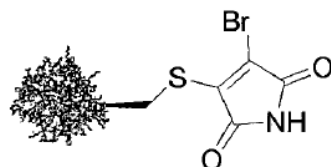
10 **Ejemplo de referencia 66(c): Preparación del aducto de GrB2-dominio SH2 L111C / N-Metilbromomaleimida / Glutatión**



15 A una solución de proteína modelo (100 μ L, [Proteína] 2,0 mg/mL, 100 mM de fosfato de sodio, 150 mM de NaCl, pH 8,0) a 0°C, se añadió N-metilbromomaleimida (5 μ L, 2,82 mM de solución en DMF). La mezcla se vortizó durante 1 s y a continuación se mantuvo a 0°C durante 1 h. El análisis utilizando LC-MS mostró una única especie de proteína de masa 14278 que correspondía al aducto proteína / N-metilbromomaleimida.

20 La mezcla fue tratada con 2-mercaptoetanol (5 μ L, 2,82 mM de solución en H₂O) a 0°C. La mezcla se vortizó durante 1 s y se mantuvo a 0 °C durante 3 h, después de lo cual la mezcla se analizó mediante LC-MS. El análisis mostró que el aducto de proteína / N-metilbromomaleimida / glutatión se había formado (masa = 14588) en una conversión del 95%. El material restante era GrB2-dominio SH2 L111C.

Ejemplo de referencia 67(a): Preparación del aducto de GrB2-dominio SH2 L111C / Dibromomaleimida



25 A una solución de proteína modelo (100 μ L, [Proteína] 2,0 mg/mL, 100 mM de fosfato de sodio, 150 mM de NaCl, pH 8,0) a 0°C, se añadió N-metilbromomaleimida (5 μ L, 2,82 mM de solución en DMF). La mezcla se vortizó durante 1 s y a continuación se mantuvo a 0°C durante 4 h. El análisis utilizando LC-MS mostró que el producto deseado se había formado en un rendimiento cuantitativo (masa 14345).

Ejemplo de referencia 67(b): Escisión reductora mediada por 2-Mercaptoetanol del aducto de GrB2-dominio SH2 L111C / Dibromomaleimida

30



5 A una solución de proteína modelo (100 μ L, [Proteína] 2,0 mg/mL, 100 mM de fosfato de sodio, 150 mM de NaCl, pH 8,0) a 0°C, se añadió dibromomaleimida (5 μ L, 2,82 mM de solución en DMF). La mezcla se vortizó durante 1 s y a continuación se mantuvo a 0°C durante 4 h. El análisis utilizando LC-MS mostró una única especie de proteína de masa 14346 que correspondía al aducto proteína / dibromomaleimida.

La mezcla fue tratada con 2-mercaptoetanol (5 μ L, 282 mM de solución en H₂O) a 0 °C. La mezcla se vortizó durante 1 s y se mantuvo a 0 °C durante 4 h, después de lo cual la mezcla fue analizada mediante LC-MS. El análisis mostró que el aducto de proteína / bromomaleimida había sido escindido limpiamente produciendo el producto deseado (masa = 14171) en un rendimiento cuantitativo.

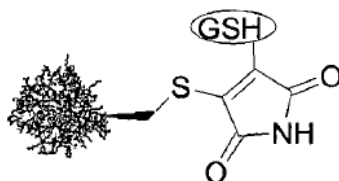
10 **Ejemplo de referencia 67 (c):** Escisión reductora mediada por glutatión del aducto de GrB2-dominio SH2 L111C / Dibromomaleimida



15 A una solución de proteína modelo (100 μ L, [Proteína] 2,0 mg/mL, 100 mM de fosfato de sodio, 150 mM de NaCl, pH 8,0) a 0°C, se añadió dibromomaleimida (5 μ L, 2,82 mM de solución en DMF). La mezcla se vortizó durante 1 s y a continuación se mantuvo a 0 °C durante 4 h. El análisis utilizando LC-MS mostró una única especie de proteína de masa 14346 que correspondía al aducto proteína / dibromomaleimida.

20 La mezcla fue tratada con glutatión (5 μ L, 282 mM de solución en H₂O) a 0 °C. La mezcla se vortizó durante 1 s y se mantuvo a 0 °C durante 4 h, después de lo cual la mezcla se analizó mediante LC-MS. El análisis mostró que el aducto de proteína / bromomaleimida había sido escindido limpiamente produciendo el producto deseado (masa = 14170) en conversión cuantitativa.

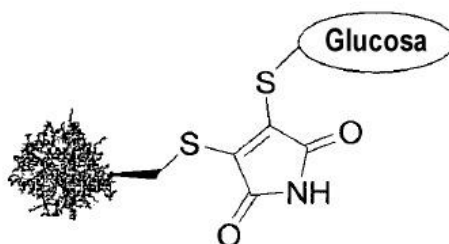
Ejemplo de referencia 68(a): Preparación del aducto de GrB2-dominio SH2 L111C / Dibromomaleimida / Glutatión



25 A una solución de proteína modelo (100 μ L, [Proteína] 2,0 mg/mL, 100 mM de fosfato de sodio, 150 mM de NaCl, pH 8,0) a 0°C, se añadió dibromomaleimida (5 μ L, 2,82 mM de solución en DMF). La mezcla se vortizó durante 1 s y a continuación se mantuvo a 0°C durante 4 h. El análisis utilizando LC-MS mostró una única especie de proteína de masa 14346 que correspondía al aducto proteína / dibromomaleimida.

30 La mezcla fue tratada con glutatión (5 μ L, 2,82 mM de solución en H₂O) a 0 °C. La mezcla se vortizó durante 1 s y se mantuvo a 0 °C durante 2 h, después de lo cual la mezcla se analizó mediante LC-MS. El análisis mostró que se había formado el producto deseado (masa = 14573) en conversión cuantitativa.

Ejemplo de referencia 68(b): Preparación del aducto de GrB2-dominio SH2 L111C / Dibromomaleimida / β -1-Tioglucosa



5 A una solución de proteína modelo (100 μ L, [Proteína] 2,0 mg/mL, 100 mM de fosfato de sodio, 150 mM de NaCl, pH 8,0) a 0°C, se añadió dibromomaleimida (5 μ L, 2,82 mM de solución en DMF). La mezcla se vortizó durante 1 s y a continuación se mantuvo a 0°C durante 4 h. El análisis utilizando LC-MS mostró una única especie de proteína de masa 14346 que correspondía al aducto proteína / dibromomaleimida.

La mezcla fue tratada con β -1-tioglucosa, sal sódica (5 μ L, 2,82 mM de solución en H₂O) a 0 °C. La mezcla se vortizó durante 1 s y se mantuvo a 0 °C durante 2 h, después de lo cual la mezcla se analizó mediante LC-MS. El análisis mostró que el producto deseado (masa = 14461) se formó en un rendimiento casi cuantitativo.

10 **Ejemplo de referencia 69(a):** Escisión mediada por glutatión del aducto de GrB2-dominio SH2 L111C / Dibromomaleimida / Glutatión



15 A una solución de proteína modelo (100 μ L, [Proteína] 2,0 mg/mL, 100 mM de fosfato de sodio, 150 mM de NaCl, pH 8,0) a 0°C, se añadió dibromomaleimida (5 μ L, 2,82 mM de solución en DMF). La mezcla se vortizó durante 1 s y a continuación se mantuvo a 0°C durante 4 h. El análisis utilizando LC-MS mostró una única especie de proteína de masa 14346 que correspondía al aducto proteína / dibromomaleimida.

La mezcla fue tratada con glutatión (5 μ L, 2,82 mM de solución en H₂O) a 0 °C. La mezcla se vortizó durante 1 s y se mantuvo a 0 °C durante 2 h, después de lo cual la mezcla de analizó mediante LC-MS. El análisis mostró que el aducto de proteína / dibromomaleimida / glutatión fue la única especie de proteína presente (masa = 14573).

20 La mezcla fue tratada con glutatión (5 μ L, 282 mM de solución en H₂O) a 0 °C. La mezcla se vortizó durante 1 s y se mantuvo a 0 °C durante 4 h, después de lo cual la mezcla fue analizada mediante LC-MS. El análisis mostró que el producto deseado (masa = 14173) se formó en un rendimiento cuantitativo.



25 A una solución de proteína modelo (100 μ L, [Proteína] 2,0 mg/mL, 100 mM de fosfato de sodio, 150 mM de NaCl, pH 8,0) a 0°C, se añadió dibromomaleimida (5 μ L, 2,82 mM de solución en DMF). La mezcla se vortizó durante 1 s y a continuación se mantuvo a 0°C durante 4 h. El análisis utilizando LC-MS mostró una única especie de proteína de masa 14346 que correspondía al aducto proteína / dibromomaleimida.

30 La mezcla fue tratada con glutatión (5 μ L, 2,82 mM de solución en H₂O) a 0 °C. La mezcla se vortizó durante 1 s y se mantuvo a 0 °C durante 2 h, después de lo cual la mezcla se analizó mediante LC-MS. El análisis mostró que el aducto de proteína / dibromomaleimida / glutatión fue la única especie de proteína presente (masa = 14573).

La mezcla fue tratada con glutatión (5 μ L, 100 mM de solución en H₂O) a 0 °C. La mezcla se vortizó durante 1 s y se mantuvo a 0 °C durante 4 h, después de lo cual la mezcla se analizó mediante LC-MS. El análisis mostró que el producto deseado (masa = 14173) se formó en un rendimiento cuantitativo.

5 **Ejemplo de referencia 69(c): Escisión mediada por Glutatión del aducto de GrB2-dominio SH2 L111C / Dibromomaleimida / Glutatión a una concentración de Glutatión fisiológicamente relevante (1 mM)**



10 A una solución de proteína modelo (100 μ L, [Proteína] 2,0 mg/mL, 100 mM de fosfato de sodio, 150 mM de NaCl, pH 8,0) a 0°C, se añadió dibromomaleimida (5 μ L, 2,82 mM de solución en DMF). La mezcla se vortizó durante 1 s y a continuación se mantuvo a 0°C durante 4 h. El análisis utilizando LC-MS mostró una única especie de proteína de masa 14346 que correspondía al aducto proteína / dibromomaleimida.

La mezcla fue tratada con glutatión (5 μ L, 2,82 mM de solución en H₂O) a 0 °C. La mezcla se vortizó durante 1 s y se mantuvo a 0 °C durante 2 h, después de lo cual la mezcla se analizó mediante LC-MS. El análisis mostró que el aducto de proteína / dibromomaleimida / Glutatión era la única especie de proteína presente (masa = 14573).

15 La solución del aducto de proteína / dibromomaleimida / glutatión se sometió a un intercambio de tampón (Micro Bio-Spin 6 cromatografía en columna, Bio-Rad) produciendo el aducto (95 μ L, [aducto] 0,2 mg/mL, 20 mM de HEPES, 100 mM de KCl, 1 mM de MgCl₂, 1 mM de EDTA, pH 7,4). A esto se añadió glutatión (5 μ L, 20 mM de solución en 20 mM de HEPES, 100 mM de KCl, 1 mM de MgCl₂, 1 mM de EDTA, pH 7,4). La mezcla se vortizó durante 1 s y a continuación se mantuvo a 37 °C durante 4 h. El análisis mostró que Grb2-SH2 (L111C) se formó (masa) 14170) en conversión cuantitativa.

20

Ejemplo de referencia 69(d): Escisión mediada por β -Mercaptoetanol del aducto de GrB2-dominio SH2 L111C / Dibromomaleimida / Glutatión



25 A una solución de proteína modelo (100 μ L, [Proteína] 2,0 mg/mL, 100 mM de fosfato de sodio, 150 mM de NaCl, pH 8,0) a 0°C, se añadió dibromomaleimida (5 μ L, 2,82 mM de solución en DMF). La mezcla se vortizó durante 1 s y a continuación se mantuvo a 0°C durante 4 h. El análisis utilizando LC-MS mostró una única especie de proteína de masa 14346 que correspondía al aducto proteína / dibromomaleimida.

30 La mezcla fue tratada con glutatión (5 μ L, 2,82 mM de solución en H₂O) a 0 °C. La mezcla se vortizó durante 1 s y se mantuvo a 0 °C durante 2 h, después de lo cual la mezcla se analizó mediante LC-MS. El análisis mostró que el aducto de proteína / dibromomaleimida / Glutatión era la única especie de proteína presente (masa = 14573).

La mezcla fue tratada con β -mercaptoetanol (5 μ L, 282 mM de solución en H₂O) a 0 °C. La mezcla se vortizó durante 1 s y se mantuvo a 0 °C durante 4 h, después de lo cual la mezcla se analizó mediante LC-MS. El análisis mostró que el producto deseado (masa = 14172) se formó en un rendimiento cuantitativo.

35 **Ejemplo de referencia 69(e): Escisión mediada por Glutatión del aducto de GrB2-dominio SH2 L111C / Dibromomaleimida / β -1-tioglucoasa**



5 A una solución de proteína modelo (100 μ L, [Proteína] 2,0 mg/mL, 100 mM de fosfato de sodio, 150 mM de NaCl, pH 8,0) a 0°C, se añadió dibromomaleimida (5 μ L, 2,82 mM de solución en DMF). La mezcla se vortizó durante 1 s y a continuación se mantuvo a 0°C durante 4 h. El análisis utilizando LC-MS mostró una única especie de proteína de masa 14346 que correspondía al aducto proteína / dibromomaleimida.

La mezcla fue tratada con β -1-tioglucona (5 μ L, 2,82 mM de solución en H₂O) a 0 °C. La mezcla se vortizó durante 1 s y se mantuvo a 0 °C durante 2 h, después de lo cual la mezcla se analizó mediante LC-MS. El análisis mostró que el aducto de proteína / dibromomaleimida / β -1-tioglucona era la única especie de proteína presente (masa = 14461).

10 La mezcla fue tratada con glutatión (5 μ L, 282 mM de solución en H₂O) a 0 °C. La mezcla se vortizó durante 1 s y se mantuvo a 0 °C durante 4 h, después de lo cual la mezcla se analizó mediante LC-MS. El análisis mostró que el producto deseado (masa = 14173) se formó en conversión cuantitativa.

Ejemplo de referencia 69(f): Escisión mediada por β -Mercaptoetanol del aducto de GrB2-dominio SH2 L111C / Dibromomaleimida / β -1-tioglucona

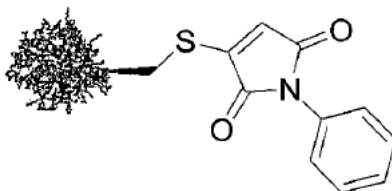


15 A una solución de proteína modelo (100 μ L, [Proteína] 2,0 mg/mL, 100 mM de fosfato de sodio, 150 mM de NaCl, pH 8,0) a 0°C, se añadió dibromomaleimida (5 μ L, 2,82 mM de solución en DMF). La mezcla se vortizó durante 1 s y a continuación se mantuvo a 0°C durante 4 h. El análisis utilizando LC-MS mostró una única especie de proteína de masa 14346 que correspondía al aducto proteína / dibromomaleimida.

20 La mezcla fue tratada con β -1-tioglucona (5 μ L, 2,82 mM de solución en H₂O) a 0 °C. La mezcla se vortizó durante 1 s y se mantuvo a 0 °C durante 2 h, después de lo cual la mezcla se analizó mediante LC-MS. El análisis mostró que el aducto de proteína / dibromomaleimida / β -1-tioglucona era la única especie de proteína presente (masa = 14461).

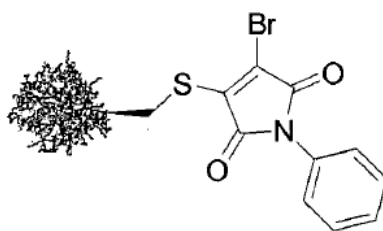
La mezcla fue tratada con β -mercaptoetanol (5 μ L, 282 mM de solución en H₂O) a 0 °C. La mezcla se vortizó durante 1 s y se mantuvo a 0 °C durante 4 h, después de lo cual la mezcla se analizó mediante LC-MS. El análisis mostró que el producto deseado (masa = 14172) se formó en conversión cuantitativa.

25 **Ejemplo de referencia 70:** Preparación del aducto de GrB2-dominio SH2 L111C / N-Fenilbromomaleimida



30 A una solución de proteína modelo (100 μ L, [Proteína] 2,0 mg/mL, 100 mM de fosfato de sodio, 150 mM de NaCl, pH 8,0) a 0°C, se añadió N-fenilbromomaleimida (5 μ L, 2,82 mM de solución en DMF). La mezcla se vortizó durante 1 s y a continuación se mantuvo a 0°C durante 1 h. El análisis utilizando LC-MS mostró que el producto deseado se había formado en un rendimiento cuantitativo (masa 14351).

Ejemplo de referencia 71(a): Preparación del aducto de GrB2-dominio SH2 L111C / N-Fenildibromomaleimida



5 A una solución de proteína modelo (100 μ L, [Proteína] 2,0 mg/mL, 20 mM de MES, 150 mM de NaCl, pH 6) a 0°C, se añadió N-fenilbromomaleimida (5 μ L, 2,82 mM de solución en DMF). La mezcla se vortizó durante 1 s y a continuación se mantuvo a 0°C durante 1 h. El análisis utilizando LC-MS mostró que el producto deseado se había formado en un rendimiento cuantitativo (masa 14431).

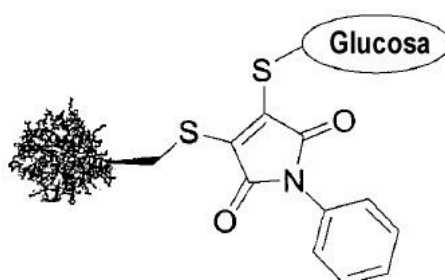
Ejemplo de referencia 71(b): Escisión mediada por β -Mercaptoetanol del aducto de GrB2-dominio SH2 L111C / N-Fenildibromomaleimida



10 A una solución de proteína modelo (100 μ L, [Proteína] 2,0 mg/mL, 20 mM de MES, 150 mM de NaCl, pH 6) a 0°C, se añadió N-fenilbromomaleimida (5 μ L, 2,82 mM de solución en DMF). La mezcla se vortizó durante 1 s y a continuación se mantuvo a 0°C durante 1 h. El análisis utilizando LC-MS mostró que el aducto de proteína / N-fenildibromomaleimida se había formado en un rendimiento cuantitativo (masa 14431).

15 La mezcla fue tratada con β -mercaptoetanol (5 μ L, 282 mM de solución en H₂O) a 0 °C. La mezcla se vortizó durante 1 s y se mantuvo a 0 °C durante 4 h, después de lo cual la mezcla se analizó mediante LC-MS. El análisis mostró que el producto deseado (masa = 14179) se formó en conversión cuantitativa.

Ejemplo de referencia 72(a): Preparación del aducto de GrB2-dominio SH2 L111C / N Fenildibromomaleimida / β -1-tioglucosa



20 A una solución de proteína modelo (100 μ L, [Proteína] 2,0 mg/mL, 20 mM de MES, 150 mM de NaCl, pH 6) a 0°C, se añadió N-fenilbromomaleimida (5 μ L, 2,82 mM de solución en DMF). La mezcla se vortizó durante 1 s y a continuación se mantuvo a 0°C durante 1 h. El análisis utilizando LC-MS mostró que el aducto de proteína / N-fenildibromomaleimida se había formado en un rendimiento cuantitativo (masa 14431).

25 La mezcla fue tratada con β -1-tioglucosa (5 μ L, 2,82 mM de solución en H₂O) a 0 °C. La mezcla se vortizó durante 1 s y se mantuvo a 0 °C durante 2 h, después de lo cual la mezcla se analizó mediante LC-MS. El análisis mostró que el aducto de proteína / N-fenildibromomaleimida / β -1-tioglucosa era la única especie de proteína presente (masa = 14547).

Ejemplo de referencia 72(b): Escisión mediada por β -Mercaptoetanol del aducto de GrB2-dominio SH2 L111C / N-Fenildibromomaleimida / β -1-tioglucosa

30

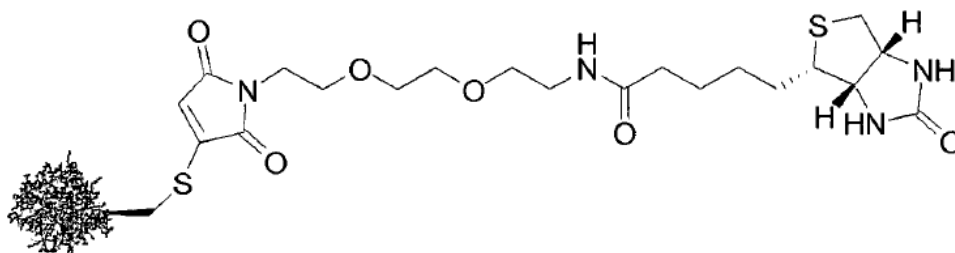


5 A una solución de proteína modelo (100 μ L, [Proteína] 2,0 mg/mL, 20 mM de MES, 150 mM de NaCl, pH 6) a 0°C, se añadió *N*-fenilbromomaleimida (5 μ L, 2,82 mM de solución en DMF). La mezcla se vortizó durante 1 s y a continuación se mantuvo a 0°C durante 1 h. El análisis utilizando LC-MS mostró que el aducto de proteína / *N*-fenildibromomaleimida se había formado en un rendimiento cuantitativo (masa 14431).

La mezcla fue tratada con β -1-tioglucosa (5 μ L, 2,82 mM de solución en H₂O) a 0 °C. La mezcla se vortizó durante 1 s y se mantuvo a 0 °C durante 2 h, después de lo cual la mezcla se analizó mediante LC-MS. El análisis mostró que el aducto de proteína / *N*-fenildibromomaleimida / β -1-tioglucosa era la única especie de proteína presente (masa = 14547).

10 La mezcla fue tratada con β -mercaptoetanol (5 μ L, 282 mM de solución en H₂O) a 0 °C. La mezcla se vortizó durante 1 s y se mantuvo a 0 °C durante 4 h, después de lo cual la mezcla se analizó mediante LC-MS. El análisis mostró que el producto deseado (masa = 14178) se formó en conversión cuantitativa.

Ejemplo de referencia 72(c): Preparación del aducto de GrB2-dominio SH2 L111C / Biotina-PEG-bromomaleimida



15 A una solución de proteína modelo (100 μ L, [Proteína] 2,0 mg/mL, 100 mM de fosfato de sodio, 150 mM de NaCl, pH 8,0) a 0°C, se añadió biotina-PEG-bromomaleimida (5 μ L, 2,82 mM de solución en DMF). La mezcla se vortizó durante 1 s y a continuación se mantuvo a 0°C durante 1 h. El análisis utilizando LC-MS mostró que el producto deseado se había formado en un rendimiento cuantitativo (masa 14634).

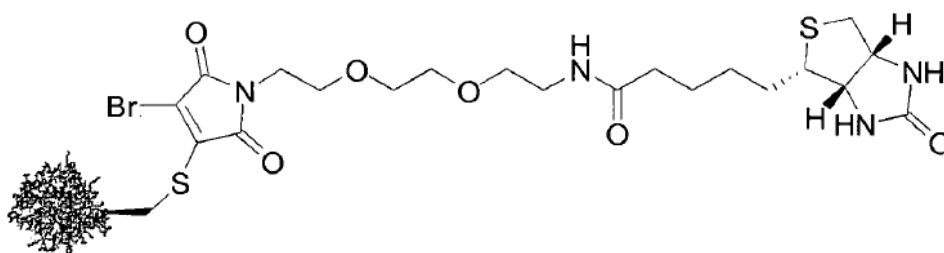
20 **Ejemplo de referencia 72(d):** Escisión mediada por β -Mercaptoetanol del aducto de GrB2-dominio SH2 L111C / Biotina-PEG-bromomaleimida



25 A una solución de proteína modelo (100 μ L, [Proteína] 2,0 mg/mL, 100 mM de fosfato de sodio, 150 mM de NaCl, pH 8,0) a 0°C, se añadió biotina-PEG-bromomaleimida (5 μ L, 2,82 mM de solución en DMF). La mezcla se vortizó durante 1 s y a continuación se mantuvo a 0°C durante 1 h. El análisis utilizando LC-MS mostró que el aducto de proteína / biotina-PEG-bromomaleimida se había formado en un rendimiento cuantitativo (masa 14634).

30 La mezcla fue tratada con β -mercaptoetanol (5 μ L, 282 mM de solución en H₂O) a 37 °C. La mezcla se vortizó durante 1 s y se mantuvo a 37 °C durante 4 h, después de lo cual la mezcla se analizó mediante LC-MS. El análisis mostró que el producto deseado (masa = 14180) se formó en conversión cuantitativa.

Ejemplo de referencia 72(e): Preparación del aducto de GrB2-dominio SH2 L111C / Biotina-PEG-dibromomaleimida



5 A una solución de proteína modelo (100 μ L, [Proteína] 2,0 mg/mL, 100 mM de fosfato de sodio, 150 mM de NaCl, pH 8,0) a 0°C, se añadió biotina-PEG-bromomaleimida (5 μ L, 2,82 mM de solución en DMF). La mezcla se vortizó durante 1 s y a continuación se mantuvo a 0°C durante 2 h. El análisis utilizando LC-MS mostró que el producto deseado se había formado en un rendimiento de >80% (masa 14701).

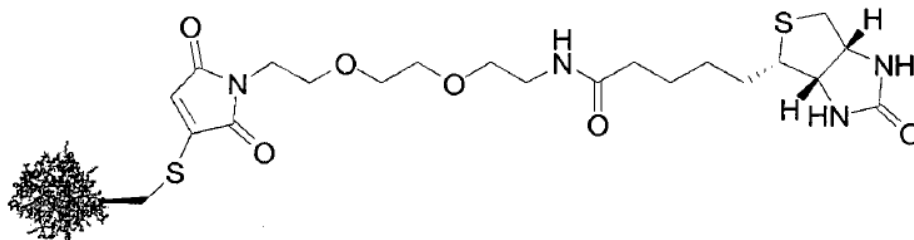
Ejemplo de referencia 72(f): Escisión mediada por β -Mercaptoetanol del aducto de GrB2-dominio SH2 L111C / Biotina-PEG-dibromomaleimida



10 A una solución de proteína modelo (100 μ L, [Proteína] 2,0 mg/mL, 100 mM de fosfato de sodio, 150 mM de NaCl, pH 8,0) a 0°C, se añadió biotina-PEG-bromomaleimida (5 μ L, 2,82 mM de solución en DMF). La mezcla se vortizó durante 1 s y a continuación se mantuvo a 0°C durante 1 h. El análisis utilizando LC-MS mostró que el aducto proteína / biotina-PEG-dibromomaleimida se había formado en un rendimiento de >80% (masa 14701).

15 La mezcla fue tratada con β -mercaptoetanol (5 μ L, 282 mM de solución en H₂O) a 0 °C. La mezcla se vortizó durante 1 s y se mantuvo a 0 °C durante 4 h, después de lo cual la mezcla se analizó mediante LC-MS. El análisis mostró que el producto deseado (masa = 14171) se formó en una conversión de >80%.

Ejemplo de referencia 72(g): Arrastre o "Pull-Down" y liberación del aducto de GrB2-dominio SH2 L111C / Biotina-PEG-bromomaleimida sobre perlas de agarosa recubiertas con Neutraavidina



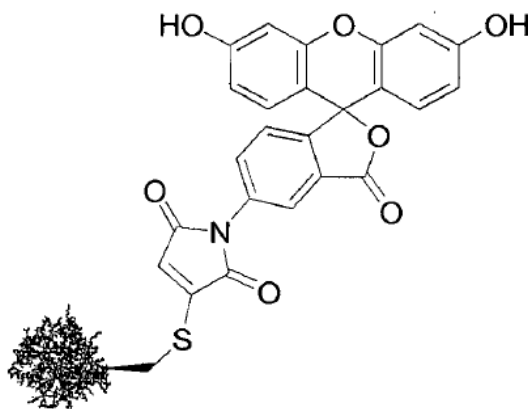
20 A una solución de proteína modelo (200 μ L, [Proteína] 1,0 mg/mL, 100 mM de fosfato de sodio, 150 mM de NaCl, pH 8,0) a 0°C, se añadió biotina-PEG-bromomaleimida (5 μ L, 2,82 mM de solución en DMF). La mezcla se vortizó durante 1 s y a continuación se mantuvo a 0°C durante 1 h. El análisis utilizando LC-MS mostró que el producto deseado se había formado en un rendimiento cuantitativo (masa 14634).

25 El aducto de proteína / biotina-PEG-bromomaleimida (200 μ L) y la proteína modelo no modificada (200 μ L) se lavaron independientemente con tampón PBS (3 x 500 μ L) en un concentrador (Vivaspin, corte de 10k) produciendo soluciones de proteínas (300 μ L) (**In**). Para cada una de las soluciones de proteínas obtenidas, se lavaron perlas de agarosa recubiertas con neutraavidina (750 μ L de suspensión acuosa al 50%) con PBS (2 x 500 μ L). La solución de proteínas (300 μ L) se añadió a continuación a las perlas y la mezcla se incubó a 4°C durante 30 minutos. La mezcla se centrifugó y las fracciones no retenidas o "flow-through" (**FT**) se recogieron. Las perlas se lavaron con PBS (2 x 500 μ L) y ambas fracciones del lavado se recogieron (**L1** y **L2**). La proteína se liberó de las perlas mediante incubación en PBS (300 μ L) que contenía β -mercaptoetanol (25 mM) durante 2 h a 37°C. La muestra se centrifugó y

el eluyente (EI) que contenía GrB2-dominio SH2 L111C escindido, se recogió. Los resultados se muestran en la Figura 1.

- 5 La cantidad de proteína recuperada se determinó como un 44% por comparación con una dilución en serie de proteínas a través de densitometría. Sin embargo, al corregir para proteína fisisorbida de forma irreversible (determinada utilizando la proteína de control no modificada) la recuperación correcta fue del 71%.

Ejemplo de referencia 72(h): Preparación del aducto de GrB2-dominio SH2 L111C / *N*-Fluoresceína bromomaleimida



- 10 A una solución de proteína modelo (100 μ L, [Proteína] 2,0 mg/mL, 100 mM de fosfato de sodio, 150 mM de NaCl, pH 7,0) a 0°C, se añadió *N*-fluoresceína bromomaleimida (5 μ L, 2,82 mM de solución en DMF). La mezcla se vortizó durante 1 s y a continuación se mantuvo a 0°C durante 1 h. El análisis utilizando LC-MS mostró que el producto deseado se había formado en una conversión del 90% (masa 14597).

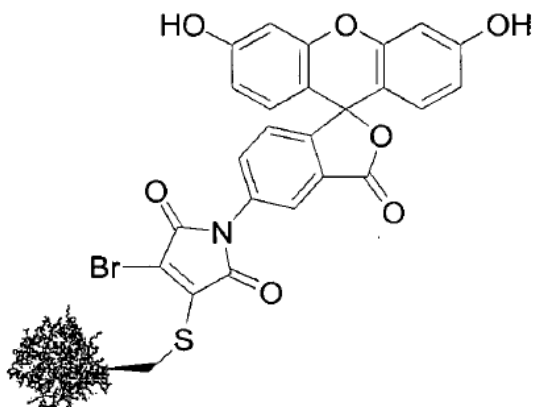
- 15 **Ejemplo de referencia 72(i):** Escisión mediada por β -Mercaptoetanol del aducto de GrB2-dominio SH2 L111C / *N*-Fluoresceína bromomaleimida



- 20 A una solución de proteína modelo (100 μ L, [Proteína] 2,0 mg/mL, 100 mM de fosfato de sodio, 150 mM de NaCl, pH 7,0) a 0°C, se añadió *N*-fluoresceína bromomaleimida (5 μ L, 2,82 mM de solución en DMF). La mezcla se vortizó durante 1 s y a continuación se mantuvo a 0°C durante 1 h. El análisis utilizando LC-MS mostró que el aducto de proteína / fluoresceína bromomaleimida se había formado en una conversión del 90% (masa 14597).

La mezcla fue tratada con β -mercaptoetanol (5 μ L, 282 mM de solución en H₂O) a 37 °C. La mezcla se vortizó durante 1 s y se mantuvo a 37 °C durante 4 h, después de lo cual la mezcla se analizó mediante LC-MS. El análisis mostró que el producto deseado (masa = 14171) se formó en una conversión del 87%.

- 25 **Ejemplo de referencia 72(j):** Preparación del aducto de GrB2-dominio SH2 L111C / *N*-Fluoresceína dibromomaleimida



- 5 A una solución de proteína modelo (100 μ L, [Proteína] 2,0 mg/mL, 100 mM de fosfato de sodio, 150 mM de NaCl, pH 8,0) a 0°C, se añadió *N*-fluoresceína bromomaleimida (5 μ L, 2,82 mM de solución en DMF). La mezcla se vortizó durante 1 s y a continuación se mantuvo a 0°C durante 1 h. El análisis utilizando LC-MS mostró que el producto deseado se había formado en una conversión del 61% (masa 14675).

Ejemplo de referencia 72(k): Escisión mediada por β -Mercaptoetanol del aducto de GrB2-dominio SH2 L111C / *N*-Fluoresceína dibromomaleimida

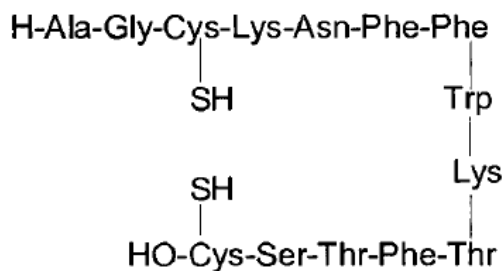


- 10 A una solución de proteína modelo (100 μ L, [Proteína] 2,0 mg/mL, 100 mM de fosfato de sodio, 150 mM de NaCl, pH 7,0) a 0°C, se añadió *N*-fluoresceína bromomaleimida (5 μ L, 2,82 mM de solución en DMF). La mezcla se vortizó durante 1 s y a continuación se mantuvo a 0°C durante 1 h. El análisis utilizando LC-MS mostró que el aducto proteína / fluoresceína dibromomaleimida se había formado en una conversión del 61% (masa 14597).

- 15 La mezcla fue tratada con β -mercaptoetanol (5 μ L, 282 mM de solución en H₂O) a 37 °C. La mezcla se vortizó durante 1 s y se mantuvo a 37 °C durante 4 h, después de lo cual la mezcla se analizó mediante LC-MS. El análisis mostró que el producto deseado (masa = 14171) se formó en una conversión del 85%.

Ejemplo 39: Modificación y regeneración de la somatostatina

Preparación de somatostatina reducida



- 20 Se solubilizó somatostatina liofilizada (masa 1638) en un tampón (50 mM de fosfato de sodio, pH 6,2, MeCN al 40 %, DMF al 2,5 %) para producir una concentración de 152,6 μ M (0,25 mg/ml) y se redujo con 1,1 equiv de TCEP durante 1 h a temperatura ambiente. Se confirmó que la reducción se había completado mediante adición de 4 equiv de dibromomaleimida a un alícuota de la muestra y con el análisis mediante LC-MS.

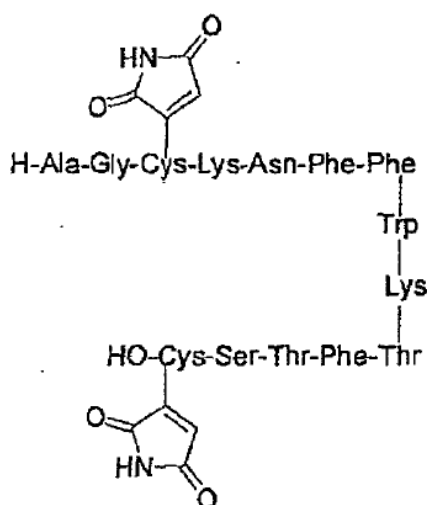
- 25 *Unión por puente de la Somatostatina con Halomaleimidias y Derivados*

Se generó somatostatina reducida según se ha descrito. 1,1 equiv de derivados de las halomaleimidias o dibromomaleimida (100 x soluciones madre en 50 mM de fosfato de sodio, pH 6,2, MeCN al 40 %, DMF al 2,5-15,0 %) se añadieron a temperatura ambiente y la generación del producto se monitorizó durante 1 h por LC-MS. Los resultados se muestran en la Figura 2.

5 *Unión por puente de la somatostatina con ditiomaleimidias*

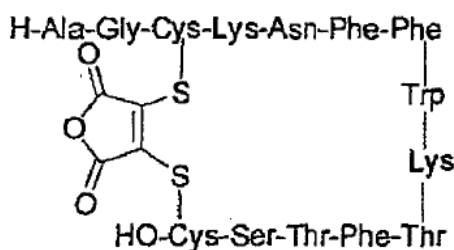
Se generó somatostatina reducida según se ha descrito. Diversas cantidades de ditiomaleimida (100 x soluciones madre en 50 mM de fosfato de sodio, pH 6,2, MeCN al 40 %, DMF al 2,5-7,5 %) se añadieron a temperatura ambiente y la generación del producto se monitorizó durante 1 h por LC-MS. Los resultados se muestran en la Figura 3.

10 *Modificación de somatostatina con Bromomaleimida*



Se generó somatostatina reducida según se ha descrito. 2,1 equiv de bromomaleimida (100 x solución madre en 50 mM de fosfato de sodio, pH 6,2, MeCN al 40 %, DMF al 7,5 %) se añadieron a temperatura ambiente y la conversión completa al producto de diadición se observó mediante LC-MS dentro de un periodo de 1 h.

15 *Modificación de Somatostatina con Anhídrido Dibromomaleico*



Se generó somatostatina reducida según se ha descrito. Se añadieron 5 equiv de anhídrido dibromomaleico (en DMF) y la generación de los productos se monitorizó mediante LC-MS. Se generó un 17,3% de somatostatina unida por puente en un periodo de 90 minutos.

20 *Escisión de somatostatina unida por puente con diversos agentes reductores*

Se preparó somatostatina unida por un puente de maleimida según se ha descrito. 100 equiv de diversos agentes reductores (1000 x soluciones madre en 50 mM de fosfato de sodio, pH 6,2, MeCN al 40 %, DMF al 2,5 %) se añadieron y la generación de péptido no modificado y productos secundarios (mezcla de disulfuros de los agentes reductores con las cisteínas de péptidos libres) se monitorizó a 4°C durante 2 d por LC-MS. La mezcla de disulfuros de somatostatina con GSH únicamente pudo detectarse mediante MALDI-TOF MS. Los resultados se muestran en la Figura 4.

25 *Escisión de somatostatina unida por puente con diversas cantidades de DTT y 2-mercaptoetanol*

Escisión de somatostatina unida por puente con diversas cantidades de DTT y 2-mercaptoetanol

Se preparó somatostatina unida por un puente de maleimida según se ha descrito. Diversas cantidades de DTT o 2-mercaptoetanol (1000 x soluciones madre en 50 mM de fosfato de sodio, pH 6,2, MeCN al 40 %, DMF al 2,5 %) se añadieron y la generación de péptido no modificado y productos secundarios (mezcla de disulfuros de los agentes reductores con las cisteínas de péptidos libres) se monitorizó a 4°C durante 6 h por LC-MS. Los resultados se muestran en la Figura 5.

Escisión catalizada de somatostatina unida por puente

Se preparó somatostatina unida por un puente de maleimida según se ha descrito. 20 equiv de 2-mercaptoetanol (1000 x solución madre en 50 mM de fosfato de sodio, pH 6,2, MeCN al 40 %, DMF al 2,5 %) se añadieron, seguido de tampón o bien 5 equiv de yoduro de sodio o benzenoselenol (100 x solución madre en 50 mM de fosfato de sodio, pH 6,2, MeCN al 40 %, DMF al 7,5 %) y la generación de péptido no modificado y productos secundarios (mezcla de disulfuros de 2-mercaptoetanol o benzenoselenol con las cisteínas de péptidos libres), se monitorizó a temperatura ambiente durante 20 minutos por LC-MS. Los resultados se muestran en la Figura 6.

Escisión de somatostatina unida por un puente de Maleimida N-funcionalizada

La somatostatina se redujo y se unió por puente con derivados de maleimida N-funcionalizada según se ha descrito. Se añadieron 100 equiv de 2-mercaptoetanol (1000 x solución madre en 50 mM de fosfato de sodio, pH 6,2, MeCN al 40 %, DMF al 2,5 %) y la generación de péptido no modificado y productos secundarios (mezcla de disulfuros de 2-mercaptoetanol con las cisteínas de péptidos libres) se monitorizó a 4 °C durante 2 d mediante LC-MS. Los resultados se muestran en la Figura 7.

Escisión del producto de la di-adición de monobromomaleimida a somatostatina

Se hizo reaccionar somatostatina reducida con 2,1 equiv de monobromomaleimida para generar el producto de di-adición. A continuación, se añadieron 100 equiv de 2-mercaptoetanol (1000 x solución en 50 mM de fosfato de sodio, pH 6,2, MeCN al 40 %, DMF al 2,5 %) y la generación del producto de mono-adición, péptido no modificado y productos secundarios (mezcla de disulfuros de 2-mercaptoetanol con las cisteínas de péptidos libres) se monitorizó a temperatura ambiente durante 2,5 h mediante LC-MS. Los resultados se muestran en la Figura 8.

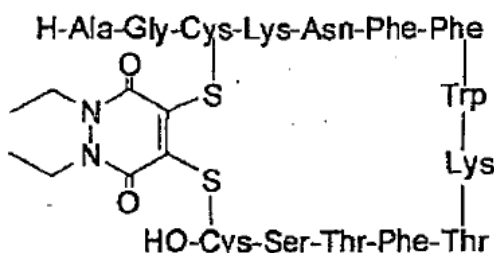
Unión por puente in situ comparable de somatostatina

Se añadió a somatostatina varias cantidades de ditiomaleimidias (100 x solución madre en 50 mM de fosfato de sodio, pH 6,2, MeCN al 40 %, DMF al 2,5-7,5 %) y la reacción fue incubada a temperatura ambiente durante 10 minutos. A continuación, se añadieron diversas cantidades de TCEP o benzenoselenol (100 x soluciones madre, recién preparadas en 50 mM de fosfato de sodio, pH 6,2, MeCN al 40 %, DMF 2,5-7,5 %) y la generación de somatostatina unida por puente se monitorizó durante 1 h a temperatura ambiente mediante LC-MS. Los resultados se muestran en la Figura 9.

Pegilación in situ de somatostatina

Se añadió a somatostatina 5 equiv de N-PEG5000-ditiofenolmaleimida o bien 10 equiv de N-PEG5000-ditiofenolmaleimida (100 x soluciones madre en 50 mM de fosfato de sodio, pH 6,2, MeCN al 40 %, DMF al 2,5 %) y la reacción se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. A continuación, se añadieron 3 equiv de TCEP y respectivamente 5 equiv de benzenoselenol (100 x soluciones madre, recién preparadas en 50 mM de fosfato de sodio, pH 6,2, MeCN al 40 %, DMF al 2,5-7,5 %) y la generación de somatostatina PEGilada se monitorizó durante 2 h a temperatura ambiente mediante LC-MS. Los resultados se muestran en la Figura 10.

Modificación de Somatostatina con DiBrDDPD



Se solubilizó somatostatina liofilizada (masa = 1638) en un tampón (50 mM de fosfato de sodio, pH 6,2, MeCN al 40 %, DMF al 2,5 %) para producir una concentración de 152,6 μ M (0,25 mg/mL) y se redujo con 1,1 equiv de TCEP durante 1 h a 21 °C. Se confirmó que la reducción se había completado mediante LCMS (masa = 1640). Se añadió DiBrDDPD (100 mol eq) y la reacción se mantuvo a 21 °C durante 10 minutos. Se observó que el aducto de Somatostatina / DiBrDDPD formaba conversión cuantitativa (masa = 1803).

Demostración de la actividad biológica reconvertida de las somatostatinas utilizando corrientes de pinzamiento zonal (patch clamp)

Para examinar si la modificación de la unión por puente tuvo un efecto perjudicial sobre la actividad de los análogos de somatostatina resultantes, sometimos a ensayo los análogos de dibromomaleimida unidos por puente, el análogo unido por puente de dibromomaleimida PEGilada y el análogo unido por puente de fluoresceína dibromomaleimida mediante ensayo de pinzamiento zonal. Se trataron células HEK 293 que expresan el canal HKIR3.1/3.2 y el receptor 2 de somatostatina receptor 2 con estos compuestos, y se tomaron los registros de corrientes de pinzamiento local de célula entera. Todos los tres análogos indejeron una activación robusta de las corrientes de GIRK en una amplitud comparable a la propia somatostatina. Como control, cuando las células se trataron con toxina Pertussis, o con el inhibidor de GIRK, Tertiapina Q, las corrientes resultaron ampliamente inhibidas. Este dato confirma que los análogos de somatostatina unidos por puente retienen la actividad biológica de la somatostatina para el agonismo del receptor 2 de somatostatina.

Cultivo celular

Los métodos de cultivo celular y la generación de líneas celulares estables se realizaron según se describe en J Biol Chem 275, 921-9 (2000). Las células HEK293 (línea celular de riñón humano embrionarias) que expresan de manera estable los canales Kir3.1 y Kir3.2^a, se mantuvieron en un medio mínimo esencial complementado con suero fetal bovino al 10% y 727 μ g de G418 (Invitrogen), a 37 °C en atmósfera humidificada (95% O₂, 5% CO₂). Las células fueron transfectadas de forma transitoria con SSTR2 ADN (Missouri S&T cDNA Resource Center) junto con pEGFP-N1 (Clontech) para la visualización de células transfectadas utilizando epifluorescencia. Las transfecciones se realizaron con 5 μ l de Fugene HD (de Roche) y 800 ng SSTR2-ADN y 40 ng EGFP-ADN por 97 μ l de medio de cultivo celular (que no contiene suero o antibióticos).

Preparación de somatostatina y análogos para experimentos de pinzamiento zonal

Las somatostatinas unidas por puente se prepararon según se describe anteriormente. La somatostatina y sus análogos fueron dializados durante 24 h a 4 °C en buffer (50 mM de fosfato de sodio, pH 6,2) para eliminar los disolventes orgánicos. Después de la diálisis se determinó la concentración y los péptidos se almacenaron a 4 °C. Se utilizó una concentración final de 20 μ M de somatostatina y análogos (la dilución se realizó en el tampón de pinzamiento zonal extracelular).

Electrofisiología

Los registros de pinzamiento local de célula entera se realizaron con un amplificador Axopatch 200B (de Axon Instruments) utilizando pipetas pulidas al fuego con una resistencia de 3-4 M Ω extraída a partir de capilares de vidrio borosilicato filamentado (Harvard Apparatus, 1,5 mm OD x 1,17 mm ID). Los datos fueron adquiridos y analizados a través de una interfaz Digidata 1322A (Axon Instruments) y el software pCLAMP (versión 8.1, de Axon Instruments). Se utilizó un sistema de perfusión rápida para aplicar somatostatina y análogos (Rapid Solution Changer, RSC-160, de Bio-Logic, Francia). Las células se fijaron a -60 mV. La solución extracelular era (mM): NaCl 80, KCl 60, CaCl₂ 2, MgCl₂ 1, HEPES 10, NaH₂PO₄ 0,33, glucosa 10, pH 7,4; mientras que la solución intracelular era (mM): K gluconato 110, KCl 20, NaCl 10, MgCl₂ 1, MgATP 2, EGTA 2 GTP 0,3, pH 7,4. Después de la aplicación del agonista, la corriente se activó con una latencia "tiempo de respuesta", seguido por una rápida subida hasta la amplitud de pico "tiempo hasta el pico". Después de la eliminación del agonista, la corriente cae y regresa al valor de referencia. Para cada célula se evaluó si estaban presentes los artefactos del flujo, que son el resultado de la presión por la aplicación del fármaco. Esto se realizó aplicando una solución de baño desde uno de los canales de drenaje al comienzo de los registros. Se utilizó tertiapina, un inhibidor de la corriente de GIRK (de Alomone), a una concentración final de 100 nM. Las células se incubaron durante la noche con toxina pertussis (Sigma, 100 ng/ml), un inhibidor de proteínas Gi/o. Los fármacos se prepararon como soluciones madre concentradas y se mantuvieron a -20°C.

Los resultados se muestran en las Figuras 11 y 12.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> UCL Business PLC
- <120> ENLACE COVALENTE REVERSIBLE DE MOLÉCULAS FUNCIONALES
- <130> N.108262B
- 5 <140> 10742867.4
- <141> 2010-08-09
- <150> PCT/GB10/001499
- <151> 2010-08-09
- <150> GB 0914321.5
- 10 <151> 2009-08-14
- <150> GB 0913965.0
- <151> 2009-08-10
- <150> GB 0913967.6
- <151> 2009-08-10
- 15 <160> 5
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 123
- <212> PRT
- 20 <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Grb2-SH2 L111C mutante
- <400> 1

ES 2 537 623 T3

Met Gly Ile Glu Met Lys Pro His Pro Trp Phe Phe Gly Lys Ile Pro
1 5 10 15

Arg Ala Lys Ala Glu Glu Met Leu Ser Lys Gln Arg His Asp Gly Ala
20 25 30

Phe Leu Ile Arg Glu Ser Glu Ser Ala Pro Gly Asp Phe Ser Leu Ser
35 40 45

Val Lys Phe Gly Asn Asp Val Gln His Phe Lys Val Cys Arg Asp Gly
50 55 60

Ala Gly Lys Tyr Phe Leu Trp Val Val Lys Phe Asn Ser Leu Asn Glu
65 70 75 80

Leu Val Asp Tyr His Arg Ser Thr Ser Val Ser Arg Asn Gln Gln Ile
85 90 95

Phe Leu Arg Asp Ile Glu Gln Val Pro Gln Gln Pro Thr Tyr Val Gln
100 105 110

Ala Gly Ser Arg Ser His His His His His His
115 120

<210> 2

<211> 14

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 2

Ala Gly Cys Lys Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Thr Ser Cys
1 5 10

<210> 3

<211> 14

10 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Somatostatina modificada

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Cisteína modificada con bromomaleimida

<220>

5 <221> MISC_FEATURE

<222> (14) .. (14)

<223> Cisteína modificada con bromomaleimida

<400> 3

Ala Gly Xaa Lys Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Thr Ser Xaa
1 5 10

10 <210> 4

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Somatostatina modificada con anhídrido dibromomaleico

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (3) .. (3)

<223> Cisteína modificada con anhídrido dibromomaleico

20 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (14)..(14)

<223> Cisteína modificada con anhídrido dibromomaleico

<400> 4

Ala Gly Xaa Lys Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Thr Ser Xaa
1 5 10

25

<210> 5

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Somatostatina modificada con DiBrDDPD

<220>

<221> MISC_FEATURE

5 <222> (3) .. (3)

<223> Cisteína modificada con DiBrDDPD

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (14) .. (14)

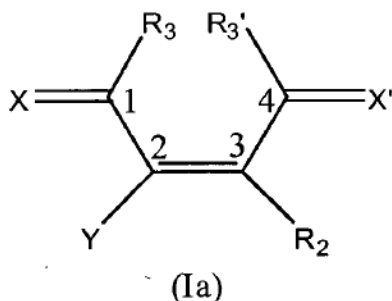
10 <223> Cisteína modificada con DiBrDDPD

<400> 5

Ala Gly Xaa Lys Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Thr Ser Xaa
1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Uso de un compuesto de fórmula (Ia) como reactivo para enlazar un compuesto de fórmula R_1-H que comprende una primera fracción funcional F_1 , a una segunda fracción funcional de fórmula F_2



5 en donde:

- X y X' cada una representan oxígeno;

- Y es un grupo saliente electrófilo;

- R_3 y $R_{3'}$ juntos forman un grupo de fórmula $-N(R_{33})$, en donde R_{33} representa un átomo de hidrógeno o un grupo de fórmula Y, Nu, $-L(Z)_n$ o IG;

10 - R_2 representa un átomo de hidrógeno o un grupo de fórmula Y, Nu, $-L(Z)_n$ o IG;

- cada grupo de fórmula Y es el mismo o diferente y representa un grupo saliente electrófilo;

- cada grupo de fórmula Nu es el mismo o diferente y representa un nucleófilo seleccionado de $-OH$, $-SH$, $-NH_2$ y $-NH(\text{alquilo } C_{1-6})$;

- cada grupo de fórmula L es el mismo o diferente y representa un grupo conector;

15 - cada grupo de fórmula Z es el mismo o diferente y representa un grupo reactivo unido a un grupo de fórmula L que es capaz de reaccionar con un compuesto que contienen una segunda fracción funcional, según se define en la reivindicación 1, de tal manera que dicha segunda fracción funcional se enlaza a dicho grupo de fórmula L;

- n es 1, 2 o 3; y

20 - cada grupo de fórmula IG es el mismo o diferente y representa una fracción que es un grupo alquilo C_{1-20} , un grupo C_{2-20} alquenoilo o un grupo C_{2-20} alquinilo, que es sustituido o no sustituido por uno o más sustituyentes seleccionados de átomos de halógeno y grupos de ácido sulfónico, y en los que (a) 0, 1 o 2 átomos de carbono se reemplazan por grupos seleccionados de arileno C_{6-10} , heteroarileno de 5- a 10- miembros, carbociclileno C_{3-7} y grupos heterociclileno de 5- a 10- miembros, y (b) 0, 1 o 2 grupos $-CH_2-$ se reemplazan por grupos seleccionados de grupos $-O-$, $-S-$, $-S-S-$, $-C(O)-$ y $-N(\text{alquilo } C_{1-6})-$, en donde:

(i) dichos grupos arileno, heteroarileno, carbociclileno y heterociclileno son no sustituidos o sustituidos por uno o más sustituyentes seleccionados de átomos de halógeno y grupos alquilo C_{1-6} , alcoxi C_{1-6} , alquiltiol C_{1-6} , $-N(\text{alquilo } C_{1-6})$ (alquilo C_{1-6}), nitro y ácido sulfónico; y

30 (ii) 0, 1 o 2 átomos de carbono en dichos grupos carbociclileno y heterociclileno se reemplazan por grupos $-C(O)-$; y

- o bien:

- la primera fracción funcional o la segunda fracción funcional es una proteína que es un anticuerpo o fragmento de un anticuerpo que es capaz de unirse a un antígeno específico a través de un epítipo en el antígeno, y la otra de entre la primera fracción funcional y la segunda fracción funcional es un fármaco, o bien

35

- la primera fracción funcional o la segunda fracción funcional es una fracción polimérica seleccionada a partir de péptidos, proteínas, polisacáridos, poliéteres, poliaminoácidos, alcoholes polivinílicos, polivinilpirrolidonas, ácido poli(met)acrílico y derivados del mismo, poliuretanos y polifosfacenos, y la otra de entre la primera fracción funcional y la segunda fracción funcional es un fármaco;

5 en donde el grupo R_1 se enlaza al compuesto de la fórmula (Ia) a través del ataque nucleófilo del primer grupo SH en el compuesto de fórmula R_1-H en la posición 2 del compuesto de la fórmula (Ia), de tal manera que el grupo Y en la posición 2 es reemplazado por el grupo R_1 .

2. Uso según la reivindicación 1, en donde:

(A):

10 Y es un átomo de halógeno o un triflato, tosilato, mesilato, N-hidroxisuccinimidilo, N-hidroxisulfosuccinimidilo, alquiltiol C_{1-6} , heterocicliltiol de 5- a 10- miembros, ariltiol C_{6-10} , carbocicliltiol C_{3-7} , -OC(O)CH₃, -OC(O)CF₃, feniloxi, grupo -NR_xR_yR_z + o - PR_xR_yR_z +, en el que R_x, R_y y R_z son los mismos o diferentes y se seleccionan de átomos de hidrógeno y grupos alquilo C_{1-6} y fenilo; y/o

(B):

15 L representa una fracción que es un grupo alquileo C_{1-20} , un grupo alquenileo C_{2-20} o un grupo alquinileo C_{2-20} , que es no sustituido o sustituido por uno o más sustituyentes seleccionados de átomos de halógeno y grupos de ácido sulfónico, y en el que (a) 0, 1 ó 2 átomos de carbono son reemplazados por grupos seleccionados de grupos arileno C_{6-10} , heteroarileno de 5 a 10- miembros, carbociclileno C_{3-7} y heterociclileno de 5- a 10- miembros, y (b) 0,1 ó 2 grupos

20 -CH₂- son reemplazados por grupos seleccionados de grupos -O-, -S-, S-S, -C(O)- y

-grupos N(alquilo C_{1-6})-, en donde:

(i) dichos grupos arileno, heteroarileno, carbociclileno y heterociclileno son no sustituidos o sustituidos por uno o más sustituyentes seleccionados de átomos de halógeno y grupos alquilo C_{1-6} , alcoxi C_{1-6} , alquiltiol C_{1-6} , -N(alquilo C_{1-6}) (alquilo C_{1-6}), nitro y ácido sulfónico; y

25 (ii) 0, 1 o 2 átomos de carbono en dichos grupos carbociclileno y heterociclileno se reemplazan por grupos -C(O)-; y/o

(C):

Z representa:

(a) un grupo de fórmula -LG, -C(O)-LG, -C(S)-LG o -C(NH)-LG en donde LG es un grupo saliente electrófilo;

30 (b) un nucleófilo Nu' seleccionado de grupos -OH, -SH, -NH₂, -NH(alquilo C_{1-6}) y -C(O)NHNH₂;

(c) una fracción cíclica Cyc, que es capaz de una reacción electrófila de apertura de anillo con un nucleófilo;

(d) un grupo de fórmula -S(O₂)(Hal), en donde Hal es un átomo de halógeno;

(e) un grupo de fórmula -N=C=O o -N=C=S;

35 (f) un grupo de fórmula -S-S(IG') en donde IG' representa un grupo de fórmula IG, según se define en la reivindicación 2;

(g) un grupo AH, que es un grupo arilo C_{6-10} que es sustituido por uno o más átomos de halógenos;

(h) un grupo fotoreactivo que es capaz de activarse por la exposición a la luz ultravioleta;

(i) un grupo de fórmula -C(O)H o -C(O)(alquilo C_{1-6});

(j) un grupo maleimido;

(k) un grupo de fórmula $-C(O)CHCH_2$;

(l) un grupo de fórmula $-C(O)C(N_2)H$ o $-PhN_2^+$, donde Ph representa un grupo fenilo; o

(m) un grupo epóxido; y/o

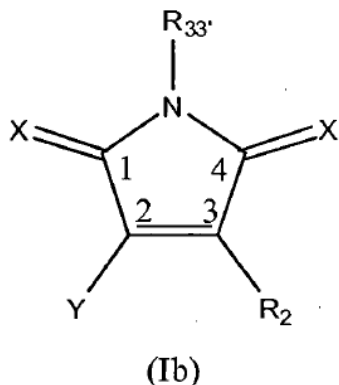
(D):

5 IG representa una fracción que es un grupo alquilo C_{1-6} , un grupo alqueno C_{2-6} o un grupo alquino C_{2-6} , en el que (a) 0 o 1 átomo de carbono es reemplazado por un grupo seleccionado de grupos fenileno, heteroarileno de 5- a 6- miembros, carbociclileno C_{5-6} y heterociclileno de 5- a 6- miembros, en donde dichos grupos fenileno, heteroarileno, carbociclileno y heterociclileno son no sustituidos o sustituidos por uno o dos sustituyentes seleccionados de átomos de halógeno y grupos alquilo C_{1-4} y alcoxi C_{1-4} , y (b) 0, 1 o 10 2 grupos $-CH_2-$ son reemplazados por grupos seleccionados de grupos $-O-$, $-S-$ y $-C(O)-$; y/o

(E):

n es 1.

3. Uso según la reivindicación 1 o 2, en donde el compuesto de fórmula (Ia) es un compuesto de fórmula (Ib)



15 en donde:

- X y X' cada uno representa un átomo de oxígeno;
- $R_{33'}$ representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C_{1-6} ;
- Y representa un átomo de halógeno; y
- R_2 representa un átomo de hidrógeno o halógeno o un grupo alquilo C_{1-6} .

20 4. Uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde:

- R_1 es un grupo de fórmula $-F_1$;
- F_1 es un péptido o proteína que comprende al menos un primer residuo de cisteína; y
- el grupo R_1 se enlaza al compuesto de fórmula (Ia) mediante ataque nucleófilo del grupo tiol de dicho primer residuo de cisteína en la posición 2 del compuesto de fórmula (Ia), de tal manera que el grupo Y es reemplazado por el grupo tiol en el primer residuo de cisteína en el grupo R_1 ;

25

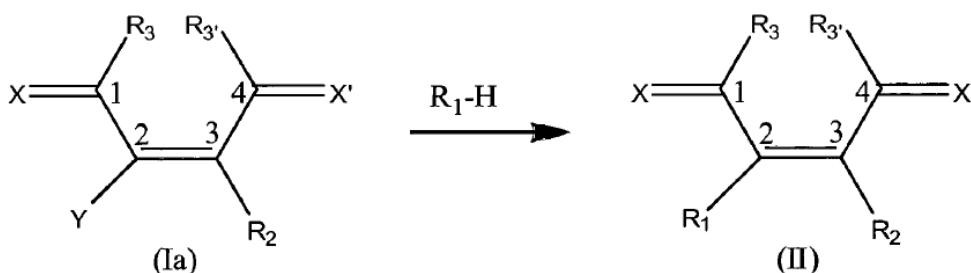
y en donde opcionalmente:

- R_2 es un grupo de fórmula Y;
- R_1 además comprende al menos un segundo residuo de cisteína; y

- el grupo R_1 se enlaza adicionalmente al compuesto de fórmula (Ia) mediante ataque nucleófilo del grupo tiol de dicho residuo de cisteína en la posición 3 de la fracción de fórmula (Ia), de tal manera que el grupo R_2 es reemplazado por el grupo tiol en el segundo residuo de cisteína en el grupo R_1 .

5. Proceso para producir un conjugado, cuyo proceso comprende

- 5 (i) hacer reaccionar un compuesto de la fórmula (Ia) con un compuesto de fórmula R_1 -H, produciendo de este modo un compuesto de la fórmula (II)



(ii) posteriormente enlazando una fracción de fórmula F_2 a dicho compuesto de la fórmula (II);

- 10 en donde la etapa (i) implica unir el grupo R_1 a través de un ataque nucleófilo del primer grupo SH en el compuesto de fórmula R_1 -H en la posición 2 del compuesto de la fórmula (Ia), de tal manera que el grupo Y en la posición 2 es reemplazado por el grupo R_1 ,

y en donde X, X', Y, R_1 , R_2 , R_3 , $R_{3'}$ y F_2 son todos tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

6. Proceso según la reivindicación 5, en donde:

- 15 (A):

el proceso comprende enlazar F_2 al compuesto de fórmula (II) a través de una reacción electrófila de adición de F_2 a través del enlace doble de carbono-carbono entre la posición 2 y la posición 3 de la fórmula (II); o

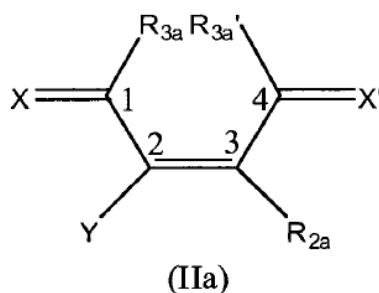
- (B):

- 20 $R_{33'}$ representa un átomo de hidrógeno o un grupo de fórmula Y, Nu o $-L(Z)_n$ y el proceso comprende enlazar F_2 al compuesto de fórmula (II) a través de una reacción entre F_2 y (i) el átomo de nitrógeno de la fracción de fórmula $-N(R_{33'})$ o (ii) dicho grupo de fórmula Y, Nu o $-L(Z)_n$; o

- (C):

- 25 R_2 representa un grupo de fórmula Y, Nu o $-L(Z)_n$, y el proceso comprende enlazar F_2 al compuesto de fórmula (II) mediante una reacción entre F_2 y dicho grupo de fórmula Y, Nu o $-L(Z)_n$.

7. Proceso para producir un conjugado, cuyo proceso comprende hacer reaccionar un compuesto de fórmula R_1 -H con un compuesto de fórmula (IIa)

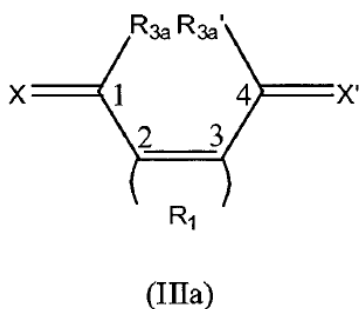
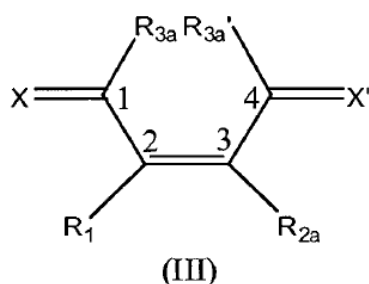


en donde:

- R_{3a} y $R_{3a'}$ juntos forman un grupo de fórmula $-N(R_{33a'})$, en donde $R_{33a'}$ representa un grupo de fórmula R_{33} , o un grupo de fórmula F_2 o $-L(F_2)_m(Z)_{n-m}$;
- R_{2a} representa un grupo de fórmula R_2 o un grupo de fórmula F_2 o $-L(F_2)_m(Z)_{n-m}$;
- 5 - m es un número entero que tiene un valor de cero a n ;
- el compuesto de fórmula (IIa) comprende al menos un grupo de fórmula F_2 ;
- F_2 es según se define en la reivindicación 1;
- $X, X', R_3, R_{3'}, R_{33}, R_2, L, Z$ y n son todos según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3
- R_1 es según se define en la reivindicación 1 o 4; y
- 10 - el proceso implica unir el grupo R_1 a través de ataque nucleófilo del primer grupo SH en el compuesto de fórmula R_1-H en la posición 2 del compuesto de fórmula (IIa), de tal manera que el grupo Y en la posición 2 es reemplazado por el grupo R_1 .

8. Proceso que comprende

- (i) proporcionar un compuesto de fórmula (III) o (IIIa); y
- 15 (ii) escindir el enlace entre el grupo R_1 y el átomo de carbono en la posición 2 del compuesto de fórmula (III) o (IIIa)



en donde

- 20 - R_{3a} y $R_{3a'}$ juntos forman un grupo de fórmula $-N(R_{33a'})$, en donde $R_{33a'}$ representa un grupo de fórmula R_{33} , o un grupo de fórmula F_2 o $-L(F_2)_m(Z)_{n-m}$;
- R_{2a} representa un grupo de fórmula R_2 o un grupo de fórmula F_2 o $-L(F_2)_m(Z)_{n-m}$;
- m es un número entero que tiene un valor de cero a n ;
- R_1 es según se define en la reivindicación 1 o 4;

- F₂ es según se define en la reivindicación 1;

- X, X', R₃, R₃', R₃₃' R₂, L, Z y n son todos según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3;

y en donde cuando el proceso implica el compuesto de la fórmula (IIIa):

5 - R₁ del compuesto de la fórmula (IIIa) comprende al menos un primer grupo tiol y un segundo grupo tiol, donde dicho primer grupo tiol está unido a la posición 2 en el compuesto de la fórmula (IIIa) y donde el segundo grupo tiol está unido a la posición 3 en el compuesto de la fórmula (IIIa); y

- la etapa (ii) además implica escindir el enlace entre el grupo R₁ y el átomo de carbono en la posición 3 de la fracción de la fórmula (IIIa).

9. Compuesto, cuyo compuesto es:

10 (A) un compuesto de fórmula (IIa) según se define en la reivindicación 7; o

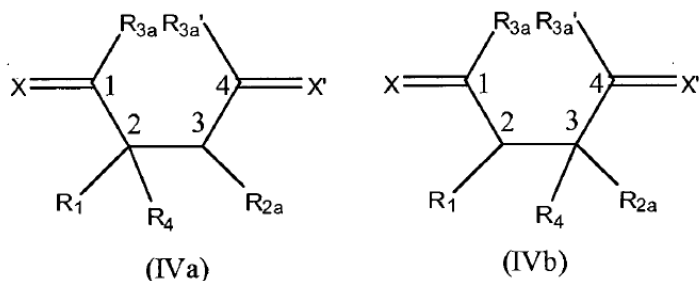
(B) un compuesto de fórmula (III) según se define en la reivindicación 8, que comprende al menos un grupo de fórmula F₂ y en el que R_{2a} no es un átomo de hidrógeno.

10. Compuesto de fórmula (IIIa) según se define en la reivindicación 8.

11. Compuesto según la reivindicación 10, que comprende al menos un grupo de fórmula F₂.

15 12. Compuesto según la reivindicación 10 u 11, en donde R₁ es un péptido o proteína que comprende al menos dos residuos de cisteína, cuyos residuos de cisteína forman preferiblemente un puente disulfuro interno en el péptido o proteína cuando dicho péptido o proteína no está enlazada en el compuesto de fórmula (IIIa).

13. Compuesto de fórmula (IVa) o (IVb)



20 en donde

- R₁ es según se define en la reivindicación 1 o 4;

- X, X', R_{2a}, R_{3a} y R_{3a'} son según se define en la reivindicación 8;

- R₄ es un átomo de halógeno, un grupo hidroxilo, alcoxi C₁₋₆, tiol, alquiltiol C₁₋₆ o alquilcarboniloxi C₁₋₆, o un grupo de fórmula F₂;

25 - al menos uno de los grupos R_{2a} y R₄ comprende un grupo de fórmula F₂; y

- F₂ es según se define en la reivindicación 1.

14. Compuesto según se define en (B) de la reivindicación 9, reivindicación 11 o reivindicación 13, para su uso en un método de tratamiento del organismo humano o animal mediante cirugía o terapia, o método de diagnóstico practicado en el organismo humano o animal.

30 15. Proceso según se define en cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en donde dicho conjugado comprende un anillo de maleimida y dicho proceso adicionalmente comprende efectuar una apertura de anillo de dicho anillo de maleimida.

FIGURA 1

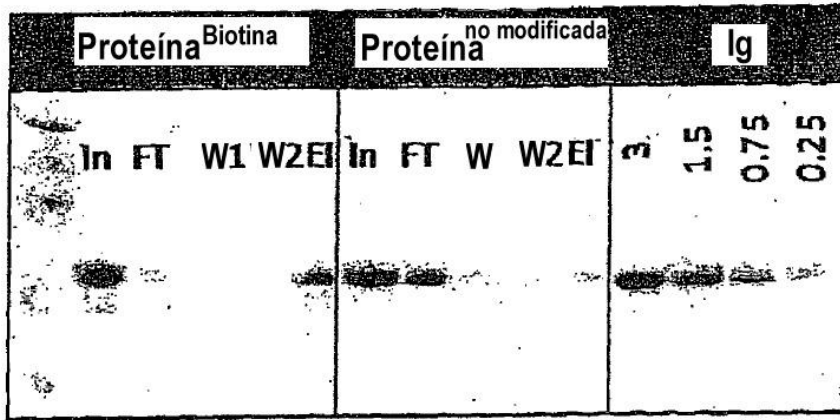
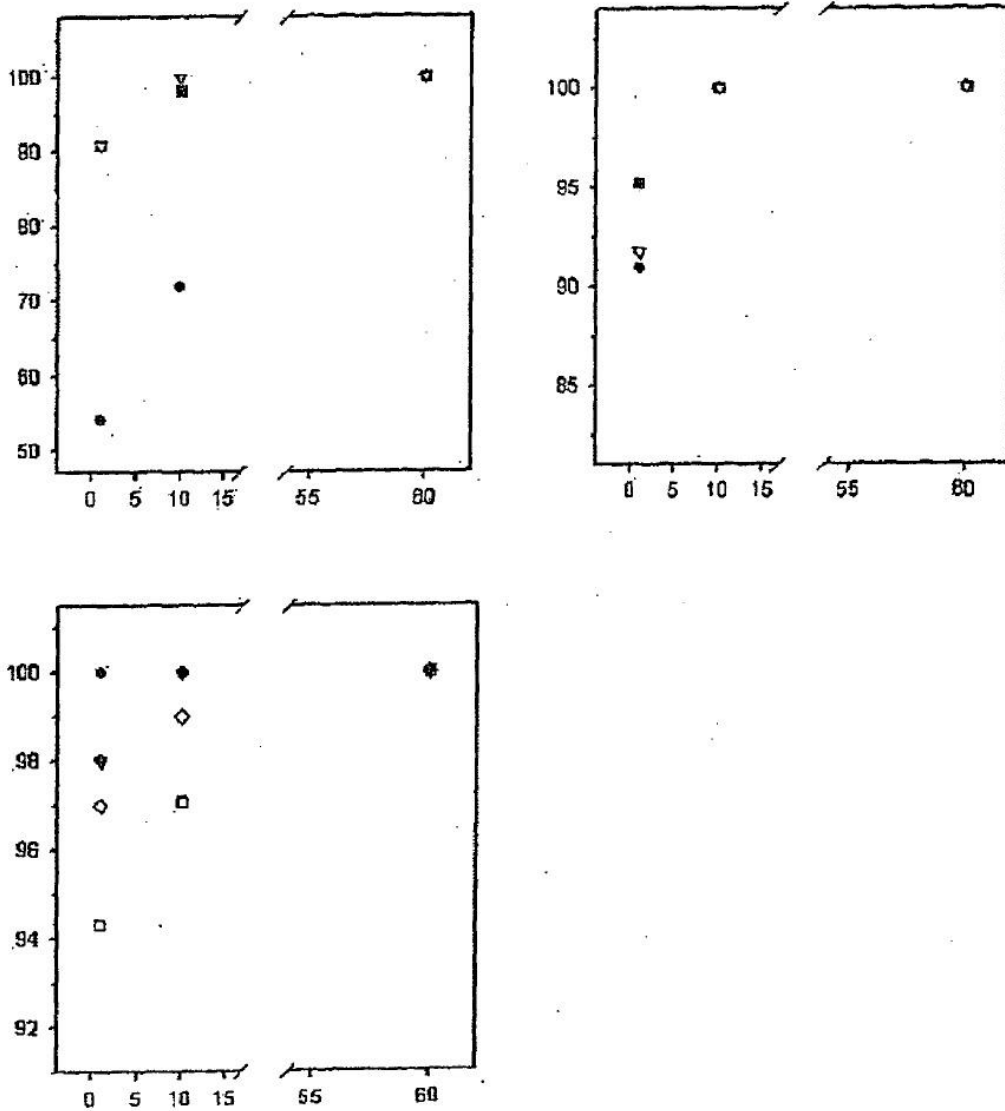


FIGURA 2



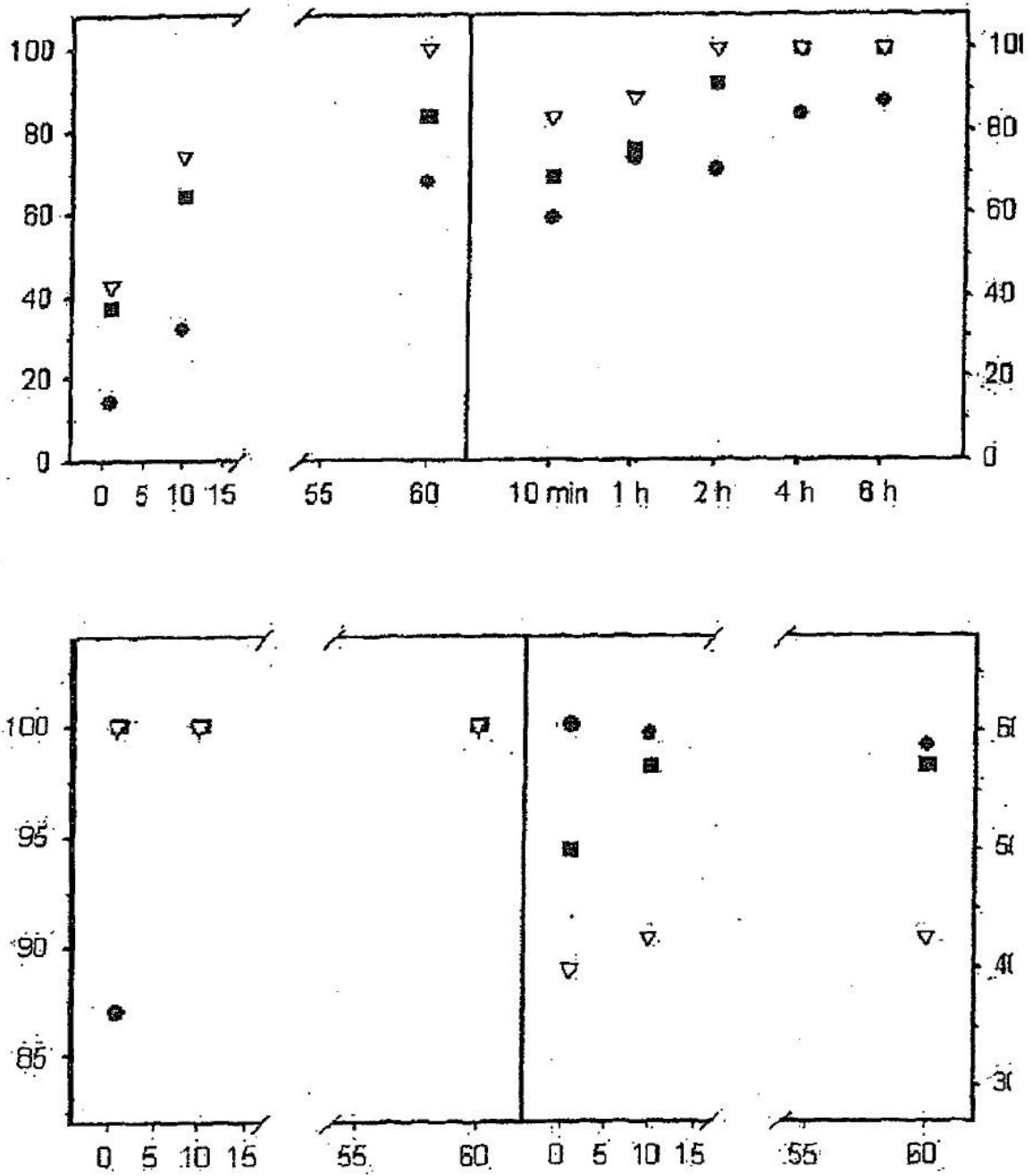


FIGURA 3

FIGURA 4

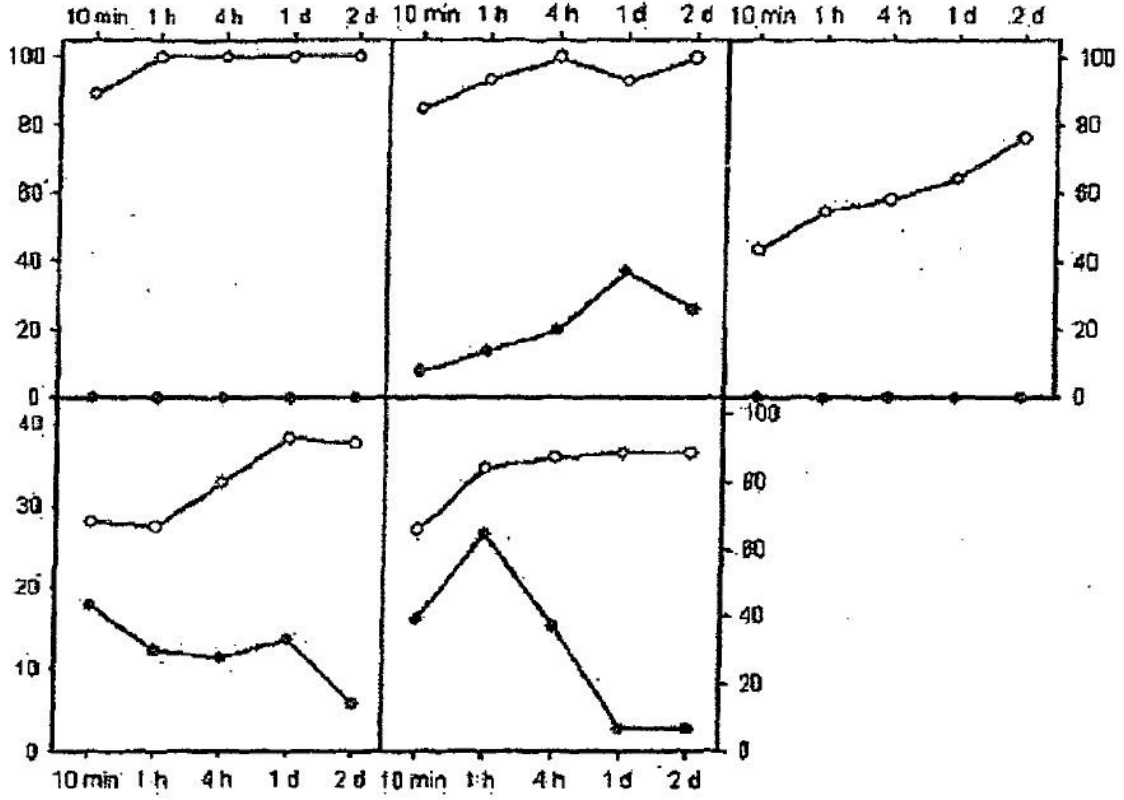


FIGURA 5

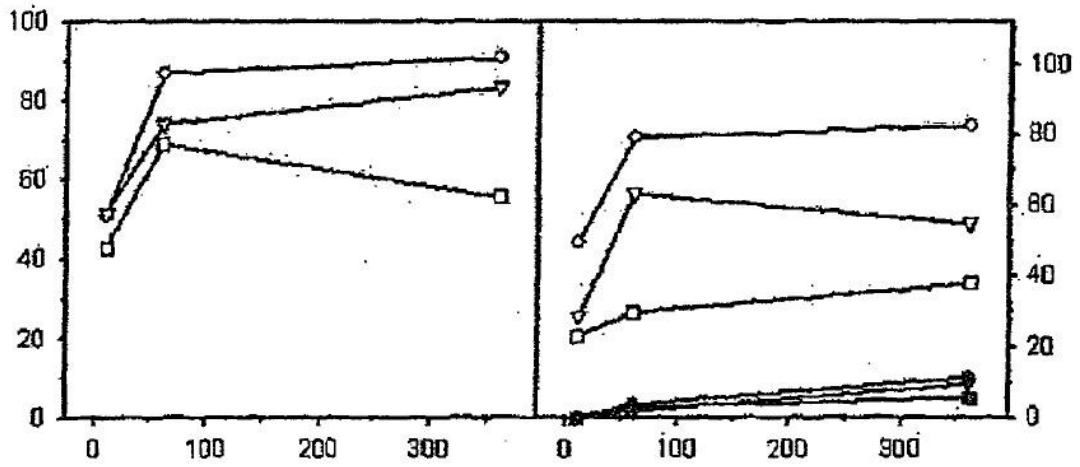


FIGURA 6

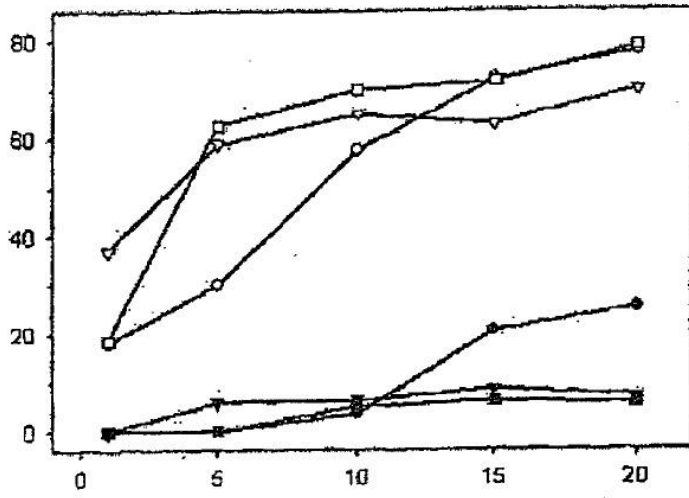


FIGURA 7

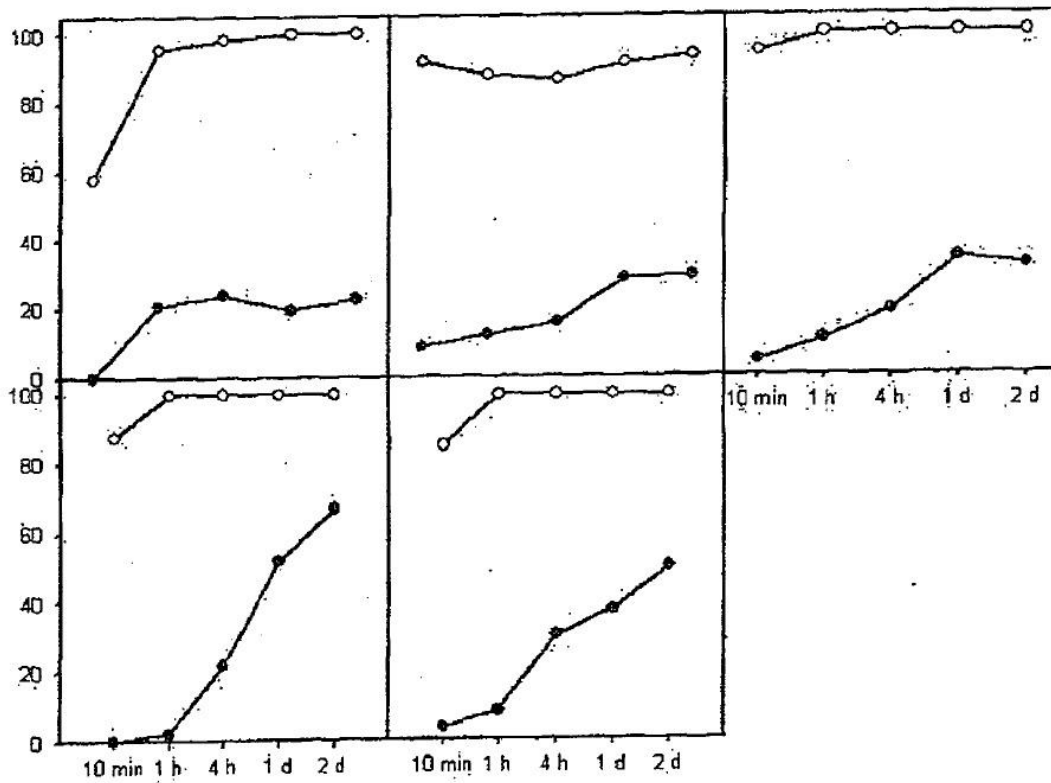


FIGURA 8

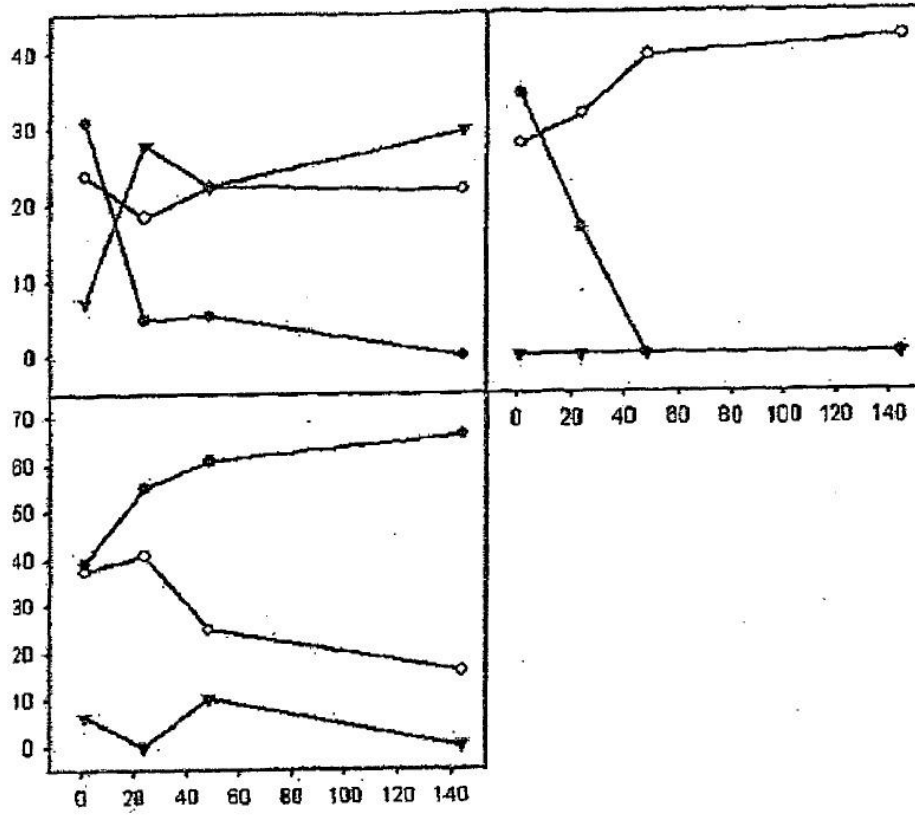


FIGURA 9

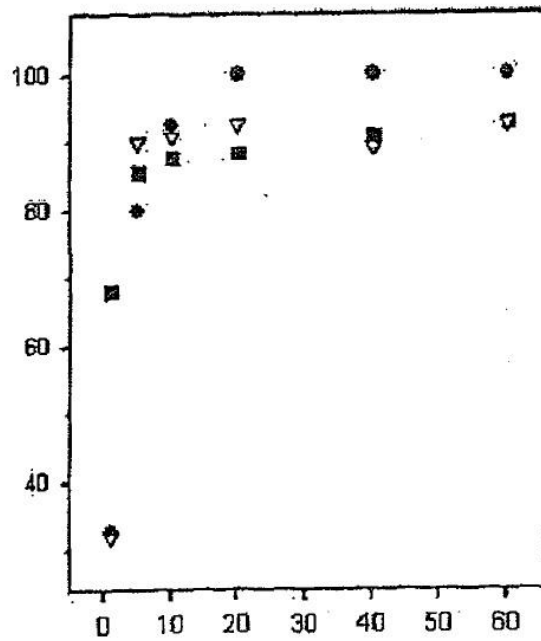


FIGURA 10

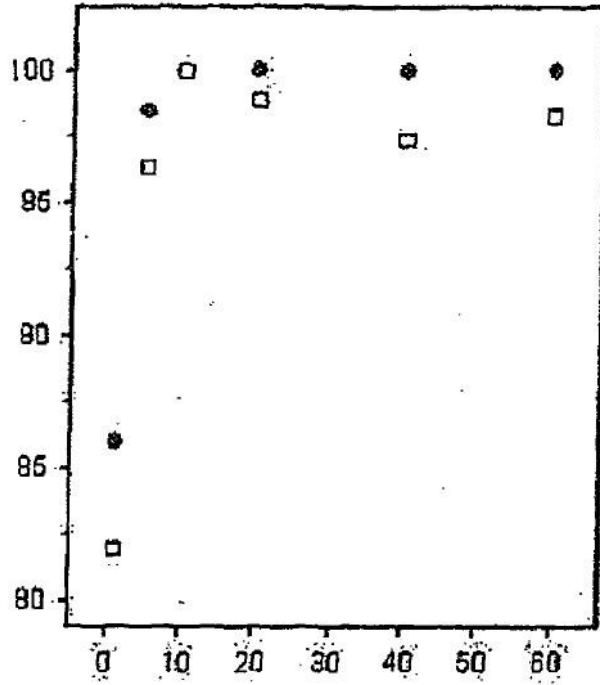


FIGURA 11

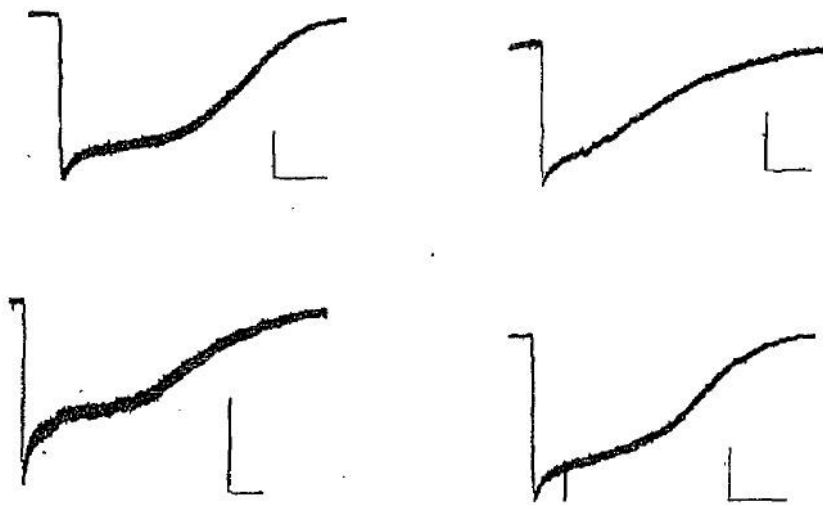


FIGURA 12

