

## TÍTULO DE PATENTE NO. 284222

**Titular(es):** UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO

**Domicilio(s):** Lascuráin de Retana No. 5, 36000, Guanajuato, Guanajuato, MÉXICO

**Denominación:** PROCESO PARA LA PREPARACION DE DERIVADOS DIPROTEGIDOS N, N'' DE COMPUESTOS TETRAAZA MACROCÍCLICOS Y DERIVADOS.

**Clasificación:** Int.Cl.8: A61K51/04; A61K51/08; C07D205/00; C07D257/02

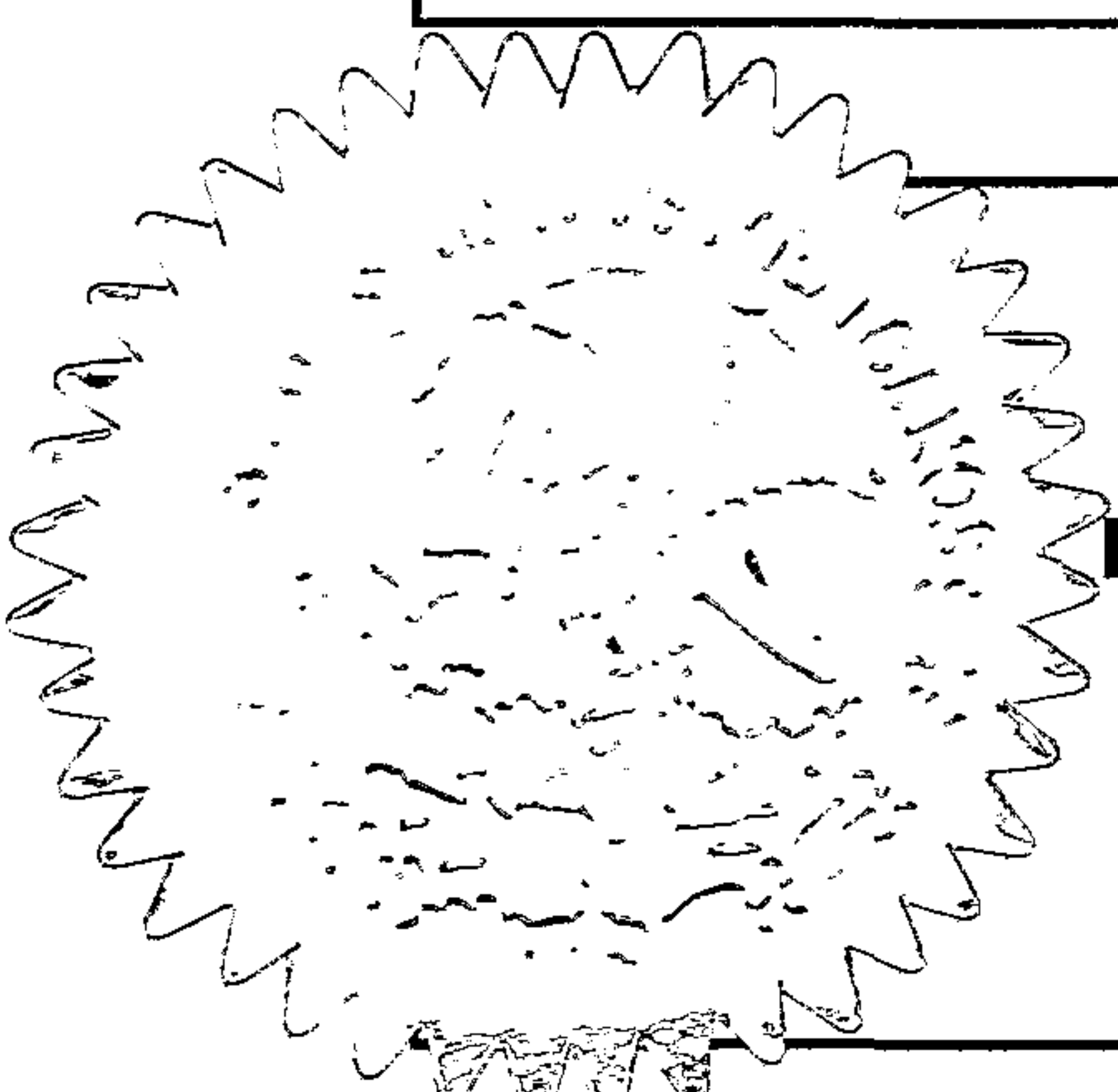
**Inventor(es):** LUIS MANUEL DE LEÓN RODRÍGUEZ; ZOLTAN KOVACS

<b>SOLICITUD</b>		
<b>Número:</b>	<b>Fecha de presentación:</b>	<b>Hora:</b>
GT/a/2004/000018	10 de diciembre de 2004	17:10
<b>PRIORIDAD</b>		
<b>País:</b>	<b>Fecha:</b>	<b>Número:</b>
<b>Vigencia:</b> Veinte años		
<b>Fecha de Vencimiento:</b> 10 de diciembre de 2024		
LA VIGENCIA DE ESTA PATENTE ES IMPRORRROGABLE Y ESTÁ SUJETA AL PAGO DE LA TARIFA PARA MANTENER VIGENTES LOS DERECHOS.		

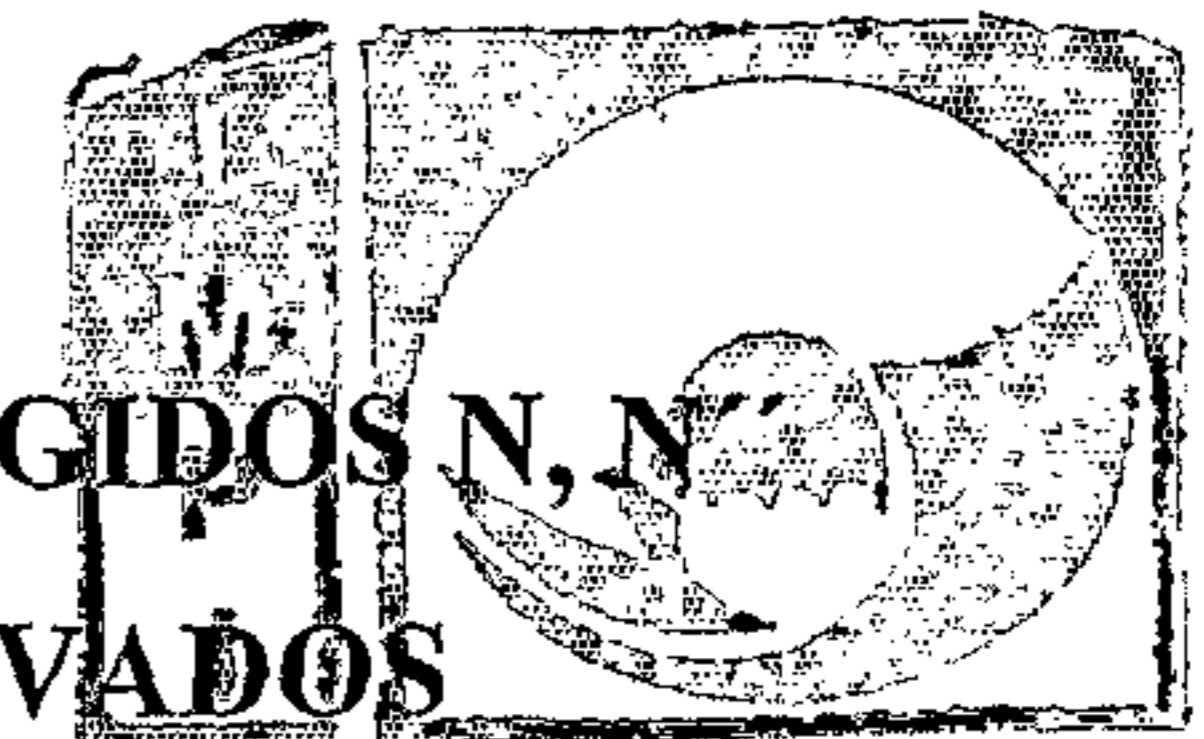
Fecha de expedición: 29 de octubre de 2010

**EL DIRECTOR DIVISIONAL DE PATENTES**

**QUÍM. FABIÁN R. SALAZAR GARCÍA**



PROCESO PARA LA PREPARACIÓN DE DERIVADOS DIPROTEGIDOS N, N''  
DE COMPUESTOS TETRAAZA MACROCÍCLICOS Y DERIVADOS



Instituto  
Mexicano  
de la Propiedad  
Industrial

DESCRIPCIÓN

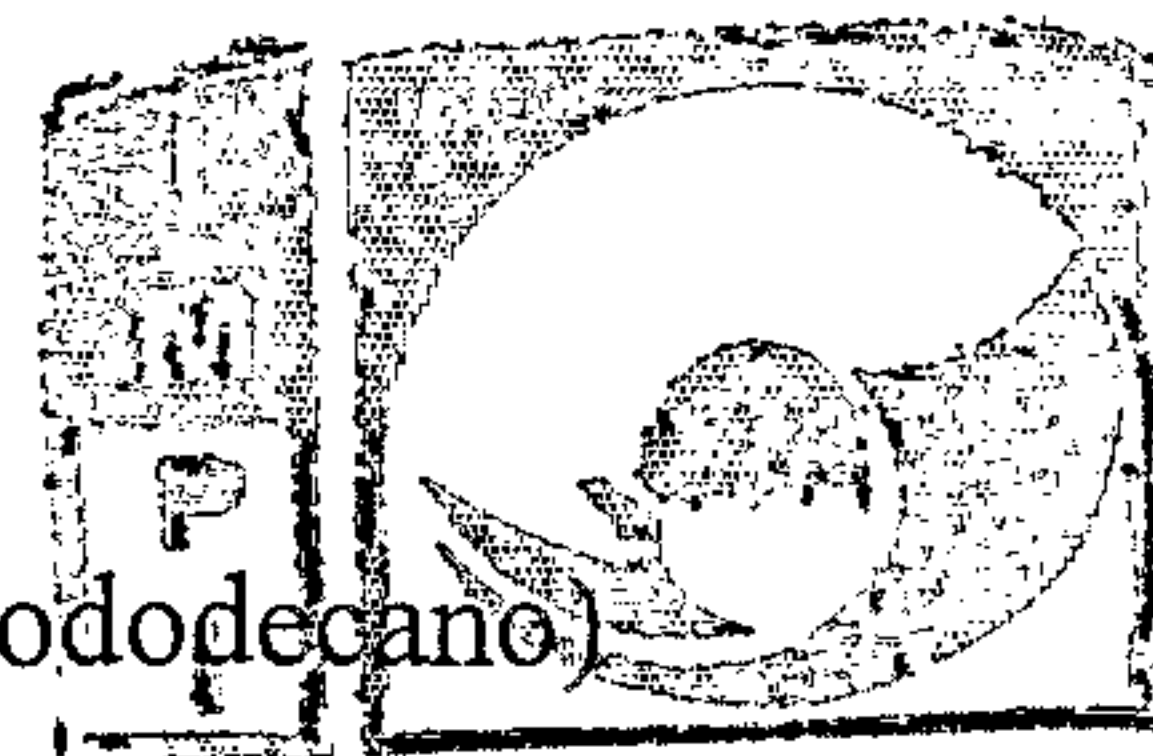
OBJETO DE LA INVENCION

5 La presente invención se relaciona a la síntesis de derivados diprotegidos N, N'' de  
compuestos macrocíclicos del tipo tetraaza y derivados de estos, y derivados de  
aminoácidos marcados con ligantes macrocíclicos tetraaza que permitan la intercalación de  
estos entre péptidos bioespecíficos con metales ya sea paramagnéticos o radioactivos para  
la generación de productos con potencial aplicación médica en diagnóstico y terapia de  
10 enfermedades.

ANTECEDENTES

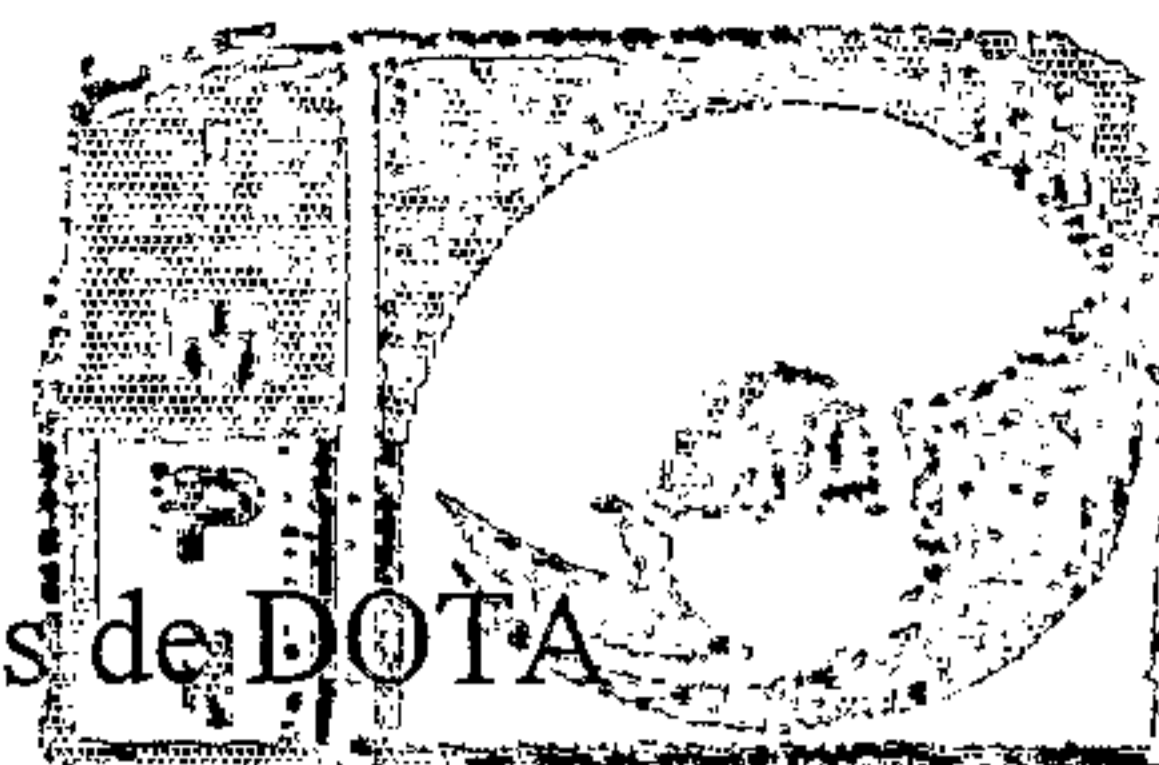
La aplicación médica de diferentes ligantes ha sido bien establecida desde hace mucho  
tiempo, así se pueden encontrar sus aplicaciones como estabilizadores en formulaciones  
15 farmacéuticas, antídotos para el envenamiento con metales y como moléculas acarreadoras  
de metales útiles para el diagnóstico y/o tratamiento de enfermedades. En este último caso  
se puede citar la aplicación de ligantes en técnicas como resonancia magnética de imagen  
(RMI), radiodiagnóstico y otros.

Para agentes de diagnóstico o terapéuticos es de suma importancia que el complejo  
20 metálico formado con el ligante sea tanto termodinámica como cinéticamente estable, y  
para cumplir dichos requisitos se ha puesto especial interés en el desarrollo de ligantes



tetraaza macrocíclicos en particular derivados de cyclen (1,4,7,10 tetraazaciclododecano) principalmente DOTA (Ácido-N,N',N'',N'''-1,4,7,10 tetraazaciclododecano tetracético) sus derivados, los cuales se caracterizan por formar complejos muy estables con diferentes metales de transición y de la serie de los lantánidos. Entre estos metales cabe señalar a gadolinio y disprosio cuyos iones paramagnéticos ejercen efectos importantes en los tiempos de relajación longitudinal y transversal ( $T_1$  y  $T_2$ ) de los protones de moléculas de agua circundantes y por tanto son metales utilizados en diagnóstico mediante resonancia magnética de imagen (RMI). Por otro lado se tiene el caso de isótopos radioactivos de itrio y lutecio, cuyas características de emisión los sugieren como agentes de radioterapia y radiodiagnóstico.

En el caso de los iones metálicos paramagnéticos que pueden ser usados como agentes de contraste (AC) en RMI (ej. Gd(III)), estos son altamente tóxicos para ser usados clínicamente como el metal libre y por tanto deben ser administrados en una forma que no permita su bioacumulación en el organismo. Por tal motivo se ha propuesto la utilización de complejos estables del metal, existiendo para el caso de Gd(III) varios productos comerciales empleados actualmente como AC en RMI entre los cuales se pueden señalar el GdDTPA (Magnevist), GdDOTA (Dotarem), GdDTPA-BMA (Omniscan) y Gd-HP-DO3A (Prohance). Todos estos AC son administrados por vía intravenosa y sus aplicación principal es en la obtención de imágenes de cuerpo completo y cerebro. Entre estos la principal diferencia es las mas altas estabilidad termodinámica de los complejos de DOTA y derivados comparados con los derivados de DTPA. Por otro lado los metales lantánidos usados generalmente se presentan en el estado de oxidación +3 por lo cual la formación de complejos neutros es preferida dado que estos presentan una osmolalidad baja cuando se



compara con complejos cargados. La generación de complejos neutros derivados de DOTA

implica la remoción de un grupo carboximetilo unido covalentemente a uno de los átomos

de nitrógeno del macrociclo para dar DO3A (Ácido- N',N'',N'''-1,4,7,10

tetraazaciclododecano tricético). La derivatización de DO3A con diferentes sustituyentes

5 en el grupo amino libre genera la oportunidad de producir AC que presenten bioespecificidad (US Pat. No. 6,166,201) característica la cual carecen los AC comerciales.

De forma muy similar se presenta el caso de agentes terapéuticos y de diagnóstico derivados de elementos radioactivos.

Recientemente ha surgido el interés por desarrollar agentes de contraste pre-dirigidos es

10 decir que permitan el contraste en respuesta a un evento determinado. Así en la actualidad

se han diseñado agentes que presentan una biodistribución específica dado sus

características hidrofóbicas o lipofílicas (Muller, R. N. et al. Eur. J. Inorg. Chem. 1999,

1949-1955), agentes de contraste que responden a algún cambio fisicoquímico como pH o

temperatura (Sherry, A.D. et al. Angew. Chem. Int. Ed. 1999, 38 (21), 3192-3194), agentes

15 de contraste llamados inteligentes puesto que estos controlan el contraste dada la ocurrencia

de un evento metabólico específico sobre el AC (Moats, R. A. et al. Angew. Chem., Int. Ed.

Engl. 1997, 36, 726) y por último agentes de contraste biospecíficos, es decir con la

capacidad de controlar el contraste de la imagen dada la interacción específica con una

proteína, receptor celular o en general macromolécula (De León-Rodríguez, L.M. et al. J.

20 Am. Chem. Soc. 2002, 124, 3514-3515). En particular, el desarrollo de agentes de

contraste o de diagnóstico específicos hacia macromoléculas ha despertado un gran interés

dado que estos pueden ser aplicados en el seguimiento de terapia génica (dada la

manifestación de una proteína), o para el desarrollo de agentes terapéuticos y/o de contraste



Instituto

Mexicano

de la Propiedad

Industrial

altamente específicos que permitan el tratamiento y estudio de enfermedades prevalentes (cáncer, SIDA, etc.). Los primeros intentos por generar estos agentes bioespecíficos hacia el uso de anticuerpos específicos hacia alguna macromolécula los cuales eran posteriormente derivatizados con un ligante seguido de la formación del complejo con el metal de interés.

5 Sin embargo, la especificidad del compuesto resultante no era como se prevía, lo cual se debía principalmente a el pobre control que se tiene sobre el paso de marcaje con el ligante.

Lo anterior se debe a que los ligantes más utilizados pertenecientes a la familia de ligantes bifuncionales reaccionan con grupos amino libres del anticuerpo formando enlaces covalentes, más sin embargo esta derivatización no es epecífica dada la gran cantidad de

10 grupos amino libres. Como una solución a esta problemática en la actualidad se propone la utilización de péptidos como especies de reconocimiento bioespecífico dado la existencia de metodologías para el monitoreo y determinación de secuencias peptídicas con alta especificidad tales como Phage Display (Smith, G. P., Science 1985, 228, 1315-1316). Por

otro lado la síntesis de péptidos en fase sólida versión Fmoc, SPFS-Fmoc (Chan, W.C:

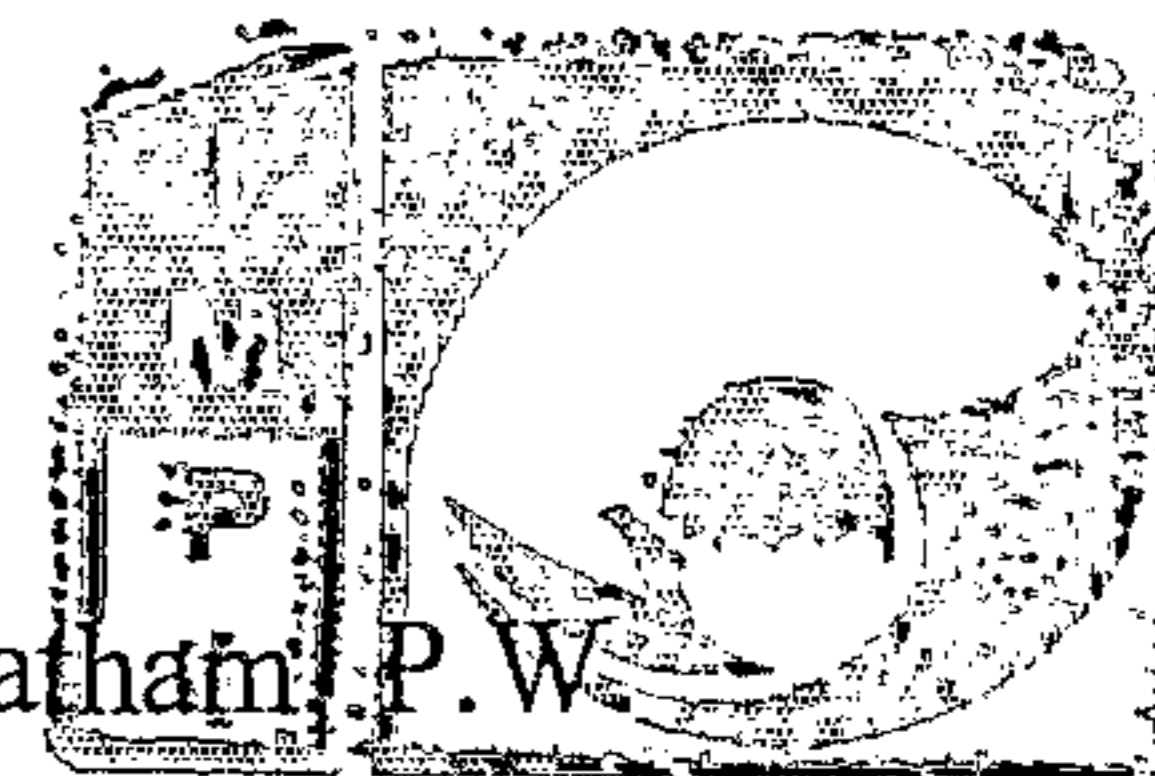
15 Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis A practical approach. Oxford University Press, 2000)

es una metodología que permite la producción de péptidos químicamente modificados. La SPFS-Fmoc es un proceso interactivo de acoplamiento de aminoácidos protegidos en el grupo amino  $\alpha$  con fluorenilmetilcarbamato (Fmoc) mientras los grupos funcionales de las

cadenas laterales son protegidos con grupos protectores lábiles a condiciones ácidas las

20 cuales son ortogonales a las condiciones de remoción de Fmoc. Así la SPFS-Fmoc ofrece la ventaja de minimizar las etapas de purificación dado que el péptido sintetizado esta

químicamente enlazado a un soporte sólido. Adicionalmente la SPFS-Fmoc permite generar



péptidos a niveles de kilogramos para secuencias de hasta 13 aminoácidos (Latham, P.W.

Nature Biotech, 1999, 17, 755) y hasta hoy en día es la única metodología de síntesis de

péptidos reportada que permite la síntesis de péptidos cuyas secuencias incluyen

aminoácidos no naturales.

- 5 Durante el diseño de AC bioespecíficos basados en péptidos se pueden presentar dos alternativas en lo que respecta a la unión del metal al residuo bioespecífico: 1) la unión directa del metal a la especie bioactiva (Caravan, P. et al. Chem. Comm. 2003, 2574) o 2) la unión covalente de un ligante macrocíclico tetraza al péptido seguido de la formación del complejo metálico con el ligante. Mientras las dos alternativas han sido previamente reportadas la segunda es más promisorio puesto que asegura la formación de un complejo estable con el metal no limitando así la aplicación a sistemas bioespecíficos que enlacen fuertemente al metal.

- La síntesis de ligantes macrocíclicos del tipo tetraaza que permitan la unión covalente hacia péptidos (anticuerpos, proteínas) ha sido reportada ampliamente (US Pat No. 5,428,156), más sin embargo esta ha sido principalmente limitada a la derivatización de grupos amino terminales libres de péptidos, o en caso de estar bloqueados a grupos amino epsilon de lisinas (Van Hagen, P.M. et al. Int. J. Cancer Radiat. Oncol. Invest. 2000, 90, 186–198) y en pocos casos se ha aplicado la derivatización de grupos tioles de cisteínas (Sherry, A.D. et al. J. Supramolecular Chem. 2002, 2). Esta derivatización con ligantes ha sido reportada al final del proceso de SPFS-Fmoc siempre y cuando exista un solo grupo amino para derivatizar. Sin embargo, en presencia de dos grupos amino libre la derivatización se vuelve complicada, requiriéndose de esquemas de protección ortogonal entre los grupos amino para derivatizar un solo grupo de forma específica (Tung, C-H. et al. Bioconjugate



Chem. 2000, 11(3), 301-305). Finalmente, la derivatización controlada en presencia de más

de dos grupos aminos se vuelve aún más complicada y no existe reporte en lo que respecta

a una multiderivatización o al acoplamiento de dos secuencias peptídicas independientes

mediante. Por otro lado el limitar la posición del ligante a lisinas limita la aplicación de AC

5 en RMI en lo que respecta a la sensibilidad máxima alcanzada puesto que esta depende en

gran proporción de los tiempos de rotación correlacional que tenga el complejo final unido

al péptido al interaccionar con la macromolécula (proteína). Así se ha observado que ha

10 pesar de que este tiempo rotacional generalmente se incrementa dado el proceso de unión

entre el AC y la biomolécula objetivo estos no son los óptimos esperados lo cuál se

atribuido a la libre rotación que existe por la cadena lateral que une al complejo con el

péptido como es el caso de lisinas (Caravan, P. et al. Chem. Comm. 2003, 2574). De tal

forma que para resolver este problema se ha sugerido el incorporar el Gd(III) dentro del

péptido sin utilizar ligantes, sin embargo aunque dicha técnica mejora la sensibilidad de los

sistemas generados esta grandemente limitada a péptidos que puedan formar complejos

15 estables termodinámicamente con el metal, de tal forma que el empleo de ligantes es

preferido. Respecto al desarrollo de técnicas en las que se puedan enlazar dos unidades

peptídicas independientes que mantengan su actividad y que contengan un ligante cuyo

complejo metálico le de una tercera funcionalidad no han sido reportados. Tampoco se

conocen procedimientos que permitan el monitoreo del efecto que tiene el punto y

20 ubicación del ligante macrocíclico dentro de un péptido relativo al tiempo de rotación de

correlación y por tanto respecto a los tiempos de relajación longitudinal ( $T_1$ ). Más sin

embargo se tiene como antecedente el como posicionar DO3A dentro de un péptido usando

DOTA-aminoácidos (De León-Rodríguez, L.M. et al. Chem. Eur. J. 2004, 10, 1149)



Instituto  
Mexicano  
de la Propiedad  
Industrial

mediante la SPFS. Aunque en este último trabajo se describe la síntesis de dos aminoácidos derivatizados con DOTA-tris-tBu-éster, el proceso es muy tedioso, de rendimientos pobres a moderados y no garantiza la obtención de productos enantioméricos puros, de hecho análisis no reportados demuestran que el porcentaje de rendimiento enantiomérico para el

5 proceso en mención es menor del 80%, lo cual disminuye notablemente el rendimiento del proceso reportado. Así mismo complica el proceso de purificación del enantiómero deseado, lo cual lo hace un procedimiento muy limitado para la producción industrial de estos derivados. Por otro lado el interés de dicho trabajo se centra en determinar el efecto que tiene la posición del ligante en la especificidad del péptido y sólo establece la

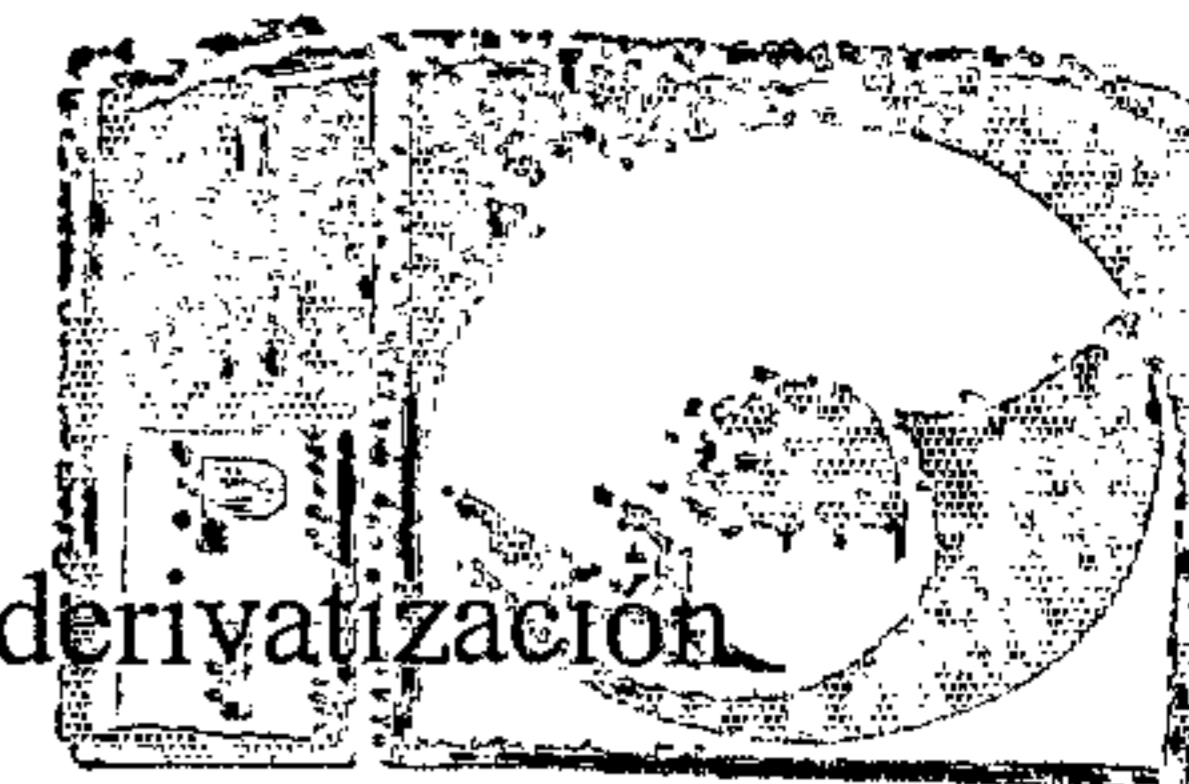
10 posibilidad de utilizar los derivados de aminoácidos de DO3A en la posición donde se encuentre el mismo aminoácido pero sin modificar, lo cual limita su aplicación a secuencias de péptidos que contengan estos aminoácidos.

Por otro lado la unión de dos secuencias péptidicas con diferente funcionalidad mediante un ligante macrocíclico tetraaza, con lo cual se generarían sistemas multifuncionales no ha sido documentada. En particular sería de interés que el ligante macrocíclico quedará internamente incluido dentro de la secuencia de péptidos y no unido a este mediante una cadena lateral de uno de los aminoácidos, a lo cual no se ha desarrollado ninguna técnica que lo permita.

Para poder incorporar internamente un ligante macrociclo del tipo tetraaza se ve la

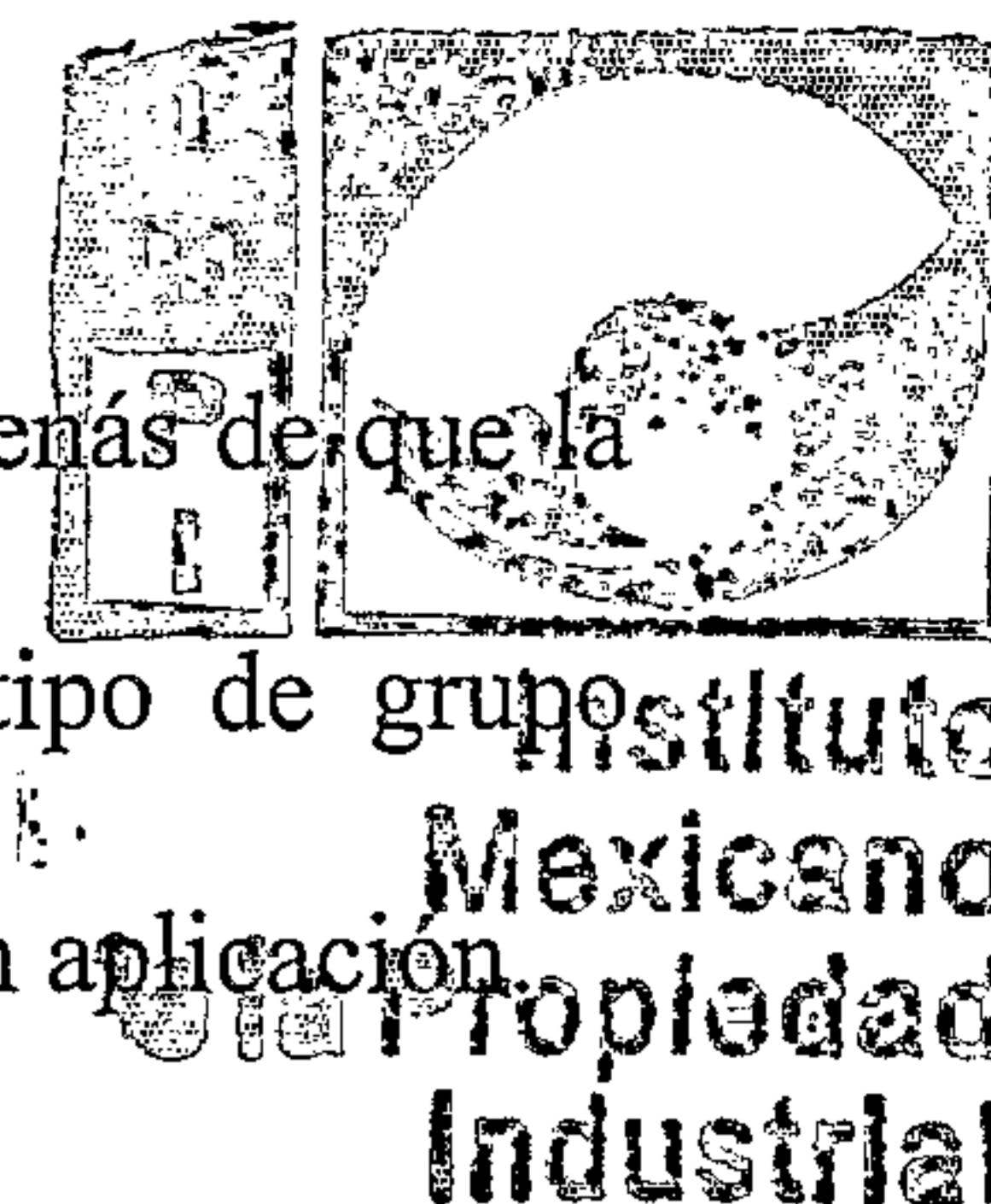
20 necesidad de desarrollar procesos de síntesis simples de sistemas N, N'' bifuncionalizados y de sistemas derivados de estos, trifuncionalizados, es decir donde dos substituyentes son iguales para los grupos amino N, N'' mientras los otros substituyentes son iguales o diferentes (N', N'''). Procesos comunes de funcionalización de macrocíclicos tetraaza se





dividen en dos: Procesos de derivatización directa y procesos de protección, derivatización  
 desprotección. Mientras los primeros son preferidos estos se han caracterizado por generar  
 productos en rendimientos desde moderados a pobres, largos periodos de reacción y de  
 pobre a regular regioselectividad. Por otro lado los métodos de protección-derivatización-  
 5 desprotección (Welch, M.J. et al. Chem.Comm. 2003, 766-767) ofrecen la ventaja de tener  
 un mejor control en la regioselectividad de los productos generados y por tanto los  
 rendimientos son buenos, aunque en muchas ocasiones presentan la desventaja de ser  
 procesos largos y tediosos. Respecto a procesos de bifuncionalización N,N' de ligantes  
 macrocíclicos tetraaza existen metodologías reportadas de funcionalización directa para  
 10 generar sistemas substituidos N,N' (US Pat. No. 6,417,354,B1), así como procesos de  
 protección N,N' (Bellouard, F. et al. J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, 1999: 3499). Sin  
 embargo, el incorporar internamente macrocíclicos tetraaza en péptidos mediante una  
 derivatización N,N' presenta la problemática de inhibir la bioespecificidad individual de los  
 péptidos dado el acercamiento espacial entre estos. Dado lo anterior se prefiere el intercalar  
 15 el ligante internamente dada una funcionalización peptídica N,N''. En la literatura existen  
 procesos para generar ligantes macrocíclicos tetraaza N,N'' derivatizados mediante la  
 formación de complejos metálicos intermediarios (Lukeš, I. et al. Tet. Lett. 2000, 41, 1249-  
 1253), mediante un esquema de protección y funcionalización por formación de sales  
 cuaternaria de amonio seguida de una desprotección en condiciones fuertemente básicas  
 20 (Abbeyes, H. et al. Inorganica Chimica Acta, 1994, 220, 347-348) y mediante un esquema  
 de protección dado un extremo control del pH durante la reacción (Sherry, A.D. et al.  
 Synthesis 1997, 759-763). Aunque todos los procesos reportados presentan ventajas y  
 desventajas particulares todos tienen el problema de ser largos requieren de un control

óptimo de condiciones y de una purificación previa a la funcionalización, además de que la aplicación de estos procesos esta limitada a la introducción de un solo tipo de grupo protector. De esta forma el desarrollo de una metodología simple sería de gran aplicación.



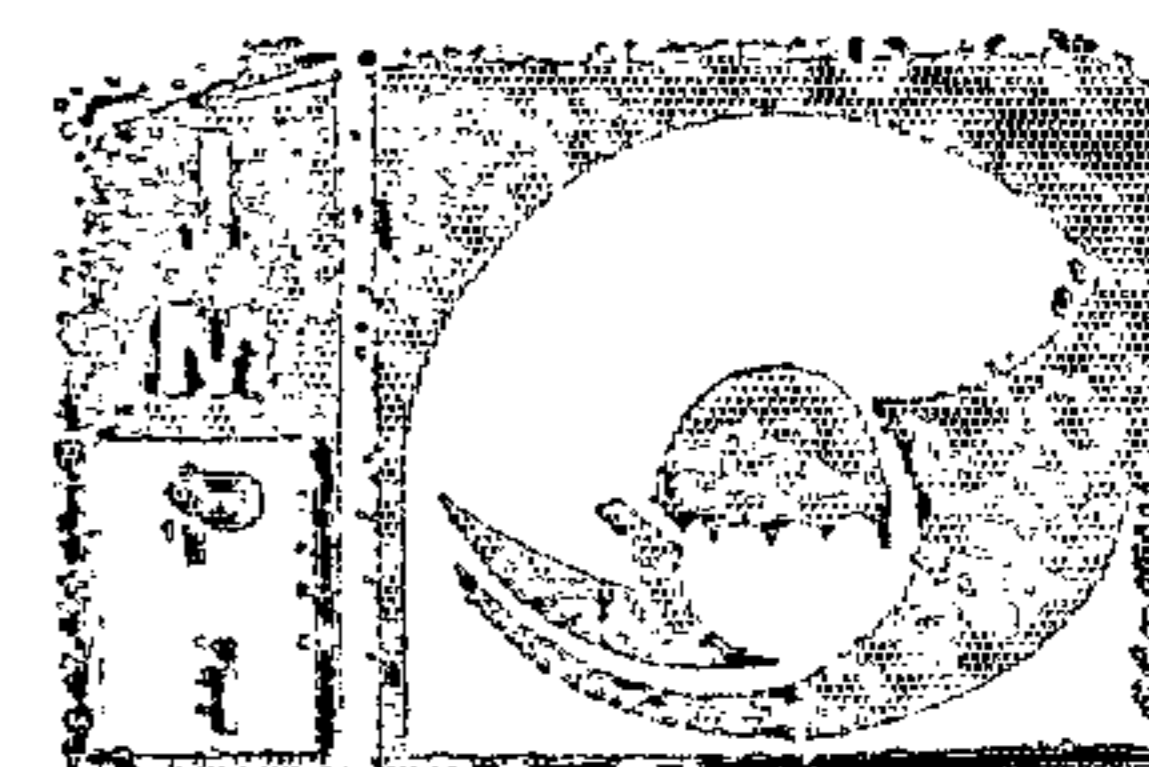
## 5 OBJETOS DE LA INVENCION

Teniendo en cuenta los defectos de las técnicas anteriores así como la carencia de procesos para lograr las metas señaladas es objeto de la siguiente invención el desarrollar procesos simples para la diprotección N, N'' de compuestos macrocíclicos tetraaza.

Es un objeto más de la presente invención de desarrollar rutas sintéticas simples para la síntesis de derivados de aminoácidos de ligantes macrocíclicos tetraaza.

Otro objeto de la presente invención es desarrollar procesos simples para la producción de ligantes macrocíclicos tetraaza funcionalizados N, R; N'', R que a su vez permita la generación de ligantes tetraaza con substitución N, R; N'', R; N', R'; N''', R' así como sistemas N, R; N'' R ;N', R' ; N''', R''.

Otro objeto de la siguiente invención es el generar moléculas derivadas de macrocíclicos tetraaza que permitan la unión de péptidos independientes para generar sistemas multifuncionales.

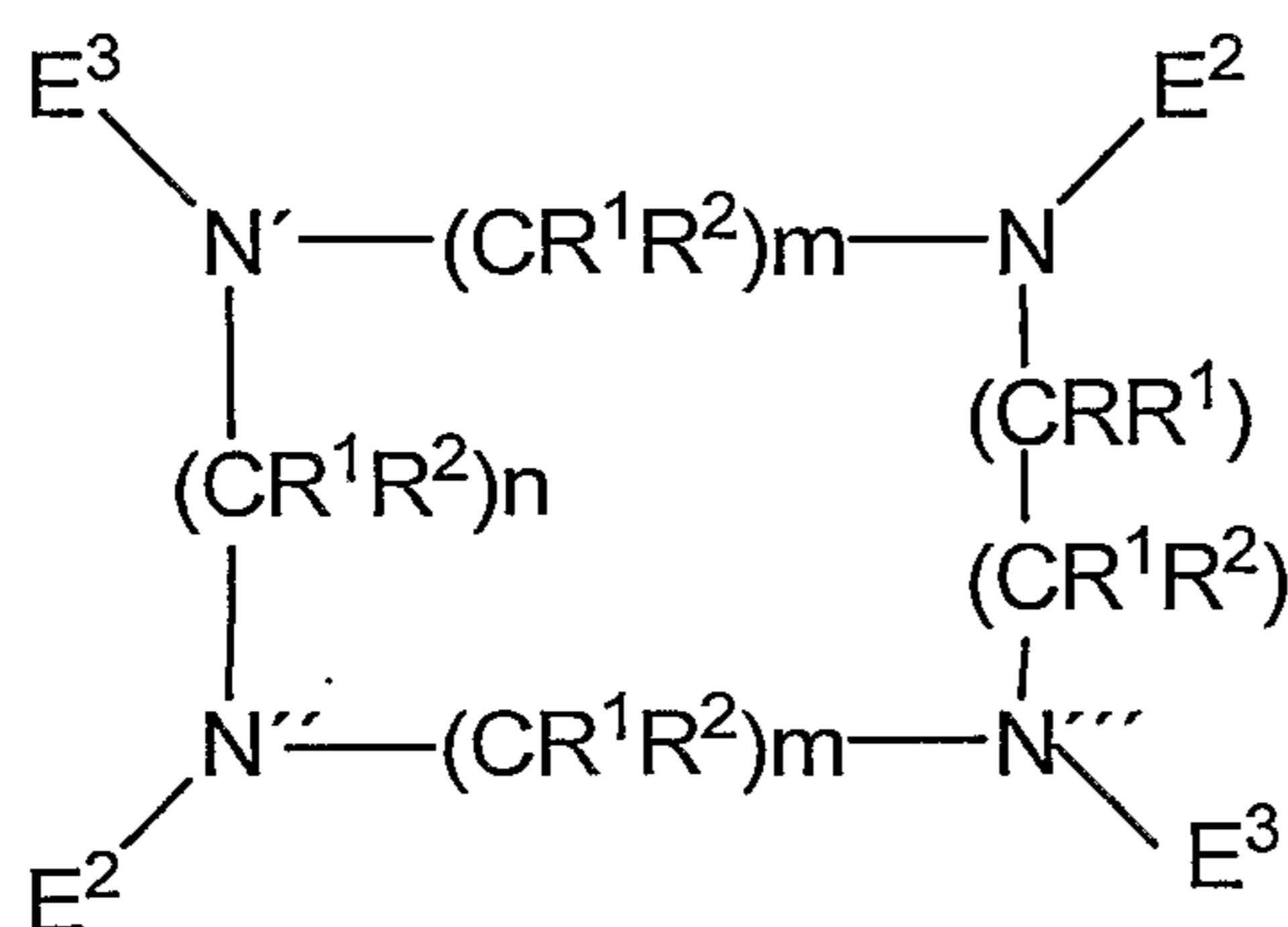


Instituto  
Mexicano  
de la Propiedad  
Industrial

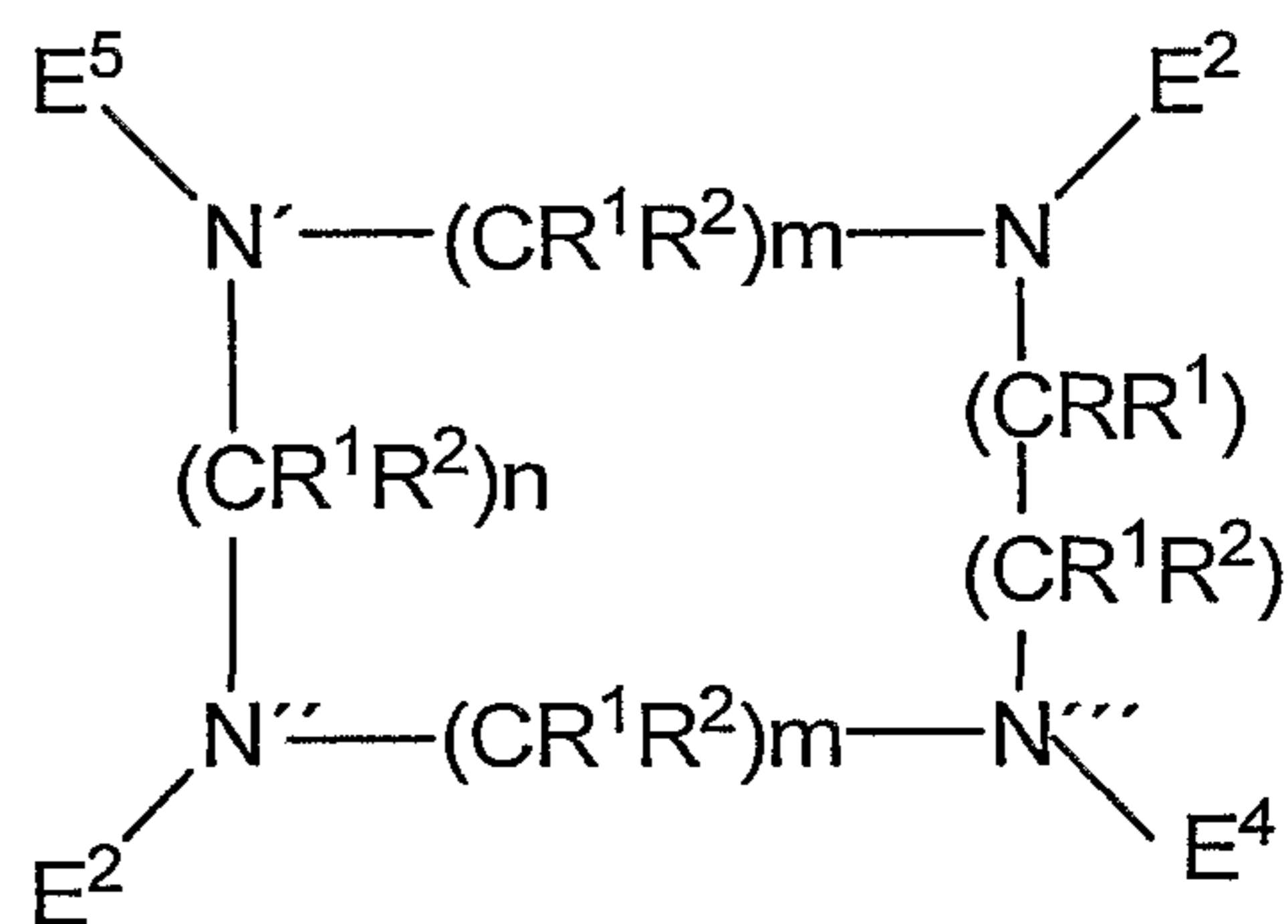
## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En un aspecto esta invención se refiere a un proceso para la generación de ligantes  
5 macrocíclicos del tipo poliaza disustituidos o polisustituidos con altos rendimientos. Este  
proceso consiste en la diprotección regioespecífica N, N' de macrocíclicos tetraaza mediante  
la reacción de dos equivalentes de succinimidilcarbamatos o pentafluorofenilcarbamatos de  
grupos protectores como Fmoc, Boc y CBz con un equivalente del macrociclo tetraaza en  
10 disolventes no polares como hexanos, benceno o polares apróticos tales como cloroformo,  
diclorometano, acetonitrilo, eter etílico, THF. En lo que esta invención se refiere el ligante  
macrocíclico tetraaza es de la familia del cyclen (1,4,7,10-tetraaza ciclododecano) acorde a  
la fórmula 1 donde  $E^2=E^3=H$ ,  $m=n=2$ ,  $R^1=R^2=H$  pero no limitado a este, y R puede ser  
hidrógeno o un grupo p-nitrobenzil, p-aminobenzil, p-isotiocianato-benzil, p-  
bromoacetamido-benzil, p-cianobenzil, 4-aminobutil- y derivados de estos. También la  
técnica descrita se pueda aplicar a derivados de cyclen N funcionalizados de fórmula 2  
donde  $E^2=E^5=H$  mientras  $E^4$  es un sustituyente cualquiera excepto aquellos que contengan  
grupos amino, alcoholes o tioles libres.

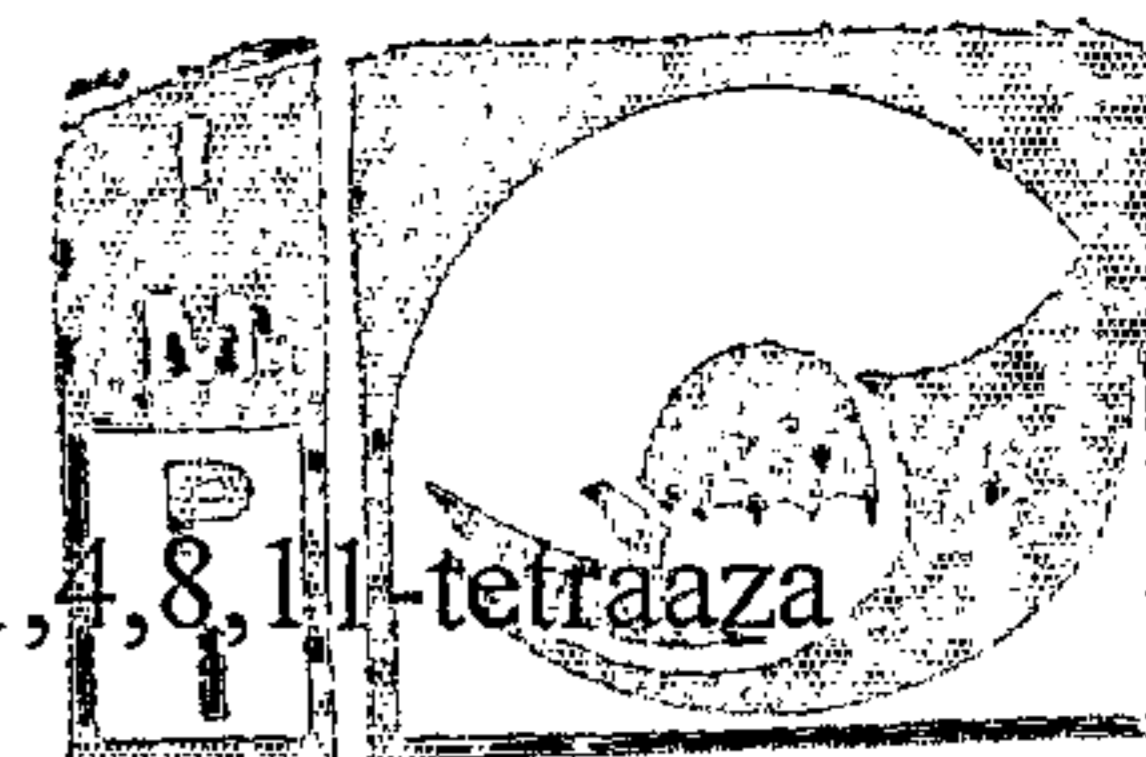
20



-1-



-2-



También la técnica aplica si el ligante es de la familia del cyclam (1,4,8,11-tetraaza-ciclotetradecano) donde  $n = 2$ ,  $m = 3$  y demás sustituyentes  $R^1$ ,  $R^2$  y  $R$  se definen como arriba. La reacción se puede realizar a una temperatura desde  $-75$  a  $70^\circ\text{C}$  aunque se prefiere el rango de  $25$  a  $50^\circ\text{C}$ . y el tiempo de reacción puede ser de  $12$  a  $36$  horas, dependiendo del

Instituto  
Mexicano  
de la Propiedad  
Industrial

5 rendimiento deseado. La purificación de los productos disubstituidos de acuerdo a la fórmula 1 donde  $E^2 = \text{Fmoc}$ ,  $\text{Boc}$  o  $\text{CBz}$  y  $E^3 = \text{H}$ , mientras los otros sustituyentes son definidos como anteriormente se puede llevar a cabo por cromatografía, o extracción líquido-líquido siendo esta última preferida en sistemas acuosos básicos solvente orgánico etéreo, derivado de éster o halogenado. Los productos recuperados después de la purificación se obtienen en rendimientos excelentes, siendo importante señalar que los rendimientos de producto generado previo a la purificación son cuantitativos.

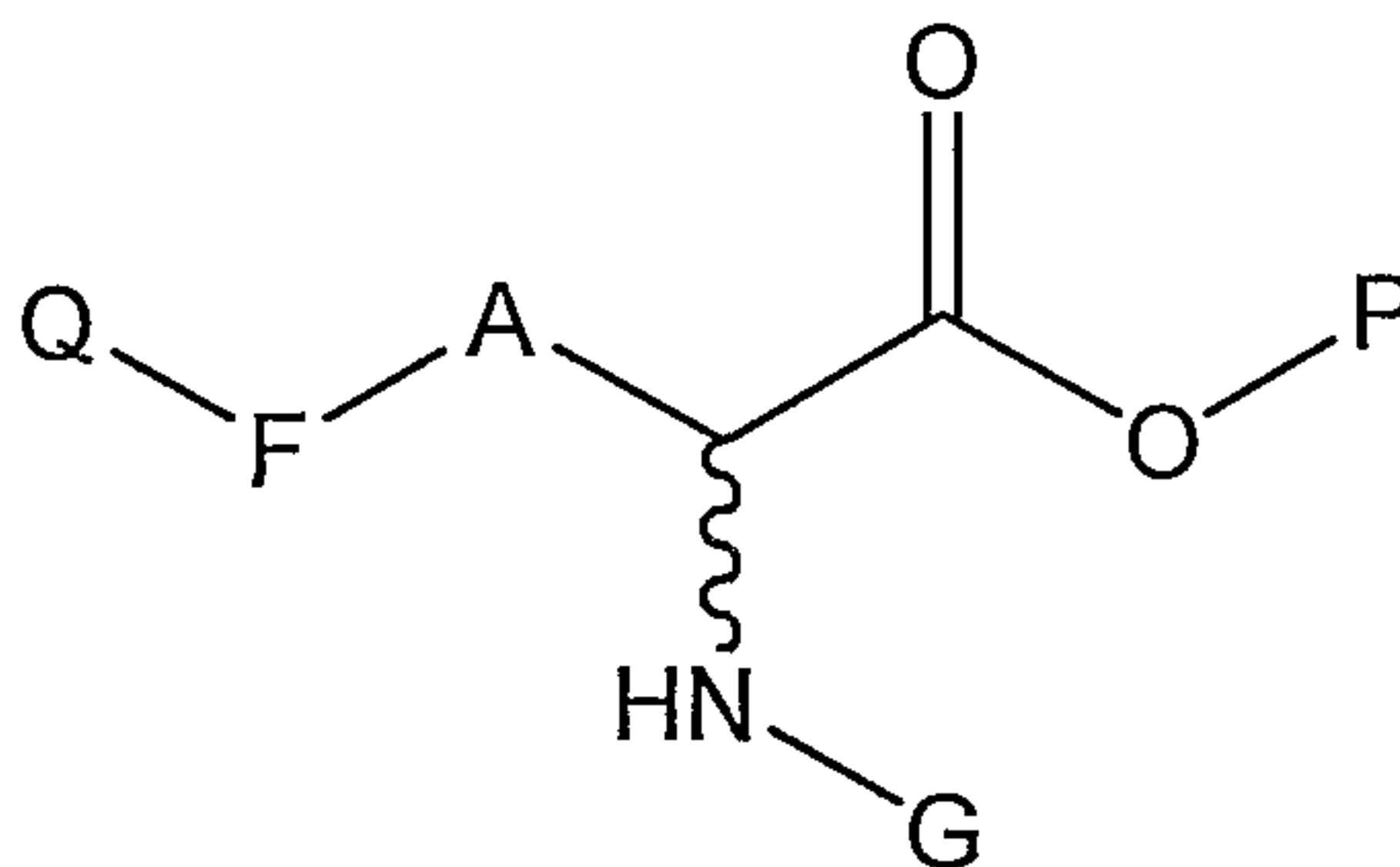
Derivados funcionalizados simétricos  $N'$ ,  $N''$ , se pueden obtener a partir del producto diprotectado puro o en forma secuencial continua a partir de la mezcla de reacción del producto diprotectado, seguido de una remoción del grupo protector. Así la funcionalización se lleva a cabo por simple adición de una base orgánica tal como trietilamina, diisopropilamina o una base inorgánica como carbonato de potasio y un reactivo electrofílico con grupos tales como halógeno, tosilatos, triflatos, epóxidos, tiocianato o isocianato para funcionalizar los nitrógenos  $N'$ ,  $N''$  generando productos de acuerdo a la fórmula 1 donde  $E^2 = \text{Fmoc}$ ,  $\text{Boc}$  o  $\text{CBz}$  y  $E^3$  es metilcarboxilatos, metilcarboxiamidas, metilfosfonatos, metilsulfonatos, metilnitrilos, alquilos de un átomo de carbono hasta veinte, lineales o ramificados, cicloalquilos de tres átomos de carbono hasta ocho, arilos simples o condensados de seis átomos de carbono o derivados funcionalizados de estos.

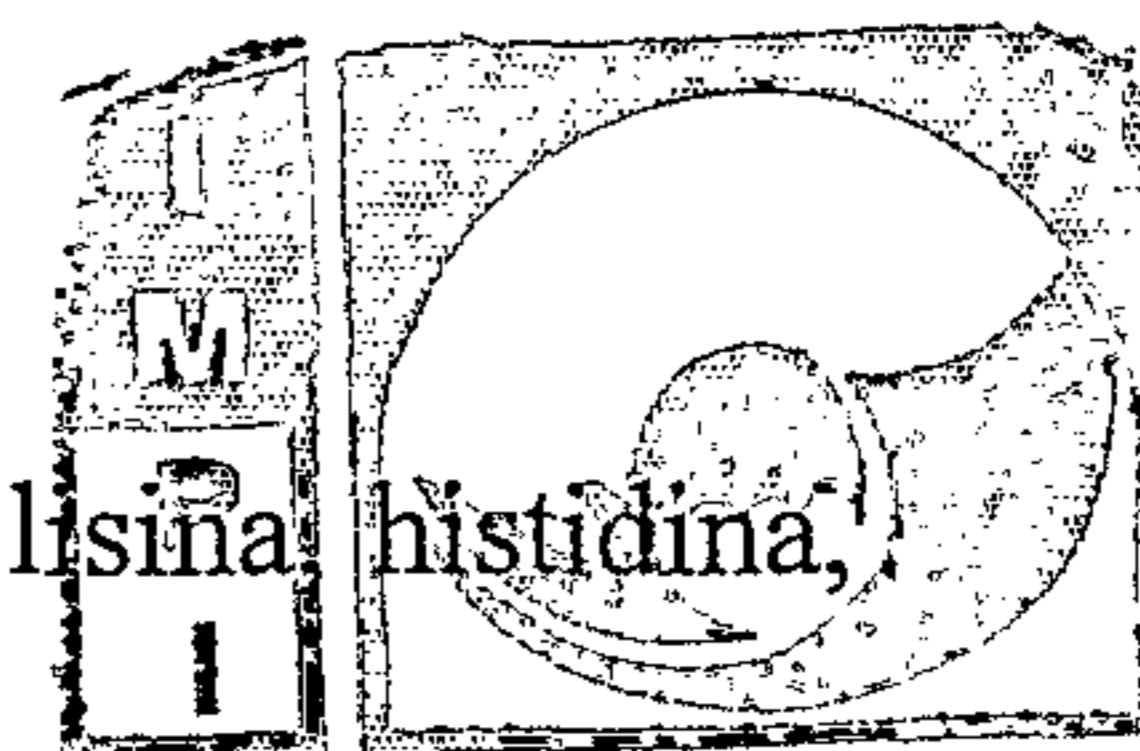
Finalmente la desprotección se lleva a cabo bajo condiciones dictadas por el grupo



Instituto  
Mexicano  
de Propiedad  
Industrial

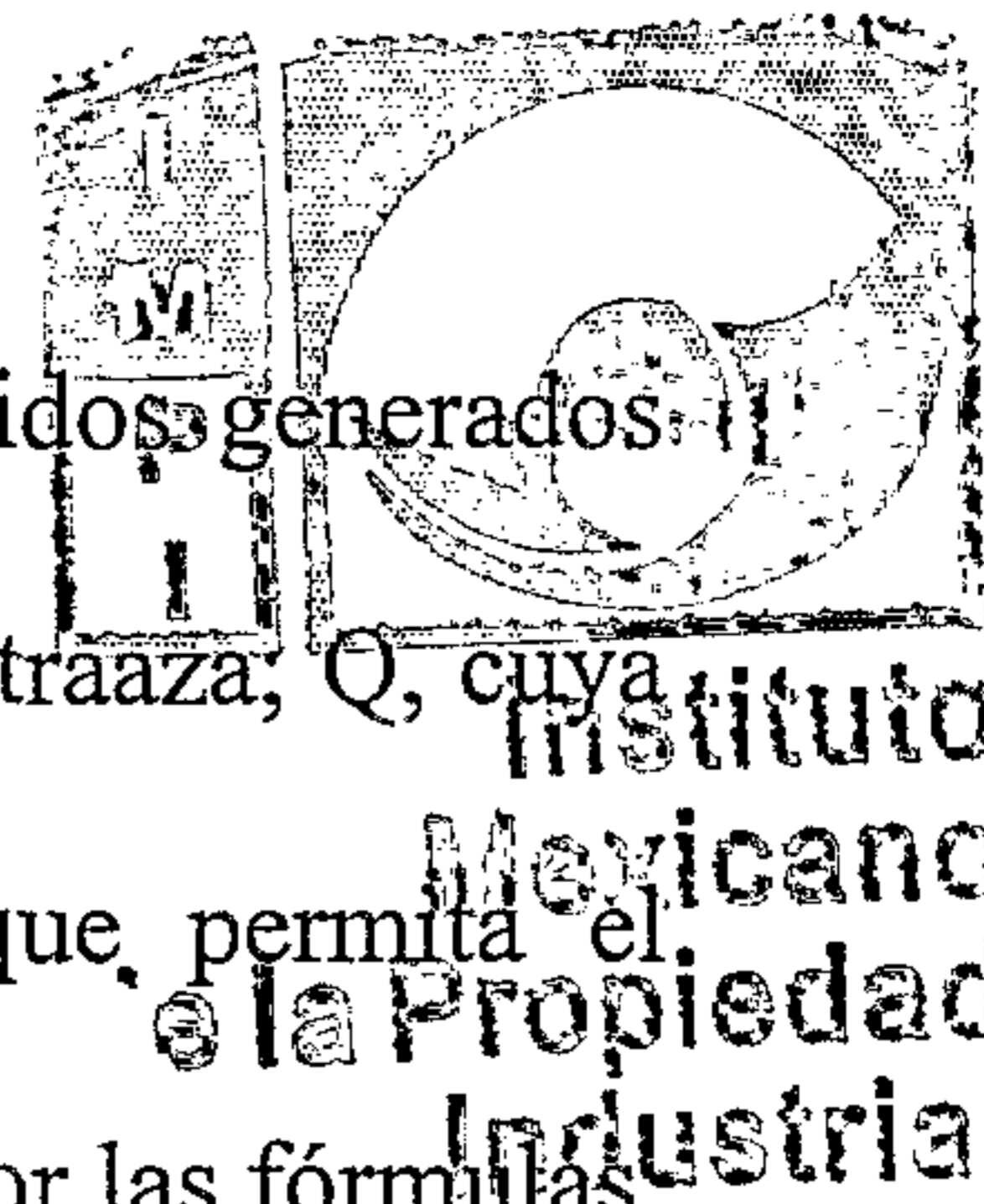
- protector según lo reportado en el estado de arte de la técnica para generar sistemas con sustituyentes en  $E^3$  mientras  $E^2 = H$  de acuerdo a la fórmula 1. De aquí se pueden generar derivados difuncionalizados simétricos al reaccionar  $N, N'$  con algún electrófilo dando sistemas donde  $E^2, E^3$  con diferentes sustituyentes de acuerdo a la fórmula 1.
- 5 Por otro lado derivados difuncionales asimétricos de acuerdo a la fórmula 2 donde  $N', N''$  tienen sustituyentes  $E^4$  y  $E^5$  diferentes se pueden obtener a partir del producto diprotegido puro o en forma secuencial continua a partir de la mezcla de reacción del producto diprotegido dada la reacción secuencial con electrófilos  $E^4$  y  $E^5$  con grupos tales como halógeno, tosilatos, triflatos, epoxidos, tiocianato o isocianato seguida de la remoción de los grupos protectores  $E^2$  generando sistemas donde  $E^2 = H$  mientras  $E^4$  y  $E^5$  son sustituyentes diferentes pertenecientes aunque no limitados a los mencionados con anterioridad. Por último a partir de estos derivados se pueden generar sistemas trifuncionales dada la reacción de los derivados difuncionales asimétricos desprotegidos con electrófilos para generar sistemas donde  $E^2$  es un sustituyente diferente a hidrógeno.
- En otro aspecto la presente invención se refiere a procesos sintéticos simples para la generación de derivados de aminoácidos de ligantes macrocíclicos tetraaza de fórmula 3.



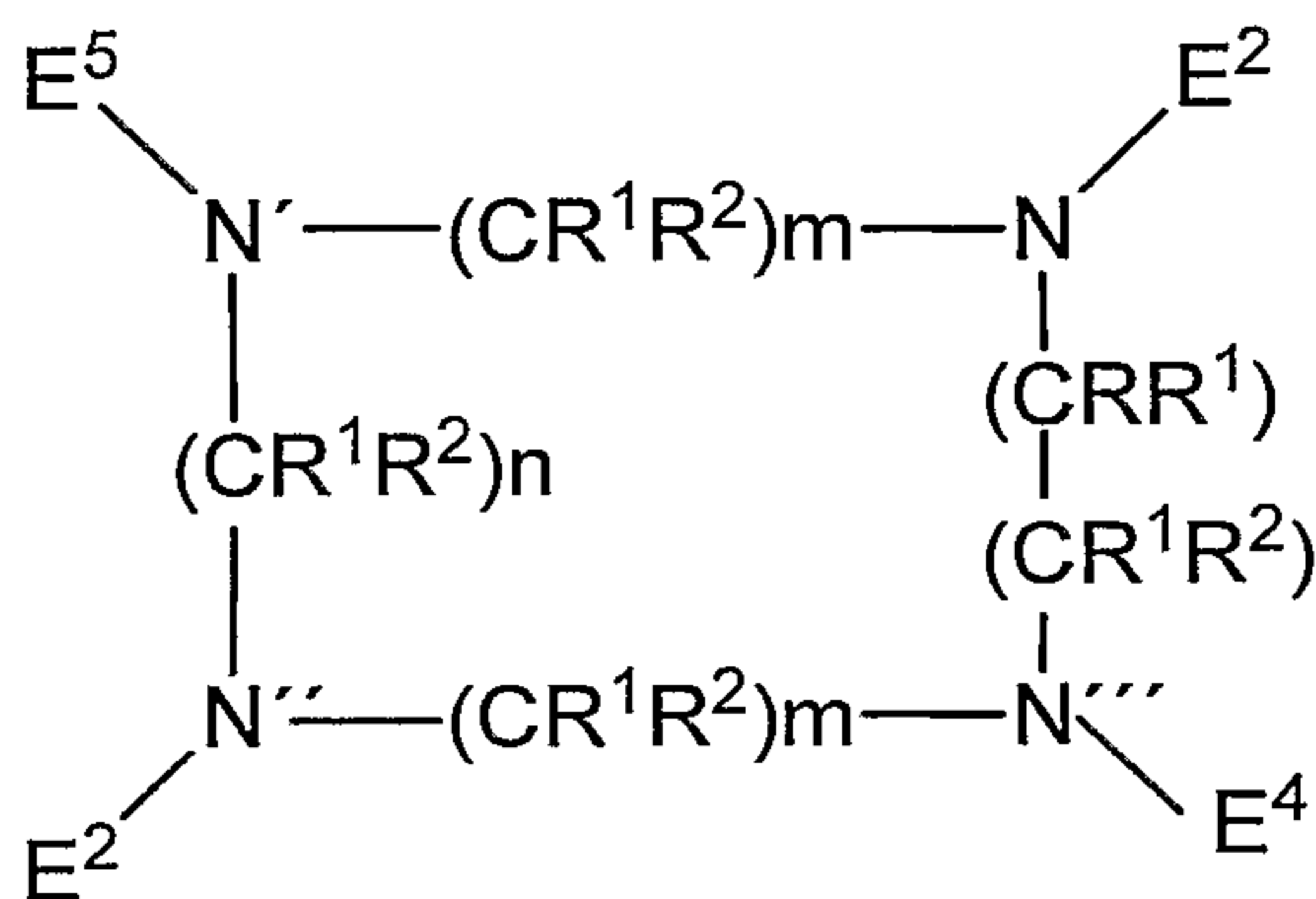


Instituto  
Mexicano  
de la Propiedad  
Industrial

- Para esto se parte de un aminoácido L o D o mezcla racémica tales como lisina, histidina, fenilalanina, ácido aspártico, treonina, serina, cisteina, tirosina, triptofano o cualquier aminoácido modificado constituido por una cadena lateral, A, que incluye una estructura aromática o cadena alifática definida por el aminoácido correspondiente la cual contiene un
- 5 grupo funcional F sea un amino, ácido carboxílico, alcohol o tiol libre Para el caso de aminoácidos aromáticos, fenilalanina y triptofano es necesario primero llevar a cabo una reacción de nitración para obtener el nitro derivado en cada caso,  $F = -NO_2$ , al cual hay que proteger los grupos amino alfa y ácido carboxílico con grupos protectores (G, P) estables a las condiciones de reducción (Ej. CBz, Bn, Fmoc, t-Bu, etc.) (Greene, T.W.; Wuts P.G.M.;
- 10 Protecting Groups in Organic Synthesis, 3ra Edición, John Wiley & Sons, 1999) comunmente empleadas para generar el amino derivado del aminoácido. Para los aminoácidos que presentan grupos funcionales F como amino, ácido carboxílico, alcohol o tiol hay que comenzar con un derivado de este que permita generar el aminoácido con el grupo funcional F libre mientras el grupo amino alfa y ácido carboxílico se encuentran
- 15 protegidos como se mencionó anteriormente. Es requisito que al final del proceso el aminoácido tenga el grupo amino alfa protegido con el grupo  $G = Fmoc$  (fluorenilmetilcarbamato) para su aplicación en SPFS-Fmoc, aunque no es necesario pero si deseable que dicho grupo se encuentre durante el proceso de síntesis durante el cual G puede ser cualquier otro grupo protector como CBZ (benzilcarbamato), Tfa (trifluoroacetil),
- 20 etc. (Greene, T.W.; Wuts P.G.M.; Protecting Groups in Organic Synthesis, 3ra Edición, John Wiley & Sons, 1999). Así la introducción de Fmoc de no ser antes del acoplamiento con Q, será después del acoplamiento siguiendo un esquema de desprotección de los grupos

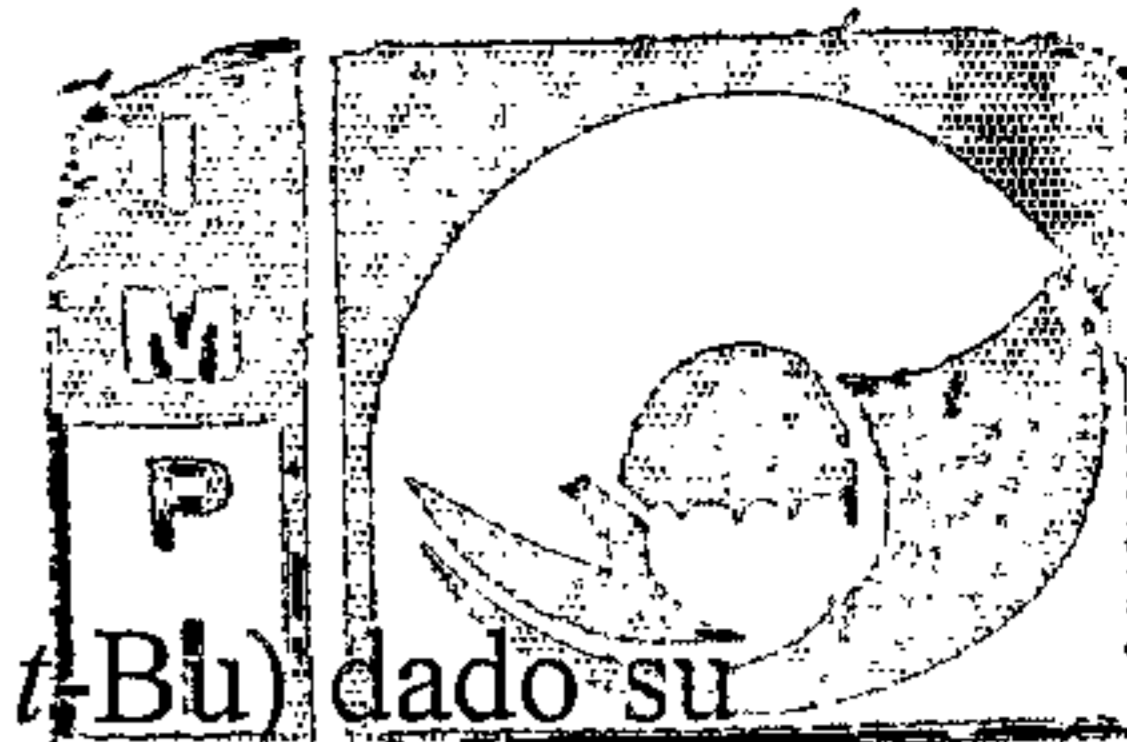


G y P seguida por la protección del amino alfa con Fmoc. Los aminoácidos generados siguiendo la descripción previa son acoplados con el ligante macrocíclico tetraaza, Q, cuya característica es que contenga un grupo reactivo derivatizado en N, que permita el acoplamiento con cualquiera de los aminoácidos descritos. Q está definido por las fórmulas



-2-

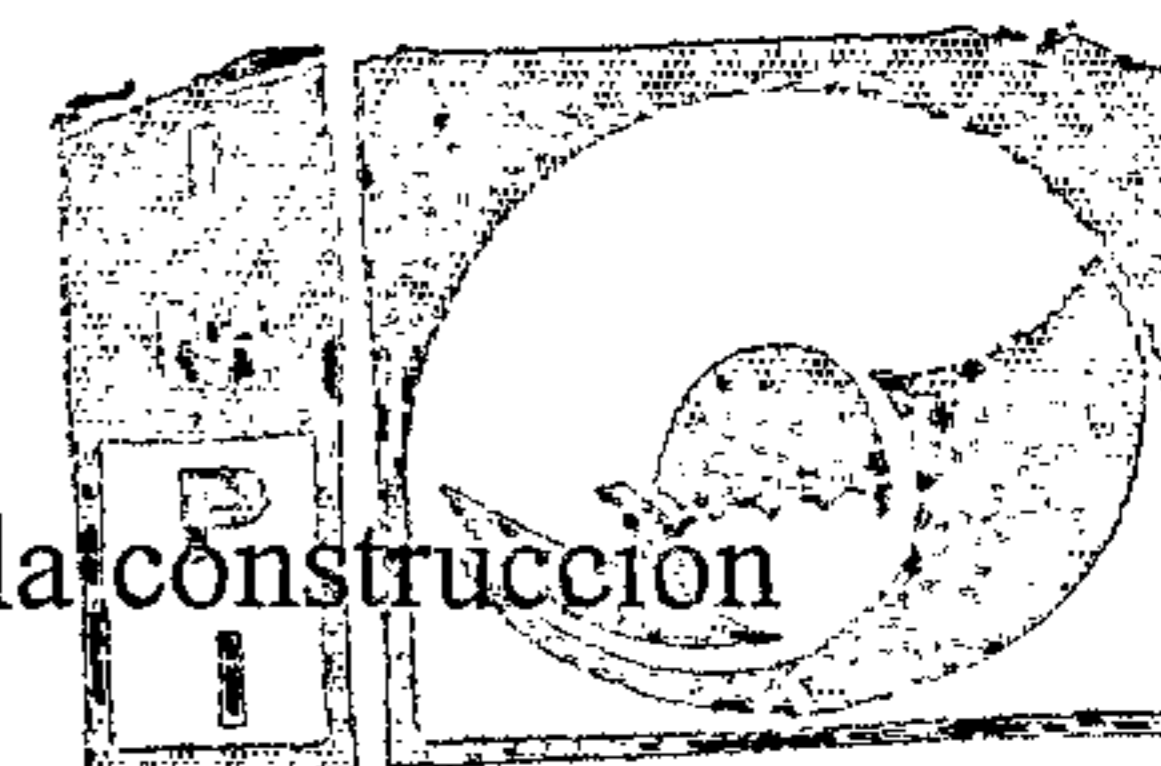
donde,  $n=m=2$  o  $n=2$   $m=3$ ,  $R^1=R^2 = H$ , R comprende hidrógeno, p-nitrobenzil, p-aminobenzil, p-isotiocionato-benzil, p-bromoacetamido-benzilo, p-cianobenzil, 4-aminobutil- o derivados de estos y  $E^2=E^4$  y son diferentes a  $E^5$  donde  $E^2$ ,  $E^4$  y  $E^5$  comprenden metilcarboxilatos, metilcarboxiamidas, metilfosfonatos, metilsulfonatos, metilnitrilos, alquilos de un átomo de carbono hasta veinte, lineales o ramificados, cicloalquilos de tres átomos de carbono hasta ocho, arilos simples o condensados de seis átomos de carbono o derivados funcionalizados de estos. Así para aminoácidos con grupos amino o alcoholes ( $F = -NH_2$ ,  $-OH$ ) es requisito que Q contenga un ácido carboxílico libre en  $E^5$  unido a  $N'$  para acoplarse por técnicas estándares de activación (Ej. diciclocoarboxidiimida, DCC; hidroxisuccinimida; NHS, o tetrametil amonio benzotriazol hexapentafluoruro; HBTU o similares), en forma de éster reactivo o como halogenuro de ácido a los grupos amino y alcoholes libres de los aminoácidos ( $F = -NH_2$  o  $OH$ ), mientras las demás funcionalidades de ligante derivatizadas en N,  $N''$ ,  $N'''$  están protegidas con



grupos lábiles a condiciones ácidas (Ej. *tert*-butilcarbamato; Boc, *tert*-butilo; *t*-Bu) dado su aplicación en síntesis de péptidos en fase sólida. Por otro lado para el acoplamiento de grupos con aminoácidos con F= -COOH se requiere que Q este derivatizado con una cadena que contenga un sólo grupo funcional alcohol o amino libre en N' en donde el acoplamiento se da como descrito anteriormente generando ésteres o amidas según sea el caso, mientras las demás funcionalidades de ligante derivatizadas en N, N'', N''' están protegidas con grupos lábiles a condiciones ácidas. Finalmente para aminoácidos con grupo funcional libre tiol, F= -SH, el acoplamiento se realiza con un ligante Q con una funcionalidad del tipo maleimida en N' (Sherry, A.D. et al. J. of Supramolecular Chemistry, 2003, 2(1-3), 1-15).

El aminoácido acoplado al ligante así generado puede estar como ácido libre P = H, protegido con algún grupo protector como benzilo, 2-cianoetilo fácil de remover (Greene, T.W.; Wuts P.G.M.; Protecting Groups in Organic Synthesis, 3ra Edición, John Wiley & Sons, 1999) o a partir del ácido libre se puede generar un éster reactivo como se describe en la literatura tal como succinimidil o pentafluorofenil o halogenuro de acilo, prefiriéndose los derivados de succinimidil o pentafluorofenil ya que estos derivados permitirían directamente la formación de un enlace covalente con un grupo amino alfa de otro aminoácido durante la síntesis de péptidos en fase sólida o líquida. Como se mencionó en los antecedentes no se han reportado metodologías sintéticas que permitan posicionar un ligante o molécula dentro de un péptido en otro residuo que no sea el aminoácido terminal, siempre y cuando este tenga el grupo amino terminal libre, o en grupos amino epsilon de lisina. Para lograr esto último durante las técnicas de síntesis química de péptidos se tienen

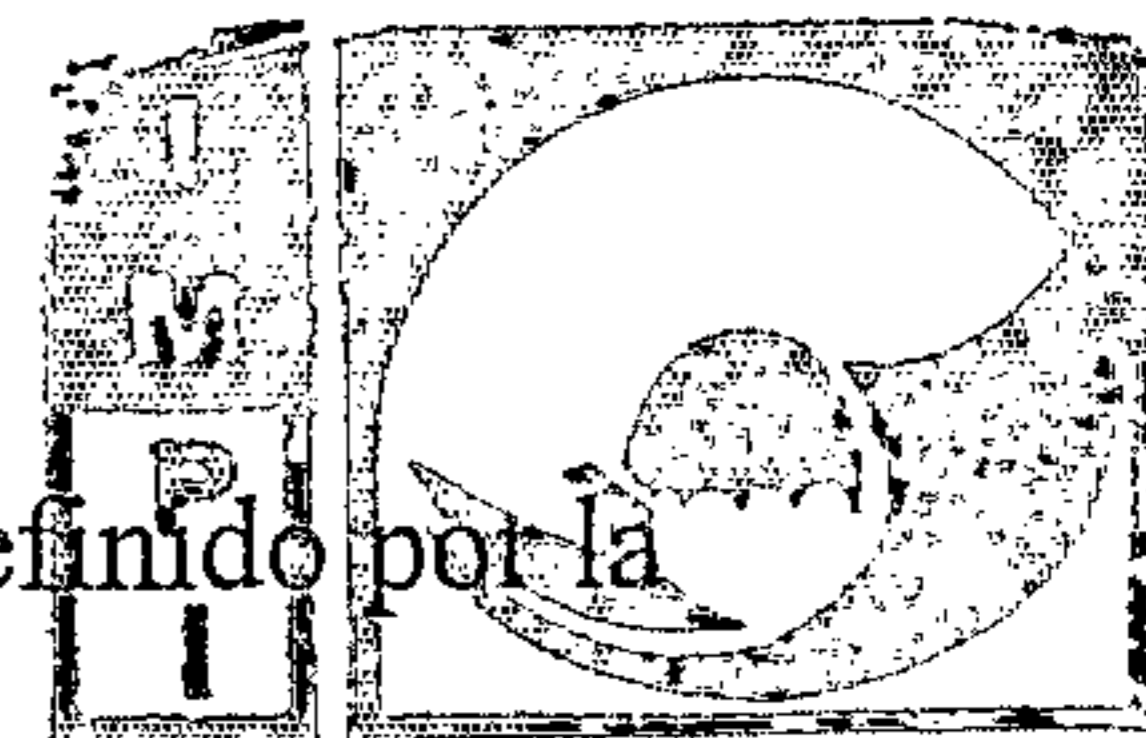




reportes donde se aplican técnicas de protección ortogonal, es decir durante la construcción de la cadena peptídica se protege el grupo amino epsilon de la lisina que se quiere marcar con un grupo protector lábil a condiciones diferentes a los grupos protectores comúnmente utilizados durante el proceso (Ejemplo: fluorenilmetilcarbamato; Fmoc, o tert-

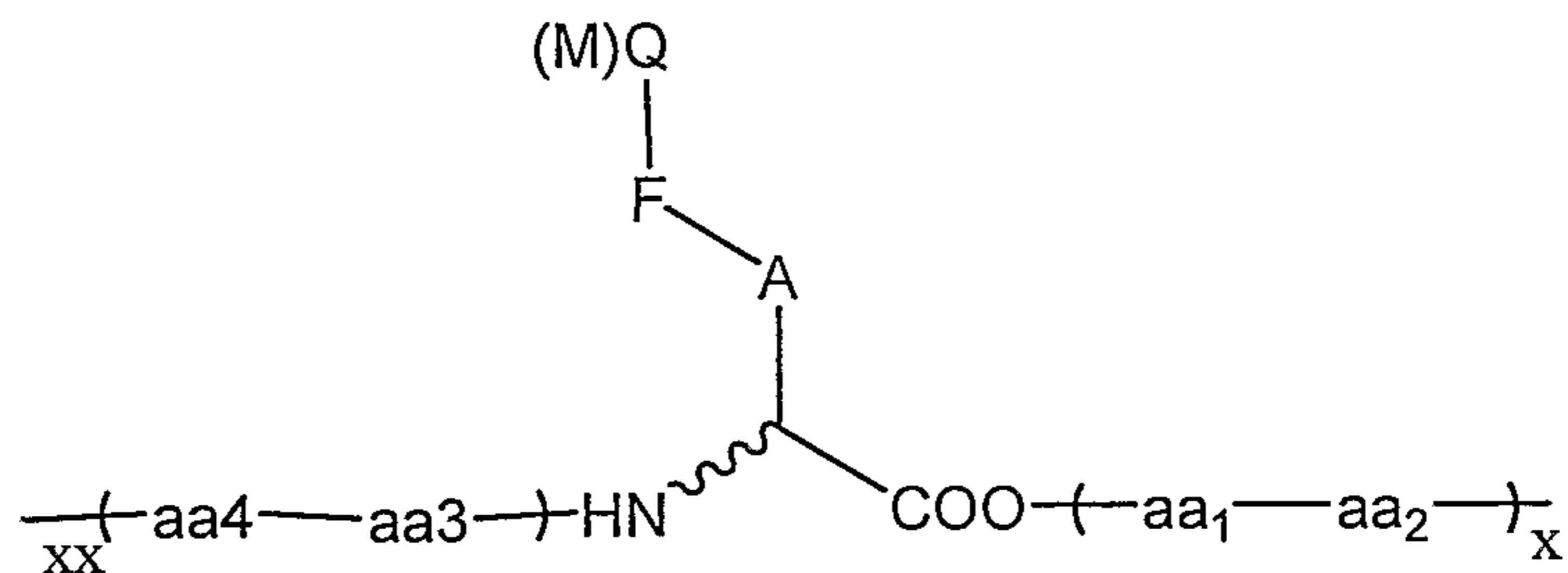
5 butilcarbamato; Boc). Sin embargo, este proceso además de limitar la posición de la molécula de marcaje dificulta el multimarcaje de péptidos con diferentes ligantes o moléculas. En la literatura se ha reportado la síntesis de derivados de lisina de ligantes como TPEN, Fulereo, DOTA en donde dichos derivados se han utilizado para marcar secuencias peptídicas en un aminoácido de lisina originalmente presente en el péptido, sin embargo en dichos estudios no se pretende generar bibliotecas péptido-ligante y por ser limitada a lisina y a que la secuencia contenga dicho aminoácido no se puede determinar el efecto de tener el ligante en un sistema rígido como sería el caso de fenilalanina. Por otro lado no se tienen reportes del uso de derivados de aminoácidos de ligantes macrocíclicos tetraaza para el acoplamiento de dos secuencias peptídicas.

Por último en esta invención se demuestra la aplicación de los derivados de aminoácidos de ligantes protegidos con Fmoc en el amino alfa del aminoácido mientras que los grupos funcionales  $E^2$  y  $E^5$  de Q de requerirlo están protegidos con grupos protectores lábiles a condiciones ácidas comúnmente utilizadas en síntesis de péptidos en fase sólida via Fmoc (SPFS-Fmoc) en la construcción de sistemas peptídicos trifuncionales utilizando esta misma técnica. Estos sistemas se caracterizan por contar con un péptido X constituido por los aminoácidos  $aa_1, aa_2, \dots$  que puede tener una biofunción específica X, unido a otro péptido XX constituido por los aminoácidos  $aa_3, aa_4, \dots$  con biofunción específica XX



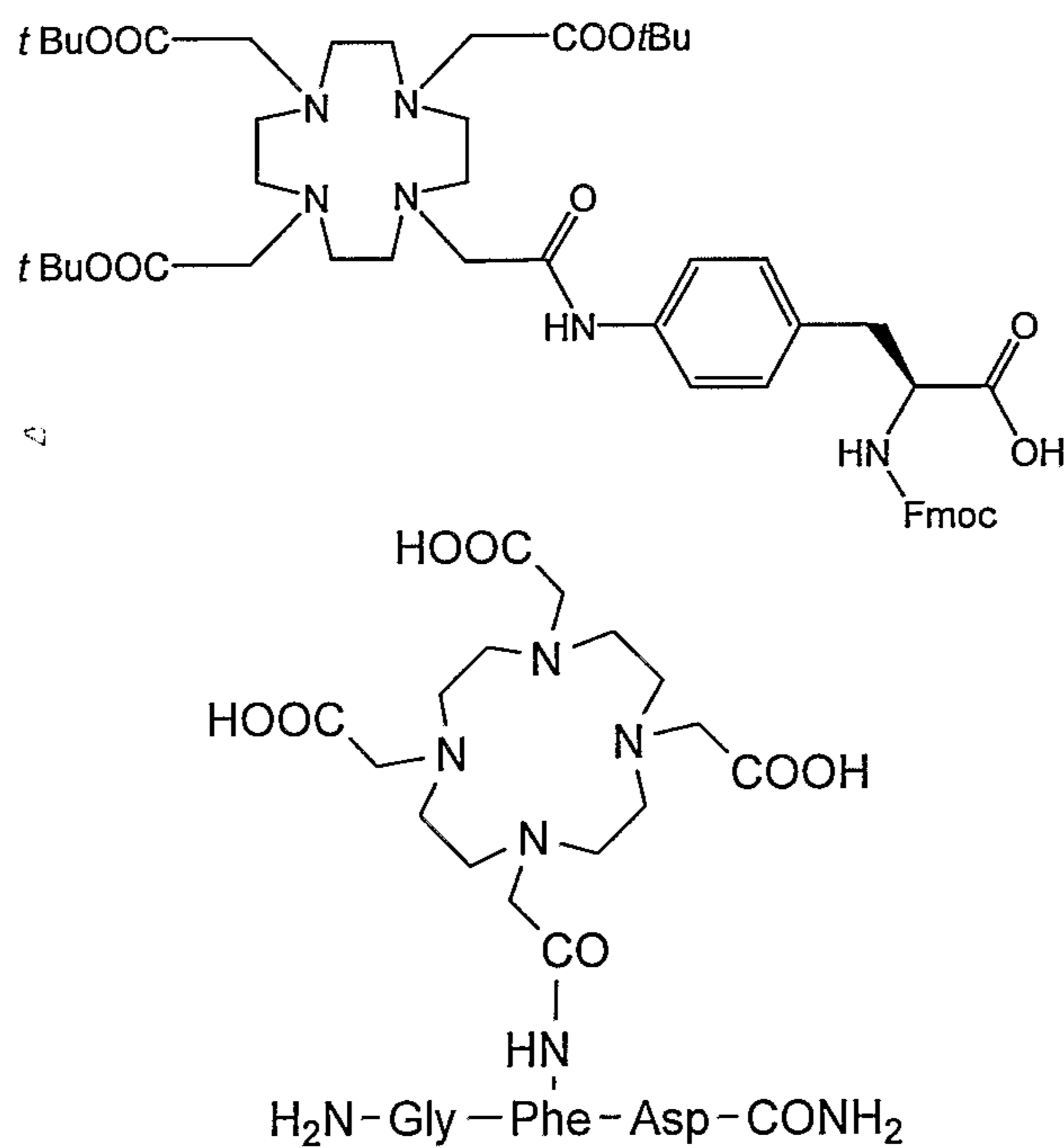
mediante un aminoácido derivatizado con un ligante macrocíclico tetraaza Q definido por la

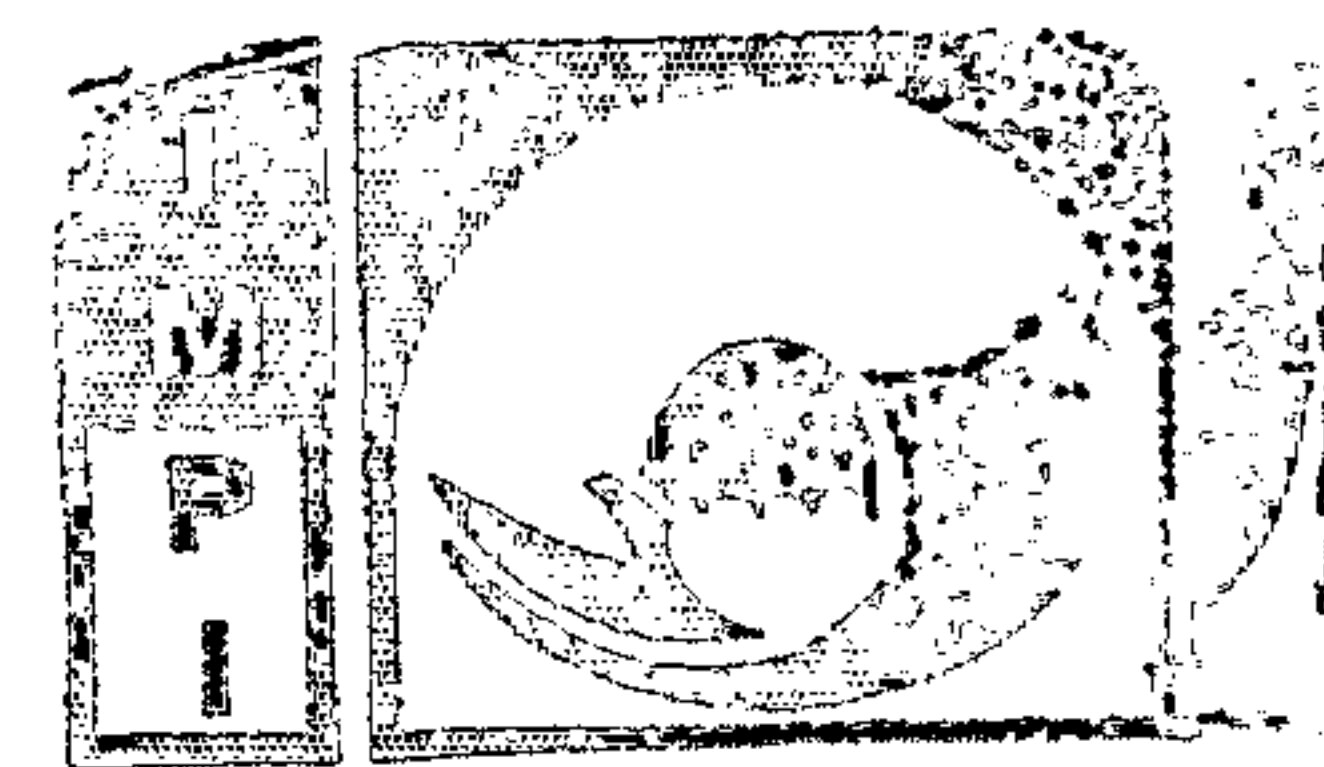
fórmula 2 el cual al formar un complejo metálico con un metal paramagnético radioactivo, M genera un sistema trifuncional.



-4-

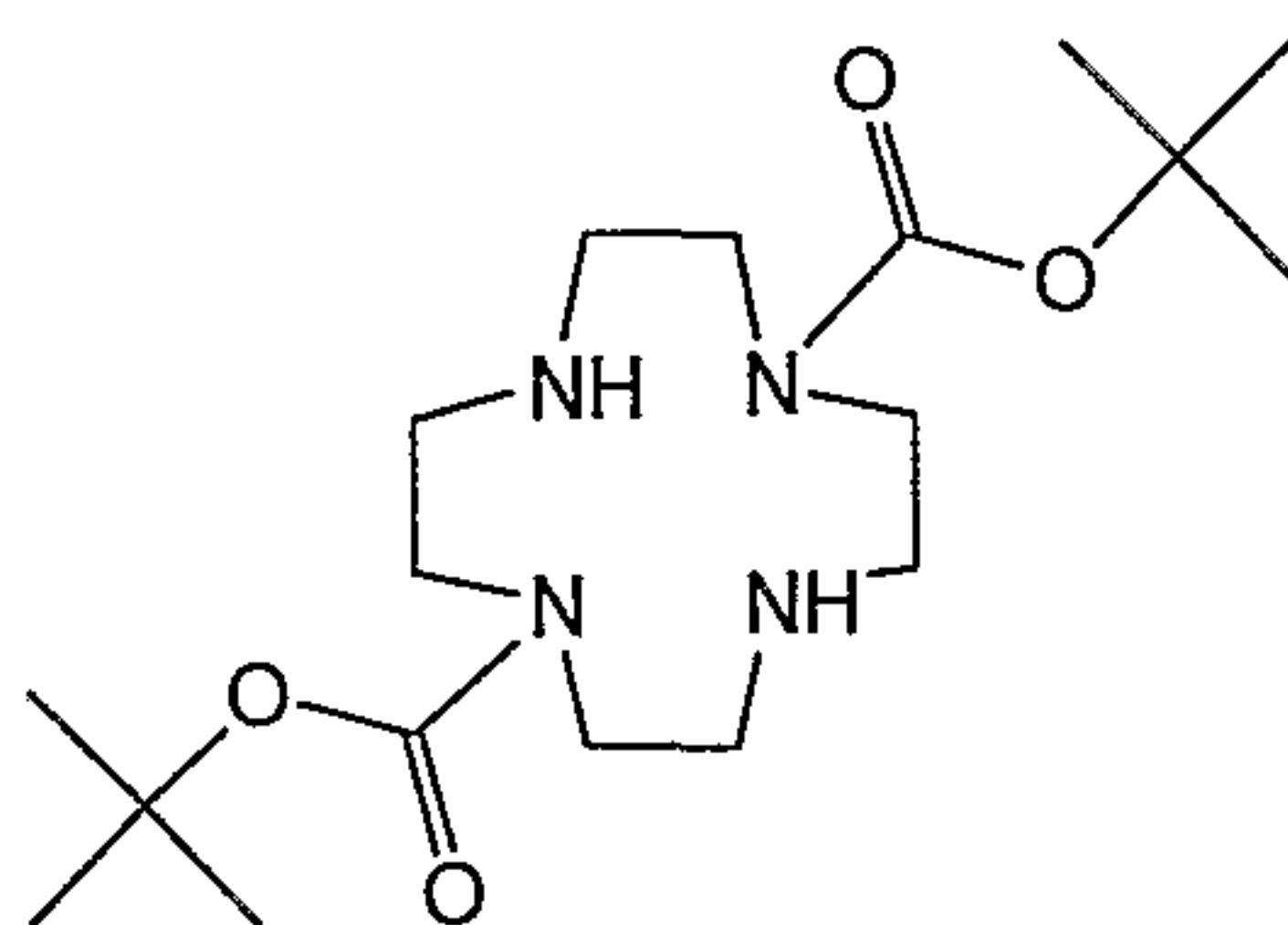
De esta forma la presente invención es ejemplificada con la síntesis de



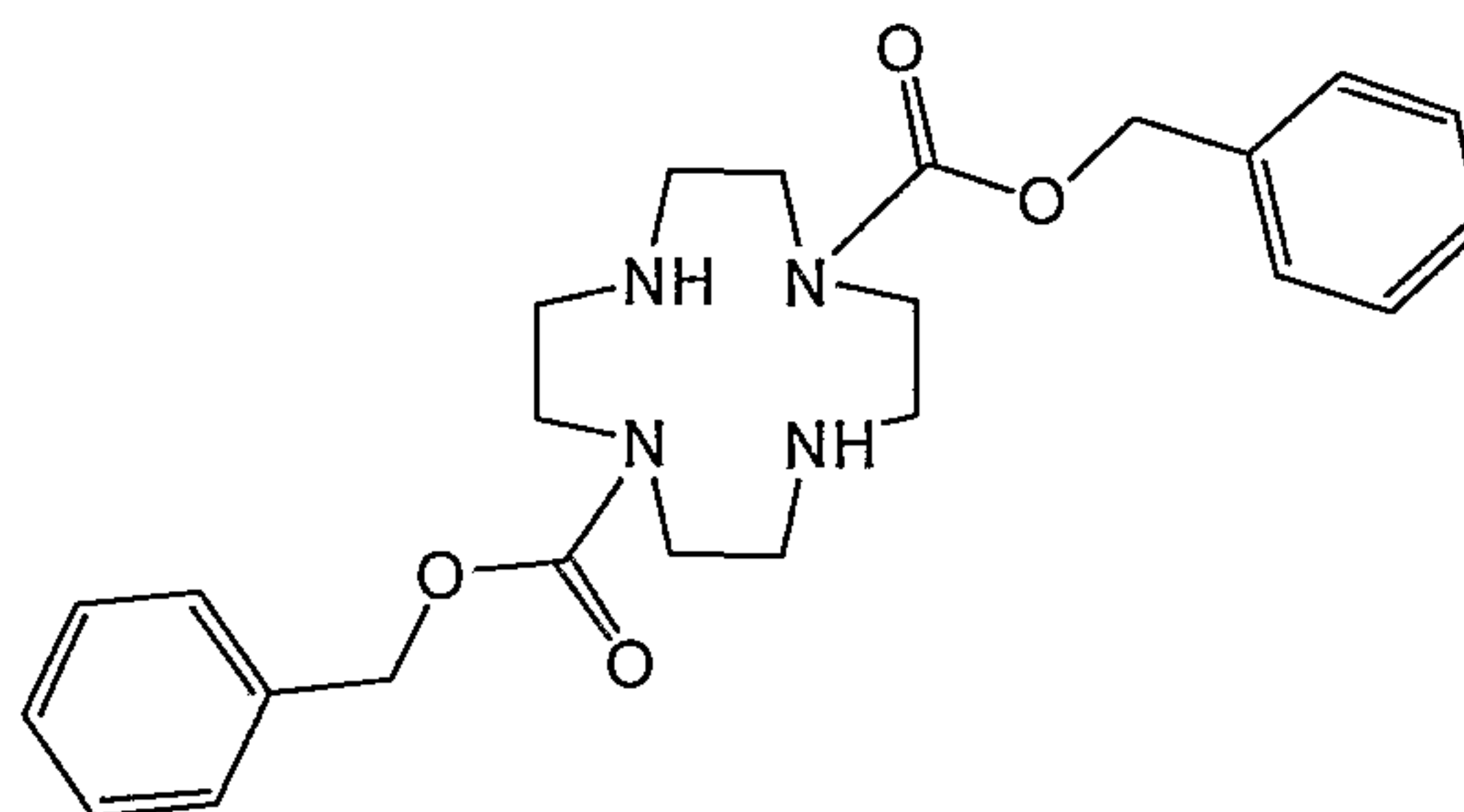


Instituto  
Mexicano  
de la Propiedad  
Industrial

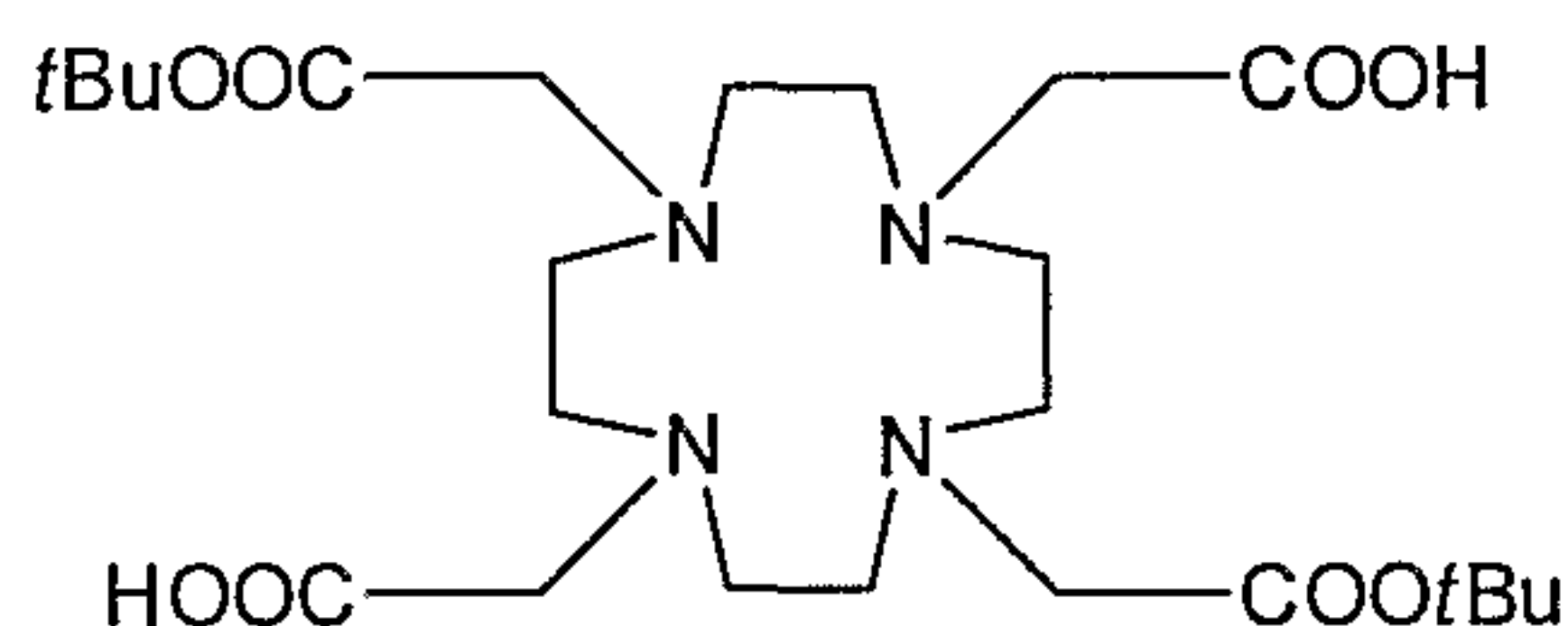
18



5



10



## EJEMPLOS

### p-Nitro-L-Fenilalanina

L-Fenilalanina (5g, 30.2mmol) fue disuelta en  $H_2SO_4$  concentrado (17g) a temperatura ambiente por 2 horas adquiriendo la solución una tonalidad amarillo ligero. La solución fue puesta en un baño de hielo a  $0^\circ C$ ; seguida de la adición lenta de  $HNO_3$  concentrado (4.56 g), cambiando el color se la solución resultanet de un amarillo ligero a un color naranja. La disolución final se deja a  $0^\circ C$  por 1 hr, y por 4 hr a temperatura ambiente. Se agregan unos cubos de hielo a la solución resultante y se neutraliza el exceso de ácido adicionando  $NH_4OH$  hasta llegar a un pH 6.7, formado un precipitado blanco. La supención resultante se mantiene en refrigeración por 2 hr hasta llegar  $0^\circ C$ . El sólido se filtra y se lava con agua DI fría. El sólido recuperado fue disuelto en agua DI caliente (45



ml) y se deja enfriar a temperatura ambiente para obtener cristales amarillo pálido los cuales se filtran y se lavan con agua DI fría. Rendimiento 3.2 g (54%).  $^1\text{H}$  RMN (200 MHz,  $\text{D}_2\text{O}/\text{NaOH}$ )  $\delta$  8.2(d, 2H,  $\text{O}_2\text{N}-\text{C}-\text{CH}$ -, arom.), 7.4(d, 2H,  $-\text{CH}$ -, arom.), 3.6(t, 1H,  $-\text{N}-\text{CH}-\text{CO}_2$ ), 2.9(m, 2H,  $-\text{CH}_2-$ )  $^{13}\text{C}$ (200MHz,  $\text{D}_2\text{O}/\text{NaOH}$ )  $\delta$  182(-COOH), 146(-C-, arom.), 145(-C- $\text{NO}_2$ , arom), 130(-CH-, arom), 124(-CH- arom.), 59(-CH-NH<sub>2</sub>), 39(-CH<sub>2</sub>-). IR (sólido, KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ); 3251, 2940, 2844.

#### **N $\alpha$ -(9-Fluorenilmetoxicarbonil)-p-nitro-L-Fenilalanina**

p-nitro-L-Fenilalanina (1g, 4.73 mmol) fue disuelta en una mezcla de dioxano (5ml) y una solución al 10% de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (ml) La solución resultante fue puesta en un baño de hielo a 0°C. Seguida de la adición lenta de una solución de cloruro de 9-fluorenilmetilcarboniol (1.68g, 1.05 equiv.) en dioxano (5ml), el matraz de reacción se purga con  $\text{N}_2$  y se dejo en agitación a temperatura ambiente por 2 días. La solución fue concentrada, evaporando el solvente, se adiciona agua DI (10ml) y se ajusta el pH a 2 con ácido clorhídrico concentrado, observándose la formación de sólidos. Los sólidos fueron filtrados y tomados disueltos en acetato de etilo (200ml) caliente y lavados con agua DI (2\*200 ml). La fase orgánica se seca con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y se evapora el solvente, obteniéndose un sólido amarillo. Rendimiento 1.58g (75%).  $^1\text{H}$  RMN (200 MHz,  $\text{DMSO}-d$ )  $\delta$  8.0(d, 2H,  $\text{O}_2\text{N}-\text{C}-\text{CH}$ -, arom.), 7.8(d, 2H,  $-\text{CH}$ -, arom), 7.6-7.1 (m, 8H, Fmoc), 6.8(d, 1H,  $-\text{CH}$ -, Fmoc), 4.1 (m, 1H,  $-\text{CH}-\text{NH}$ -), 1.8(s, 1H,  $-\text{O}-\text{CH}$ -), 1.0(t, 2H,  $-\text{CH}_2-\text{CH}$ ).  $^{13}\text{C}$  RMN (200 MHz,  $\text{DMSO}-d$ )  $\delta$  174(-CO<sub>2</sub>H), 158(HN-CO<sub>2</sub>-), 148-138 (arom.), 130-118(arom, Fmoc), 64(-CH<sub>2</sub>-, Fmoc,), 46( HN-CH-), 18 (-CH<sub>2</sub>-). IR (sólido, KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3428, 3277, 1661

#### **N $\alpha$ -(9-Fluorenilmetoxicarbonil)-p-nitro-L-Fenilalanina benzil éster**

A una solución de N-(9)-p-nitro-L-Fenilalanina (0.9g, 2.01mmol) en acetonitrilo (10ml) con N,N diisopropiletilamina (0.28g, 1.1 equiv.), se adicionó una solución de bromuro de bencilo (0.36g, 1.05 equiv.) en acetonitrilo (3ml) lentamente. El matraz de reacción se purga con  $\text{N}_2$  y la reacción se mantiene en agitación a temperatura ambiente por

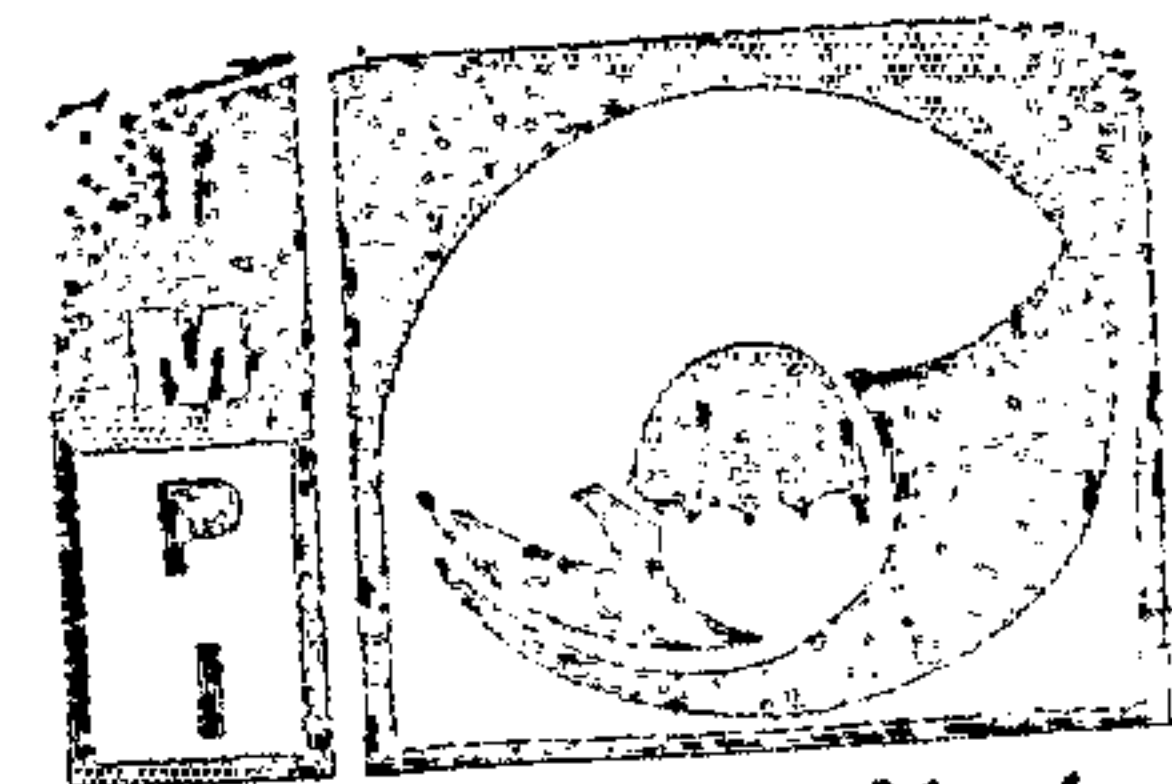


Instituto  
Mexicano  
de la Propiedad  
Industrial

3 días. Se evapora el solvente a sequedad y se adiciona  $\text{CHCl}_3$  (30ml) y se lava con agua DI (2\* 30ml). La fase orgánica fue colectada y se seca con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , se evapora el solvente obteniéndose un sólido blanco. Rendimiento 0.73 g (67%).  $R_f = 0.51$  (TLC,  $\text{SiO}_2$ , 60%/40% Hexanos/Acetato de etilo).  $^1\text{H}$  RMN (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.0(d, 2H, -CH-, arom.), 7.8(d, 2H, -CH-, arom.), 7.6-7.2(m, 15H, arom. Fmoc, Bn), 7.0(d, 1H, -CH-, Fmoc), 5.3(m, 2H, -O- $\text{CH}_2$ -, Fmoc) 4.5(m, 2H, -O- $\text{CH}_2$ -, Bn), 4.1(t, 1H, -HN-CH-), 1.3(s, 2H, - $\text{CH}_2$ -),  $^{13}\text{C}$  RMN (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  178(- $\text{CO}_2$ ), 159(HN- $\text{CO}_2$ -), 144(-C- $\text{NO}_2$ , arom.), 142(-C-, arom.), 140-145(arom.Fmoc,Bn) 130-135 (arom Fmoc,Bn.), 124(arom.-CH-), 120(arom. -CH-), 79 ( O- $\text{CH}_2$ -,Bn), 77(O- $\text{CH}_2$ -, Fmoc), 60(-CH-NH), 24(- $\text{CH}_2$ ). IR (sólido, KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ), 3433, 2961, 1725, 1601

#### **$N\alpha$ -(9-Fluorenilmetoxicarbonil)-p-amino-L-Fenilalanina benzil éster**

$N\alpha$ -(9-Fluorenilmetoxicarbonil)-p-nitro-L-Fenilalanina benzil éster (0.7g, 1.3mmol) y polvo de zinc (0.42g, 6.53mmol) fueron suspendidos en etanol (15ml), seguido de la adición de ácido acético glacial (15ml). La suspensión formada se dejó en agitación y bajo reflujo a  $60^\circ\text{C}$  por 1 día. Se evapora todo el solvente y el producto se purifica por cromatografía en columna (sílica gel 60, 70-230 mesh), utilizando como eluente 60%/40% Hexanos /Acetato de etilo, las fracciones conteniendo el producto se recolectan y se evapora el solvente obteniéndose un sólido amarillo pálido. Rendimiento 0.35 g (53%).  $R_f = 0.56$  (TLC,  $\text{SiO}_2$ , 60% Hexanos/40% Acetato de etilo)  $^1\text{H}$  RMN (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.8(d, 2H, arom.Fmoc,Bn), 7.6(d, 2H, -HC-CH-C-, arom  $J=7.8$ ), 7.2-7.4 (m, 11H, arom. Fmoc, Bn), 6.8(d, 2H,  $\text{H}_2\text{N-C-CH}$ -, arom,  $J=7.8$ ), 6.6(d, 2H, -O- $\text{CH}_2$ -, Bn), 5.2(m, 2H, -HC-O- Fmoc), 4.8(s, 1H, -N-CH-CO-), 3(d, 2H, - $\text{CH}_2$ -).  $^{13}\text{C}$  RMN (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  145(- $\text{CO}_2$ ), 143(HN- $\text{CO}_2$ -), 140-145(arom.Fmoc,Bn) 130-135 (arom Fmoc,Bn.), 120(arom.), 115(arom. - $\text{H}_2\text{N-CH}$ -), 48 ( HN-CH-), 15- $\text{CH}_2$ -). IR (sólido, KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ), 3337, 2966, 1780, 1470

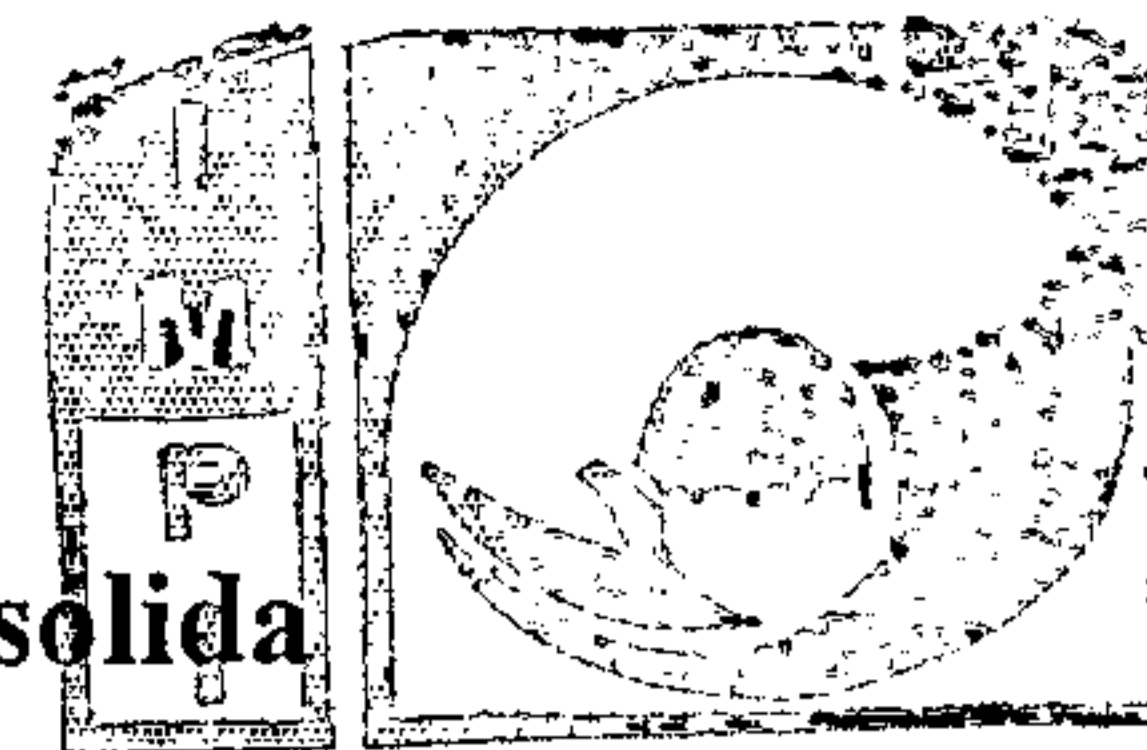


**1,4,7-tris(tert-butilacetato)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-10-N $\alpha$ -(9-Fluorenilmtoxycarbonil)-p-acetilamida-L-fenilalanina**

N $\alpha$ -(9-Fluorenilmtoxycarbonil)-p-amino-L-Fenilalanina benzil éster (0.3g, 0.61

Instituto  
Mexicano  
de la Propiedad  
Industrial

mmol) y fueron disueltos en acetonitrilo (10ml), seguido de la adición de 1,4,7-tris(tert-butilacetato)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-10-succinimil-acetato (0.4 g, 1 equiv.) en 5 ml de acetonitrilo. La solución se purga con nitrógeno y se deja en en agitación por 1 día. Se evapora todo el solvente y el producto se pasa por un fitro de sílica (sílica gel 60, 70-230 mesh), utilizando como eluente Acetato de etilo, las fracciones se colectan y el solvente se evapora obteniéndose un aceite amarillo, el cual se disuelve en isopropanol (20 mL) y a la solución se le agrega 0.2 g de catalizador 10% Pd-C. La mezcla de reacción se coloca en un equipo de hidrogenación Parr y se purga con hidrógeno (10x) y finalmente la presión se mantiene a 35 psi por dos días. El catalizador es filtrado y el disolvente evaporado dando un sólido amarillo. Rendimiento 0.55 g (95%). <sup>1</sup>H NMR (270 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  11.37 (s, 1H, DOTA-CH<sub>2</sub>-CONH-) 7.69-7.20 (m, 12H, arom.), 6.13 (s, 1H, -CH-NH-Fmoc), 5.07 (bs, 1H, -CH-(Fmoc)), 4.41 (bs, 2H, -CH<sub>2</sub>-(Fmoc)), 3.90-2.70 (bm, s, 26H, -CH<sub>2</sub>-N-, CH<sub>2</sub>CO-, DOTA), 1.41 (s, 27H, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (270 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  174.5 (-COOH), 172.2-170.6 (-COOtBu, -COONH-), 155.6 (O-CO-NH, Fmoc), 145.4 (Fmoc, arom.), 144.3 (Fmoc, arom.), 137.3, 133.5 (arom.), 129.9 (Fmoc arom), 128.4 (arom.), 128.2, 126.9.8, 125.5 (Fmoc, arom.), 119.5 (arom.), 81.6 (C-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 66.2 (-CH<sub>2</sub>-,Fmoc), 56.9-47.3 (-CH-, Fmoc; -CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>COOtBu, DOTA; -CH-NH, CH<sub>2</sub>-CONH-), 37.5 (-CH<sub>2</sub>-), 27.9 (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)

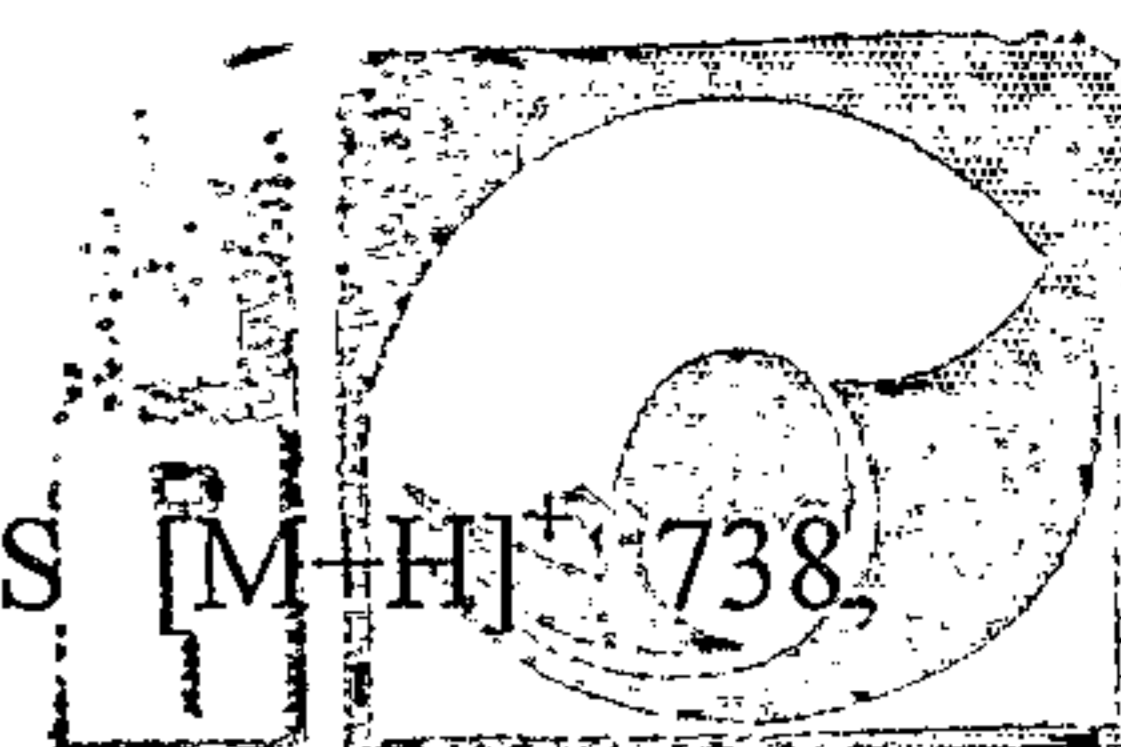


## Proceso para la unión de dos péptidos mediante síntesis de péptidos en fase sólida

La síntesis de péptidos en fase sólida se llevó a cabo manualmente siguiendo protocolos estándares de química Fmoc. El péptido fue sintetizado a escala 0.1 mmol en una resina Rink Amide usando acoplamiento simple usando 2 equivalentes del aminoácido Fmoc protegido, 2 equivalentes de agente acoplante (HBTU), 2 equivalentes de auxiliar de supresión de racemización (HOBT) y 6 equivalentes de diisopropiletilamina en DMF para cada acoplamiento. Después de cada acoplamiento se hizo un lavado de los grupos aminos libres sin reaccionar con una solución de anhídrido acético 4.75 %v/v en NMP a temperatura ambiente, seguido de la remoción del grupo Fmoc con piperidina al 20% en DMF. Los procesos de acoplamiento, lavado y desprotección fueron monitoreados mediante la prueba de ninhidrina. Una vez obtenido el péptido deseado se lleva a cabo la remoción del péptido de la resina y remoción de grupos protectores de cadenas laterales mediante el tratamiento de la resina con ácido trifluoroacético: tioanisol: 1,2-etanoditiol: anisol (9:0.5:0.3:0.2) a 25°C por 2 horas. La resina es removida por filtración y el filtrado es concentrado mediante un flujo de nitrógeno. El péptido es precipitado con éter dietílico frío (-20°C) se filtra, se lava con éter frío, se seca y finalmente es redissuelto en ácido acético al 10%. El péptido es purificado por cromatografía de líquidos de alta resolución, liofilizado y caracterizado por ESI-MS.

Para el péptido sintetizado como ejemplo se utilizaron los aminoácidos ácido -N $\alpha$ -Fmoc aspártico (D), 1,4,7-tris(tert-butilacetato)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-10-N $\alpha$ -(9-Fluorenilmetoxycarbonil)-p-acetilamida-L-fenilalanina (F-DOTA), y Fmoc- glicina (G).

H<sub>2</sub>N-G(F-DOTA)D-CONH<sub>2</sub>, Anal. HPLC. Rt = 10.7 min, ESI-MS [M+H]<sup>+</sup> 738, (calcd. 738), [M-H]<sup>-</sup> 736, (calcd. 736).



Instituto  
Mexicano  
de la Propiedad  
Industrial

#### 1,7-(terbutoxicarbonil)-1,4,7,10-Tetraazaciclododecano

5 1,4,7,10-Tetraazaciclododecano (100 mg, 0.58 mmol) y (N (terbutoxicarboniloxi))-succinimida (249 mg, 1.16 mmol) se disolvieron en 10 ml de acetonitrilo y se dejaron en agitación continua durante tres días. El disolvente se evapora y al residuo se le agrega agua DI ajustando (20 mL) y el pH es ajustado a 12 mediante adición de una solución de NaOH y el producto es extraído con éter etílico (3x20 mL). La fase  
10 orgánica es colectada y secada con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y el solvente evaporado dando un residuo aceitoso incoloro. Rendimiento 98%. <sup>1</sup>H RMN (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 3.08(8H, m, -CH<sub>2</sub>-N) 2.65 (8H, m, -CH<sub>2</sub>-N) 1.45(18H, s, -CH<sub>3</sub>) <sup>13</sup>C RMN (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 155 (-CO<sub>2</sub>-) 76.45 (C-O) 50.9 (-CH<sub>2</sub>-N) 48.3 (-CH<sub>2</sub>-N)

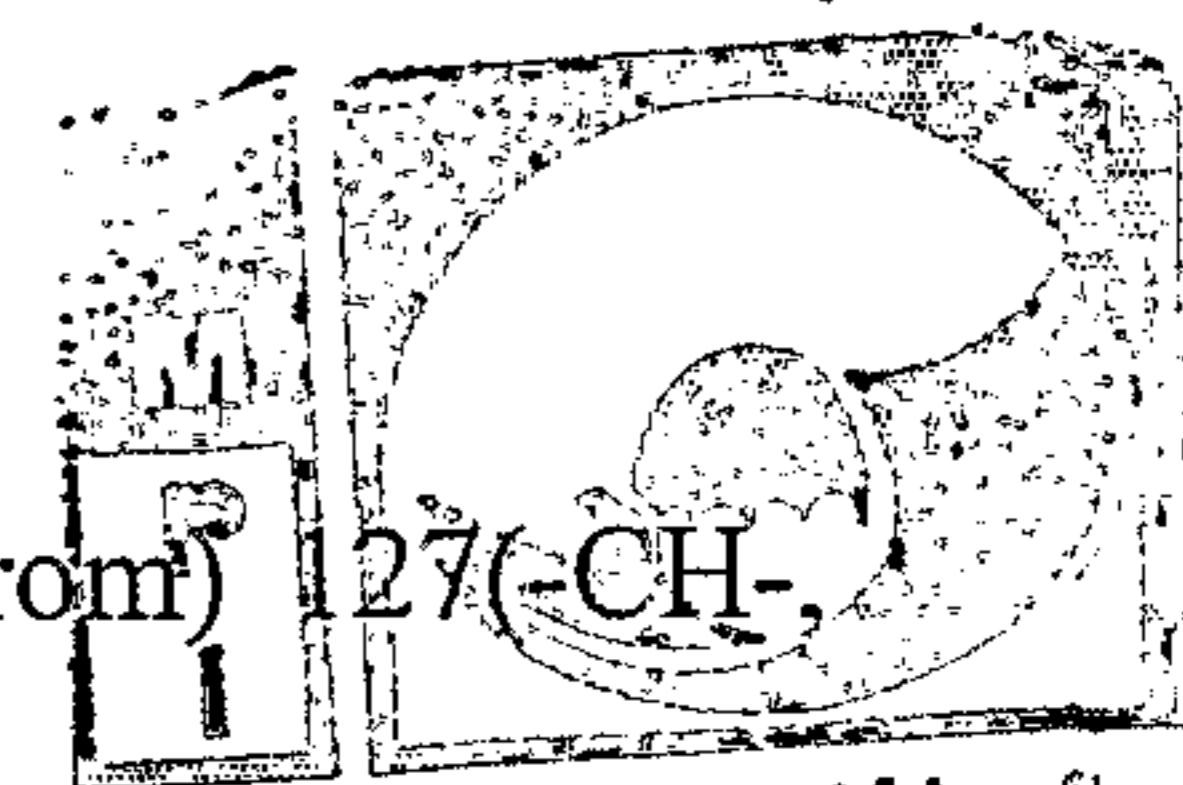
#### 15 1,7-(benciloxycarbonil)-1,4,7,10-Tetraazaciclododecano

1,4,7,10-Tetraazaciclododecano (100 mg, 0.58 mmol) se disuelve en 10 ml de acetonitrilo y se mezcla con (N-(benciloxycarboniloxi))-succinimida (289 mg, 1.16 mmol) en agitación continua. La mezcla de reacción se deja reaccionar durante tres días al final de los cuales se evapora el acetonitrilo. El residuo se toma en NaOH (20% w/v, 10 ml) y se extrae con éter etílico (4x15 mL). Las fracciones orgánicas se colectan y se secan con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, el solvente se evapora. Rendimiento 83%. <sup>1</sup>H RMN (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.34(10H, s, arom. Bn) 5.15(4H, s, -CH<sub>2</sub>-, Bn) 3-2.8(16H, m, N-CH<sub>2</sub>-) <sup>13</sup>C

20



RMN (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 158(-CO<sub>2</sub>) 138(-C-, arom) 128 (-CH- arom) 127(-CH-, arom) 70(-CH<sub>2</sub>-O) 52-48(-CH<sub>2</sub>-N)



Instituto  
Mexicano  
de la Propiedad  
Industrial

**Ácido 4,10-bis(tert-butil acetato)-1,4,7,10-Tetraazaciclododecan-1,7-diacético**

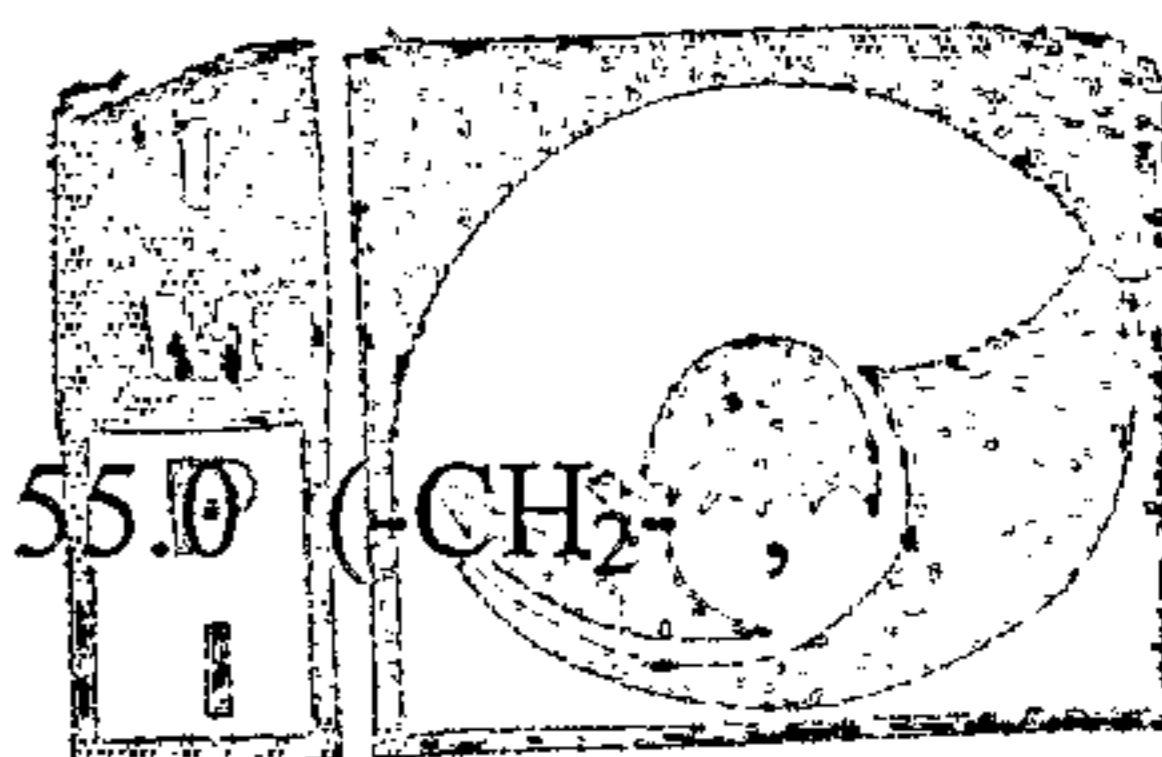
5 1,7-(terbutoxicarbonil)-1,4,7,10-Tetraazaciclododecano (200 mg, 0.54 mmol) fuerpon disueltos en 10 mL de acetonitrilo junto con diisopropiletilamina (208 mg, 3 equiv.). A la solución resultante se le agregan 5 mL de una solución de bromoacetato de bencilo (252 g, 2.05 equiv.) en acetonitrilo y se dejó en agitación a temperatura ambiente por 1 día. El solvente se evapora y el residuo resultante se pasa por un pequeño filtro de sílica usando acetato de etilo como eluente. La fracción orgánica se evapora y el residuo se

10 redisuelve en agua con ácido clorhídrico 1 M (10 mL) y la solución se deja agitando por 1 día. El disolvente se evapora y el residuo se disuelve en acetonitrilo junto con diisopropiletilamina (208 mg, 7 equiv.). A la solución resultante se le agregan 5 mL de una solución de bromoacetato de tert-butilo (215 mg, 2.05 equiv.) en acetonitrilo y la mezcla se agita por 1 día a temperatura ambiente. El solvente se evapora y el residuo se

15 pasa por un filtro de sílica usando acetato de etilo como eluente. El solvente es evaporado y el residuo es disuelto en tert-butanol y a la solución resultante se le agrega 0.2 g de catalizador 10% Pd-C. La mezcla de reacción se coloca en un equipo de hidrogenación Parr y se purga con hidrógeno (10x) y finalmente la presión se mantiene

20 a 35 psi por dos días. El catalizador es filtrado y el disolvente evaporado dando residuo aceitoso. Rendimiento 250 mg (90%). <sup>1</sup>H NMR (270 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 3.45 (s, 4H), 3.28 (s, 4H), 3.06 (s, 4H), 2.93 (s, 8H), 1.47 (s, 18H); <sup>13</sup>C NMR (270 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 176.3

(-COOH), 167.5 (-COOtBu), 83.7 (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 58.0 (CH<sub>2</sub>-COOH), 55.0 (-CH<sub>2</sub>- , cyclen), 51.7(-CH<sub>2</sub>-COOtBu), 51.2 (-CH<sub>2</sub>- , cyclen), 27.9 (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)

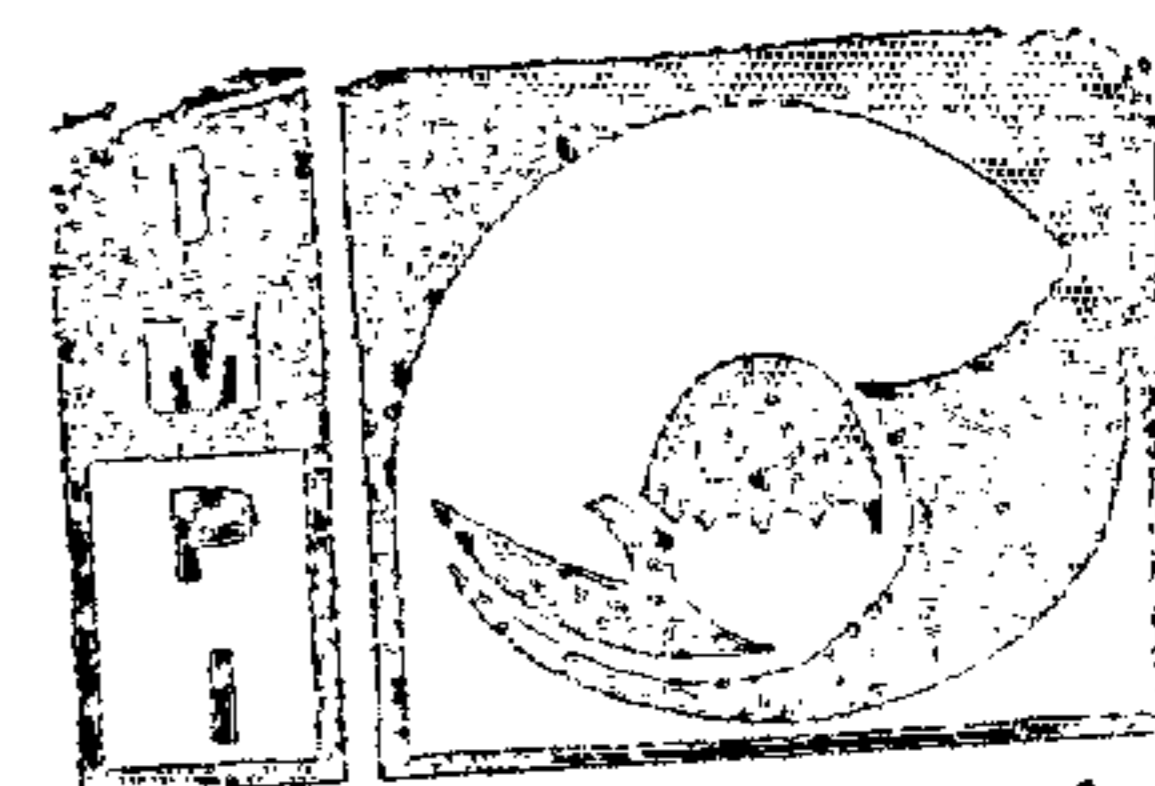


Instituto  
Mexicano  
de la Propiedad  
Industrial

### Proceso de unión de péptidos en fase líquida

5 A una mezcla de 1 equivalente del Ácido 4,10-bis(tert-butil acetato)-1,4,7,10-Tetraazaciclododecan-1,7-diacético, 2 equivalentes de agente acoplante (HBTU) y 6 equivalentes de diisopropiletilamina en DMF se mezclan con 2 equivalentes del péptido conteniendo 1 sólo grupo amino libre mientras otros grupos funcionales interferentes (hidroxilo, tiol, ácido carboxílico) no estan presentes o estan protegidos. El producto se  
10 purifica por comatografía de líquidos de alta resolución y se caracteriza como indicado anteriormente.

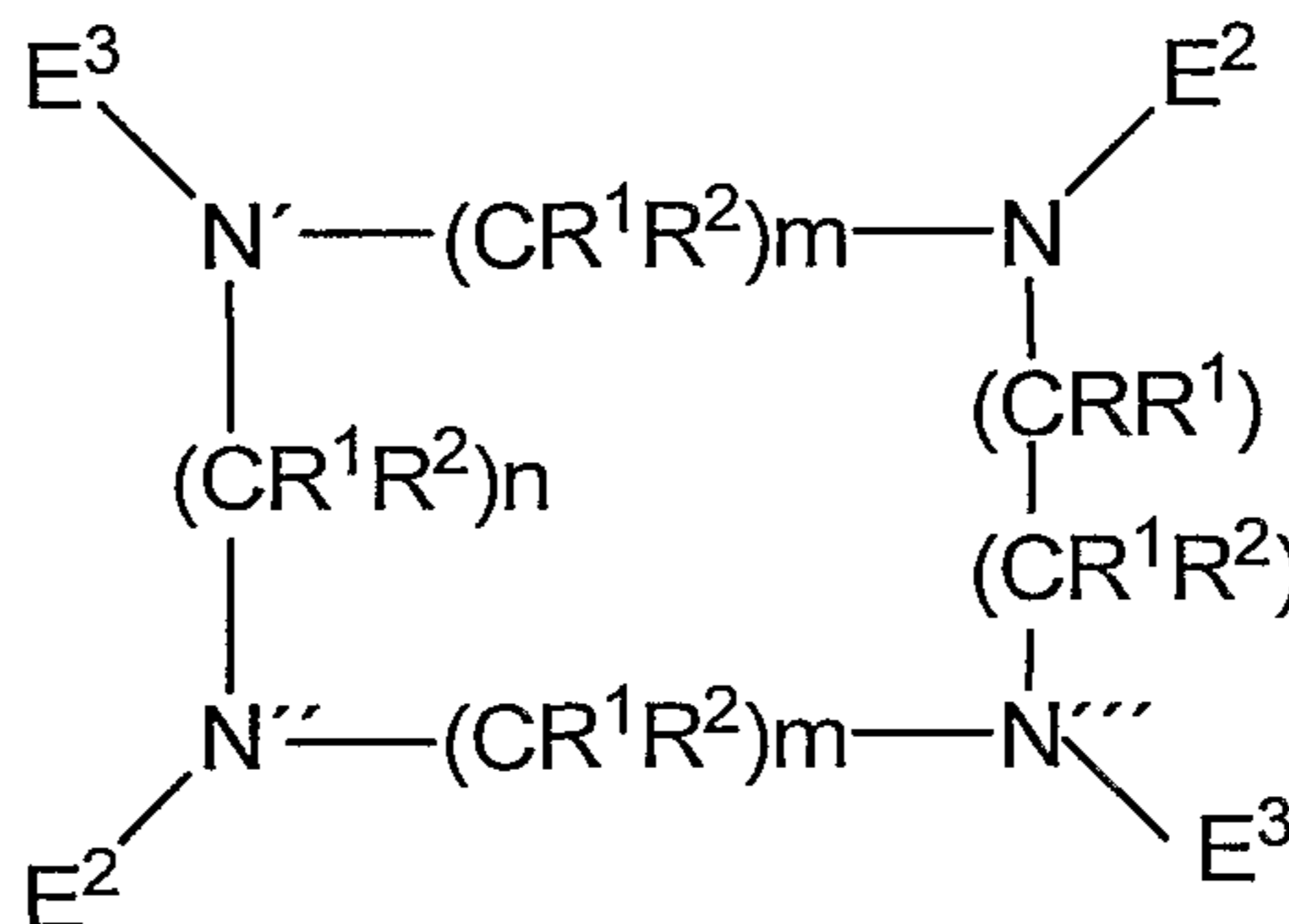
## REIVINDICACIONES



Habiendo descrito suficiente mi invención, considero como una novedad y por lo tanto reclamo como de mi exclusiva propiedad, lo contenido en las siguientes cláusulas.

Instituto  
Mexicano  
de la Propiedad  
Industrial

- 5 1. Un proceso para generar compuestos N', N''' monofuncionales de fórmula



10

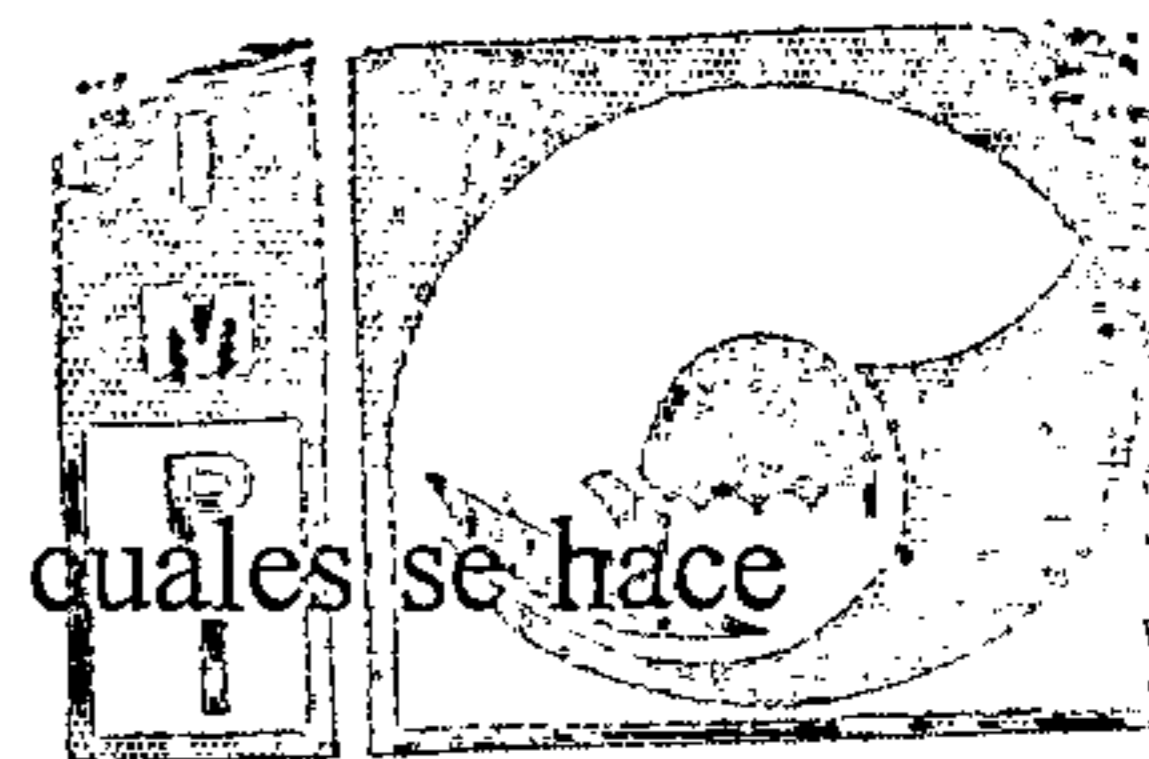
-1-

donde  $n=m=2$  o  $n=2$   $m=3$ ,  $E^2=R^1=R^2=H$ , R comprende hidrógeno, p-nitrobenzil, p-aminobenzil, p-isotiocionato-benzil, p-bromoacetamido-benzilo, p-cianobenzil, 4-aminobutil- o derivados de estos y  $E^3$  comprende metilcarboxilatos, metilcarboxiamidas, metilfosfonatos, metilsulfonatos, metilnitrilos, alquilos de un átomo de carbono hasta veinte, lineales o ramificados, cicloalquilos de tres átomos de carbono hasta ocho, arilos simples o condensados de seis átomos de carbono o derivados funcionalizados de estos.

El proceso caracterizado por los siguientes pasos:

- 1) Inicia mezclando 1 equivalente de un derivado macrocíclico tetraaza según la fórmula 1 donde  $n=m=2$  o  $n=2$   $m=3$ ,  $E^2=E^3=R^1=R^2=H$  y R comprende hidrógeno, p-nitrobenzil, p-aminobenzil, p-isotiocionato-benzil, p-bromoacetamido-benzil, p-cianobenzil, 4-aminobutil- o derivados de estos, con 2 equivalentes de derivados de succinimidil o pentafluorofenil de tert-

20

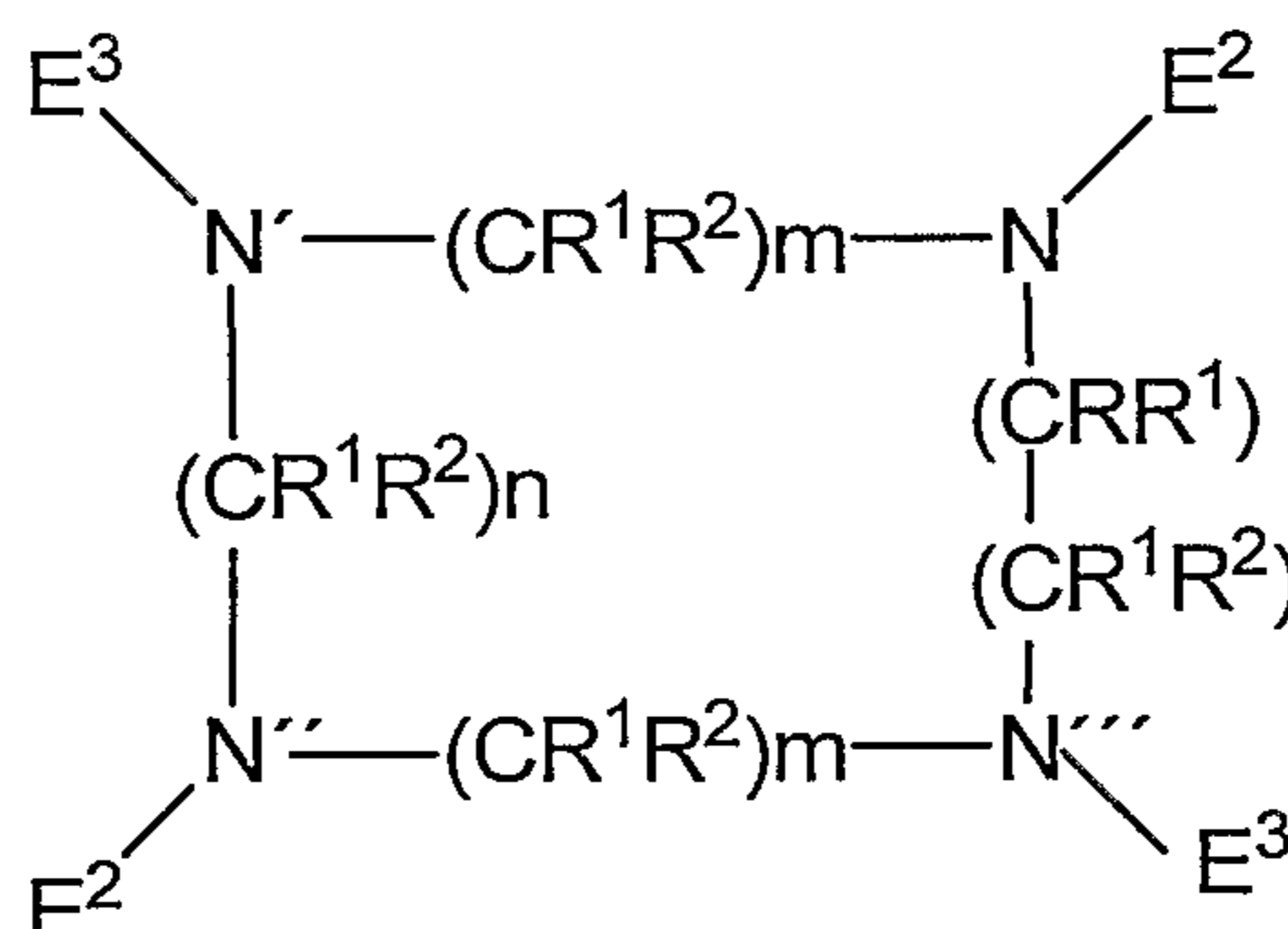


butilcarbamato, fluorenilmetilcarbamato y benzilcarbamato a los cuales se hace referencia como Boc, Fmoc y CBz, en un disolvente no polar como hexanos, benceno, cloroformo, diclorometano o polar aprótico como, acetonitrilo, éter etílico o THF a una temperatura de  $-75$  a  $70$  °C. La mezcla se agita por un periodo de hasta 36 horas, al final de la cual se remueve el disolvente por evaporación y el residuo obtenido se disuelve en una mezcla de un solvente orgánico tal como diclorometano o cloroformo y agua básica o neutra. La fase orgánica se separa y se seca con una sal inorgánica anhidra y el solvente de la fase orgánica se evapora.

5

10

2) El producto obtenido de fórmula



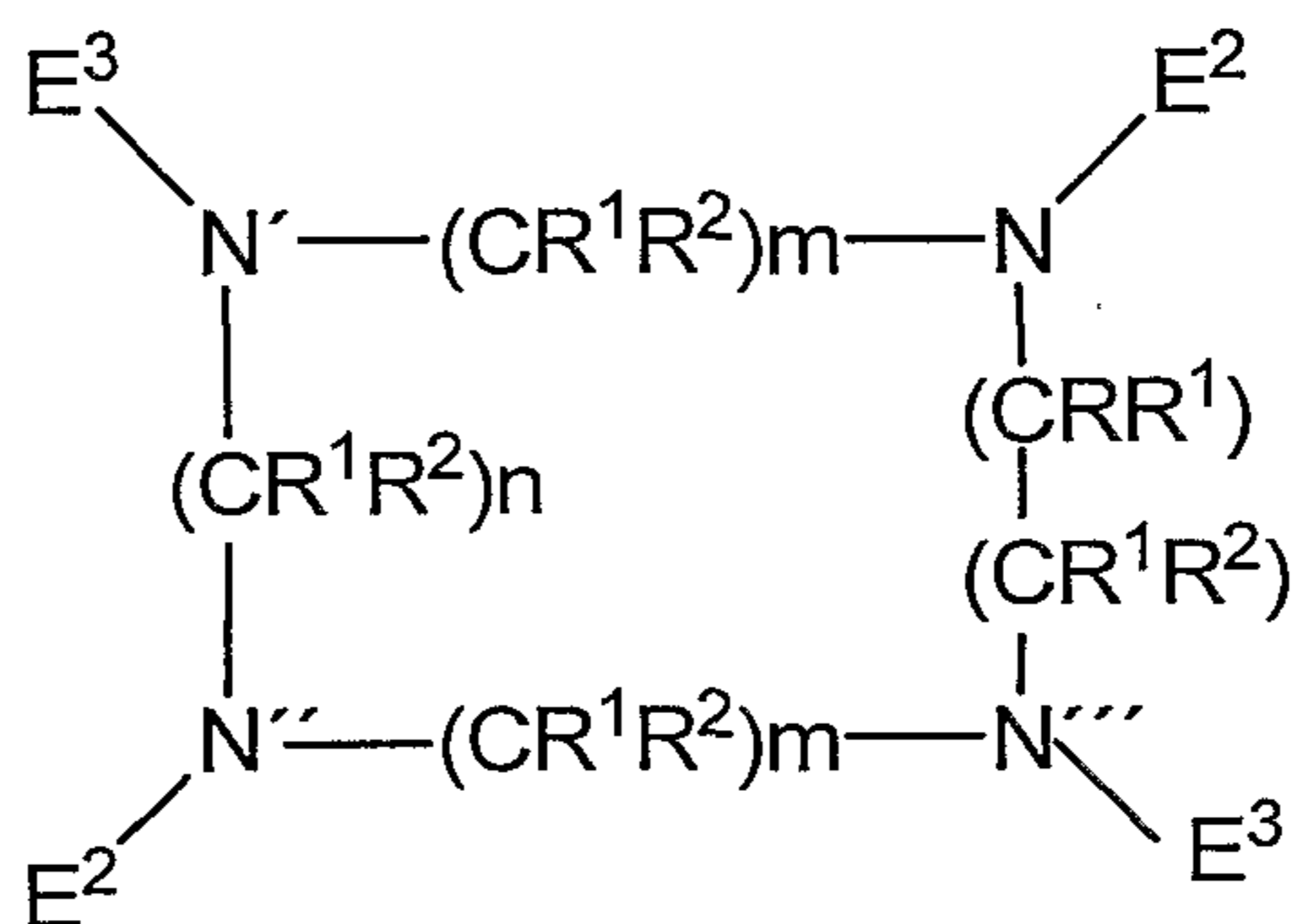
-1-

donde  $n=m=2$  o  $n=2$   $m=3$ ,  $\text{E}^2 = \text{Boc}$ ,  $\text{CBz}$  o  $\text{Fmoc}$ ,  $\text{E}^3 = \text{R}^1 = \text{R}^2 = \text{H}$  y R comprende hidrógeno, p-nitrobenzil, p-aminobenzil, p-isotiocionato-benzil, p-bromoacetamido-benzil, p-cianobenzil, 4-aminobutil- o derivados de estos se hace reaccionar en disolventes no polares como hexanos, ciclohexano, benceno, cloroformo, diclorometano o polares apróticos como acetonitrilo, éter etílico o THF a una temperatura de  $-75$  a  $70$ °C con 2 a 5 equivalentes de compuestos electrofílicos que contienen en su estructura halógeno, tosilatos, triflatos, epoxidos, tiocianato o isocianato en presencia 2 a 5 equivalentes de una base orgánica como trietilamina,

20

diisopropiletilamina, piridina o inorgánica como carbonatos o bicarbonatos de metales como sodio, potasio, cesio por un tiempo de 6 a 32 horas.

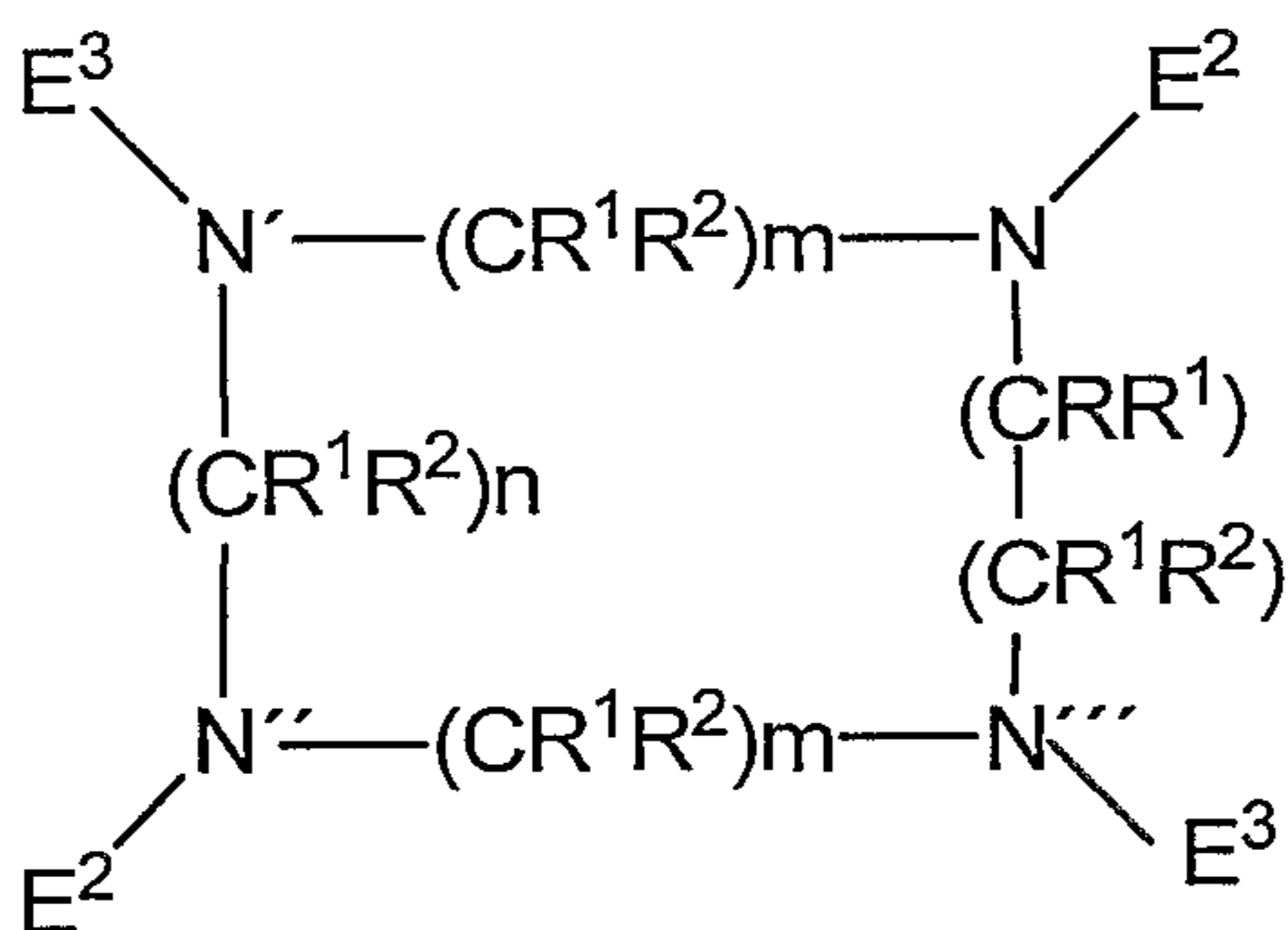
3) Seguida de la purificación, remoción de los grupos protectores (CBz, Fmoc o Boc) y purificación del producto se obtienen los productos descritos por la fórmula



-1-

donde  $n=m=2$  o  $n=2$   $m=3$ ,  $E^2=R^1=R^2=H$ , R comprende hidrógeno, p-nitrobenzil, p-aminobenzil, p-isotiocionato-benzil, p-bromoacetamido-benzilo, p-cianobenzil, 4-aminobutil- o derivados de estos y  $E^3$  comprende metilcarboxilatos, metilcarboxiamidas, metilfosfonatos, metilsulfonatos, metilnitrilos, alquilos de un átomo de carbono hasta veinte, lineales o ramificados, cicloalquilos de tres átomos de carbono hasta ocho, arilos simples o condensados de seis átomos de carbono o derivados funcionalizados de estos.

2. Un proceso de para generar compuestos N, N''; N', N''' bifuncionales de fórmula



-1-

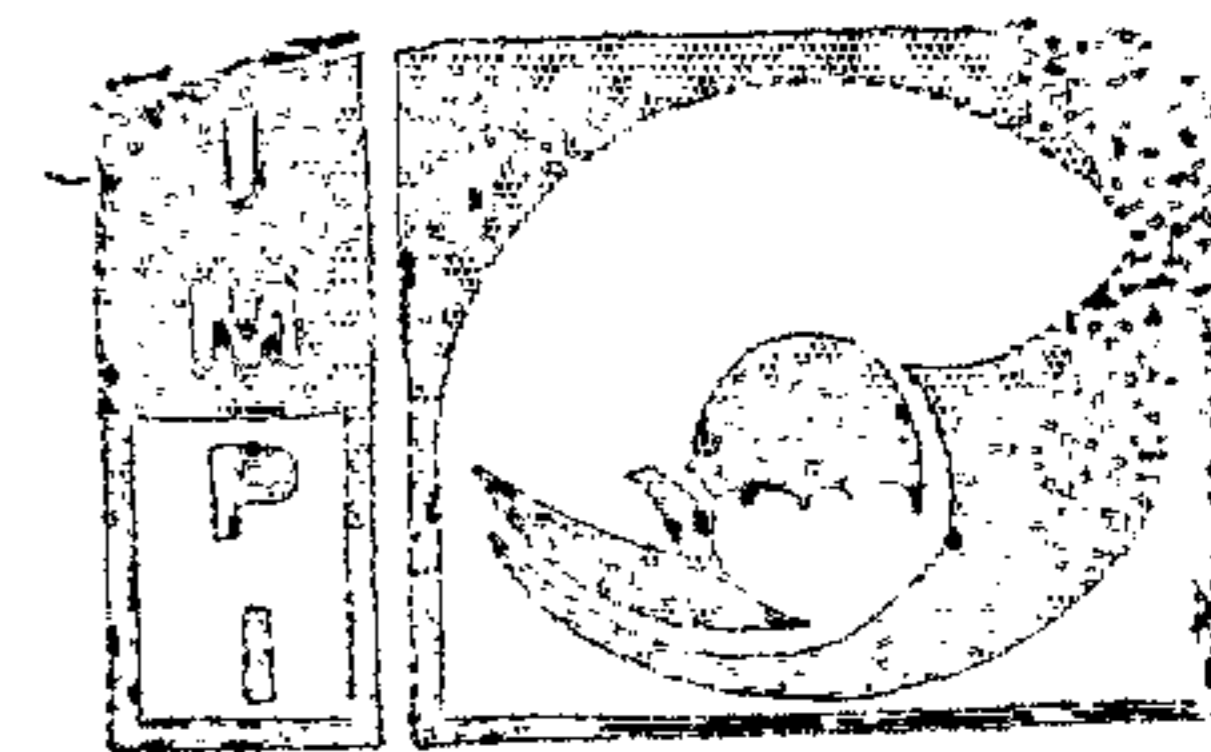


Instituto  
Mexicano  
de la Propiedad  
Industrial

5

10

20



Instituto  
Mexicano  
de la Propiedad  
Industrial

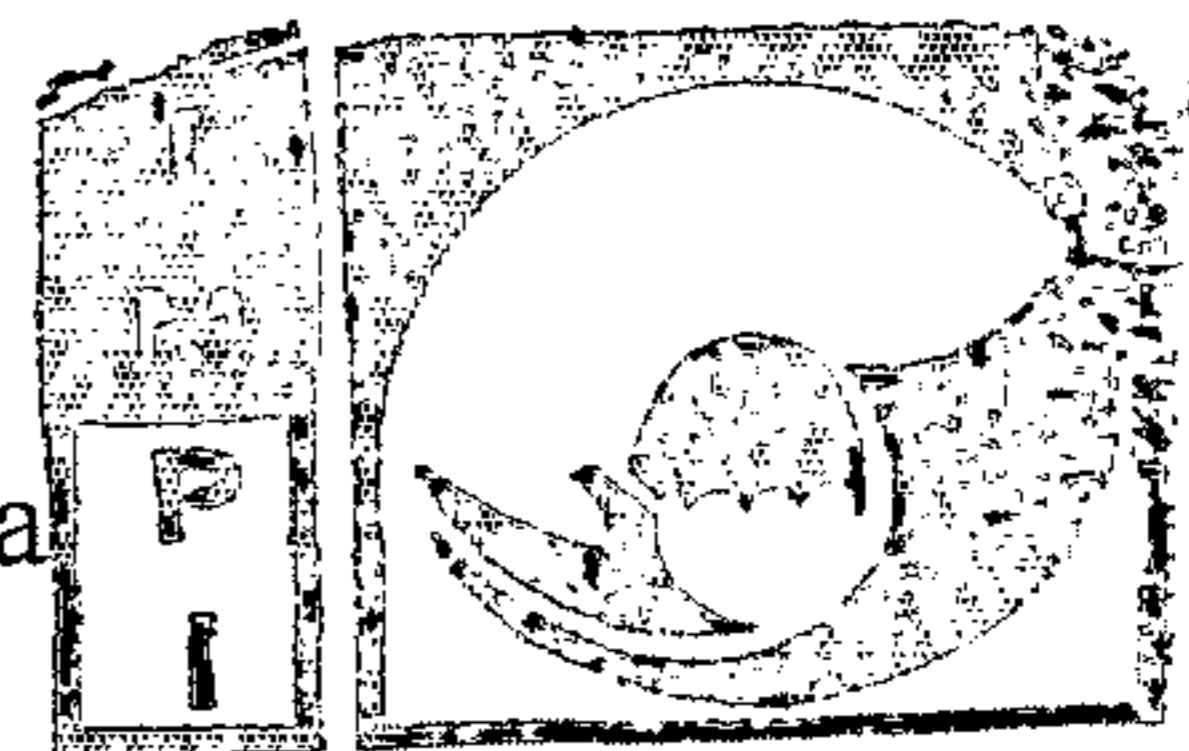
donde,  $n=m=2$  o  $n=2$   $m=3$ ,  $R^1=R^2=H$ , R comprende hidrógeno, p-nitrobenzil, p-aminobenzil, p-isotiocionato-benzil, p-bromoacetamido-benzilo, p-cianobenzil, 4-aminobutil- o derivados de estos.  $E^2$  y  $E^3$  son diferentes y comprenden metilcarboxilatos, metilcarboxiamidas, metilfosfonatos, metilsulfonatos, metilnitrilos, alquilos de un átomo de carbono hasta veinte, líneales o ramificados, cicloalquilos de tres átomos de carbono hasta ocho, arilos simples o condensados de seis átomos de carbono o derivados funcionalizados de estos.

10

El proceso caracterizado por:

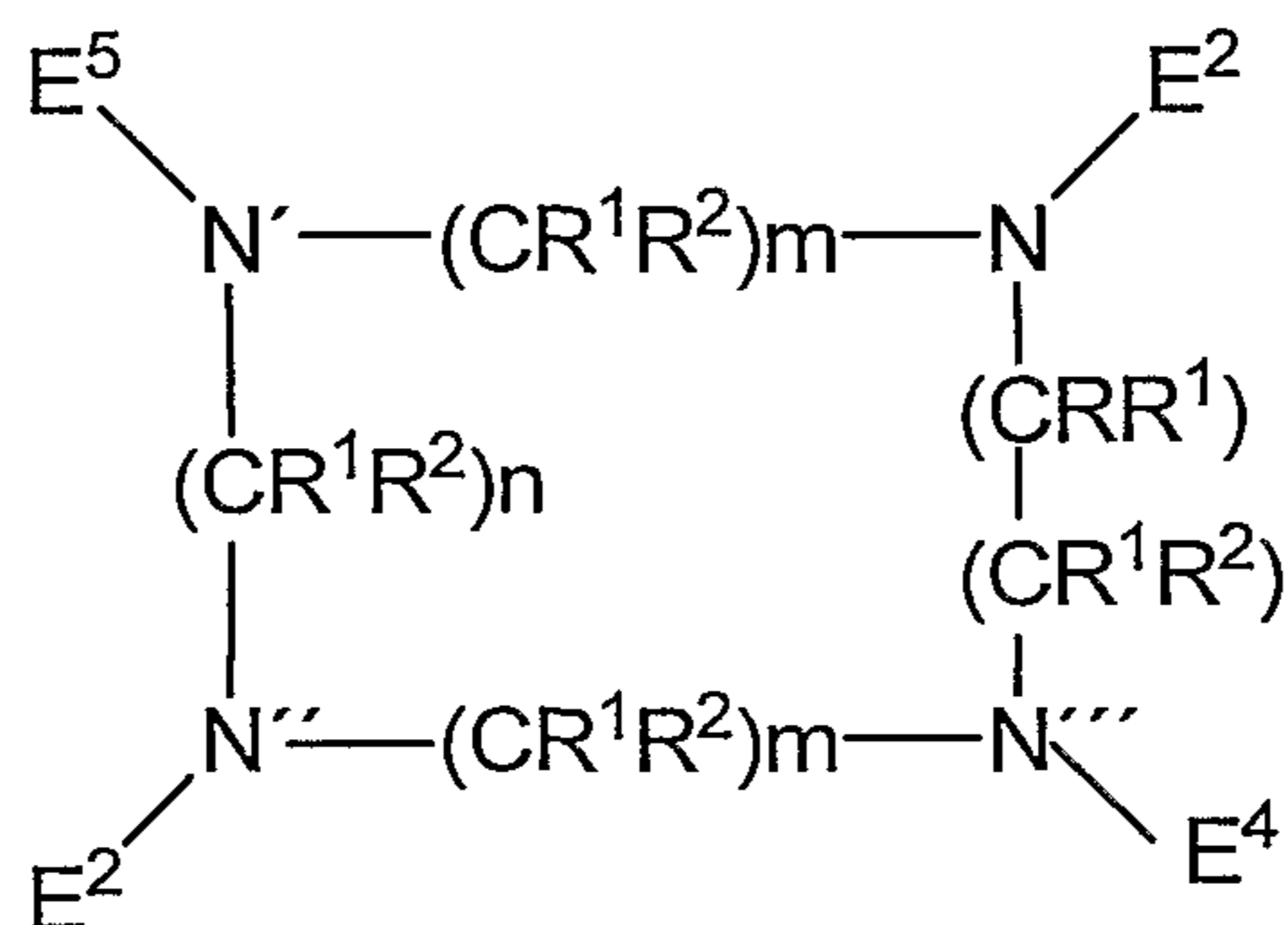
- 1) Mezclar 1 equivalente de un compuesto  $N'$ ,  $N''$  monofuncional cuya fórmula es descrita en la reivindicación 1 en disolventes no polares como hexanos, ciclohexano, benceno, cloroformo, diclorometano o polares apróticos como acetonitrilo, éter etílico o THF a una temperatura de  $-75$  a  $70^\circ\text{C}$  con 2 a 5 equivalentes de compuestos electrofílicos conteniendo halógeno, tosilatos, triflatos, epoxidos, tiocianato o isocianato en presencia 2 a 5 equivalentes de una base orgánica como trietilamina, diisopropiletilamina, piridina o inorgánica como carbonatos o bicarbonatos de metales como sodio, potasio, cesio por un tiempo de 6 a 32 horas. Seguida de la purificación se generan los productos descritos.

20



Instituto  
Mexicano  
de la Propiedad  
Industrial

3. Un proceso para generar compuestos N' monofuncionales con fórmula

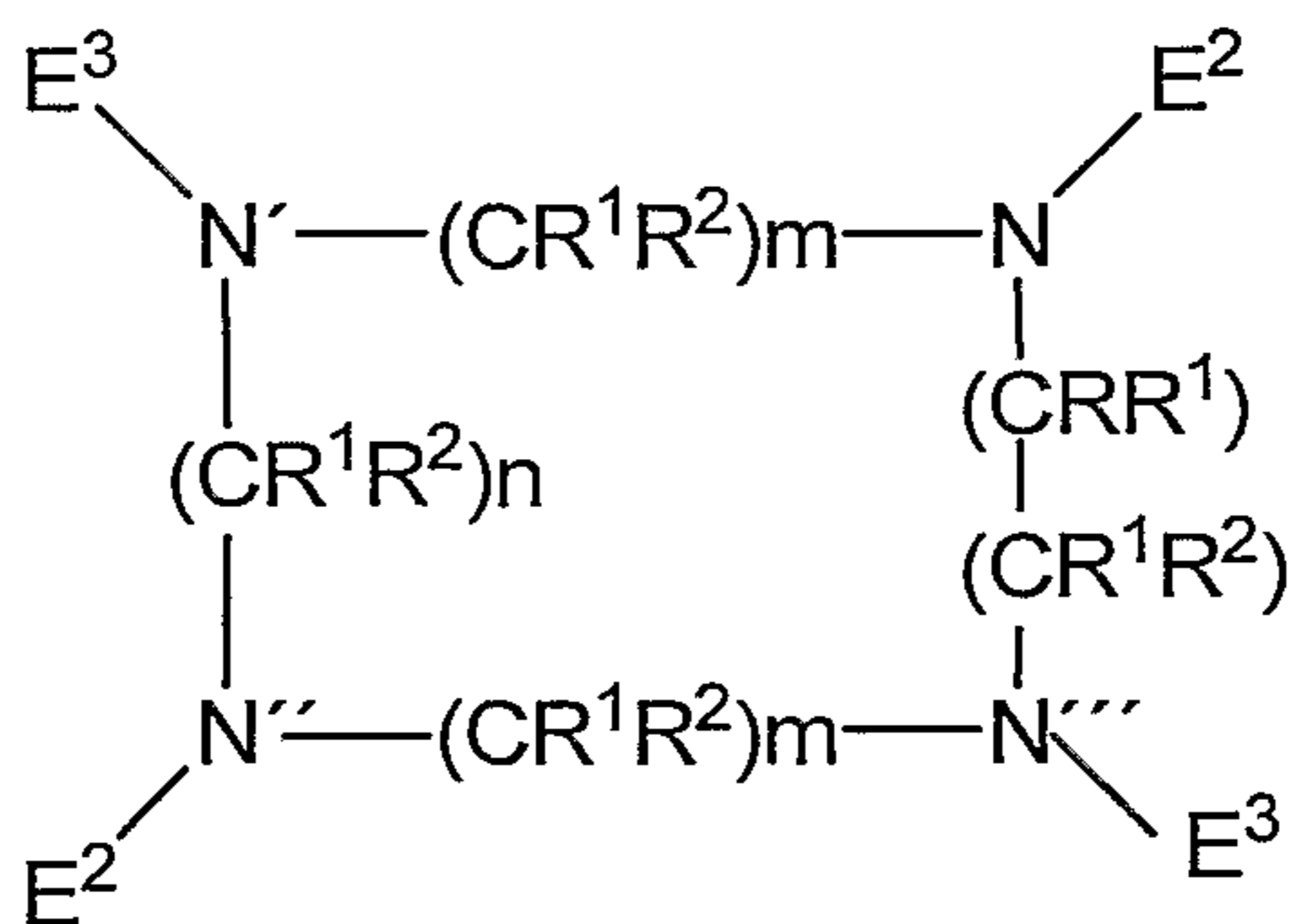


-2-

donde,  $n=m=2$  o  $n=2$   $m=3$ ,  $E^2=E^4=R^1=R^2 = H$ , R comprende hidrógeno, p-nitrobenzil, p-aminobenzil, p-isotiocionato-benzil, p-bromoacetamido-benzilo, p-cianobenzil, 4-aminobutil- o derivados de estos y  $E^5$  comprende metilcarboxilatos, metilcarboxiamidas, metilfosfonatos, metilsulfonatos, metilnitrilos, alquilos de un átomo de carbono hasta veinte, lineales o ramificados, cicloalquilos de tres átomos de carbono hasta ocho, arilos simples o condensados de seis átomos de carbono o derivados funcionalizados de estos.

El proceso caracterizado por:

1) Inicia mezclando 1 equivalente de un compuesto N, N'' diprotegido de fórmula



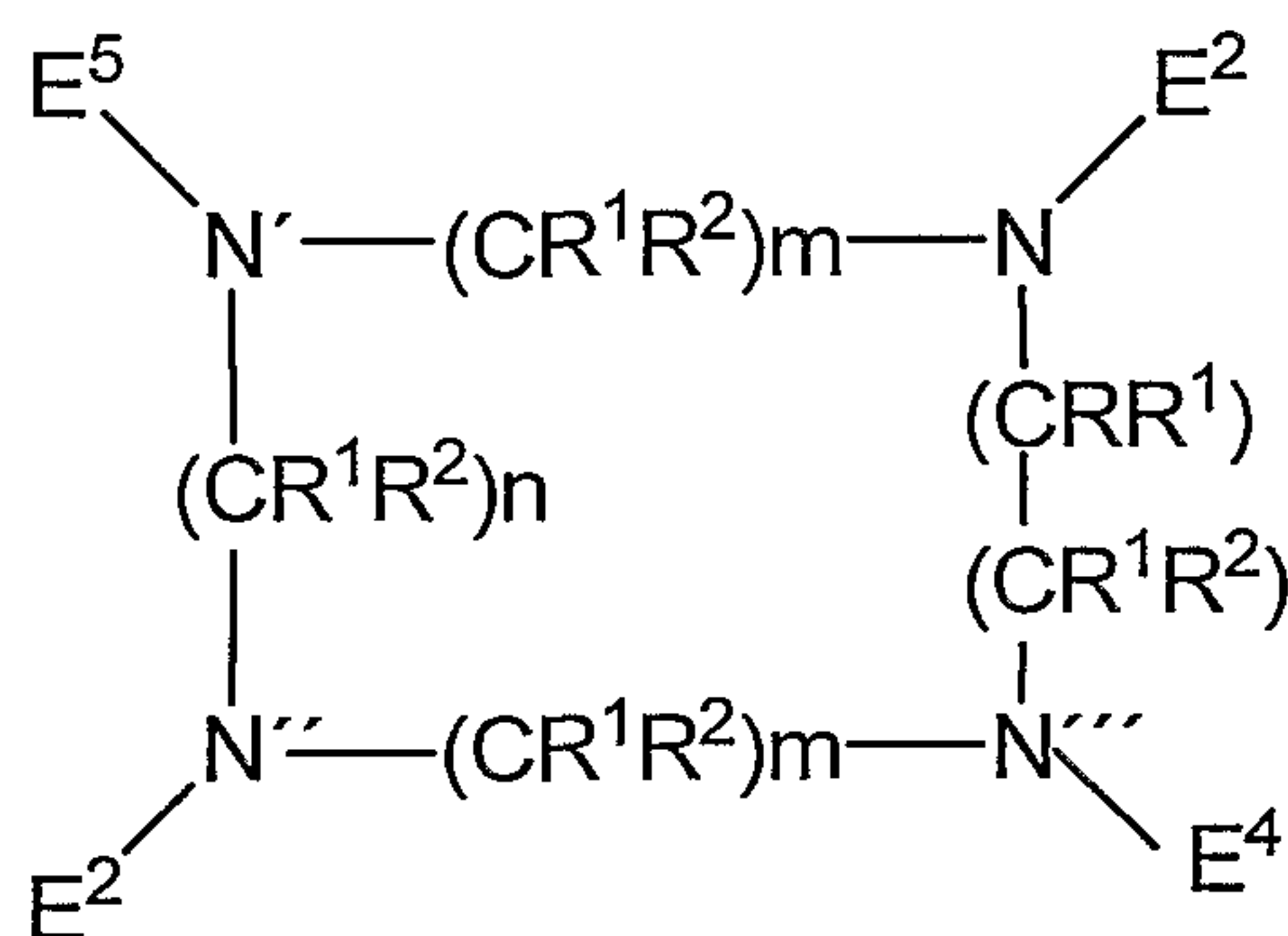
-1-

donde  $n=m=2$  o  $n=2$   $m=3$ ,  $E^2 = Boc, CBz$  o  $Fmoc$ ,  $E^4=E^5=R^1=R^2=H$  y R comprende hidrógeno, p-nitrobenzil, p-aminobenzil, p-isotiocionato-benzil, p-bromoacetamido-



Instituto  
Mexicano  
de la Propiedad  
Industrial

benzil, p-cianobenzil, 4-aminobutil- o derivados de estos, en disolventes no polares como hexanos, ciclohexano, benceno, cloroformo, diclorometano o polares apróticos como acetonitrilo, éter etílico o THF a una temperatura de  $-75$  a  $70^{\circ}\text{C}$ . con 1 equivalente de compuestos electrofílico conteniendo halógeno, tosilatos, triflatos, epoxidos, tiocianato o isocianato en ausencia de base por un tiempo de 6 a 32 horas dependiendo del rendimiento deseado. Se remueve el disolvente por evaporación y el residuo obtenido se disuelve en una mezcla de un solvente orgánico tal como diclorometano o cloroformo y agua básica o neutra. La fase orgánica se separa y se seca con una sal inorgánica anhidra y el solvente de la fase orgánica se evapora generando compuestos  $\text{N}'$  monofuncionales,  $\text{N}$ ,  $\text{N}''$  diprottegidos dados por la fórmula 2

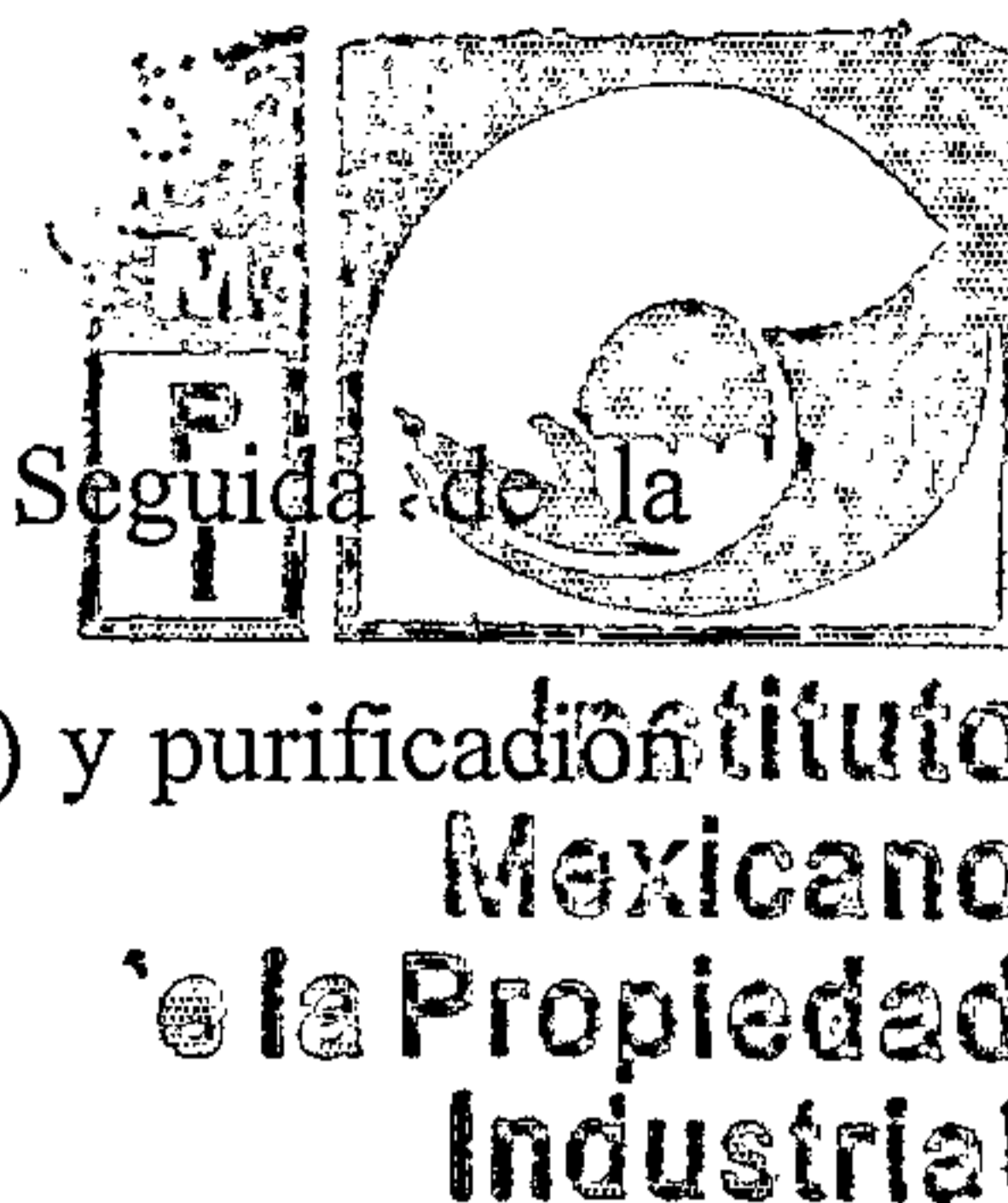


-2-

donde,  $n=m=2$  o  $n=2$   $m=3$ ,  $\text{E}^2=\text{Boc}$ ,  $\text{Fmoc}$  o  $\text{CBz}$ ,  $\text{E}^4=\text{R}^1=\text{R}^2 = \text{H}$ ,  $\text{R}$  comprende hidrógeno, p-nitrobenzil, p-aminobenzil, p-isotiocionato-benzil, p-bromoacetamido-benzilo, p-cianobenzil, 4-aminobutil- o derivados de estos donde  $\text{E}^5$  comprende metilcarboxilatos, metilcarboxiamidas, metilfosfonatos, metilsulfonatos, metilnitrilos, alquilos de un átomo de carbono hasta veinte, líneales o ramificados, cicloalquilos de tres átomos de carbono hasta ocho, arilos simples o condensados de

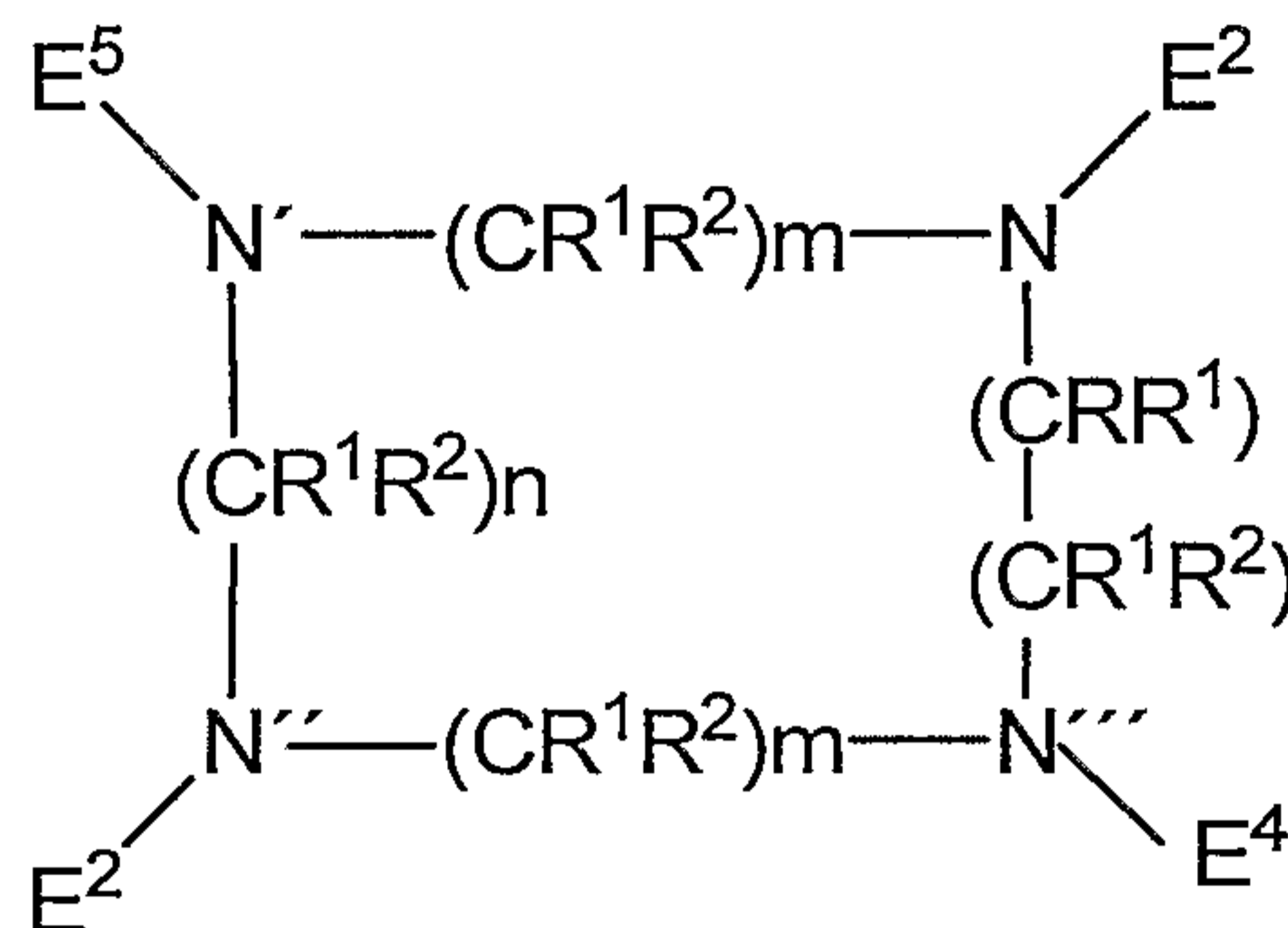


seis átomos de carbono o derivados funcionalizados de estos. Seguida de la purificación, remoción de los grupos protectores (CBz, Fmoc o Boc) y purificación se obtienen los productos descritos.



5

4. Un proceso para generar compuestos N'; N''' bifuncionales con fórmula



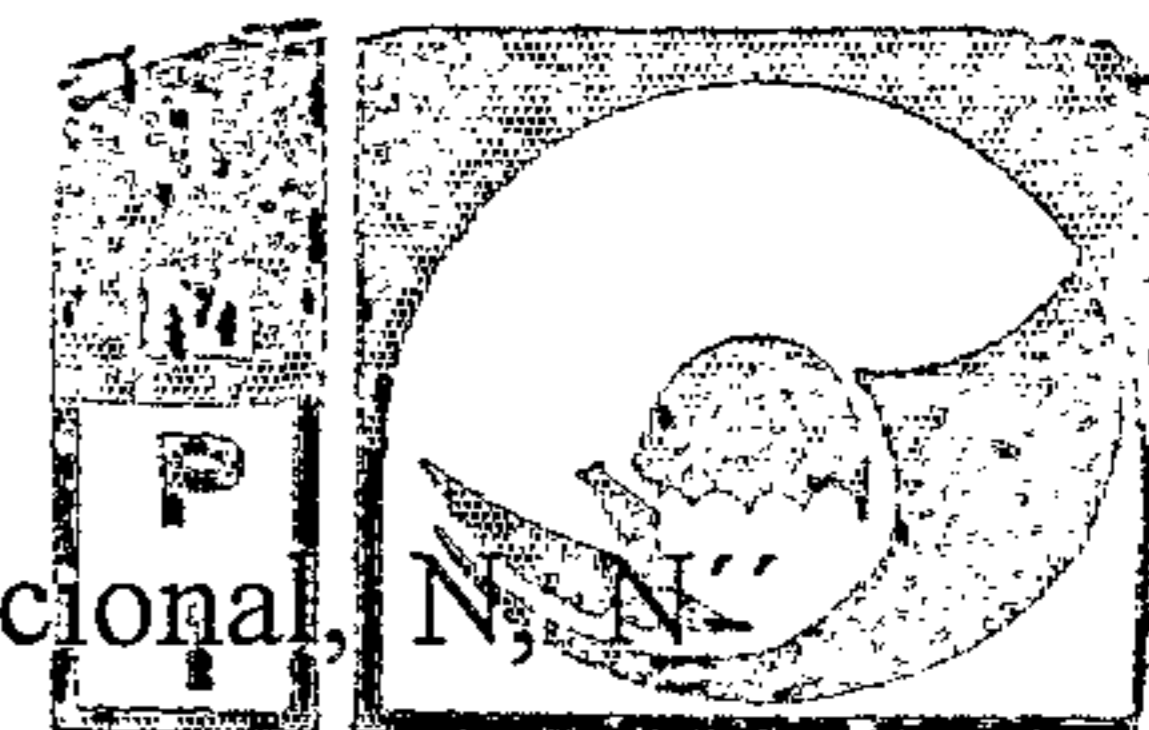
10

-2-

donde,  $n=m=2$  o  $n=2$   $m=3$ ,  $E^2 = R^1 = R^2 = H$ , R comprende hidrógeno, p-nitrobenzil, p-aminobenzil, p-isotiocionato-benzil, p-bromoacetamido-benzilo, p-cianobenzil, 4-aminobutil- o derivados de estos donde  $E^4$  y  $E^5$  son diferentes y comprenden metilcarboxilatos, metilcarboxiamidas, metilfosfonatos, metilsulfonatos, metilnitrilos, alquilos de un átomo de carbono hasta veinte, líneales o ramificados, cicloalquilos de tres átomos de carbono hasta ocho, arilos simples o condensados de seis átomos de carbono o derivados funcionalizados de estos.

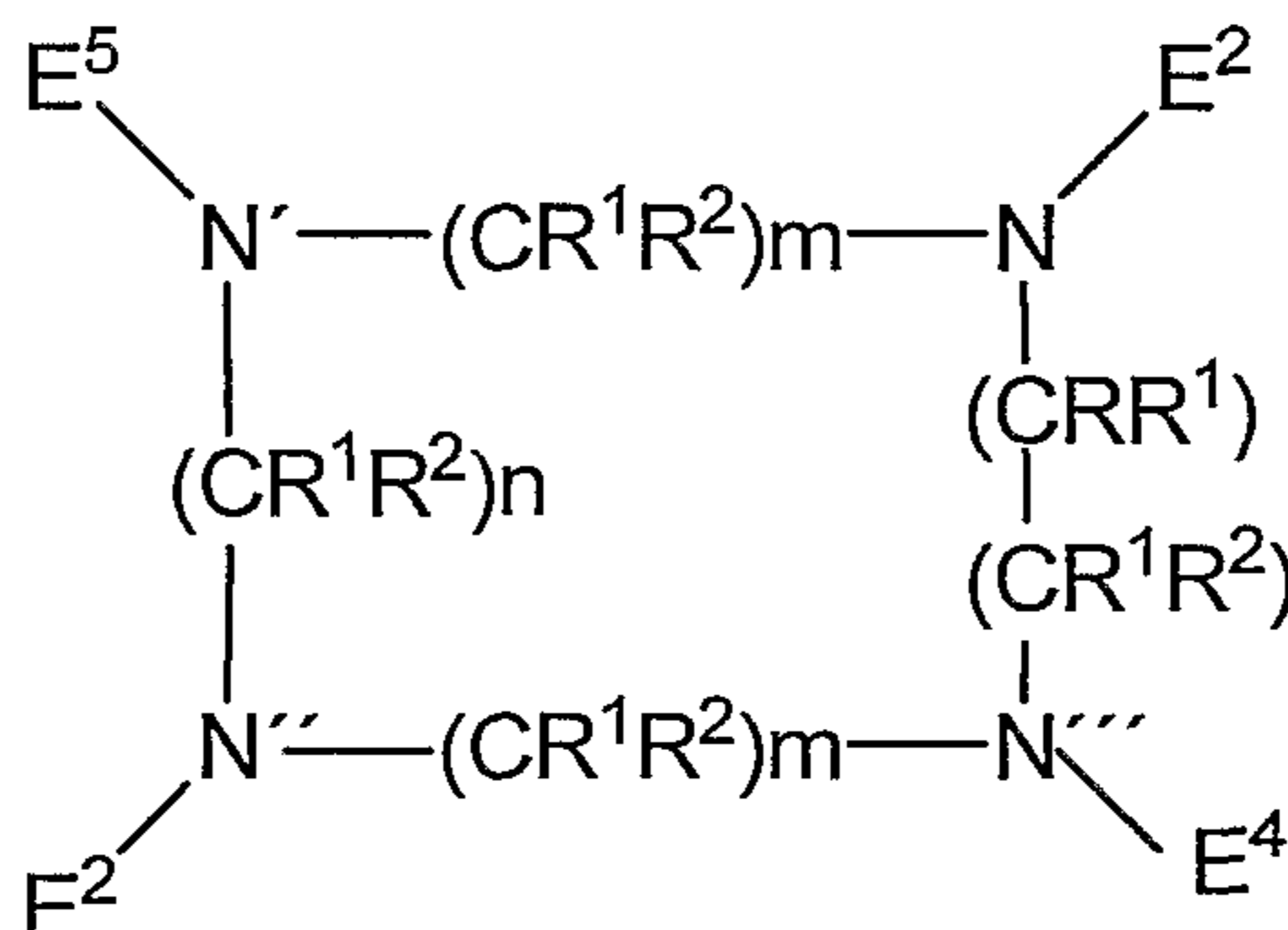
El proceso caracterizado por los siguientes pasos:

20



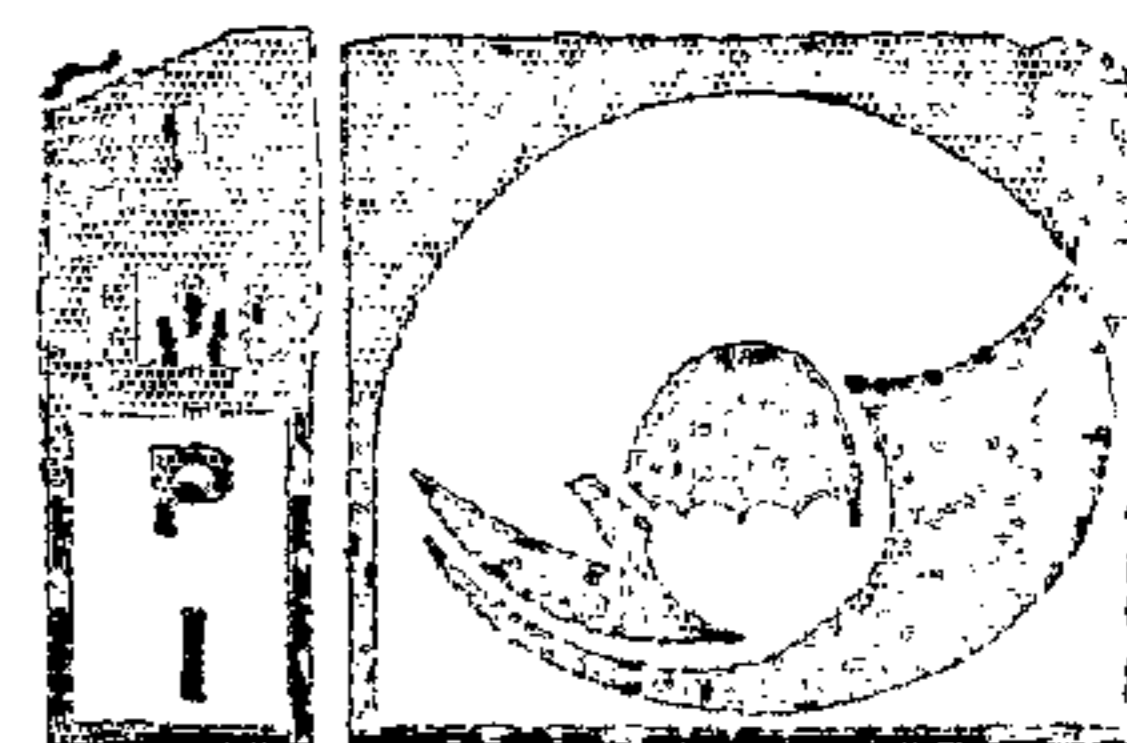
Instituto  
Mexicano  
de la Propiedad  
Industrial

- 1) Inicia mezclando 1 equivalente de un compuesto N' monofuncional, diprottegidos de fórmula



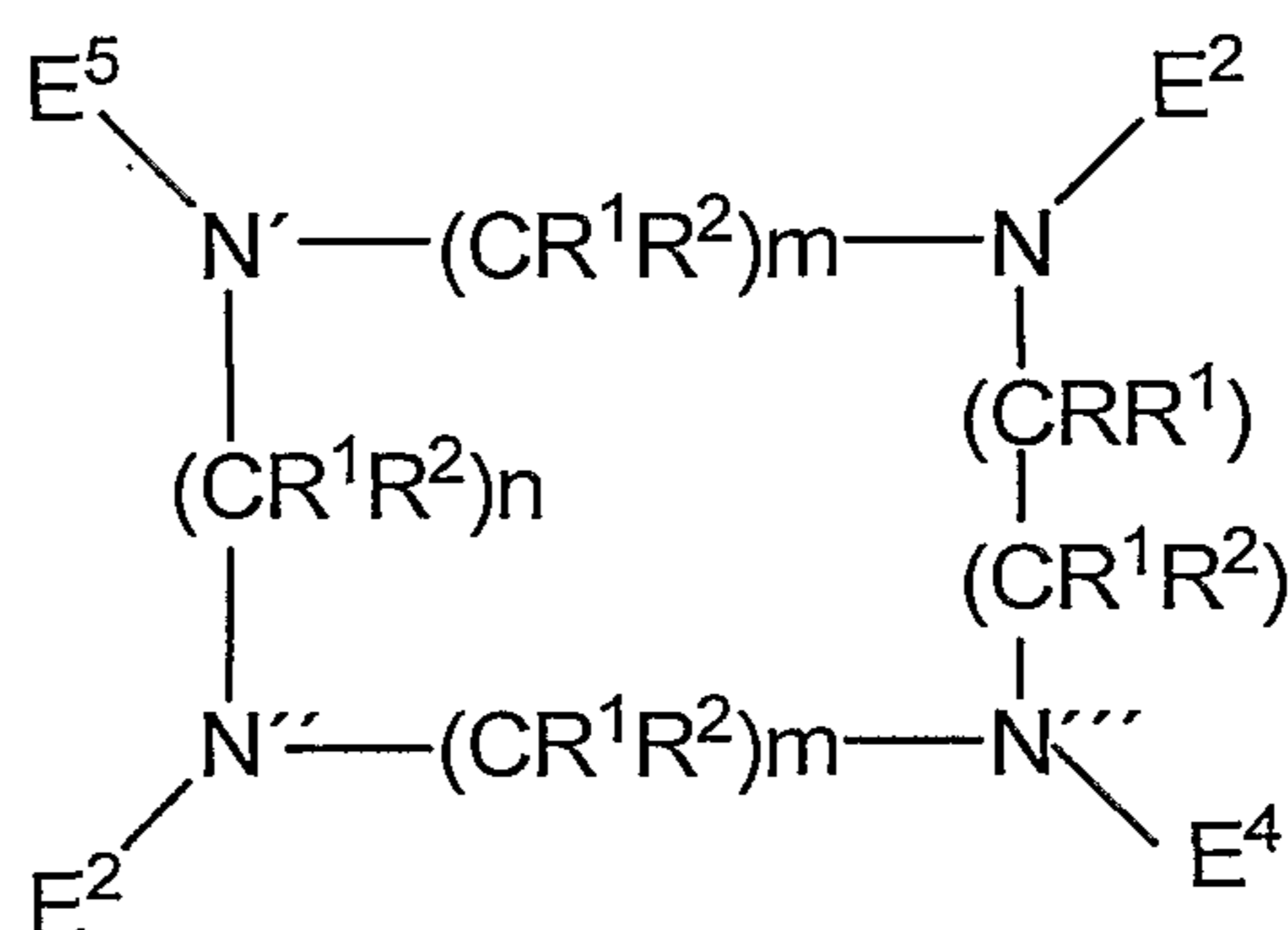
-2-

donde,  $n=m=2$  o  $n=2$   $m=3$ ,  $E^2 = \text{Boc}$ ,  $\text{Fmoc}$  o  $\text{CBz}$ ,  $E^4 = R^1 = R^2 = \text{H}$ , R comprende hidrógeno, p-nitrobenzil, p-aminobenzil, p-isotiocionato-benzil, p-bromoacetamido-benzilo, p-cianobenzil, 4-aminobutil- o derivados de estos y  $E^5$  es un grupo tal como metilcarboxilatos, metilcarboxiamidas, metilfosfonatos, metilsulfonatos, metilnitrilos, alquilos de un átomo de carbono hasta veinte, líneales o ramificados, cicloalquilos de tres átomos de carbono hasta ocho, arilos simples o condensados de seis átomos de carbono o derivados funcionalizados de estos en disolventes no polares como hexanos, ciclohexano, benceno, cloroformo, diclorometano o polares apróticos como acetonitrilo, éter etílico o THF a una temperatura de  $-75$  a  $70^\circ\text{C}$  con 1 a 2 equivalentes de un agente electrofílico conteniendo halógeno, tosilatos, triflatos, epoxidos, tiocianato o isocianato pero con sustituyente diferente al que se encuentra en  $E^5$  más 1 a 3 equivalentes de una base orgánica u inorgánica no nucleofílicas. Seguida de la purificación se realiza la remoción de los grupos protectores ( $\text{CBz}$ ,  $\text{Fmoc}$  o  $\text{Boc}$ ) y purificación del producto generando así los compuestos descritos.



Instituto  
Mexicano  
de la Propiedad  
Industrial

5. Un proceso para generar compuestos N, N'' ;N'; N''' trifuncionales con fórmula



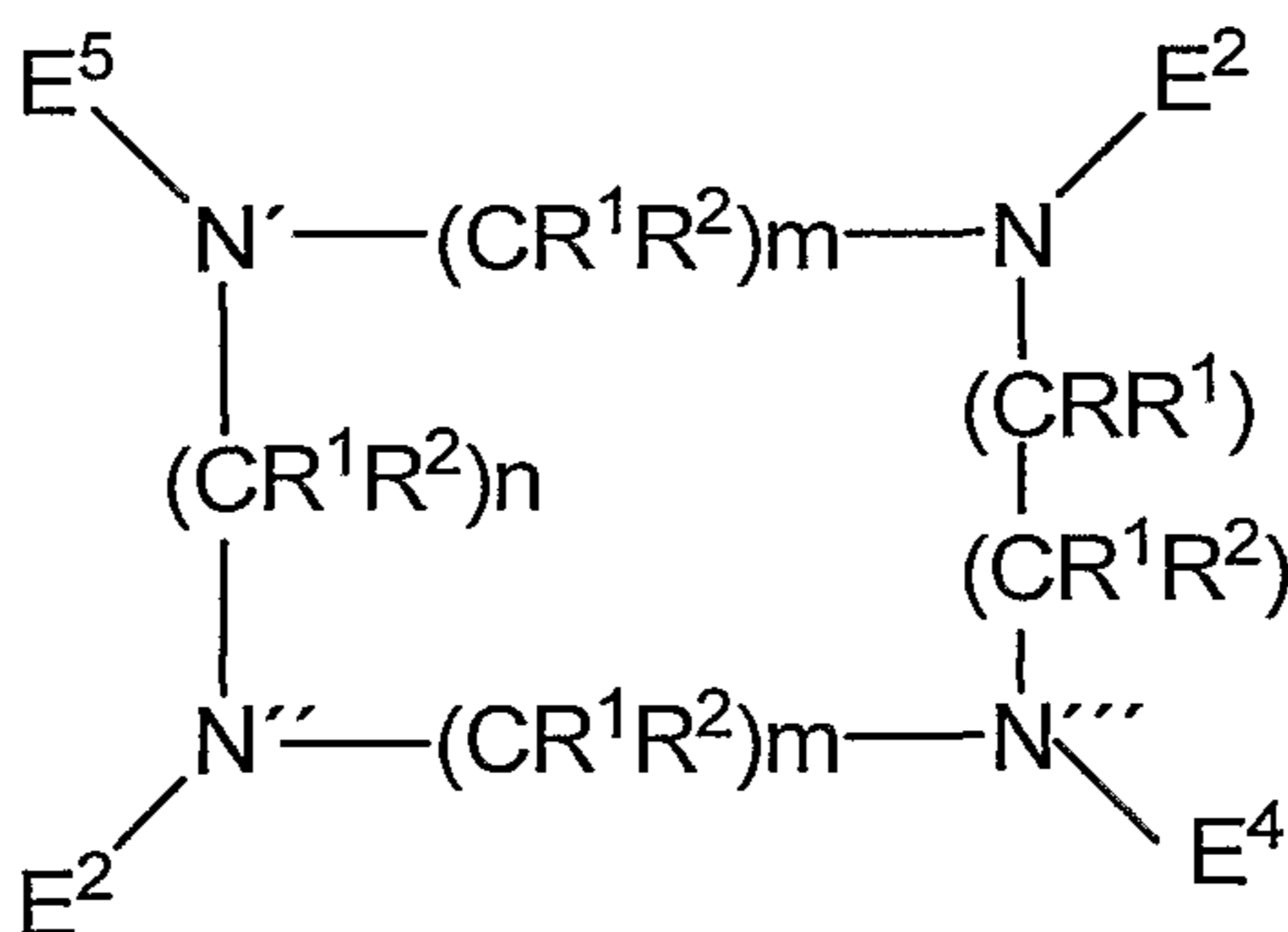
-2-

donde,  $n=m=2$  o  $n=2$   $m=3$ ,  $R^1=R^2 = H$ , R comprende hidrógeno, p-nitrobenzil, p-aminobenzil, p-isotiocionato-benzil, p-bromoacetamido-benzilo, p-cianobenzil, 4-aminobutil- o derivados de estos donde  $E^2$ ,  $E^4$  y  $E^5$  son diferentes y comprenden metilcarboxilatos, metilcarboxiamidas, metilfosfonatos, metilsulfonatos, metilnitrilos, alquilos de un átomo de carbono hasta veinte, líneales o ramificados, cicloalquilos de tres átomos de carbono hasta ocho, arilos simples o condensados de seis átomos de carbono o derivados funcionalizados de estos.

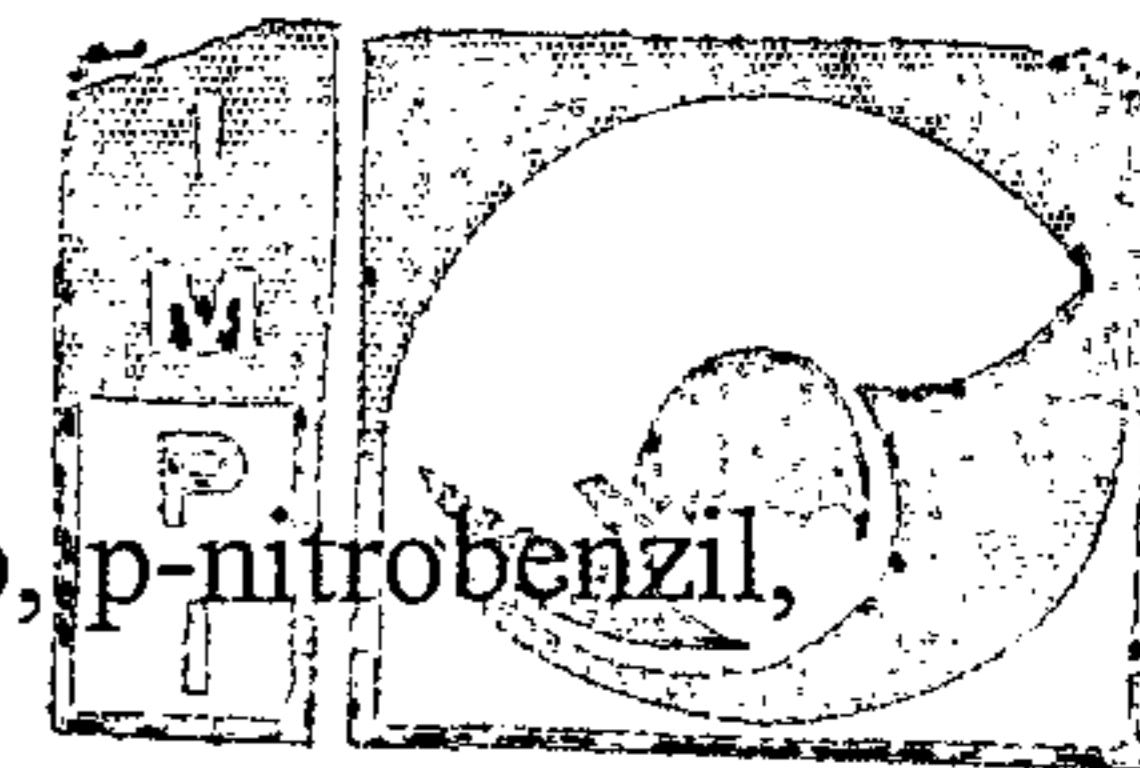
El proceso caracterizado por:

- 1) Inicia mezclando 1 equivalente de un compuesto N'; N''' bifuncional de

fórmula



-2-



donde,  $n=m=2$  o  $n=2$   $m=3$ ,  $E^2 = R^1 = R^2 = H$ , R comprende hidrógeno, p-nitrobenzil,

p-aminobenzil, p-isotiocionato-benzil, p-bromoacetamido-benzilo, p-cianobenzil, p-aminobutil- o derivados de estos donde  $E^4$  y  $E^5$  son diferentes y comprenden

metilcarboxilatos, metilcarboxiamidas, metilfosfonatos, metilsulfonatos,

metilnitrilos, alquilos de un átomo de carbono hasta veinte, lineales o ramificados,

cicloalquilos de tres átomos de carbono hasta ocho, arilos simples o condensados de

seis átomos de carbono o derivados funcionalizados de estos en disolventes no

polares como hexanos, ciclohexano, benceno, cloroformo, diclorometano o polares

apróticos como acetonitrilo, éter etílico o THF a una temperatura de  $-75$  a  $70^\circ\text{C}$  con

2 a 5 equivalentes de compuestos electrofílicos conteniendo halógeno, tosilatos,

triflatos, epoxidos, tiocianato o isocianato con sustituyentes diferentes a los

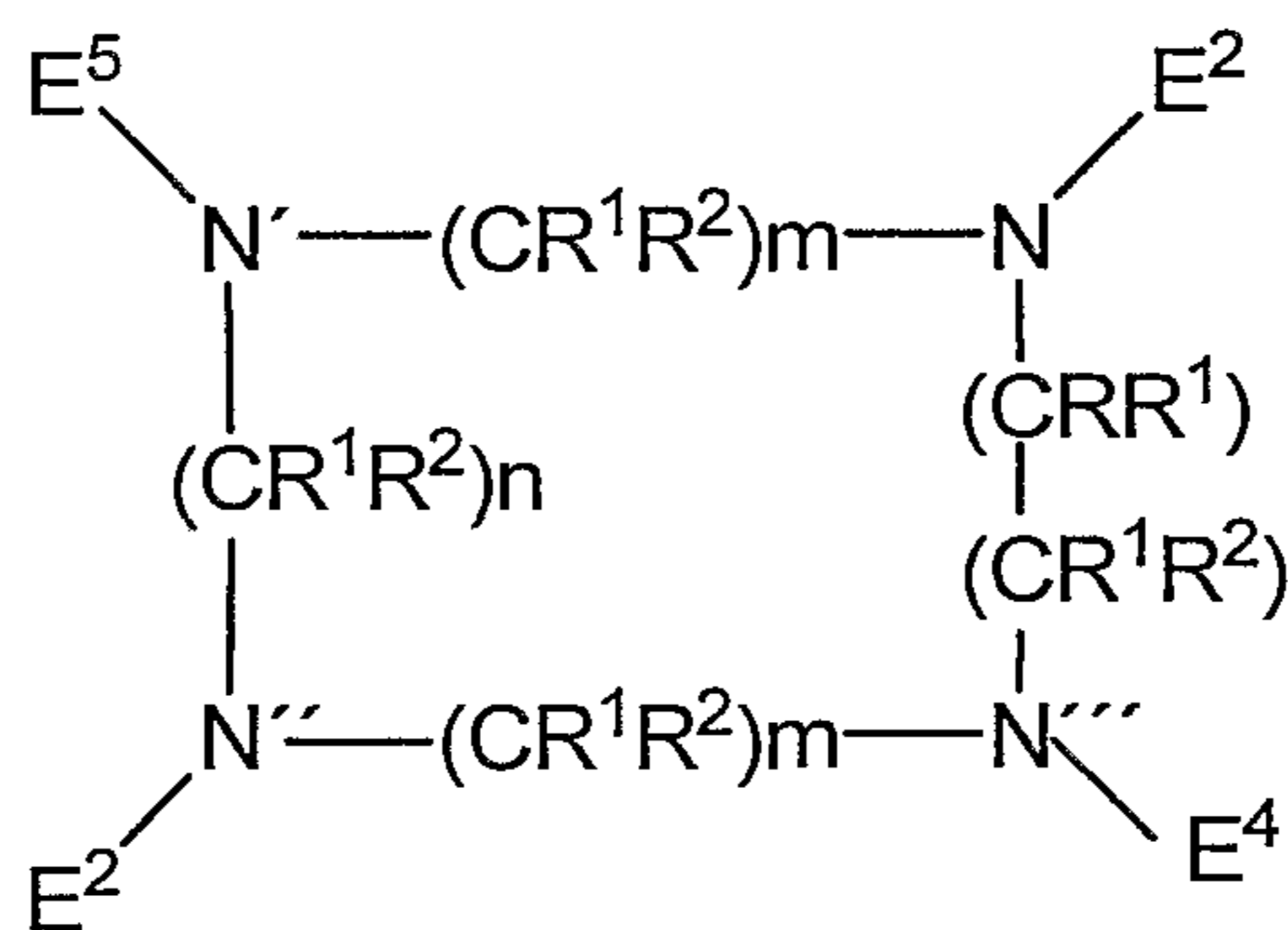
comprendidos en  $E^4$  y  $E^5$  en presencia 2 a 5 equivalentes de una base orgánica como

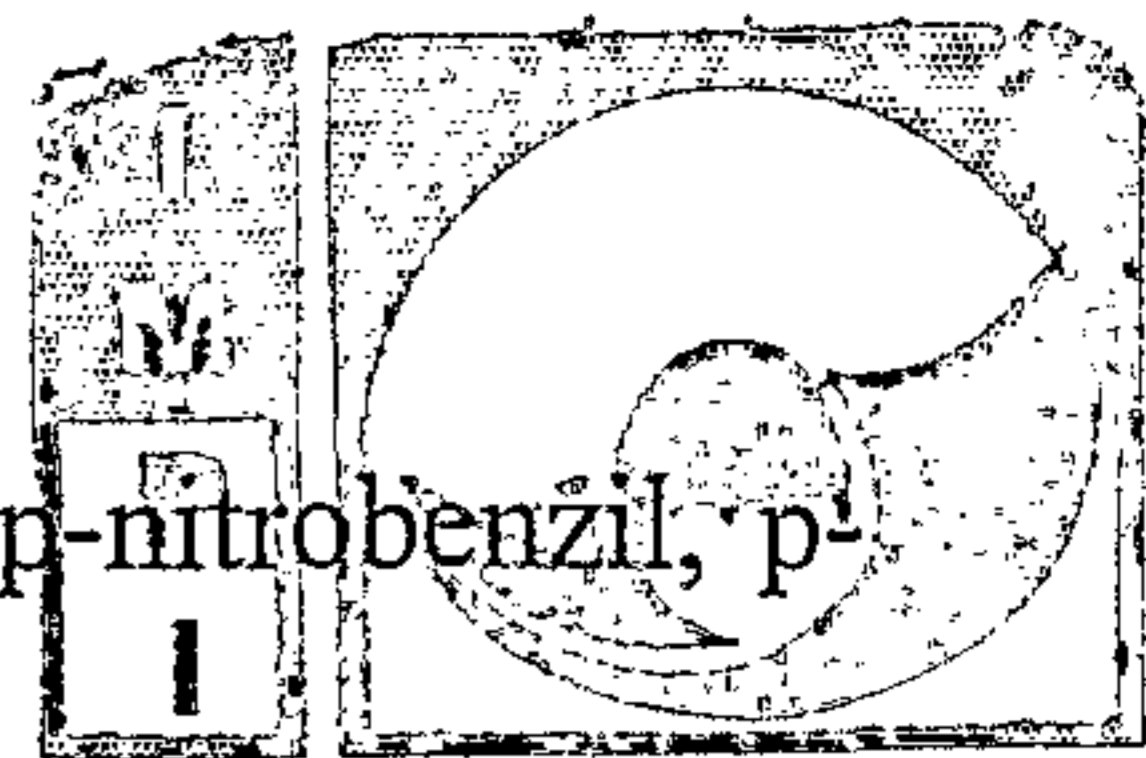
triethylamina, diisopropyletilamina, piridina o inorgánica como carbonatos o

bicarbonatos de metales como sodio, potasio, cesio por un tiempo de 6 a 32 horas.

Seguida de la purificación se generan los productos descritos.

6. Un proceso para generar compuestos  $N'$ ;  $N$ ,  $N''$ ,  $N'''$  bifuncionales con fórmula

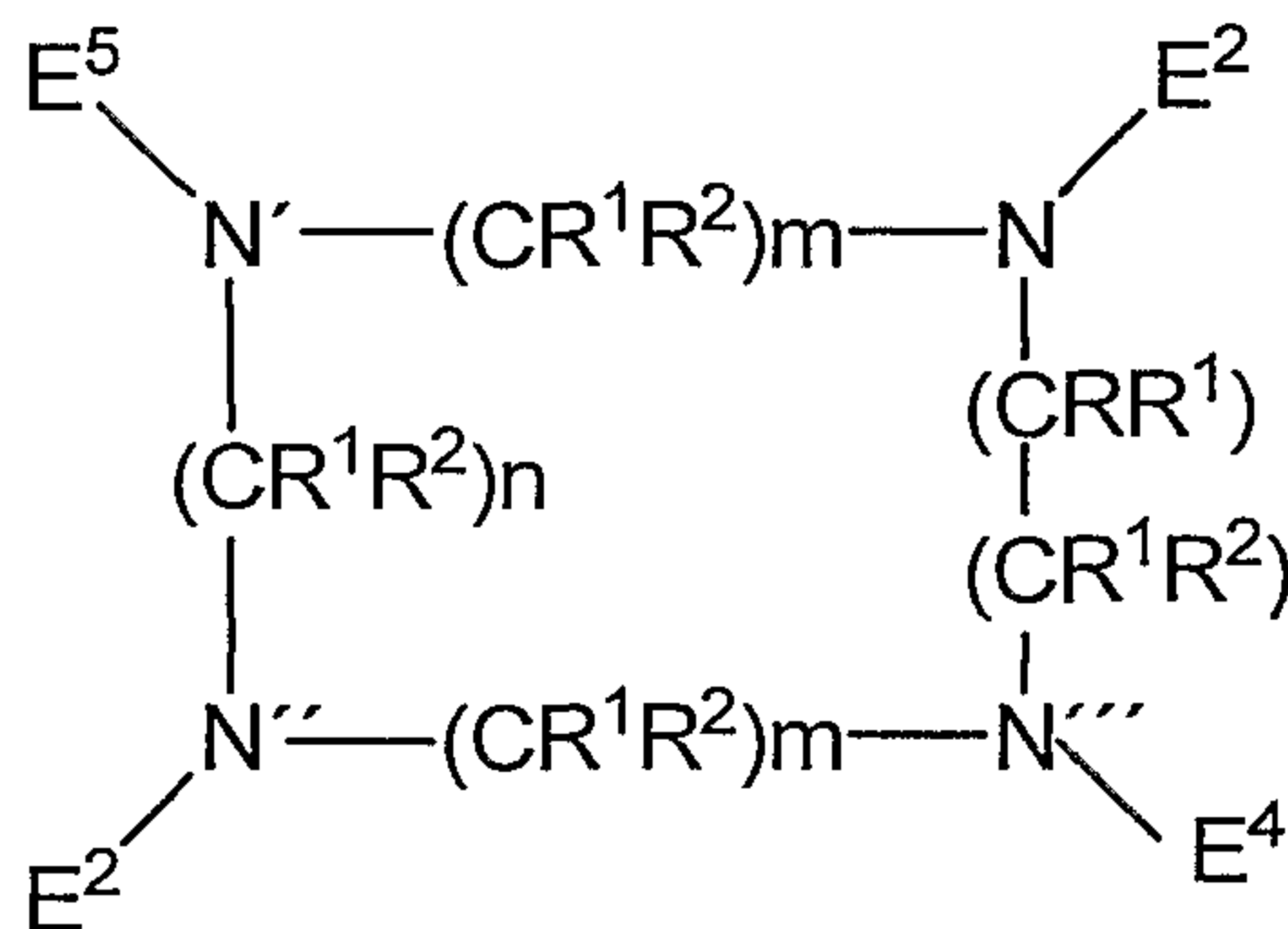




donde,  $n=m=2$  o  $n=2$   $m=3$ ,  $R^1=R^2 = H$ , R comprende hidrógeno, p-nitrobenzil, p-aminobenzil, p-isotiocionato-benzil, p-bromoacetamido-benzilo, p-cianobenzil, 4-aminobutil- o derivados de estos y  $E^2=E^4$  y son diferentes a  $E^5$  donde  $E^2, E^4$  y  $E^5$  comprenden metilcarboxilatos, metilcarboxiamidas, metilfosfonatos, metilsulfonatos, metilnitrilos, alquilos de un átomo de carbono hasta veinte, lineales o ramificados, cicloalquilos de tres átomos de carbono hasta ocho, arilos simples o condensados de seis átomos de carbono o derivados funcionalizados de estos.

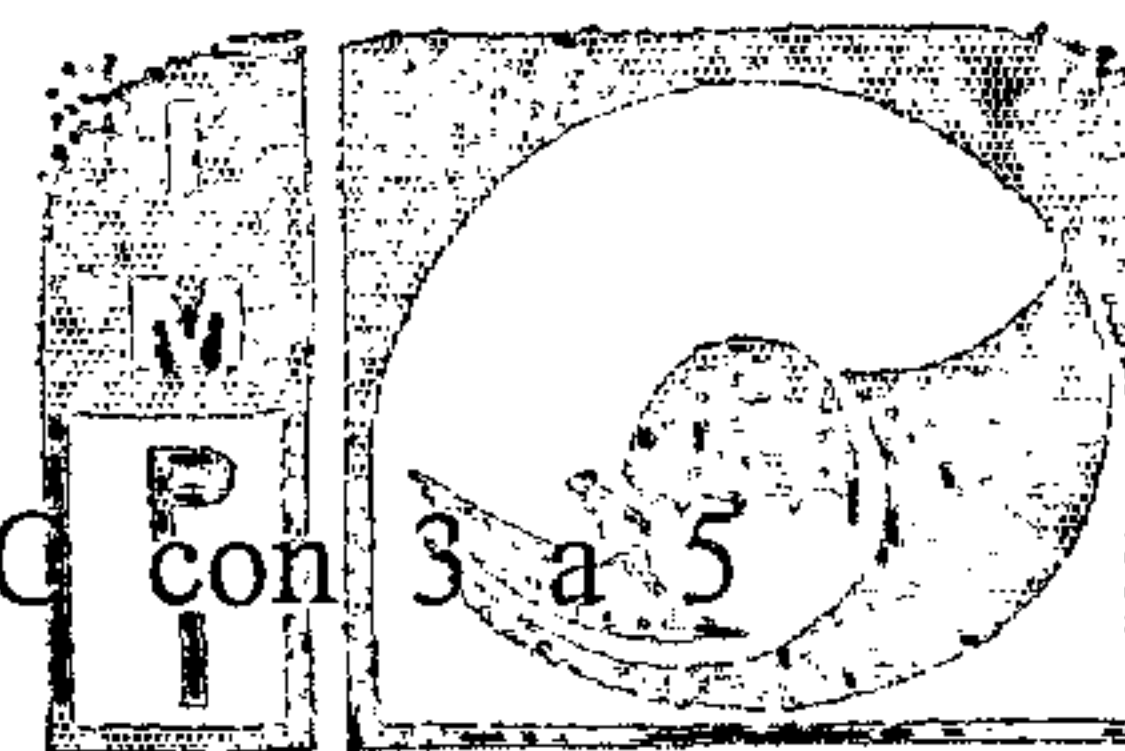
El proceso caracterizado por:

1) Inicia mezclando 1 equivalente de un compuesto N' monofuncional de fórmula



-2-

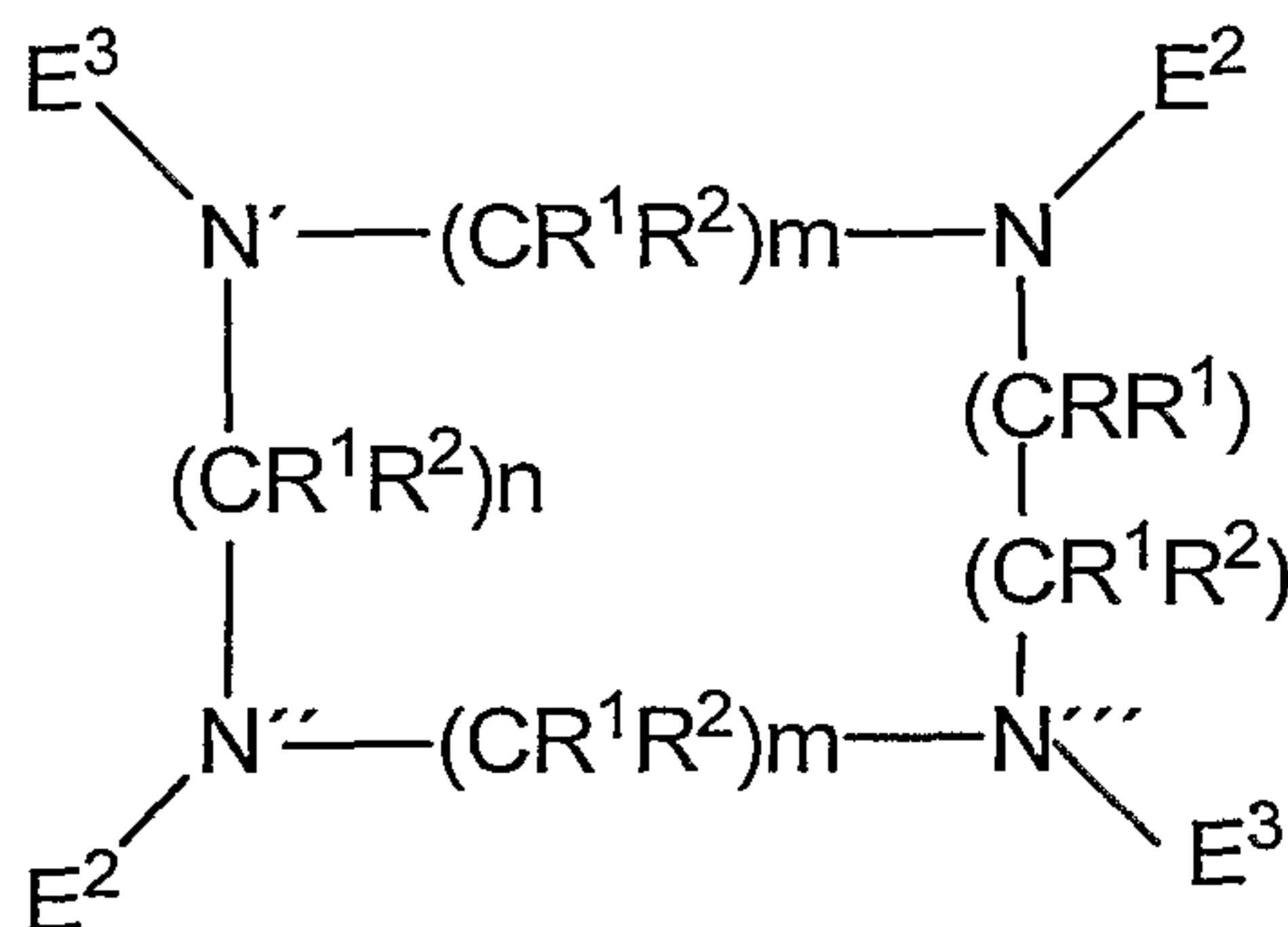
donde,  $n=m=2$  o  $n=2$   $m=3$ ,  $E^2=E^4=R^1=R^2 = H$ , R comprende hidrógeno, p-nitrobenzil, p-aminobenzil, p-isotiocionato-benzil, p-bromoacetamido-benzilo, p-cianobenzil, 4-aminobutil- o derivados de estos y  $E^5$  comprende metilcarboxilatos, metilcarboxiamidas, metilfosfonatos, metilsulfonatos, metilnitrilos, alquilos de un átomo de carbono hasta veinte, lineales o ramificados, cicloalquilos de tres átomos de carbono hasta ocho, arilos simples o condensados de seis átomos de carbono o derivados funcionalizados de estos, en disolventes no polares como hexanos, ciclohexano, benceno, cloroformo, diclorometano o polares apróticos como



acetonitrilo, éter etílico o THF a una temperatura de  $-75$  a  $70^{\circ}\text{C}$  con 3 a 5 equivalentes de compuesto electrofílico conteniendo halógeno, tosilatos, triflatos, epoxidos, tiocianato o isocianato que contengan sustituyentes diferentes en  $\text{E}^5$  en presencia de 3 a 5 equivalentes de una base orgánica u inorgánica no nucleofílica por un tiempo de 6 a 32 horas. Seguida de la purificación se generan los productos descritos.

Instituto  
Mexicano  
de Propiedad  
Industrial

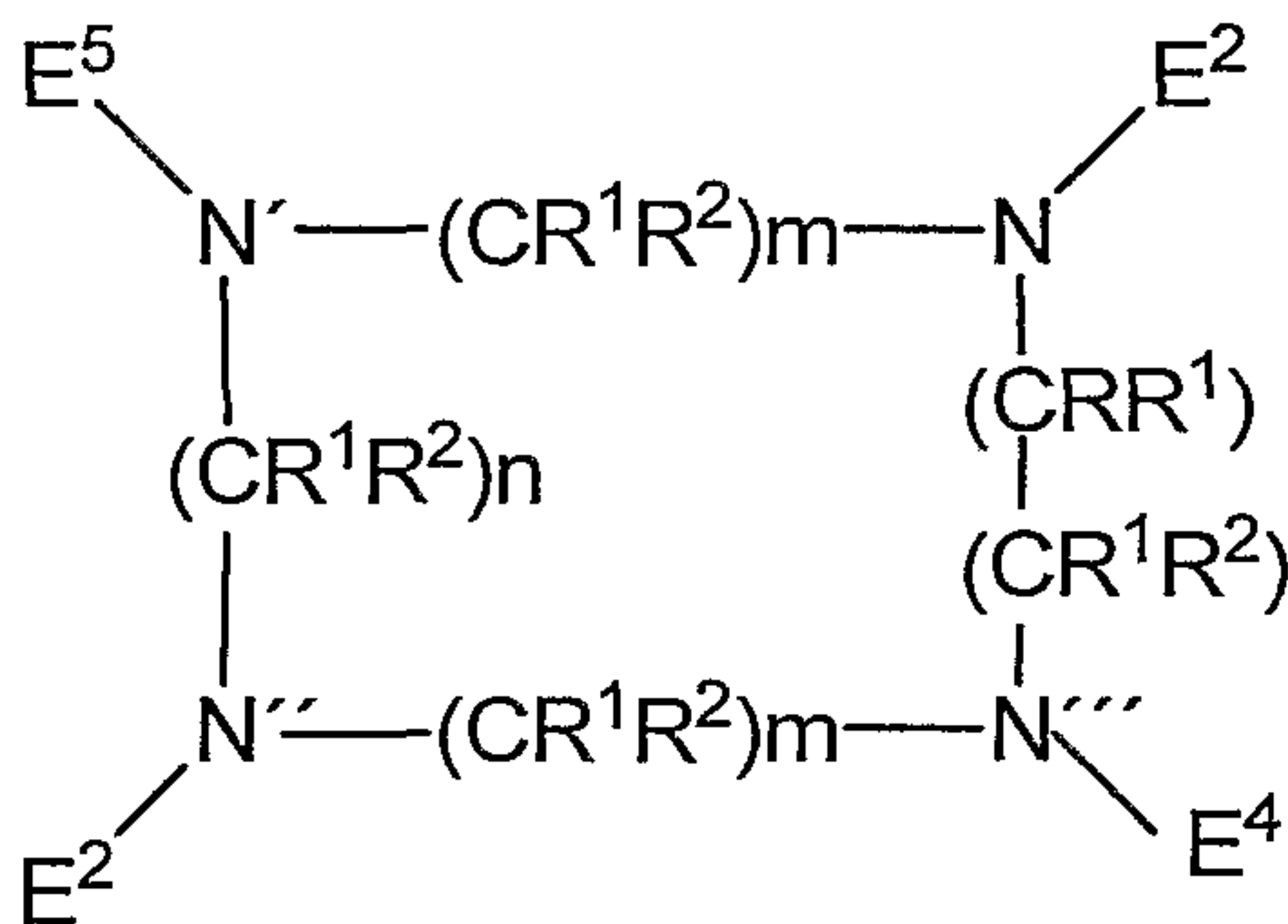
7. Un compuesto de fórmula



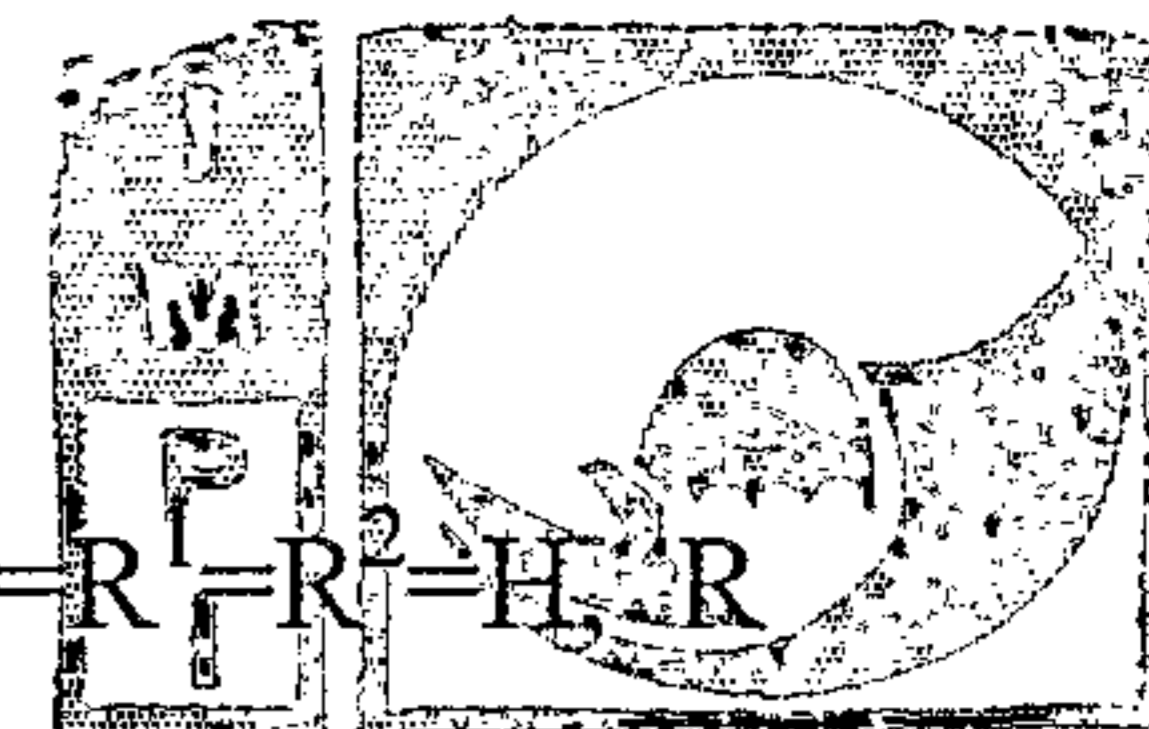
-1-

caracterizado porque  $n=m=2$  o  $n=2$   $m=3$ ,  $\text{E}^2 = \text{Boc}$  o  $\text{Fmoc}$ ,  $\text{E}^3 = \text{R}^1 = \text{R}^2 = \text{H}$ ,  $\text{R}$  comprende hidrógeno, p-nitrobenzil, p-aminobenzil, p-isotiocionato-benzil, p-bromoacetamido-benzilo, p-cianobenzil, 4-aminobutil- o derivados de estos.

8. Un compuesto de fórmula

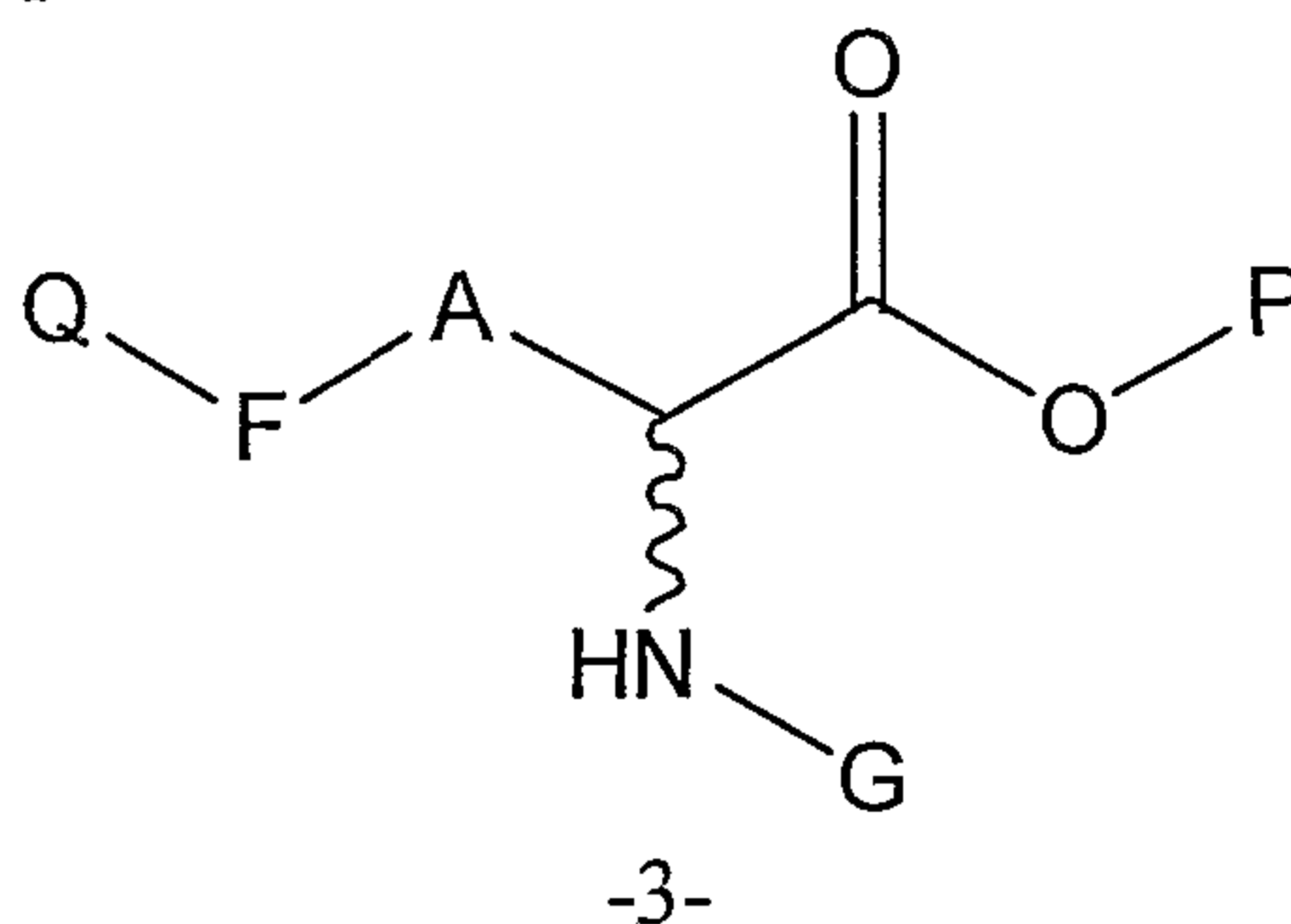


-2-

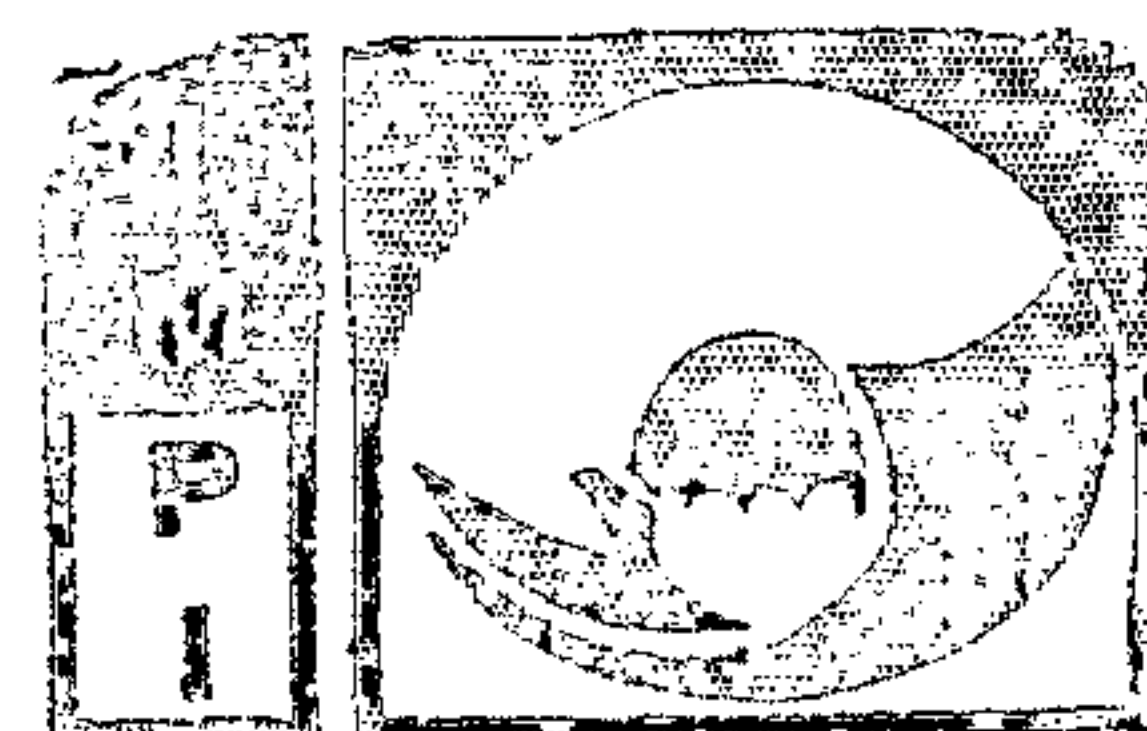
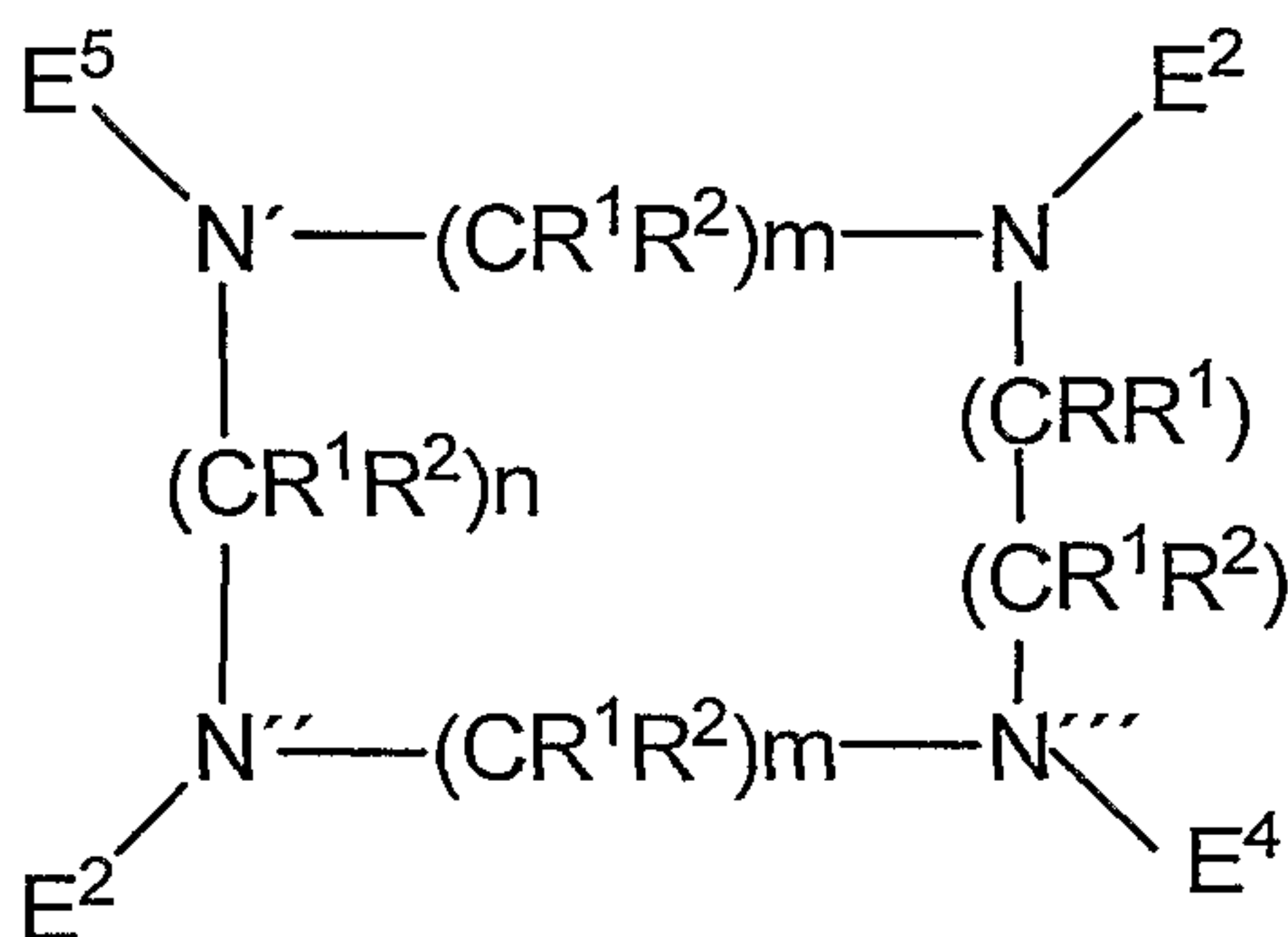


caracterizado porque  $n=m=2$  o  $n=2$   $m=3$ ,  $E^2 = \text{Boc}$  o  $\text{Fmoc}$ ,  $E^4 = \text{R}^1 = \text{R}^2 = \text{H}$ ,  $\text{R}^3 = \text{R}^4$  comprende hidrógeno, p-nitrobenzil, p-aminobenzil, p-isotiocionato-benzil, bromoacetamido-benzilo, p-cianobenzil, 4-aminobutil- o derivados de estos y comprende metilcarboxilatos, metilcarboxiamidas, metilfosfonatos, metilsulfonatos, metilnitrilos, alquilos de un átomo de carbono hasta veinte, lineales o ramificados, cicloalquilos de tres átomos de carbono hasta ocho, arilos simples o condensados de seis átomos de carbono o derivados funcionalizados de estos.

9. El proceso para obtener compuestos con fórmula



donde G comprende un grupo protector de preferencia Fmoc y P es hidrógeno o un grupo activador de la función carboxílica tales como succinimidil y pentafluorofenil, A comprende cadenas laterales alifáticas, cíclicas o aromáticas definidas por los aminoácidos de lisina, histidina, fenilalanina, ácido aspártico, treonina, serina, cisteina, tirosina, triptofano o cualquier otro aminoácido modificado, donde F comprende grupos funcionales de los aminoácidos mencionados tales como amino, ácido carboxílico, alcohol o tiol funcionalizado con un ligante macrocíclico del tipo tetraaza Q dado por la fórmula



Instituto  
Mexicano  
de la Propiedad  
Industrial

5

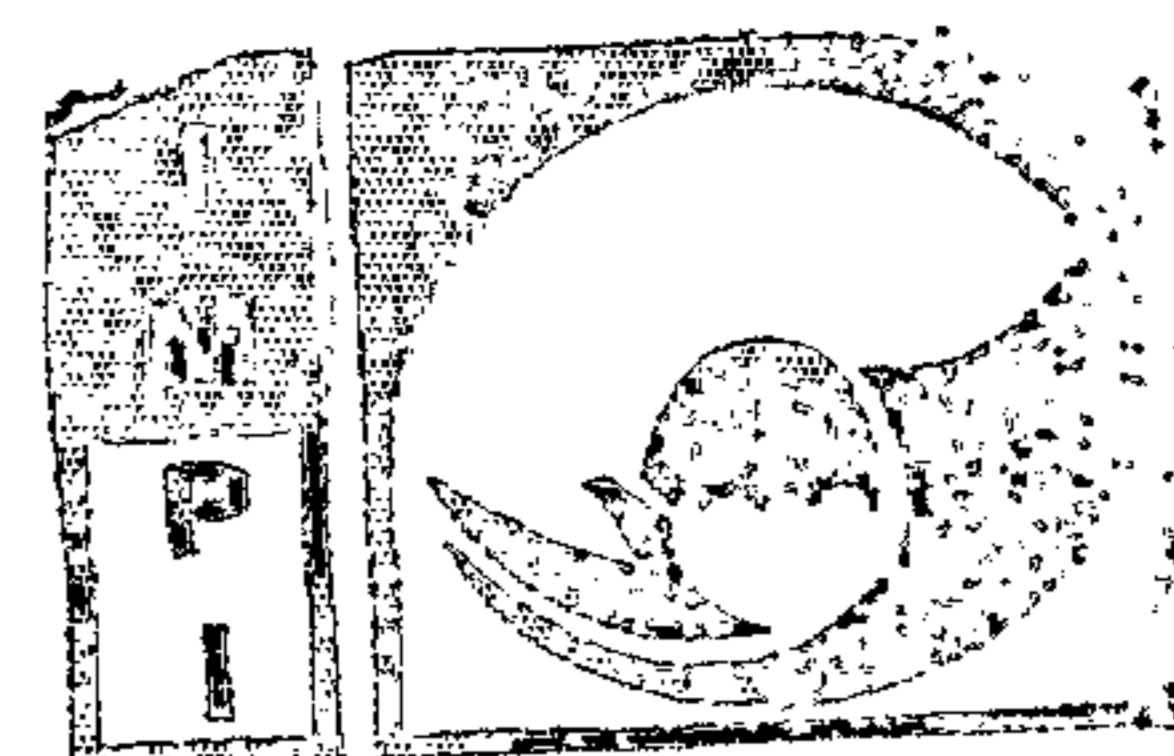
-2-

10

20

donde  $n=m=2$  o  $n=2$   $m=3$ ,  $R=R^1=R^2 = H$ , y  $E^2=E^4$  y estos son diferentes a  $E^5$  donde  $E^2$  y  $E^4$  comprenden metilcarboxilatos, metilcarboxiamidas, metilfosfonatos, metilsulfonatos, metilnitrilos, alquilos de un átomo de carbono hasta veinte, lineales o ramificados, cicloalquilos de tres átomos de carbono hasta ocho, arilos simples o condensados de seis átomos de carbono o derivados funcionalizados de estos. Mientras que cuando  $F$  es  $-NH$  o  $-O$   $E^5$  será un un metilcarbonil unido a  $N'$  mientras las demás funcionalidades de ligante derivatizadas en  $N$ ,  $N''$ ,  $N'''$  deberán estar protegidas con grupos lábiles a condiciones ácidas (Ej. *tert*-butilcarbamato; Boc, *tert*-butilo; *t*-Bu) dado su aplicación en síntesis de péptidos en fase sólida. Por otro lado cuando  $F$  es  $-CO$ ,  $E^5$  será alquilos de un átomo de carbono hasta veinte, lineales o ramificados, cicloalquilos de tres átomos de carbono hasta ocho, arilos simples o condensados de seis átomos de carbono o derivados funcionalizados de estos conteniendo un grupo amino o alcohol en  $N'$  mientras las demás funcionalidades de ligante derivatizadas en  $N$ ,  $N''$ ,  $N'''$  están protegidas con grupos lábiles a condiciones ácidas. Finalmente cuando  $F = -S$ , el ligante  $Q$  tendrá en  $E^5$  una funcionalidad del tipo maleimida en  $N'$ .

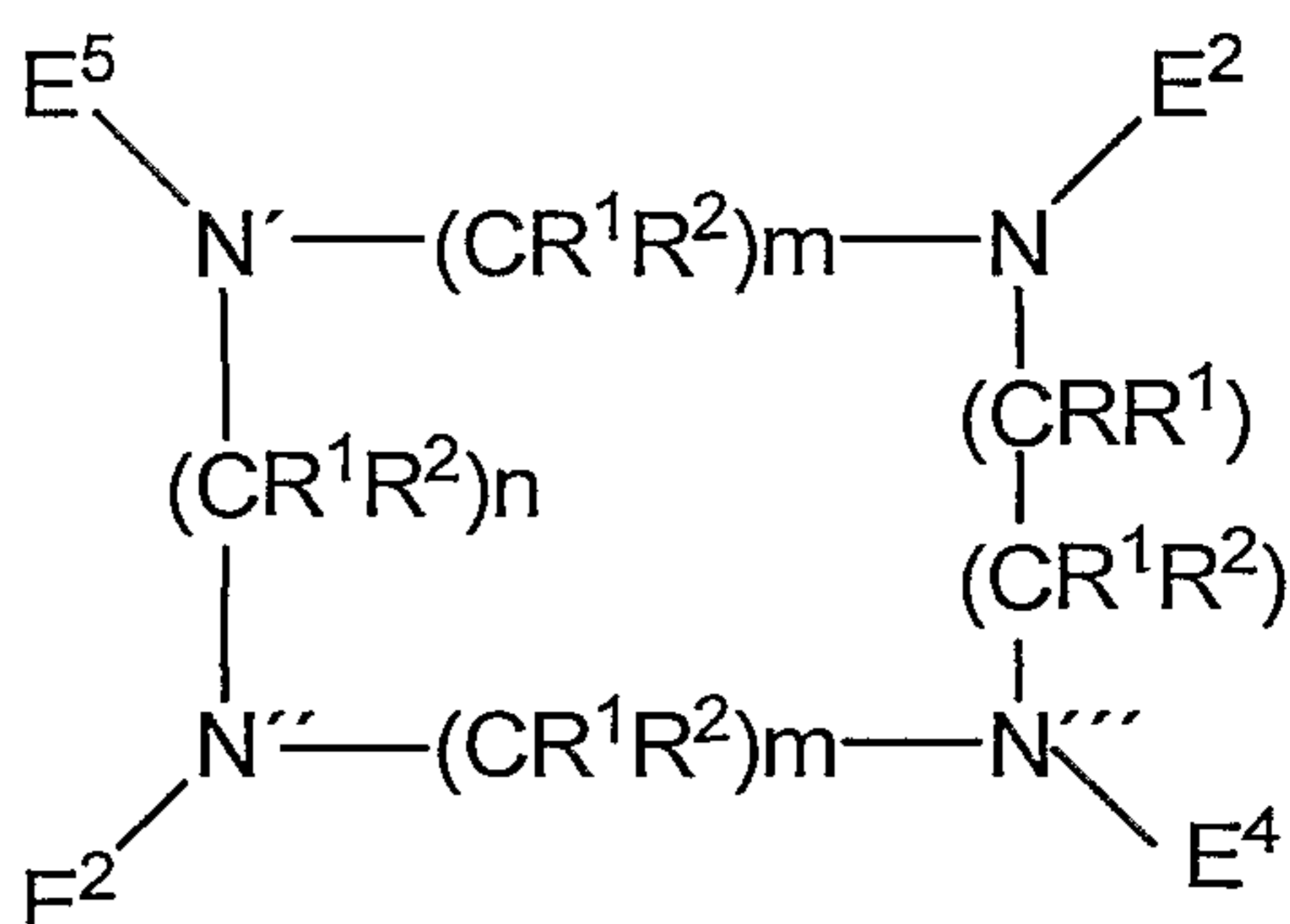




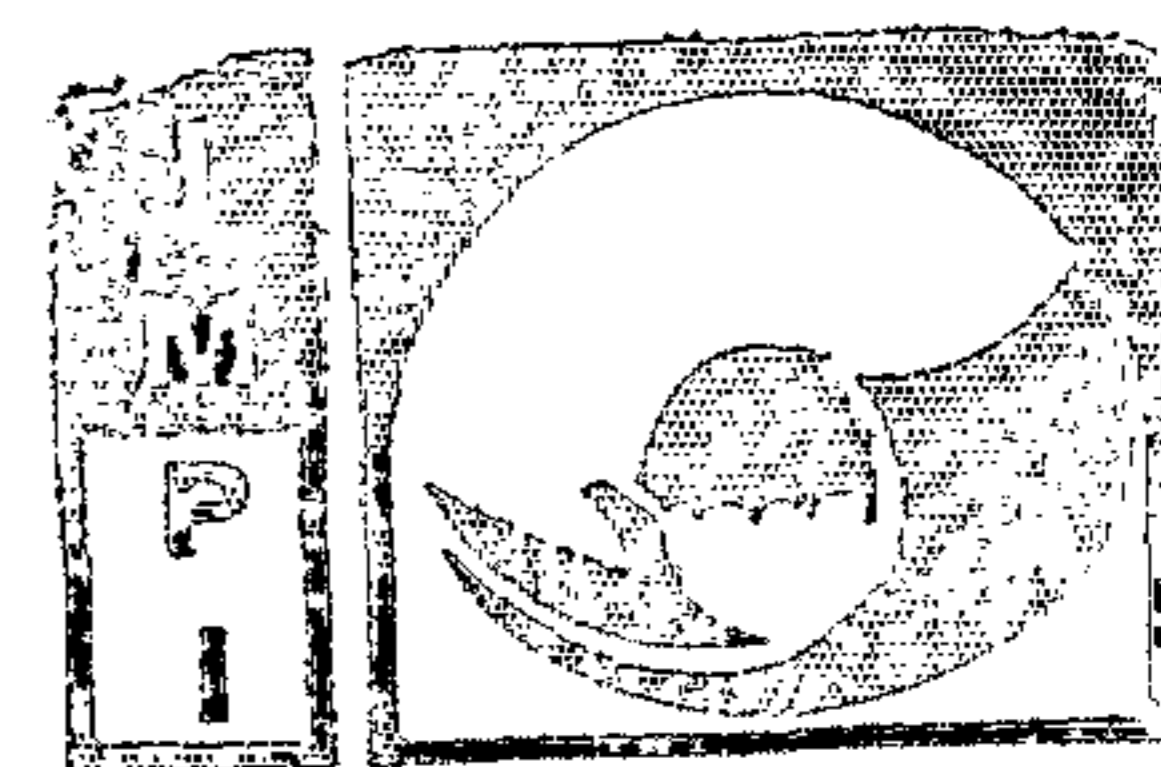
Instituto  
Mexicano  
de la Propiedad  
Industrial

El proceso caracterizado por

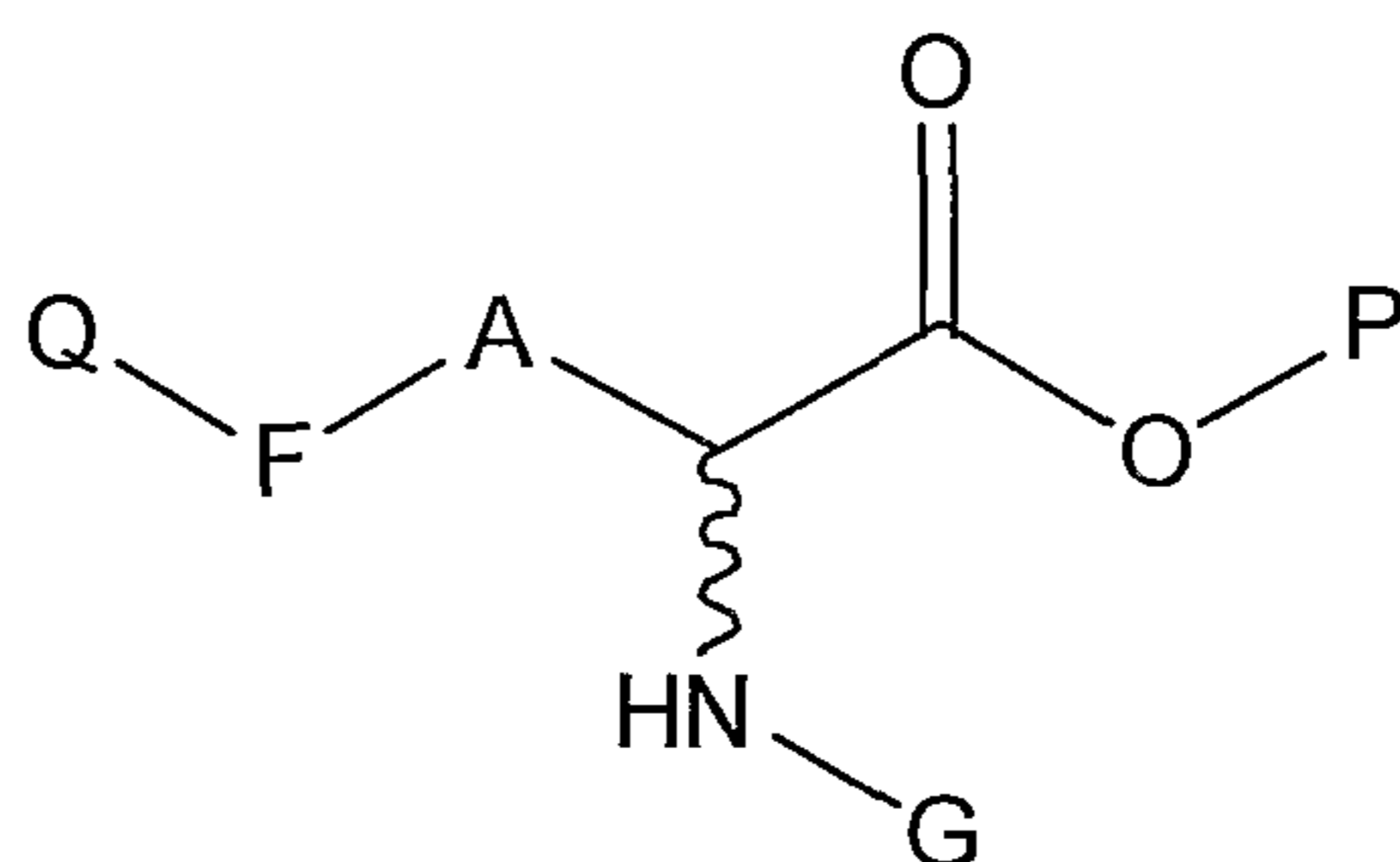
1) Inicia mezclando 1 equivalente del ligante Q según la fórmula 2



donde  $n=m=2$  o  $n=2$   $m=3$ ,  $R=R^1=R^2 = H$ , y  $E^2=E^4$  y estos son diferentes a  $E^5$  donde  $E^2$  y  $E^4$  comprenden metilcarboxilatos, metilcarboxiamidas, metilfosfonatos, metilsulfonatos, metilnitrilos, alquilos de un átomo de carbono hasta veinte, lineales o ramificados, cicloalquilos de tres átomos de carbono hasta ocho, arilos simples o condensados de seis átomos de carbono o derivados funcionalizados de estos.  $E^5$  es un metilcarboxilato cuando F es  $-NH$  o  $-OH$  o  $E^5$  es alquilos de un átomo de carbono hasta veinte, lineales o ramificados, cicloalquilos de tres átomos de carbono hasta ocho, arilos simples o condensados de seis átomos de carbono o derivados funcionalizados de estos conteniendo un grupo amino o alcohol cuando F es  $-COOH$  alternativamente  $E^5$  contiene la funcionalidad maleimida cuando F es  $-SH$  mientras las demás funcionalidades de ligante derivatizadas en N, N'', N''' están protegidas con grupos lábiles a condiciones ácidas (Ej. *tert*-butilcarbamato; Boc, *tert*-butilo; *t*-Bu) en disolventes no polares como hexanos, ciclohexano, benceno, cloroformo, diclorometano o polares apróticos como acetonitrilo, éter etílico o THF a una temperatura de  $-75$  a  $70^\circ C$  con 1 equivalente de un aminoácido de fórmula

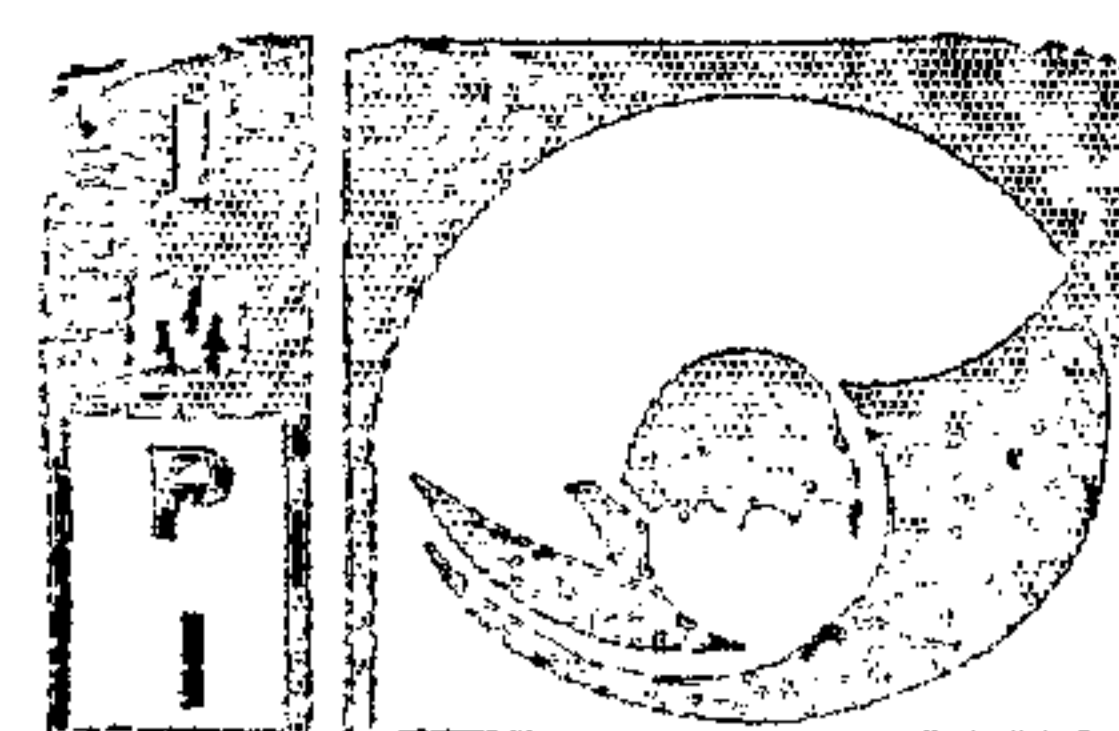


Instituto  
Mexicano  
de la Propiedad  
Industrial



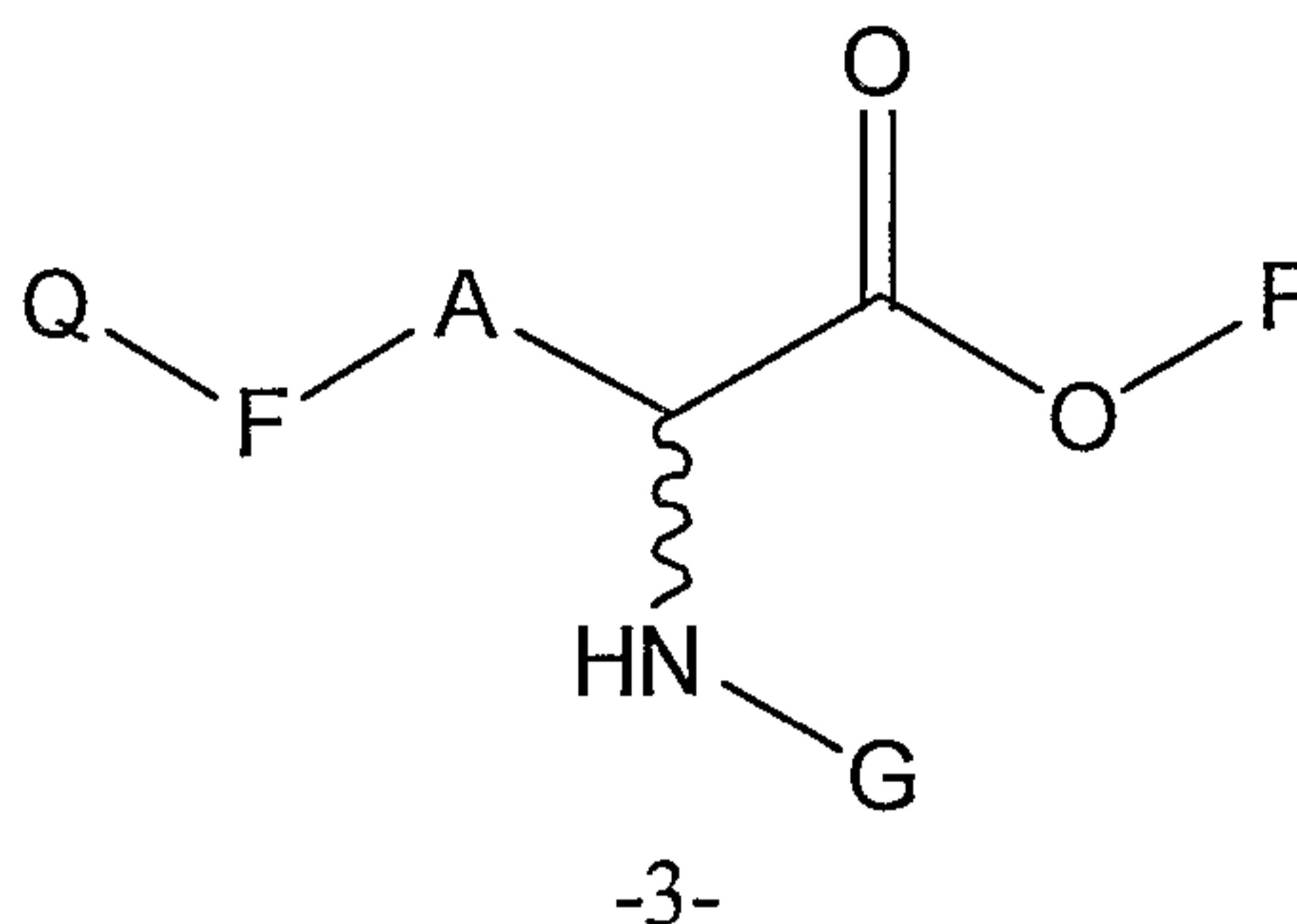
-3-

donde Q no existe y G comprende un grupo protector de preferencia Fmoc y P es hidrógeno o un grupo activador de la función carboxílica tales como succinimidil y pentafluorofenil, A comprende cadenas laterales alifáticas, cíclicas o aromáticas de lisina, histidina, fenilalanina, ácido aspártico, treonina, serina, cisteina, tirosina, triptofano o cualquier otro aminoácido modificado, donde F comprende grupos funcionales de los aminoácidos mencionados tales como amino, ácido carboxílico, alcohol o tiol con 1 equivalente reactivo tal como. dicitlocarboxidiimida, DCC; hidroxisuccinimida; NHS, o tetrametil amonio benzotriazol hexapentafluoruro; HBTU o similares, en presencia de 3 a 5 equivalentes de una base orgánica u inorgánica no nucleofílica por un tiempo de 6 a 32 horas. Seguida de la purificación se generan los productos descritos.

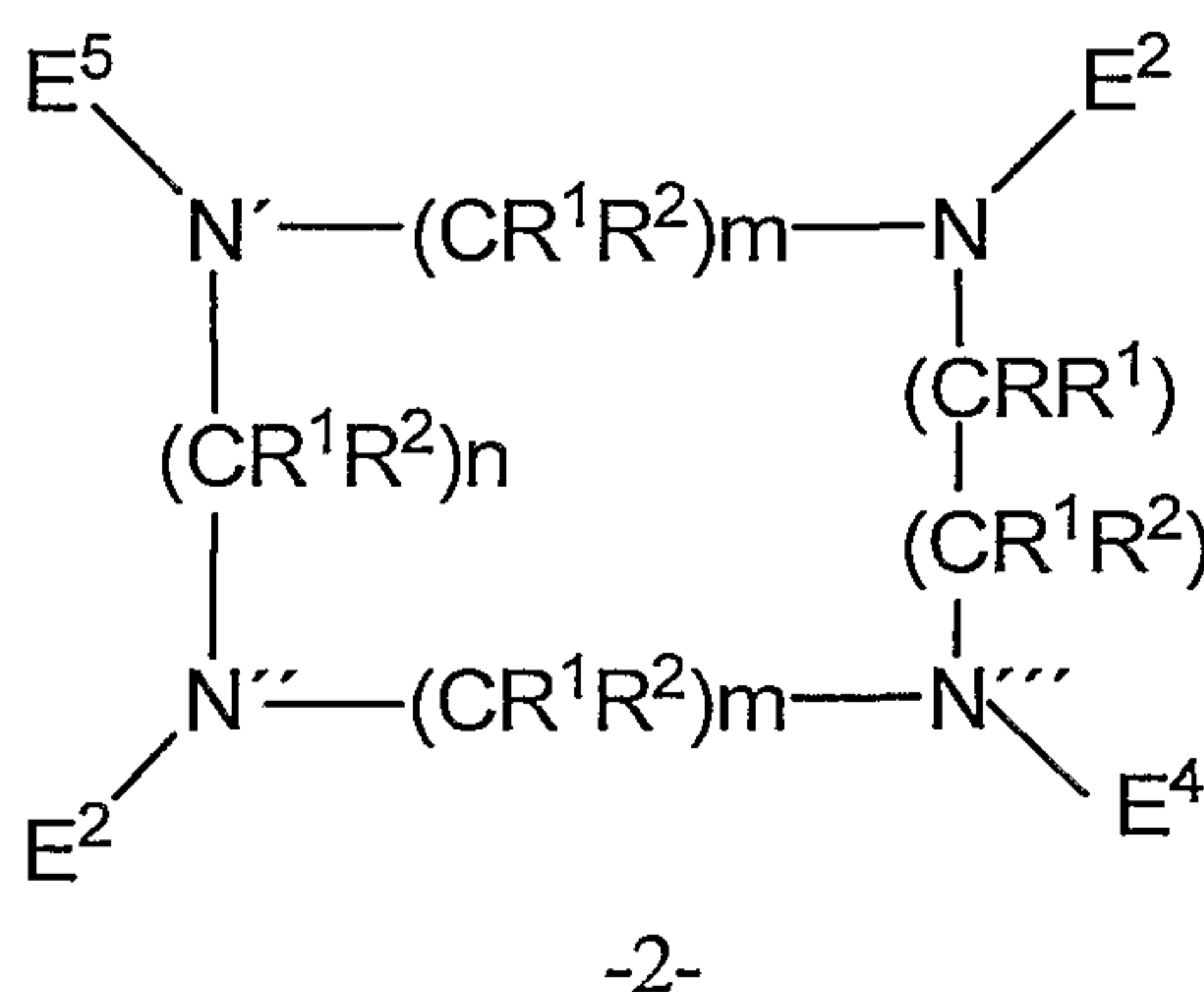


Instituto  
Mexicano  
de la Propiedad  
Industrial

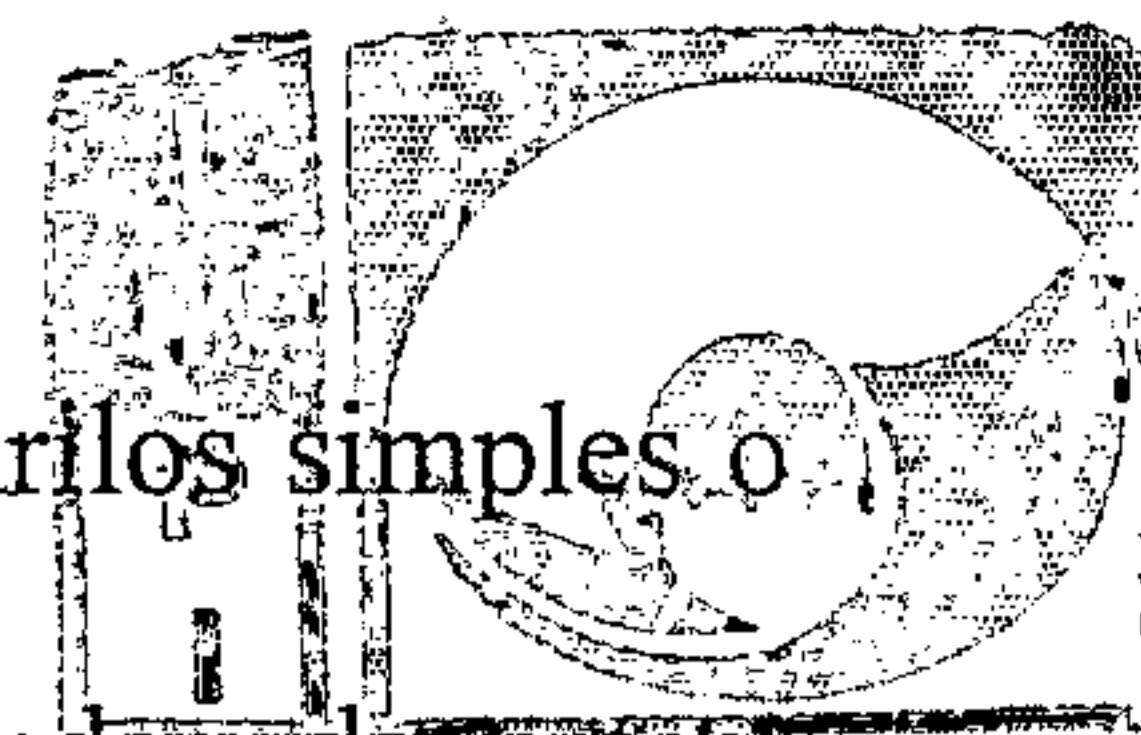
10. Un compuesto de fórmula



donde G comprende un grupo protector de preferencia Fmoc y P es hidrógeno o un grupo activador de la función carboxílica tales como succinimidil y pentafluorofenil, A comprende cadenas laterales alifáticas, cíclicas o aromáticas definidas por los aminoácidos de lisina, histidina, fenilalanina, ácido aspártico, treonina, serina, cisteina, tirosina, triptofano o cualquier otro aminoácido modificado, donde F comprende grupos funcionales de los aminoácidos mencionados tales como amino, ácido carboxílico, alcohol o tiol funcionalizado con un ligante macrocíclico del tipo tetraaza Q dado por la fórmula



donde  $n=m=2$  o  $n=2$   $m=3$ ,  $R=R^1=R^2 = H$ , y  $E^2=E^4$  y estos son diferentes a  $E^5$  donde  $E^2$  y  $E^4$  comprenden metilcarboxilatos, metilcarboxiamidas, metilfosfonatos, metilsulfonatos, metilnitrilos, alquilos de un átomo de carbono hasta veinte, lineales



o ramificados, cicloalquilos de tres átomos de carbono hasta ocho, arilos simples o condensados de seis átomos de carbono o derivados funcionalizados de estos.

Mientras que cuando F es  $-NH$  o  $-O$   $E^5$  será un un metilcarbonil unido a N, mientras las demás funcionalidades de ligante derivatizadas en N, N'', N''' deberán

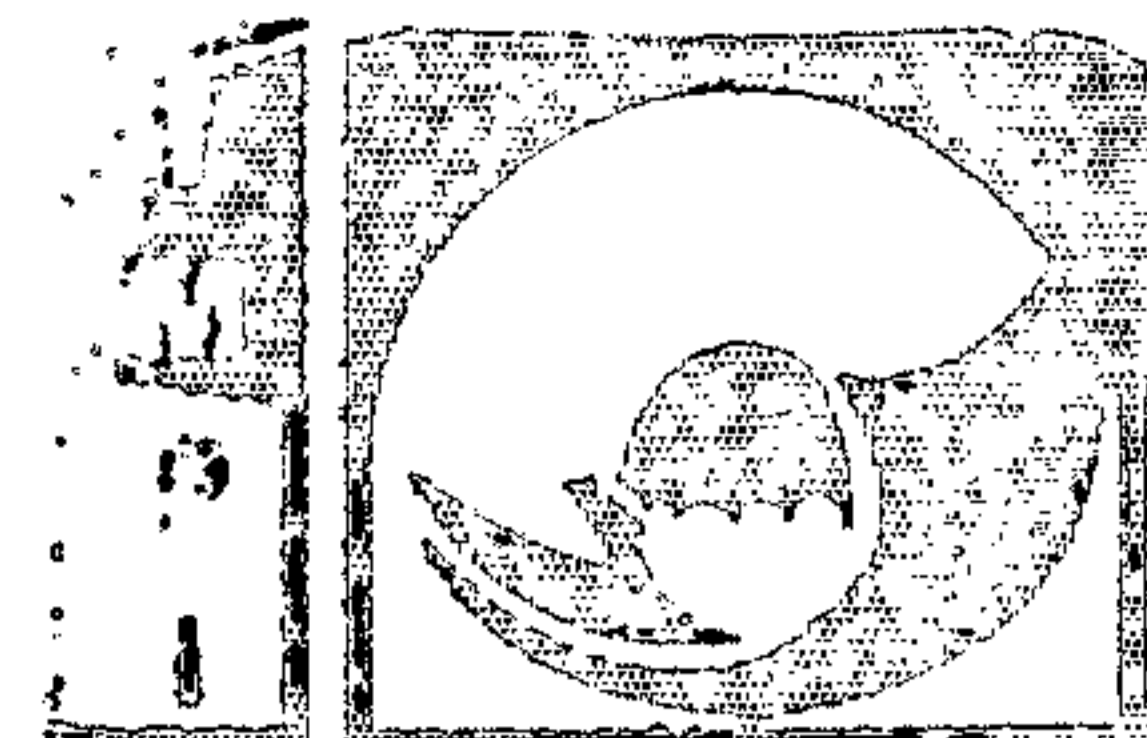
- 5 estar protegidas con grupos lábiles a condiciones ácidas (Ej. *tert*-butilcarbamato; Boc, *tert*-butilo; *t*-Bu) dado su aplicación en síntesis de péptidos en fase sólida. Por otro lado cuando F es  $-CO$ ,  $E^5$  será alquilos de un átomo de carbono hasta veinte, líneas o ramificados, cicloalquilos de tres átomos de carbono hasta ocho, arilos simples o condensados de seis átomos de carbono o derivados funcionalizados de estos conteniendo un grupo amino o alcohol en N' mientras las demás funcionalidades de ligante derivatizadas en N, N'', N''' están protegidas con grupos lábiles a condiciones ácidas. Finalmente cuando F=  $-S$ , el ligante Q tendrá en  $E^5$  una funcionalidad del tipo maleimida en N'.
- 10
- 20



## RESUMEN

En la presente invención se presenta un proceso para la producción de compuestos macrocíclicos tetraaza diprottegidos N, N'' así como los procesos de producción de derivados que se pueden obtener a partir de estos tales como compuestos

5 monofuncionalizados N' y N', N''', bifuncionalizados N' y N'''; N' y N, N'', N'''; y N, N'' y N', N''' y trifuncionalizados N' y N''' y N, N'. Así mismo se presenta un proceso general para la síntesis de aminoácidos derivatizados con ligantes macrocíclicos tetraaza aunque no limitado a estos protegidos en el grupo amino alfa con Fmoc. Finalmente se presenta procesos para la unión de dos péptidos mediante derivados 10 bifuncionales macrocíclico tetraaza y mediante aminoácidos derivatizados con ligantes de estos lo cual permite generar sistemas trifuncionales con metales paramagnéticos o radiactivos para la generación de productos con potencial aplicación médica en diagnóstico y terapia de enfermedades.



Instituto  
Mexicano  
de la Propiedad  
Industrial

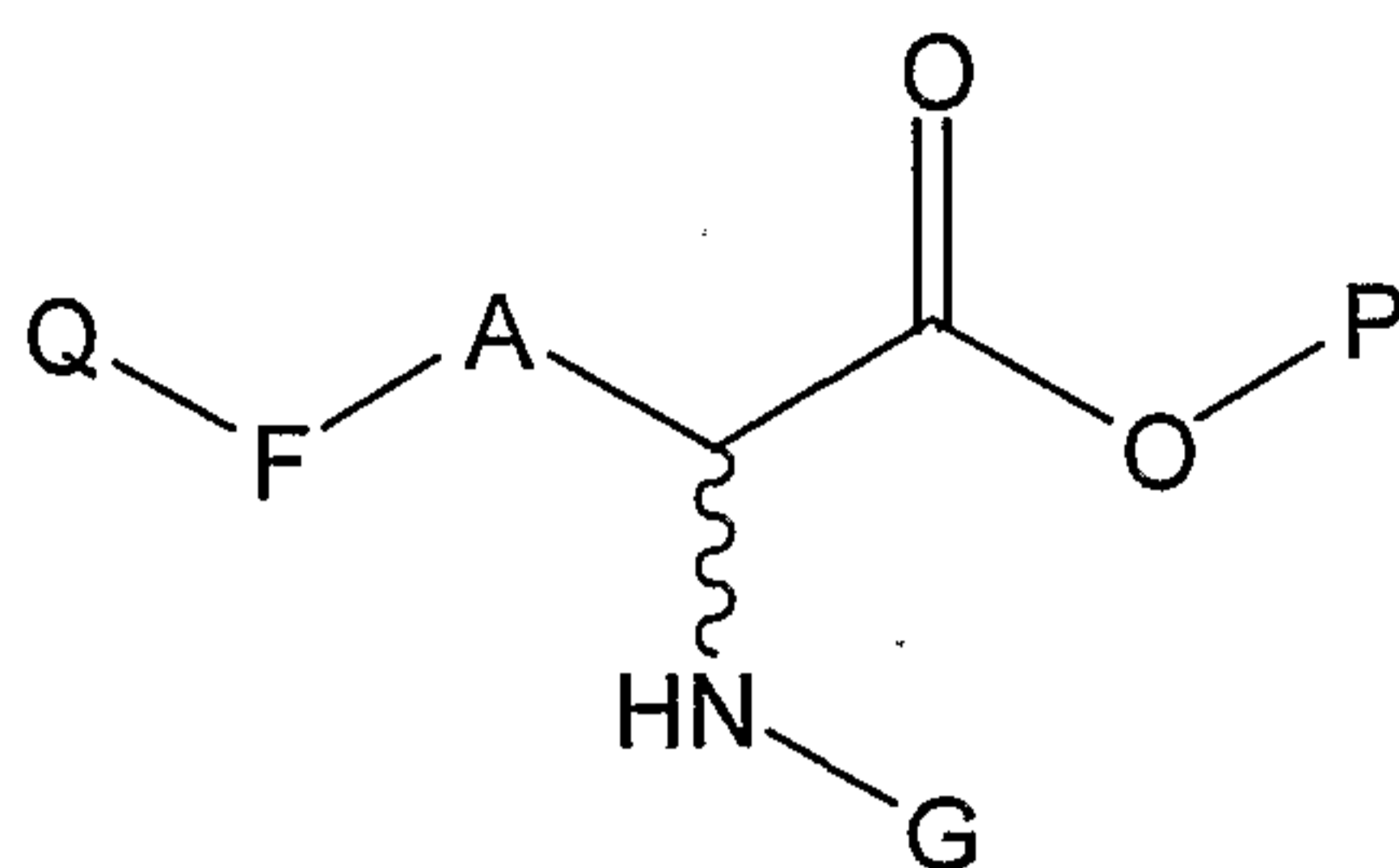


Figura o Fórmula 1

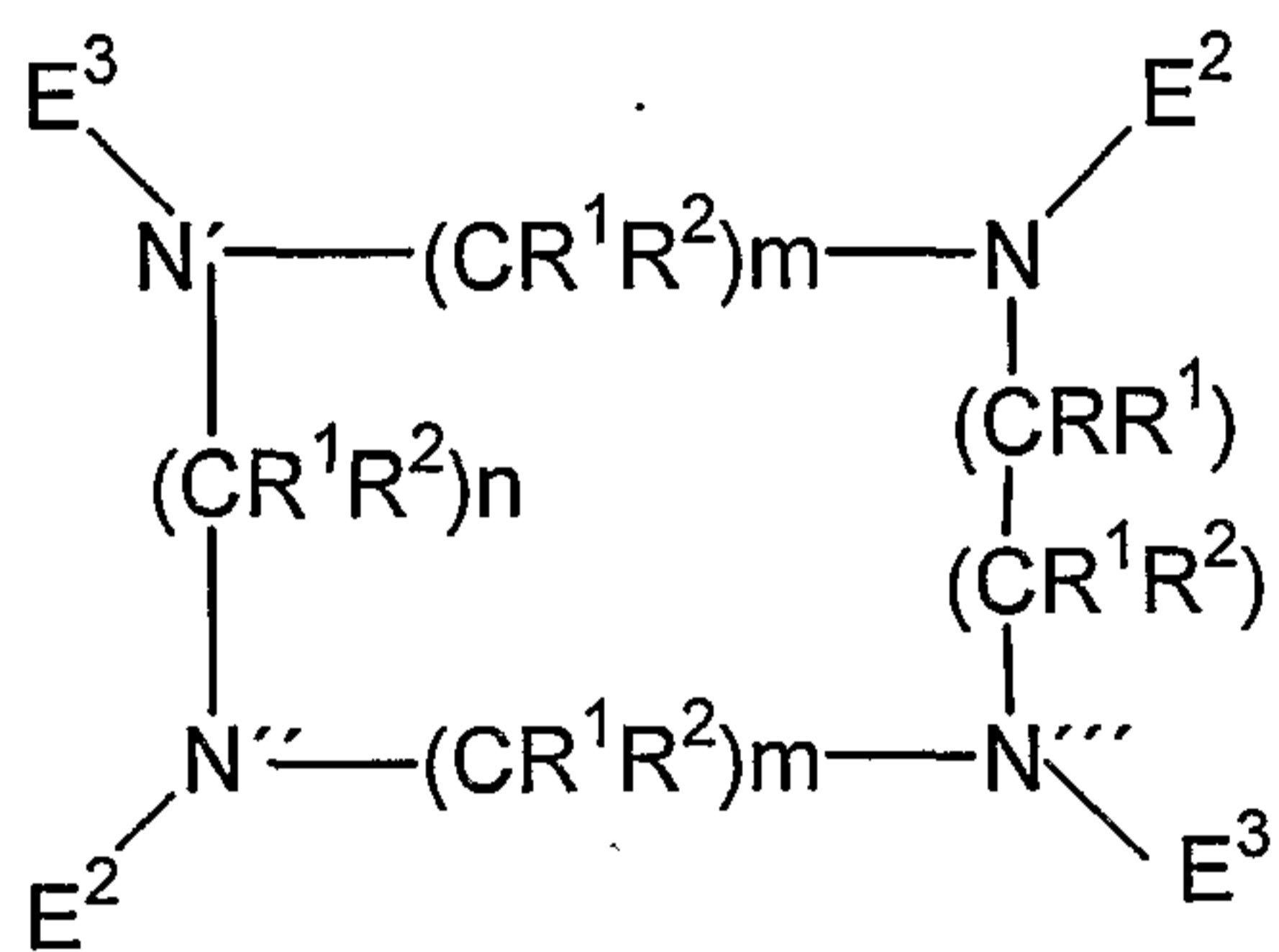


Figura o Fórmula 2

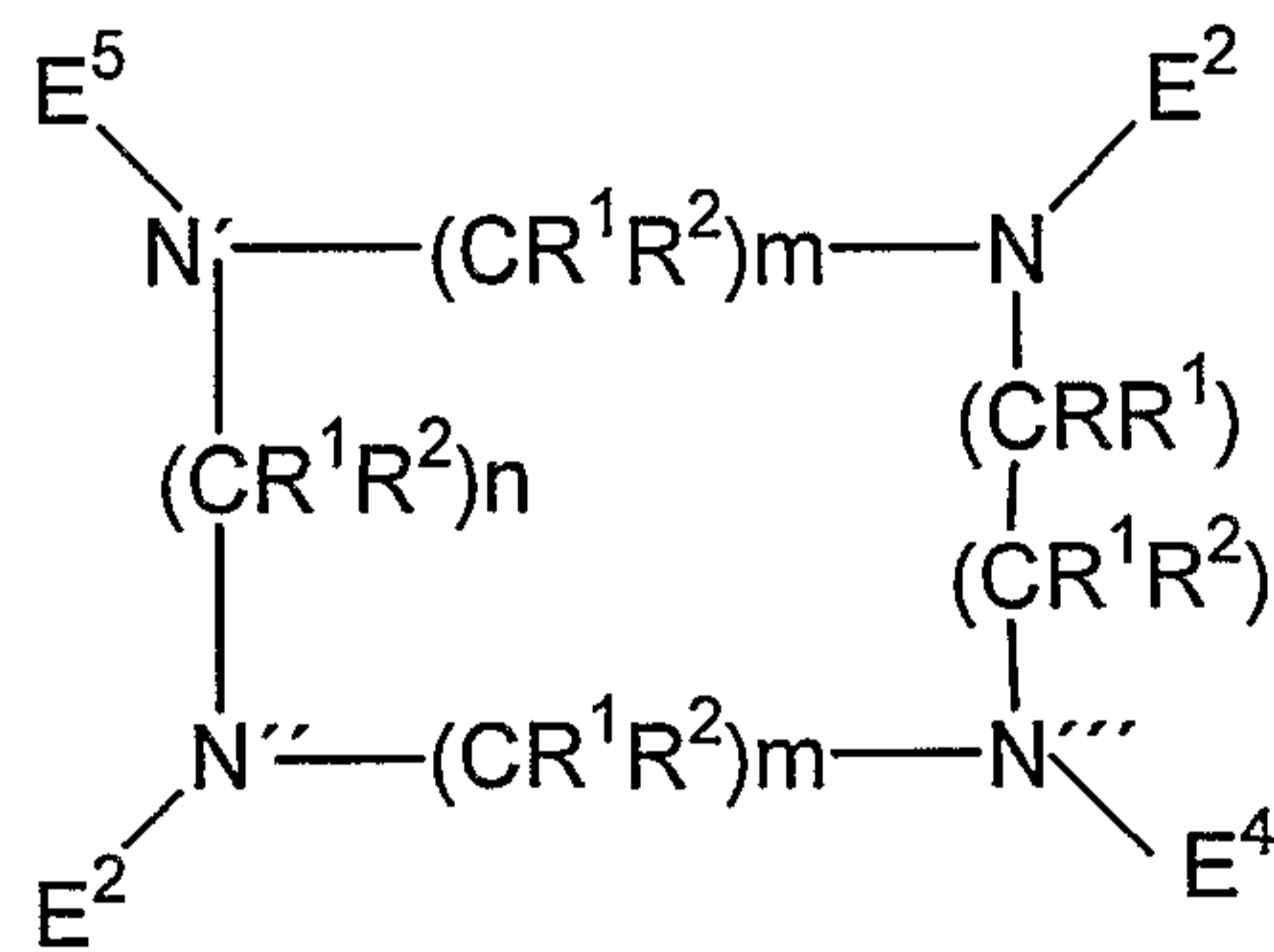


Figura o Fórmula 3

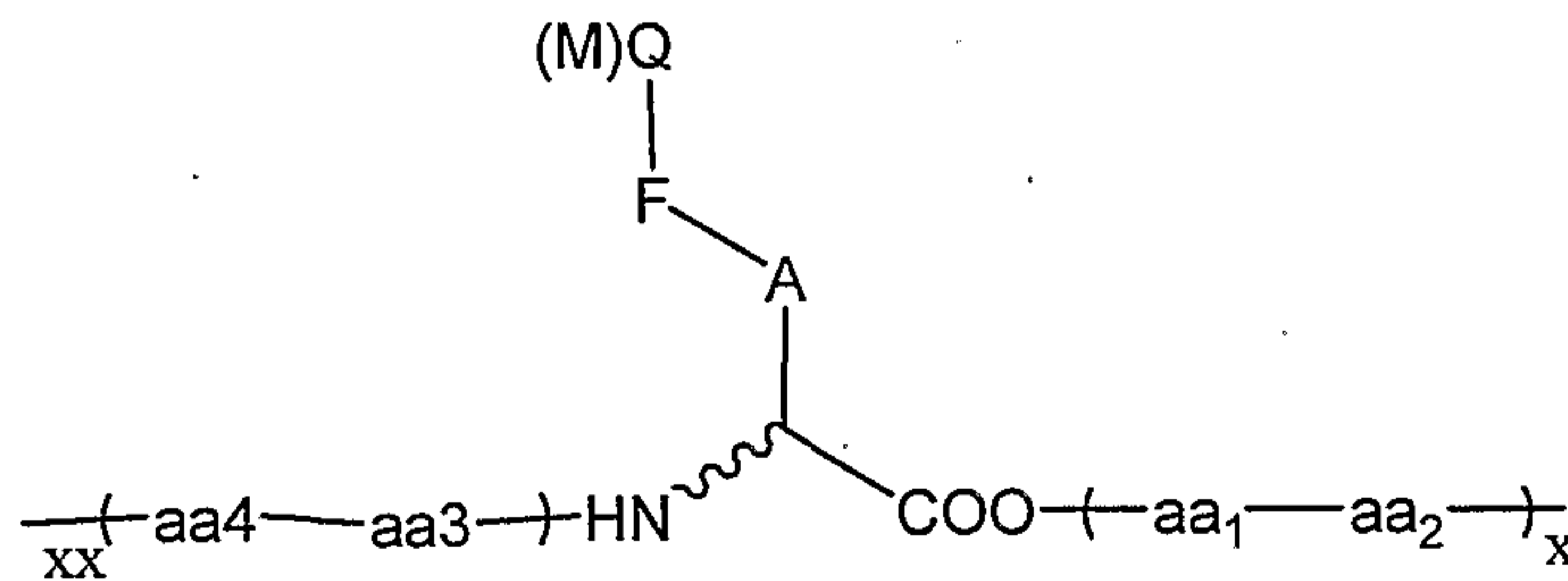


Figura o Fórmula 4