COMPUESTOS PEPTIDOMIMÉTICOS Y SUS CONJUGADOS DE ANTICUERPO–FÁRMACO

REFERENCIA CRUZADA A LAS SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud no provisional presentada bajo 37 CFR §1.53 (b), reivindica el beneficio en virtud de 35 USC §119 (e) de la solicitud provisional US serie N.º 61/916.661 presentada el 16 de diciembre de 2013, y la solicitud provisional US serie N.º 61/916.691 presentada el 16 de diciembre de 2013, todos los cuales se incorporan en la presente como referencia en su totalidad.

LISTADO DE SECUENCIAS

La presente solicitud contiene un listado de secuencias que se ha presentado electrónicamente en formato ASCII y se incorpora en la presente como referencia en su totalidad. Dichas copia ASCII, creada el 12 de diciembre de 2014, se denomina P5760PCT_SL.txt y tiene 35.047 bytes de tamaño.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a nuevos compuestos peptidomiméticos que son útiles como ligadores de los conjugados de anticuerpo–fármaco (ADC). La presente invención también se refiere a ADCs que contienen ligadores de peptidomiméticos. La presente invención también se refiere a métodos de tratamiento de enfermedades en los seres humanos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

El uso de anticuerpos monoclonales (mAbs) para administrar

fármacos anticancerígenos directamente a las células tumorales ha atraído una gran cantidad de atención en los últimos años. Dos nuevos conjugados anticuerpo–fármaco han sido aprobados por la FDA para el tratamiento del cáncer. Adcetris® (Brentuximab vedotina) es un conjugado anticuerpo–fármaco dirigido a CD30 (ADC) indicado para el tratamiento del linfoma de Hodgkin recidivante o refractario y el linfoma de células grandes anaplásico sistémico (LACG). Kadcila® (ado–trastuzumab emtansina), es un nuevo tratamiento aprobado para pacientes con cáncer de mama (metastásica) en última etapa del HER2–positivo. Para obtener una actividad anti–tumor terapéutica tanto potente y el índice terapéutico aceptable en un ADC, se pueden optimizar varios aspectos del diseño. En particular, es bien conocido que la estructura química del ligador puede tener un impacto significativo tanto en la eficacia y la seguridad de ADC (Ducry & Stump, Bioconjugate Chem, 2010, 21, 5–13). La elección del ligador derecho influye en la administración de fármacos adecuada para el compartimiento celular deseado de las células cancerosas. Los ligadores se pueden dividir generalmente en dos categorías: escindibles (tales como el péptido, hidrazona, o disulfuro) o no escindible (tales como tioéter). Los ligadores peptídicos, tales como valina–citrulina (Val–Cit), que se pueden hidrolizar mediante las enzimas lisosómicas (tales como la catepsina B) se han utilizado para conectar el fármaco con el anticuerpo (US6214345). Estos han sido particularmente útiles, debido en parte a su relativa estabilidad en la circulación sistémica y la capacidad de liberar de manera eficiente el fármaco en el tumor. Se ha demostrado que los ADCs que contienen el ligador Val–Cit son relativamente estables in vivo (t1/2 para la liberación del fármaco ~ 7 días (Doronina et al (2008), Bioconjugate Chem., 19, 1960–1963). Sin embargo, el espacio

químico representado por péptidos naturales es limitado, por lo tanto, es deseable tener una variedad de ligadores no peptídicos que actúan como péptidos y pueden escindirse efectivamente mediante las proteasas lisosómicas. La mayor diversidad de estructuras no peptídicas puede producir nuevas propiedades beneficiosas que son provistas por los ligadores peptídicos. En la presente se proporcionan diferentes tipos ligadores no peptídicos para los ADC que puede ser escindido por las enzimas lisosomales.

SÍNTESIS DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a conjugados de anticuerpo–fármaco representados por la fórmula (I)

Ab— (L—D)$_{p,}$

Ab es un anticuerpo;

L es un ligador peptidomimético representado por la siguiente fórmula

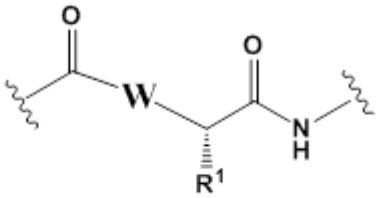
—Str—(PM)—Sp—

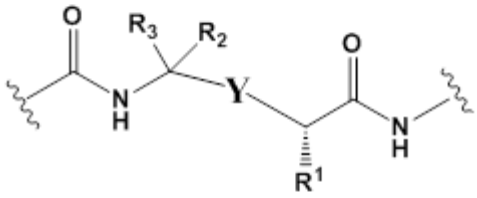
en donde

Str es una unidad extensora covalentemente unida a Ab;

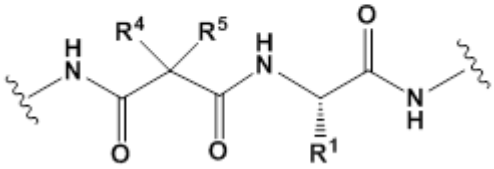
Sp es un enlace o unidad espaciadora covalentemente unida a un resto farmacológico;

PM es un resto químico no peptídico seleccionado del grupo que consiste en:





y



W es –NH–heterocicloalquilo o heterocicloalquilo;

Y es heteroarilo, arilo, –C(O)alquileno C1–C6, alquilen C1–C6–NH_2, alquilen C1–C6–NH–CH_3, alquilen C1–C6–N–$(CH_3)_2$, alquenilo C1–C6 o alquilenilo C1–C6;

cada R^1 es, de modo independiente, alquilo C1–C10, alquenilo C1–C10, (alquil C1–C10)NHC(NH)NH_2 o (alquil C1–C10)NHC(O)NH_2;

R^3 y R^2 son cada uno, de modo independiente, H, alquilo C1–C10, alquenilo C1–C10, arilalquilo o heteroarilalquilo o R^3 y R^2 pueden formar juntos un cicloalquilo C3–C7;

R^4 y R^5 son cada uno, de modo independiente, alquilo C1–C10, alquenilo C1–C10, arilalquilo, heteroarilalquilo, (alquil C1–C10)OCH_2– o R^4 y R^5 pueden formar un anillo cicloalquilo C3–C7;

p es un número entero de 1 a 8;

D es un resto farmacológico.

La presente invención también se refiere a composiciones

farmacéuticas de los conjugados de anticuerpo–fármaco de la fórmula (I).

La presente invención también se refiere a un método de tratar cáncer, uso de los conjugados de anticuerpo–fármaco de la fórmula (I) en la terapia, y el uso de los compuestos de la fórmula (I) en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cáncer.

La presente invención también se refiere un método de preparar los conjugados de anticuerpo–fármaco de la fórmula (I).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra la comparación de eficacia de los ADCC CD33 (CD33 CBI–PBD ADC_3–2 y ADC2–2) en los ratones SCID con tumores de leucemia mieloide aguda humana HL–60.

La Figura 2 muestra la comparación de eficacia de los ADCC NaPi2b NaPi2b CBI–PBD ADC2–1 y ADC_3–1) en ratones beige SCID– con tumores ováricos humanos OVCAR3X2.1.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

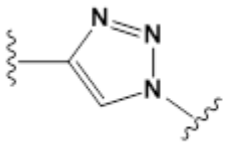
En la presente se describen diferentes tipos de ligadores no peptídicos para ADC que son escindibles mediante enzimas lisosomales. Por ejemplo, el enlace amida en el medio de un dipéptido (por ejemplo, Val–Cit) fue reemplazado con un mimético de amida; y/o aminoácido entero (por ejemplo, aminoácido valina en dipéptido Val–Cit) se reemplazó con un resto no aminoácido (por ejemplo, estructuras de cicloalquil dicarbonilo (por ejemplo, tamaño del anillo = 4 o 5)).

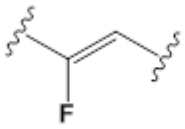
La presente invención se refiere a conjugados de anticuerpo–fármaco de la fórmula (I).

La presente invención también se refiere a conjugados de

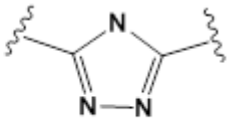
anticuerpo–fármaco de la fórmula (I), en donde Y es heteroarilo; R^4 y R^5 forman juntos un anillo ciclobutilo.

La presente invención también se refiere a conjugados de anticuerpo–fármaco de la fórmula (I), en donde Y es un resto seleccionado del grupo que consiste en



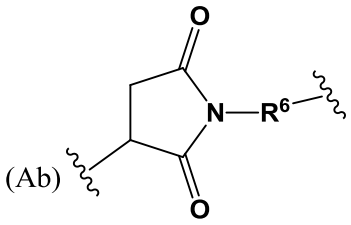


y



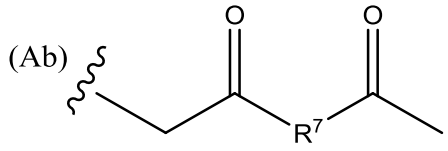
La presente invención también se refiere a conjugados de anticuerpo–fármaco de la fórmula (I), en donde

Str es un resto químico representado por la siguiente fórmula:



en donde R^6 se selecciona del grupo que consiste en alquileno C1–C10, alquenilo C1–C10, cicloalquilo C3–C8, (alquilen C1–C8)O– y alquilen C1–C10–C(O)N(R^a)–alquileno C2–C6, donde cada alquileno puede estar sustituido con uno a cinco sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halo, trifluorometilo, difluorometilo, amino, alquilamino, ciano, sulfonilo, sulfonamida, sulfóxido, hidroxi, alcoxi, éster, ácido carboxílico, alquiltioarilo, cicloalquilo C3–C8, heterocicloalquilo C4–C7, arilo, arilalquilo, heteroarilalquilo y heteroarilo, cada R^a es, de modo independiente, H o alquilo C1–C6; Sp es —Ar—R^b—, en donde Ar es arilo o heteroarilo, R^b es (alquilen C1–C10)O–.

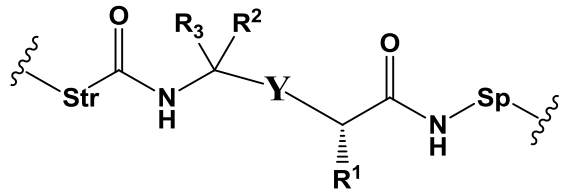
La presente invención también se refiere a conjugados de anticuerpo–fármaco de la fórmula (I), en donde Str tiene la fórmula:



en donde R^7 se selecciona de alquileno C1–C10, alquenilo C1–C10, (alquilen C1–C10)O–, N(R^c)–(alquilen C2–C6)–N(R^c) y N(R^c)–(alquileno C2–C6); donde cada R^c es, de modo independiente, H o alquilo C1–C6; Sp es —Ar—R^b—, en donde Ar es arilo o heteroarilo, R^b es (alquilen C1–C10)O– o Sp –alquilen C1–C6–C(O)NH–.

La presente invención también se refiere a conjugados de anticuerpo–fármaco de la fórmula (I),

en donde Ab es un anticuerpo; L es resto químico no peptídico representado por la siguiente fórmula



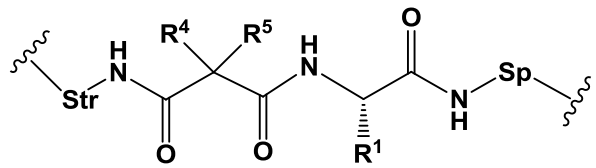
R^1 es alquilo C1–C6, alquenilo C1–C6, (alquil C1–C6)NHC(NH)NH_2 o (alquil C1–C6)NHC(O)NH_2;

R^3 y R^2 son cada uno, de modo independiente, H o alquilo C1–C10.

La presente invención también se refiere a conjugados de anticuerpo–fármaco de la fórmula (I),

en donde Ab es un anticuerpo;

L es resto químico no peptídico representado por la siguiente fórmula



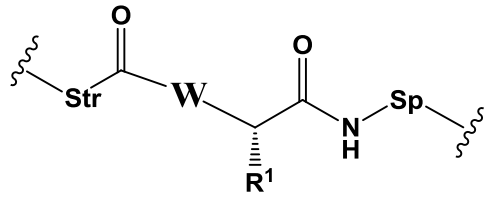
R^1 es alquilo C1–C6, (alquil C1–C6)NHC(NH)NH_2 o (alquil C1–C6)NHC(O)NH_2;

R^4 y R^5 forman juntos un anillo cicloalquilo C3–C7.

La presente invención también se refiere a conjugados de anticuerpo–fármaco de la fórmula (I),

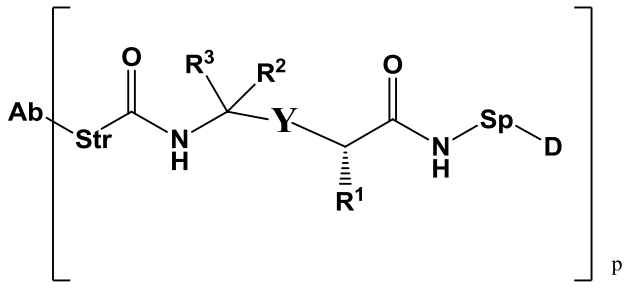
en donde Ab es un anticuerpo;

L es resto químico no peptídico representado por la siguiente fórmula



R^1 es alquilo C1–C6, (alquil C1–C6)NHC(NH)NH_2 o (alquil C1–C6)NHC(O)NH_2.

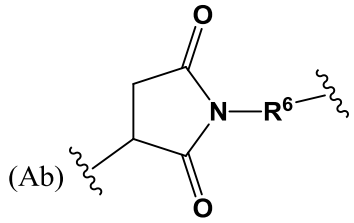
La presente invención también se refiere a conjugados de anticuerpo–fármaco de la fórmula (I), que están representados por la siguiente fórmula



(I)(A1)

en donde

Str es un resto químico representado por la siguiente fórmula:

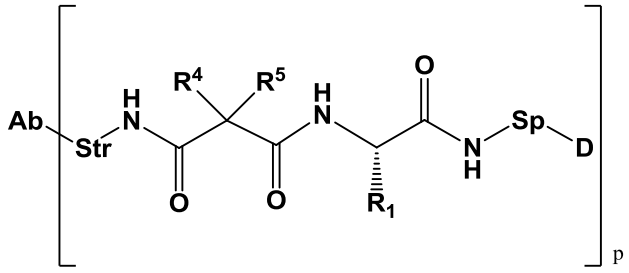


en donde R^6 se selecciona del grupo que consiste en alquileno C1–C10 y alquilen C1–C10–C(O)N(R^a)–alquileno C2–C6, donde cada alquileno puede estar sustituido con uno a cinco sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halo, trifluorometilo, difluorometilo, amino,

alquilamino, ciano, sulfonilo, sulfonamida, sulfóxido, hidroxi, alcoxi, éster, ácido carboxílico, alquiltioarilo, cicloalquilo C3–C8, heterocicloalquilo C4–C7, arilo, arilalquilo, heteroarilalquilo y heteroarilo, cada R^a es, de modo independiente, H o alquilo C1–C6;

p es 1, 2, 3 ó 4.

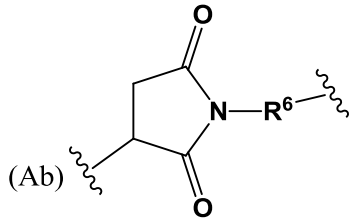
La presente invención también se refiere a conjugados de anticuerpo–fármaco de la fórmula (I) representado por la siguiente fórmula:



(I)(B1)

en donde

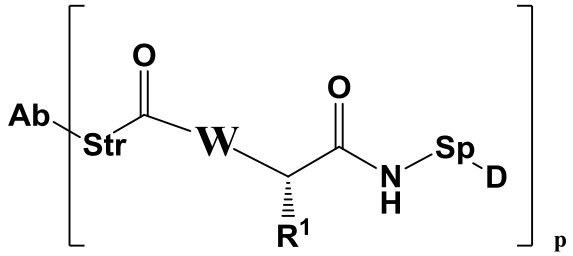
Str es un resto químico representado por la siguiente fórmula:



en donde R^6 se selecciona del grupo que consiste en alquileno C1–C10 y alquilen C1–C10–C(O)N(R^a)–alquileno C2–C6, donde cada alquileno puede estar sustituido con uno a cinco sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halo, trifluorometilo, difluorometilo, amino, alquilamino, ciano, sulfonilo, sulfonamida, sulfóxido, hidroxi, alcoxi, éster, ácido carboxílico, alquiltioarilo, cicloalquilo C3–C8, heterocicloalquilo C4–C7, arilo, arilalquilo, heteroarilalquilo y heteroarilo, cada R^a es, de modo independiente, H o alquilo C1–C6;

p es 1, 2, 3 ó 4.

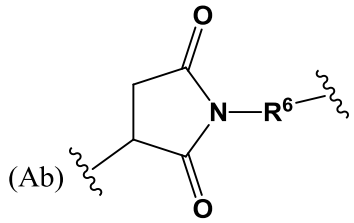
La presente invención también se refiere a conjugados de anticuerpo–fármaco de la fórmula (I) representado por la siguiente fórmula:



(I)(C1)

en donde

Str es un resto químico representado por la siguiente fórmula:

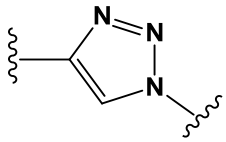


en donde R^6 se selecciona del grupo que consiste en alquileno C1–C10 y alquilen C1–C10–C(O)N(R^a)–alquileno C2–C6, donde cada alquileno puede estar sustituido con uno a cinco sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halo, trifluorometilo, difluorometilo, amino, alquilamino, ciano, sulfonilo, sulfonamida, sulfóxido, hidroxi, alcoxi, éster, ácido carboxílico, alquiltioarilo, cicloalquilo C3–C8, heterocicloalquilo C4–C7, arilo, arilalquilo, heteroarilalquilo y heteroarilo, cada R^a es, de modo independiente, H o alquilo C1–C6;

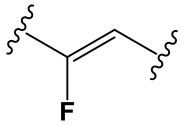
p es 1, 2, 3 ó 4.

La presente invención también se refiere a cualquiera de los conjugados de anticuerpo anteriores, en donde Y es heteroarilo, arilo o alquenilo; R^6 es alquileno C1–C10.

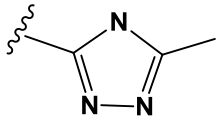
La presente invención también se refiere a cualquiera de los conjugados de anticuerpo anteriores (I) y (I)(A1), en donde Y es



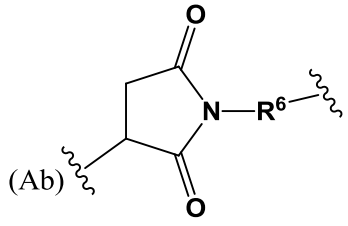
La presente invención también se refiere a cualquiera de los conjugados de anticuerpo anteriores (I) y (I)(A1), en donde Y es



La presente invención también se refiere a cualquiera de los conjugados de anticuerpo anteriores (I) y (I)(A1), en donde Y es



La presente invención también se refiere a cualquiera de los conjugados de anticuerpo anteriores (I)(A1), (I)(B1) y (I)(C1), en donde Str es un resto químico representado por la siguiente fórmula:

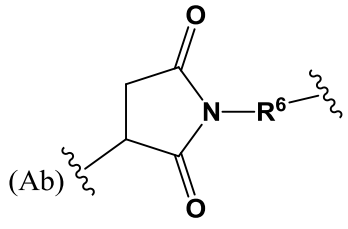


,

R^6 es alquileno C1–C6 que puede estar sustituido con 1–3 grupos seleccionados de arilo y heteroarilo;

Sp es –alquilen C1–C6–C(O)NH– o —Ar—R^b—, donde Ar es arilo, R^b es (alquilen C1–C3)O–.

La presente invención también se refiere a cualquiera de los conjugados de anticuerpo anteriores (I)(A1), (I)(B1) y (I)(C1), en donde Str es un resto químico representado por la siguiente fórmula:

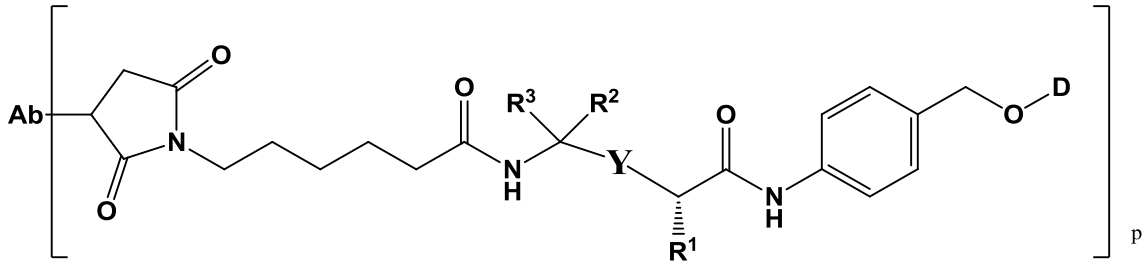


,

R^6 es alquileno C1–C6 que puede estar sustituido con 1–3 grupos seleccionados de arilo y heteroarilo;

Sp es –alquilen C1–C6–C(O)NH–.

La presente invención también se refiere a cualquiera de los conjugados de anticuerpo anteriores (I) y (I)(A1), representado por la siguiente fórmula:



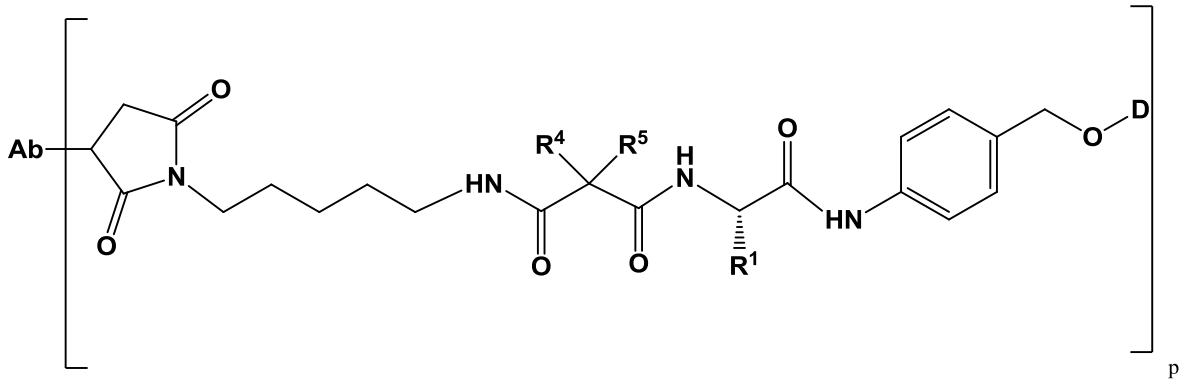
(I)(A2)

en donde

R^1 es alquil C1–C6–NH_2, (alquil C1–C6)NHC(NH)NH_2 o (alquil C1–C6)NHC(O)NH_2

p es 1, 2, 3 ó 4.

La presente invención también se refiere a cualquiera de los conjugados de anticuerpo anteriores (I) y (I)(B1), representado por la siguiente fórmula:



(I)(B2)

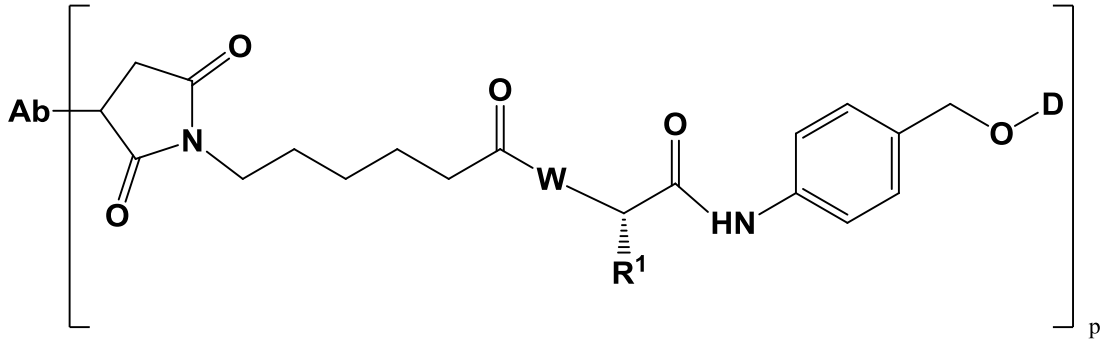
en donde

p es 1, 2, 3 ó 4;

R^1 es alquil C1–C6–NH_2, (alquil C1–C6)NHC(NH)NH_2 o (alquil C1–C6)NHC(O)NH_2;

R^4 y R^5 son cada uno, de modo independiente, alquilo C1–C6, en donde dicho alquilo no está sustituido o R^4 y R^5 pueden formar un anillo cicloalquilo C3–C7.

La presente invención también se refiere a cualquiera de los conjugados de anticuerpo anteriores (I) y (I)(C1), representado por la siguiente fórmula:



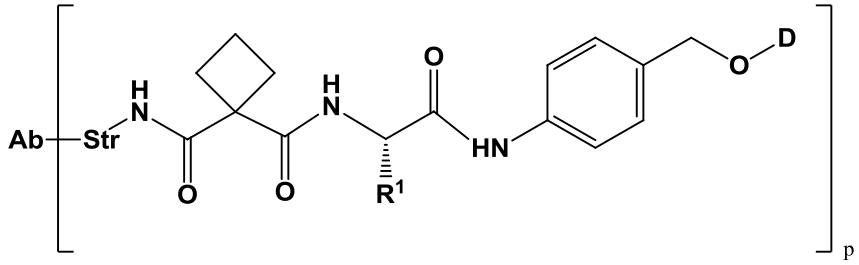
(I)(C2)

en donde

p es 1, 2, 3 ó 4;

R^1 es alquil C1–C6–NH_2, (alquil C1–C6)NHC(NH)NH_2 o (alquil C1–C6)NHC(O)NH_2.

La presente invención también se refiere a conjugados de anticuerpo de (I), que están representados por la siguiente fórmula:



(I)(B3)

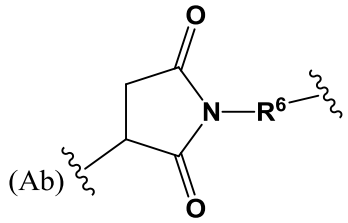
en donde

p es 1, 2, 3 ó 4;

R^1 es alquil C1–C6–NH_2, (alquil C1–C6)NHC(NH)NH_2 o (alquil C1–C6)NHC(O)NH_2;

La presente invención también se refiere a conjugados de anticuerpo–fármaco de (I)(B3), en donde

Str es un resto químico representado por la siguiente fórmula:



,

R^6 es alquileno C1–C6 que puede estar sustituido con 1–3 grupos seleccionados de arilo y heteroarilo;

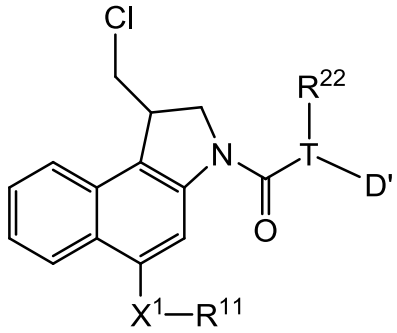
La presente invención también se refiere a conjugados de anticuerpo–fármaco de (I)(B3), en donde R^1 es $(CH_2)_3NHC(O)NH_2$.

La presente invención también se refiere a conjugados de anticuerpo–fármaco de (I)(B3), en donde R^1 es $(CH_2)_4NH_2$.

La presente invención también se refiere a conjugados de

anticuerpo–fármaco de (I), (I)(B1), (I)(B2) y (I)(B3), en donde R^1 es (alquil C1–C6)$NHC(NH)NH_2$.

La presente invención también se refiere a cualquiera de los anteriores conjugados de anticuerpo–fármaco, en donde D es el resto farmacológico dimérico que tiene la fórmula:



en donde

R^{11} se selecciona de H, $P(O)_3H_2$, $C(O)NR^{aa}R^{bb}$ o un enlace con L;

R^{22} se selecciona de H, $P(O)_3H_2$, $C(O)NR^{aa}R^{bb}$ o un enlace con L;

R^{aa} y R^{bb} se seleccionan, de modo independiente, de H y alquilo C1–C6 opcionalmente sustituido con uno o varios F,

o R^{aa} y R^{bb} forman un grupo heterocicloalquilo de cinco o seis miembros;

T es un grupo de traba seleccionado de alquileno C3–C12, Y^1, (alquilen C1–C6)– Y^1–(alquileno C1–C6), (alquilen C1–C6)– Y^1–(alquilen C1–C6)– Y^1–(alquileno C1–C6), (alquenilen C2–C6)–Y^1–(alquenileno C2–C6) y (alquinilen C2–C6)–Y^1–(alquinileno C2–C6);

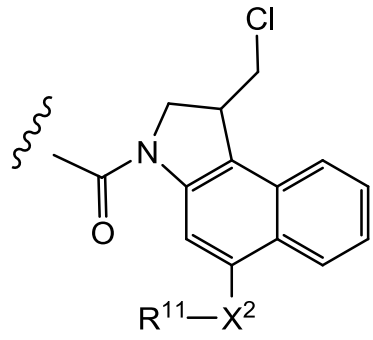
donde Y^1 se selecciona, de modo independiente, de O, S, NR^{11}, arilo y heteroarilo;

donde alquileno, alquenileno, arilo y heteroarilo están independiente y opcionalmente sustituidos con F, OH, O(alquilo C1–C6), NH_2, $NHCH_3$, $N(CH_3)_2$, $NHC(O)(alquileno\ C1–C6)_m$, $OP(O)_3H_2$ y alquilo C1–C6, donde alquilo está opcionalmente sustituido con uno o varios F, m es 0 ó 1;

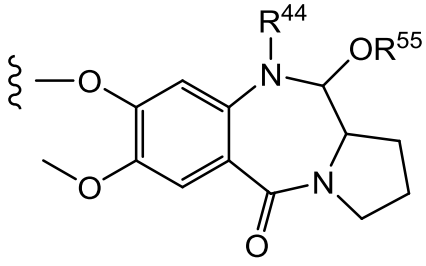
o alquileno, alquenileno, arilo y heteroarilo están independiente y opcionalmente sustituidos con un enlace con L, en donde el enlace con L

se puede conectar a través de uno de los sustituyentes opcionales;

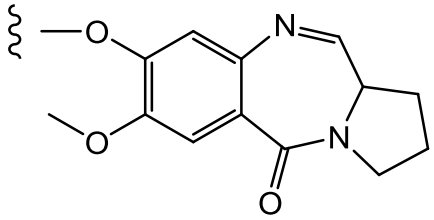
D' es un resto farmacológico seleccionado de:



,



, y



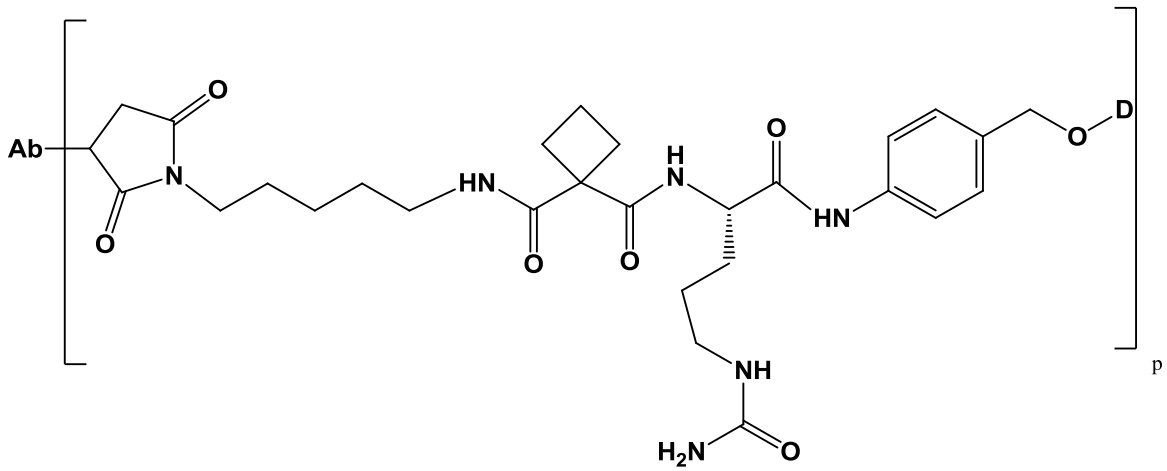
donde la línea ondulada indica el sitio de unión con T;

X^1 y X^2 se seleccionan, de modo independiente, de O y NR^{33}, donde R^{33} se selecciona de H, C(O) y alquilo C1–C6 opcionalmente sustituido con uno o varios F o X^1 y X^2 están cada uno, de modo independiente, ausentes;

R^{44} es H, CO_2R, C(O) o un enlace con L, donde R es alquilo C1–C6 o bencilo; y

R^{55} es H o alquilo C1–C6.

La presente invención también se refiere a conjugados de anticuerpo–fármaco de la fórmula (I), que están representados por la siguiente fórmula:



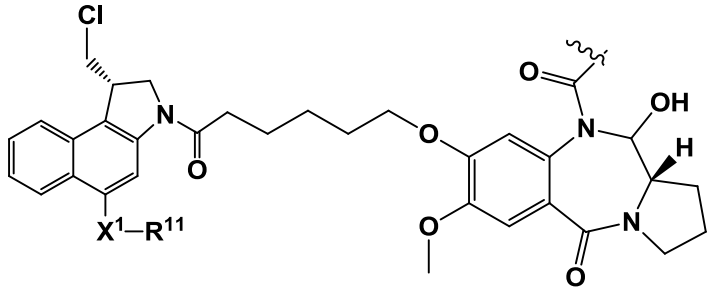
(I)(B4)

en donde

Ab es un anticuerpo que se une con un blanco seleccionado de Her2, CLL1, CD33, CD22 y NaPi2b;

P es 1–4;

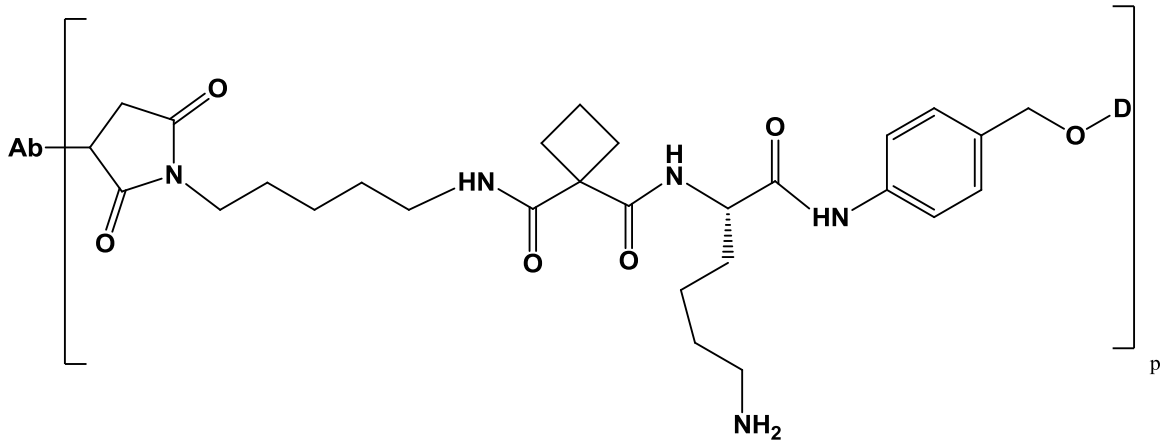
D es



X^1 está ausente u O;

R^{11} es C(O)N–piperazin(CH_3) o $P(O)_3H_2$.

La presente invención también se refiere a conjugados de anticuerpo–fármaco de la fórmula (I), que están representados por la siguiente fórmula:



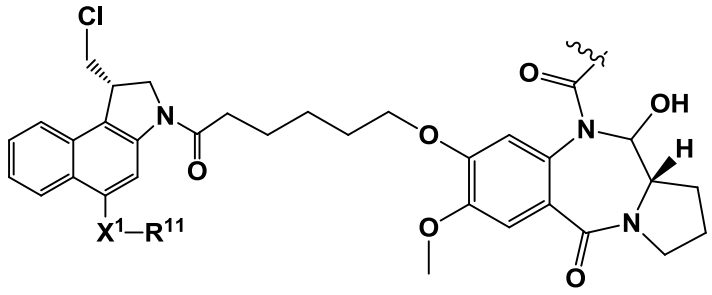
(I)(B5)

en donde

Ab es un anticuerpo que se une con un blanco seleccionado de Her2, CLL1, CD33, CD22 y NaPi2b;

P es 1–4;

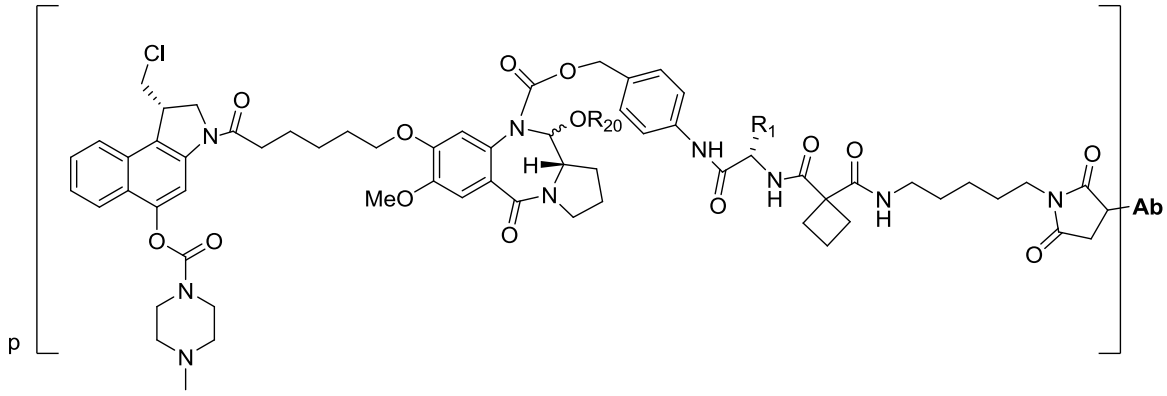
D es



X^1 está ausente u O;

R^{11} es C(O)N–piperazin(CH_3) o $P(O)_3H_2$.

La presente invención también se refiere a conjugados de anticuerpo–fármaco de la fórmula (I), que están representados por la siguiente fórmula:



(I)(B6)

en donde

Ab es un anticuerpo que se une con un blanco seleccionado de Her2, CLL1, CD33, CD22 y NaPi2b;

P es 1–4; y

R^1 es alquil C1–C6–NH_2, (alquil C1–C6)NHC(NH)NH_2 o (alquil C1–C6)NHC(O)NH_2;

R^{20} es H o Me;

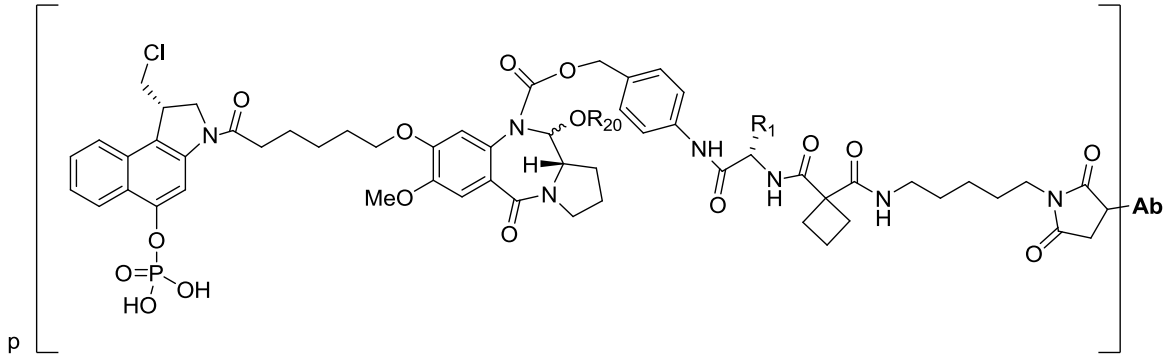
La presente invención también se refiere a conjugados de anticuerpo–fármaco de la fórmula (I)(B6), en donde

R^{20} es H, R^1 es $(CH_2)_4NH_2$.

La presente invención también se refiere a conjugados de anticuerpo–fármaco de la fórmula (I)(B6), en donde

R^{20} es Me, R^1 es $(CH_2)_4NH_2$.

La presente invención también se refiere a conjugados de anticuerpo–fármaco de la fórmula (I), que están representados por la siguiente fórmula:



(I)(B7)

en donde

Ab es un anticuerpo que se une con un blanco seleccionado de Her2, CLL1, CD33, CD22 y NaPi2b;

P es 1–4;

R^1 es alquil C1–C6–NH_2, (alquil C1–C6)NHC(NH)NH_2 o (alquil C1–C6)NHC(O)NH_2;

R^{20} es H o Me;

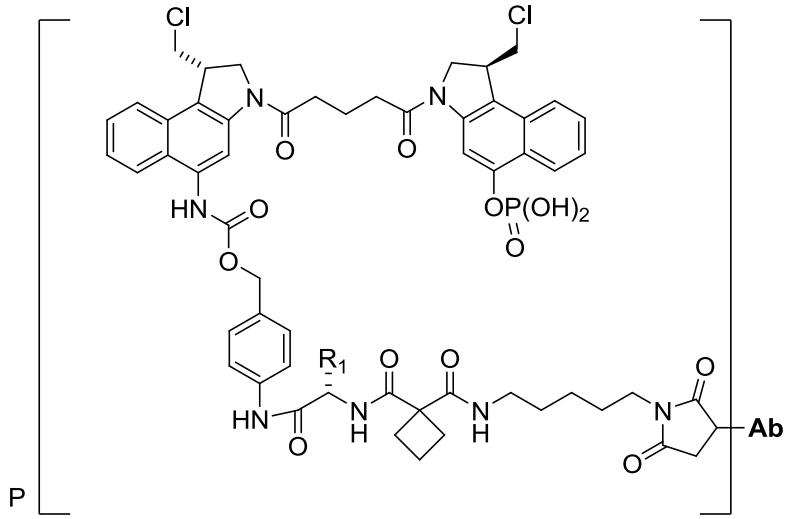
La presente invención también se refiere a conjugados de anticuerpo–fármaco de la fórmula (I)(B7), en donde

R^{20} es H, R^1 es $(CH_2)_4NH_2$.

La presente invención también se refiere a conjugados de anticuerpo–fármaco de la fórmula (I)(B7), en donde

R^{20} es Me, R^1 es $(CH_2)_4NH_2$.

La presente invención también se refiere a conjugados de anticuerpo–fármaco de la fórmula (I), que están representados por la siguiente fórmula:



(I)(B8)

en donde

Ab es un anticuerpo que se une con un blanco seleccionado de Her2, CLL1, CD33, CD22 y NaPi2b;

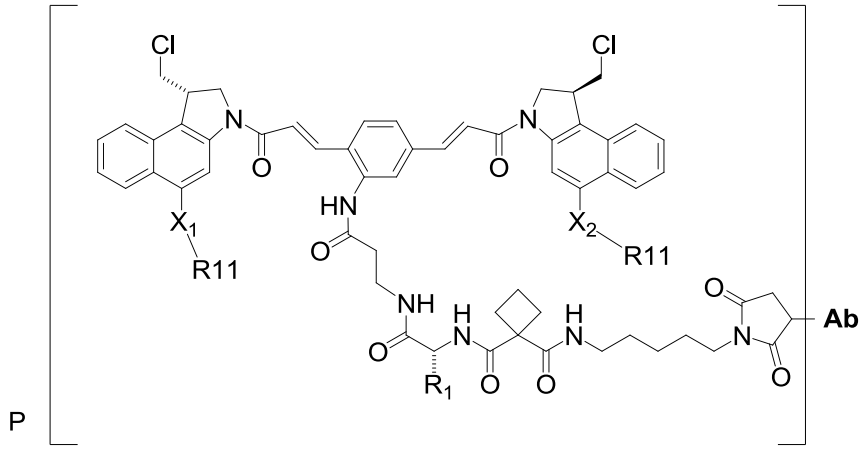
P es 1–4; y

R^1 es alquil C1–C6–NH_2, (alquil C1–C6)NHC(NH)NH_2 o (alquil C1–C6)NHC(O)NH_2;

La presente invención también se refiere a conjugados de anticuerpo–fármaco de la fórmula (I)(B8), en donde

R^1 es $(CH_2)_4NH_2$.

La presente invención también se refiere a conjugados de anticuerpo–fármaco de la fórmula (I), que están representados por la siguiente fórmula:



(I)(B9)

en donde

Ab es un anticuerpo que se une con un blanco seleccionado de Her2, CLL1, CD33, CD22 y NaPi2b;

P es 1–4;

R^1 es alquil C1–C6–NH_2, (alquil C1–C6)NHC(NH)NH_2 o (alquil C1–C6)NHC(O)NH_2;

X^1 y X^2 están cada uno, de modo independiente, ausentes u O;

cada R^{11} es, de modo independiente, C(O)N–piperazin(CH_3) o $P(O)_3H_2$.

La presente invención también se refiere a conjugados de anticuerpo–fármaco de la fórmula (I)(B9), en donde

X^1 está ausente, R^{11} is $P(O)_3H_2$, R^1 es $(CH_2)_4NH_2$.

La presente invención también se refiere a cualquiera de los anteriores conjugados de anticuerpo–fármaco de la fórmula (I)(B6), (I)(B7), (I)(B8) y (I)(B9), en donde Ab es un anticuerpo que se une con Her2.

La presente invención también se refiere a cualquiera de los anteriores conjugados de anticuerpo–fármaco de la fórmula (I)(B6), (I)(B7), (I)(B8) y (I)(B9), en donde Ab es un anticuerpo que se une con CLL1.

La presente invención también se refiere a cualquiera de los

anteriores conjugados de anticuerpo–fármaco de la fórmula (I)(B6), (I)(B7), (I)(B8) y (I)(B9), en donde Ab es un anticuerpo que se une con CD33.

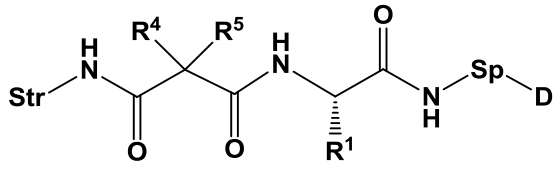
La presente invención también se refiere a cualquiera de los anteriores conjugados de anticuerpo–fármaco de la fórmula (I)(B6), (I)(B7), (I)(B8) y (I)(B9), en donde Ab es un anticuerpo que se une con CD22.

La presente invención también se refiere a cualquiera de los anteriores conjugados de anticuerpo–fármaco de la fórmula (I)(B6), (I)(B7), (I)(B8) y (I)(B9), en donde Ab es un anticuerpo que se une con NaPi2b.

La presente invención también se refiere a cualquiera de los anteriores conjugados de anticuerpo–fármaco, en donde

donde Y^1 es fenilo que está opcionalmente sustituido con F, OH, O(alquilo C1–C6), NH_2, $NHCH_3$, $N(CH_3)_2$, $NHC(O)(alquileno\ C1–C6)_m$, $OP(O)_3H_2$ y alquilo C1–C6, donde alquilo está opcionalmente sustituido con uno o varios F, m es 0 ó 1.

La presente invención también se refiere a compuestos no peptídicos de la fórmula (I)(B)(LD1):



(I)(B)(LD1)

en donde

Str es una unidad extensora que puede estar covalentemente unida a un anticuerpo;

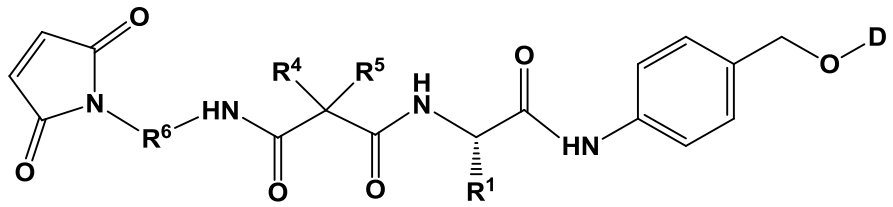
Sp es un enlace o una unidad espaciadora covalentemente unida a un resto farmacológico;

R^1 es alquilo C1–C10, (alquil C1–C10)NHC(NH)NH_2 o (alquil C1–C10)NHC(O)NH_2;

R^4 y R^5 son cada uno, de modo independiente, alquilo C1–C10, arilalquilo, heteroarilalquilo, (alquil C1–C10)OCH_2– o R^4 y R^5 pueden formar un anillo cicloalquilo C3–C7;

D es un resto farmacológico.

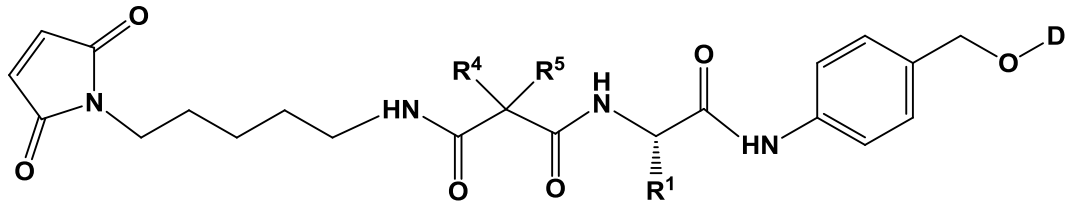
La presente invención también se refiere a compuestos no peptídicos representados por la siguiente fórmula



(I)(B)(LD2)

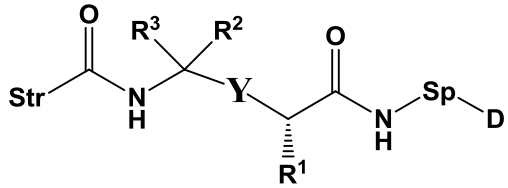
en donde R_6 es alquileno C1–C10; R^4 y R^5 forman juntos un anillo cicloalquilo C3–C7.

La presente invención también se refiere a compuestos no peptídicos representados por la siguiente fórmula



(I)(B)(LD3)

La presente invención también se refiere a compuestos no peptídicos de la fórmula:



(I)(A)(LD1)

en donde

Str es una unidad extensora que puede estar covalentemente unida a un anticuerpo;

Sp es una unidad espaciadora opcional covalentemente unida a un resto farmacológico;

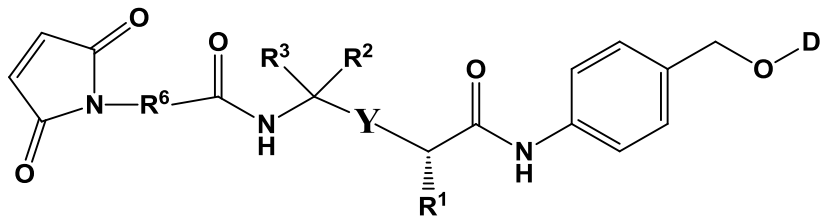
Y es heteroarilo, arilo, –C(O)alquileno C1–C6, alquilen C1–C6–NH_2, alquilen C1–C6–NH–CH_3, alquilen C1–C6–N–$(CH_3)_2$, alquenilo C1–C6 o alquilenilo C1–C6;

R^1 es alquilo C1–C10, (alquil C1–C10)NHC(NH)NH_2 o (alquil C1–C10)NHC(O)NH_2;

R^3 y R^2 son cada uno, de modo independiente, H, alquilo C1–C10, arilalquilo o heteroarilalquilo o R^3 y R^2 pueden formar juntos un cicloalquilo C3–C7;

D es un resto farmacológico.

La presente invención también se refiere a compuestos no peptídicos representados por la siguiente fórmula:

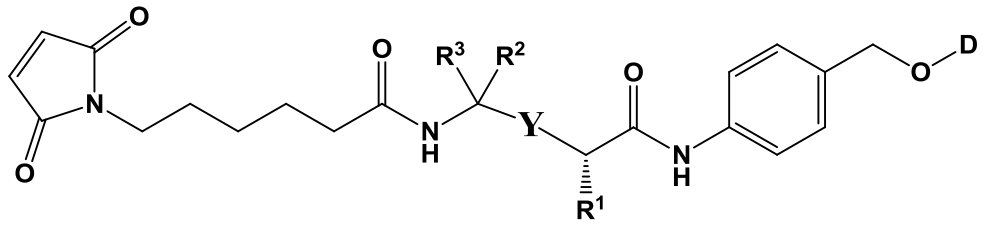


(I)(A)(LD2)

en donde

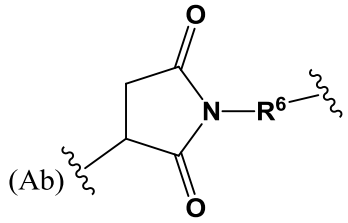
R_6 es alquileno C1–C10.

La presente invención también se refiere a compuestos no peptídicos representados por la siguiente fórmula:



(I)(A)(LD3)

La presente invención también se refiere a cualquiera de los anteriores compuestos no peptídicos, en donde Str tiene la siguiente fórmula:



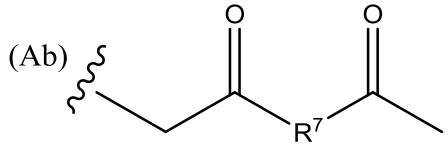
en donde R^6 se selecciona del grupo que consiste en alquileno C1–C10, cicloalquilo C3–C8, O–(alquileno C1–C8) y alquilen C1–C10–C(O)N(R^a)–alquileno C2–C6, donde cada alquileno puede estar sustituido con uno a cinco sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halo, trifluorometilo, difluorometilo, amino, alquilamino, ciano, sulfonilo, sulfonamida, sulfóxido, hidroxi, alcoxi, éster, ácido carboxílico, alquiltioarilo, cicloalquilo C3–C8, heterocicloalquil C4–C7–arilo, arilalquilo, heteroarilalquilo y heteroarilo; cada R^a es, de modo independiente, H o alquilo C1–C6; Sp es —Ar—R^b—, en donde Ar es arilo o heteroarilo, R^b es (alquilen C1–C10)O–.

La presente invención también se refiere a compuestos no peptídicos, en donde R^6 es alquileno C1–C10, Sp es —Ar—R^b—, en donde Ar es arilo, R^b es (alquilen C1–C6)O–.

La presente invención también se refiere a compuestos no peptídicos, donde R_6 es $–(CH_2)_q$ es 1–10.

La presente invención también se refiere a compuestos no

peptídicos, en donde Str tiene la fórmula:

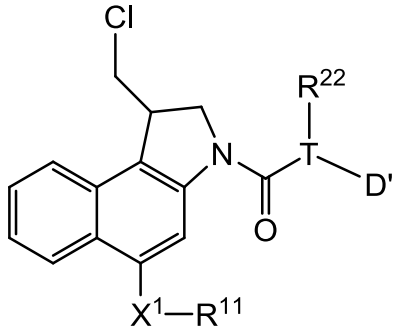


en donde R^7 se selecciona de alquileno C1–C10, alquilen C1–C10–O, N(R^c)–(alquilen C2–C6)–N(R^c) y N(R^c)–(alquileno C2–C6); donde cada R^c es, de modo independiente, H o alquilo C1–C6;

Sp es —Ar—R^b—, en donde Ar es arilo o heteroarilo, R^b es (alquilen C1–C10)O–.

La presente invención también se refiere a compuestos no peptídicos, en donde R^6 es alquileno C1–C10, Sp es —Ar—R^b—, en donde Ar es arilo, R^b es (alquilen C1–C6)O–.

La presente invención también se refiere a cualquiera de los anteriores compuestos no peptídicos de la fórmula (IV), (IV)(A), (IV)(B), (V), (V)(A) y (V)(B), en donde D es el resto farmacológico dimérico que tiene la fórmula:



en donde

R^{11} se selecciona de H, $P(O)_3H_2$, $C(O)NR^{aa}R^{bb}$ o un enlace con L;

R^{22} se selecciona de H, $P(O)_3H_2$, $C(O)NR^{aa}R^{bb}$ o un enlace con L;

R^{aa} y R^{bb} se seleccionan, de modo independiente, de H y alquilo C1–C6 opcionalmente sustituido con uno o varios F,

o R^{aa} y R^{bb} forman un grupo heterocicloalquilo de cinco o seis miembros;

T es un grupo de traba seleccionado de alquileno C3–C12, Y^1, (alquilen

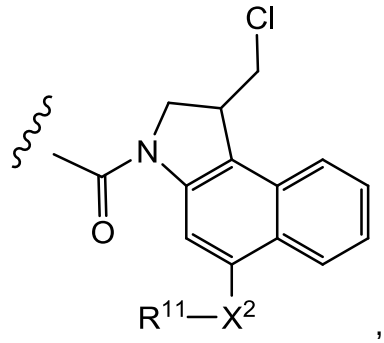
C1–C6)– Y^1–(alquileno C1–C6), (alquilen C1–C6)– Y^1–(alquilen C1–C6)–Y^1–(alquileno C1–C6), (alquenilen C2–C6)–Y^1–(alquenileno C2–C6) y (alquinilen C2–C6)–Y^1–(alquinileno C2–C6);

donde Y^1 se selecciona, de modo independiente, de O, S, NR^{11}, arilo y heteroarilo;

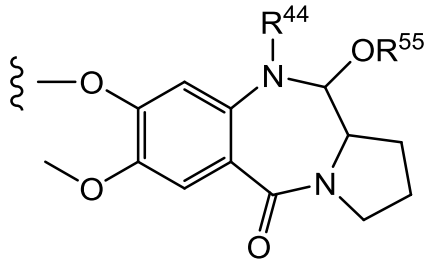
donde alquileno, alquenileno, arilo y heteroarilo están independiente y opcionalmente sustituidos con F, OH, O(alquilo C1–C6), NH_2, $NHCH_3$, $N(CH_3)_2$, $NHC(O)(alquileno\ C1–C6)_m$, $OP(O)_3H_2$ y alquilo C1–C6, donde alquilo está opcionalmente sustituido con uno o varios F, m es 0 ó 1;

o alquileno, alquenileno, arilo y heteroarilo están independiente y opcionalmente sustituidos con un enlace con L, en donde el enlace con L se puede conectar a través de uno de los sustituyentes opcionales;

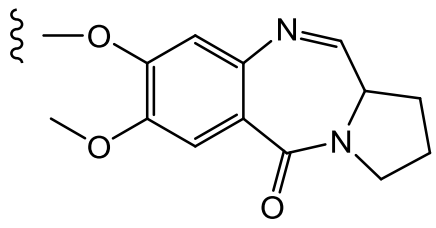
D' es un resto farmacológico seleccionado de:



,



, y



donde la línea ondulada indica el sitio de unión con T;

X^1 y X^2 se seleccionan, de modo independiente, de O y NR^{33}, donde R^{33} se selecciona de H, C(O) y alquilo C1–C6 opcionalmente sustituido con uno o varios F o X^1 y X^2 están cada uno, de modo independiente, ausentes;

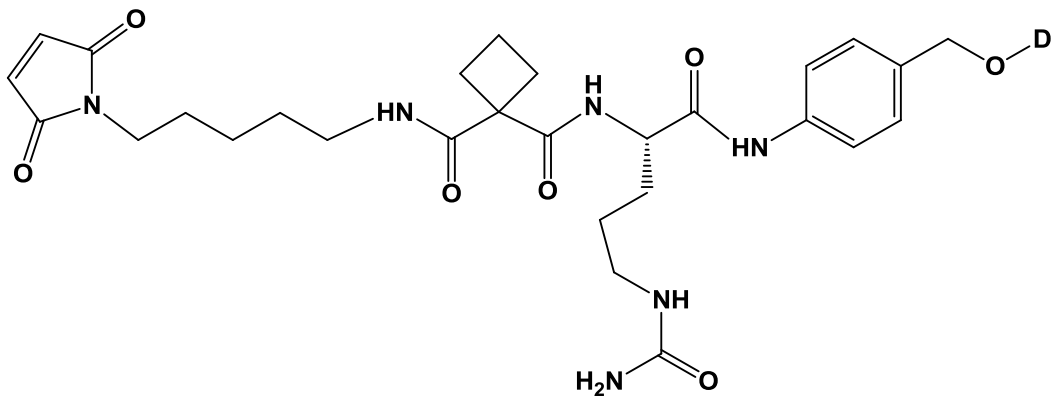
R^{44} es H, CO_2R, C(O) o un enlace con L, donde R es alquilo C1–C6 o bencilo; y

R^{55} es H o alquilo C1–C6.

La presente invención también se refiere a cualquiera de los anteriores compuestos de ligador–fármaco, en donde

donde Y^1 es fenilo que está opcionalmente sustituido con F, OH, O(alquilo C1–C6), NH_2, $NHCH_3$, $N(CH_3)_2$, NHC(O)(alquileno C1–C6)$_m$, $OP(O)_3H_2$ y alquilo C1–C6, donde alquilo está opcionalmente sustituido con uno o varios F, m es 0 ó 1.

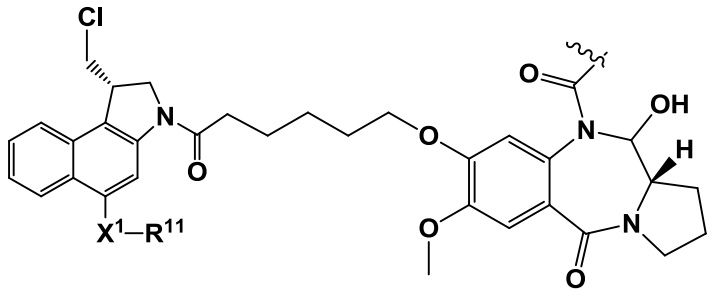
La presente invención también se refiere a compuestos de la siguiente fórmula:



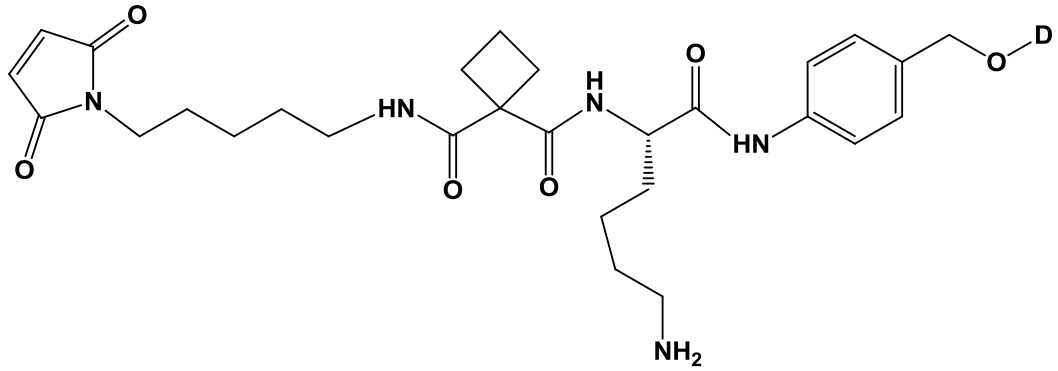
(I)(B)(LD4)

en donde,

D es un resto farmacológico de la siguiente fórmula



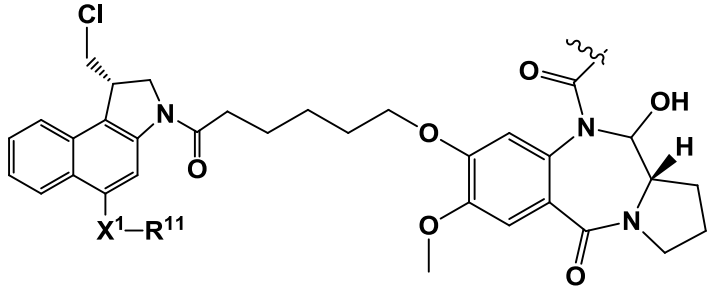
La presente invención también se refiere a compuestos de la siguiente fórmula:



(I)(B)(LD5)

en donde,

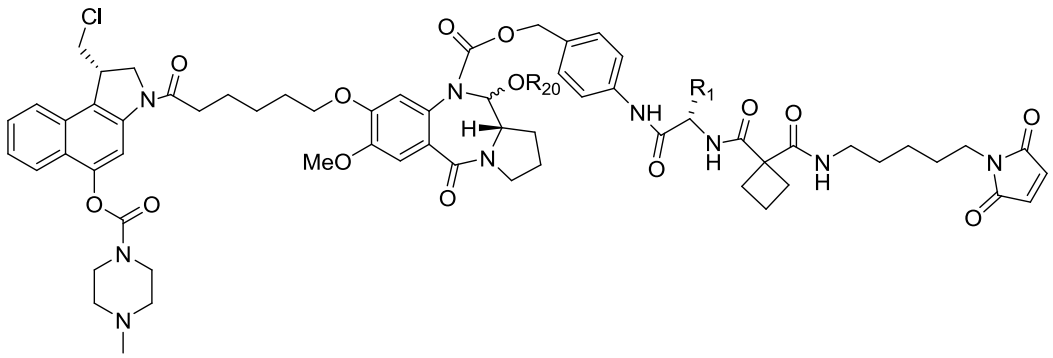
D es un resto farmacológico de la siguiente fórmula



X^1 está ausente u O;

R^{11} es C(O)N–piperazin(CH_3) o $P(O)_3H_2$.

La presente invención también se refiere a compuestos de la siguiente fórmula:



(I)(B)(LD6)

en donde

R^1 es alquil C1–C6–NH_2, (alquil C1–C6)NHC(NH)NH_2 o (alquil C1–C6)NHC(O)NH_2;

R^{20} es H o Me;

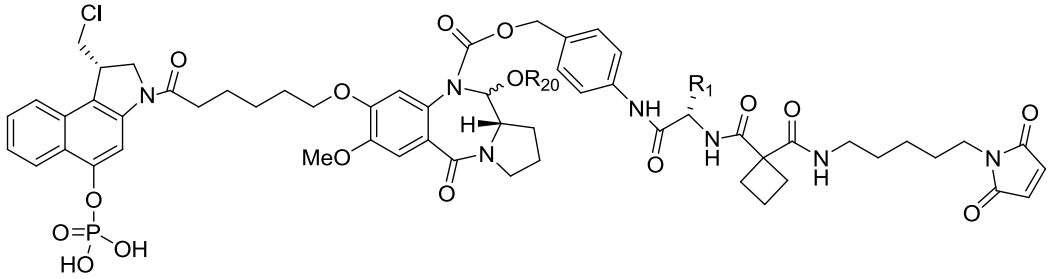
La presente invención también se refiere a compuestos de la fórmula (I)(B((LD6), en donde

R^{20} es H, R^1 es $(CH_2)_4NH_2$.

La presente invención también se refiere a compuestos de la fórmula (I)(B((LD6), en donde

R^{20} es Me, R^1 es $(CH_2)_4NH_2$.

La presente invención también se refiere a compuestos de la siguiente fórmula:



(I)(B)(LD7)

en donde

R^1 es alquil C1–C6–NH_2, (alquil C1–C6)NHC(NH)NH_2 o (alquil C1–

C6)NHC(O)NH_2;

R^{20} es H o Me;

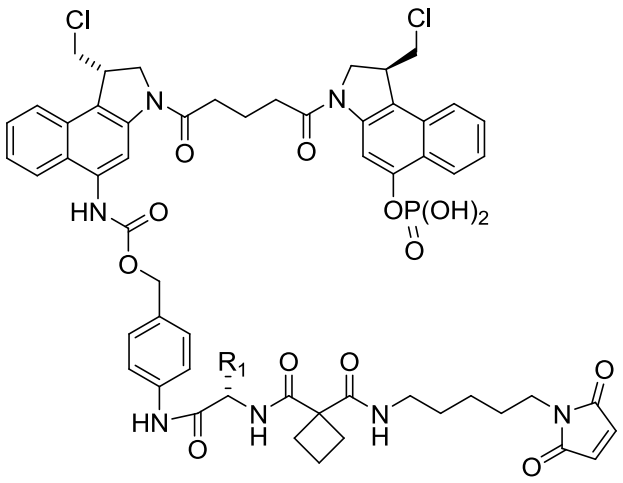
La presente invención también se refiere a compuestos de la fórmula (I)(B((LD7), en donde

R^{20} es H, R^1 es $(CH_2)_4NH_2$.

La presente invención también se refiere a compuestos de la fórmula (I)(B((LD7), en donde

R^{20} es Me, R^1 es $(CH_2)_4NH_2$.

La presente invención también se refiere a compuestos de la siguiente fórmula:



(I)(B)(LD8)

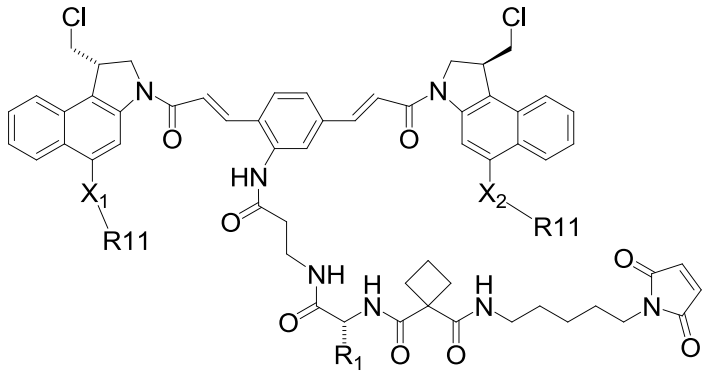
en donde,

R^1 es alquil C1–C6–NH_2, (alquil C1–C6)NHC(NH)NH_2 o (alquil C1–C6)NHC(O)NH_2;

La presente invención también se refiere a compuestos de la fórmula (I)(B)(LD8), en donde

R^1 es $(CH_2)_4NH_2$.

La presente invención también se refiere a compuestos de la siguiente fórmula:



(I)(B)(LD9)

en donde

R^1 es alquil C1–C6–NH_2, (alquil C1–C6)NHC(NH)NH_2 o (alquil C1–C6)NHC(O)NH_2;

X^1 y X^2 están cada uno, de modo independiente, ausentes u O;

cada R^{11} es, de modo independiente, C(O)N–piperazin(CH_3) o $P(O)_3H_2$.

La presente invención también se refiere a uno de los conjugados anteriores, en el que D es un resto antibiótico seleccionado del grupo que consiste de clindamicina, novobiocina, retapamulina, daptomicina, GSK–2140944, CG–400 549, sitafloxacina, teicoplanina, triclosan, naftiridona, radezolid, doxorrubicina, ampicilina, vancomicina, imipenem, doripenem, gemcitabina, dalbavancina, y azitromicina. Los mecanismos de acción bactericida y bacteriostática de tales antibióticos incluyen, pero no se limitan a: (i) inhibición de la pared celular, la elongación de peptidoglicano (vancomicina, teicoplanina, dalbavancina); (ii) inhibición de la pared celular, las reticulaciones de proteínas de unión a penicilina (imipenem, doripenem, ampicilina); (iii) despolarización de la membrana celular (daptomicina); (iv) alteración de la replicación del ADN (gemcitabina); (v) unión a ADN (doxorrubicina); (vi) enoil ACP–reductasa FABI (CG–400549, triclosan, naftiridona); (vii) inhibición de la síntesis de la proteína ribosomal, ribosoma 30S (clindamicina, retapamulina,

radezolid); y (viii) inhibidores de topoisomerasa (topoIIA) (novobiocina, sitafloxacina, GSK–2140944). Estructuralmente, la mayoría de los antibióticos se pueden agrupar en: (i) aminoglucósidos; (ii) betalactámicos; (iii) macrólidos/péptidos cíclicos; (iv) tetraciclinas; (v) fluoroquinolines/fluoroquinolonas; (vi) y oxazolidinonas. Ver: Shaw, K. and Barbachyn, M. (2011) Ann. N.Y. Acad. Sci. 1241:48–70; Sutcliffe, J. (2011) Ann. N.Y. Acad. Sci. 1241:122–152.

La presente invención también se refiere a cualquiera de los conjugados de anticuerpo–fármaco anteriores o conjugados de anticuerpo–antibiótico descriptos en la presente, donde p es 1.

La presente invención también se refiere a cualquiera de los conjugados de anticuerpo–fármaco anteriores o conjugados de anticuerpo–antibiótico descriptos en la presente, donde p es 2.

La presente invención también se refiere a cualquiera de los conjugados de anticuerpo–fármaco anteriores o conjugados de anticuerpo–antibiótico descriptos en la presente, donde p es 3.

La presente invención también se refiere a cualquiera de los conjugados de anticuerpo–fármaco anteriores o conjugados de anticuerpo–antibiótico descriptos en la presente, donde p es 4.

La invención proporciona nuevos tratamientos antibacterianos que tienen como objetivo evitar el escape antibiótico al dirigirse a las poblaciones de bacterias que evaden el tratamiento antibiótico convencional. La nueva terapia antibacteriana se logra con un conjugado de anticuerpo con antibiótico (AAC) en el que un anticuerpo específico para los componentes de la pared celular que se encuentran en *S. aureus* (que incluyen MRSA) está químicamente unido a un antibiótico potente. El antibiótico se une al anticuerpo por medio de un ligador peptídico escindible de la proteasa que está diseñado para ser escindido

por la catepsina B, una proteasa lisosomal que se halla en la mayoría de los tipos de células de mamíferos (Dubowchik et al (2002) Bioconj Chem 13:855 a 869). El AAC actúa como un profármaco en que el antibiótico está inactivo (debido al gran tamaño del anticuerpo) hasta que se escinde el ligador. Dado que una proporción significativa de S. aureus encontrado en una infección natural es absorbido por las células huésped, principalmente neutrófilos y macrófagos, en algún momento durante el curso de la infección en el huésped, y que el tiempo pasado en el interior de células huésped ofrece una oportunidad significativa para que la bacteria evada la actividad antibiótica. Los AACs de la invención están diseñados para unirse a S. aureus y liberar el antibiótico en el interior del fagolisosoma después de bacterias son absorbidas por las células huésped. Mediante este mecanismo, los AAC son capaces de concentrar el antibiótico activo específicamente en un lugar donde S. aureus es escasamente tratado por los antibióticos convencionales. Mientras que la invención no está limitada o definida por un mecanismo de acción particular, la AAC mejoran la actividad antibiótica mediante tres mecanismos potenciales: (1) El AAC libera el antibiótico dentro de las células de mamíferos que captan las bacterias, de este modo aumenta la potencia de los antibióticos que se difunden escasamente en los fagolisosomas donde las bacterias son secuestradas. (2) AAC opsoniza las bacterias – de este modo aumenta la absorción de las bacterias libres por las células fagocíticas – y libera el antibiótico localmente para matar las bacterias, mientras que son secuestradas en el fagolisosoma. (3) AAC aumenta la vida media de los antibióticos in vivo (mejor farmacocinética) mediante la unión del antibiótico a un anticuerpo. La mejora de la farmacocinética de AAC permite la administración de antibiótico suficiente en las regiones donde S. aureus

se concentra mientras que limita la dosis general de antibiótico que debe ser administrado sistémicamente. Esta propiedad debe permitir el tratamiento a largo plazo con AAC para dirigirse a la infección persistente con efectos secundarios de los antibióticos mínimos.

La presente invención también se refiere a conjugados de anticuerpo–fármaco que son conjugados de anticuerpo–antibiótico, donde el anticuerpo se une a las bacterias y D es un resto de antibiótico.

La presente invención también se refiere a cualquiera de los conjugados de anticuerpo–antibiótico, en el que la D es un fármaco seleccionado del grupo que comprende clindamicina, novobiocina, retapamulinA, daptomicina, GSK–2140944, CG–400 549, sitafloxacina, teicoplanina, triclosan, naftiridona, radezolid, doxorrubicina, ampicilina, vancomicina, imipenem, doripenem, gemcitabina, dalbavancina, y azitromicina.

Otro aspecto de la invención es una composición farmacéutica que comprende un compuesto conjugado de anticuerpo–antibiótico de la invención.

Otro aspecto de la invención es un método de tratamiento de una infección bacteriana mediante la administración a un paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto conjugado de anticuerpo antibiótico de la invención. En una forma de realización, el paciente es un ser humano. En una forma de realización, la infección bacteriana es una infección de Staphilococcus aureus. En algunas formas de realización, el paciente ha sido diagnosticado con una infección por Staph aureus. En algunas formas de realización, el tratamiento de la infección bacteriana comprende reducir la carga bacteriana.

En otra forma de realización, el método de tratamiento comprende

además la administración de un segundo agente terapéutico. En una forma de realización adicional, el segundo agente terapéutico es un antibiótico.

En una forma de realización, el segundo antibiótico administrado en combinación con el conjugado de anticuerpo–antibiótico de la invención se selecciona de las clases estructurales: (i) aminoglucósidos; (ii) betalactámicos; (iii) macrólidos/péptidos cíclicos; (iv) tetraciclinas; (v) fluoroquinolinas/fluoroquinolonas; (vi) y oxazolidinonas.

En una forma de realización, el segundo antibiótico administrado en combinación con el compuesto conjugado de anticuerpo–antibiótico de la invención se selecciona de rifamicina, clindamicina, novobiocina, retapamulinA, daptomicina, GSK–2140944, CG–400 549, sitafloxacina, teicoplanina, triclosan, naftiridona, radezolid , doxorubicina, ampicilina, vancomicina, imipenem, doripenem, gemcitabina, dalbavancina, y azitromicina.

Otro aspecto de la invención es un proceso para preparar un anticuerpo o un compuesto conjugado de anticuerpo–antibiótico de la invención.

Otro aspecto de la invención es un kit para tratar una infección bacteriana que comprende una composición farmacéutica de la invención y las instrucciones de uso.

La presente invención también se refiere a cualquiera de los anteriores conjugados de anticuerpo–fármaco, en donde el anticuerpo se une con uno o varios de polipéptidos seleccionado del grupo que consiste en:

CLL1

BMPR1B;

E16;

STEAP1;
0772P;
MPF;
NaPi2b;
Sema 5b;
PSCA hIg;
ETBR;
MSG783;
STEAP2;
TrpM4;
CRIPTO;
CD21;
CD79b;
FcRH2;
HER2;
NCA;
MDP;
IL20Rα;
Brevican;
EfB2R;
ASLG659;
PSCA;
GEDA;
BAFF–R;
CD22;
CD79a;
CXCR5;
HLA–DOB;

P2X5 ;

CD72;

LY64;

FcRH1;

IRTA2;

TENB2;

PMEL17;

TMEFF1;

GDNF–Ra1;

Li6E;

TMEM46;

Li6G6D;

LGR5;

RET;

LY6K;

GPR19;

GPR54;

ASPHD1;

Tirosinase;

TMEM118;

GPR172A;

MUC16 y

CD33.

La presente invención también se refiere a métodos de tratamiento de una enfermedad en un ser humano que lo necesita, que comprende la administración a dicho ser humano de una cantidad efectiva de un conjugado de anticuerpo–fármaco de acuerdo con la reivindicación 1.

La presente invención también se refiere a composiciones

farmacéuticas que comprenden un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 y uno de sus portadores farmacéuticamente aceptables.

La presente invención también se refiere a cualquiera de los anteriores conjugados de anticuerpo–fármaco, en donde el anticuerpo se une con uno o varios de polipéptidos seleccionado del grupo que consiste en:

CLL1;

STEAP1;

NaPi2b;

STEAP2;

TrpM4;

CRIPTO;

CD21;

CD79b;

FcRH2;

HER2;

CD22;

CD79a;

CD72;

LY64;

Li6E;

MUC16; y

CD33.

La presente invención también se refiere a cualquiera de los anteriores conjugados de anticuerpo–fármaco, en donde el anticuerpo se une con CD33.

La presente invención también se refiere a cualquiera de los anteriores conjugados de anticuerpo–fármaco, en donde el anticuerpo se

une con CD22.

La presente invención también se refiere a cualquiera de los anteriores conjugados de anticuerpo–fármaco, en donde el anticuerpo se une con NaPi2b.

La presente invención también se refiere a cualquiera de los anteriores conjugados de anticuerpo–fármaco, en donde el anticuerpo se une con CLL1.

La presente invención también se refiere a cualquiera de los anteriores conjugados de anticuerpo–fármaco, en donde el anticuerpo se une con Her2.

La presente invención también se refiere a cualquiera de los anteriores conjugados de anticuerpo–fármaco, en donde el anticuerpo se une con CD33 y el anticuerpo anti–CD33 comprende una HVR–L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:11, una HVR–L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:12, una HVR–L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:13, una HVR–H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, una HVR–H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:15 y una HVR–H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16.

La presente invención también se refiere a cualquiera de los anteriores conjugados de anticuerpo–fármaco, en donde el anticuerpo se une con CD33 y el anticuerpo anti–CD33 comprende un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:17 y un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:18.

En algunas formas de realización, el anticuerpo del conjugado de anticuerpo–fármaco se une con CD33. En algunas formas de realización, el anticuerpo del conjugado de anticuerpo–fármaco comprende (a) HVR–

H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:22; (b) HVR–H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:23; (c) HVR–H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:24; (d) HVR–L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:19; (e) HVR–L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:20; y (f) HVR–L3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO:21.

En algunas formas de realización, el anticuerpo comprende una VH como en cualquiera de las formas de realización proporcionadas con anterioridad y una VL como en cualquiera de las formas de realización proporcionadas con anterioridad. En una forma de realización, el anticuerpo comprende las secuencias de VL y VH en SEQ ID NO:25 y SEQ ID NO:26, respectivamente, incluyendo modificaciones postraduccionales de aquellas secuencias.

La presente invención también se refiere a cualquiera de los anteriores conjugados de anticuerpo–fármaco, en donde el anticuerpo se une con NaPi2b.

La presente invención también se refiere a cualquiera de los anteriores conjugados de anticuerpo–fármaco, en donde el anticuerpo se une con NaPi2b y el anticuerpo NaPi2b comprende una HVR–L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1, una HVR–L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2, una HVR–L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:3, una HVR–H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4, una HVR–H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:5 y una HVR–H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

La presente invención también se refiere a cualquiera de los anteriores conjugados de anticuerpo–fármaco, en donde el anticuerpo se une con NaPi2b y el anticuerpo NaPi2b comprende un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:7 y un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:8.

La presente invención también se refiere a cualquiera de los anteriores conjugados de anticuerpo–fármaco, en donde el anticuerpo se une con NaPi2b y el anticuerpo NaPi2b comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9 y una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10.

La presente invención también se refiere a cualquiera de los anteriores conjugados de anticuerpo–fármaco, en donde el anticuerpo se une con CD22.

La presente invención también se refiere a cualquiera de los anteriores conjugados de anticuerpo–fármaco, en donde el anticuerpo se une con CD22 y el anticuerpo CD22 comprende una HVR–L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:41, una HVR–L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42, una HVR–L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:43, una HVR–H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:44, una HVR–H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:45 y una HVR–H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46.

La presente invención también se refiere a cualquiera de los anteriores conjugados de anticuerpo–fármaco, en donde el anticuerpo se une con CD22 y el anticuerpo CD22 comprende un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:47 y un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:48.

La presente invención también se refiere a cualquiera de los anteriores conjugados de anticuerpo–fármaco, en donde el anticuerpo se une con CD22 y el anticuerpo CD22 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:49 y una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 50.

DEFINICIONES

Salvo que se indique lo contrario, los siguientes términos y frases siguientes usados en la presente se consideran que tienen los siguientes significados: cuando se utilizan nombres comerciales en la presente, los solicitantes intentan incluir de modo independiente el nombre comercial de la formulación del producto, el fármaco genérico, y el principio activo farmacéutico del nombre comercial del producto.

El término "peptidomimético" o PM como se usa en la presente significa un resto químico no peptídico. Los péptidos son cadenas cortas de monómeros de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos (amida), los enlaces químicos covalentes se forman cuando el grupo carboxilo de un aminoácido reacciona con el grupo amino de otro. Los péptidos más cortos son dipéptidos, que consisten en 2 aminoácidos unidos por un solo enlace peptídico, seguido de tripéptidos, tetrapéptidos, etc. Un resto químico peptidomimético incluye restos químicos que no son aminoácidos. Un resto químico peptidomimético también puede incluir uno o más aminoácidos que están separados por una o más unidades químicas de aminoácido.. Un grupo químico peptidomimético no contiene en ninguna porción de su estructura química dos o más aminoácidos adyacentes que están unidos por enlaces peptídicos.

El término "aminoácido" como se usa en la presente significa glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, fenilalanina, prolina, serina,

treonina, tirosina, cisteína, metionina, lisina, arginina, histidina, triptófano, ácido aspártico, ácido glutámico, asparagina, glutamina o citrulina.

El término "antibiótico" (abx o ABX) incluye cualquier molécula que inhibe específicamente el crecimiento o muerte de microorganismos, tales como las bacterias, pero no es letal para el huésped en la concentración y el intervalo de dosificación administrada. En un aspecto específico, un antibiótico no es tóxico para el huésped en los intervalos de concentración y dosificación administrados. Los antibióticos efectivos contra las bacterias se pueden clasificar en forma general como bactericida (es decir, mata directamente) o bacteriostáticos (es decir, evita la división). Los antibióticos anti–bactericida también se pueden subclasificar como de espectro reducido o espectro amplio. Un antibiótico de amplio espectro es uno efectivo una gama amplia de bacterias que incluyen bacterias grampositivas y gramnegativas, en contraste con un antibiótico de espectro reducido, que es efectivo contra un variedad menor o familias específicas de bacterias. Los ejemplos de antibióticos incluyen: (i) aminoglucósidos, por ejemplo, amikacina, gentamicina, kanamicina, neomicina, netilmicina, estreptomicina, tobramicina, paromicina, (ii) ansamicinas, por ejemplo, geldanamicina, herbimicina, (iii) carbacefemos, por ejemplo, loracarbef, (iv), carbapenems, por ejemplo, ertapenum, doripenem, imipenem/cilastatina, meropenem, (v) cefalosporinas (primera generación), por ejemplo, cefadroxilo, cefazolina, cefalotina, cefalexina, (vi) cefalosporinas (segunda generación), por ejemplo, ceflaclor, cefamandol, cefoxitina, cefprozilo, cefuroxima, (vi) cefalosporinas (tercera generación), por ejemplo, cefixima, cefdinir, cefditoren, cefoperazona, cefotaxima, cefpodoxima, ceftazidima, ceftibuteno, ceftizoxima, ceftriaxona, (vii)

cefalosporinas (cuarta generación), por ejemplo, cefepima, (viii), cefalosporinas (quinta generación), por ejemplo, ceftobiprol, (ix) glicopéptidos, por ejemplo, teicoplanina, vancomicina, (x) macrólidos, por ejemplo, axitromicina, claritromicina, diritromicina, eritromicina, roxitromicina, troleandomicina, telitromicina, espectinomicina, (xi) monobactamas, por ejemplo, axtreonam, (xii) penicilinas, por ejemplo, amoxicilina, ampicilina, axlocilina, carbenicilina, cloxacilina, dicloxacilina, flucloxacilina, mezlocilina, meticilina, nafcilin, oxacilina, penicilina, peperacillin, ticarcilina, (xiii) polipéptidos antibióticos, por ejemplo, bacitracina, colistina, polimixina B, (xiv) quinolonas por ejemplo, ciprofloxacina, enoxacina, gatifloxacina, levofloxacina, lemefloxacina, moxifloxacina, norfloxacina, orfloxacina, trovafloxacina, (xv) sulfonamidas, por ejemplo, mafenida, prontosilo, sulfacetamida, sulfametizol, sulfanilamida, sulfasalazina , sulfisoxazol, trimetoprima, trimetoprima–sulfametoxazol (TMP–SMX), (xvi) tetraciclinas, por ejemplo, demeclociclina, doxiciclina, minociclina, oxitetraciclina, tetraciclina y (xvii) otros como arspenamina, cloranfenicol, clindamicina, lincomicina, etambutol, fosfomicina, ácido fusídico, furazolidona, isoniazida, linezolida, metronidazol, mupirocina, nitrofurantoína, platensimicina, pirazinamida, quinupristina/dalfopristina, rifampina/rifampicina o tinidazol.

La expresión "*Staphilococcus aureus* resistente a la meticilina" (MRSA), alternativamente conocido como *Staphilococcus aureus* resistente a múltiples fármacos o *Staphilococcus aureus* resistente a oxacilina–resistente (ORSA) se refiere a cualquier cepa de *Staphilococcus aureus* que es resistente a antibióticos beta–lactámicos, que incluyen las penicilinas (por ejemplo, meticilina, dicloxacilina, nafcilina, oxacilina, etc.) y cefalosporinas. "*Staphilococcus aureus*

sensible a la meticilina " (MSSA) Se refiere a cualquier cepa de *Staphilococcus aureus* que es sensible a los antibióticos beta–lactámicos.

El término "anticuerpo" en la presente se utiliza en el sentido más amplio y específicamente cubre anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, dímeros, multímeros, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), y fragmentos de anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada (Miller et al (2003) Jour. of Immunology 170:4854–4861). Los anticuerpos pueden ser murinos, humanos, humanizados, quiméricos, o derivados de otras especies. Un anticuerpo es una proteína generada por el sistema inmune que es capaz de reconocer y unirse a un antígeno específico. (Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik (2001) Biología Inmuno, quinto Ed., Garland Publishing, Nueva York). Un antígeno blanco en general tiene numerosos sitios de unión, también llamados epítopos, reconocidos por los CDR en múltiples anticuerpos. Cada anticuerpo que se une específicamente a un epítopo diferente tiene una estructura diferente. Por lo tanto, un antígeno puede tener más de un anticuerpo correspondiente. Un anticuerpo incluye una molécula de inmunoglobulina de longitud completa o una porción inmunológicamente activa de una molécula de inmunoglobulina de longitud completa, es decir, una molécula que contiene un sitio de unión al antígeno que se une inmunoespecíficamente a un antígeno de un blanco de interés o parte del mismo, tales objetivos, que incluyen, pero sin limitación, células de cáncer o células que producen anticuerpos autoinmunes asociados con una enfermedad autoinmune. La inmunoglobulina descrita en la presente puede ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o

subclase de molécula de inmunoglobulina. Las inmunoglobulinas se pueden derivar de cualquier especie. En un aspecto, sin embargo, la inmunoglobulina es de origen humano, murino, o de origen de conejo.

La expresión "fragmento de anticuerpo (s)", como se usa en la presente, incluye una porción de un anticuerpo de longitud completa, generalmente la región de unión al antígeno o variable de este. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen Fab, Fab ', F (ab') $_2$, y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; minicuerpos (Olafsen et al (2004) Protein Eng. Design & Sel. 17(4):315–323, fragmentos producidos por una biblioteca de expresión Fab, anticuerpos anti–idiotípicos (anti–Id), CDR (región determinante de la complementariedad) y fragmentos de unión al epítopo de los anteriores que se unen inmunoespecíficamente a antígenos celulares de cáncer, antígenos virales o antígenos microbianos, moléculas de anticuerpo de cadena simple; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

La expresión "anticuerpo monoclonal" tal como se usa en la presente, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticas a excepción de las mutaciones naturales posibles que puede que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, se dirigen contra un sitio antigénico único. Además, en contraste con las preparaciones de anticuerpos policlonales que incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos ya que se pueden sintetizar sin contaminación con los demás anticuerpos. El modificador

“monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como obtenido a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse que requiere la producción del anticuerpo mediante algún procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales para utilizar en la presente invención de acuerdo se puede preparar por el primer método de hibridoma descrito por Kohler et al (1975) Nature, 256: 495, o se puede obtener por métodos de ADN recombinante (ver, por ejemplo: US 4816567; US 5807715). Los anticuerpos monoclonales también se pueden aislar de bibliotecas de anticuerpos de fagos utilizando la técnica descrita en por ejemplo Clackson et al (1991) Nature, 352: 624–628; Marks et al (1991) J. Mol. Biol, 222: 581–597.

Los anticuerpos monoclonales incluyen en la presente específicamente anticuerpos "quiméricos" en que una porción de la cadena pesada y/o liviana es idéntica u homóloga con las correspondientes secuencias en los anticuerpos derivados de una especie particular o perteneciente a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la cadena idéntico u homólogo a las secuencias correspondientes en los anticuerpos derivados de otras especies o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de tales anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada (US 4.816.567; y Morrison et al (1984) Proc Natl Acad Sci EE.UU. 81: 6851–6855). Los anticuerpos quiméricos de interés incluyen en la presente anticuerpos "primatizados" que comprenden secuencias de unión a antígeno de dominio variable derivadas de un primate no humano (por ejemplo, Old World Monkey, Simio, etc) y secuencias de la región constante humana.

La expresión "anticuerpo intacto" como se usa en la presente es uno que comprende los dominios VH y VL, así como un dominio

constante de cadena liviana (CL) y los dominios constantes de cadena pesada, CH1, CH2 y CH3. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de secuencia nativa (por ejemplo, dominios constantes de secuencia nativa humana) o variante de la secuencia de aminoácidos de este. El anticuerpo intacto puede tener una o más "funciones efectoras", que se refieren a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región constante Fc (una región de la Fc de la secuencia nativa o región Fc de la variante de la secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras del anticuerpo incluyen la unión de C1q; citotoxicidad dependiente del complemento; unión al receptor Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC); fagocitosis; y regulación por disminución de los receptores celulares de superficie, tales como receptor de las células B y BCR.

La expresión "región Fc" como se usa en la presente significa una región C–terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina que contiene al menos que una parte de la región constante. El término incluye regiones Fc de la secuencia nativa y regiones Fc variantes. En una forma de realización, una región Fc de la cadena pesada de IgG humana se extiende desde Cys226, o desde Pro230, al carboxilo–terminal de la cadena pesada. Sin embargo, la lisina C–terminal (Lys447) de la región Fc puede o no estar presente. A menos que se especifique de otro modo en la presente, la numeración de los residuos de aminoácidos en la región Fc o región constante está de acuerdo con el sistema de numeración EU, también llamado el índice EU, tal como se describe en Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

El término "estructura" o "FR" como se usa en la presente se

refiere a residuos del dominio variable diferentes de los residuos de la región hipervariable (HVR). El FR de un dominio variable generalmente consiste en cuatro dominios FR: FR1, FR2, FR3 y FR4. En consecuencia, las secuencias de HVR y FR generalmente aparecen en la siguiente secuencia en VH (o VL): FR1–H1 (L1) –FR2–H2 (L2) –FR3–H3 (L3) –FR4.

De acuerdo con la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos intactos se pueden asignar a diferentes "clases". Existen cinco clases principales de anticuerpos de inmunoglobulina intactas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas se pueden subdividir en "subclases" (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, e IgA2. Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponde a las diferentes clases de anticuerpos se denominan α, δ, ε, γ, y μ, respectivamente. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas. Las formas de Ig incluyen modificaciones de bisagra o formas sin bisagra (Roux et al (1998) J. Immunol. 161:4083–4090; Lund et al (2000) Eur. J. Biochem. 267:7246–7256; US 2005/0048572; US 2004/0229310).

La expresión "anticuerpo humano", como se usa en la presente se refiere a un anticuerpo que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde a la de un anticuerpo producido por un ser humano o una célula humana o derivada de una fuente no humana que utiliza repertorios de anticuerpos humanos u otras secuencias que codifican el anticuerpo humano. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión a antígeno no humano.

La expresión "estructura de consenso humano" como se usa en la

presente, se refiere a una estructura que representa los residuos de aminoácidos que aparecen más comúnmente en una selección de secuencias estructurales VL o VH de la inmunoglobulina humana. Generalmente, la selección de secuencias estructurales VL o VH de la inmunoglobulina humana proviene de un subgrupo de secuencias de dominio variable. En general, el subgrupo de secuencias es un subgrupo como en Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, NIH Publication 91–3242, Bethesda MD (1991), vols. 1–3. En una forma de realización, para VL, el subgrupo es subgrupo kappa I como en Kabat et al*., supra*. En una forma de realización, para la VH, el subgrupo es subgrupo III como en Kabat et al*., supra*.

La expresión "anticuerpo humanizado", como se usa en la presente se refiere a un anticuerpo quimérico que comprende residuos de aminoácidos de HVR no humano y residuos de aminoácidos de FR humanos. En ciertas formas de realización, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en el que el total o sustancialmente el total de HVRS (por ejemplo, CDRs) corresponde a las de un anticuerpo no humano, y el total o sustancialmente el total de las FRs corresponde a las de un anticuerpo humano. Un anticuerpo humanizado opcionalmente puede comprender al menos una porción de una región constante del anticuerpo derivado de un anticuerpo humano. Una "forma humanizada" de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo no humano, se refiere a un anticuerpo que se ha sometido a humanización.

La expresión "región hipervariable" o "HVR", como se usa en la presente, se refiere a cada una de las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en la secuencia y/o forman bucles estructuralmente definidos ("bucles hipervariables"). Generalmente, los

anticuerpos de cuatro cadenas nativas comprenden seis HVR; tres en el VH (H1, H2, H3), y tres en el VL (L1, L2, L3). Las HVR comprenden generalmente residuos de aminoácidos de los bucles hipervariables y/o de las "regiones determinantes de complementariedad" (CDR), está última es de la más alta variabilidad de secuencia y/o está involucrada en el reconocimiento del antígeno. Los bucles hipervariables ilustrativos a aparecen en los residuos de aminoácidos 26–32 (L1), 50–52 (L2), 91–96 (L3), 26–32 (H1), 53–55 (H2) y 96–101 (H3). (Chothia y Lesk, J. Mol Biol 196:901–917 (1987).) Los ejemplos de CDR (CDR–L1, CDR–L2, CDR–L3, CDR–H1, CDR–H2 y CDR–H3) aparecen en los residuos de aminoácidos 24–34 de L1, L2 de 50–56, 89–97 de L3, 31–35B de H1, H2 de 50–65, y 95–102 de H3. (Kabat et al*., Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991).) Con la excepción de CDR1 de VH, las CDR generalmente comprenden los residuos de aminoácidos que forman los bucles hipervariables. Las CDR también comprenden "residuos determinantes de especificidad" o "SDR", que son los residuos que entran en contacto con el antígeno. Las SDR están contenidas dentro de las regiones de las CDR llamadas CDR abreviadas, o a–CDR. Los ejemplos de a–CDRs (a–CDR–L1, a–CDR–L2, a–CDR–L3, a–CDR–H1, a–CDR–H2, y a–CDR–H3) se producen en los residuos de aminoácidos 31–34 de L1, L2 de 50–55, 89–96 de L3, 31–35B de H1, H2 de 50–58, y 95–102 de H3. (Ver Almagro and Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619–1633 (2008)). A menos que se indique lo contrario, los residuos de HVR y otros residuos en el dominio variable (por ejemplo, los residuos de FR) se enumeran en la presente de acuerdo con Kabat et al, supra.

La expresión "aminoácido libre de cisteína" tal como se utiliza en

la presente, se refiere a un residuo de aminoácido cisteína que ha sido diseñado en un anticuerpo precursor, tiene un grupo funcional tiol (–SH), y no está apareado como un puente disulfuro intramolecular o intermolecular.

La expresión "ligador", "unidad ligadora", o "unión" como se usa en la presente significa un resto químico que comprende una cadena de átomos que une covalentemente un resto de fármaco a un anticuerpo. En diversas formas de realización, un ligador es un radical divalente, especificado como L.

La expresión "resto de fármaco" como se usa en la presente significa una sustancia que inhibe o impide una función celular y/o causa la muerte o destrucción de las células. Los agentes citotóxicos incluyen, pero sin limitación, isótopos radiactivos (por ejemplo, At^{211}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, Bi^{212}, P^{32}, Pb^{212} e isótopos radiactivos de Lu); agentes quimioterapéuticos o medicamentos (por ejemplo, metotrexato, adriamicina, alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorrubicina, melfalan, mitomicina C, clorambucilo, daunorrubicina u otros agentes intercalantes); agentes inhibidores del crecimiento; enzimas y fragmentos de los mismoss tales como enzimas nucleolíticas; y los diversos agentes antitumorales o anticancerosos descritos a continuación.

Como se usa en la presente, a menos que se defina de otro modo en una reivindicación, el término "acilo" se refiere al grupo –C (O) R ', donde R' es alquilo, cicloalquilo C_3–C_6, o heterociclilo, como cada uno se define en la presente.

Como se usa en la presente, a menos que se defina de otro modo en una reivindicación, el término "alcoxi" se refiere al grupo –O ', donde R' es alquilo C_1–C4 o cicloalquilo C_3–C_6 como se definió anteriormente.

Los ejemplos de "alcoxi" incluyen metoxi, etoxi, isopropoxi, propoxi, butoxi, t–butoxi, isobutoxi, ciclopropoxi, ciclobutoxi y, y sus formas halogenados. por ejemplo, fluorometoxi y difluorometoxi.

Como se usa en la presente, a menos que se defina de otro modo en una reivindicación, el término "alquilo" se refiere a un radical de cadena hidrocarbonada monovalente o divalente lineal o ramificado que tiene de uno a doce (C_1–C_{12}) átomos de carbono, que pueden estar no sustituidos o sustituidos con múltiples grados de sustitución, por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis incluidos dentro de la presente invención. Los ejemplos de sustituyentes se seleccionan del grupo que consiste en halo, trifluorometilo, difluorometilo, amino, alquilamino, ciano, sulfonilo, sulfonamida, sulfóxido, hidroxi, éster, alcoxi, ácido carboxílico y alquiltio. Ejemplos de "alquilo" como se usa en la presente incluyen, pero sin limitación, metilo (Me, $–CH_3$), etilo (Et, $–CH_2CH_3$), 1–propilo (n–Pr, n–propilo, $–CH_2CH_2CH_3$), 2–propilo (i–Pr, i–propilo, $–CH(CH_3)_2$), 1–butilo (n–Bu, n–butilo, $–CH_2CH_2CH_2CH_3$), 2–metil–1–propilo (i–Bu, i–butilo, $–CH_2CH(CH_3)_2$), 2–butilo (s–Bu, s–butilo, $–CH(CH_3)CH_2CH_3$), 2–metil–2–propilo (t–Bu, t–butilo, $–C(CH_3)_3$), 1–pentilo (n–pentilo, $–CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$), 2–pentilo ($–CH(CH_3)CH_2CH_2CH_3$), 3–pentil ($–CH(CH_2CH_3)_2$), 2–metil–2–butilo ($–C(CH_3)_2CH_2CH_3$), 3–metil–2–butilo ($–CH(CH_3)CH(CH_3)_2$), 3–metil–1–butil ($–CH_2CH_2CH(CH_3)_2$), 2–metil–1–butilo ($–CH_2CH(CH_3)CH_2CH_3$), 1–hexilo ($–CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$), 2–hexilo ($–CH(CH_3)CH_2CH_2CH_2CH_3$), 3–hexilo ($–CH(CH_2CH_3)(CH_2CH_2CH_3)$), 2–metil–2–pentilo ($–C(CH_3)_2CH_2CH_2CH_3$), 3–metil–2–pentilo ($–CH(CH_3)CH(CH_3)CH_2CH_3$), 4–metil–2–pentilo ($–CH(CH_3)CH_2CH(CH_3)_2$), 3–metil–3–pentilo ($–C(CH_3)(CH_2CH_3)_2$), 2–metil–3–pentilo ($–CH(CH_2CH_3)CH(CH_3)_2$), 2,3–dimetil–2–butilo (–

$C(CH_3)_2CH(CH_3)_2$), 3,3–dimetil–2–butilo (–$CH(CH_3)C(CH_3)_3$, así como el divalente (“alquileno”) y sus versiones sustituidas. Los ejemplos de alquilo sustituido incluyen, pero sin limitación, hidroximetilo, difluorometilo y trifluorometilo.

Como se usa en la presente a menos que se defina de otro modo en una reivindicación, el término "alquenilo" significa un radical de cadena hidrocarbonada monovalente o divalente, lineal o ramificada de cualquier longitud desde dos hasta ocho átomos de carbono (C_2–C_{10}) con al menos un sitio de insaturación, es decir, un enlace doble sp^2 carbono–carbono, donde el radical alquenilo puede estar opcionalmente sustituido de modo independiente con uno o más sustituyentes descritos anteriormente en la definición de "alquilo", e incluye radicales que tienen orientaciones "cis" y "trans", o alternativamente, y orientaciones "E” y "Z". Los ejemplos de alquenilo incluyen, pero sin limitación, etenilo o vinilo (–$CH{=}CH_2$), prop–1–enilo (–$CH{=}CHCH_3$), prop–2–enilo (–$CH_2CH{=}CH_2$), 2–metilprop–1–enilo, but–1–enilo, but–2–enilo, but–3–enilo, buta–1,3–dienilo, 2–metilbuta–1,3–dieno, hex–1–enilo, hex–2–enilo, hex–3–enilo, hex–4–enilo, hexa–1,3–dienilo, así como el divalente ("alquenileno") y las versiones sustituidas de los estos.

Como se usa en la presente a menos que se defina de otro modo en una reivindicación, el término "alquinilo" significa un radical hidrocarbonado monovalente o divalente, lineal o ramificado de cualquier longitud desde dos hasta ocho átomos de carbono (C_2–C_{10}) con al menos un sitio de insaturación, es decir, un enlace triple sp carbono–carbono en el que el radical alquinilo puede estar opcionalmente sustituido de modo independiente con uno o más sustituyentes descritos anteriormente en la definición de alquilo, los ejemplos de alquinilo incluyen, pero sin limitación, etinilo (–C≡CH), prop–1–inilo (–$C{\equiv}CCH_3$),

prop–2–inilo (propargilo, $–CH_2C{\equiv}CH$), but–1–inilo, but–2–inilo y but–3–inilo, así como el divalente ("alquinileno") y las versiones sustituidas de los estos.

Como se usa en la presente, a menos que se defina de otro modo en una reivindicación, el término "alquilamino" se refiere al grupo –NR'R", en el que R' es H, alquilo C_1–C_6 o cicloalquilo C_3–C_6, y R" es alquilo C_1–C_6 o cicloalquilo C_3–C_6, los ejemplos de alquilamino incluyen, pero sin limitación, metilamino, dimetilamino, etilamino, dietilamino, propilamino y ciclopropilamino

Como se usa en la presente, a menos que se defina de otro modo en una reivindicación, el término "amida" se refiere al grupo –C(O) NR'R", donde R' y R" son cada uno independientemente H, alquilo C_1–C_6, o cicloalquilo C_3–C_6; los ejemplos de amida incluyen, pero sin limitación, $–C(O)NH_2$, $–C(O)NHCH_3$, y $–C(O)N(CH_3)_2$.

Como se usa en la presente, a menos que se defina de otro modo en una reivindicación, el término "arilo" se refiere a un sistema anular hidrocarbonado aromático. El sistema anular puede ser monocíclico o policíclico fusionado (por ejemplo, bicíclico, tricíclico, etc.), sustituido o no sustituido. En diversas formas de realización, el anillo arilo monocíclico es C_5–C_{10}, o C_5–C_7, o C_5–C_6, donde estos números de carbono se refieren al número de átomos de carbono que forman el sistema anular. Un sistema anular C_6, es decir, un anillo de fenilo, es un grupo arilo. En varias formas de realización, el anillo policíclico es un grupo arilo bicíclico, donde los ejemplos de grupos arilo bicíclicos incluyen C_8–C_{12}, o C_9–C_{10}. Un anillo naftilo, que tiene 10 átomos de carbono, es un grupo arilo policíclico. Los ejemplos de sustituyentes para arilo se describen a continuación en la definición de "opcionalmente sustituido".

En la presente, a menos que se defina de otro modo en una reivindicación, el término "ciano" se refiere al grupo –CN.

Como se usa en la presente, a menos que se defina de otro modo en una reivindicación, "cicloalquilo" se refiere a un grupo anular hidrocarbonado no aromático, sustituido o no sustituido, saturado o parcialmente insaturado. Los ejemplos de sustituyentes se describen en la definición de "opcionalmente sustituido". En un ejemplo, el grupo cicloalquilo es de 3 a 12 átomos de carbono C_3–C_{12}). En otros ejemplos, cicloalquilo es C_3–C_8, C_3–C_{10} o C_5–C_{10}. En otros ejemplos, el grupo cicloalquilo, como un monociclo, es C_3–C_8, C_3–C_6 o C_5–C_6. En otro ejemplo, el grupo cicloalquilo, como un biciclo, es C_7–C_{12}. En otro ejemplo, el grupo cicloalquilo, como un sistema espiro, es C_5–C_{12}. Los ejemplos de cicloalquilo monocíclico incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, 1–ciclopent–1–enilo, 1–ciclopent–2–enilo, 1–ciclopent–3–enilo, ciclohexilo, perdeuteriociclohexilo, 1–ciclohex–1–enilo, 1–ciclohex–2–enilo, 1–ciclohex–3–enilo, ciclohexadienilo, cicloheptilo, ciclooctilo, ciclononilo, ciclodecilo, cicloundecilo y ciclododecilo. Los ejemplos de cicloalquilos bicíclicos que tienen de 7 a 12 átomos anulares incluyen, pero sin limitación, sistemas anulares [4,4], [4,5], [5,5], [5,6] o [6,6]. Los ejemplos de cicloalquilos bicíclicos con puente incluyen, pero sin limitación, biciclo [2.2.1] heptano, biciclo [2.2.2] octano y biciclo [3.2.2] nonano. Los ejemplos de cicloalquilo espiro incluyen, espiro [2.2] pentano, espiro [2.3] hexano, espiro [2.4] heptano, espiro [2.5] octano y espiro [4.5] decano.

Como se usa en la presente, a menos que se defina de otro modo en una reivindicación, el término "éster" se refiere al grupo –C (O) O', donde R' es alquilo C_1–C_6, o cicloalquilo C_3–C_6.

Como se usa en la presente, a menos que se defina de otro modo

en una reivindicación, el término "heterociclo" "heterocicloalquilo" o "heterociclilo" se refiere a sistemas anulares no aromáticos mono– o policíclicos que contienen de 2 a 12 átomos de carbono anulares y 1 a 3 heteroátomos anulares. Los sistemas de anillos policíclicos pueden fusionarse en forma bi– o tri–cíclico, espiro o con puente. Los ejemplos de heteroátomos incluyen N, O, y S, incluyendo N–óxidos, óxidos de azufre, y dióxidos. En una forma de realización, el anillo es de tres a ocho miembros y está completamente saturado o tiene uno o más grados de insaturación. Se incluyen múltiples grados de sustitución dentro de la presente definición. Los ejemplos de sustituyentes se definen a continuación. Los ejemplos de grupos "heterocíclicos" incluyen, pero sin limitación tetrahidrofuranilo, piranilo, 1,4–dioxanilo, 1,3–dioxanilo, oxolanilo, oxetanilo, 2–oxa–6–aza–espiro [3.3] heptan–6–ilo, piperidinilo , pirrolidinilo, morfolinilo, azetidinilo, piperazinilo, pirrolidinonilo, piperazinonilo, pirazolidinilo, imidazolinilo, imidazolidinilo, y sus diferentes tautómeros.

Como se usa en la presente, a menos que se defina de otro modo en una reivindicación, el término "heteroarilo", a menos que se defina de otro modo en una reivindicación, se refiere a un sistema de anillo aromático que contiene 1 a 9 de carbonos y al menos un heteroátomo. Los ejemplos de heteroátomos incluyen N, O, y S. El heteroarilo puede ser monocíclico o policíclico, sustituido o no sustituido. Un grupo heteroarilo monocíclico puede tener de 2 a 6 átomos de carbono anulares y 1 a 3 heteroátomos anulares en el anillo, mientras que un heteroarilo policíclico puede contener de 3 a 9 átomos de carbono anulares y 1 a 5 heteroátomos anulares. Un anillo heteroarilo policíclico puede contener uniones anulares fusionadas, espiro o con puente, por ejemplo, un heteroarilo bicíclico es un heteroarilo policíclico. Los anillos

heteroarilo bicíclicos pueden contener de 8 a 12 átomos miembros. Los anillos heteroarilo monocíclicos pueden contener de 5 a 8 átomos miembros (carbonos y heteroátomos). Los ejemplos de grupos heteroarilo ejemplares incluyen pero sin limitación: benzofuranilo, benzotiofenilo, furanilo, imidazolilo, indolilo, azaindolilo, azabencimidazolilo, benzoxazolilo, benzotiazolilo, benzotiadiazolilo, benzotriazolilo, benzoimidazolilo, tetrazinilo, tetrazolilo, isotiazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, pirazinilo, pirazolilo, piridazinilo, piridinilo, pirimidinilo, pirrolilo, quinolinilo, quinazolinilo, quinoxalinilo, triazinilo, triazolilo, tiazolilo y tiofenilo. Los ejemplos de sustituyentes para heteroarilo se describen a continuación en la definición de "opcionalmente sustituido".

Como se usa en la presente, a menos que se defina de otro modo en una reivindicación, el término "heteroarilalquilo" significa el grupo (heteroaril)alquilo C_1–C_3.

Como se usa en la presente, a menos que se defina de otro modo en una reivindicación, el término “arilalquilo” significa el grupo (aril)alquilo C_1–C_3.

Como se usa en la presente, a menos que se defina de otro modo en una reivindicación, el término “urea” se refiere al grupo –NR’C(O)NR”, donde R’ y R” son cada uno de modo independiente H, alquilo C_1–C_6, o cicloalquilo C_3–C_6.

Como se usa en la presente, a menos que se defina de otro modo en una reivindicación, el término opcionalmente" significa que el evento posteriormente descrito puede o no ocurrir e incluye tanto los eventos que se producen como los que no se producen.

Como se usa en la presente, a menos que se defina de otro modo, la frase "opcionalmente sustituido", "sustituido" o sus variaciones indican

una sustitución opcional, que incluye múltiples grados de sustitución, con uno o más grupos sustituyentes, por ejemplo, uno, dos o tres. La frase no debe interpretarse como una duplicación de las sustituciones descriptas e ilustradas en la presente. Los ejemplos de grupos sustituyentes opcionales incluyen acilo, alquilo C_1–C_6, sulfonilo, amino, sulfonamida, sulfóxido, alcoxi, ciano, halo, urea, éster, ácido carboxílico, amida, hidroxi, oxo, y nitro.

Como se usa en la presente, a menos que se defina de otro modo en una reivindicación, el término "tratamiento" se refiere a aliviar la afección especificada, eliminar o reducir uno o más síntomas de la afección, lentificar o eliminar la progresión de la afección.

Como se usa en la presente, a menos que se defina de otro modo en una reivindicación, el término "cantidad efectiva" significa la cantidad de un fármaco o agente farmacéutico que provocará la respuesta biológica o médica de un tejido, sistema, animal, o humano que es buscada, por ejemplo, por un investigador o médico.

Como se usa en la presente, a menos que se defina de otro modo en una reivindicación, la expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" significa cualquier cantidad que, en comparación con un sujeto correspondiente que no ha recibido dicha cantidad, produce el tratamiento de una enfermedad, trastorno o efecto secundario, o una disminución en la tasa de avance de una enfermedad o trastorno. El término también incluye dentro de su alcance las cantidades efectivas para mejorar la función fisiológica normal. Para uso en terapia, las cantidades terapéuticamente efectivas de un compuesto de la fórmula I, así como sus sales, se pueden administrar como producto químico en bruto. Además, el ingrediente activo se puede presentar como una composición farmacéutica.

La presente invención también se refiere a uno cualquiera de los ejemplos en la sección experimental.

La frase "sal farmacéuticamente aceptable", como se usa en la presente, se refiere a sales farmacéuticamente aceptables inorgánicas u orgánica de un conjugado anticuerpo–fármaco (ADC) o un resto ligador de fármacos. Los ejemplos de sales incluyen, pero no sin limitación las sales de sulfato, citrato, acetato, oxalato, cloruro, bromuro, yoduro, nitrato, bisulfato, fosfato, fosfato ácido, isonicotinato, lactato, salicilato, citrato ácido, tartrato, oleato, tanato, pantotenato, bitartrato, ascorbato, succinato, maleato, gentisinato, fumarato, gluconato, glucuronato, sacarato, formiato, benzoato, glutamato, metansulfonato, etansulfonato, bencensulfonato, p–toluensulfonato y pamoato (es decir, 1,1'–metilenbis–(2–hidroxi–3–naftoato)). Una sal farmacéuticamente aceptable puede implicar la inclusión de otra molécula tal como un ion acetato, un ion succinato u otro contraión. El contraión puede ser cualquier resto orgánico o inorgánico que estabiliza la carga en el compuesto original. Además, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener más de un átomo cargado en su estructura. Los casos en que múltiples átomos cargados forman parte de la sal farmacéuticamente aceptable puede tener múltiples contraiones. Por lo tanto, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener uno o más átomos cargados y/o uno o más contraiones.

Otras sales, que no son farmacéuticamente aceptables, pueden ser útiles en la preparación de compuestos de esta invención y se debe considerar que forman un aspecto adicional de la invención. Estas sales, tales como el oxálico o trifluoroacetato, aunque no sean de por sí farmacéuticamente aceptables, pueden ser útiles en la preparación de sales útiles como intermediarios en la obtención de los compuestos de la

invención y sus sales farmacéuticamente aceptables.

Los compuestos de la presente invención pueden existir en forma sólida o líquida. En el estado sólido, pueden existir en forma cristalina o no cristalina, o como una mezcla de estos. El experto en la técnica apreciará que los solvatos farmacéuticamente aceptables se pueden formar de compuestos cristalinos o no cristalinos. En los solvatos cristalinos, las moléculas de solvente se incorporan en la red cristalina durante la cristalización. Los solvatos pueden incluir solventes no acuosos tales como, pero sin limitación, etanol, isopropanol, DMSO, ácido acético, etanolamina, o acetato de etilo, o pueden incluir agua como el solvente que se incorpora en la red cristalina. Los solvatos el que el agua es el solvente incorporado en la red cristalina se denominan típicamente como "hidratos". Los hidratos incluyen hidratos estequiométricos así como composiciones que contienen cantidades variables de agua. La invención incluye todos estos solvatos.

El experto en la técnica apreciará además que ciertos compuestos de la invención que existen en forma cristalina, incluyendo los diversos solvatos de estos, pueden presentar polimorfismo (es decir, la capacidad de aparecer en diferentes estructuras cristalinas). Estas formas cristalinas diferentes se conocen normalmente como "polimorfos". La invención incluye todos estos polimorfos. Los polimorfos tienen la misma composición química pero difieren en el empacamiento, disposición geométrica, y otras propiedades descriptivas del estado sólido cristalino. Los polimorfos, por lo tanto, pueden tener diferentes propiedades físicas, tales como forma, densidad, dureza, deformabilidad, estabilidad, y propiedades de disolución. Los polimorfos normalmente exhiben diferentes puntos de fusión, espectros de IR y los patrones de difracción de polvo de rayos X, que se pueden usar para la identificación. El

experto en la técnica apreciará que diferentes polimorfos se pueden producir, por ejemplo, cambiando o ajustando las condiciones o reactivos de reacción, utilizados en la fabricación del compuesto. Por ejemplo, los cambios en la temperatura, presión, o solvente pueden producir polimorfos. Además, un polimorfo puede convertir espontáneamente a otro polimorfo bajo ciertas condiciones.

Los compuestos de la presente invención o una de sus sales pueden existir en formas estereoisómeras (por ejemplo, que contiene uno o más átomos de carbono asimétricos). Los estereoisómeros individuales (enantiómeros y diastereómeros) y las mezclas de estos se incluyen dentro del alcance de la presente invención. Asimismo, se entiende que un compuesto o sal de la fórmula (I) pueden existir en formas tautómeras distintas de las mostradas en la fórmula y también se incluyen dentro del alcance de la presente invención. Es de entenderse que la presente invención incluye todas las combinaciones y subconjuntos de los grupos particulares definidos anteriormente en la presente. El alcance de la presente invención incluye mezclas de estereoisómeros, así como enantiómeros purificados o mezclas enantioméricamente/diastereoméricamente enriquecidas. Es de entenderse que la presente invención incluye todas las combinaciones y subconjuntos de los grupos particulares definidos anteriormente en la presente.

La presente invención también incluye formas marcadas isotópicamente de los compuestos de la presente invención, pero en este caso uno o más átomos se reemplazan por un átomo que tiene una masa atómica o número másico diferente de la masa atómica o número másico encontrado habitualmente en la naturaleza. Los ejemplos de isótopos que pueden incorporarse en compuestos de la invención y sus

sales farmacéuticamente aceptables incluyen isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, fósforo, azufre, flúor, yodo, y cloro, tales como 2H, 3H, 11C, 13C, 14C, 15N, 17O, 18O, 31P, 32P, 35S, 18F, 36Cl, 123I y 125I.

Los compuestos de la presente invención y sus sales farmacéuticamente aceptables de dichos compuestos que contienen los isótopos mencionados anteriormente y/u otros isótopos de otros átomos están dentro del alcance de la presente invención. Los compuestos de la presente invención marcados con isótopos, por ejemplo aquellos en que se incorporan isótopos radiactivos tales como 3H, 14C, son útiles en ensayos de fármacos y/o de distribución en tejidos sustrato. Los isótopos tritiados, es decir, 3H, y carbono–14, es decir, 14C, se utilizan comúnmente por su facilidad de preparación y detectabilidad. Los isótopos 11C y 18F son útiles en PET (tomografía por emisión de positrones), y los isótopos 125I son útiles en SPECT (tomografía computada de emisión de fotón único), todos útiles en los exámenes de imágenes del cerebro. Además, la sustitución con isótopos más pesados tales como deuterio, es decir, 2H, puede proporcionar ciertas ventajas terapéuticas resultantes de una mayor estabilidad metabólica, por ejemplo aumento de la vida media in vivo o reducción de los requerimientos de dosificación y, por lo tanto, se pueden preferir en algunas circunstancias. Los compuestos marcados isotópicamente de la fórmula I y siguientes de esta invención se pueden preparar generalmente llevando a cabo los procedimientos descritos en los Esquemas y/o en los Ejemplos siguientes, mediante la sustitución de un reactivo marcado isotópicamente fácilmente disponible por un reactivo no marcado isotópicamente.

COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS DE ADCS

Las formulaciones farmacéuticas de los conjugados anticuerpo–fármaco (ADC) terapéuticos de la invención se preparan típicamente para la administración parenteral, es decir, inyección en bolo, intravenosa, intratumoral con un vehículo parenteral farmacéuticamente aceptable y en una forma inyectable de dosis unitaria. Un conjugado anticuerpo–fármaco (ADC) que tiene el grado de pureza deseado está opcionalmente mezclado con diluyentes, portadores, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables (de Remington Pharmaceutical Sciences (1980) 16ª edición, Osol, A. Ed.), en la forma de una formulación liofilizada o una solución acuosa.

ANTICUERPOS MANIPULADOS GENÉTICAMENTE CON CISTEÍNA

Los compuestos de la invención incluyen conjugados de anticuerpo–fármaco que comprenden anticuerpos manipulados genéticamente con cisteína donde uno o más aminoácidos de un anticuerpo tipo salvaje o progenitor se sustituyen con un aminoácido cisteína. Cualquier forma de anticuerpo se manipular genéticamente de este modo, es decir mutar. Por ejemplo, un fragmento de anticuerpo Fab progenitor se puede manipular genéticamente para formar un Fab manipulado genéticamente con cisteína, denominado en la presente como "TioFab". De manera similar, un anticuerpo monoclonal progenitor puede manipular genéticamente para formar un "TioMab." Cabe señalar que una mutación de sitio único produce un residuo de cisteína manipulado genéticamente único en un TioFab, mientras que una mutación de sitio único produce dos residuos de cisteína manipulados genéticamente en un TioMab, debido a la naturaleza dimérica del anticuerpo IgG. Las mutantes con cisteína /Cys) reemplazada

("manipulada genéticamente") se evalúan para determinar la reactividad de los grupos tiol de cisteína manipulados genéticamente recién introducidos. El valor de la reactividad tiol es un término numérico relativo en el rango de 0 a 1,0 y se puede medir para cualquier anticuerpo manipulado genéticamente con cisteína. Los valores de reactividad tiol de los anticuerpos manipulados genéticamente con cisteína de la invención son en los rangos de 0,6 a 1,0; 0,7 a 1,0; o 0,8 a 1,0.

Para preparar un anticuerpo manipulado genéticamente con cisteína por mutagénesis, el ADN que codifica una variante de la secuencia de aminoácidos del polipéptido de partida se prepara por una variedad de métodos conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen, pero sin limitación, la preparación por mutagénesis dirigida al sitio (o mediada por oligonucleótidos), mutagénesis por PCR, y mutagénesis de cassette de un ADN preparado anteriormente que codifica el polipéptido. Las variantes de anticuerpos recombinantes se pueden construir también por la manipulación de fragmentos de restricción o mediante la PCR de extensión superpuesta con oligonucleótidos sintéticos. Los cebadores mutagénicos codifican el remplazo de codón de la cisteína. Se pueden emplear técnicas de mutagénesis estándar para generar ADN que codifica tales anticuerpos manipulados genéticamente con cisteína mutante. La orientación general puede encontrarse en Sambrook et al Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989; y Ausubel et al Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing y Wiley–Interscience, Nueva York, Nueva York, 1993.

Los aminoácidos cisteína se pueden manipular genéticamente en los sitios reactivos en un anticuerpo y que no forman enlaces disulfuro

intracatenarios o intermoleculares Junutula, et al., 2008b Nature Biotech., 26(8):925–932; Dornan et al (2009) Blood 114(13):2721–2729; US 7521541; US 7723485; WO2009/052249, Shen et al (2012) Nature Biotech., 30(2):184–191; Junutula et al (2008) Jour of Immun. Methods 332:41–52). Los tioles de cisteína manipulada genéticamente pueden reaccionar con reactivos ligadores o los intermediarios de ligador–fármacos de la presente invención que tienen grupos electrófilos con tiol reactivo, tales como maleimida o alfa–halo de amidas para formar ADC con anticuerpos manipulados genéticamente con cisteína (TioMabs) y el resto del fármaco (D). La ubicación del resto de fármaco por lo tanto se puede diseñar, controlar y conocer. La carga de fármaco se puede controlar ya que los grupos tiol de cisteína manipulada genéticamente normalmente reaccionan con reactivos ligadores con tiol reactivo o intermediarios del ligador–fármaco en un alto rendimiento. La manipulación genética de un anticuerpo para introducir un aminoácido cisteína por sustitución en un solo sitio en la cadena pesada o liviana proporciona dos nuevas cisteínas en el anticuerpo simétrico. Se puede obtener una carga de fármaco cerca de 2 y cerca de la homogeneidad del producto de conjugación ADC.

Los anticuerpos manipulados genéticamente con cisteína de la invención con preferencia retienen la capacidad de unión al antígeno de sus contrapartes de anticuerpos progenitores. Por lo tanto, los anticuerpos manipulados genéticamente con cisteína son capaces de unirse, con preferencia específicamente, a los antígenos. Tales antígenos incluyen, por ejemplo, antígenos asociados a tumores, (TAA), proteínas receptoras de la superficie celular y otras moléculas de la superficie celular, proteínas transmembrana, proteínas de señalización, factores reguladores de la supervivencia celular, factores reguladores de

la proliferación celular, moléculas asociadas con (por ejemplo, se sabe o se sospecha que contribuyen funcionalmente a), desarrollo o diferenciación de tejidos, linfoquinas, citoquinas, moléculas implicadas en la regulación del ciclo celular, moléculas que participan en la vasculogénesis y moléculas asociadas con (por ejemplo, se sabe o se sospecha que contribuyen funcionalmente a) la angiogénesis. El antígeno asociado a tumor puede ser un factor de diferenciación del agrupamiento (es decir, una proteína CD). Un antígeno para el cual un anticuerpo manipulado genéticamente con cisteína es capaz de unirse a un miembro de un subconjunto de una de las categorías mencionadas anteriormente, en donde el otro subconjunto de dicha categoría comprende otras moléculas/antígenos que tienen una característica distintiva (con respecto al antígeno de interés).

Los anticuerpos manipulados genéticamente con cisteína se preparan para la conjugación con intermediarios de ligador–fármaco mediante la reducción y reoxidación de los grupos disulfuro intracatenarios.

ANTÍGENOS ASOCIADOS CON EL TUMOR

Los anticuerpos, que incluyen, pero sin limitación los anticuerpos manipulados genéticamente con cisteína, que pueden ser útiles en los conjugados de anticuerpo–fármaco de la invención en el tratamiento de cáncer incluyen, pero sin limitación, anticuerpos contra receptores de superficie celular y antígenos asociados a tumores (TAA). Ciertos antígenos asociados a tumores son conocidos en la técnica, y se pueden preparar para su uso en la generación de anticuerpos usando métodos e información que son bien conocidos en la técnica. En los intentos por descubrir blancos celulares efectivos para el diagnóstico y la terapia del

cáncer, los investigadores han buscado identificar polipéptidos de transmembrana o de otra manera asociados a tumores que se expresan específicamente en la superficie de uno o más tipos particulares de células de cáncer en comparación con en una o más células no cancerosas. A menudo, dichos polipéptidos asociados a tumores se expresan más abundantemente en la superficie de las células cancerosas en comparación con en la superficie de las células no cancerosas. La identificación de dichos polipéptidos antigénicos de la superficie celular asociados a tumores ha dado origen a la posibilidad de dirigir más específicamente células cancerosas específicas para la destrucción a través de terapias basadas en anticuerpos.

Los ejemplos de antígenos asociados a tumor TAA incluyen, pero sin limitación, los enumerados a continuación. Por conveniencia, la información relativa a estos antígenos, todos los cuales son conocidos en la técnica, se enumera a continuación e incluye nombres, nombres alternativos, números de acceso GenBank y referencias primarias, siguientes convenciones de identificación de secuencias de ácidos nucleicos y proteínas del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Las secuencias de ácidos nucleicos y proteínas correspondientes a TAA listadas a continuación están disponibles en bases de datos públicas tales como GenBank. Los antígenos asociados a tumores dirigidos por anticuerpos incluyen todas las variantes e isoformas de secuencia de aminoácidos que poseen al menos aproximadamente 70%, 80%, 85%, 90%, o 95% de identidad de secuencia con respecto a las secuencias identificadas en las referencias citadas, y/o que exhiben sustancialmente las mismas propiedades biológicas o características que un TAA que tiene una secuencia que se encuentra en las referencias citadas. Por ejemplo, un TAA que tiene una

variante de secuencia generalmente es capaz de unirse específicamente a un anticuerpo que se une específicamente al TAA con la secuencia correspondiente listada. Las secuencias y la descripción de la referencia específicamente mencionada en la presente se incorporan expresamente por referencia.

(1) BMPR1B (proteína receptora morfogenética ósea de tipo IB, N.º de acceso a Genbank NM_001203)

ten Dijke, P., et al Science 264 (5155):101–104 (1994), Oncogene 14 (11):1377–1382 (1997)); WO2004063362 (reivindicación 2); WO2003042661 (reivindicación 12); US2003134790–A1 (página 38–39); WO2002102235 (reivindicación 13; página 296); WO2003055443 (página 91–92); WO200299122 (Ejemplo 2; página 528–530); WO2003029421 (reivindicación 6); WO2003024392 (reivindicación 2; Fig 112); WO200298358 (reivindicación 1; página 183); WO200254940 (página 100–101); WO200259377 (página 349–350); WO200230268 (reivindicación 27; página 376); WO200148204 (Ejemplo; Fig 4)

NP_001194 proteína receptora morfogenética ósea, tipo IB /pid=NP_001194.1 –

Referencias cruzadas: MIM:603248; NP_001194.1; AY065994

(2) E16 (LAT1, SLC7A5, N.º de acceso a Genbank NM_003486)

Biochem. Biophys. Res. Commun. 255 (2), 283–288 (1999), Nature 395 (6699):288–291 (1998), Gaugitsch, H.W., et al (1992) J. Biol. Chem. 267 (16):11267–11273); WO2004048938 (Ejemplo 2); WO2004032842 (Ejemplo IV); WO2003042661 (reivindicación 12); WO2003016475 (reivindicación 1); WO200278524 (Ejemplo 2); WO200299074 (reivindicación 19; página 127–129); WO200286443 (reivindicación 27; páginas 222, 393); WO2003003906 (reivindicación 10; página 293); WO200264798 (reivindicación 33; página 93–95); WO200014228

(reivindicación 5; página 133–136); US2003224454 (Fig 3); WO2003025138 (reivindicación 12; página 150);

NP_003477 familia de portadores de soluto 7 (transportador de aminoácidos catiónicos, sistema y+), miembro 5 /pid=NP_003477.3 – Homo sapiens

Referencias cruzadas: MIM:600182; NP_003477.3; NM_015923; NM_003486_1

(3) STEAP1 (seis antígenos de próstata epitelial transmembrana, N.º de acceso a Genbank NM_012449)

Cancer Res. 61 (15), 5857–5860 (2001), Hubert, R.S., et al (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96 (25):14523–14528); WO2004065577 (reivindicación 6); WO2004027049 (Fig 1L); EP1394274 (Ejemplo 11); WO2004016225 (reivindicación 2); WO2003042661 (reivindicación 12); US2003157089 (Ejemplo 5); US2003185830 (Ejemplo 5); US2003064397 (Fig 2); WO200289747 (Ejemplo 5; página 618–619); WO2003022995 (Ejemplo 9; Fig 13A, Ejemplo 53; página 173, Ejemplo 2; Fig 2A);

NP_036581 seis antígeno epitelial transmembrana de próstata

Referencias cruzadas: MIM:604415; NP_036581.1; NM_012449_1

(4) 0772P (CA125, MUC16, N.º de acceso a Genbank AF361486)

J. Biol. Chem. 276 (29):27371–27375 (2001)); WO2004045553 (reivindicación 14); WO200292836 (reivindicación 6; Fig 12); WO200283866 (reivindicación 15; página 116–121); US2003124140 (Ejemplo 16); Referencias cruzadas: GI:34501467; AAK74120.3; AF361486_1

(5) MPF (MPF, MSLN, SMR, factor de potenciación de megacariocitos, mesotelina, N.º de acceso a Genbank NM_005823) Yamaguchi, N., et al Biol. Chem. 269 (2), 805–808 (1994), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96

(20):11531–11536 (1999), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93 (1):136–140 (1996), J. Biol. Chem. 270 (37):21984–21990 (1995)); WO2003101283 (reivindicación 14); (WO2002102235 (reivindicación 13; página 287–288); WO2002101075 (reivindicación 4; página 308–309); WO200271928 (página 320–321); WO9410312 (página 52–57);

Referencias cruzadas: MIM:601051; NP_005814.2; NM_005823_1

(6) Napi3b/NaPi2b (NAPI–3B, NPTIIb, SLC34A2, familia de portadores de solutos 34 (fosfato de sodio), miembro 2, transportador de fosfato dependiente de sodio de tipo II 3b, N.º de acceso a Genbank NM_006424)

J. Biol. Chem. 277 (22):19665–19672 (2002), Genomics 62 (2):281–284 (1999), Feild, J.A., et al (1999) Biochem. Biophys. Res. Commun. 258 (3):578–582); WO2004022778 (reivindicación 2); EP1394274 (Ejemplo 11); WO2002102235 (reivindicación 13; página 326); EP875569 (reivindicación 1; página 17–19); WO200157188 (reivindicación 20; página 329); WO2004032842 (Ejemplo IV); WO200175177 (reivindicación 24; página 139–140);

Referencias cruzadas: MIM:604217; NP_006415.1; NM_006424_1

(7) Sema 5b (FLJ10372, KIAA1445, Mm.42015, SEMA5B, SEMAG, semaforina 5b Hlog, dominio sema, siete repeticiones de trombospondina (de tipo 1 y símil tipo 1), dominio transmembrana (TM) y dominio citoplásmico corto, (semaforina) 5B, N.º de acceso a Genbank AB040878)

Nagase T., et al (2000) DNA Res. 7 (2):143–150); WO2004000997 (reivindicación 1); WO2003003984 (reivindicación 1); WO200206339 (reivindicación 1; página 50); WO200188133 (reivindicación 1; página 41–43, 48–58); WO2003054152 (reivindicación 20); WO2003101400 (reivindicación 11);

Acceso: Q9P283; EMBL; AB040878; BAA95969.1. Genew; HGNC:10737; (8) PSCA hlg (2700050C12Rik, C530008O16Rik, RIKEN cDNA 2700050C12, RIKEN cDNA 2700050C12 gene, N.º de acceso a Genbank AY358628); Ross et al (2002) Cancer Res. 62:2546–2553; US2003129192 (reivindicación 2); US2004044180 (reivindicación 12); US2004044179 (reivindicación 11); US2003096961 (reivindicación 11); US2003232056 (Ejemplo 5); WO2003105758 (reivindicación 12); US2003206918 (Ejemplo 5); EP1347046 (reivindicación 1); WO2003025148 (reivindicación 20);

Referencias cruzadas: GI:37182378; AAQ88991.1; AY358628_1

(9) ETBR (receptor de endotelina de tipo B, N.º de acceso a Genbank AY275463);

Nakamuta M., et al Biochem. Biophys. Res. Commun. 177, 34–39, 1991; Ogawa Y., et al Biochem. Biophys. Res. Commun. 178, 248–255, 1991; Arai H., et al Jpn. Circ. J. 56, 1303–1307, 1992; Arai H., et al J. Biol. Chem. 268, 3463–3470, 1993; Sakamoto A., Yanagisawa M., et al Biochem. Biophys. Res. Commun. 178, 656–663, 1991; Elshourbagy N.A., et al J. Biol. Chem. 268, 3873–3879, 1993; Haendler B., et al J. Cardiovasc. Pharmacol. 20, s1–S4, 1992; Tsutsumi M., et al Gene 228, 43–49, 1999; Strausberg R.L., et al Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99, 16899–16903, 2002; Bourgeoes C., et al J. Clin. Endocrinol. Metab. 82, 3116–3123, 1997; Okamoto Y., et al Biol. Chem. 272, 21589–21596, 1997; Verheij J.B., et al Am. J. Med. Genet. 108, 223–225, 2002; Hofstra R.M.W., et al Eur. J. Hum. Genet. 5, 180–185, 1997; Puffenberger E.G., et al Cell 79, 1257–1266, 1994; Attie T., et al, Hum. Mol. Genet. 4, 2407–2409, 1995; Auricchio A., et al Hum. Mol. Genet. 5:351–354, 1996; Amiel J., et al Hum. Mol. Genet. 5, 355–357, 1996; Hofstra R.M.W., et al Nat. Genet. 12, 445–447, 1996; Svensson P.J., et al Hum. Genet. 103, 145–

148, 1998; Fuchs S., et al Mol. Med. 7, 115–124, 2001; Pingault V., et al (2002) Hum. Genet. 111, 198–206; WO2004045516 (reivindicación 1); WO2004048938 (Ejemplo 2); WO2004040000 (reivindicación 151); WO2003087768 (reivindicación 1); WO2003016475 (reivindicación 1); WO2003016475 (reivindicación 1); WO200261087 (Fig 1); WO2003016494 (Fig 6); WO2003025138 (reivindicación 12; página 144); WO200198351 (reivindicación 1; página 124–125); EP522868 (reivindicación 8; Fig 2); WO200177172 (reivindicación 1; página 297–299); US2003109676; US6518404 (Fig 3); US5773223 (reivindicación 1a; Col 31–34); WO2004001004;

(10) MSG783 (RNF124, proteína hipotética FLJ20315, N.º de acceso a Genbank NM_017763); WO2003104275 (reivindicación 1); WO2004046342 (Ejemplo 2); WO2003042661 (reivindicación 12); WO2003083074 (reivindicación 14; página 61); WO2003018621 (reivindicación 1); WO2003024392 (reivindicación 2; Fig 93); WO200166689 (Ejemplo 6);

Referencias cruzadas: LocusID:54894; NP_060233.2; NM_017763_1

(11) STEAP2 (HGNC_8639, IPCA–1, PCANAP1, STAMP1, STEAP2, STMP, gen asociado con cáncer de próstata 1, proteína asociada con cáncer de próstata 1, seis antígenos epiteliales transmembrana de próstata 2, seis proteínas de próstata transmembrana, N.º de acceso a Genbank AF455138)

Lab. Invest. 82 (11):1573–1582 (2002)); WO2003087306; US2003064397 (reivindicación 1; Fig 1); WO200272596 (reivindicación 13; página 54–55); WO200172962 (reivindicación 1; Fig 4B); WO2003104270 (reivindicación 11); WO2003104270 (reivindicación 16); US2004005598 (reivindicación 22); WO2003042661 (reivindicación 12); US2003060612 (reivindicación 12; Fig 10); WO200226822

(reivindicación 23; Fig 2); WO200216429 (reivindicación 12; Fig 10);

Referencias cruzadas: GI:22655488; AAN04080.1; AF455138_1

(12) TrpM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, canal de catión potencial del receptor transitorio, subfamilia M, miembro 4, N.º de acceso a Genbank NM_017636)

Xu, X.Z., et al Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98 (19):10692–10697 (2001), Cell 109 (3):397–407 (2002), J. Biol. Chem. 278 (33):30813–30820 (2003)); US2003143557 (reivindicación 4); WO200040614 (reivindicación 14; página 100–103); WO200210382 (reivindicación 1; Fig 9A); WO2003042661 (reivindicación 12); WO200230268 (reivindicación 27; página 391); US2003219806 (reivindicación 4); WO200162794 (reivindicación 14; Fig 1A–D);

Referencias cruzadas: MIM:606936; NP_060106.2; NM_017636_1

(13) CRIPTO (CR, CR1, CRGF, CRIPTO, TDGF1, factor de crecimiento derivado de teratocarcinoma, N.º de acceso a Genbank NP_003203 or NM_003212)

Ciccodicola, A., et al EMBO J. 8 (7):1987–1991 (1989), Am. J. Hum. Genet. 49 (3):555–565 (1991)); US2003224411 (reivindicación 1); WO2003083041 (Ejemplo 1); WO2003034984 (reivindicación 12); WO200288170 (reivindicación 2; página 52–53); WO2003024392 (reivindicación 2; Fig 58); WO200216413 (reivindicación 1; página 94–95, 105); WO200222808 (reivindicación 2; Fig 1); US5854399 (Ejemplo 2; Col 17–18); US5792616 (Fig 2);

Referencias cruzadas: MIM:187395; NP_003203.1; NM_003212_1

(14) CD21 (CR2 (receptor del complemento 2) o C3DR (C3d/receptor del virus de Epstein Barr) o Hs.73792 N.º de acceso a Genbank M26004)

Fujisaku et al (1989) J. Biol. Chem. 264 (4):2118–2125); Weis J.J., et al J. Exp. Med. 167, 1047–1066, 1988; Moore M., et al Proc. Natl. Acad.

Sci. U.S.A. 84, 9194–9198, 1987; Barel M., et al Mol. Immunol. 35, 1025–1031, 1998; Weis J.J., et al Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83, 5639–5643, 1986; Sinha S.K., et al (1993) J. Immunol. 150, 5311–5320; WO2004045520 (Ejemplo 4); US2004005538 (Ejemplo 1); WO2003062401 (reivindicación 9); WO2004045520 (Ejemplo 4); WO9102536 (Fig 9.1–9.9); WO2004020595 (reivindicación 1);

Acceso: P20023; Q13866; Q14212; EMBL; M26004; AAA35786.1.

(15) CD79b (CD79B, CD79β, IGb (asociado con inmunoglobulina beta), B29, N.º de acceso a Genbank NM_000626 o 11038674)

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2003) 100 (7):4126–4131, Blood (2002) 100 (9):3068–3076, Muller et al (1992) Eur. J. Immunol. 22 (6):1621–1625); WO2004016225 (reivindicación 2, Fig 140); WO2003087768, US2004101874 (reivindicación 1, página 102); WO2003062401 (reivindicación 9); WO200278524 (Ejemplo 2); US2002150573 (reivindicación 5, página 15); US5644033; WO2003048202 (reivindicación 1, páginas 306 and 309); WO 99/558658, US6534482 (reivindicación 13, Fig 17A/B); WO200055351 (reivindicación 11, páginas 1145–1146);

Referencias cruzadas: MIM:147245; NP_000617.1; NM_000626_1

(16) FcRH2 (IFGP4, IRTA4, SPAP1A (dominio SH2 que contiene proteína de ancla de fosfatasa 1a), SPAP1B, SPAP1C, N.º de acceso a Genbank NM_030764, AY358130)

Genome Res. 13 (10):2265–2270 (2003), Immunogenetics 54 (2):87–95 (2002), Blood 99 (8):2662–2669 (2002), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98 (17):9772–9777 (2001), Xu, M.J., et al (2001) Biochem. Biophys. Res. Commun. 280 (3):768–775; WO2004016225 (reivindicación 2); WO2003077836; WO200138490 (reivindicación 5; Fig 18D–1–18D–2); WO2003097803 (reivindicación 12); WO2003089624 (reivindicación 25);

Referencias cruzadas: MIM:606509; NP_110391.2; NM_030764_1

(17) HER2 (ErbB2, N.º de acceso a Genbank M11730)

Coussens L., et al Science (1985) 230(4730):1132–1139); Yamamoto T., et al Nature 319, 230–234, 1986; Semba K., et al Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82, 6497–6501, 1985; Swiercz J.M., et al J. Cell Biol. 165, 869–880, 2004; Kuhns J.J., et al J. Biol. Chem. 274, 36422–36427, 1999; Cho H.–S., et al Nature 421, 756–760, 2003; Ehsani A., et al (1993) Genomics 15, 426–429; WO2004048938 (Ejemplo 2); WO2004027049 (Fig 1I); WO2004009622; WO2003081210; WO2003089904 (reivindicación 9); WO2003016475 (reivindicación 1); US2003118592; WO2003008537 (reivindicación 1); WO2003055439 (reivindicación 29; Fig 1A–B); WO2003025228 (reivindicación 37; Fig 5C); WO200222636 (Ejemplo 13; página 95–107); WO200212341 (reivindicación 68; Fig 7); WO200213847 (página 71–74); WO200214503 (página 114–117); WO200153463 (reivindicación 2; página 41–46); WO200141787 (página 15); WO200044899 (reivindicación 52; Fig 7); WO200020579 (reivindicación 3; Fig 2); US5869445 (reivindicación 3; Col 31–38); WO9630514 (reivindicación 2; página 56–61); EP1439393 (reivindicación 7); WO2004043361 (reivindicación 7); WO2004022709; WO200100244 (Ejemplo 3; Fig 4);

Acceso: P04626; EMBL; M11767; AAA35808.1. EMBL; M11761; AAA35808.1.

(18) NCA (CEACAM6, N.º de acceso a Genbank M18728);

Barnett T., et al Genomics 3, 59–66, 1988; Tawaragi Y., et al Biochem. Biophys. Res. Commun. 150, 89–96, 1988; Strausberg R.L., et al Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99:16899–16903, 2002; WO2004063709; EP1439393 (reivindicación 7); WO2004044178 (Ejemplo 4); WO2004031238; WO2003042661 (reivindicación 12); WO200278524

(Ejemplo 2); WO200286443 (reivindicación 27; página 427); WO200260317 (reivindicación 2);

Acceso: P40199; Q14920; EMBL; M29541; AAA59915.1. EMBL; M18728;

(19) MDP (DPEP1, N.º de acceso a Genbank BC017023)

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99 (26):16899–16903 (2002)); WO2003016475 (reivindicación 1); WO200264798 (reivindicación 33; página 85–87); JP05003790 (Fig 6–8); WO9946284 (Fig 9);

Referencias cruzadas: MIM:179780; AAH17023.1; BC017023_1

(20) IL20Rα (IL20Ra, ZCYTOR7, N.º de acceso a Genbank AF184971);

Clark H.F., et al Genome Res. 13, 2265–2270, 2003; Mungall A.J., et al Nature 425, 805–811, 2003; Blumberg H., et al Cell 104, 9–19, 2001; Dumoutier L., et al J. Immunol. 167, 3545–3549, 2001; Parrish–Novak J., et al J. Biol. Chem. 277, 47517–47523, 2002; Pletnev S., et al (2003) Biochemistry 42:12617–12624; Sheikh F., et al (2004) J. Immunol. 172, 2006–2010; EP1394274 (Ejemplo 11); US2004005320 (Ejemplo 5); WO2003029262 (página 74–75); WO2003002717 (reivindicación 2; página 63); WO200222153 (página 45–47); US2002042366 (página 20–21); WO200146261 (página 57–59); WO200146232 (página 63–65); WO9837193 (reivindicación 1; página 55–59);

Acceso: Q9UHF4; Q6UWA9; Q96SH8; EMBL; AF184971; AAF01320.1.

(21) Brevican (BCAN, BEHAB, N.º de acceso a Genbank AF229053)

Gary S.C., et al Gene 256, 139–147, 2000; Clark H.F., et al Genome Res. 13, 2265–2270, 2003; Strausberg R.L., et al Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99, 16899–16903, 2002; US2003186372 (reivindicación 11); US2003186373 (reivindicación 11); US2003119131 (reivindicación 1; Fig 52); US2003119122 (reivindicación 1; Fig 52); US2003119126 (reivindicación 1); US2003119121 (reivindicación 1; Fig 52);

US2003119129 (reivindicación 1); US2003119130 (reivindicación 1); US2003119128 (reivindicación 1; Fig 52); US2003119125 (reivindicación 1); WO2003016475 (reivindicación 1); WO200202634 (reivindicación 1);

(22) EphB2R (DRT, ERK, Hek5, EPHT3, Tyro5, N.º de acceso a Genbank NM_004442)

Chan, J. and Watt, V.M., Oncogene 6 (6), 1057–1061 (1991) Oncogene 10 (5):897–905 (1995), Annu. Rev. Neurosci. 21:309–345 (1998), Int. Rev. Cytol. 196:177–244 (2000)); WO2003042661 (reivindicación 12); WO200053216 (reivindicación 1; página 41); WO2004065576 (reivindicación 1); WO2004020583 (reivindicación 9); WO2003004529 (página 128–132); WO200053216 (reivindicación 1; página 42);

Referencias cruzadas: MIM:600997; NP_004433.2; NM_004442_1

(23) ASLG659 (B7h, N.º de acceso a Genbank AX092328)

US20040101899 (reivindicación 2); WO2003104399 (reivindicación 11); WO2004000221 (Fig 3); US2003165504 (reivindicación 1); US2003124140 (Ejemplo 2); US2003065143 (Fig 60); WO2002102235 (reivindicación 13; página 299); US2003091580 (Ejemplo 2); WO200210187 (reivindicación 6; Fig 10); WO200194641 (reivindicación 12; Fig 7b); WO200202624 (reivindicación 13; Fig 1A–1B); US2002034749 (reivindicación 54; página 45–46); WO200206317 (Ejemplo 2; página 320–321, reivindicación 34; página 321–322); WO200271928 (página 468–469); WO200202587 (Ejemplo 1; Fig 1); WO200140269 (Ejemplo 3; páginas 190–192); WO200036107 (Ejemplo 2; página 205–207); WO2004053079 (reivindicación 12); WO2003004989 (reivindicación 1); WO200271928 (página 233–234, 452–453); WO 0116318;

(24) PSCA (precursor de antígeno de células madre de próstata, N.º de acceso a Genbank AJ297436)

Reiter R.E., et al Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95, 1735–1740, 1998; Gu Z., et al Oncogene 19, 1288–1296, 2000; Biochem. Biophys. Res. Commun. (2000) 275(3):783–788; WO2004022709; EP1394274 (Ejemplo 11); US2004018553 (reivindicación 17); WO2003008537 (reivindicación 1); WO200281646 (reivindicación 1; página 164); WO2003003906 (reivindicación 10; página 288); WO200140309 (Ejemplo 1; Fig 17); US2001055751 (Ejemplo 1; Fig 1b); WO200032752 (reivindicación 18; Fig 1); WO9851805 (reivindicación 17; página 97); WO9851824 (reivindicación 10; página 94); WO9840403 (reivindicación 2; Fig 1B);

Acceso: O43653; EMBL; AF043498; AAC39607.1.

(25) GEDA (N.º de acceso a Genbank AY260763);

AAP14954 proteína tipo par de fusión de lipoma HMGIC /pid=AAP14954.1 – Homo sapiens

Especie: Homo sapiens (humano)

WO2003054152 (reivindicación 20); WO2003000842 (reivindicación 1); WO2003023013 (Ejemplo 3, reivindicación 20); US2003194704 (reivindicación 45);

Referencias cruzadas: GI:30102449; AAP14954.1; AY260763_1

(26) BAFF–R (receptor del factor activante de células B, receptor BLyS 3, BR3, N.º de acceso a Genbank AF116456); BAFF receptor /pid=NP_443177.1 – Homo sapiens

Thompson, J.S., et al Science 293 (5537), 2108–2111 (2001); WO2004058309; WO2004011611; WO2003045422 (Ejemplo; página 32–33); WO2003014294 (reivindicación 35; Fig 6B); WO2003035846 (reivindicación 70; página 615–616); WO200294852 (Col 136–137); WO200238766 (reivindicación 3; página 133); WO200224909 (Ejemplo 3; Fig 3);

Referencias cruzadas: MIM:606269; NP_443177.1; NM_052945_1; AF132600

(27) CD22 (isoforma CD22–B del receptor de células B, BL–CAM, Lyb–8, Lyb8, SIGLEC–2, FLJ22814, N.º de acceso a Genbank AK026467);

Wilson et al (1991) J. Exp. Med. 173:137–146; WO2003072036 (reivindicación 1; Fig 1);

Referencias cruzadas: MIM:107266; NP_001762.1; NM_001771_1

(28) CD79a (CD79A, CD79α, asociado con inmunoglobulina alfa, una proteína específica de células B que interactúa de modo covalente con Ig beta (CD79B) y forma un complejo sobre la superficie con moléculas de IgM, transduce una señal implicada en la diferenciación de células B), pI: 4.84, MW: 25028 TM: 2 [P] cromosoma génico: 19q13.2, N.º de acceso a Genbank NP_001774.10)

WO2003088808, US20030228319; WO2003062401 (reivindicación 9); US2002150573 (reivindicación 4, páginas 13–14); WO9958658 (reivindicación 13, Fig 16); WO9207574 (Fig 1); US5644033; Ha et al (1992) J. Immunol. 148(5):1526–1531; Mueller et al (1992) Eur. J. Biochem. 22:1621–1625; Hashimoto et al (1994) Immunogenetics 40(4):287–295; Preud'homme et al (1992) Clin. Exp. Immunol. 90(1):141–146; Yu et al (1992) J. Immunol. 148(2) 633–637; Sakaguchi et al (1988) EMBO J. 7(11):3457–3464;

(29) CXCR5 (receptor 1 de linfoma de Burkitt, un receptor acoplado con la proteína G que es activado por la quimioquina CXCL13, funciones en la migración linfocítica y defensa humoral, desempeña un papel en la infección de HIV–2 y quizás desarrollo de sida, linfoma, mieloma y leucemia); 372 aa, pI: 8.54 MW: 41959 TM: 7 [P] cromosoma génico: 11q23.3, N.º de acceso a Genbank NP_001707.1)

WO2004040000; WO2004015426; US2003105292 (Ejemplo 2);

US6555339 (Ejemplo 2); WO200261087 (Fig 1); WO200157188 (reivindicación 20, página 269); WO200172830 (páginas 12–13); WO200022129 (Ejemplo 1, páginas 152–153, Ejemplo 2, páginas 254–256); WO9928468 (reivindicación 1, página 38); US5440021 (Ejemplo 2, col 49–52); WO9428931 (páginas 56–58); WO9217497 (reivindicación 7, Fig 5); Dobner et al (1992) Eur. J. Immunol. 22:2795–2799; Barella et al (1995) Biochem. J. 309:773–779;

(30) HLA–DOB (subunidad beta de molécula de clase II de MHC (antígeno Ia) que une péptidos y los presenta con linfocitos T CD4+); 273 aa, pI: 6.56 MW: 30820 TM: 1 [P] cromosoma génico: 6p21.3, N.º de acceso a Genbank NP_002111.1)

Tonnelle et al (1985) EMBO J. 4(11):2839–2847; Jonsson et al (1989) Immunogenetics 29(6):411–413; Beck et al (1992) J. Mol. Biol. 228:433–441; Strausberg et al (2002) Proc. Natl. Acad. Sci USA 99:16899–16903; Servenius et al (1987) J. Biol. Chem. 262:8759–8766; Beck et al (1996) J. Mol. Biol. 255:1–13; Naruse et al (2002) Tissue Antigens 59:512–519; WO9958658 (reivindicación 13, Fig 15); US6153408 (Col 35–38); US5976551 (col 168–170); US6011146 (col 145–146); Kasahara et al (1989) Immunogenetics 30(1):66–68; Larhammar et al (1985) J. Biol. Chem. 260(26):14111–14119;

(31) P2X5 (canal iónico 5 regulado por ligando P2X de receptor purinérgico, un canal iónico regulado por ATP extracelular, puede estar implicado en la transmisión sináptica y la neurogénesis, la deficiencia puede contribuir con la patofisiología de inestabilidad detrusora idiopática); 422 aa), pI: 7.63, MW: 47206 TM: 1 [P] cromosoma génico: 17p13.3, N.º de acceso a Genbank NP_002552.2)

Le et al (1997) FEBS Lett. 418(1–2):195–199; WO2004047749; WO2003072035 (reivindicación 10); Touchman et al (2000) Genome

Res. 10:165–173; WO200222660 (reivindicación 20); WO2003093444 (reivindicación 1); WO2003087768 (reivindicación 1); WO2003029277 (página 82);

(32) CD72 (antígeno de diferenciación de células B CD72, Lyb–2) SECUENCIA PROTEICA Full maeaity...tafrfpd (1..359; 359 aa), pI: 8.66, MW: 40225 TM: 1 [P] Cromosoma génico: 9p13.3, N.º de acceso a Genbank NP_001773.1)

WO2004042346 (reivindicación 65); WO2003026493 (páginas 51–52, 57–58); WO200075655 (páginas 105–106); Von Hoegen et al (1990) J. Immunol. 144(12):4870–4877; Strausberg et al (2002) Proc. Natl. Acad. Sci USA 99:16899–16903;

(33) LY64 (antígeno de linfocitos 64 (RP105), proteína de membrana de tipo I de la repetición rica en familia de leucina (LRR), regula la activación de células B y apoptosis, pérdida de función se asocia con mayor actividad patológica en pacientes con lupus eritematoso sistémico); 661 aa, pI: 6.20, MW: 74147 TM: 1 [P] cromosoma génico: 5q12, N.º de acceso a Genbank NP_005573.1)

US2002193567; WO9707198 (reivindicación 11, páginas 39–42); Miura et al (1996) Genomics 38(3):299–304; Miura et al (1998) Blood 92:2815–2822; WO2003083047; WO9744452 (reivindicación 8, páginas 57–61); WO200012130 (páginas 24–26);

(34) FcRH1 (proteína 1 de tipo receptor Fc, un receptor putativo para el dominio Fc de inmunoglobulina que contiene símil Ig de tipo C2 y dominios ITAM, puede tener un papel en la diferenciación de linfocitos B); 429 aa, pI: 5.28, MW: 46925 TM: 1 [P] cromosoma génico: 1q21–1q22, N.º de acceso a Genbank NP_443170.1)

WO2003077836; WO200138490 (reivindicación 6, Fig 18E–1–18–E–2); Davis et al (2001) Proc. Natl. Acad. Sci USA 98(17):9772–9777;

WO2003089624 (reivindicación 8); EP1347046 (reivindicación 1); WO2003089624 (reivindicación 7);

(35) IRTA2 (translocación de receptores de la superfamilia de las inmunoglobulinas asociadas 2, un inmunorreceptor putativo con posibles papeles en el desarrollo de células B y linfomagénesis; desregulación del gen por translocación ocurre en algunas malignidades de células B); 977 aa, pI: 6.88 MW: 106468 TM: 1 [P] cromosoma génico: 1q21, N.º de acceso a Genbank Human: AF343662, AF343663, AF343664, AF343665, AF369794, AF397453, AK090423, AK090475, AL834187, AY358085; Mouse:AK089756, AY158090, AY506558; NP_112571.1 WO2003024392 (reivindicación 2, Fig 97); Nakayama et al (2000) Biochem. Biophys. Res. Commun. 277(1):124–127; WO2003077836; WO200138490 (reivindicación 3, Fig 18B–1–18B–2);

(36) TENB2 (TMEFF2, tomorregulina, TPEF, HPP1, TR, proteoglicano putativo transmembrana, relacionado con la familia de EGF/heregulina de factores de crecimiento y folistatina); 374 aa, NCBI Acceso: AAD55776, AAF91397, AAG49451, NCBI RefSeq: NP_057276; NCBI Gene: 23671; OMIM: 605734; SwissProt Q9UIK5; N.º de acceso a Genbank AF179274; AY358907, CAF85723, CQ782436 WO2004074320 (SEQ ID NO 810); JP2004113151 (SEQ ID NOS 2, 4, 8); WO2003042661 (SEQ ID NO 580); WO2003009814 (SEQ ID NO 411); EP1295944 (páginas 69–70); WO200230268 (página 329); WO200190304 (SEQ ID NO 2706); US2004249130; US2004022727; WO2004063355; US2004197325; US2003232350; US2004005563; US2003124579; Horie et al (2000) Genomics 67:146–152; Uchida et al (1999) Biochem. Biophys. Res. Commun. 266:593–602; Liang et al (2000) Cancer Res. 60:4907–12; Glynne–Jones et al (2001) Int J Cancer. Oct 15;94(2):178–84;

(37) PMEL17 (homólogo de plata; SILV; D12S53E; PMEL17; (SI); (SIL); ME20; gp100) BC001414; BT007202; M32295; M77348; NM_006928; McGlinchey, R.P. et al (2009) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 106 (33), 13731–13736; Kummer, M.P. et al (2009) J. Biol. Chem. 284 (4), 2296–2306;

(38) TMEFF1 (proteína transmembrana con dominios tipo EGF y dos dominios 1 de tipo folistatina; Tomoregulina–1; H7365; C9orf2; C9ORF2; U19878; X83961) NM_080655; NM_003692; Harms, P.W. (2003) Genes Dev. 17 (21), 2624–2629; Gery, S. et al (2003) Oncogene 22 (18):2723–2727;

(39) GDNF–Ra1 (familia GDNF receptor alfa 1; GFRA1; GDNFR; GDNFRA; RETL1; TRNR1; RET1L; GDNFR–alpha1; GFR–ALPHA–1; U95847; BC014962; NM_145793) NM_005264; Kim, M.H. et al (2009) Mol. Cell. Biol. 29 (8), 2264–2277; Treanor, J.J. et al (1996) Nature 382 (6586):80–83;

(40) Ly6E (complejo 6 de antígeno linfocítico, locus E; Ly67,RIG–E,SCA–2,TSA–1) NP_002337.1; NM_002346.2; de Nooij–van Dalen, A.G. et al (2003) Int. J. Cancer 103 (6), 768–774; Zammit, D.J. et al (2002) Mol. Cell. Biol. 22 (3):946–952;

(41) TMEM46 (homólogo de shisa 2 (Xenopus laevis); SHISA2) NP_001007539.1; NM_001007538.1; Furushima, K. et al (2007) Dev. Biol. 306 (2), 480–492; Clark, H.F. et al (2003) Genome Res. 13 (10):2265–2270;

(42) Ly6G6D (complejo 6 de antígeno linfocítico, locus G6D; Ly6–D, MEGT1) NP_067079.2; NM_021246.2; Mallya, M. et al (2002) Genomics 80 (1):113–123; Ribas, G. et al (1999) J. Immunol. 163 (1):278–287;

(43) LGR5 (receptor 5 acoplado con la proteína H que contiene repeticiones ricas en leucina; GPR49, GPR67) NP_003658.1;

NM_003667.2; Salanti, G. et al (2009) Am. J. Epidemiol. 170 (5):537–545; Yamamoto, Y. et al (2003) Hepatology 37 (3):528–533;

(44) RET (ret proto–oncogén; MEN2A; HSCR1; MEN2B; MTC1; (PTC); CDHF12; Hs.168114; RET51; RET–ELE1) NP_066124.1; NM_020975.4; Tsukamoto, H. et al (2009) Cancer Sci. 100 (10):1895–1901; Narita, N. et al (2009) Oncogene 28 (34):3058–3068;

(45) LY6K (complejo 6 de antígeno linfocítico, locus K; LY6K; HSJ001348; FLJ35226) NP_059997.3; NM_017527.3; Ishikawa, N. et al (2007) Cancer Res. 67 (24):11601–11611; de Nooij–van Dalen, A.G. et al (2003) Int. J. Cancer 103 (6):768–774;

(46) GPR19 (receptor 19 acoplado a proteína G; Mm.4787) NP_006134.1; NM_006143.2; Montpetit, A. and Sinnett, D. (1999) Hum. Genet. 105 (1–2):162–164; O'Dowd, B.F. et al (1996) FEBS Lett. 394 (3):325–329;

(47) GPR54 (KISS1 receptor; KISS1R; GPR54; HOT7T175; AXOR12) NP_115940.2; NM_032551.4; Navenot, J.M. et al (2009) Mol. Pharmacol. 75 (6):1300–1306; Hata, K. et al (2009) Anticancer Res. 29 (2):617–623;

(48) ASPHD1 (dominio 1 que contiene aspartato beta–hidroxilasa; LOC253982) NP_859069.2; NM_181718.3; Gerhard, D.S. et al (2004) Genome Res. 14 (10B):2121–2127;

(49) Tirosinasa (TYR; OCAIA; OCA1A; tirosinasa; SHEP3) NP_000363.1; NM_000372.4; Bishop, D.T. et al (2009) Nat. Genet. 41 (8):920–925; Nan, H. et al (2009) Int. J. Cancer 125 (4):909–917;

(50) TMEM118 (proteína del dedo de anillo, transmembrana 2; RNFT2; FLJ14627) NP_001103373.1; NM_001109903.1; Clark, H.F. et al (2003) Genome Res. 13 (10):2265–2270; Scherer, S.E. et al (2006) Nature 440 (7082):346–351

(51) GPR172A (receptor 172A acoplado a proteína G; GPCR41;

FLJ11856; D15Ertd747e) NP_078807.1; NM_024531.3; Ericsson, T.A. et al (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100 (11):6759–6764; Takeda, S. et al (2002) FEBS Lett. 520 (1–3):97–101.

En una forma de realización, el anticuerpo se une con uno o varios de los siguientes polipéptidos: BMPR1B; E16; STEAP1; 0772P; MPF; NaPi2b; Sema 5b; PSCA hlg; ETBR; MSG783; STEAP2; TrpM4; CRIPTO; CD21; CD79b; FcRH2; HER2; NCA; MDP; IL20Rα; Brevican; EphB2R; ASLG659; PSCA; GEDA; BAFF–R; CD22; CD79a; CXCR5; HLA–DOB; P2X5; CD72; LY64; FcRH1; IRTA2; TENB2; PMEL17; TMEFF1; GDNF–Ra1; Ly6E; TMEM46; Ly6G6D; LGR5; RET; LY6K; GPR19; GPR54; ASPHD1; Tyrosinase; TMEM118; GPR172A; and CD33.

En una forma de realización, el anticuerpo se une con BMPR1B;

En una forma de realización, el anticuerpo se une con E16;

En una forma de realización, el anticuerpo se une con STEAP1;

En una forma de realización, el anticuerpo se une con 0772P;

En una forma de realización, el anticuerpo se une con MPF;

En una forma de realización, el anticuerpo se une con NaPi2b;

En una forma de realización, el anticuerpo se une con Sema 5b;

En una forma de realización, el anticuerpo se une con PSCA hlg;

En una forma de realización, el anticuerpo se une con ETBR;

En una forma de realización, el anticuerpo se une con MSG783;

En una forma de realización, el anticuerpo se une con STEAP2;

En una forma de realización, el anticuerpo se une con TrpM4;

En una forma de realización, el anticuerpo se une con CRIPTO;

En una forma de realización, el anticuerpo se une con CD21;

En una forma de realización, el anticuerpo se une con CD79b;

En una forma de realización, el anticuerpo se une con FcRH2;

En una forma de realización, el anticuerpo se une con HER2;

En una forma de realización, el anticuerpo se une con NCA;

En una forma de realización, el anticuerpo se une con MDP;

En una forma de realización, el anticuerpo se une con IL20Rα;

En una forma de realización, el anticuerpo se une con Brevican;

En una forma de realización, el anticuerpo se une con EfB2R;

En una forma de realización, el anticuerpo se une con ASLG659;

En una forma de realización, el anticuerpo se une con PSCA;

En una forma de realización, el anticuerpo se une con GEDA;

En una forma de realización, el anticuerpo se une con BAFF–R;

En una forma de realización, el anticuerpo se une con CD22;

En una forma de realización, el anticuerpo se une con CD79a;

En una forma de realización, el anticuerpo se une con CXCR5;

En una forma de realización, el anticuerpo se une con HLA–DOB;

En una forma de realización, el anticuerpo se une con P2X5;

En una forma de realización, el anticuerpo se une con CD72;

En una forma de realización, el anticuerpo se une con LY64;

En una forma de realización, el anticuerpo se une con FcRH1;

En una forma de realización, el anticuerpo se une con IRTA2;

En una forma de realización, el anticuerpo se une con TENB2;

En una forma de realización, el anticuerpo se une con PMEL17;

En una forma de realización, el anticuerpo se une con TMEFF1;

En una forma de realización, el anticuerpo se une con GDNF–Ra1;

En una forma de realización, el anticuerpo se une con Li6E;

En una forma de realización, el anticuerpo se une con TMEM46;

En una forma de realización, el anticuerpo se une con Li6G6D;

En una forma de realización, el anticuerpo se une con LGR5;

En una forma de realización, el anticuerpo se une con RET;

En una forma de realización, el anticuerpo se une con LY6K;

En una forma de realización, el anticuerpo se une con GPR19;

En una forma de realización, el anticuerpo se une con GPR54;

En una forma de realización, el anticuerpo se une con ASPHD1;

En una forma de realización, el anticuerpo se une con Tirosinase;

En una forma de realización, el anticuerpo se une con TMEM118;

En una forma de realización, el anticuerpo se une con GPR172A;

En una forma de realización, el anticuerpo se une con CD33.

El anticuerpo progenitor también puede ser una proteína de fusión que comprende una secuencia del péptido de unión a albúmina (ABP) (Dennis et al. (2002) “Albumin Binding As A General Strategy For Improving The Pharmacokinetics Of Proteins” J Biol Chem. 277:35035–35043; WO 01/45746). Los anticuerpos de la invención incluyen proteínas de fusión con secuencias ABP enseñadas por: (i) Dennis et al (2002) J Biol Chem. 277: 35035–35.043 en las Tablas III y IV, página 35038; (ii) US 20040001827 en [0076]; y (iii) WO 01/45746 en las páginas 12–13, y todos los cuales se incorporan en la presente por referencia.

Los anticuerpos se pueden producir usando métodos y composiciones recombinantes, por ejemplo, como se describe en US 4816567 y conocido en la técnica. En algunas formas de realización, el anticuerpo se produce en una célula huésped eucariota (por ejemplo, células huésped de mamífero). En algunas formas de realización, el anticuerpo se produce en una célula huésped procariota (por ejemplo, E. coli).

En ciertas formas de realización, una o más modificaciones de aminoácidos se pueden introducir en la región Fc de un anticuerpo proporcionado en la presente, de este modo se genera una variante de la región Fc. La variante de la región Fc puede comprender una

secuencia de la región Fc humana (por ejemplo, una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana) que comprende una modificación de aminoácidos (por ejemplo, una sustitución) en una o más posiciones de aminoácidos.

En ciertas formas de realización, la invención contempla una variante de anticuerpo que posee algunas, pero no todas las funciones efectoras, lo que la hace un candidato deseable para aplicaciones en las que la vida media del anticuerpo in vivo es importante, sin embargo ciertas funciones efectoras (tales como el complemento y ADCC) son innecesarias o perjudiciales. Los ensayos de citotoxicidad in vitro y/o in vivo se pueden llevar a cabo para confirmar la reducción/eliminación de las actividades de CDC y/o ADCC. Por ejemplo, los ensayos de unión del receptor Fc (FcR) se pueden llevar a cabo para asegurar que el anticuerpo carece de unión a FcγR (por lo tanto probablemente carece de actividad ADCC), pero mantiene la capacidad de unión FcRn.

CARGA DEL FÁRMACO DE ADC

La carga de fármaco es el número medio de restos de fármacos por anticuerpo. La carga de fármaco puede variar de 1 a 8 fármacos (D) por anticuerpo (Ab), es decir 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, y 8 restos de fármacos se unen covalentemente al anticuerpo. Las composiciones de ADC incluyen colecciones de anticuerpos conjugados con una variedad de fármacos, de 1 a 8. El número promedio de fármacos por anticuerpo en las preparaciones de ADC de reacciones de conjugación pueden caracterizarse por medios convencionales tales como espectroscopia de masas, ensayo de ELISA, electroforesis, y HPLC. La distribución cuantitativa de los ADC en términos de p también se puede determinar. Por ELISA, se puede determinar el valor promedio de p en una

preparación particular de ADC (Hamblett et al (2004) Clin Cancer Res 10: 7063–7070; Sanderson et al (2005) Clin Cancer Res 11: 843– 852). Sin embargo, la distribución de los valores de p (fármaco) no es discernible por la unión anticuerpo–antígeno y la limitación de detección del ELISA. Además, el ensayo de ELISA para la detección de conjugados de anticuerpo–fármaco no determina donde los restos de fármacos se unen al anticuerpo, tal como los fragmentos de cadena pesada o cadena liviana, o los residuos de aminoácidos particulares. En algunos casos, la separación, purificación y caracterización de los ADC homogéneos donde p es un cierto valor de ADC con otras cargas de fármaco se puede conseguir por medios tales como HPLC de fase inversa o electroforesis.

Para algunos conjugados de anticuerpo–fármaco, p puede estar limitado por el número de sitios de unión en el anticuerpo. Por ejemplo, un anticuerpo puede tener sólo uno o varios grupos tiol de cisteína, o puede tener sólo uno o varios grupos tiol suficientemente reactivos a través del cual se puede unir un ligador. La carga de fármaco superior, por ejemplo, p> 5, puede causar la agregación, insolubilidad, toxicidad, o pérdida de la permeabilidad celular de ciertos conjugados de anticuerpo–fármaco.

Típicamente, menos del máximo teórico de los restos de fármaco se conjuga a un anticuerpo durante una reacción de conjugación. Un anticuerpo puede contener, por ejemplo, muchos restos de lisina que no reaccionan con el intermediario ligador–fármaco (XLD) o reactivo ligador. Sólo los grupos de lisina más reactivos pueden reaccionar con un reactivo ligador de amina reactiva. Además, solo los grupos tiol de cisteína más reactivos pueden reaccionar con un reactivo ligador reactivo con tiol o intermediario ligador–fármaco. Generalmente, los

anticuerpos no contienen muchos, si hubiera, grupos tiol de cisteína libres y reactivos que pueden estar unidos a un resto de fármacos. La mayoría de los residuos de tiol de cisteína de los anticuerpos de los compuestos existen como puentes disulfuro y deben reducirse con un agente reductor tal como ditiotreitol (DTT) o TCEP, bajo condiciones reductoras parciales o totales. La carga (relación fármaco/anticuerpo, "DAR") carga de un ADC se puede controlar de varias maneras diferentes, incluyendo: (i) limitar el exceso molar del intermediario ligador–fármaco o reactivo ligador con respecto al anticuerpo, (ii) limitar el tiempo o temperatura de reacción de conjugación, y (iii) condiciones reductoras parciales o limitantes para la modificación de tiol de cisteína.

Cuando más de un grupo nucleófilo o electrófilo del anticuerpo reacciona con un intermediario ligador–fármaco o reactivo ligador seguido por reactivo de resto de fármaco dímero, luego el producto resultante es una mezcla de conjugado de anticuerpo–fármaco s con una distribución de restos de fármaco unido a un anticuerpo, por ejemplo, 1, 2, 3, etc. Los métodos de cromatografía de líquidos tales como fase polimérica inversa (PLRP) y de interacción hidrofóbica (HIC) pueden separar compuestos en la mezcla por el valor de la carga de fármaco. Las preparaciones de ADC con un valor de carga de fármaco (p) único se pueden aislar, sin embargo, estos ADC de valor de carga único todavía pueden ser mezclas heterogéneas debido a que los restos de fármacos se pueden unir, mediante el ligador, en diferentes sitios en el anticuerpo. En consecuencia, las composiciones de conjugado de anticuerpo–fármaco de la invención incluyen mezclas de compuestos de conjugado de anticuerpo–fármaco en el que el anticuerpo tiene uno o más restos de fármacos y donde los restos de fármaco pueden estar unidos al anticuerpo en varios residuos de aminoácidos.

Restos de fármacos de ejemplo

Maitansina y maitansinoides

En algunas formas de realización, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo conjugado con una o varias moléculas de maitansinoides. Los maitansinoides son derivados de maitansina y son inhibidores mitóticos que actúan inhibiendo la polimerización de tubulina. La maitansina se aisló primero de East African shrub Maitenus serrata (patente U. S. N.º 3896111). Posteriormente, se descubrió que ciertos microbios también producen maitansinoides, tales como maitansinol y ésteres de maitansinol C–3 (patente U. S. N.º 4.151.042). Los maitansinoides sintéticos se revelan, por ejemplo, en las patentes U. S. Nros. 4.137.230, 4.248.870, 4.256.746, 4.260.608, 4.265.814, 4.294.757, 4.307.016, 4.308.268, 4.308.269, 4.309.428, 4.313.946, 4.315.929, 4.317.821, 4.322.348, 4.331.598, 4.361.650, 4.364.866, 4.424.219, 4.450.254, 4.362.663 y 4.371.533.

Los restos farmacológicos de maitansinoides son restos farmacológicos atractivos en conjugados de anticuerpo–fármaco porque son: (i) relativamente accesibles para preparar por fermentación o modificación química o derivación de productos de fermentación, (ii) susceptibles de derivación con grupos funcionales apropiados para conjugación a través de ligadores no disulfuro con anticuerpos, (iii) estables en plasma y (iv) efectivos contra una variedad de líneas celulares tumorales.

Ciertos maitansinoides apropiados para usar como restos farmacológicos de maitansinoides son conocidos en el arte y se pueden aislar de fuentes naturales de acuerdo con métodos conocidos o producidos usando técnicas de ingeniería genética (ver, por ejemplo, Yu et al. (2002)

PNAS 99:7968–7973). Los maitansinoides también se pueden preparar sintéticamente de acuerdo con métodos conocidos.

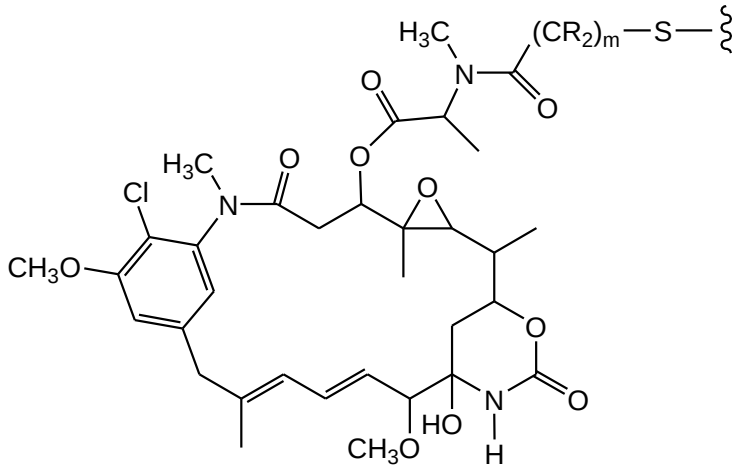
Los restos farmacológicos de maitansinoide de ejemplo incluyen, pero sin limitación, aquellos que tienen un anillo aromático modificado como: C–19–decloro (patente U. S. N.º 4256746) (preparado, por ejemplo, por reducción de hidruro de litio y aluminio de ansamitocina P2); C–20–hidroxi (o C–20–demetilo) +/–C–19–decloro (patentes U. S. Nros. 4361650 y 4307016) (preparados, por ejemplo, por desmetilación usando *Streptomyces* o *Actinomyces* o decloración usando LAH); y C–20–demetoxi, C–20–aciloxi (–OCOR), +/–decloro (patente U. S. N.º 4.294.757) (preparado, por ejemplo, por acilación usando cloruros de acilo) y los que tienen modificaciones en otras posiciones del anillo aromático.

Los restos farmacológicos de maitansinoide de ejemplo también incluyen aquellos que tienen modificaciones tales como: C–9–SH (patente U. S. N.º 4424219) (preparado, por ejemplo, por reacción de maitansinol con H_2S o P_2S_5); C–14–alcoximetil(demetoxi/CH_2 OR)(US 4331598); C–14–hidroximetilo o aciloximetilo (CH_2OH o CH_2OAc) (patente U. S. N.º 4450254) (preparado, por ejemplo, a partir de Nocardia); C–15–hidroxi/aciloxi (patente US 4364866) (preparado, por ejemplo, por conversión de maitansinol por Streptomyces); C–15–metoxi (patente U. S. Nros. 4313946 y 4315929) (por ejemplo, aislado de Trewia nudlflora); C–18–N–demetilo (patentes U. S. Nros. 4362663 y 4322348) (preparado, por ejemplo, por demetilación de maitansinol por Streptomyces); y 4,5–desoxi (US 4371533) (preparado, por ejemplo, por reducción de tricloruro de titanio/LAH de maitansinol).

Muchas posiciones en compuestos de maitansinoide son de utilidad como la posición de ligación. Por ejemplo, una ligación de éster se puede formar por reacción con un grupo hidroxilo usando técnicas de

acoplamiento convencionales. En algunas formas de realización, la reacción se puede producir en la posición C–3 que tiene un grupo hidroxilo, la posición C–14 modificada con hidroximetilo, la posición C–15 modificada con un grupo hidroxilo y la posición C–20 modificada con un grupo hidroxilo. En algunas formas de realización, la ligación está formada en la posición C–3 de maitansinol o un análogo de maitansinol.

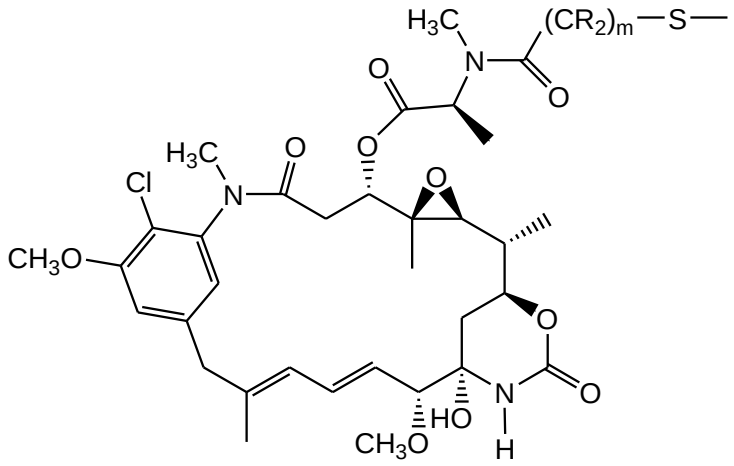
Los restos farmacológicos de maitansinoide incluyen aquellos que tienen la estructura:



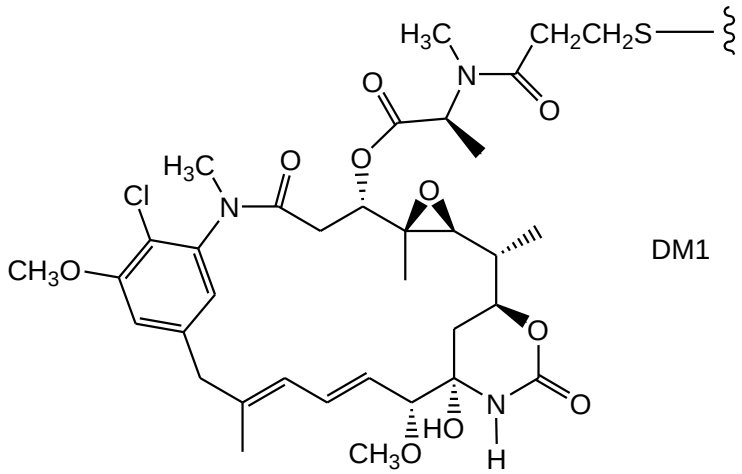
donde la línea ondulada indica la unión covalente del átomo de azufre del resto farmacológico de maitansinoide con un ligador con un ADC. Cada R puede ser, de modo independiente, H o un alquilo C_1–C_6. La cadena de alquileno que une el grupo amida con el átomo de azufre puede ser metanilo, etanilo o propilo, es decir, m es 1, 2 ó 3 (US 633410; US 5208020; Chari et al. (1992) *Cancer Res.* 52:127–131; Liu et al. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 93:8618–8623).

Todos los estereoisómeros del resto farmacológico de maitansinoide se contemplan para el ADC, es decir, cualquier combinación de las configuraciones *R* y *S* en los carbonos quirales (US 7276497; US 6913748; US 6441163; US 633410 (RE39151); US 5208020; Widdison et al. (2006) J.

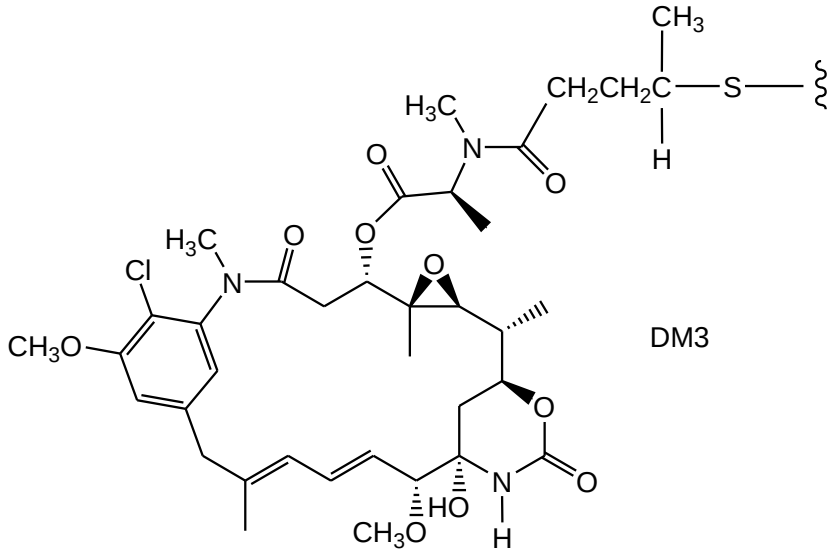
Med. Chem. 49:4392–4408, que se incorporan por referencia en su totalidad). En algunas formas de realización, el resto farmacológico de maitansinoide tiene la siguiente estereoquímica:



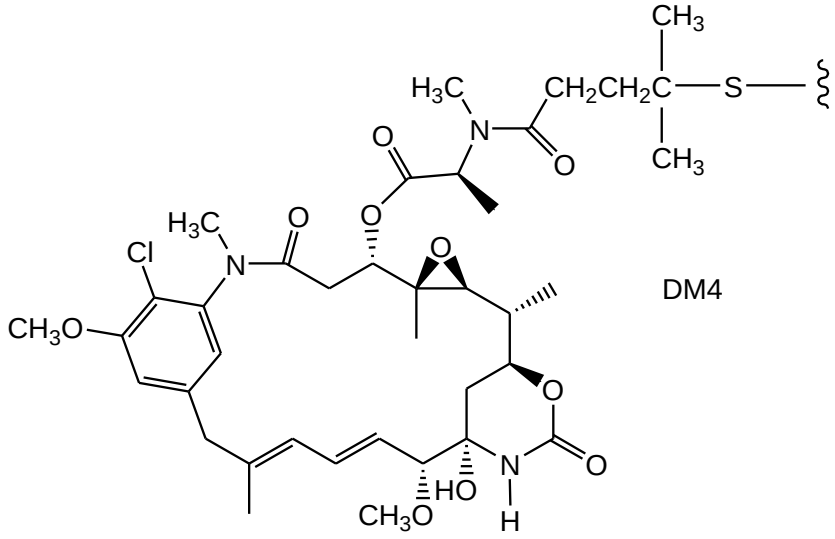
Las formas de realización de restos farmacológicos de maitansinoide de ejemplo incluyen, pero sin limitación, DM1; DM3; y DM4, que tienen las estructuras:



DM1



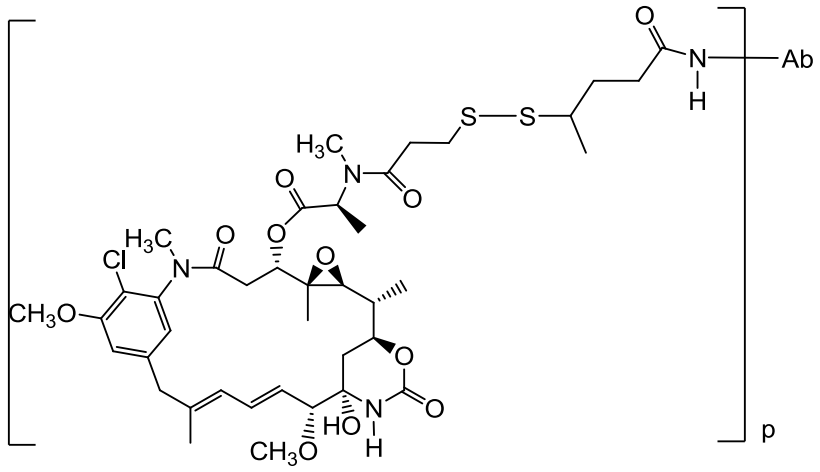
DM3



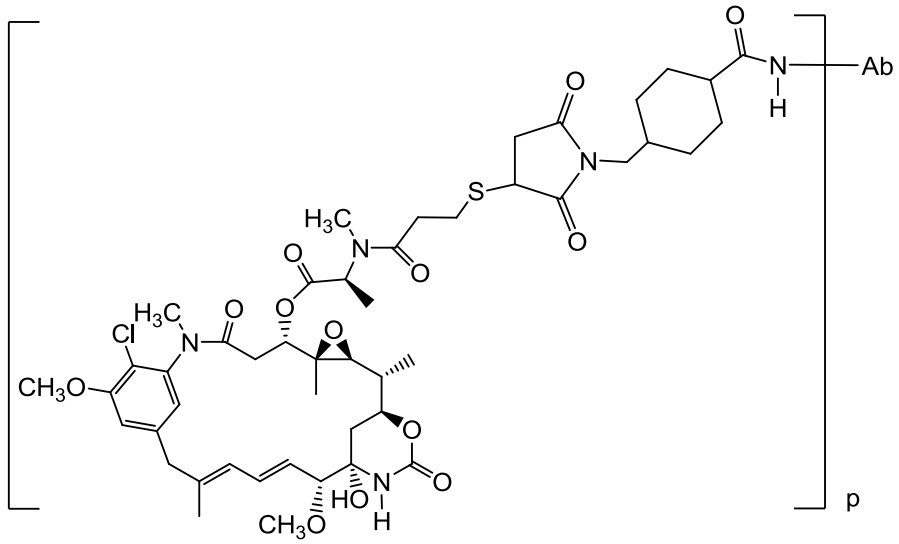
DM4

en donde la línea ondulada indica la unión covalente del átomo de azufre del fármaco con un ligador (L) de un conjugado de anticuerpo–fármaco.

Otros conjugados de anticuerpo–fármaco de maitansinoide de ejemplo tienen las siguientes estructuras y abreviaturas (en donde Ab es anticuerpo y p es 1 a aproximadamente 20. En algunas formas de realización, p es 1 a 10, p es 1 a 7, p es 1 a 5 o p es 1 a 4):

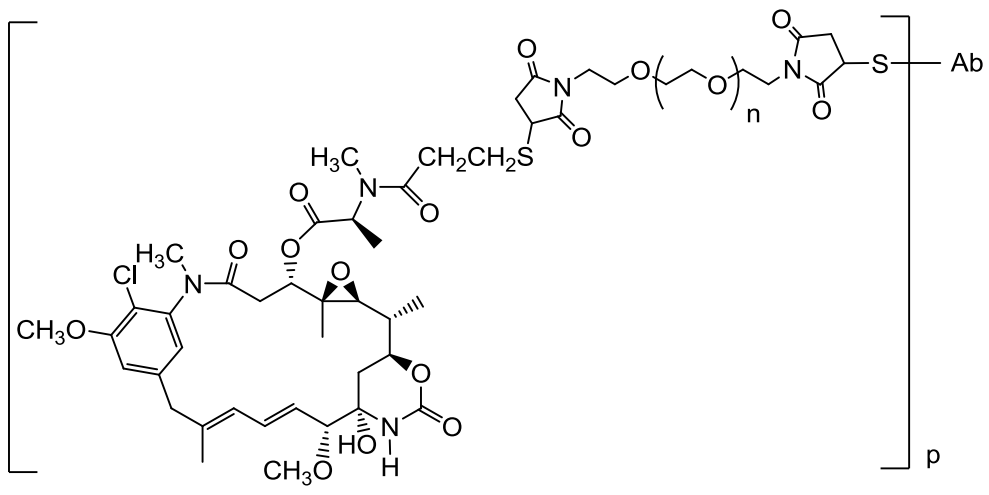


Ab –SPP–DM1



Ab–SMCC–DM1

Los conjugados de anticuerpo–fármaco de ejemplo donde DM1 se liga a través de un ligador BMPEO con un grupo tiol del anticuerpo tienen la estructura y la abreviación:



donde Ab es anticuerpo; n es 0, 1 ó 2; y p es 1 a aproximadamente 20. En algunas formas de realización, p es 1 a 10, p es 1 a 7, p es 1 a 5 o p es 1 a 4.

Los inmunoconjugados que contienen maitansinoides, métodos de preparación de ellos y su uso terapéutico se revelan, por ejemplo, en las patentes U. S. Nros. 5.208.020 y 5.416.064, US 2005/0276812 A1 y la patente europea EP 0 425 235 B1, cuyas descripciones se incorporan expresamente en la presente por referencia. Ver también Liu et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618–8623 (1996); y Chari et al. *Cancer Research* 52:127–131 (1992).

En algunas formas de realización, los conjugados de anticuerpo–maitansinoide se pueden preparar por ligación química de un anticuerpo con una molécula de maitansinoide sin reducir significativamente la actividad biológica del anticuerpo o la molécula de maitansinoide. Ver, por ejemplo, la patente U. S. N.º 5.208.020 (cuya descripción se incorpora aquí expresamente por referencia). En algunas formas de realización, el ADC con un promedio de 3–4 moléculas de maitansinoide conjugadas por molécula de anticuerpo mostró eficacia en la mejora de la citotoxicidad de células blanco sin afectar negativamente la función o la solubilidad del anticuerpo.

En algunas instancias, se espera que incluso una molécula de toxina/anticuerpo mejore la citotoxicidad respecto del anticuerpo desnudo.

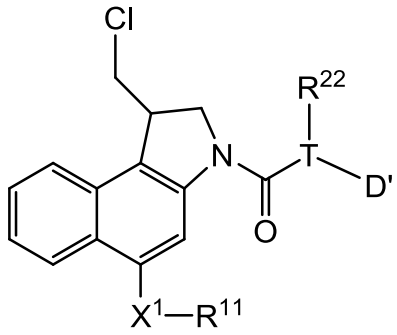
Los grupos ligadores de ejemplo para preparar conjugados de anticuerpo–maitansinoide incluyen, por ejemplo, aquellos descritos en la presente y aquellos descritos en la patente U. S. N.º 5208020; patente EP 0 425 235 B1; Chari et al. *Cancer Research* 52:127–131 (1992); US 2005/0276812 A1; y US 2005/016993 A1, cuyas descripciones se incorporan aquí expresamente por referencia.

Calicheamicina

En algunas formas de realización, el inmunoconjugado comprende un anticuerpo conjugado con una o varias moléculas de calicheamicina. La familia de calicheamicina de antibióticos y sus análogos son capaces de producir roturas de ADN bicatenario en concentraciones subpicomolares (Hinman et al., (1993) *Cancer Research* 53:3336–3342; Lode et al., (1998) *Cancer Research* 58:2925–2928). La calicheamicina tiene sitios intracelulares de acción pero, en ciertas instancias, no cruza con facilidad la membrana plasmática. En consecuencia, la absorción celular de estos agentes a través de la internalización mediada por anticuerpos, en algunas formas de realización, puede mejorar mucho sus efectos citotóxicos. Los métodos de preparación de ejemplo no limitativos de conjugados de anticuerpo–fármaco con un resto farmacológico de calicheamicina se describen, por ejemplo, en los documentos US 5712374, US 5714586, US 5739116 y US 5767285.

Dímeros de CBI

En algunas formas de realización, el resto de fármaco es un dímero CBI que tiene la siguiente fórmula:



donde

R^{11} se selecciona de H, $P(O)_3H_2$, $C(O)NR^{aa}R^{bb}$, o un enlace con L;

R^{22} se selecciona de H, $P(O)_3H_2$, $C(O)NR^{aa}R^{bb}$, o un enlace con L;

R^{aa} y R^{bb} se seleccionan de modo independiente de H y alquilo C_1–C_6 opcionalmente sustituido con uno o más F,

o R^{aa} y R^{bb} forman un grupo heterocicloalquilo de cinco o seis miembros;

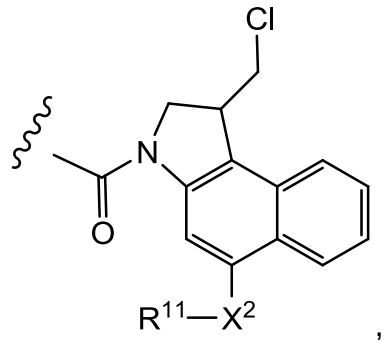
T es un grupo de unión seleccionado de alquileno C_3–C_{12}, Y^1, (alquileno C_1–C_6)– Y^1–(alquileno C_1–C_6), (alquileno C_1–C_6)– Y^1–(alquileno C_1–C_6)–Y^1–(alquileno C_1–C_6), (C_2–C_6alkenilene)– Y^1–(alquenileno C_2–C_6), y (alquinileno C_2–C_6)– Y^1–(alquinileno C_2–C_6);

donde Y^1 se selecciona de modo independiente de O, S, NR^{11}, arilo, y heteroarilo;

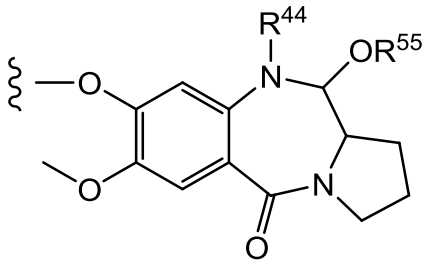
donde el alquileno, alquenileno, arilo, y heteroarilo están sustituidos de modo independiente y opcional con F, OH, O(alquilo C_1–C_6), NH_2, $NHCH_3$, $N(CH_3)_2$, $OP(O)_3H_2$, y alquilo C_1–C_6, donde el alquilo está opcionalmente sustituido con uno o más F;

o alquileno, alquenileno, arilo, y heteroarilo están sustituidos de modo independiente y opcional con un enlace con L;

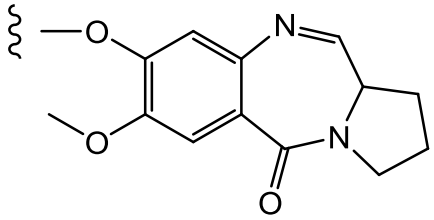
D' es un resto de fármaco seleccionado de:



,



, y



donde la línea ondulada indica el sitio de unión a T;

X^1 y X^2 se seleccionan de modo independiente de O y NR^{33}, donde R^{33} se selecciona de H y alquilo C_1–C_6 opcionalmente sustituido con uno o más F, o X^1 y X^2 están independientemente ausentes;

R^{44} es H, CO_2R, C(O) o un enlace con L, donde R es alquilo C_1–C_6 o bencilo; y

R^{55} es H o alquilo C_1–C_6.

Antibióticos

Los antibióticos que se pueden conjugar a un anticuerpo incluyen clindamicina, novobiocina, retapamulina, daptomicina, GSK–2140944, CG–400 549, sitafloxacina, teicoplanina, triclosan, naftiridona, radezolid, doxorrubicina, ampicilina, vancomicina, imipenem, doripenem, gemcitabina, dalbavancina, y azitromicina. Los mecanismos de acción

bactericida y bacteriostática de tales antibióticos incluyen, pero sin limitación: (i) la inhibición de la pared celular, elongación del peptidoglicano (vancomicina, teicoplanina, dalbavancina); (ii) inhibición de la pared celular, (ii) inhibición de la pared celular, las reticulaciones de proteínas de unión a penicilina (imipenem, doripenem, ampicilina); (iii) despolarización de la membrana celular (daptomicina); (iv) alteración de la replicación del ADN (gemcitabina); (v) unión a ADN (doxorrubicina); (vi) enoil ACP–reductasa FABI (CG–400549, triclosan, naftiridona); (vii) inhibición de la síntesis de la proteína ribosomal, ribosoma 30S (clindamicina, retapamulina, radezolid); y (viii) inhibidores de topoisomerasa (topoIIA) (novobiocina, sitafloxacina, GSK–2140944). Estructuralmente, la mayoría de los antibióticos se pueden agrupar en: (i) aminoglucósidos; (ii) betalactámicos; (iii) macrólidos/péptidos cíclicos; (iv) tetraciclinas; (v) fluoroquinolinas/fluoroquinolonas; (vi) y oxazolidinonas. Ver: Shaw, K. and Barbachyn, M. (2011) Ann. N.Y. Acad. Sci. 1241:48–70; Sutcliffe, J. (2011) Ann. N.Y. Acad. Sci. 1241:122–152.

INDICACIONES Y MÉTODOS DE TRATAMIENTO

Se contempla que los conjugados de anticuerpo–fármaco (ADC) de la presente invención se pueden usar para tratar diversas enfermedades o trastornos, por ejemplo, caracterizado por la sobreexpresión de un antígeno tumoral. Los ejemplos de afecciones o trastornos hiperproliferativos incluyen tumores sólidos benignos o malignos y trastornos hematológicos tales como leucemia y neoplasias linfoides. Otros incluyen trastornos neuronales, gliales, astrocitales, hipotalámicos, glandulares, macrofágicos, epiteliales, estromales, blastocélicos, inflamatorios, angiogénicos e inmunológicos, incluyendo autoinmunes.

En ciertas formas de realización, un ADC de la invención que comprende un anticuerpo anti–NaPi2b, tales como los descritos anteriormente, se utiliza en un método de tratamiento de tumor sólido, por ejemplo, de ovario,

En otra forma de realización, un ADC de la invención que comprende un anticuerpo anti–CD33, tales como los descritos en la presente, se utiliza en un método de tratamiento de neoplasias hematológicas tales como el linfoma no Hodgkin (NHL), linfoma hematopoyético grande difuso, linfoma folicular, linfoma de células del manto, leucemia linfocítica crónica, mieloma múltiple, leucemia mieloide aguda (AML), y leucemia de células mieloides (MCL), y que incluyen los cánceres relacionados con células B y trastornos proliferativos. Ver: US 8226945; Li et al (2013) Mol. Cancer. Ther. 12(7):1255–1265; Polson et al (2010) Leukemia 24:1566–1573; Polson et al (2011) Expert Opin. Investig. Drugs 20(1):75–85, cuyos contenidos se incorporan por referencia.

En otra forma de realización, un ADC de la invención que comprende un anticuerpo anti–MUC16, tales como los descritos en la presente, se utiliza en un método de tratamiento de cánceres de ovario, mama y páncreas. El cáncer puede estar asociado con la expresión o actividad de un polipéptido MUC16/CA125/O772P. Ver: WO 2007/001851; US 7989595; US 8449883; US 7723485; Chen et al (2007) Cancer Res. 67(10): 4924–4932; Junutula, et al., (2008) Nature Biotech., 26(8):925–932, cuyos contenidos se incorporan por referencia.

En ciertas formas de realización, un ADC de la invención que comprende un anticuerpo anti–HER2, tales como los descritos anteriormente, se utiliza en un método de tratamiento del cáncer, por ejemplo, cáncer de mama o gástrico, más específicamente cáncer de

mama HER2 + o gástrico, donde el método comprende la administración de tales ADC a un paciente en necesidad de tal tratamiento. En una de tales formas de realización, el ADC comprende el anticuerpo anti–HER2 trastuzumab o pertuzumab.

Generalmente, la enfermedad o trastorno a tratar es una enfermedad hiperproliferativa tal como el cáncer. Los ejemplos de cáncer para tratar en la presente incluyen, pero sin limitación, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, y leucemia o neoplasias linfoides. Los ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen el cáncer de células escamosas (por ejemplo cáncer de células escamosas epiteliales), cáncer de pulmón incluyen cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma del pulmón y carcinoma escamoso del pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago que incluyen cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de la glándula salival, cáncer renal, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma de pene, así como cáncer de cabeza y cuello.

Las enfermedades autoinmunes para las que el conjugado de anticuerpo–fármaco s se puede usar en el tratamiento incluyen trastornos reumatológicos (tales como, por ejemplo, artritis reumatoide, síndrome de Sjögren, esclerodermia, lupus tal como lupus eritematoso sistémico (SLE) y lupus nefrítico, polimiositis/dermatomiositis, crioglobulinemia, síndrome de anticuerpo anti–fosfolípido, y artritis psoriásica), osteoartritis, trastornos autoinmunes gastrointestinales y del

hígado (tales como, por ejemplo, enfermedades inflamatorias del intestino (por ejemplo, colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn), gastritis autoinmune y anemia perniciosa, hepatitis autoinmune, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria, y enfermedad celíaca), vasculitis (tales como, por ejemplo, vasculitis asociada a ANCA, incluyendo vasculitis de Churg–Strauss, granulomatosis de Wegener, y poliarteriitis), trastornos neurológicos autoinmunes (tales como, por ejemplo, esclerosis múltiple , síndrome opsoclono mioclono, miastenia gravis, neuromielitis óptica, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, y polineuropatías autoinmunes), trastornos renales (tales como, por ejemplo, glomerulonefritis, síndrome de Goodpasture, y la enfermedad de Berger), trastornos dermatológicos autoinmunes (tales como, por ejemplo, psoriasis, urticaria, prurito, pénfigo vulgar, penfigoide bulloso, y lupus eritematoso cutáneo), alteraciones hematológicas (tal como, por ejemplo, púrpura trombocitopénica, púrpura trombocitopénica trombótica, púrpura postransfusional, y anemia hemolítica autoinmune), aterosclerosis, uveítis, enfermedades de audición autoinmunes (tales como, por ejemplo, enfermedad del oído interno y pérdida de la audición), enfermedad de Behcet, síndrome de Raynaud, trasplante de órganos, y trastornos endocrinos autoinmunes (tales como, por ejemplo, enfermedades autoinmunes relacionadas con la diabetes tales como diabetes mellitus dependiente de insulina (IDDM), enfermedad de Addison, y la enfermedad tiroidea autoinmune (por ejemplo, enfermedad de Graves y tiroiditis)). Tales enfermedades más preferidas incluyen, por ejemplo, artritis reumatoide, colitis ulcerosa, vasculitis asociada a ANCA, lupus, esclerosis múltiple, síndrome de Sjögren, enfermedad de Graves, IDDM, anemia perniciosa, tiroiditis, y glomerulonefritis.

Para la prevención o tratamiento de la enfermedad, la dosis

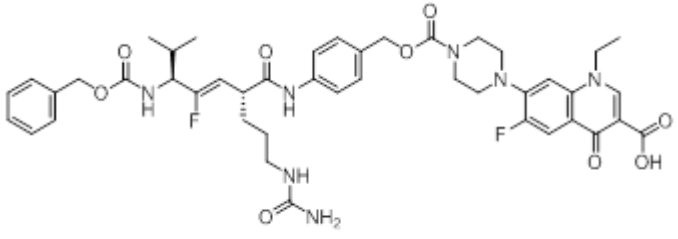
apropiada de un ADC dependerá del tipo de enfermedad a tratar, como se define anteriormente, la gravedad y curso de la enfermedad, si la molécula se administra con fines preventivos o terapéuticos, terapia previa, la historia clínica del paciente y la respuesta al anticuerpo, y el criterio del médico tratante. La molécula se administra convenientemente al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos. De acuerdo con el tipo y gravedad de la enfermedad, aproximadamente 1 μg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo, 0,1–20 mg/kg) de la molécula es una dosis candidata inicial para la administración al paciente, sea, por ejemplo, en una o más administraciones separadas, o mediante infusión continua. Una dosis diaria típica podría oscilar desde aproximadamente 1 μg/kg a 100 mg/kg o más, de acuerdo con los factores mencionados anteriormente. Un ejemplo de dosis de ADC para ser administrada a un paciente se encuentra en el rango de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 mg/kg de peso del paciente.

EJEMPLOS EXPERIMENTALES

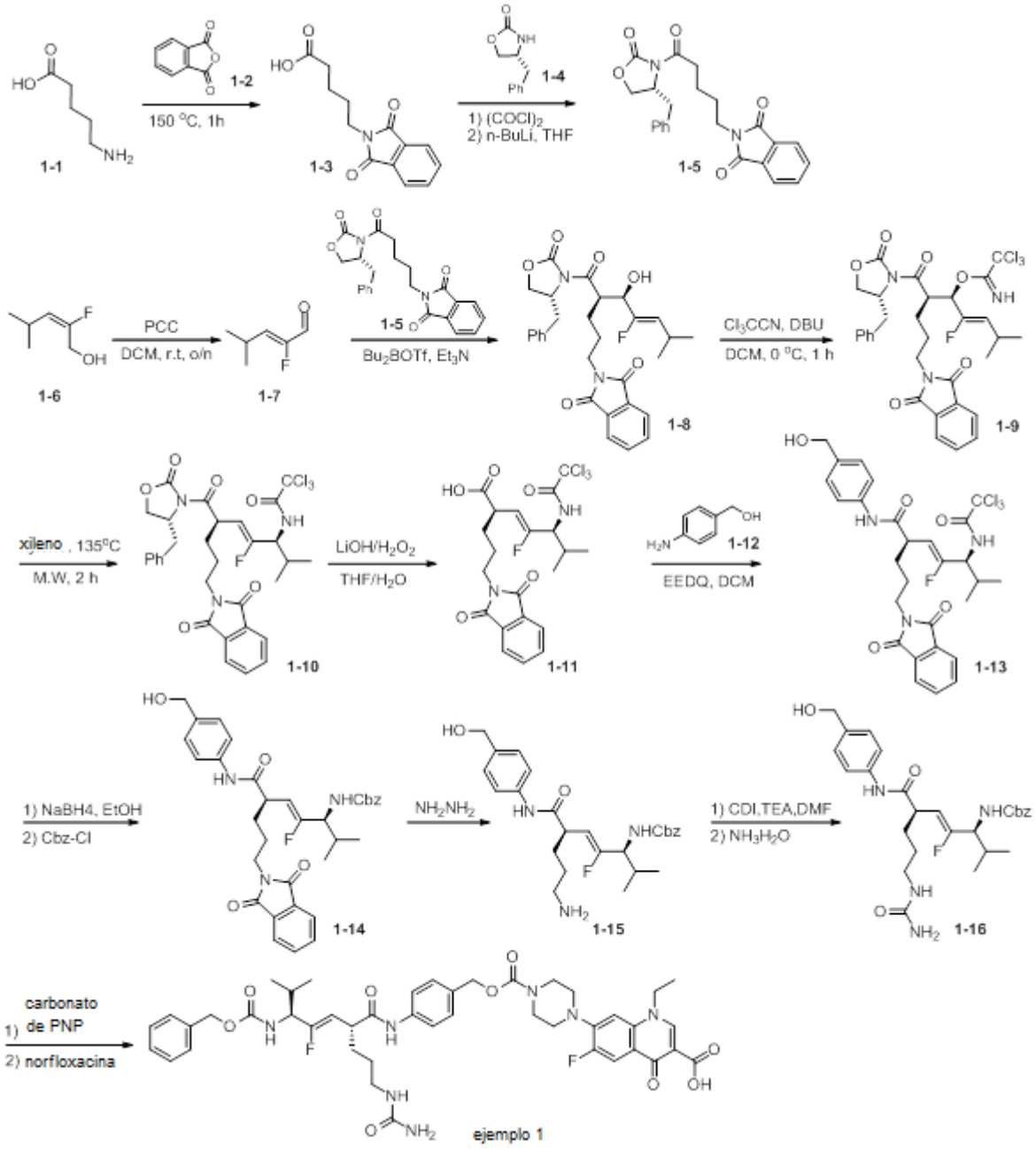
Método de preparación de restos de fármaco de ligador peptidomimético; PCT/US2014/042560 se incorpora por referencia en la presente.

Ejemplo 1.

Ácido 7–(4–((4–((2R,5S,Z)–5–(benciloxicarbonilamino)–4–fluoro–6–metil–2–(3–ureidopropil)hept–3–enamido)benciloxi)carbonil)piperazin–1–il)–1–etil–6–fluoro–4–oxo–1,4–dihidroquinolin–3–carboxílico.



Ejemplo 1



Etapa 1. Una mezcla de **1–1** (10,0 g, 85,36 mmol), **1–2** (13,3 g, 89,79 mmol) se agitó a 150 °C durante 1 h. La mezcla se enfrió hasta 25 °C, el sólido se disolvió en agua caliente. La mezcla se enfrió en un baño de hielo y el precipitado se recolectó por filtración y se lavó con agua. La torta filtrante se secó para dar **1–3** en forma de sólido blanco (19,0 g, 90,0 %).

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO–d_6) δ 11,96 (br, 1H), 7,78 – 7,77 (m, 4H), 3,52 (t, J = 6,8 Hz, 2H), 2,18 (t, J = 7,2 Hz, 2H), 1,59 – 1,51 (m, 2H), 1,47 – 1,41 (m, 2H).

Etapa 2. A una mezcla de **1–3** (9,0 g, 36,40 mmol) en DCM anhidra (100 mL) se añadieron $(COCl)_2$ (15,0 mL, 157,76 mmol), DMF (1 mL) en porciones a temperatura ambiente. Después de agitar la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 0,5 h, se concentró a presión reducida. El residuo se coevaporó con THF anhidro (60 mL) para dar el cloruro de acilo en forma de un sólido amarillo.

A una mezcla de **1–4** (6,6 g, 37,25 mmol) en THF anhidro (60 mL) se añadió n–BuLi (15,0 mL, 2,5 M, 37,5 mmol) en porciones a –78 ^{o}C bajo N_2. El cloruro de acilo en THF (40 mL) se añadió lentamente en la mezcla a –78 ^{o}C. La mezcla de reacción se agitó a –78 ^{o}C durante 15 min y se neutralizó con solución ac. de NH_4Cl (30 mL). La mezcla se dividió en EtOAc y agua. Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na_2SO_4, se filtraron y se concentraron. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (PE/EtOAc 3:1) para dar el compuesto crudo **1–5** en forma de sólido blanco (13,0 g, 87,9%).

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO–d_6) δ 7,89 – 7,83 (m, 4H), 7,32 – 7,28 (m, 2H), 7,25 – 7,22 (m, 1H), 7,19 – 7,17 (m, 2H), 4,66 – 4,60 (m, 1H), 4,30 (t, J = 8,4 Hz, 1H), 4,17 (dd, J = 9,2, 2,8 Hz, 1H), 3,61 (t, J = 6,4 Hz, 2H), 3,00 – 2,78 (m, 4H), 1,70 – 1,60 (m, 4H).

Etapa 3. A una solución de **1–6** (3,0 g, 25,39 mmol) en DCM (100 mL) se añadió PCC (10,9 g, 50,78 mmol). Después de agitar la mezcla a 25 ^{o}C durante 16 h bajo N_2, se filtró a través de un tapón de sílice. El filtrado se concentró a presión reducida a una temperatura de baño de 25 ^{o}C para dar el compuesto **1–7** en forma de un aceite (1,8 g, 61,0 %).

^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9,18 (d, J = 18,4Hz, 1 H), 5,79 (dd, J

=32,8, 9,2 Hz, 1 H), 3,02 – 2,93 (m, 1 H), 1,13 (d, *J* = 6,8 Hz, 6 H).

Etapa 4. Una solución de **1–5** (6,0 g, 14,7 mmol) en DCM (20 mL) se enfrió hasta 0 ºC con en un baño de hielo. Bu_2BOTf en DCM (1 M, 15 mL, 15 mmol) se añadió en porciones, seguido por Et_3N (3,03 g, 30 mmol) a una tasa para mantener la temperatura interna a menos de 3 ºC. El baño de hielo se reemplazó por un baño de hielo seco–acetona. Cuando la temperatura interna cayó a menos de –65 ºC, el compuesto **1–7** (1,5 g, 12,9 mmol) en DCM (10 mL) se añadió en porciones. La solución se agitó durante 20 min en el baño de hielo seco–acetona, luego durante 1 h a la temperatura del baño de hielo. La mezcla de reacción se neutralizó con tampón acuoso de fosfato (pH = 7,0, 20 mL) y MeOH (10 mL). A esta solución turbia se añadió una mezcla de MeOH/30% de H_2O_2 (2:1, 20 mL) a una tasa para mantener la temperatura interna a menos de 10 ºC. Después de agitar la solución durante una hora adicional, el compuesto volátil se removió en un evaporador rotativo a una temperatura de baño de 25–30 ^oC. La suspensión se extrajo con EtOAc (50 mL × 3). La capa orgánica combinada se lavó con solución saturada de Na_2SO_3 (15 mL), solución al 5% de $NaHCO_3$ (30 mL) y salmuera (25 mL), se secó sobre Na_2SO_4, se filtró y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (PE/EtOAc 3:1) para dar **1–8** crudo en forma de aceite (4,0 g, 59,7%).

LCMS (ESI): m/z 505,0 [M–17].

Etapa 5. A una solución de **1–8** (4,0 g, 7,65 mmol) y Cl_3CCN (1,67 g, 11,48 mmol) en DCM (20 mL) se añadió DBU (234 mg, 1,53 mmol) a 0 ^oC bajo N_2. La mezcla se agitó a 0 ^oC durante 1 h. Después de la eliminación del solvente, el residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (5%–20% de petróleo en EtOAc) para dar **1–9**

(3,0 g, 58,8%).

LCMS (ESI): m/z 505,1 [M–160].

^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8,47 (s, 1H), 7,83 – 7,80 (m, 2H), 7,72 – 7,69 (m, 2H), 7,36 – 7,28 (m, 2H), 7,28 – 7,22 (m, 3H), 5,69 – 5,63 (q, 1H), 4,89 (dd, *J* = 37,6, 9,6 Hz, 1H), 4,63 – 4,58 (m, 2H), 4,20 – 4,11 (m, 2H), 3,74 – 3,69 (m, 2H), 3,35 (dd, *J* = 13,2, 3,2 Hz, 1H), 2,78 – 2,69 (m, 2H), 1,99 – 1,85 (m, 2H), 1,80 – 1,76 (m, 2H), 0,96 – 0,92 (q, 6H).

Etapa 6. Una solución de **1–9** (3,0 g, 4,50 mmol) en xileno (5 mL) se calentó en microondas durante 2 h a 135 ºC. La mezcla se enfrió hasta 25 ^{o}C y se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (5%–10%–50% de PE en EtOAc) para dar **1–10** (1,4 g, 46,7%).

LCMS (ESI): m/z 685,0 [M+H_2O].

^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,83 – 7,81 (m, 2H), 7,71 – 7,69 (m, 2H), 7,36 – 7,32 (m, 2H), 7,29 – 7,25 (m, 1H), 7,21 – 7,19 (m, 2H), 6,90 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H), 5,11 (dd, *J* = 36,4, 9,6 Hz, 1H), 4,81 – 4,76 (m, 1H), 4,68 – 4,64 (m, 1H), 4,30 – 4,16 (m, 3H), 3,75 – 3,68 (m, 2H), 3,27 (dd, *J* = 13,2, 3,2 Hz, 1H), 2,80 – 2,74 (q, 1H), 2,08–2,05 (m, 1H), 1,93 – 1,90 (m, 1H), 1,76 – 1,70 (m, 2H), 1,65 – 1,62 (m, 1H), 1,00 (dd, *J* = 6,8, 3,2 Hz, 6H).

Etapa 7. A una solución del compuesto **1–10** (1,4 g, 2,1 mmol) en THF/H_2O (v/v 4:1, 10 mL) se añadió H_2O_2 (1,43 g, 30 % en agua, 12,6 mmol), seguido por $LiOH{\cdot}H_2O$ (264,6 mg, 6,3 mmol). Después de agitar la solución durante 1,5 h a 25 ^{o}C, solución saturada de Na2SO3 (8 mL) se añadió. El solvente se removió y el residuo se extrajo con DCM (20 mL × 2). La solución acuosa se acidificó a pH = 1 con HCl 1 M, se extrajo con EtOAc/MeOH (10/1, 25 mL × 3). La capa orgánica combinada se secó sobre Na_2SO_4, se filtró y se concentró para dar el compuesto **1–11** (1,0 g, 93,4%).

LCMS (ESI): m/z 527,0 [M+Na^+].

Etapa 8. A una solución del compuesto **1–11** (1,0 g, 1,97 mmol) y (4–aminofenil) metanol (364 mg, 2,96 mmol) en DCM/MeOH (v/v 2:1, 7,5 mL) se añadió EEDQ (732 mg, 2,96 mmol) a 0 ºC bajo N_2. La mezcla se agitó a 25 ºC durante 16 h. El solvente se removió, el residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (30% de petróleo en EtOAc) para dar el compuesto crudo **1–13** (1,0 g, 82,8 %).

LCMS (ESI): m/z 614,0 [M+H^+].

Etapa 9. A una solución del compuesto **1–13** (1,0 g, 1,63 mmol) en EtOH (15 mL) se añadió $NaBH_4$ (364,8 mg, 9,60 mmol) a 0 ºC. La mezcla se agitó a 25 ºC durante 2 h y agua (10 mL) se añadió para neutralizar la reacción. A continuación, Cbz–Cl (410,4 mg, 2,40 mmol) se añadió en porciones a 0 ºC. La mezcla se agitó a 0 ºC durante 1 h. La mezcla se diluyó con agua y se extrajo con DCM (25 mL × 3). La capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4, se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (DCM/MeOH = 20:1~5:1) para dar el compuesto crudo **1–14** (300 mg, 31,2%).

LCMS (ESI): m/z 602,0 [M+H].

Etapa 10. A una solución del compuesto **1–14** (300 mg, 0,498 mmol) en EtOH (10 mL) se añadió $NH_2NH_2.xH_2O$ (48 mg, 50 %, 0,748 mmol) en porciones. La mezcla se calentó a reflujo durante 1 h. La mezcla de reacción se concentró y el residuo (**1–15)** se usó directamente en la siguiente reacción sin ulterior purificación.

Etapa 11. A una solución agitada del compuesto **1–15** (281,0 mg, 0,496 mmol) en DMF (5 mL) se añadió TEA (100 mg, 0,992 mmol) y CDI (162,7 mg, 0,992 mmol). Después de agitar la mezcla a 29 ºC durante 1 h, NH_3H_2O (5 mL) se añadió y la mezcla se agitó a 29 ^oC durante 16 h. La mezcla de reacción se filtró y el filtrado se purificó por HPLC prep para

dar el compuesto **1–16** (50 mg, 19,6 %) en forma de sólido blanco.

LCMS (ESI): m/z 515,1 [M+1].

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO–d_6) δ 9,94 (s, 1H), 7,66 (d, J = 9,2 Hz, 1H), 7,53 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 7,35 – 7,29 (m, 5H), 7,22 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 5,94 (t, J = 6,0 Hz, 1H), 5,36 (s, 2H), 5,10 (t, J = 6,0 Hz, 1H), 5,05 – 4,94 (m, 3H), 4,42 (d, J = 4,2 Hz, 2H), 3,92 – 3,83 (m, 1H), 3,46 – 3,44 (m, 1H), 3,01 – 2,90 (m, 2H), 1,92 – 1,85 (m, 1H), 1,65 – 1,63 (m, 1H), 1,44 – 1,28 (m, 3H), 0,88 (t, J = 6,4 Hz, 6H).

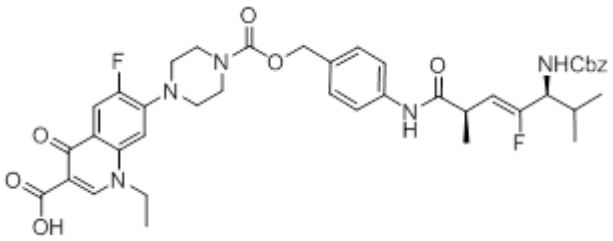
Etapa 12. A la mezcla del compuesto **1–16** (50 mg, 0,097 mmol) en DMF anhidra (3 mL) se añadió DIPEA (63 mg, 0,485 mmol). El carbonato de PNP (87 mg, 0,291 mmol) se añadió a 25 ^{o}C. La mezcla de reacción se agitó a 25 ^{o}C durante 8 h y se añadió norfloxacina (93 mg, 0,291 mmol). Después de agitar la mezcla a 25 ^{o}C durante otras 3 h, se filtró y el filtrado se purificó por HPLC prep para dar el ejemplo **1** (35 mg, 42,0 %).

LCMS (ESI): RT = 0,885 min, M/2+H$^+$ = 430,7. Método = 5–95 /2 min.

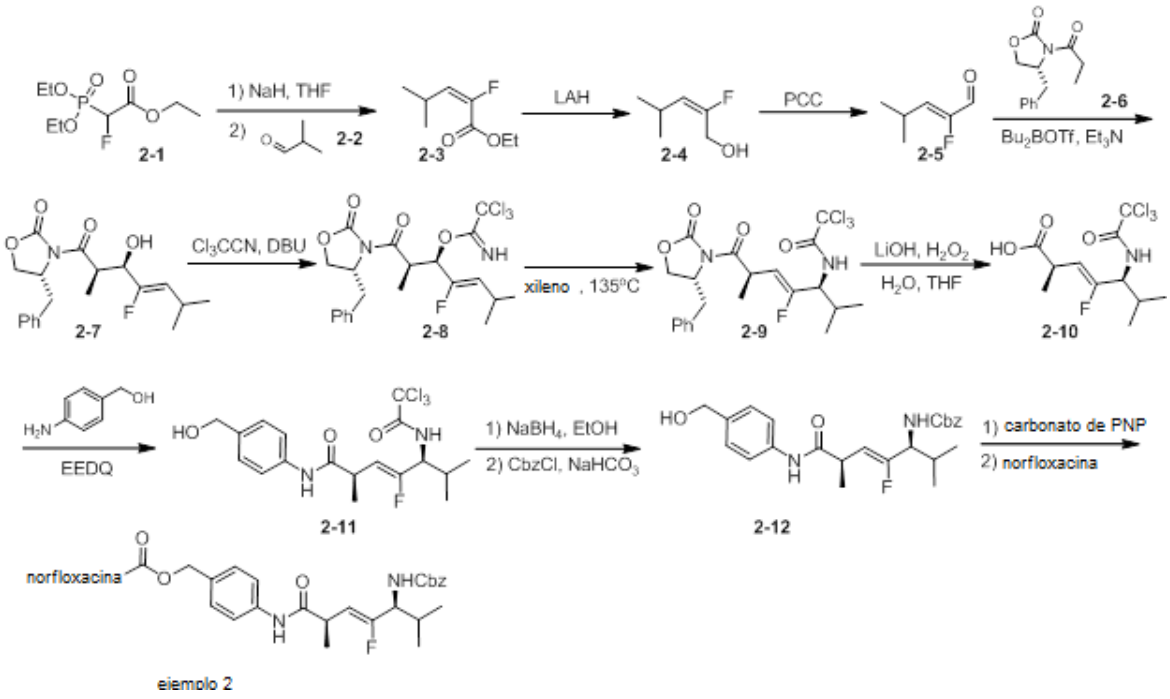
^{1}H RMN (400 MHz, DMSO–d_6) δ 15,32 (s, 1H), 10,04 (s, 1H), 8,95 (s, 1H), 7,94 (d, J = 12,8 Hz, 1H), 7,66 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 7,60 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 7,34 – 7,28 (m, 7H), 7,21 (d, J = 7,2 Hz, 1H), 5,94 (t, J = 5,2 Hz, 1H), 5,36 (s, 2H), 5,06 – 4,94 (m, 5H), 4,59 – 4,57 (q, 2H), 3,92 – 3,84 (m, 1H), 3,61 (s, 4H), 3,49 – 3,43 (q, 1H), 3,33 – 3,31 (m, 4H), 3,01 – 2,90 (m, 2H), 1,90 – 1,83 (m, 1H), 1,68 – 1,65 (m, 1H), 1,41 (d, J = 6,8 Hz, 5H), 1,33 – 1,23 (m, 1H), 0,86 (t, J = 6,8 Hz, 6H).

Ejemplo 2.

Ácido 7–(4–((4–((2R,5S,Z)–5–(benciloxicarbonilamino)–4–fluoro–2,6–dimetilhept–3–enamido)benciloxi)carbonil)piperazin–1–il)–1–etil–6–fluoro–4–oxo–1,4–dihidroquinolin–3–carboxílico



ejemplo 2



Etapa 1. A una mezcla de NaH (1,82 g, 45,5 mmol) en THF (200 mL) se añadió **2–1** (10,0 g, 41,3 mmol) en THF (20 mL) en porciones a 0 ºC. La mezcla se agitó a 0 ºC durante 1 h y luego se enfrió hasta –78 ºC. El compuesto **2–2** (2,98 g, 41,3 mmol) en THF (5 mL) se añadió en porciones y la mezcla se calentó hasta 25 ºC lentamente y se agitó a 25 ºC durante 16 h. Solución saturada de NH4Cl se añadió lentamente a 0 ºC seguido por agua (50 mL) y la mezcla se extrajo con EtOAc (80 mL×2). La capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4, se filtró, se concentró y se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (PE/EtOAc = 50:1) para dar **2–3** (2,2 g, 33%).

^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 5,73 (dd, J = 10,4, 22,0 Hz, 1 H), 4,30 (q, J

= 7,2 Hz, 2 H), 3,37–3,31 (m, 1 H), 1,35 (t, *J* = 7,2 Hz, 3 H), 1,08–1,04 (m, 6 H).

Etapa 2. A una solución de **2–3** (12,0 g, 74,91 mmol) en THF (80 mL) se añadió $LiAlH_4$ (5,69 g, 149,82 mmol) a 0 ºC. Después de agitar la mezcla durante 2 h a 0 ºC, se neutralizó con solución saturada de NH4Cl (1 mL). La capa orgánica solvente se removió a presión reducida y la mezcla se diluyó con agua (50 mL) y se extrajo con EtOAc (100 mL × 2). La capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4, se filtró, se concentró para dar el producto crudo **2–4** (8,0 g).

^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) *δ* 5,06 (dd, *J* = 10,4, 21,2 Hz, 1 H), 4,24 (d, *J* = 21,2 Hz, 2 H), 2,42–2,37 (m, 1 H), 1,03–0,99 (m, 6 H).

Etapa 3. A una solución de **2–4** (8,0 g, 33,86 mmol) en DCM (100 mL) se añadió PCC (29,2 g, 67,72 mmol) a 25 ^{o}C. Después de la mezcla se calentó a reflujo durante 3 h bajo N_2, se enfrió hasta 25 ^{o}C y se filtró a través de un tapón de gel de sílice. El filtrado se concentró para dar **2–5 crudo** (5,1 g).

^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) *δ* 9,19 (d, *J* = 18,0Hz, 1 H), 5,79 (dd, *J* = 9,6, 32,8 Hz, 1 H), 3,01–2,95 (m, 1 H), 1,15–1,13 (m, 6 H).

Etapa 4. Bu_2BOTf en DCM (1M, 66 mL, 66 mmol) se añadió en porciones a la solución de **2–6** (15,37 g, 65,88 mmol) en DCM (200 mL), seguido por Et_3N (8,89 g, 87,84 mmol) a una tasa para mantener la temperatura interna a menos de 3 ºC. Se enfrió hasta –65 ºC y **2–5** (5,1 g, 43,92 mmol) en DCM (10 mL) se añadió en porciones. La solución se agitó durante 20 min en el baño de hielo seco–acetona, luego durante 1 h en un baño de hielo. La mezcla de reacción se neutralizó con un tampón acuoso de fosfato a pH 7 (50 mL) y MeOH (150 mL). A una solución turbia se añadió una mezcla de MeOH/30% de H_2O_2 (2:1, 90 mL) a tal tasa como para mantener la temperatura interna a menos de 10

ºC. Después de agitar la solución durante 1 h más, el compuesto volátil se removió en un evaporador rotativo a una temperatura de baño de 25–30 ºC. La suspensión resultante se extrajo con EtOAc (150 mL×3). La capa orgánica combinada se lavó con solución saturada de Na2SO3 (150 mL), solución al 5% de NaHCO3 (150 mL) y salmuera (150 mL), se secó sobre Na_2SO_4, se filtró y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (PE/EtOAc 3:1) para dar **2–7** (8,8 g, 57%).

^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,36–7,27 (m, 3 H), 7,21–7,19 (m, 2 H), 4,85 (dd, *J* = 9,2, 38,4 Hz, 1 H), 4,73–4,67 (m, 1 H), 4,53–4,50 (m, 1 H), 4,27–4,19 (m, 2 H), 3,99–3,95 (m, 1 H), 3,24 (dd, *J* = 3,2, 13,6 Hz, 1 H), 3,17–3,16 (m, 1 H), 2,83–2,74 (m, 2 H), 1,29 (d, *J* = 6,8Hz, 3 H), 1,02–0,99 (m, 6 H).

Etapa 5. A una solución de **2–7** (2,0 g, 5,72 mmol) y Cl_3CCN (1,24 g, 8,58 mmol) en DCM (15 mL) se añadió DBU (174 mg, 1,14 mmol) a 0 ^{o}C bajo N_2. Después de agitar la mezcla a 0 ºC durante 1 h, el solvente se removió y el residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (5%–20% de petróleo en EtOAc) para dar **2–8** (1,55 g, 55%).

^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8,47 (s, 1 H), 7,35–7,27 (m, 3 H), 7,25–7,19 (m, 2 H), 5,81–5,75 (m, 1 H), 4,98–4,85 (m, 1 H), 4,64–4,59 (m, 1 H), 4,40–4,36 (m, 1 H), 4,22–4,17 (m, 2 H), 3,27–3,24 (m, 1 H), 2,83–2,71 (m, 2 H), 1,40–1,38 (m, 3 H), 0,99–0,95 (m, 6 H).

Etapa 6. Una solución de **2–8** (1,55 g, 3,14 mmol) en xileno (10 mL) se calentó a 135 ºC durante 30 h. Se enfrió hasta temperatura ambiente y el solvente se removió a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (5%–10%–50% de petróleo en EtOAc) para dar **2–9** (450 mg, 29%).

^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,35–7,28 (m, 3 H), 7,21–7,20 (m, 2 H),

6,75 (d, *J* = 8,4 Hz, 1 H), 5,20 (dd, *J* = 9,2, 37,6 Hz, 1 H), 4,76–4,65 (m, 2 H), 4,28–4,17 (m, 3 H), 3,27–3,23 (m, 1 H), 2,79 (dd, *J* = 9,6, 13,2 Hz, 1 H), 2,07–2,00 (m, 1 H), 1,33 (d, *J* = 7,2Hz, 3 H), 1,00–0,94 (m, 6 H).

Etapa 7. A una solución de **2–9** (950 mg, 1,92 mmol) en THF y H_2O (v/v 4:1, 10 mL) se añadió H_2O_2 (1,38 mg, 11,52 mmol), seguido por $LiOH{\cdot}H_2O$ (242 mg, 5,76 mmol) en agua (2 mL). Después de agitar la solución a 10 ^oC durante 1 h, la solución saturada de Na2SO3 (8 mL) se añadió. El solvente se removió y el residuo se lavó con DCM (20 mL × 2). La solución acuosa se acidificó a pH 1 con HCl 1 M y se extrajo con EtOAc (25 mL × 3). La capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4, se filtró, se concentró para dar **2–10** (420 mg, 65%).

LCMS (ESI): m/z 334,0 [$M+H^+$].

Etapa 8. A una solución de **2–10** (420 mg, 1,26 mmol) y (4–aminofenil)metanol (233 mg, 1,89 mmol) en DCM (10 mL) se añadió EEDQ (623 mg, 2,52 mmol) a 0 ºC bajo N_2. Después de agitar la mezcla a 10 ºC durante 3 h, el solvente se removió y el residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (30% de petróleo en acetato de etilo) para dar **2–11** (300 mg, 54%).

LCMS (ESI): m/z 439,0 [$M+H^+$].

Etapa 9. A una solución de **2–11** (300 mg, 0,682 mmol) en EtOH (6 mL) se añadió $NaBH_4$ (300 mg, 7,94 mmol) a 0 ºC. La mezcla se agitó a 10 ºC durante 3 h. agua (0,5 mL) se añadió y EtOH se removió a presión reducida. El producto crudo se disolvió en una mezcla de THF (4 mL) y solución saturada de NaHCO3 (4 mL) y CbzCl (140 mg, 8,18 mmol) se añadió a 10 ºC. Después de agitar la mezcla a 10 ºC durante 2 h, el solvente se removió y el residuo se extrajo con DCM (8 mL×2). La capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4, se concentró y se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (PE/EtOAc = 2:1) para dar **2–**

12 (125 mg, 43%).

^{1}H RMN (400 MHz, MeOD) δ 7,53–7,46 (m, 2 H), 7,36–7,25 (m, 7 H), 5,11–5,00 (m, 3 H), 4,56 (s, 2 H), 3,94–3,87 (m, 1 H), 3,63–3,59 (m, 1 H), 1,98–1,92 (m, 1 H), 1,27 (d, *J* = 6,8 Hz, 3 H), 0,96–0,93 (m, 6 H).

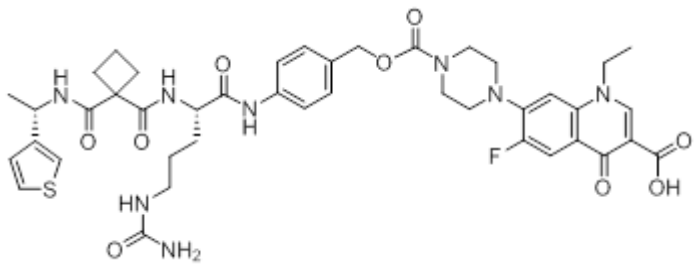
LCMS (ESI): m/z 429,2 [M+H$^+$].

Etapa 10. A una solución de **2–12** (20 mg, 0,0467 mmol) en DCM (2 mL) se añadió carbonato de PNP (43 mg, 0,140 mmol) y DIEA (24 mg, 0,187 mmol) a 10 ^{o}C. Después de la mezcla se calentó a reflujo durante 16 h, el solvente se removió y el residuo se disolvió en DMF (2 mL). A esta solución se añadieron DIEA (24 mg, 0,187 mmol) y norfloxacina (22 mg, 0,070 mmol) a 10 ºC y la solución resultante se agitó a 10 ºC durante 1 h. Después de remover el solvente, el residuo se purificó por HPLC prep para dar el ejemplo **2** (14,1 mg, 39%).

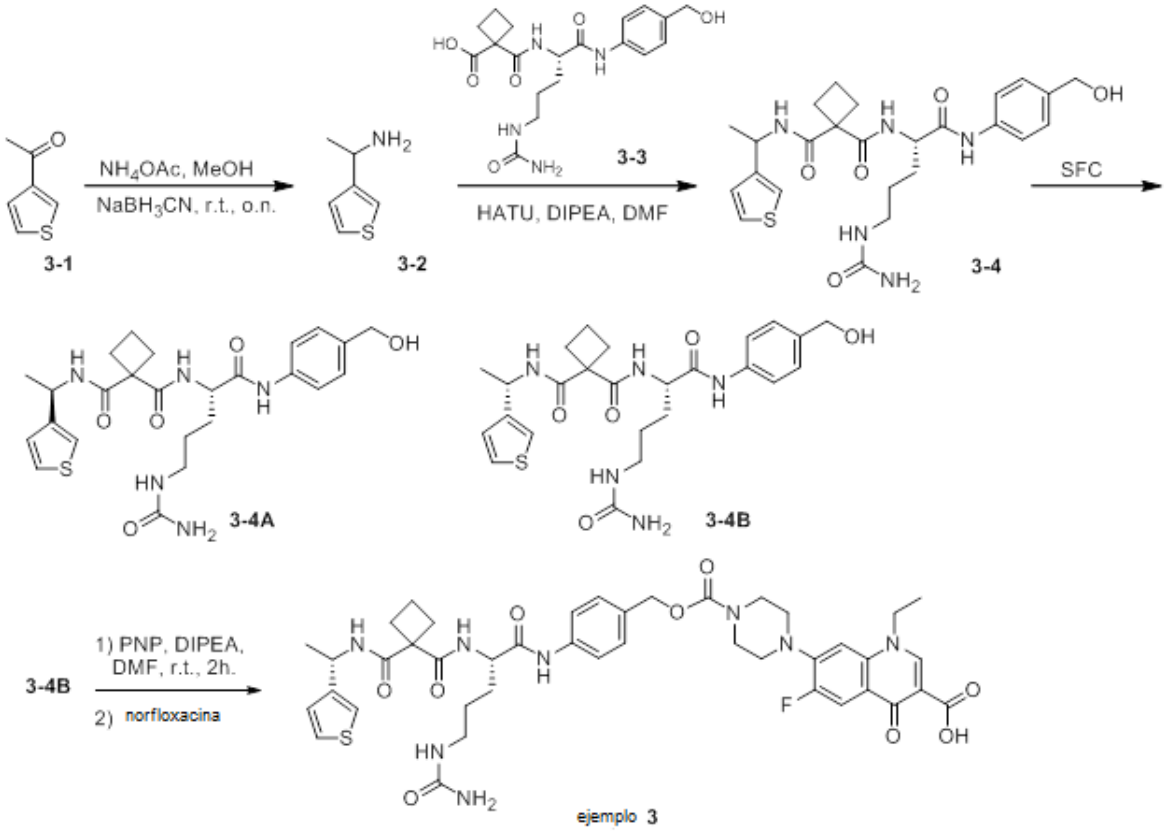
^{1}H RMN (400 MHz, DMSO–d_6) δ 15,35 (br, 1 H), 10,02 (s, 1 H), 8,95 (s, 1 H), 7,95–7,91 (m, 1 H), 7,69–7,58 (m, 3 H), 7,34–7,19 (m, 8 H), 5,12–5,00 (m, 5 H), 4,59–4,57 (m, 2 H), 3,87–3,81 (m, 1 H), 3,60–3,51 (m, 5 H), 3,30 (s, 4 H), 1,89–1,83 (m, 1 H), 1,40 (t, *J* = 7,2 Hz, 3 H), 1,20–1,81 (m, 3 H), 0,87 (m, 6 H).

LCMS (ESI): m/z 774,8 [M+H$^+$]

Ejemplo 3. Ácido 1–etil–6–fluoro–4–oxo–7–(4–((4–((S)–2–(1–((S)–1–(tiofen–3–il)etilcarbamoil) ciclobutancarboxamido)–5–ureidopentanamido)benciloxi)carbonil)piperazin–1–il)–1,4–dihidroquinolin–3–carboxílico.



ejemplo 3



Etapa 1. A una solución del compuesto **3–1** (2 g, 15,9 mmol) en MeOH (20 mL) se añadió NH_4OAc (12,2 g, 0,159 mol) y $NaBH_3CN$ (3,5 g, 55,5 mmol) a 20 ºC. Después de agitar la mezcla a 20 ºC durante 16 h, se concentró. El residuo se dividió entre EtOAc (50 mL) y solución NaOH (5 M, 5 mL) (ajustar el pH > 13). La capa orgánica se lavó con salmuera (20 mL×2), se concentró y se purificó por columna (20%–30% de MeOH en DCM) para dar el compuesto crudo **3–2** (800 mg, 40% de rendimiento). ^{1}H RMN (400 MHz, DMSO–d_6) δ 7,63 – 7,61 (d, J = 8,0 Hz, 1 H), 7,58 – 5,57 (m, 1 H), 7,25 – 7,23 (d, J = 8,0 Hz, 2 H), 4,53 – 4,48 (m, 1 H), 1,51 – 1,49 (d, J = 8,0 Hz , 3 H).

Etapa 2. A una solución del compuesto **3–3** (500 mg, 1,23 mmol) en DMF (3 mL) se añadió el compuesto **3–2** (600 mg, 4,7 mmol), DIPEA (0,5 mL, 3 mmol) y HATU (740 mg, 2 mmol) a 20 ºC. Después de agitar la mezcla a 20 ºC durante 2 h, se purificó por HPLC prep para dar **3–4**

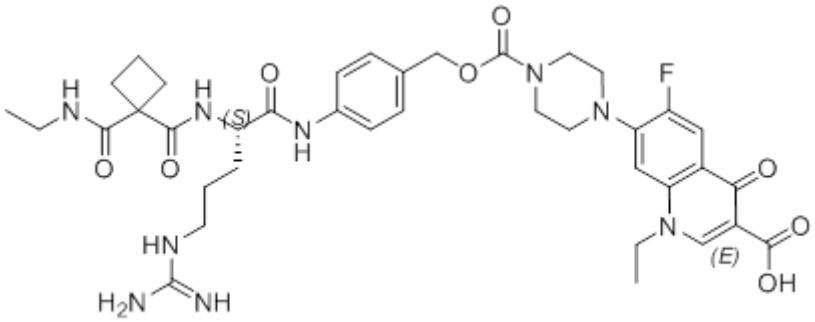
(360 mg, 57% de rendimiento). Compuesto **3–4** (300 mg) se separó por separación de SFC para dar 2 isómeros **3–4A** y **3–4B**.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO–d_6) δ 10,03 (s, 1 H), 8,12 – 8,10 (m, 1H), 7,9 –7,75 (m, 1 H), 7,55 – 7,52 (m, 2 H), 7,45 – 7,35 (m, 2 H), 7,3 – 7,2 (m, 3 H), 7,04 (m, 1 H), 6,0 (m, 1 H), 5,5 – 5,2 (m, 2 H), 5,1 – 5,0 (m, 1 H), 4,45 – 4,35 (m, 3 H), 3,1 – 2,9 (m, 4 H), 2,43 – 2,39 (m, 4 H), 1,8 – 1,7 (m, 3 H), 1,7 – 1,5 (m, 1 H), 1,5–1,33 (m, 5 H).

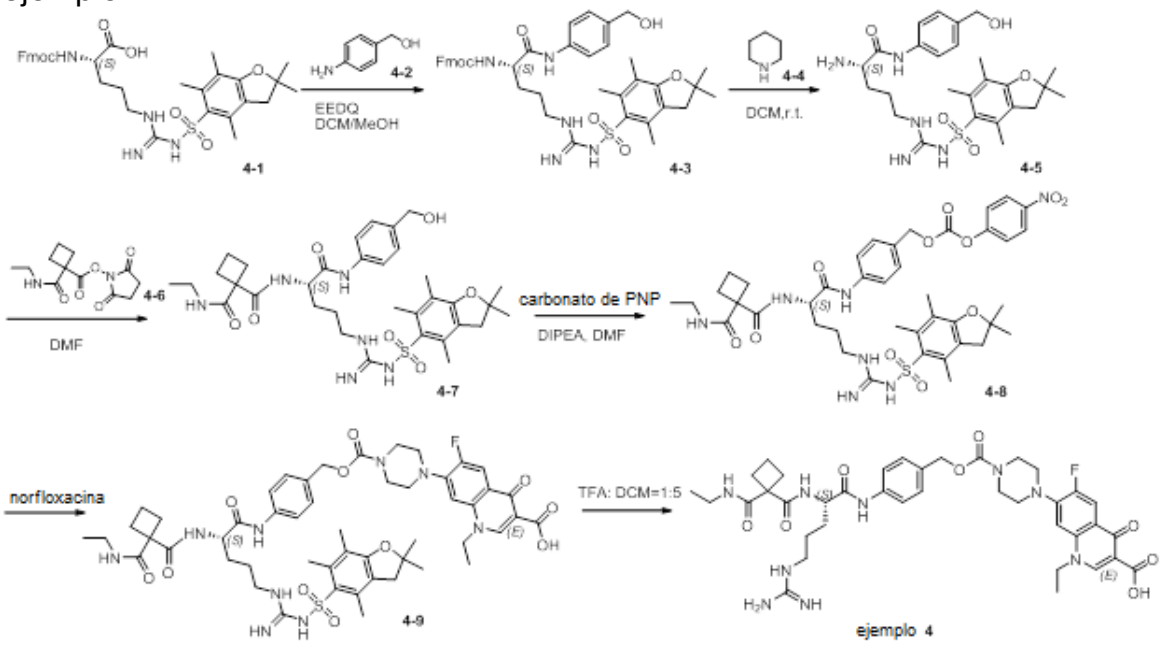
Etapa 3. A una solución del compuesto **3–4B** (110 mg, 0,21 mmol) en DMF seca (3 mL) se añadió PNP (130 mg, 0,43 mmol) y DIPEA (0,5 ml, 3 mmol) a 20 ºC. Después de agitar la mezcla a 20 ºC durante 1,5 h bajo N_2, la norfloxacina (100 mg, 0,31 mmol) se añadió. La mezcla se agitó a 20 ºC durante otra hora y se purificó por HPLC prep (FA), para dar el ejemplo **3** (102,1 mg, 57%).

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO–d_6) δ 10,15 (s, 1H), 8,93 (s, 1 H), 8,10 – 8,08 (d, 1H), 8,04 (s, 1 H), 7,93 – 7,90 (m, 2 H), 7,60 – 7,58 (d, J = 8,0 Hz , 2 H), 7,41 – 7,39 (d, , 2 H), 7,32 – 7,30 (d, J = 8,0 Hz , 2 H), 7,25 (d, 1H), 7,20 (d, 1H), 7,04 – 7,02(d, 1H), 6,0 (m, 1 H), 5,40 (s, 2 H), 5,1–5,0 (m, 3 H), 4,6 – 4,5 (m, 2 H), 4,5 – 4,35 (m, 1 H), 3,59 (s, 1 H), 3,2 (s, 4 H), 3,1 – 2,9 (m, 2 H), 2,42 – 2,40 (m, 4 H), 1,8 – 1,7 (m, 3 H), 1,7 – 1,6 (m, 1 H), 1,5 – 1,3 (m, 8 H).

Ejemplo 4. Ácido (S)–1–etil–7–(4–((4–(2–(1–(etilcarbamoil)ciclobutancarboxamido)–5–guanidinopentanamido)benciloxi)carbonil)piperazin–1–il)–6–fluoro–4–oxo–1,4–dihidroquinolin–3–carboxílico



ejemplo 4



Etapa 1. A una solución del compuesto **4–1** (1,3 g, 2 mmol) en DCM / MeOH (20 mL / 20 mL) se añadieron 4–amino–fenil)–metanol (370 mg, 3 mmol) y EEDQ (989 mg, 4 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. El residuo se purificó por columna (PE/EtOAc = 1/3) para dar **4–3** (1,94 g, rendimiento: 90 %)

A una solución de **4–3** (1,44 g, 2 mmol) en DCM (50 mL) se añadieron **4–4** (1,2 ml, 9,56 mmol) con jeringa a temperatura ambiente. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. El residuo se concentró y se lavó por éter metil ter–butílico, luego se filtró y la torta filtrante se combinó para dar **4–5** (700 mg, rendimiento: 70 %).

Etapa 2. A una solución de **4–5** (700 mg, 1,32 mmol) en DME (10 ml) se

añadió una solución de **4–6** (424 mg, 1,58 mmol) y $NaHCO_3$ (222 mg, 2,64 mmol) en agua (10 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. La mezcla se lavó con EtOAc y se ajustó a pH = 3 con 10% de HCl. La suspensión resultante se extrajo con EtOAc. Las capas orgánicas combinadas se concentraron y se purificaron por columna (PE/EtOAc = 1/3) para dar **4–7** (400 mg, rendimiento: 37 %)

Etapa 3. A una solución de **4–7** (250 mg, 0,365 mmol), carbonato de PNP (223 mg, 0,731 mmol) en DMF (4 mL) se añadió DIPEA (142 mg, 1,095 mmol) a 0 ºC. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. La mezcla (**4–8**) se usó para la siguiente etapa sin ulterior purificación.

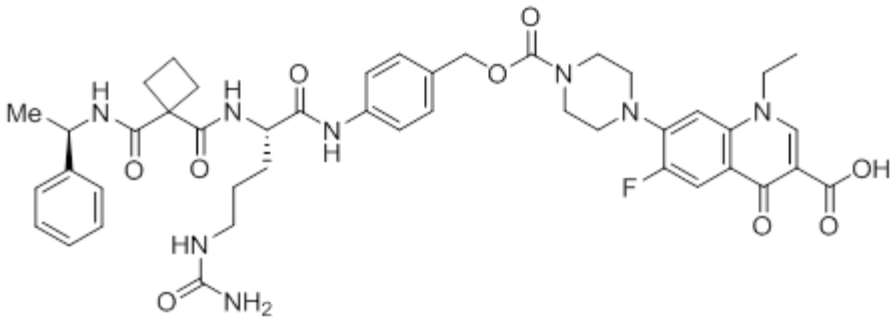
Etapa 4. A la mezcla de la última etapa se añadió norfloxacina (234 mg, 0,73 mmol) a temperatura ambiente. Después de agitar la mezcla a temperatura ambiente durante 1 h, se purificó por HPLC prep y SFC para dar **4–9** (Rendimiento: 30 %).

Etapa 5. Al compuesto **4–9** (100 mg, 0,1 mmol) se añadió una solución de TFA en DCM (1:5) a 0 ^oC. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. La mezcla se alcalinizó a pH = 9 por $NH_3.H_2O$. El residuo se purificó por HPLC prep, luego SFC para dar el ejemplo **4** (16,0 mg, rendimiento: 15 %).

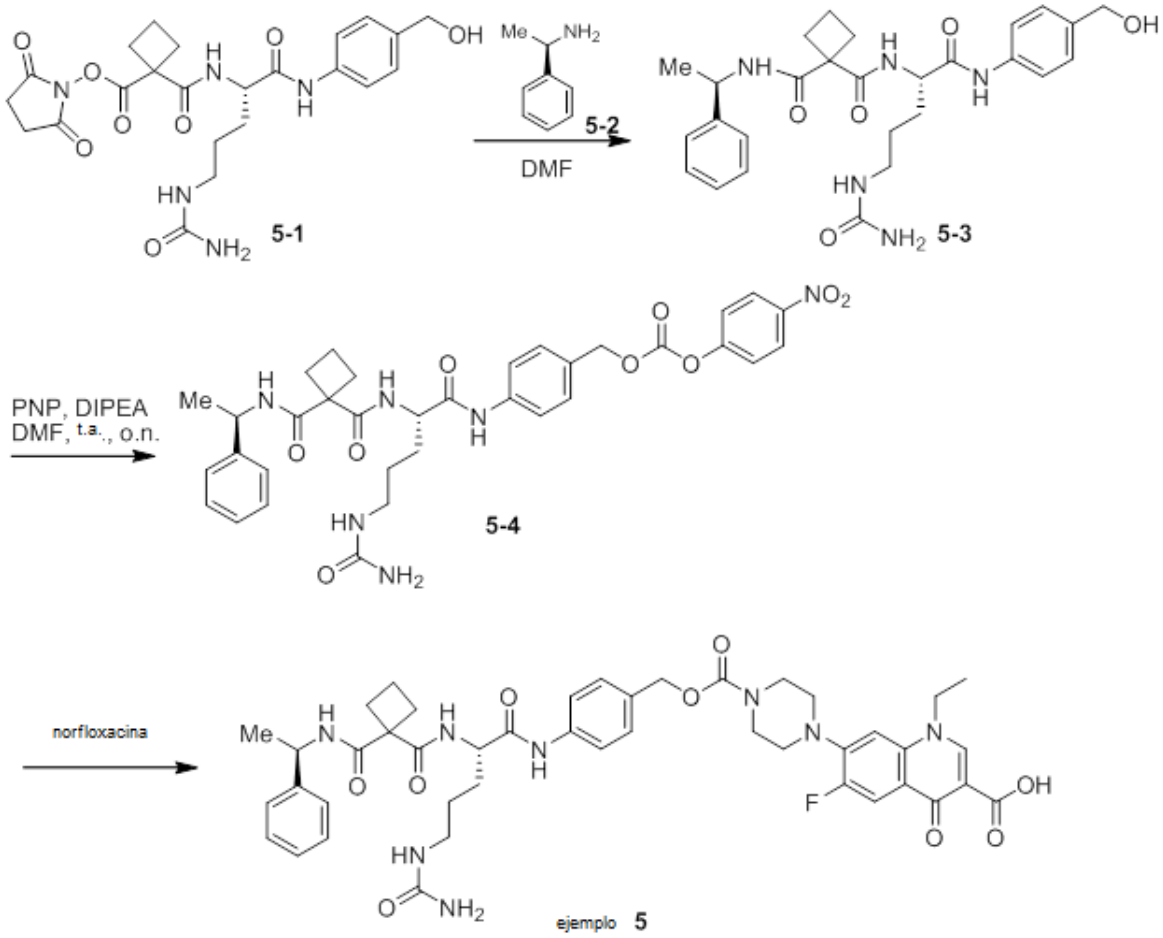
^1H RMN (400 MHz, Metanol–d_4) δ 8,83 (s, 1 H), 8,55 (s, 1 H), 7,97 (d, J = 13,2 Hz, 1 H), 7,62 (d, J = 7,6 Hz, 2 H), 7,35 (d, J = 7,6 Hz, 2 H), 7,17 (s, 1 H), 5,13 (s, 2 H), 4,55 – 4,52 (m, 3 H), 3,72 (s, 4 H), 3,34 (s, 4 H), 3,31 – 3,24 (m, 4 H), 2,58 – 2,54 (m, 4 H), 2,00 – 1,69 (m, 6 H), 1,52 (s, 3 H), 1,15 – 0,11 (m, 3 H).

Ejemplo 5. Ácido 1–etil–6–fluoro–4–oxo–7–(4–((4–((S)–2–(1–((S)–1–feniletilcarbamoil) ciclobutancarboxamido)–5–ureidopentanamido)benciloxi)carbonil) piperazin–1–il)–1,4–

dihidroquinolin–3–carboxílico



ejemplo 5



Etapa 1. Una mezcla del compuesto **5–1** (50 mg, 0,1 mmol) y **5–2** (15 mg, 0,12 mmol) en DMF (10 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. La mezcla se concentró y se purificó por TLC prep (MeOH/ DCM=1/10) para dar **5–3** (50 mg, 99 %).

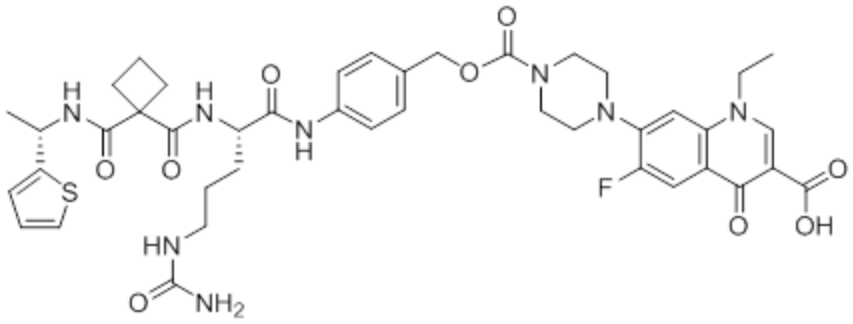
Etapa 2. A una solución del compuesto **5–3** (40 mg, 0,078 mmol),

carbonato de PNP (48 mg, 0,157 mmol) en DMF (4 mL) se añadió DIPEA (30 mg, 0,236 mmol) a 0 ºC. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. La mezcla (**5–4**) se usó para la siguiente etapa sin ulterior purificación.

Etapa 3. A la mezcla de la última etapa se añadió norfloxacina (51 mg, 0,157 mmol) a temperatura ambiente y se agitó durante 1 h. El residuo se purificó por HPLC prep para dar el ejemplo **5**. (7 mg, rendimiento: 8 %)

^{1}H RMN (400 MHz, MeOH–d_4) δ 8,86 (s, 1 H), 8,46 (s, 1 H), 8,00 (d, J = 12,8 Hz, 1 H), 7,61 (d, J = 8 Hz, 2 H), 7,35 – 7,33 (m, 2 H), 7,30 (d, J = 7,2 Hz, 2 H), 7,24 (d, J = 7,2 Hz, 2 H), 7,20 (d, J = 14 Hz, 2 H), 7,16 (s, 2 H), 5,12 (s, 2 H), 5,04 (d, J = 7,2 Hz, 1 H), 4,50 – 4,47 (m, 4 H), 3,71 (s, 4 H), 3,34 (s, 4 H), 3,22 – 3,03 (m, 2 H), 2,60 – 2,51 (m, 4 H), 1,94 – 1,86 (m, 3 H), 1,74 – 1,71 (m, 1 H), 1,60 – 1,45 (m, 7 H).

Ejemplo 6. Ácido 1–etil–6–fluoro–4–oxo–7–(4–((4–((S)–2–(1–((S)–1–(tiofen–2–il)etilcarbamoil) ciclobutancarboxamido)–5–ureidopentanamido)benciloxi)carbonil)piperazin–1–il)–1,4–dihidroquinolin–3–carboxílico



ejemplo 6

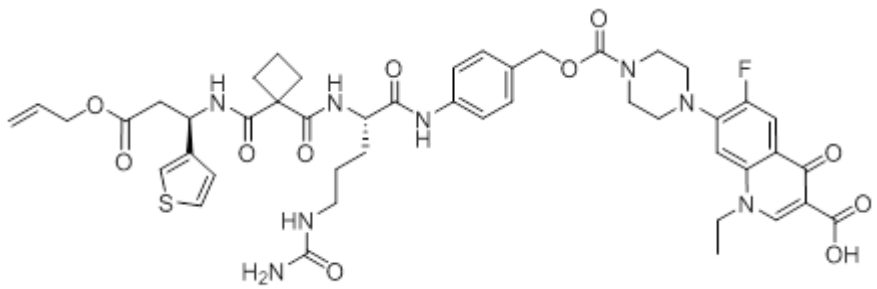
El Ejemplo 6 se preparó usando el procedimiento como en el Ejemplo **3**. Compartió el intermediario con el Ejemplo **10**.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO–d_6) δ 15,3 (s, 1H), 10,13 (s, 1H), 8,93 (s, 1 H), 8,25 (d, 1H), 7,94 – 7,91 (d, J = 12,0 Hz, 1H), 7,8 (d, 1 H), 7,60 –

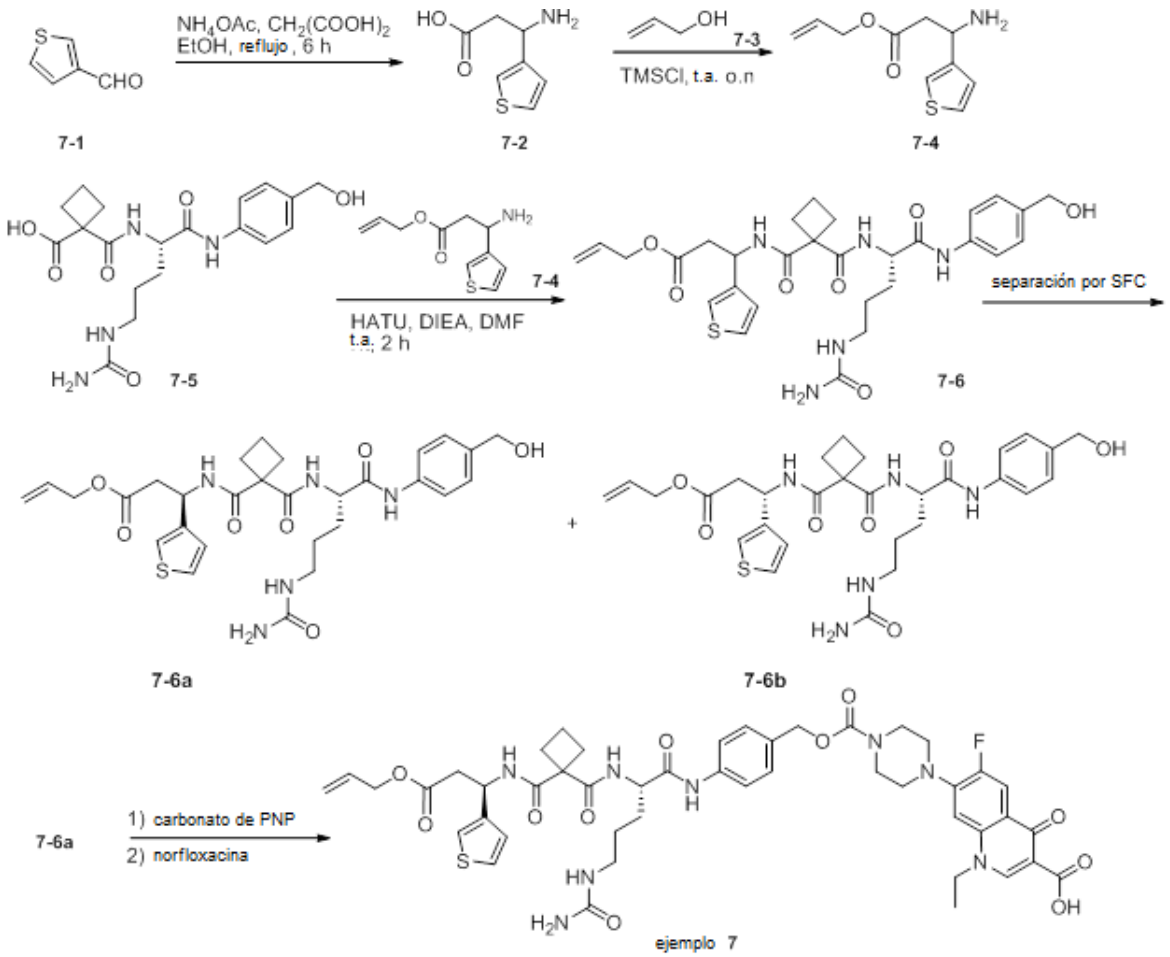
7,58 (d, *J* = 8,0 Hz, 2 H), 7,33 – 7,30 (d, *J* = 8,0 Hz , 3H), 7,20 (d, 1 H), 6,92 – 6,91 (m, 2 H), 5,95 (m, 1 H), 5,40 (s, 1H), 5,25 – 5,15 (m, 1H), 5,04 (s, 2 H), 4,65 – 4,4 (m, 2 H), 4,5 – 4,4 (m, 1 H), 3,7 – 3,5 (s, 4 H), 3,3 (s, 4 H), 3,1 – 2,85 (m, 2 H), 2,44 – 2,42 (m, 4 H), 1,8 – 1,7 (m, 3 H), 1,7 – 1,55 (m, 1 H), 1,46 – 1,45 (d, *J* = 4,0 Hz , 1 H), 1,45 – 1,3 (m, 5 H).

Ejemplo 7.

Ácido 7–(4–((4–((S)–2–(1–((R)–3–(aliloxi)–3–oxo–1–(tiofen–3–il)propilcarbamoil)ciclobutancarboxamido)–5–ureidopentanamido)benciloxi)carbonil)piperazin–1–il)–1–etil–6–fluoro–4–oxo–1,4–dihidroquinolin–3–carboxílico



ejemplo 7



Etapa 1. A una solución del compuesto **7–1** (10,0 g, 89,17 mmol) y $CH_2(COOH)_2$ (9,3 g, 89,17 mmol) en EtOH (100 mL) se añadió NH_4OAc (13,7 g, 178,33 mmol). La mezcla se agitó a 80 ^oC durante 6 h. Se enfrió hasta temperatura ambiente, se filtró y se lavó con EtOH (100 mL). La torta filtrante se recolectó y se concentró a presión reducida para obtener el compuesto **7–2** (8,0 g, 52,6 %) en forma de sólido blanco.

^1H RMN D_2O 400 MHz, δ 7,44 (s, 2H), 7,13 (d, J = 3,2 Hz, 1H), 4,69 (t, J = 7,2 Hz, 1H), 2,84 – 2,73 (m, 2H).

Etapa 2. A una mezcla del compuesto **7–2** (6,0 g, 35,04 mmol) en compuesto **7–3** (60,0 g) se añadió TMSCl (13,4 mL, ρ = 0,85, 105,13 mmol) en porciones. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente bajo N_2 durante la noche. La mezcla se concentró a presión reducida y el residuo se diluyó con H_2O (50 mL), se ajustó a pH 1 por

solución de HCl y se lavó con EtOAc (50 mL × 3). La fase acuosa se ajustó a pH 12 por NH_3H_2O y se extrajo con EtOAc (50 mL × 3). La capa combinada de EtOAc se secó sobre Na_2SO_4, se filtró y se concentró a presión reducida para obtener el compuesto **7–4** en forma de un aceite (4,0 g, 54,1 %).

^{1}H RMN DMSO–d_6 400 MHz, δ 7,45 – 7,43 (q, 1H), 7,31 (s, 1H), 7,15 (d, J =4,8 Hz, 1H), 5,91 – 5,85 (m, 1H), 5,27 (dd, J = 17,2, 1,6 Hz, 1H), 5,20 – 5,17 (m, 1H), 4,53 (d, J = 5,2 Hz, 2H), 4,31 – 4,27 (m, 1H), 2,73 – 2,61 (m, 2H).

Etapa 3. A una mezcla del compuesto **7–5** (1,0 g, 2,46 mmol) en DMF (20 mL) se añadió DIPEA (636 mg, 4,92 mmol), seguido por HATU (1,4 g, 3,69 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 15 min y el compuesto **7–4** (624 mg, 2,95 mmol) se añadió. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 h y se purificó por HPLC prep para obtener el compuesto **7–6** en forma de sólido blanco (800 mg, 54,1 %).

El compuesto **7–6** se escaló hasta 1,5 g y se separó por SFC para obtener **7–6a** (580 mg) y **7–6b** (560 mg).

7–6a

LCMS: (5–95, AB, 1,5 min, ESI), 0,773 min, MS = 600,1 [M+1]

^{1}H RMN DMSO–d_6 400 MHz, δ 10,05 (s, 1H), 8,25 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,74 (d, J = 7,9 Hz, 1H), 7,56 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 7,45 – 7,43 (q, 1H), 7,31 (d, J = 2,6 Hz, 1H), 7,24 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 7,08 (d, J = 4,0 Hz, 1H), 5,97 (t, J = 5,6 Hz, 1H), 5,90 – 5,80 (m, 1H), 5,43 – 5,37 (m, 3H), 5,27 (dd, J = 17,4, 1,5 Hz, 1H), 5,17 (dd, J = 10,4 Hz, 1,3 Hz, 1H), 5,17 (t, J = 5,7 Hz, 1H), 4,51 (d, J = 5,3 Hz, 2H), 4,44 – 4,39 (m, 3H), 3,06 – 2,98 (m, 1H), 2,97 – 2,88 (m, 3H), 2,48 – 2,39 (m, 4H), 1,78 – 1,70 (m, 3H), 1,64 – 1,55 (m, 1H), 1,42 – 1,28 (m, 2H).

7–6b

LCMS: (5–95, AB, 1,5 min, ESI), 0,762 min, MS = 600,1 [M+1]

^{1}H RMN DMSO–d_6 400 MHz, δ 10,04 (s, 1H), 8,26 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,79 (d, J = 7,7 Hz, 1H), 7,57 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 7,39 – 7,37 (q, 1H), 7,31 (s, 1H), 7,24 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 7,07 (d, J = 4,9 Hz, 1H), 5,97 (t, J = 5,5 Hz, 1H), 5,91 – 5,81 (m, 1H), 5,43 – 5,36 (m, 3H), 5,26 (dd, J = 17,3, 1,4 Hz, 1H), 5,18 (d, J = 10,4 Hz, 1H), 5,11 (t, J = 5,7 Hz, 1H), 4,53 – 4,52 (m, 2H), 4,44 – 4,40 (m, 3H), 3,05 – 2,98 (m, 1H), 2,97 – 2,85 (m, 3H), 2,46 – 2,33 (m, 4H), 1,77 – 1,72 (m, 3H), 1,64 – 1,56 (m, 1H), 1,42 – 1,30 (m, 2H).

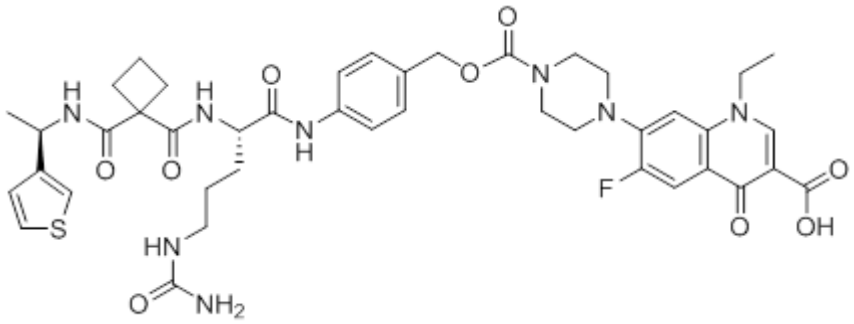
Etapa 4. A una solución de **7–6a** (50 mg, 0,083 mmol) en DMF anhidra (5 mL) se añadió DIPEA (107 mg, 0,83 mmol), seguido por carbonato de PNP (60 mg, 0,20 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. A continuación, la norfloxacina (64 mg, 0,20 mmol) se añadió. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante otras 2 h. La mezcla se filtró y el filtrado se purificó por HPLC prep para obtener el **ejemplo 7** en forma de un sólido blanco (41,7 g, 53,5 %).

LCMS: (5–95, AB, 1,5 min, ESI), 0,858 min, MS = 473,3 [1/2M+1]

^{1}H RMN DMSO–d_6 400 MHz, δ 15,32 (br, 1H), 10,15 (s, 1H), 8,95 (s, 1H), 8,23 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,91 (d, J = 13,0 Hz, 1H), 7,77 (d, J = 7,5 Hz, 1H), 7,62 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 7,44 – 7,42 (q, 1H), 7,35 – 7,31 (m, 3H), 7,19 (br, 1H), 7,08 (d, J = 4,5 Hz, 1H), 5,98 (br, 1H), 5,89 – 5,80 (m, 1H), 5,44 – 5,37 (m, 3H), 5,23 (d, J = 17,6 Hz, 1H), 5,16 (d, J = 10,5 Hz, 1H), 5,07 (s, 2H), 4,57 (br, 2H), 4,51 (d, J = 5,5 Hz, 2H), 4,45 – 4,40 (m, 1H), 3,61 (br, 4H), 3,31 (br, 4H), 3,06 – 3,01 (m, 1H), 2,95 – 2,90 (m, 3H), 2,47 – 2,40 (m, 4H), 1,76 – 1,72 (m, 3H), 1,62 – 1,59 (m, 1H), 1,40 – 1,35 (m, 5H).

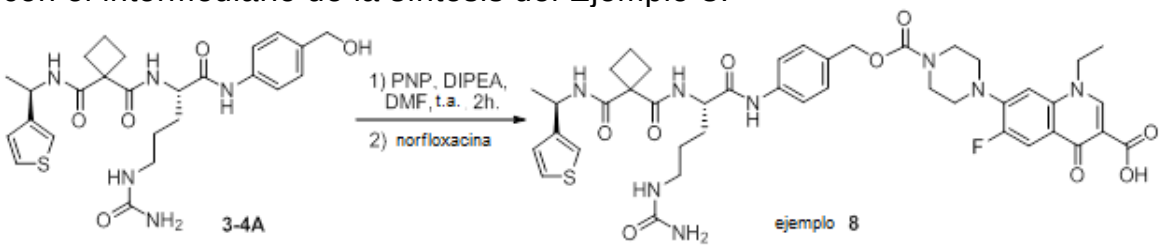
Ejemplo 8.

Ácido 1–etil–6–fluoro–4–oxo–7–(4–((4–((S)–2–(1–((R)–1–(tiofen–3–il)etilcarbamoil)ciclobutancarboxamido)–5–ureidopentanamido)benciloxi)carbonil)piperazin–1–il)–1,4–dihidroquinolin–3–carboxílico



ejemplo 8

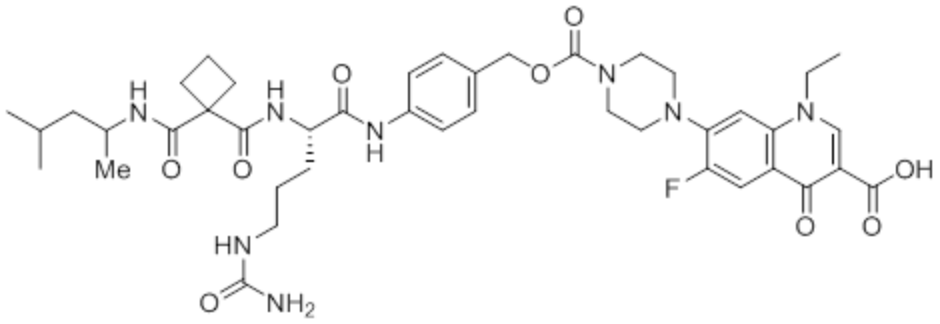
El Ejemplo 8 se preparó usando el procedimiento como en el Ejemplo **3**, con el intermediario de la síntesis del Ejemplo **3**.



^{1}H RMN (400 MHz, DMSO–d_6) δ 10,14 (s, 1H), 8,92 (s, 1 H), 8,05 – 8,03 (d, 1H), 7,93 – 7,90 (d, J = 12,0 Hz, 1 H), 7,85 – 7,83 (d, 1 H), 7,61 – 7,59 (d, J = 8,0 Hz , 1H), 7,36 – 7,35 (m , 1 H), 7,33 – 7,31 (d, J = 8,0 Hz , 2 H), 7,24 (s, 1 H), 7,20 (m, 1 H), 5,5 (m, 1 H), 7,04 – 7,03 (m, 1H), 6,0 (m, 1H), 5,40 (s, 2 H), 5,1 – 5,0 (m, 3 H), 4,6 – 4,5 (m, 2 H), 4,5 – 4,35 (m, 1 H), 3,59 (s, 1 H), 3,2 (s, 4 H), 3,05 – 2,9 (m, 2 H), 2,44 – 2,41 (m, 4 H), 1,8 – 1,7 (m, 3 H), 1,7 – 1,6 (m, 1 H), 1,5 – 1,35 (m, 8 H).

Ejemplo 9. Ácido 1–etil–6–fluoro–7–(4–((4–((2S)–2–(1–(4–metilpentan–2–ilcarbamoil)ciclobutancarboxamido)–5–

ureidopentanamido)benciloxi)carbonil)piperazin–1–il)–4–oxo–1,4–dihidroquinolin–3–carboxílico



ejemplo 9

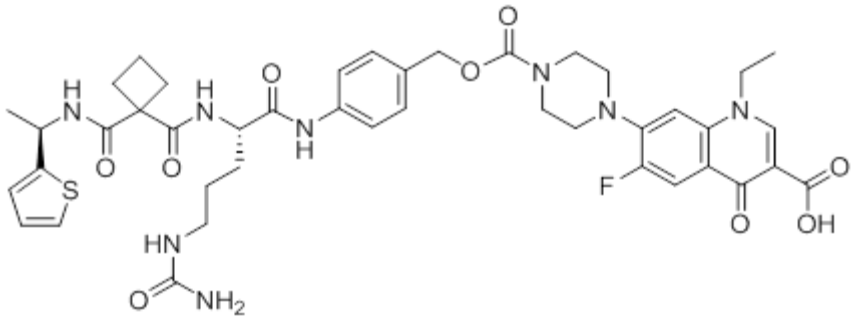
El Ejemplo 9 se preparó usando el procedimiento como en el Ejemplo **5**

LCMS : (5–95 AB, 1,5 min), T = 0,858 min, M = 8,352 (M+1);

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO–*d6*) δ 10,22 (s, 1H), 8,85 (s, 1H), 7,89 – 7,71 (m, 2H), 7,65 – 7,64 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H), 7,53 – 7,50 (m, 1H), 7,34 – 7,31 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H), 7,18 – 7,13 (m, 1H), 6,06 (s, 1H), 5,45 (d, *J* = 3,2 Hz, 2H), 5,05 (s, 2H), 4,60 – 4,42 (m, 2H), 3,91 – 3,88 (t, *J* = 6,4 Hz, 1H), 3,59 (s, 4H), 3,26 (s, 4H), 3,03 – 2,99 (m, 1H), 2,97 – 2,91 (m, 1H), 2,41 – 2,39 (m, 5H), 1,74 – 1,71 (m, 3H), 1,7 – 1,5 (m, 2H), 1,5 – 1,3 (m, 6H), 1,2 – 1,1 (m, 1H), 1,03 –1,00 (m, 3H), 0,81 (m, 6H).

Ejemplo 10.

Ácido 1–etil–6–fluoro–4–oxo–7–(4–((4–((S)–2–(1–((R)–1–(tiofen–2–il)etilcarbamoil)ciclobutancarboxamido)–5–ureidopentanamido)benciloxi)carbonil)piperazin–1–il)–1,4–dihidroquinolin–3–carboxílico



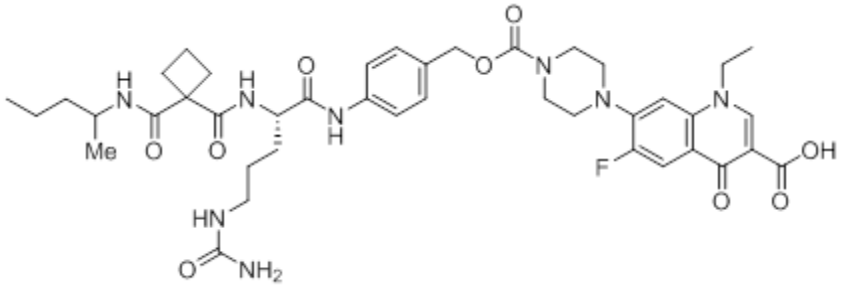
ejemplo 10

El Ejemplo 10 se preparó usando el procedimiento como en el Ejemplo **3**. Compartió el intermediario con el Ejemplo **6**.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO–d_6) δ 15,3 (s, 1H), 10,13 (s, 1H), 8,94 (s, 1 H), 8,25 (d, 1H), 7,94 – 7,91 (d, J = 12,0 Hz, 1H), 7,8 (d, 1 H), 7,62 – 7,60 (d, J = 8,0 Hz, 2 H), 7,34 – 7,31 (d, J = 8,0 Hz , 2H), 7,28 – 7,27 (d , J = 4,0 Hz , 1 H), 7,20 (d, 1 H), 6,93 (s, 1 H), 6,90 – 6,88 (m, 1 H), 5,95 (m, 1 H), 5,40 (s, 1H), 5,25 – 5,15 (m, 1H), 5,05 (s, 2 H), 4,65 – 4,4 (m, 2 H), 4,5 – 4,4 (m, 1 H), 3,7 – 3,5 (s, 4 H), 3,3 (s, 4 H), 3,1 – 2,85 (m, 2 H), 2,44 – 2,42 (m, 4 H), 1,85 – 1,7 (m, 3 H), 1,7 – 1,55 (m, 1 H), 1,47 – 1,46 (d, J = 4,0 Hz , 1 H), 1,46 – 1,3 (m, 5 H).

Ejemplo 11.

Ácido 1–etil–6–fluoro–4–oxo–7–(4–((4–((2S)–2–(1–(pentan–2–ilcarbamoil)ciclobutancarboxamido)–5–ureidopentanamido)benciloxi)carbonil)piperazin–1–il)–1,4–dihidroquinolin–3–carboxílico



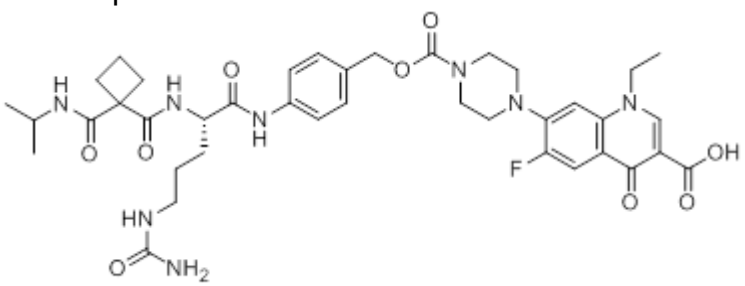
ejemplo 11

El Ejemplo 11 se preparó usando el procedimiento como en el Ejemplo 5. LCMS: (5–95 AB, 1,5 min), T = 0,848 min, M = 821,2 (M+1);

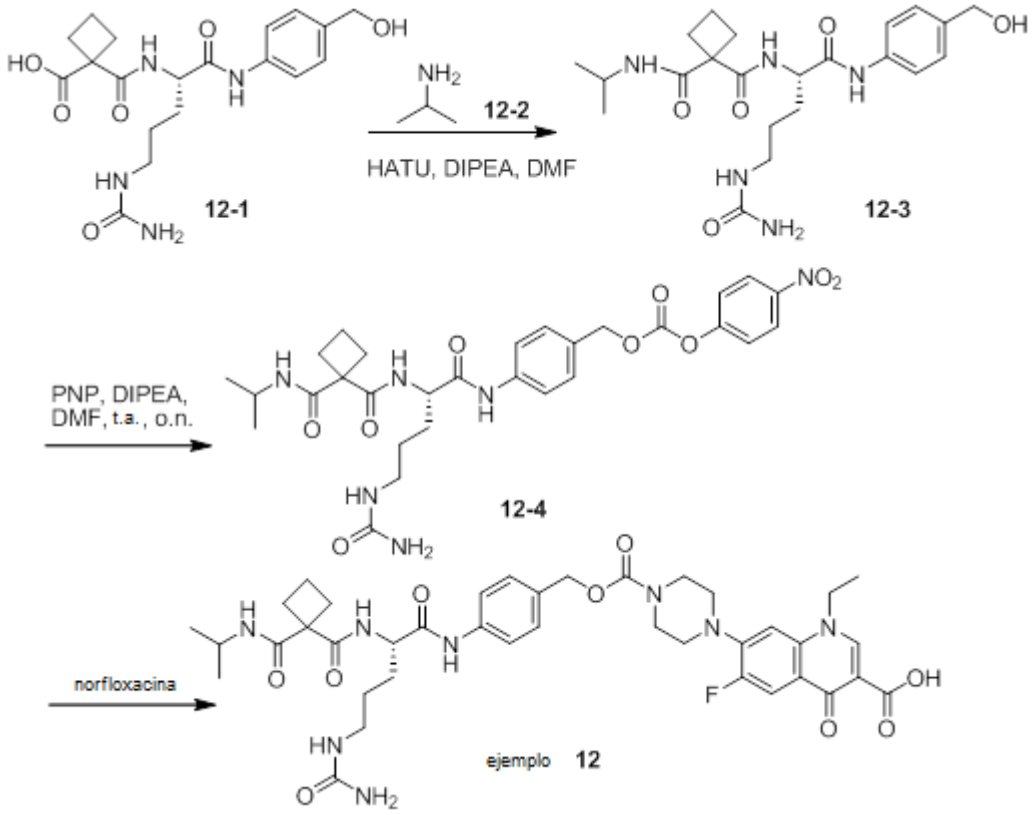
^{1}H RMN (400 MHz, DMSO–*d6*) δ 10,15 – 10,13 (m, 1H), 8,96 (s, 1H), 7,97 – 7,93 (d, *J* = 13,2 Hz, 1H), 7,81 – 7,74 (m, 1H), 7,63 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H), 7,50 – 7,46 (m, 1H), 7,34 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 7,21 (d, *J* = 7,2 Hz, 1H), 5,98 – 5,95 (t, *J* = 5,6 Hz, 1H), 5,42 (s, 2H), 5,06 (s, 2H), 4,60 – 4,57 (q, *J* = 6,8 Hz, 2H), 4,44 – 4,42 (m, 1H), 3,81(m, 1H), 3,60 (s, 4H), 3,49 – 3,36 (s, 4H), 3,33 – 3,29 (m, 2H), 3,1 – 2,9(m, 2H), 2,42 – 2,39 (m, 4H), 1,73 (m, 4H), 1,63 – 1,58 (m, 1H), 1,41 (m, 5H), 1,35 – 1,30 (m, 2H), 1,04 – 1,02 (m, 3H), 0,84 – 0,78 (m, 3H).

Ejemplo 12.

Ácido (S)–1–etil–6–fluoro–7–(4–((4–(2–(1–(isopropilcarbamoil)ciclobutancarboxamido)–5–ureidopentanamido)benciloxi)carbonil)piperazin–1–il)–4–oxo–1,4–dihidroquinolin–3–carboxílico



ejemplo 12



Etapa 1. Una mezcla del compuesto **12–1** (120 mg, 0,3 mmol), HATU (171 mg, 0,45 mmol), DIPEA (195 mg, 1,5 mmol) en DMF (10 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. A continuación, el compuesto **12–2** (9 mg, 0,3 mmol) se añadió. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. La mezcla se concentró y se purificó por TLC prep (MeOH/ DCM=1/10) para dar **12–3** (180 mg, 136 %).

Etapa 2. A una solución del compuesto **12–3** (180 mg, 0,4 mmol), carbonato de PNP (245 mg, 0,81 mmol) en DMF (4 mL) se añadió DIPEA (156 mg, 1,21 mmol) a 0 ºC. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. La mezcla (**12–4**) se usó para la siguiente etapa sin ulterior purificación.

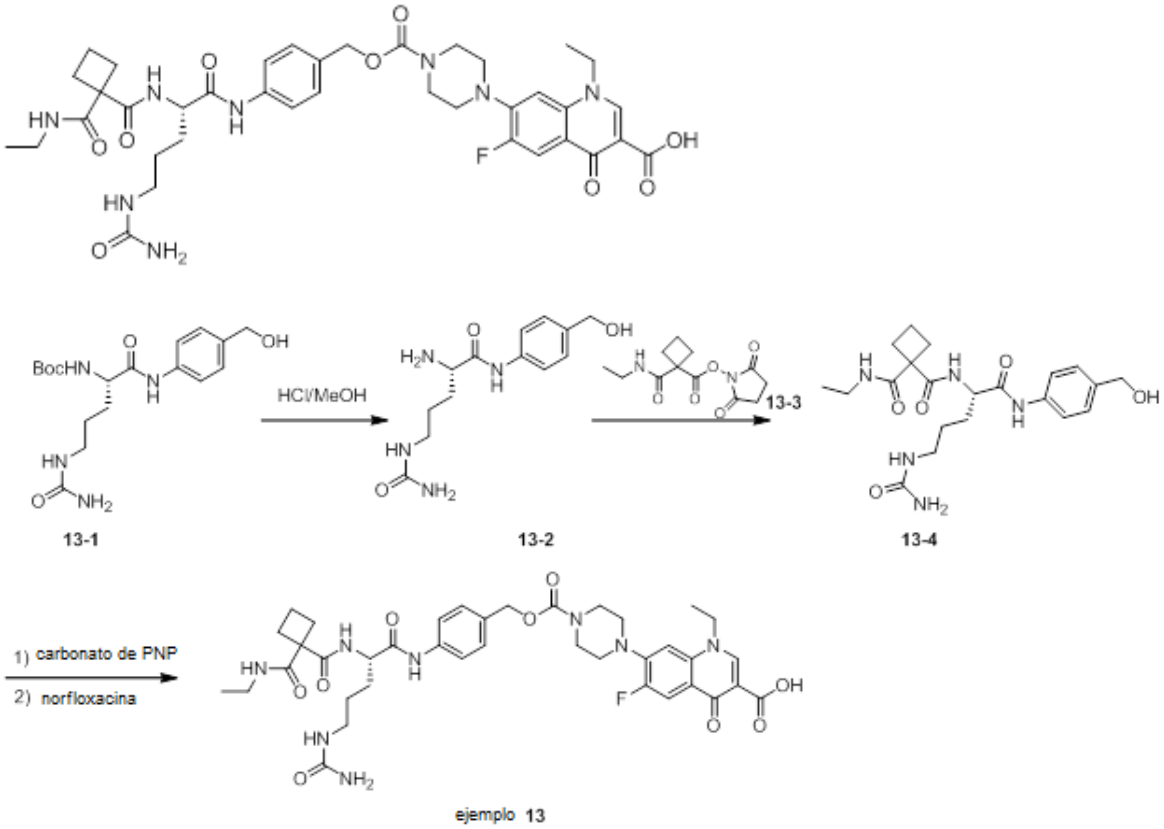
Etapa 3. A la mezcla de la última etapa se añadió norfloxacina (259 mg, 0,81 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó a temperatura

ambiente durante 1 h. El residuo se purificó por HPLC prep para dar el ejemplo **12** (18,5 mg, rendimiento: 6 % en dos etapas).

^{1}H RMN (400 MHz, MeOH–d_4) δ 8,88 (s, 1 H), 8,02 – 7,99 (d, J = 13,2 Hz, 1 H), 7,65 – 7,62 (d, J = 8,8 Hz, 3 H), 7,37 – 7,35 (d, J = 8,4 Hz, 2 H), 7,19 (d, J = 6,4 Hz, 1 H), 5,13 (s, 2 H), 4,54 – 4,50 (m, 4 H), 4,06 – 4,01 (m, 1 H), 3,73(s, 4 H), 3,35 (s, 4 H), 3,26 – 3,19 (m, 2 H), 2,57 – 2,52 (m, 4 H), 1,94 – 1,90 (m, 2 H), 1,81 – 1,74 (m, 2 H), 1,59 – 1,53 (m, 3 H), 1,21 – 1,13 (m, 6 H).

Ejemplo 13.

Ácido (S)–1–etil–7–(4–((4–(2–(1–(etilcarbamoil)ciclobutancarboxamido)–5–ureidopentanamido)benciloxi)carbonil)piperazin–1–il)–6–fluoro–4–oxo–1,4–dihidroquinolin–3–carboxílico



Etapa 1. Una mezcla del compuesto **13–1** (1 g, 2,63 mmol) y HCl en dioxano (4 M, 10 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. La

solución se concentró para dar el **13–2**.

Etapa 2. A una solución del compuesto **13–2** (651 mg, 2,326 mmol) en DME–H_2O (10 mL / 2 mL) se añadieron una mezcla del compuesto **13–3** (623 mg, 2,326 mmol) y NaHCO3 sat. (10 mL). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. La solución se concentró y el residuo se purificó por HPLC prep para dar **13–4.**

^{1}H RMN (400 MHz, Metanol–d_4) δ 7,62 (d, J = 8,4 Hz, 2 H), 7,33 (d, J = 8,8 Hz, 2 H), 4,57–4,52 (m, 3 H), 3,29–3,10 (m, 4 H), 2,60–2,53 (m, 4 H), 2,05–1,50 (m, 6 H), 1,16 (t, J = 7,6 Hz, 3 H).

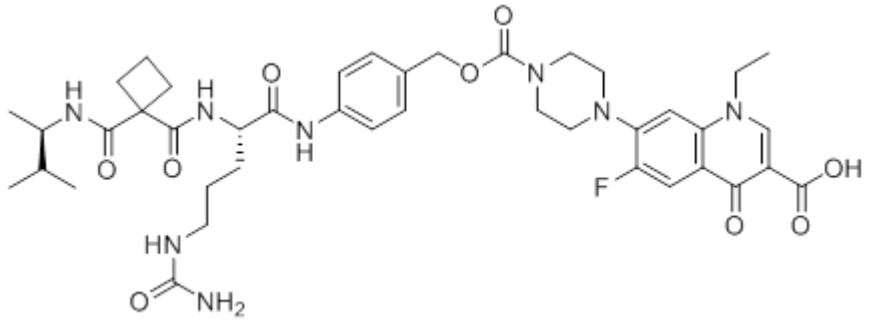
LCMS (ESI): m/z 434,1 [M+H$^+$].

Etapa 3. A una solución de **13–4** (60 mg, 0,139 mmol) en DCM (10 mL) se añadieron DIPEA (90 mg, 0,695 mmol) y carbonato de PNP (84 mg, 0,277 mmol). La mezcla se agitó a 25 ºC durante 2 días. La mezcla se concentró y se disolvió en DMF (5 mL) y norfloxacina (88 mg, 0,278 mmol) se añadió. La mezcla se agitó a 25 ºC durante 1,5 h. Después de la eliminación del solvente, el residuo se purificó por HPLC prep para dar el ejemplo **13**.

^{1}H RMN (400 MHz, Metanol–d_4) δ 8,86 (s, 1 H), 8,00 (d, J = 13,2 Hz, 1 H), 7,63 (d, J = 8,4 Hz, 2 H), 7,35 (d, J = 8,8 Hz, 2 H), 7,18 (d, J = 6,8 Hz, 1 H), 5,11 (s, 2 H), 4,57–4,48 (m, 3 H), 3,71 (s, 4 H), 3,33–3,32 (m, 4 H), 3,26–3,08 (m, 4 H), 2,60–2,47 (m, 4 H), 1,93–1,50 (m, 10 H), 1,14 (t, J = 7,2 Hz, 3 H).

LCMS (ESI): m/z 779,4.[M+H$^+$].

Ejemplo 14. Ácido 1–etil–6–fluoro–7–(4–((4–((S)–2–(1–((R)–3–metilbutan–2–ilcarbamoil)ciclobutancarboxamido)–5–ureidopentanamido)benciloxi)carbonil)piperazin–1–il)–4–oxo–1,4–dihidroquinolin–3–carboxílico

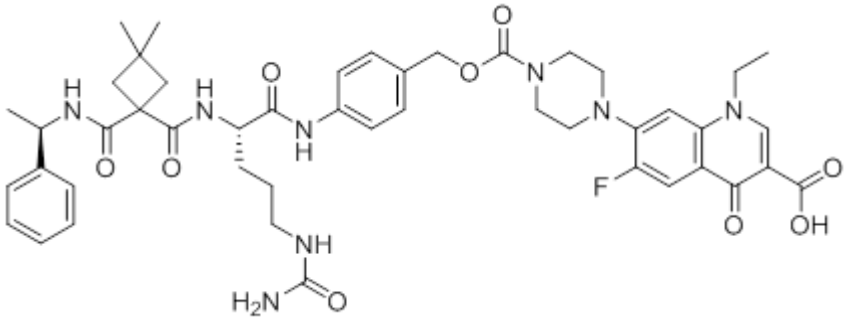


ejemplo 14

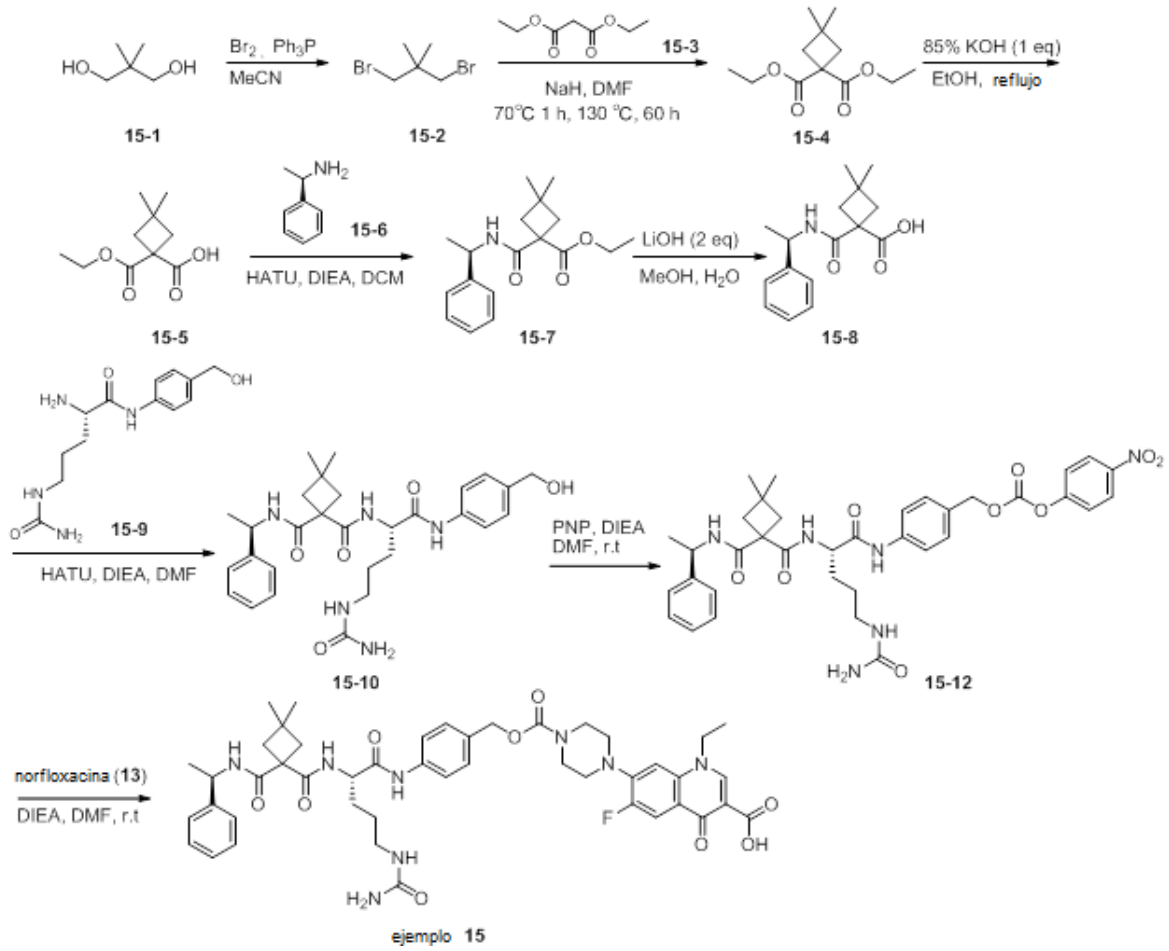
El Ejemplo 14 se preparó usando el procedimiento como en el Ejemplo **5**.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO–d_6) δ 10,16 (s, 1 H), 8,96 (s, 1 H), 7,97 – 7,93 (d, J = 13,2 Hz, 1 H), 7,85 – 7,83 (d, J = 7,6 Hz, 1 H), 7,63 – 7,61 (d, J = 8,8 Hz, 2 H), 7,43 – 7,41 (d, J = 8,8 Hz, 1 H), 7,35 – 7,33 (d, J = 8,8 Hz, 2 H), 7,22 – 7,21 (d, J = 6,8 Hz, 1 H), 6,00 – 5,97 (m, 1 H), 5,43 (s, 2 H), 5,07 (s, 2 H), 4,61 – 4,56 (m, 2 H), 4,46 – 4,41 (m, 1 H), 3,62 (m, 6 H), 3,41 (s, 2 H), 3,30 (s, 4 H), 3,12 – 2,89 (m, 2 H), 2,45 – 2,39 (m, 4 H), 1,76 – 1,62 (m, 4 H), 1,44 – 1,39 (m, 3 H) , 1,00 (d, J = 6,8 Hz, 3 H) , 0,82 (d, J = 5,6 Hz, 6 H).

Ejemplo 15. Ácido 7–(4–((4–((S)–2–(3,3–dimetil–1–((R)–1–feniletilcarbamoil)ciclobutancarboxamido)–5–ureidopentanamido)benciloxi)carbonil)piperazin–1–il)–1–etil–6–fluoro–4–oxo–1,4–dihidroquinolin–3–carboxílico



Ejemplo 15



Etapa 1. A una solución agitada de Ph_3P (91,8 g, 350 mmol) en MeCN (250 mL) se añadió en porciones una solución de bromo (56 g, 350 mmol) en MeCN (40 mL) a 0 °C. A continuación, el compuesto **15–1** (18,2 g, 175 mmol) se añadió a la mezcla. La reacción se calentó a reflujo durante 16 h. El solvente se removió y el residuo se destiló para dar **15–2** en forma de un aceite amarillo claro (14 g, 35%).

^{1}H RMN $CDCl_3$ 400 MHz, δ 3,40 (s, 4 H), 1,17 (s, 6 H).

Etapa 2. A una suspensión de NaH (3,4 g, 60%, 84,9 mmol) en DMF (40 mL), compuesto **15–3** (11,14 g, 69,6 mmol) se añadió en porciones a 0 °C. La mezcla se calentó a 70 °C durante 1 h bajo N_2. A continuación, el compuesto **15–2** (8,0 g, 34,8 mmol) se añadió y se agitó durante 60 h bajo N_2. La mezcla se vertió en una solución acuosa de NH_4Cl (20 g en 300 mL) y se extrajo con PE (50 mL x 5). La fase orgánica se concentró

y se purificó por cromatografía (PE) para obtener el compuesto **15–4** (3,0 g, rendimiento: 37,9%).

^{1}H RMN $CDCl_3$ 400 MHz δ 4,21– 4,16 (m, 4 H), 2,36 (s, 4 H), 1,26 – 1,22 (m, 6H), 1,11 (s, 6 H).

Etapa 3. A una solución agitada del compuesto **15–4** (3,0 g, 13,9 mmol) en EtOH (10 mL) se añadió KOH acuoso (85%, 779 mg, 13,9 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó a 76 ^{o}C durante 3 h. La mezcla se concentró y se dividió en EtOAc (75 mL) y H_2O (125 mL). La fase acuosa se acidificó con HCl 1 N hasta pH = 3 y se extrajo con EtOAc (75 mL x 2). La capa orgánica se concentró para dar el compuesto **15–5** (1,9 g, 68,3%) en forma de aceite.

^{1}H RMN $CDCl_3$ 400 MHz, δ 11,62 (s, 1 H), 4,26 – 4,21 (m, 2 H), 2,42 (s, 4 H), 1,29 – 1,26 (m, 3H), 1,15 – 1,13 (d, J = 7,2 Hz, 6 H).

Etapa 4. A una solución agitada del compuesto **15–5** (500 mg, 0,5 mmol) en DCM (8 mL) se añadió HATU (285,0 mg, 0,75 mmol) y DIPEA (193,5 mg, 1,5 mmol) a temperatura ambiente. Después de agitar la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 30 min, **15–6** (90,9 mg, 0,75 mmol) se añadió y se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. La mezcla se concentró y se purificó por cromatografía (DCM: MeOH = 90: 10) para dar el compuesto **15–7** en forma de sólido blanco (70 mg, 46,2%)

LCMS: (5–95, AB, 1,5 min, ESI), 0,807 min, MS = 303,9 [M+1]

^{1}H RMN $CDCl_3$ 400 MHz, δ 7,34 – 7,22 (m, 5 H), 6,19 (d, J = 7,2 Hz, 1 H), 5,14 – 5,06 (m, 1 H), 4,22 – 4,16 (m, 2 H), 2,46 – 2,31 (m, 4 H), 1,46 (d, J = 6,8 Hz, 3 H), 1,25 – 1,21 (m, 3 H), 1,09 (s, 6 H).

Etapa 5. A una solución agitada del compuesto **15–7** (70 mg, 0,23 mmol) en MeOH / THF /H_2O (1 mL / 2 mL/2 mL) se añadió $LiOH{\cdot}H_2O$ (19,4 mg, 0,462 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó a

temperatura ambiente durante 1 h. El solvente orgánico se removió y se dividió en EtOAc (30 mL) y H_2O (25 mL). La fase acuosa se acidificó con HCl 1 N a pH = 3 y se extrajo con EtOAc (30 mL). La fase orgánica se concentró para obtener el compuesto **15–8** en forma de sólido blanco (50 mg, 78,7%).

^{1}H RMN $CDCl_3$ 400 MHz, δ 7,34 – 7,23 (m, 5 H), 6,30 (d, J = 7,2 Hz, 1 H), 5,14 – 5,07 (m, 1 H), 2,50 – 2,31 (m, 4 H), 1,48 (d, J = 6,8 Hz, 3 H), 1,11 (d, J = 16 Hz, 6 H).

Etapa 6. A una solución agitada del compuesto **15–8** (50 mg, 0,18 mmol) en DCM (10 ml) se añadió HATU (102,6 mg, 0,27 mmol) y DIPEA (46,44 mg, 0,36 mmol) a temperatura ambiente y se agitó durante 30 min. El compuesto **15–9** (53 mg, 0,19 mmol) se añadió en la mezcla de reacción y se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. La mezcla se concentró y se purificó por cromatografía (DCM: MeOH = 85: 15) para obtener el compuesto **15–10** (60 mg, 61,8%) en forma de sólido blanco.

LCMS: (5–95, AB, 1,5 min, ESI), 0,803 min, MS = 538,2[M+1]

^{1}H RMN Metanol–d_4 400 MHz, δ 8,19 (d, J = 8 Hz, 1 H), 7,58 (d, J = 8,4 Hz, 2 H), 7,31 – 7,17 (m, 7 H), 5,07 – 5,00 (m, 1 H), 4,56 (s, 2 H), 4,51 – 4,47 (m, 1 H), 3,21 – 3,17 (m, 1 H), 2,45 – 2,35 (m, 4 H), 1,89 – 1,85 (m, 1 H), 1,75 – 1,72 (m, 1 H),1,55 – 1,47 (m, 5H), 1,08(d, J = 2 Hz, 6 H).

Etapa 7. A una solución agitada del compuesto **15–10** (60 mg, 0,11 mmol) en DMF seca (3 mL) se añadió carbonato de PNP (**15–11**) (66,9 mg, 0,22 mmol) y DIPEA (70,9 mg, 0,55 mmol) a temperatura ambiente y se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. La mezcla (**15–12**) se usó para la siguiente etapa sin ulterior purificación.

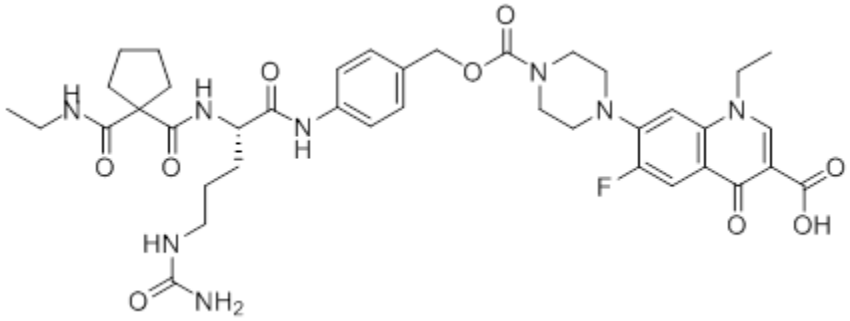
Etapa 8. A la mezcla de reacción de la última etapa se añadió norfloxacina (70,2 mg, 0,22 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 h y se purificó por HPLC

prep para dar el ejemplo **15** (14,4 mg, rendimiento: 14,8 %).

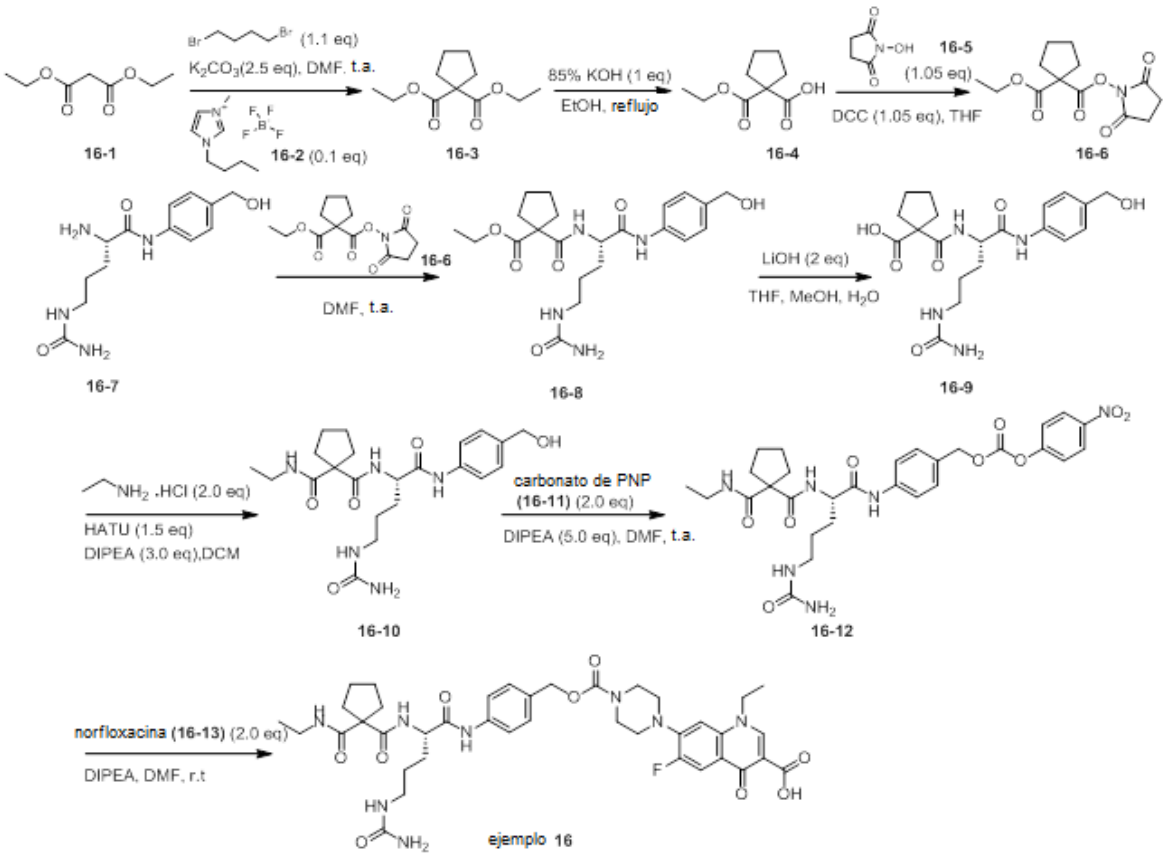
LCMS: (5–95, AB, 1,5 min, ESI), 0,887 min, MS = 883,4 [M+1], 442,4 [1/2M+1]

^{1}H RMN DMSO – d_6 400 MHz, δ 10,24 (s, 1 H), 8,94 (s, 1 H), 8,39 (s, 1 H), 8,13 (d, J = 2 Hz, 1 H), 7,965 – 7,963 (m, 2 H), 7,63 (d, J = 8,4 Hz, 2 H), 7,47 (d, J = 8,8 Hz, 2 H), 7,30 – 7,26 (m, 4 H), 7,19 – 7,18 (m, 2 H), 6,05 (s, 1 H), 5,46 (s, 2 H), 5,07 (s, 2 H), 4,97 – 4,91 (m, 1 H), 4,57 (s, 2 H), 4,45 (s, 1 H), 3,62 (s, 4 H), 3,35 (s, 4 H), 3,05 – 3,02 (m, 1 H), 2,96 – 2,92 (m, 1 H), 2,32 – 2,26 (m, 4 H), 1,73 – 1,71 (m, 1 H), 1,63 – 1,61 (m, 1 H), 1,42 – 1,37 (m, 8 H), 0,99 (s, 6 H).

Ejemplo 16. Ácido (S)–1–etil–7–(4–((4–(2–(1–(etilcarbamoil)ciclopentanecarboxamido)–5–ureidopentanamido)benciloxi)carbonil)piperazin–1–il)–6–fluoro–4–oxo–1,4–dihidroquinolin–3–carboxílico



ejemplo 16



Etapa 1. A una solución del compuesto **16–1** (10 g, 62,4 mmol) en DMF (50 mL) se añadió 1,4–dibromobutano (14,8 g, 68,6 mmol), K_2CO_3 (21,5 g, 155,8 mmol) y compuesto **16–2** (1,4 g, 6,2 mmol) a temperatura ambiente y se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. El solvente se removió a presión reducida y el residuo se dividió entre EtOAc (200 mL) y H_2O (80 mL), la fase orgánica combinada se secó y se concentró para dar el compuesto **16–3** en forma de aceite (10,0 g, rendimiento: 75%). ^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 4,15 – 4,10 (m, 4 H), 2,14 – 2,10 (m, 4 H), 1,64 – 1,61 (m, 4 H), 1,20 – 1,17 (m, 6 H).

Etapa 2. A una solución del compuesto **16–3** (6,0 g, 28,0 mmol) en EtOH (20 mL) se añadió solución acuosa al 85% de KOH (1,85 g, 28,0 mmol) a temperatura ambiente y se agitó a 76 ^{o}C durante 3 h. El solvente se removió y el residuo se dividió entre EtOAc (20 mL) y H_2O (30 mL). La fase acuosa se acidificó con HCl 1 N a pH = 3 y se extrajo con EtOAc

(20 mL×2). La capa orgánica se secó y se concentró para dar el compuesto **16–4** en forma de aceite (2,5 g, rendimiento: 48,0%).

^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 10,61 – 10,60 (m, 1 H), 4,21 – 4,15 (m, 2 H), 2,21 – 2,18 (m, 4 H), 1,72 – 1,65 (m, 4 H), 1,26 – 1,22 (m, 3 H).

Etapa 3. A una solución del compuesto **16–4** (2,5 g, 13,4 mmol) y compuesto **16–5** (1,62 g, 14,1 mmol) en THF seco (20 mL) se añadió DCC (3,04 g, 14,74 mmol) a 0 ºC. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 h bajo N_2. La mezcla se filtró y el filtrado se concentró para dar el compuesto crudo **16–6** que se usó para la siguiente etapa sin ulterior purificación.

^{1}H RMN (400 MHz, MeOH–d_4) δ 4,23 – 4,18 (m, 2 H), 2,79 (s, 4 H), 2,36 – 2,23 (m, 4 H), 1,76 – 1,72 (m, 4 H), 1,30 – 1,28 (t, J = 7,2 Hz, 3 H).

Etapa 4. A una solución del compuesto **16–6** (1,0 g, 3,53 mmol) en DMF (15 mL) se añadió el compuesto **16–7** (658,7 mg, 2,35 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. La mezcla se concentró y se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (DCM : MeOH = 10:1) para dar el compuesto **16–8** en forma de sólido blanco (150 mg, rendimiento: 14,2%).

LCMS (ESI): m/z 449,0 [M+1].

Etapa 5. A una solución del compuesto **16–8** (150 mg, 0,33 mmol) en THF/ MeOH /H_2O(3 mL / 3 mL/1,5 mL) se añadió LiOH·H_2O (28,14 mg, 0,67 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. La mezcla se concentró y se dividió en EtOAc (15 mL) y H_2O (20 mL). La fase acuosa se acidificó con HCl 1 N a pH = 3, se extrajo con EtOAc (15 mL × 3) y se concentró para dar el compuesto crudo **16–9** en forma de sólido blanco que se usó en la siguiente etapa sin ulterior purificación.

LCMS (ESI): m/z 420,9 [M+1].

Etapa 6. A una solución del compuesto **16–9** (250 mg, 0,595 mmol) en DMF (15 mL) se añadió HATU (339,2 mg, 0,89 mmol) y DIPEA (268,6 mg, 2,08 mmol) a temperatura ambiente y se agitó durante 30 min. Clorhidrato de etilamina (96,98 mg, 1,19 mmol) se añadió en la mezcla de reacción y se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. La mezcla se filtró y se purificó por HPLC prep y SFC para dar el compuesto **16–10** en forma de sólido blanco (30 mg, rendimiento: 11,3%).

LCMS (ESI): m/z 447,9 [M+1].

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO – d_6) δ 9,99 (s, 1 H), 7,75 – 7,73 (m, 2 H), 7,57 – 7,55 (m, 2 H), 7,23 – 7,21 (m, 2 H), 5,97 – 5,94 (m, 1 H), 5,39 (s, 2 H), 5,11 – 5,08 (m, 1 H), 4,41 – 4,36 (m, 2 H), 4,35 – 4,32 (s, 1 H), 3,13 – 3,06 (m, 2 H), 2,97 – 2,90 (m, 2 H), 2,16 – 2,14 (m,2 H), 2,11 – 2,05 (m, 1 H), 1,95 – 1,93 (m, 1 H), 1,92 – 1,91 (m, 1 H), 1,51 – 1,49 (m, 4 H), 1,39 – 1,37 (m, 1 H), 1,20 – 1,19 (m, 2 H), 1,02 – 0,98 (t, J = 7,2 Hz, 3 H).

Etapa 7. A una solución del compuesto **16–10** (30 mg, 0,067 mmol) en DMF seca (3 mL) se añadió el compuesto **16–11** (40,7 mg, 0,134 mmol) y DIPEA (43,22 mg, 0,335 mmol) a 0 ºC. Después de agitar la mezcla a temperatura ambiente durante 5 h, se usó para la siguiente etapa directamente sin ulterior purificación.

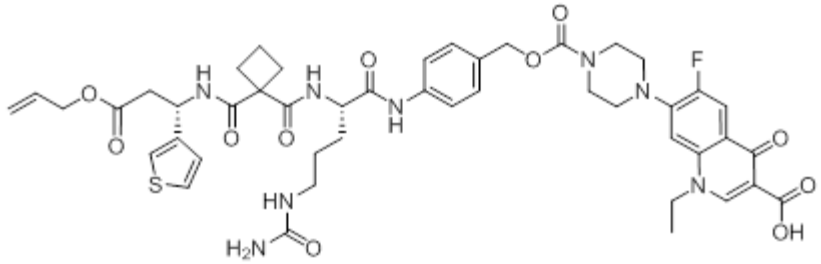
Etapa 8. A la mezcla de la última etapa (**16–12**) se añadió el compuesto **16–13** (42,8 mg, 0,134 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 h y luego se purificó por HPLC prep para dar el producto deseado **ejemplo 16**. (35,0 mg Rendimiento: 66,0 %)

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO–d_6) δ 15,32 (s, 1 H), 10,09 (s, 1 H), 8,95 (s, 1 H), 7,93 (d, J = 13,2 Hz, 1 H), 7,80 – 7,71 (m, 2 H), 7,62 (d, J = 8,4 Hz, 2

H), 7,32 (d, *J* = 8,4 Hz, 2 H), 7,18 (d, *J* = 8,0 Hz, 1 H), 5,98 – 5,91 (m, 1 H), 5,39 (s, 2 H), 5,04 (s, 2 H), 4,60 – 4,52 (m, 2 H), 4,38 – 4,32 (m, 1 H), 3,59 (s, 4 H), 3,30 (s, 4 H), 3,12 – 3,08 (m, 2 H), 2,96 – 2,85 (m, 2 H), 2,14 – 2,11 (m, 2 H), 2,10 – 2,00 (m, 1 H), 1,94 – 1,89 (m, 1 H), 1,63 – 1,40 (m, 5 H), 1,38 – 1,30 (m, 5 H), 1,02 – 0,98 (t, *J* = 7,2 Hz, 3 H).

Ejemplo 17.

Ácido 7–(4–((4–((S)–2–(1–((S)–3–(aliloxi)–3–oxo–1–(tiofen–3–il)propilcarbamoil)ciclobutancarboxamido)–5–ureidopentanamido)benciloxi)carbonil)piperazin–1–il)–1–etil–6–fluoro–4–oxo–1,4–dihidroquinolin–3–carboxílico

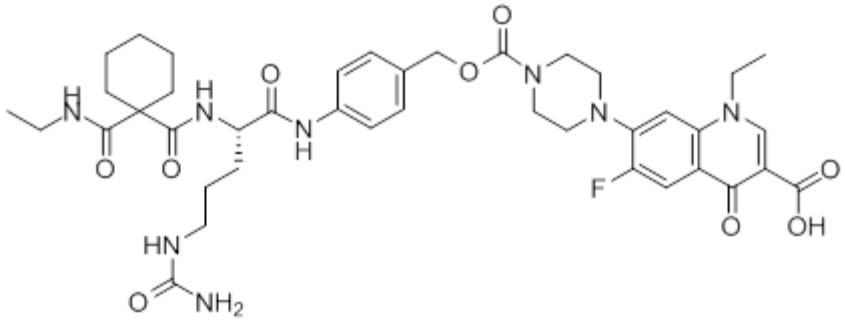


ejemplo 17

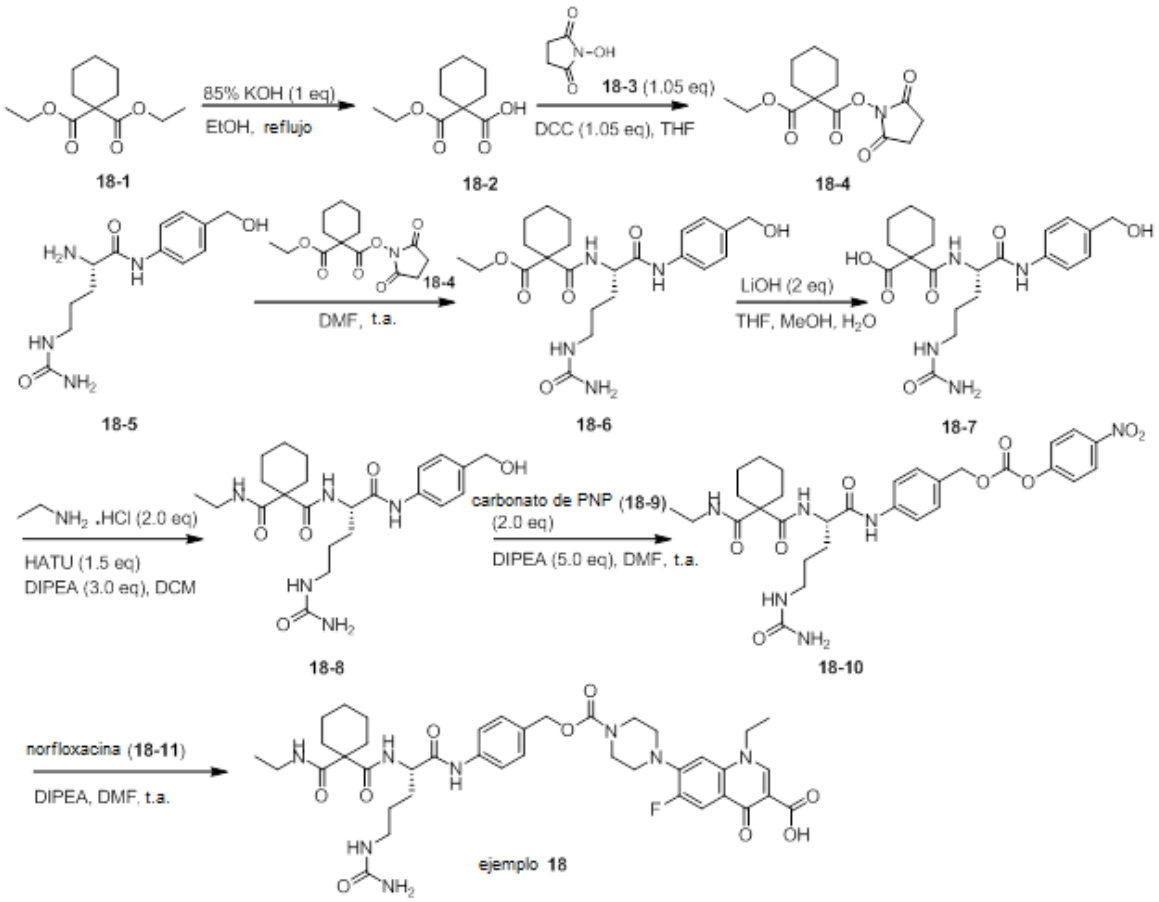
El Ejemplo 17 se preparó usando el procedimiento como en el Ejemplo **7**, con los intermediarios de la síntesis del Ejemplo **7**.

Ejemplo 18.

Ácido (S)–1–etil–7–(4–((4–(2–(1–(etilcarbamoil)ciclohexanecarboxamido)–5–ureidopentanamido)benciloxi)carbonil)piperazin–1–il)–6–fluoro–4–oxo–1,4–dihidroquinolin–3–carboxílico.



ejemplo 18



Etapa 1. A una solución del compuesto **18–1** (4,0 g, 17,5 mmol) en EtOH (20 mL) se añadió solución acuosa al 85% de KOH (1,15 g, 17,5 mmol) a temperatura ambiente. Después de agitar la mezcla de reacción a 76 ^{o}C durante 3 h, se concentró y se dividió en EtOAc (15 mL) y H_2O (25 mL). La fase acuosa se acidificó con HCl 1 N a pH = 3 y se extrajo con EtOAc (15 mL × 2). La capa orgánica se concentró para dar el compuesto **18–2** en forma de un aceite (2,5 g, rendimiento: 71,4%).

^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 4,20 – 4,15 (m, 2 H), 2,03 – 1,90 (m, 4 H), 1,56 – 1,47 (m, 6 H), 1,45 – 1,43 (t, 4,0 Hz, 3 H).

Etapa 2. A una solución del compuesto **18–2** (2,5 g, 12,5 mmol) y **18–3** (1,51 g, 13,13 mmol) en THF seco (20 mL) se añadió DCC (2,83 g, 13,35 mmol) a 0 ºC. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 h bajo N_2. La mezcla se filtró y el filtrado se concentró para dar el

compuesto crudo **18–4** que se usó para la siguiente etapa sin ulterior purificación (2,0 g, rendimiento: 53,8%).

Etapa 3. A una solución agitada del compuesto **18–4** (2,0 g, 6,7 mmol) en DMF (15 mL) se añadió el compuesto **18–5** (1,26 g, 4,5 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. La mezcla se concentró y se purificó por cromatografía en columna (DCM : MeOH = 10:1) para dar el compuesto **18–6** en forma de sólido blanco (700 mg, rendimiento: 22,4%).

LCMS (ESI): m/z 463,0 [M+1].

Etapa 4. A una solución del compuesto **18–6** (700 mg, 1,50 mmol) en THF/ MeOH /H_2O(4 mL / 4 mL/2 mL) se añadió LiOH·H_2O (126,0 mg, 3,0 mmol) a temperatura ambiente. Después de agitar la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 16 h, se concentró y se dividió en EtOAc (25 mL) y H_2O (30 mL), la fase acuosa se acidificó con HCl 1 N a pH = 3, se extrajo con EtOAc (25 mL × 2) y se concentró para dar el compuesto crudo **18–7** en forma de sólido blanco que se usó en la siguiente etapa sin ulterior purificación.

LCMS (ESI): m/z 435,0 [M+1].

Etapa 5. A una solución del compuesto **18–7** (300 mg, 0,69 mmol) en DMF (15 mL) se añadió HATU (395,2 mg, 1,04 mmol) y DIPEA (267,03 mg, 2,07 mmol) a temperatura ambiente y se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. Etilamina (112,47 mg, 1,38 mmol) se añadió en la mezcla de reacción y se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. La mezcla se filtró y se purificó por HPLC prep y SFC para dar el compuesto **18–8** (60 mg, rendimiento: 18,8%) en forma de sólido blanco.

LCMS (ESI): m/z 462,0 [M+1].

^{1}H RMN (400 MHz, MeOH – d_4) δ 7,62 (d, J =8,4 Hz, 2 H), 7,28 (d, J =8,8 Hz, 2 H), 4,58 (s, 1 H), 4,54 – 4,50 (m, 3 H), 3,62 – 3,57 (m, 1 H),

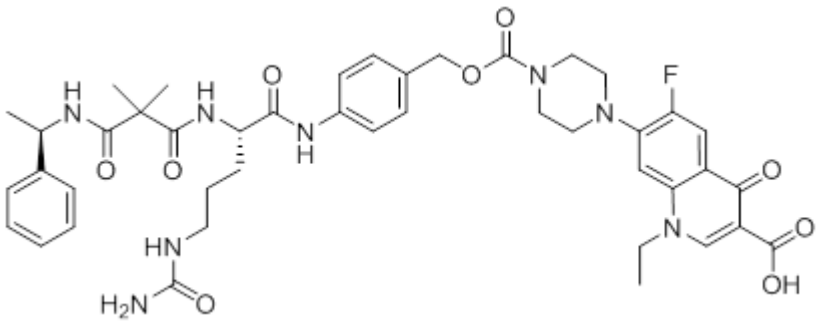
3,26 – 3,18 (s, 2 H), 3,10 – 3,07 (m, 2 H), 2,16 – 2,02 (m, 2 H), 1,85 – 1,81 (m, 3 H), 1,73 – 1,71 (m, 1 H), 1,59 – 1,50 (m, 5 H), 1,18 – 1,14 (m, 1 H), 1,12 – 1,09 (m, 3 H).

Etapa 6. A una solución agitada del compuesto **18–8** (100 mg, 0,216 mmol) en DMF seca (3 ml) se añadió el compuesto **18–9** (131,3 mg, 0,432 mmol) y DIPEA (139,3 mg, 1,08 mmol) a 0 ºC. La mezcla (**18–10**) se agitó a temperatura ambiente durante 3 h y se usó para la siguiente etapa sin ulterior purificación.

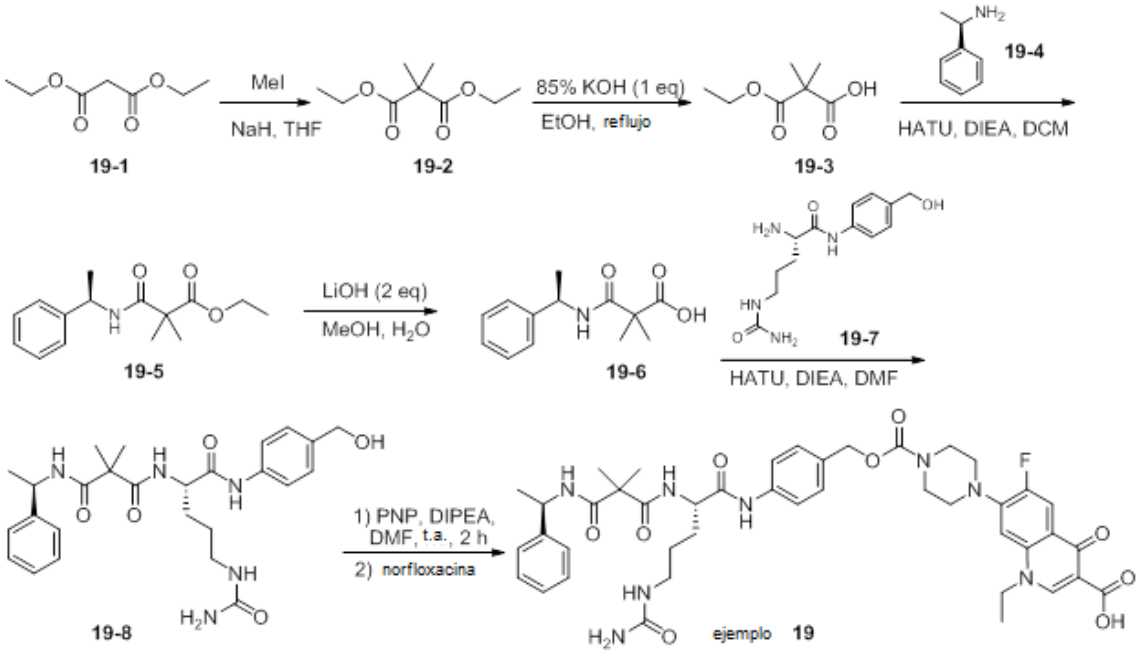
Etapa 7. A la mezcla (**18–10**) de la última etapa se añadió norfloxacina (**18–11)** (137,9 mg, 0,432 mmol) a temperatura ambiente y se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. La mezcla se purificó por HPLC prep para dar el ejemplo **18** (98,0 mg Rendimiento: 56,2 %).

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO – d_6) δ 15,30 (s, 1 H), 10,09 (s, 1 H), 8,93 (s, 1 H), 7,92 (d, J = 13,2 Hz, 1 H), 7,78 – 7,72 (m, 1 H), 7,67 (d, J = 7,6 Hz, 1 H), 7,63 (d, J = 8,8 Hz, 2 H), 7,32 (d, J = 8,8 Hz, 2 H), 7,18 (d, J = 8,0 Hz, 1 H), 5,98 – 5,92 (m, 1 H), 5,38 (s, 2 H), 5,04 (s, 2 H), 4,57 – 4,55 (m, 2 H), 4,39 – 4,31 (m, 1 H), 3,59 (s, 4 H), 3,31 (s, 4 H), 3,31 – 3,08 (m, 2 H), 3,00 – 2,86 (m, 2 H), 2,12 – 2,03 (m, 1 H), 2,01 – 1,91 (m, 1 H), 1,90 – 1,83 (m, 3 H), 1,58 – 1,67 (m, 1 H), 1,40 – 1,25 (m, 11 H), 1,01 – 0,97 (t, J = 7,2 Hz, 3 H).

Ejemplo 19. Ácido 7–(4–((4–((S)–2–(2,2–dimetil–3–oxo–3–((R)–1–feniletilamino)propanamido)–5–ureidopentanamido)benciloxi)carbonil)piperazin–1–il)–1–etil–6–fluoro–4–oxo–1,4–dihidroquinolin–3–carboxílico



ejemplo 19



Etapa 1. A una solución del compuesto **19–1** (5,0 g, 31,22 mmol) en THF anhidro (70 mL) se añadió NaH (3,75 g, 93,65 mmol, c = 60 %) lentamente a 0 ^{o}C. Después de agitar la mezcla a 0 ^{o}C durante 10 m. MeI (6,15 mL, 124,88 mmol) se añadió en porciones a 0 ^{o}C y la mezcla de reacción se agitó a 0 ^{o}C durante 2 h. La mezcla se diluyó con EtOAc (50 mL), se filtró, el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se diluyó con EtOAc (50 mL), se filtró y el filtrado se concentró para obtener el compuesto **19–2** (3,5 g, 59,6 %) en forma de un aceite.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO–d_6) δ 4,13 – 4,08 (q, 4H), 1,33 (s, 6H), 1,16 (t, J = 6,8 Hz, 6H).

Etapa 2. A una solución del compuesto **19–2** (3,0 g, 15,94 mmol) en EtOH (20 mL) se añadió solución acuosa de KOH (85%, 894 mg, 15,94 mmol). La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 1 h. Después de remover el solvente orgánico a presión reducida, se diluyó con H_2O (20 mL) y se lavó con PE (10 mL × 2). La fase acuosa se ajustó a pH 2 con solución conc. de HCl y se extrajo con EtOAc (20 mL × 3). La capa combinada de EtOAc se secó sobre Na_2SO_4, se filtró y se concentró a presión reducida para obtener el compuesto **19–3** (1,5 g, 58,8 %).

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO–d_6) δ 3,98 – 3,93 (q, 4H), 1,17 (s, 6H), 1,12 (t, J = 7,2 Hz, 3H).

Etapa 3. A una mezcla del compuesto **19–3** (1,0 g, 6,24 mmol) en DCM anhidra (20 mL) se añadió DIPEA (1,61 g, 12,48 mmol), seguido por HATU (2,85 g, 7,49 mmol). Después de agitar la mezcla a temperatura ambiente durante 15 min y compuesto **19–4** (908 mg, 7,49 mmol) se añadió. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 h y se lavó con solución de ácido cítrico (10 mL × 3), salmuera (10 mL × 1), se secó sobre Na_2SO_4, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna (PE/EtOAc = 5:1) para obtener el compuesto **19–5** en forma de un sólido blanco (1,30 g, 79,3 %).

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO–d_6) δ 8,00 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,31 – 7,28 (m, 4H), 7,22 – 7,18 (m, 1H), 4,97 – 4,90 (m, 1H), 4,12 – 4,01 (m, 2H), 1,36 (d, J = 6,8 Hz, 3H), 1,33 (d, J = 2,4 Hz, 6H), 1,14 (d, J = 6,8 Hz, 3H).

Etapa 4. A una solución del compuesto **19–5** (1,5 g, 5,70 mmol) en una mezcla de MeOH/H_2O (15 mL/ 5 mL) se añadió $LiOH{\cdot}H_2O$ (478 mg, 11,40 mmol). La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 2 h. El solvente orgánico se removió a presión reducida la suspensión acuosa se lavó con DCM (5 mL × 3). Se ajustó a pH 1 con slu concentrada de

HCl y se extrajo con EtOAc (10 mL × 3). La capa combinada de EtOAc se secó sobre Na_2SO_4, se filtró y se concentró a presión reducida para obtener el compuesto **19–6** en forma de sólido blanco (800 mg, 59,7 %).

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO–d_6) δ 12,45 (br, 1H), 7,95 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,32 – 7,27 (m, 4H), 7,23 – 7,17 (m, 1H), 4,97 – 4,90 (m, 1H), 1,36 (d, J = 6,8 Hz, 3H), 1,31 (d, J = 3,6 Hz, 6H).

Etapa 5. A una solución del compuesto **19–6** (167 mg, 0,71 mmol) en DMF (5 mL) se añadió DIPEA (183 mg, 1,42 mmol), seguido por HATU (323 mg, 0,85 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 10 min y el compuesto **19–7** (200 mg, 0,71 mmol) se añadió. Después de agitar la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 2 h, se purificó por HPLC prep para obtener el compuesto **19–8** en forma de sólido blanco (80 mg, 22,7 %).

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO–d_6) δ 10,05 (s, 1H), 8,11 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,88 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 7,57 – 7,54 (m, 2H), 7,32 – 7,25 (m, 4H), 7,22 – 7,15 (m, 3H), 5,95 (t, J = 5,6 Hz, 1H), 5,39 (s, 2H), 5,08 (br, 1H), 4,98 – 4,94 (m, 1H), 4,41 (s, 2H), 4,36 – 4,31 (m, 1H), 3,00 – 2,89 (m, 2H), 1,78 – 1,75 (m, 1H), 1,63 – 1,59 (m, 1H), 1,40 – 1,33 (m, 8H), 1,30 (s, 3H).

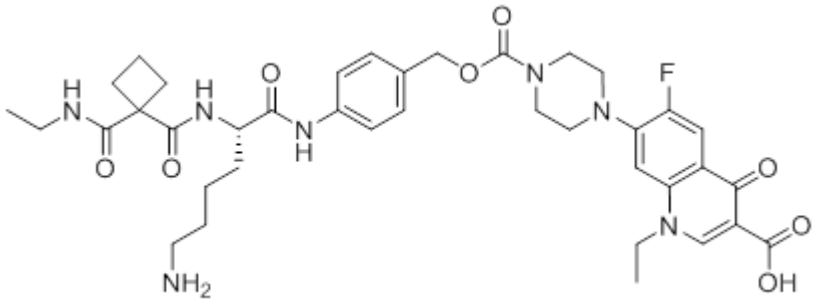
Etapa 6. A una solución del compuesto **19–8** (80 mg, 0,16 mmol) en DMF anhidra (4 mL) se añadió DIPEA (103 mg, 0,80 mmol), seguido por carbonato de PNP (97 mg, 0,32 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente bajo N_2 durante 2 h, norfloxacina (102 mg, 0,32 mmol) se añadió. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante otra hora, se filtró y el filtrado se purificó por HPLC prep para obtener el ejemplo **19** en forma de sólido blanco (81 mg, 60,0 %).

LCMS (ESI): RT = 0,854 min, M/2+H$^+$ = 422,2. Método = 5–95 /1,5 min.

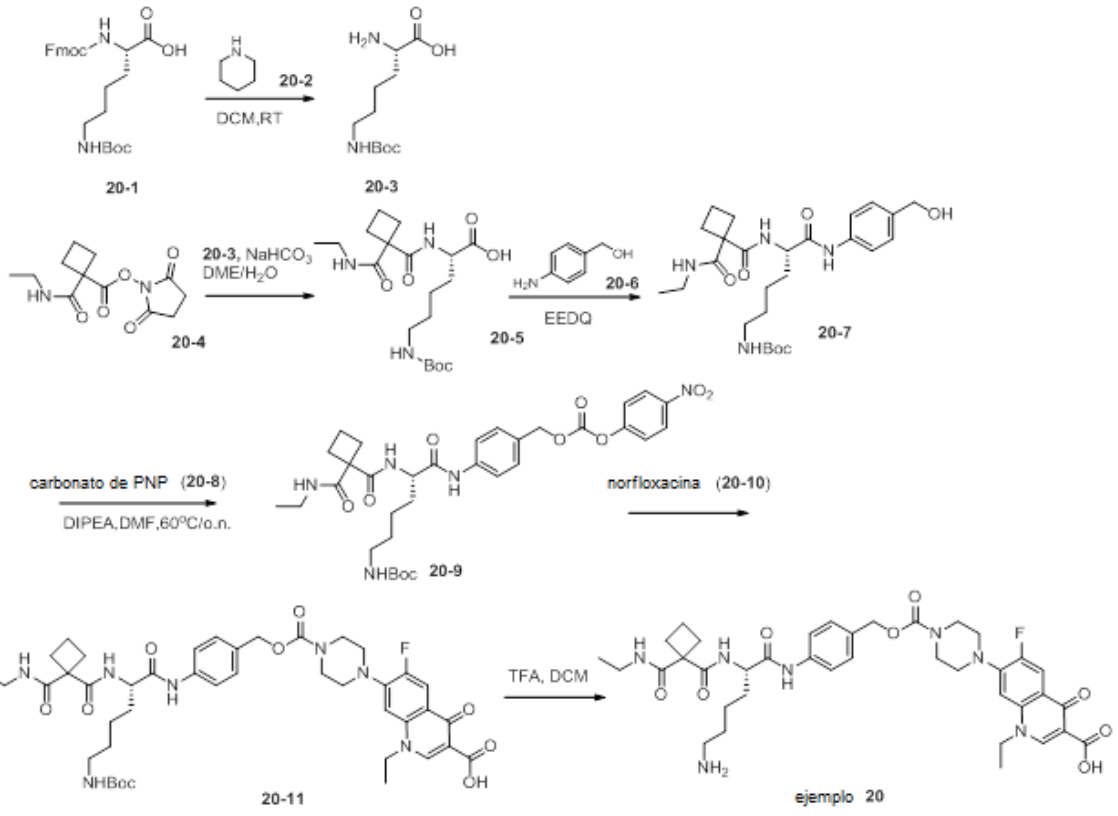
^{1}H RMN (400 MHz, DMSO–d_6) δ 15,30 (br, 1H), 10,16 (s, 1H), 8,95 (s, 1H), 8,11 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,95 – 7,91 (m, 2H), 7,64 (d, J = 8,8 Hz,

2H), 7,35 – 7,27 (m, 6H), 7,21 – 7,17 (m, 2H), 5,97 (t, *J* = 5,6 Hz, 1H), 5,42 (s, 2H), 5,07 (s, 2H), 5,00 – 4,97 (m, 1H), 4,58 – 4,55 (m, 2H), 4,39 – 4,33 (m, 1H), 3,61 (s, 4H), 3,31 (s, 4H), 3,02 – 2,92 (m, 2H), 1,80 – 1,78 (m, 1H), 1,64 – 1,62 (m, 1H), 1,42 – 1,33 (m, 14H).

Ejemplo 20. Ácido (S)–7–(4–((4–(6–amino–2–(1–(etilcarbamoil)ciclobutancarboxamido)hexanamido)benciloxi)carbonil)piperazin–1–il)–1–etil–6–fluoro–4–oxo–1,4–dihidroquinolin–3–carboxílico



ejemplo 20



Etapa 1. A una solución agitada del compuesto **20–1** (5 g, 10,7 mmol) en

DCM se añadió el compuesto **20–2** (5,5 ml, 53 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. La mezcla de reacción se extrajo con H_2O y las capas acuosas combinadas se concentraron para dar **20–3**. (Rendimiento: 95 %)

Etapa 2. A una solución del compuesto **20–4** (1,5 g, 5,6 mmol) en DME (50 ml) se añadió una solución del compuesto **20–3** (2,75 g, 11,2 mmol) y $NaHCO_3$ (940 mg, 11,2 mmol) en agua (50 mL). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. La mezcla se lavó con EtOAc y se acidificó a pH 3 con 10% de HCl. La suspensión resultante se extrajo con EtOAc. La capa orgánica combinada se concentró para dar el compuesto **20–5**. (Rendimiento: 80 %)

LCMS (ESI): m/z 400,0 [$M+H^+$].

Etapa 3. A una solución del compuesto **20–5** (1 g, 2,5 mmol) en una mezcla de DCM y MeOH (20 mL, 10 mL) se añadieron 4–amino–fenil)metanol (**20–6**) (462 mg, 3,75 mmol) y EEDQ (1,236 g, 5 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. El residuo se purificó por columna (PE/EtOAc = 1/3) para dar **20–7** (Rendimiento: 60 %).

LCMS (ESI): m/z 505,1 [$M+H^+$].

Etapa 4. A una solución del compuesto **20–7** (180 mg, 0,36 mmol) en DMF (6 mL) se añadió el compuesto **20–8** (219 mg, 0,72 mmol) y DIPEA (140 mg, 1,08 mmol) a 0 ºC. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. La mezcla (**20–9**) se usó en la siguiente etapa sin ulterior purificación. (Rendimiento: 100 %)

LCMS (ESI): m/z 670,6 [$M+H^+$].

Etapa 5. A la mezcla de **20–9** crudo se añadió norfloxacina (230 mg, 0,72 mmol) a temperatura ambiente y se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. El residuo se purificó por HPLC prep para dar el compuesto

20–11. (Rendimiento: 60 %)

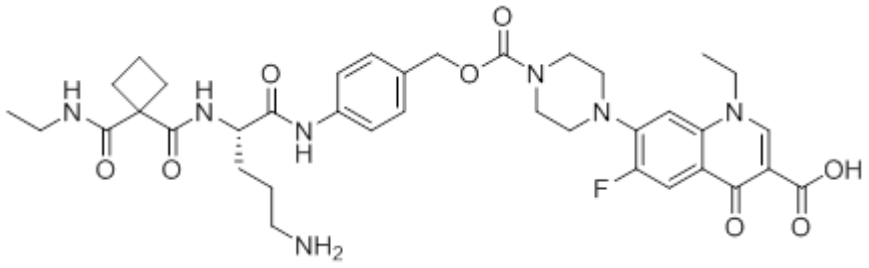
LCMS (ESI): m/z 850,5 [M+H^+].

Etapa 6. Al compuesto **20–11** se añadió una solución de TFA y DCM (1:1) a 0 ^oC. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. La mezcla se alcalinizó a pH = 9 con $NH_3.H_2O$. El residuo se purificó por HPLC prep y SFC para dar el ejemplo **20** (Rendimiento: 30 %).

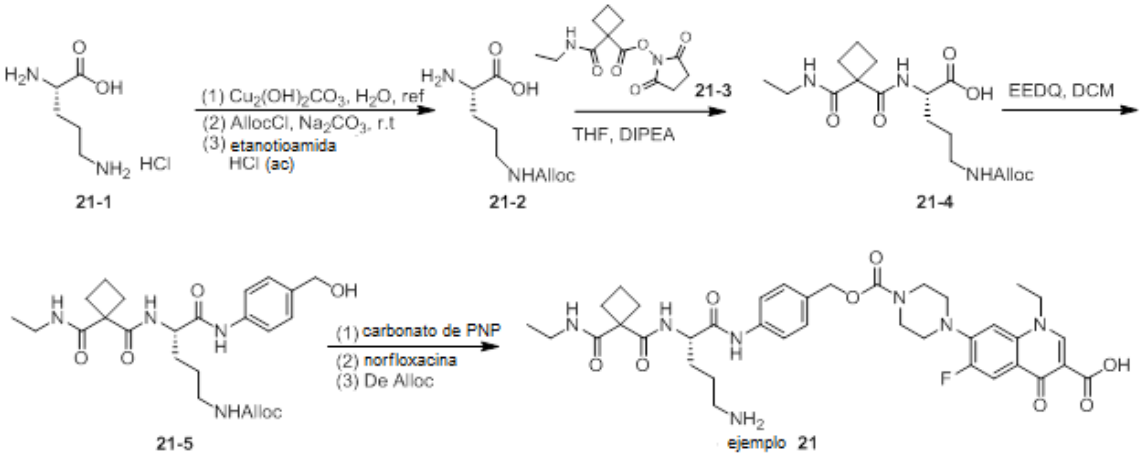
^1H RMN (400 MHz, DMSO–d_6)

δ 10,26 (s, 1 H), 9,43 (HCOOH), 8,97 (d, J = 7,6 Hz, 1 H), 7,99 – 7,89 (m, 6 H), 7,67 – 7,65 (m, 2 H), 7,39 – 7,33 (m, 2 H), 7,23 – 7,21 (m, 1 H), 5,06 (s, 2 H), 4,72 – 4,60 (m, 2 H), 4,40 (s, 1 H), 3,80 – 3,55 (m, 6 H), 3,31 (s, 4 H), 3,15 – 3,12 (m, 2 H), 2,76 – 2,73 (m, 2 H), 2,48 – 2,41 (m, 2 H), 1,81 – 1,69 (m, 4 H), 1,59 – 1,55 (m, 2 H), 1,43 – 1,34 (m, 5 H), 1,07 – 0,98 (m, 3 H).

Ejemplo 21. Ácido (S)–7–(4–((4–(5–amino–2–(1–(etilcarbamoil)ciclobutancarboxamido) pentanamido)benciloxi)carbonil)piperazin–1–il)–1–etil–6–fluoro–4–oxo–1,4–dihidroquinolin–3–carboxílico



ejemplo 21



Etapa 1. A una solución de **21–1** (10,0 g, 0,06 mol) en H_2O (300 mL) se añadió $Cu_2(OH)_2CO_3$ (24,0 g, 0,12 mol). Después de agitar la mezcla a 100 ºC durante 1 h, se filtró rápidamente. Na_2CO_3 (20,0 g, 0,18 mol) se añadió al filtrado. Después de agitar a temperatura ambiente durante 20 min, AllocCl (12,0 g, 0,10 mol) se añadió en porciones a temperatura ambiente y se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. La mezcla se filtró y se lavó con H_2O, luego la etanotioamida (7,5 g, 0,10 mol) se añadió. Después de agitar a 50 ºC durante 3 h, HCl (ac) se añadió para ajustar pH = 3–4. La mezcla se calentó a reflujo durante 1 h. Después de filtrar la mezcla caliente, el filtrado se concentró hasta precipitar el sólido blanco. Se enfrió hasta temperatura ambiente y se filtró para dar **21–2** en forma de sólido blanco (4,5 g, 35%)

Etapa 2. A una solución de **21–2** (1,0 g, 4,6 mmol) en THF (30 mL) se añadió DIPEA (1,9 g, 15,0 mmol) y el compuesto **21–3** (1,2 g, 4,6 mmol). Después de agitar a 100 ºC durante 4 h, la mezcla se enfrió hasta temperatura ambiente agua (100 mL) se añadió, seguido por HCl (ac) para ajustar pH = 2–3. La mezcla se extrajo con EtOAc (50 mL×2). La capa orgánica se lavó con salmuera (50 mL), se secó sobre Na_2SO_4 y se concentró para dar el **21–4** crudo como sólido marrón (1,3 g, crudo).

Etapa 3. A una solución de **21–4** (1,2 g, 3,2 mmol) en DCM (50 mL) se

añadió EEDQ (1,1 g, 4,5 mmol) y (4–aminofenil)metanol (750 mg, 6,0 mmol). Después de agitar la mezcla a temperatura ambiente durante 4 h, el agua (50 mL) se añadió. La mezcla se extrajo con DCM (60 mL×2), se secó sobre Na_2SO_4, se concentró y se purificó por columna (PE: EtOAc = 1:20) para dar **21–5** en forma de aceite amarillo (500 mg, 30%).

Etapa 4. A una solución de **21–5** (500 mg, 1,05 mmol) en DCM (30 mL) se añadió DIPEA (650 mg, 5,0 mmol) y carbonato de PNP (320 mg, 1,5 mmol). La mezcla se calentó a reflujo durante 16 h. El solvente se removió y el residuo se disolvió en DMF (20 mL). DIPEA (400 mg, 3,0 mol) y norfloxacina (380 mg, 1,2 mmol) se añadieron. La mezcla se agitó a 100 ^oC durante 5 h, luego se enfrió hasta temperatura ambiente NaCl saturado (100 mL) se añadió y se filtró para dar el producto crudo en forma de un sólido amarillo (300 mg, MS = 820,2, M +1).

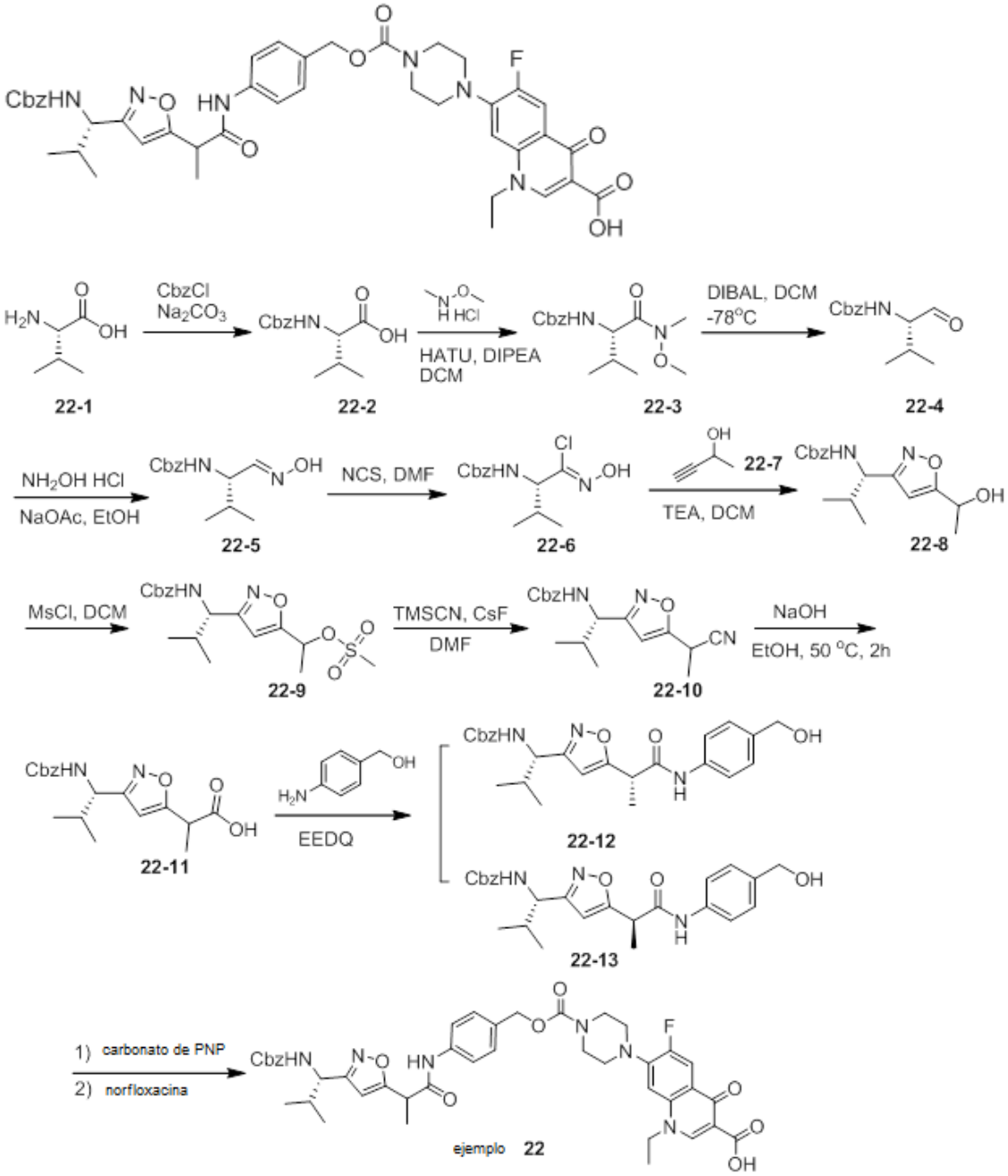
A una solución del producto crudo anterior (300 mg) en THF (30 mL) se añadió $Pd(PPh_3)_4$ (80 mg, 0,07 mmol) y 1, 3–dimetilpirimidin–2,4,6(1H,3H,5H)–triona (1,0 g, 6,4 mmol). La mezcla se agitó a 50 ºC durante 16 h bajo N_2 y se enfrió hasta temperatura ambiente La mezcla se filtró, se concentró y se purificó por HPLC prep para dar el ejemplo **21** (24 mg, 8%).

^1H RMN (400 MHz, DMSO–d_6) δ 10,37 (s, 1 H), 8,94 (s, 1 H), 7,94 – 7,89 (m, 6 H), 7,65 – 7,63 (d, *J* = 8,4 Hz, 2 H), 7,37 – 7,31 (m, 2 H), 7,19 (d, *J* = 7,6 Hz, 1 H), 5,04 (s, 2 H), 4,63 – 4,54 (m, 2 H), 4,47 – 4,41 (m, 1 H), 3,68 – 3,53 (m, 6 H), 3,29 (s, 4 H), 3,14 – 3,08 (m, 2 H), 2,80 – 2,77 (m, 2 H), 2,48 – 2,42 (m, 2 H), 1,88 – 1,63 (m, 6 H), 1,48 (t, *J* = 6,8 Hz, 3 H), 1,05 – 0,95 (t, *J* = 7,2 Hz, 3 H).

Ejemplo 22.

Ácido 7–(4–((4–(2–(3–((S)–1–(benciloxicarbonilamino)–2–metilpropil)isoxazol–5–il)propanamido)benciloxi)carbonil)piperazin–1–il)–

1–etil–6–fluoro–4–oxo–1,4–dihidroquinolin–3–carboxílico



Etapa 1. A una suspensión de compuesto **22–1** (50,0 g, 0,43 mol) y Na_2CO_3 (90,0 g, 0,85 mol) en THF y H_2O (300 mL/300 mL) a 0 ºC se añadió CbzCl (84,0 g, 0,49 mol) lentamente. La mezcla de reacción se dejó calentar hasta temperatura ambiente y se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. La capa orgánica solvente se removió y la solución acuosa se extrajo con EtOAc (200 mL). La solución acuosa se

acidificó a pH = 2 con HCl 1 M y luego se extrajo con EtOAc (200 mL × 2). La capa orgánica combinada se lavó con salmuera (150 mL), se secó sobre Na2SO4 anhidro, se filtró y se concentró para obtener el **22–2** crudo en forma de un sólido blanco, que se usó en la siguiente etapa sin ulterior purificación.

Etapa 2. A la solución del compuesto **22–2** (20 g, 79,6 mmol) en DCM seca (200 mL) se añadió HATU (35 g, 92,1 mmol) y DIPEA (28 g, 217 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 15 min, se añadió clorhidrato de N–metoximetanamina (11 g, 112,8 mmol). Después de agitar la solución durante 3 h, se lavó con HCl 1 M, NaHCO3 saturado y salmuera. La capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4, se filtró, se concentró y se purificó por la columna cromatografía en gel de sílice para dar el compuesto **22–3** (12 g, 51,2 %).

Etapa 3. DIBAL–H (30 mL, 1 M en tolueno) se añadió en porciones a una solución del compuesto **22–3** (4 g, 13,6 mmol) en DCM seca (150 mL) a –78 ºC bajo N_2. Después de agitar la solución a –78 ºC durante 6 h, se neutralizó con MeOH (100 mL) y agua (10 mL). La suspensión se filtró y el filtrado se secó sobre Na_2SO_4. El solvente se removió y el residuo se purificó en gel de sílice columna para obtener el compuesto **22–4** en forma de aceite incoloro (1,1 g, 34,4 %).

^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9,65 (s, 1 H), 7,37–7,32 (m, 5 H), 5,35–5,33 (m, 1 H), 5,12 (s, 2 H), 4,38–4,32 (m, 1 H), 2,36–2,28 (m, 1 H), 1,05 – 1,03 (d, *J* = 7,2 Hz, 3 H), 0,95 (d, *J* = 6,8 Hz, 3 H).

Etapa 4. A la solución del compuesto **22–4** (110 mg, 0,47 mmol) en EtOH (10 mL) se añadió acetato de sodio (57,5 mg, 0,7 mmol) y clorhidrato de hidroxilamina (49 mg, 0,7 mmol). Después de la reacción se agitó a 80 ºC durante 16 h, el solvente se removió y el residuo se disolvió en agua y se extrajo con EtOAc (30 mL×2). Las capas orgánicas combinadas se

lavaron con salmuera (30 mL), se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se concentraron para dar el compuesto **22–5** en forma de un sólido blanco que se usó en la siguiente etapa sin ulterior purificación.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO–d_6) δ 10,97 (s, 0,6 H), 10,73 (s, 0,3 H), 7,49–7,45 (m, 1 H), 7,39–7,29 (m, 5 H), 7,18 (d, J = 7,2 Hz, 0,3 H), 6,54 (d, J = 6,8 Hz, 0,6 H), 5,02 (s, 2 H), 4,63–4,58 (m, 0,6 H), 3,88–3,82 (m, 0,3 H), 1,89–1,78 (m, 1 H), 0,84 (q, J = 6,8 Hz, 6 H).

LCMS (ESI): m/z 251,0 [M+H$^+$].

Etapa 5. A una solución del compuesto **22–5** (800 mg, 3,2 mmol) en DMF (5 mL) se añadió NCS (470 mg, 3,5 mmol). Después de agitar la mezcla durante 1 h a 40 ºC, se diluyó con EtOAc (50 mL) y agua (20 mL). La capa orgánica se separó y se lavó con salmuera (30 mL × 5), se secó sobre Na_2SO_4, se filtró y se concentró para obtener el compuesto **22–6**, que se usó directamente en la siguiente etapa.

Etapa 6. A una solución agitada del compuesto **22–7** (168 mg, 2,4 mmol) en DCM (10 mL) se añadió TEA (240 mg, 2,4 mmol) a 0 ºC. Después de agitar durante 30 min, una solución del compuesto **22–6** (1,2 mmol) en DCM (10 mL) se añadió lentamente. La mezcla de reacción se calentó hasta temperatura ambiente y se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. Se añadió agua a la mezcla de reacción y las capas se separaron y la capa acuosa se extrajo con DCM (20 mL × 3). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (20 mL), se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se concentraron. El residuo se purificó en gel de sílice columna para dar el compuesto **22–8** en forma de un sólido amarillo pálido (150 mg, 39,3 %).

^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,34–7,31 (m, 5 H), 6,09 (s, 1 H), 5,41 (d, J = 8,0 Hz, 1 H), 5,14–5,06 (m, 2 H), 4,96 (d, J = 6,4 Hz, 1 H), 4,78 – 4,74

(q, *J* = 9,2 Hz, 1 H), 2,17–2,08 (m, 1 H), 1,55 (d, *J* = 6,8 Hz, 3 H), 1,03 (d, *J* = 6,8 Hz, 3 H), 0,96–0,91 (t, *J* = 9,6 Hz, 6 H).

Etapa 7. A la solución del compuesto **22–8** (1 g, 3,14 mmol) en DCM seca (50 mL) se añadió MsCl (5 g, 43,9 mmol) a 0 ^{o}C. La mezcla de reacción se dejó calentar hasta temperatura ambiente y se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. Se añadió agua a la mezcla de reacción y las capas se separaron y la capa acuosa se extrajo con DCM (50 mL×3). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (50 mL), se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se concentraron. El producto crudo se purificó en gel de sílice columna para obtener el compuesto **22–9** en forma de aceite incoloro (1,2 g, 96,4 %).

^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,36 – 7,33 (m, 5 H), 6,26 (s, 1 H), 5,82 – 5,77 (q, *J* = 13,6 Hz, 1 H), 5,32 – 5,31 (d, *J* = 8,8 Hz, 1 H), 5,14 – 5,08 (m, 2 H), 4,80 – 4,77 (m, 1 H), 3,00 (s, 3 H), 2,20 – 2,12 (m, 1 H), 1,79 – 1,77 (d, *J* = 6,8 Hz, 3 H), 0,97 – 0,93 (q, *J* = 10 Hz, 6 H).

Etapa 8. Un recipiente que contenía CsF (690 mg, 4,54 mmol) se purgó con N_2, TMSCN (750 mg, 7,57 mmol) y DMF seca (2,5 mL) se añadió. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 15 min y se formó una suspensión amarilla pálida. La solución del compuesto **22–9** (600 mg, 1,51 mmol) en DMF seca (2 mL) se añadió. Después de agitar la mezcla a 50 ºC durante 16 h bajo N_2, agua (50 mL) y EtOAc (50 mL) se añadieron y las capas se separaron. La capa acuosa se extrajo con EtAc (50 mL × 2). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con NaHCO3 ac., salmuera y se secó sobre Na_2SO_4. El solvente se removió y el residuo se purificó por HPLC prep para dar el compuesto **22–10** (60 mg, 12,1 %).

^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,37 – 7,33 (m, 5 H), 6,22 (s, 1 H), 5,28 – 5,26 (m, 1 H), 5,15 – 5,08 (m, 2 H), 4,80 – 4,76 (m, 1 H), 4,12 – 4,06 (m,

J = 14,8 Hz ,1 H), 2,19 – 2,14 (m, 1 H), 1,74 – 1,70 (d, *J* = 7,2 Hz, 3 H), 0,98 – 0,93 (m, 6 H).

LCMS (ESI): m/z 327,9 [M+H^+].

Etapa 9. A una solución agitada del compuesto **22–10** (500 mg, 1,5 mmol) en EtOH (10 mL) se añadió solución acuosa de NaOH (4 M, 5 mL). Después de agitar la mezcla de reacción a 50 ^oC durante 2 h, el solvente orgánico se removió y la capa acuosa se diluyó con H_2O (20 mL) y EtOAc (30 mL). Las capas se separaron y la capa acuosa se acidificó a pH = 2 con 1 M HCl. Se extrajo con EtOAc (30 mL × 2). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron y se concentraron para obtener el compuesto crudo **22–11** que se usó en la siguiente etapa sin ulterior purificación.

Etapa 10. EEDQ (300 mg, 1,22 mmol) se añadió a la solución del compuesto **22–11** (220 mg, 0,61 mmol) y (4–aminofenil)metanol (155 mg, 1,22 mmol) en DCM seca (10 mL) a 0 ^oC bajo N_2. La mezcla de reacción se calentó hasta temperatura ambiente y se agitó a temperatura ambiente durante 1 h bajo N_2. El solvente se removió y el residuo se purificó por HPLC prep y separación por SFC para obtener **22–12 y 22–13.**

^{1}H RMN (400 MHz, MeOD–*d_4) δ* 7,49 – 7,47 (d, *J* = 8,4 Hz, 2 H), 7,27 – 7,23 (m, 7 H), 6,23 (s, 1H), 5,05 – 4,97 (m, 2 H), 4,48 (s, 3 H), 4,00 – 3,94 (q, *J* = 14,0 Hz, 1 H), 2,04 – 1,95 (m, 1 H), 1,52 1,51 (d, *J* = 7,2 Hz, 3 H), 0,91 – 0,90 (d, *J* = 6,8 Hz, 3 H), 0,82 – 0,80 (d, *J* = 6,8 Hz, 3 H).

LCMS (ESI): m/z 473,9 [M+Na^+], 497,0 [M+2Na^+].

^{1}H RMN (400 MHz, MeOD) δ 7,54 – 7,52 (d, *J* = 8,4 Hz, 2 H), 7,31 – 7,29 (m, 7 H), 6,29 (s, 1 H), 5,05 (s, 2 H), 4,55 (s, 3 H), 4,05 – 4,00 (m, 1 H), 2,10 – 2,00 (m, 1 H), 1,58 – 1,56 (d, *J* = 7,2 Hz, 3 H), 0,97 – 0,96 (d, *J* = 6,8 Hz, 3 H), 0,87 – 0,85 (d, *J* = 6,8 Hz, 3 H).

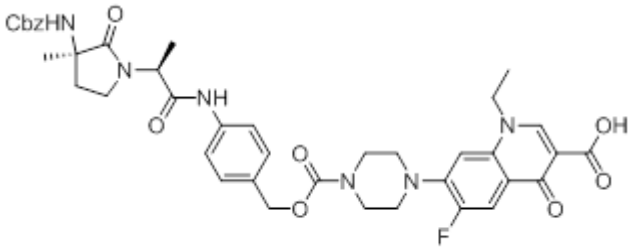
LCMS (ESI): m/z 473,8 [M+Na^+], 496,9 [M+2Na^+].

Etapa 11. A la solución de **22–12 ó 22–13** (30 mg, 0,066 mmol) en DCM seca (5 mL) se añadió carbonato de PNP (40,4 mg, 0,13 mmol) y DIPEA (0,5 mL). La mezcla se calentó a reflujo durante 20 h. Después de remover el solvente, el residuo se disolvió en DMF (3 mL). DIPEA (0,5 mL) y norfloxacina (63,5 mg, 0,2 mmol) se añadieron. Después de agitar la mezcla a temperatura ambiente durante 2 h, el solvente se removió y el residuo se purificó por HPLC prep para dar el ejemplo **22**.

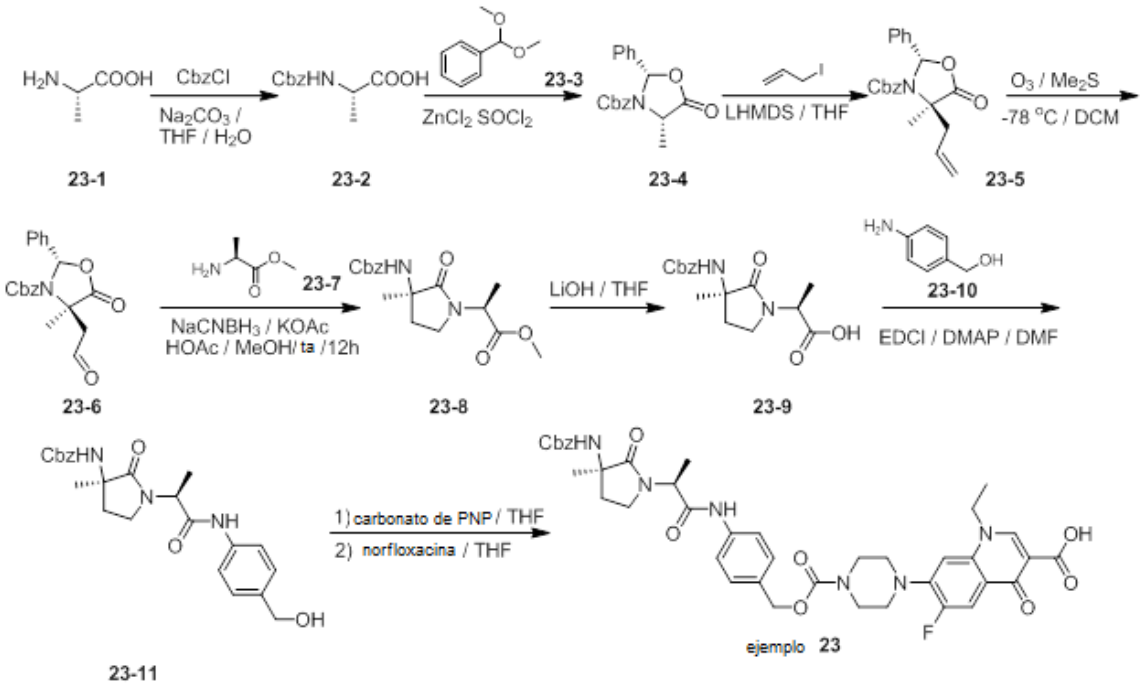
^{1}H RMN (400 MHz, DMSO–d_6) δ 15,32 (s, 1 H), 10,37 (s, 1 H), 8,97 (s, 1 H), 7,97 – 7,94 (d, *J* = 13,2 Hz, 1 H), 7,83 – 7,81 (d, *J* = 10,8 Hz, 1 H), 7,62 – 7,60 (d, *J* = 8,4 Hz, 2 H), 7,37 – 7,21 (m, 8 H), 6,34 (s, 1 H), 5,07 – 5,01 (m, 4 H), 4,60 – 4,56 (m, 2 H), 4,47 – 4,43 (m, 1 H), 4,08 – 4,03 (m, 1 H), 3,61 (s, 4 H), 3,33 (s, 4 H), 1,97 – 1,92 (m, 1 H), 1,49 – 1,47 (d, *J* = 7,2 Hz, 3 H), 1,43 – 1,39 (t, *J* = 7,2 Hz, 3 H), 0,91 – 0,90 (d, *J* = 4,8 Hz, 3 H), 0,77 – 0,76 (d, *J* = 6,8 Hz, 3 H).

LCMS (ESI): m/z 797,0 [M+H^+].

Ejemplo 23. Ácido 7–(4–((4–((S)–2–((R)–3–(benciloxicarbonilamino)–3–metil–2–oxopirrolidin–1–il)propanamido)benciloxi)carbonil)piperazin–1–il)–1–etil–6–fluoro–4–oxo–1,4–dihidroquinolin–3–carboxílico



ejemplo 23



Etapa 1. A la solución de L–alanina **23–1** (18 g, 0,2 mol) en agua (100 mL) se añadió carbonato de sodio (32 g, 0,30 mol). La solución se tornó clara y se enfrió hasta 0 ºC. CbzCl (40 g, 235 mmol) en THF (200 mL) se añadió en 1 h, manteniendo la temperatura a menos de 5 ^{o}C. Después de agitar a temperatura ambiente durante otras 3 h, la solución se lavó con EtOAc. Solución acuosa luego se acidificó y se extrajo con EtOAc (300 mL x 3). La capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4 y se concentró para dar el compuesto **23–2**.

Etapa 2. Cloruro de tionilo (3,27 mL, 44,8 mmol) se añadió a la mezcla agitada de CBz–L–alanina **23–2** (10,0 g, 44,8 mmol) y benzaldehído dimeltilacetal (6,73 mml, 44,8 mmol) en THF seco a 0 ^{o}C. Después de agitar durante 30 min, $ZnCl_2$ anhidro (6,11 g, 44,8 mmol) se añadió. La mezcla se agitó a 0 ^{o}C durante 3 h y otras 0,2 equiv. de $ZnCl_2/SOCl_2$ luego se añadieron. La mezcla luego se neutralizó con agua (menos de 10 ºC) y se extrajo con MTBE (150 mL x 3). La capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4 y se purificó por columna en gel de sílice para dar el compuesto **23–4**.

^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,41–7,39 (m, 10 H), 6,65 (s, 1 H), 5,18–5,16 (m, 2 H), 4,47–4,52 (m, 1 H), 1,63–1,57 (m, 3 H).

Etapa 3. A una solución del compuesto **23–4** (15,0 g, 48,2 mmol) en THF seco (80 mL) a –78 ºC se añadió LiHMDS (1 M, 63 mL) en porciones en 1 h y la solución se agitó a –78 ºC durante 20 min. Yoduro de aillo (6,3 mL, 68,9 mmol) luego se añadió lentamente y la reacción se agitó a –78 ºC durante 3 h. La mezcla se calentó hasta temperatura ambiente y se agitó durante otros 12 h. La mezcla se diluyó con éter y se neutralizó con NH4Cl acuoso (100 mL). La mezcla se extrajo con éter (150 mL x 3). La capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4 y se purificó por columna en gel de sílice para dar el compuesto **23–5** (15 g, 88%).

^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,34–7,14 (m, 9 H), 6,82–6,81 (m, 1 H), 6,28–6,21 (m, 2 H), 5,62–5,56 (m, 1 H), 5,23–5,08 (m, 2 H), 5,01–4,84 (m, 2 H), 3,36–3,19 (m, 1 H), 2,50–2,45 (m, 1 H), 1,65 (s, 2 H), 1,62–1,60 (m, 1 H).

Etapa 4. Ozone se burbujeó a una solución del compuesto **23–5** (7,8 g, 22,2 mmol) en DCM a –78 ºC, hasta que la solución se volvió azul. N_2 se burbujeó en la solución hasta tornarse incolora y Me_2S (33 mL) luego se añadió y se agitó a –78 ºC durante 1 h. Después de se calentó hasta temperatura ambiente, solvente se evaporó para dar el compuesto **23–6**.

^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9,66 (s, 1 H), 7,42–7,16 (m, 9 H), 6,80–6,78 (m, 2 H), 6,57 (s, 1 H), 4,99–4,96 (m, 1 H), 4,86–4,83 (m, 1 H), 4,13–4,02 (m, 1 H), 3,10–3,05 (m, 1 H), 1,76 (s, 3 H).

Etapa 5. A una solución del compuesto **23–6** (1,0 g, 2,83 mmol) en MeOH (20 mL) se añadió el compuesto **23–7** (438 mg, 4,24 mmol), $NaCNBH_3$ (263 mg, 4,24 mmol) y NaOAc (100 mg). Ácido acético se añadió para ajustar pH a 6,0. La reacción se agitó a temperatura ambiente bajo N_2 durante 24 h. Después de remover el solvente, el

residuo se extrajo con DCM (50 mL x 2), se lavó con 10 % de HCl y agua (30 mL). La capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4, se concentró y se purificó con columna para dar el compuesto **23–8**.

^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,37–7,29 (m, 5 H), 5,35 (s, 1 H), 5,11–5,03 (m, 2 H), 4,89–4,88 (m, 1 H), 3,71 (s, 3 H), 3,41–3,35 (m, 2 H), 2,45–2,43 (m, 1 H), 2,32–2,31 (m, 1 H), 1,47–1,39 (m, 6 H).

Etapa 6. A la solución del compuesto **23–8** (334 mg, 1 mmol) en THF (1 mL) se añadió LiOH acuoso (4 equiv.). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. Después de remover el solvente, el residuo se disolvió en agua y se acidificó a pH 3,0 con HCl acuoso. Se extrajo con éter (20 mL x 3). La capa orgánica se combinó, se secó y se concentró para obtener el compuesto **23–9**, que se usó directamente en la siguiente etapa.

Etapa 7. A la solución del compuesto **23–9** (320 mg, 1,0 mmol) en DCM (20 mL) se añadió EEDQ (247 mg, 1,0 mmol) y compuesto **23–10** (123 mg, 1,0 mmol). Después de la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h, el solvente se removió y el residuo se purificó con HPLC prep para dar **23–11**.

^{1}H RMN (400 MHz, MeOD) δ 7,55–7,52 (m, 2 H), 7,34–7,27 (m, 7 H), 5,05 (s, 2 H), 4,65–4,58 (m, 1 H), 4,54 (s, 2 H), 3,61–3,59 (m, 2 H), 2,60–2,45 (m, 1 H), 2,10–2,00 (m, 1 H), 1,56–1,54 (m, 3 H), 1,33 (s, 3 H).

LCMS (ESI): m/z 448,1 [$M+Na^+$].

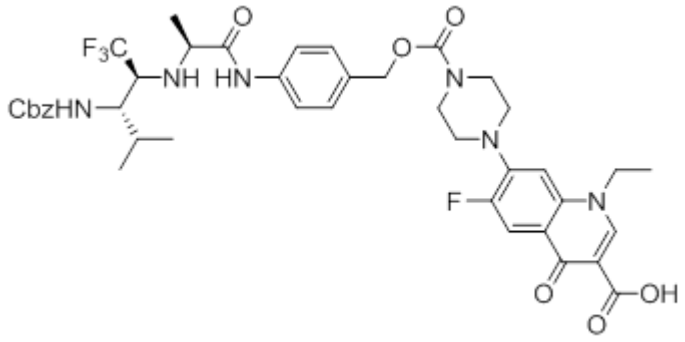
Etapa 8. A la solución de **23–11** (42 mg, 0,1 mmol) en DCM (20 mL) se añadió carbonato de PNP (2 equiv.) y DIPEA (0,2 mL). La solución se calentó a reflujo durante 16 h. Solventes se evaporaron y el residuo se disolvió en DMF seca (5 mL). DIPEA (0,2 mL) y norfloxacina (4 eq.) se añadió. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 min,

después el solvente se removió, el residuo se purificó por la HPLC prep para dar el ejemplo **23**.

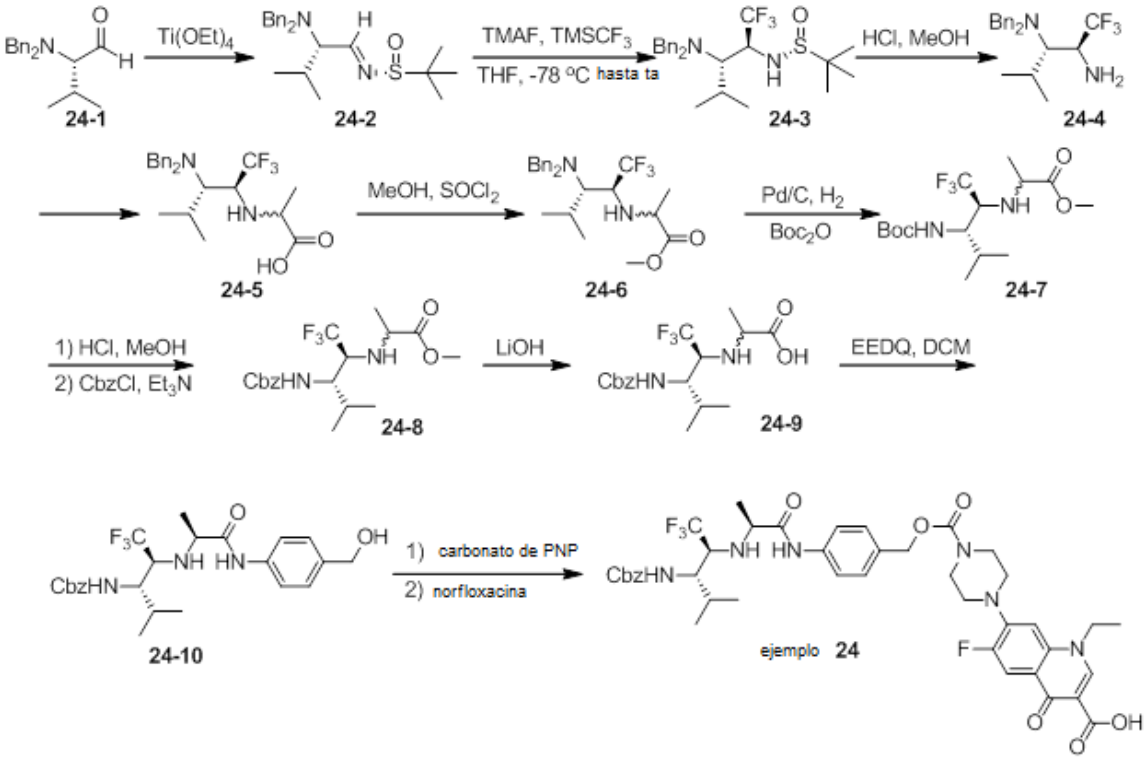
^{1}H RMN (400 MHz, MeOD) δ 8,77 (s, 1 H), 7,91–7,88 (m, 1 H), 7,50–7,48 (m, 2 H), 7,25–7,23 (m, 7 H), 7,10–7,00 (m, 1 H), 5,02 (s, 2 H), 4,96 (s, 2 H), 4,61–4,42 (m, 6 H), 4,15–4,08 (m, 1 H), 3,62 (s, 4 H), 3,52–3,50 (m, 2 H), 2,50–2,40 (m, 1 H), 2,00–1,92 (m, 1 H), 1,47–1,41 (m, 6 H), 1,27 (s, 3 H).

LCMS (ESI): m/z 771,1 [M+H$^+$].

Ejemplo 24. Ácido7–(4–((4–((S)–2–((2S,3S)–3–(benciloxicarbonilamino)–1,1,1–trifluoro–4–metilpentan–2–ilamino)propanamido)benciloxi)carbonil)piperazin–1–il)–1–etil–6–fluoro–4–oxo–1,4–dihidroquinolin–3–carboxílico



ejemplo 24



Etapa 1. A una solución del compuesto **24–1** (9,93 g, 35,28 mmol) y 2–metilpropan–2–sulfinamida (4,28 g, 35,28 mmol) en THF (100 mL) se añadió $Ti(OEt)_4$ (32,19 g, 141,12 mmol) en porciones a 0 ºC. Después de agitar la mezcla a 25 ºC durante 16 h, agua (25 mL) se añadió en porciones a 0 ºC. La mezcla se filtró y el filtrado se extrajo con EtOAc (50 mL × 3). El solvente se removió para dar el producto crudo **24–2** (11 g, 81,1%).

LCMS (ESI): m/z 385,3 [$M+H^+$].

Etapa 2. $TMSCF_3$ (3,55 g, 24,96 mmol) se añadió en porciones a –78 ^oC a una solución de **24–2** (6,4 g, 16,64 mmol) y TMAF (1,86 g, 19,97 mmol) en THF (30 mL). Después de agitar la solución a –78 ^oC durante 2 h, se neutralizó lentamente con agua (2 mL), luego se diluyó con agua (50 mL). La mezcla se extrajo con EtOAc (60 mL × 2). La capa orgánica se concentró y el residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice para dar **24–3** (3,3 g, 44%).

^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,37–7,20 (m, 10 H), 4,21–4,11 (m, 1 H), 3,98–3,93 (m, 3 H), 3,65–3,61 (m, 2 H), 2,88–2,85 (m, 1 H), 2,29–2,20 (m, 1 H), 1,22 (s, 9 H), 1,13–1,11 (m, 3 H), 0,95–0,91 (m, 3 H).

Etapa 3. Una mezcla de **24–3** (3,3 g, 7,26 mmol) y HCl 4 M en MeOH (25 mL) se agitó a 25 ^{o}C durante 6 h. El solvente se removió para dar el producto crudo de **24–4** (2,8 g).

LCMS (ESI): m/z 351,2 [M+H$^+$].

Etapa 4. A una solución de **24–4** (900 mg, 2,57 mmol), ácido 2–oxopropanoico (905 mg, 10,28 mmol) y HOAc (617 mg, 10,28 mmol) en DCE (12 mL) se añadió $NaBH(AcO)_3$ (2,18 g, 10,28 mmol) a 25 ^{o}C. Después de agitar la mezcla a 25 ^{o}C durante 16 h, el solvente se removió y el residuo se purificó por cromatografía en columna para dar **24–5** (700 mg, 64,5%).

LCMS (ESI): m/z 423,3 [M+H$^+$].

Etapa 5. A una solución de **24–5** (700 mg, 1,66 mmol) en MeOH (5 mL) se añadió $SOCl_2$ (395 mg, 3,32 mmol) en porciones a 0 ^{o}C. Después de agitar la solución a 50 ^{o}C durante 16 h, se enfrió hasta 25 ^{o}C y solvente se removió a presión reducida para dar el producto crudo de **24–6** (620 mg, crudo).

LCMS (ESI): m/z 437,3 [M+H$^+$].

Etapa 6. A una solución de **24–6** (520 mg, 1,19 mmol) y Boc_2O (260 mg, 1,19 mmol) en MeOH (8 mL) se añadió Pd/C (100 mg). Después de agitar la mezcla a 25 ^{o}C durante 16 h bajo H_2, se filtró, el solvente se removió y el residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (PE/EtOAc 5:1) para dar **24–7** (390 mg, 92%).

LCMS (ESI): m/z 357,2 [M+H$^+$].

Etapa 7. A una solución de **24–7** (395 mg, 1,08 mmol) en MeOH (5 mL) se añadió HCl 4 M en MeOH (5 mL, 20 mmol). Después de agitar la

solución a 25 ºC durante 2 h, el solvente se removió y el residuo se disolvió en DCM (8 mL). CbzCl (276 mg, 1,62 mmol) y Et_3N (219 mg, 2,16 mmol) se añadieron a 0 ºC y la mezcla se agitó a 25 ^oC durante 6 h. El solvente se removió y el residuo se purificó por TLC prep para dar el compuesto **8** (110 mg, 26%).

LCMS (ESI): 391,1 [$M+H^+$].

Etapa 8. A una solución del compuesto **8** (110 mg, 0,282 mmol) en THF/MeOH/H_2O (0,5 mL: 0,5 mL: 0,5 mL) se añadió $LiOH·H_2O$ (42 mg, 1 mmol) a 25 ºC. La solución se agitó a 25 ^oC durante 2 h. Solvente Removed y el residuo se extrajo en con agua (3 mL). La solución acuosa se acidificó a pH 2 con HCl 1 M y se extrajo con EtOAc (15 mL×3). La capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4, se filtró, se concentró para dar el compuesto **9** (100 mg, 94%).

LCMS (ESI): 377,1 m/z [$M+H^+$].

Etapa 9. A una solución de **24–9** (120 mg, 0,319 mmol) y (4–aminofenil) metanol (79 mg, 0,638 mmol) en DCM (3 mL) se añadió EEDQ (158 mg, 0,638 mmol) a 0 ºC bajo N_2. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 6 h. Después de la eliminación del solvente, el residuo se purificó por TLC prep, luego separación por SFC para dar el isómero principal (72 mg) **24–10** y el isómero menor (26 mg). La configuración absoluta de cada isómero no se determina.

^1H RMN (400 MHz, MeOD) δ 7,65–7,63 (m, 2 H), 7,37–7,27 (m, 7 H), 5,14–5,07 (m, 2 H), 4,56 (s, 2 H), 3,81–3,79 (m, 1 H), 3,59–3,57 (m, 1 H), 3,37–3,35 (m, 1 H), 2,11–2,10 (m, 1 H), 1,33 (d, J = 6,8 Hz, 3 H), 0,93 (d, J = 6,8 Hz, 3 H), 0,87 (d, J = 6,4 Hz, 3 H).

LCMS (ESI): 482,2 m/z [$M+H^+$].

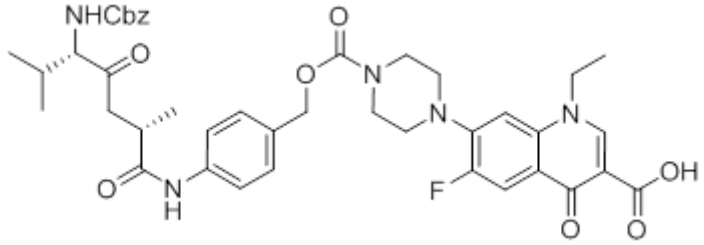
Etapa 10. A una solución de **24–10** (20 mg, 0,042 mmol) en THF (1,5 mL) se añadió carbonato de PNP (38 mg, 0,125 mmol) y DIPEA (21 mg,

0,166 mmol) a 25 ºC. La mezcla se calentó a 50 ºC durante 18 h. El solvente se removió y el residuo se disolvió en DMF (1,5 mL). Norfloxacina (20 mg, 0,062 mmol) se añadió y la mezcla se agitó a 25 ºC durante 2 h. La mezcla se purificó por HPLC prep para dar el ejemplo **24** (11,2 mg, 33%).

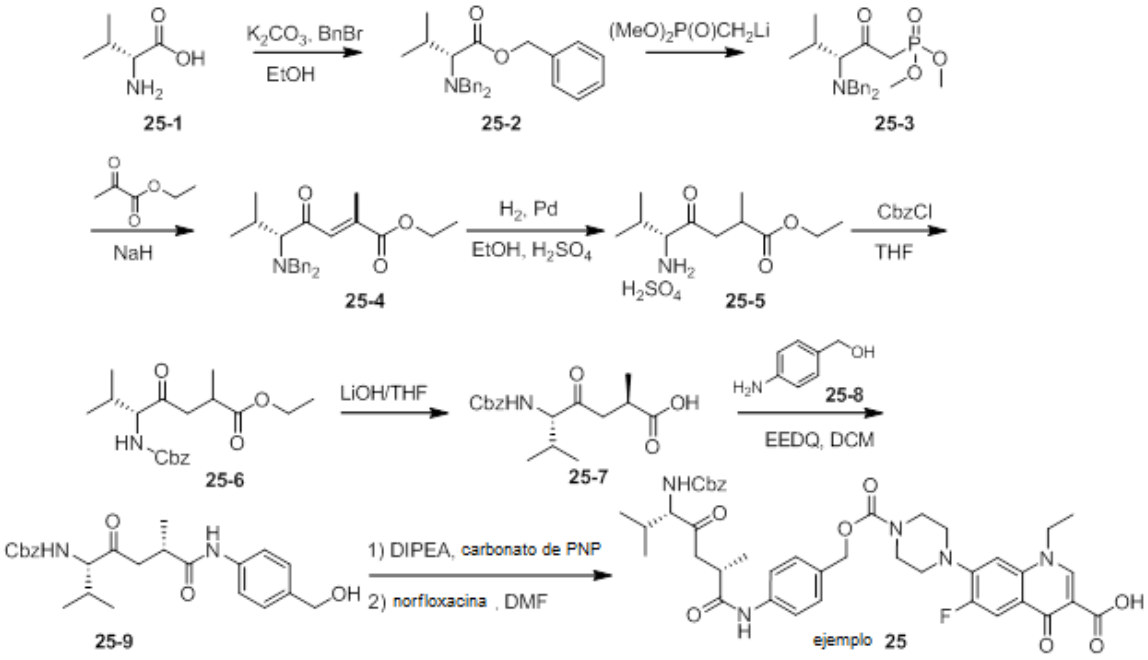
^{1}H RMN (400 MHz, MeOD) δ 8,86 (s, 1 H), 8,41 (s, 1 H), 8,1–7,94 (m, 1 H), 7,70–7,68 (m, 2 H), 7,37–7,09 (m, 9 H), 5,13–5,09 (m, 4 H), 4,89–4,86 (m, 2 H), 3,80–3,57 (m, 6H), 3,38–3,28 (m, 3 H), 2,20–2,07 (m, 1 H), 1,52 (s, 3 H), 1,33 (t, *J* = 6,8 Hz, 3 H), 0,937 (d, *J* = 6,8 Hz, 3 H), 0,87(d, *J* = 6,8 Hz, 3 H).

LCMS (ESI): 827,3 m/z [M+H$^+$].

Ejemplo 25: ácido7–(4–((4–((2S,5R)–5–(benciloxicarbonilamino)–2,6–dimetil–4–oxoheptanamido)benciloxi)carbonil)piperazin–1–il)–1–etil–6–fluoro–4–oxo–1,4–dihidroquinolin–3–carboxílico



ejemplo 25



Etapa 1. A la solución del compuesto **25–1** (2 g, 17,07 mmol) y K_2CO_3 (7,066 g, 51,2 mmol) en EtOH (50 mL) se añadió bromuro de bencilo (8,7 g, 51,2 mmol). Después de la mezcla se calentó a reflujo durante 5 h, el sólido se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida y se purificó por cromatografía flash en gel de sílice (EtOAc: hexano = 1:10) para dar **25–2** (3,52 g, 58,1%).

Etapa 2. A la solución de dimetilmetilfosfonato (6,78 g, 54,7 mmol) en THF seco (60 mL) se añadió en porciones LDA (2 mol/L, 27 mL) a –78 ºC durante 1 h. Después de agitar a –78 ºC durante 1 h, una solución de **25–2** (3,52 g, 9,12 mmol) en THF seco (10 mL) se añadió en porciones a –78 ºC. La mezcla se agitó durante 1 h y se extrajo con EtOAc (100 mL × 3). La capa orgánica se lavó con salmuera (60 mL) y se concentró para dar el producto crudo de **25–3**, que se usó para la siguiente etapa sin ulterior purificación (3,12 g, 84,9%).

LCMS (ESI): m/z 403,9 [$M+H^+$], 425,9 [$M+Na^+$]

Etapa 3. A una solución de **25–3** (3,12 g, 7,75 mmol) en THF seco (60 mL) se añadió hidruro de sodio (372 mg, 9,3 mmol, 60%) a 0 ºC.

Después de agitar a 0 ºC durante 30 min, una solución de éster etílico de ácido 2–oxo–propionico (1,349 g, 11,6 mmol) en THF seco (5 mL) se añadió en porciones. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 h bajo N_2. Solvente se removió, el residuo se purificó por HPLC prep para dar **25–4** (2,85 g, 93,6%).

LCMS (ESI): m/z 394,2 [$M+H^+$].

Etapa 4. A la solución de **25–4** (2,85 g, 7,3 mmol) y ácido sulfúrico (750 mg, 7,3 mmol) en EtOH (60 mL) se añadió paladio sobre carbón activado al 10% (1 g). Después de se agitó bajo hidrógeno durante 6 h, la mezcla de reacción se filtró a través de un taco de celite y se concentró para dar el producto deseado **25–5** (3,65 g, 100%).

Etapa 5. A la solución de **25–5** (3,65 g, 7,3 mmol) y trietilamina (2,21 g, 21,9 mmol) en CH_2Cl_2 (150 mL) se añadió en porciones una solución de CbzCl (1,36 g, 8,03 mmol) en baño de hielo. Después de agitar la mezcla a temperatura ambiente durante 2 h, se extrajo con EtOAc (50 mL × 3). La capa orgánica se lavó con salmuera (50 mL), se secó sobre Na_2SO_4, se concentró al vacío para dar el producto crudo **25–6**.

LCMS (ESI): m/z 350,2 [$M+H^+$], 372,2 [$M+Na^+$].

Etapa 6. A la solución de **25–6** (1,6 g, 4,58 mmol) en una mezcla de H_2O y THF (40 mL, 1:3) se añadió hidróxido de litio hidratado (1,93 g, 45,8 mmol). Después de agitar la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 16 h, se extrajo con EtOAc (50 mL × 3). La capa orgánica se lavó con salmuera (50 mL), se secó sobre Na_2SO_4, se concentró al vacío para dar el producto crudo **25–7** (1,43 g, 97,3%).

LCMS (ESI): m/z 344,1 [$M+Na^+$].

Etapa 7. A una solución del compuesto **25–7** (1,0 g, 3,11 mmol) en DCM seca (20 mL) se añadió EEDQ (1,52 g, 6,22 mmol) y **25–8** (765 mg, 6,22 mmol). La mezcla se agitó a 0 ºC durante 16 h bajo N_2. Después de

remover el solvente, el residuo se purificó por HPLC prep y SFC para dar **25–9**, **25–10**, **25–11** y **25–12.**

^{1}H RMN (400 MHz, MeOD) δ 7,49 (d, J = 8,8 Hz, 2 H), 7,35–7,25 (m, 7 H), 5,06 (s, 2 H), 4,53 (s, 2 H), 4,12 (d, J = 5,6 Hz, 1 H), 3,07–3,92 (m, 2 H), 2,62–2,57 (m, 1 H), 2,26–2,21 (m, 1 H), 1,18 (d, J = 6,8 Hz, 3 H), 0,95 (d, J = 6,8 Hz, 3 H), 0,81 (d, J = 6,8 Hz, 3 H). LCMS (ESI): m/z 427,2 [M+H$^+$], 449,1 [M+Na$^+$], 409,2 [M–OH].

^{1}H RMN (400 MHz, MeOD) δ 7,49 (d, J = 8,8 Hz, 2 H), 7,33–7,20 (m, 7 H), 5,07 (s, 2 H), 4,53 (s, 2 H), 4,12 (d, J = 5,6 Hz, 1 H), 3,28–2,92 (m, 2 H), 2,63–2,57 (m, 1 H), 2,27–2,19 (m, 1 H), 1,18 (d, J = 6,8 Hz, 3 H), 0,95 (d, J = 6,8 Hz, 3 H), 0,81 (d, J = 6,8 Hz, 3 H). LCMS (ESI): m/z 427,2 [M+H$^+$], 449,1 [M+Na$^+$], 409,2 [M–OH].

^{1}H RMN (400 MHz, MeOD) δ 7,41 (d, J = 6,8 Hz, 2 H), 7,39–7,16 (m, 7 H), 5,03–4,96 (m, 2 H), 4,47 (s, 2 H), 3,89 (d, J = 6,4 Hz, 1 H), 2,93–2,82 (m, 2 H), 2,49–2,43 (m, 1 H), 2,10–2,05 (m, 1 H), 1,07 (d, J = 6,8 Hz, 3 H), 0,82 (d, J = 6,8 Hz, 3 H), 0,77 (d, J = 6,8 Hz, 3 H). LCMS (ESI): m/z 427,2 [M+H$^+$], 449,1 [M+Na$^+$], 409,2 [M–OH].

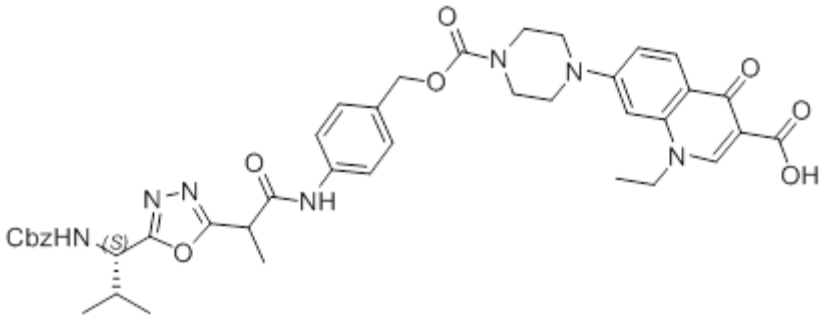
^{1}H RMN (400 MHz, MeOD) δ 8,02 (d, J = 18,8 Hz, 2 H), 7,79–7,29 (m, 7 H), 5,16–5,08 (m, 2 H), 4,56 (s, 2 H), 4,01 (d, J = 6,0 Hz, 1 H), 3,32–2,94 (m, 2 H), 2,60–2,55 (m, 1 H), 2,24–2,12 (m, 1 H), 1,19 (d, J = 6,8 Hz, 3 H), 0,95–0,88 (m, 6 H). LCMS (ESI): m/z 409,0 [M–OH].

Etapa 8. A una solución de **25–9** (100 mg, 0,235 mmol) en DCM seca (2 mL) se añadió carbonato de PNP (147 mg, 0,47 mmol) y DIPEA (61 mg). La mezcla se calentó a reflujo durante 16 h. Después de remover el solvente, el residuo se disolvió en DMF (3 mL). DIPEA (61 mg, 0,47 mmol) y norfloxacina (150 mg, 0,47 mmol) se añadió. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. Después de remover el solvente, el residuo se purificó por HPLC prep para dar el ejemplo **25** en forma de un

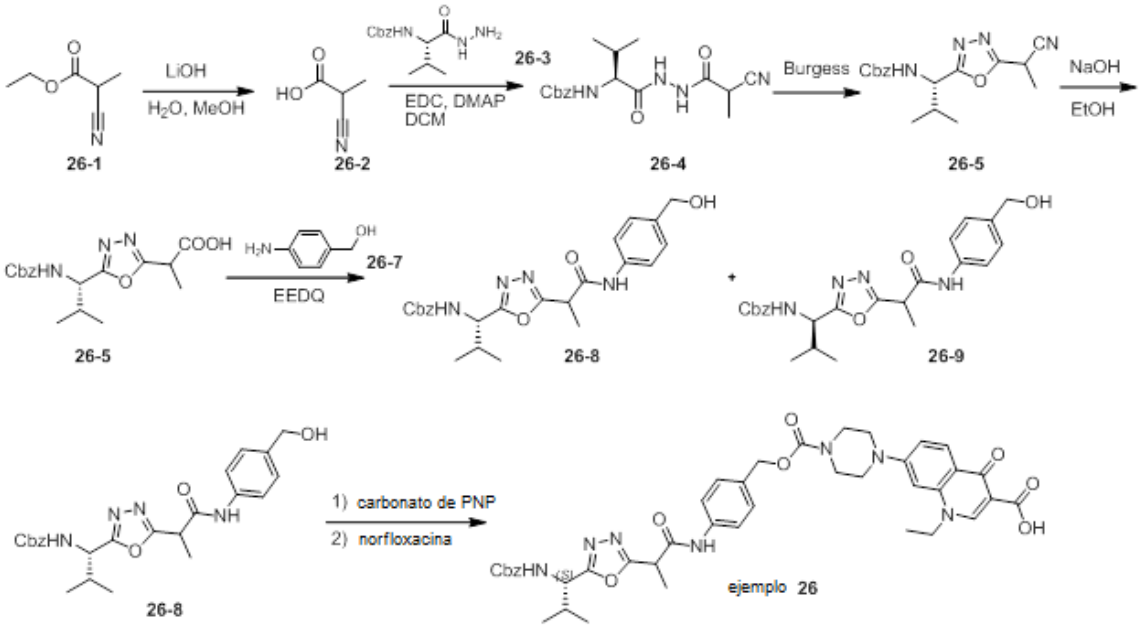
sólido blanco.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO–d_6) δ 15,33 (s, 1 H), 10,01 (s, 1 H), 8,96 (s, 1 H), 7,94 (d, J = 12,8 Hz, 1 H), 7,72 (d, J = 8,0 Hz, 1 H), 7,58 (d, J = 8,4 Hz, 2 H), 7,37–7,30 (m, 7 H), 7,21 (d, J = 7,2 Hz, 1 H), 5,05–5,04 (m, 4 H), 4,59–4,58 (m, 2 H), 3,84–3,80 (m, 1 H), 3,61 (s, 4 H), 2,94–2,89 (m, 2 H), 2,12–2,05 (m, 1 H), 1,42–1,39 (m, 3 H), 1,07 (d, J = 6,0 Hz, 3 H), 0,82 (d, J = 6,4 Hz, 6 H). LCMS (ESI): m/z 772,6 [M+H$^+$], 386,7 [M/2+H$^+$].

Ejemplo 26. Ácido 7–(4–((4–(2–(5–((S)–1–(benciloxicarbonilamino)–2–metilpropil)–1,3,4–oxadiazol–2–il)propanamido)benciloxi)carbonil)piperazin–1–il)–1–etil–4–oxo–1,4–dihidroquinolin–3–carboxílico



ejemplo 26



Etapa 1. A una solución de **26–1** (10,0 g, 78,7 mmol) en MeOH (180 mL) y H_2O (180 mL) se añadió $LiOH \cdot H_2O$ (16,9 g, 393,3 mmol). Después de agitar la mezcla a temperatura ambiente durante 24 h, se acidificó con HCl conc. a pH = 6. El crudo se extrajo luego con (200 mL×3) y se concentró para dar **26–2**.

Etapa 2. A una solución agitada de **26–2**(2 g, 20,2 mmol) y DMAP (247 mg, 2,02 mmol) en DCM (400 mL) se añadió **26–3** (5,89 g, 22,2 mmol) y EDCI (4,26 g, 22,2 mmol). Después de agitar la solución a temperatura ambiente durante 2 h, se lavó sucesivamente con agua (200 mL×3), salmuera (100 mL), se secó sobre Na_2SO_4 y se concentró para dar **26–4**.

Etapa 3. Una mezcla de **26–4** (3 g, 8,7 mmol) y reactivo de Burgess (3,1 g, 13,1 mmol) en THF (50 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 24 h. Después de la eliminación del solvente, el residuo se extrajo con EtOAc (100 mL×3). Las capas orgánicas se lavaron con salmuera (100 mL), se concentró y se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (PE: EtOAc = 2:1) para dar **26–5**.

Etapa 4. Una mezcla de **26–5**(1,67 g, 5,09 mmol) y una solución de NaOH (66 mmol) en EtOH (66 mL) y H_2O (66 mL) se calentó a 80 ºC

durante 12 h. Después de se enfrió hasta temperatura ambiente, la mezcla se lavó con EtOAc (50 mL) y la capa acuosa se ajustó a pH 5–6 y se extrajo con EtOAc (60 mL×3). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na2SO4 y se concentraron para dar **26–6**.

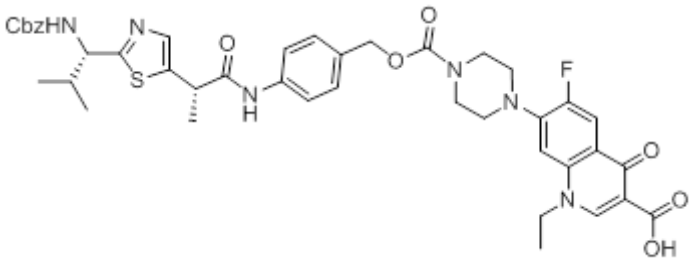
Etapa 5. Una mezcla de **26–6** (1,47 g, 4,23 mmol), **26–7** (1,56 g, 12,7 mmol) y EEDQ (3,14 g, 12,7 mmol) en DCM (50 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. El solvente se removió y el residuo se purificó por HPLC prep y SFC para dar **26–8** y **26–9**.

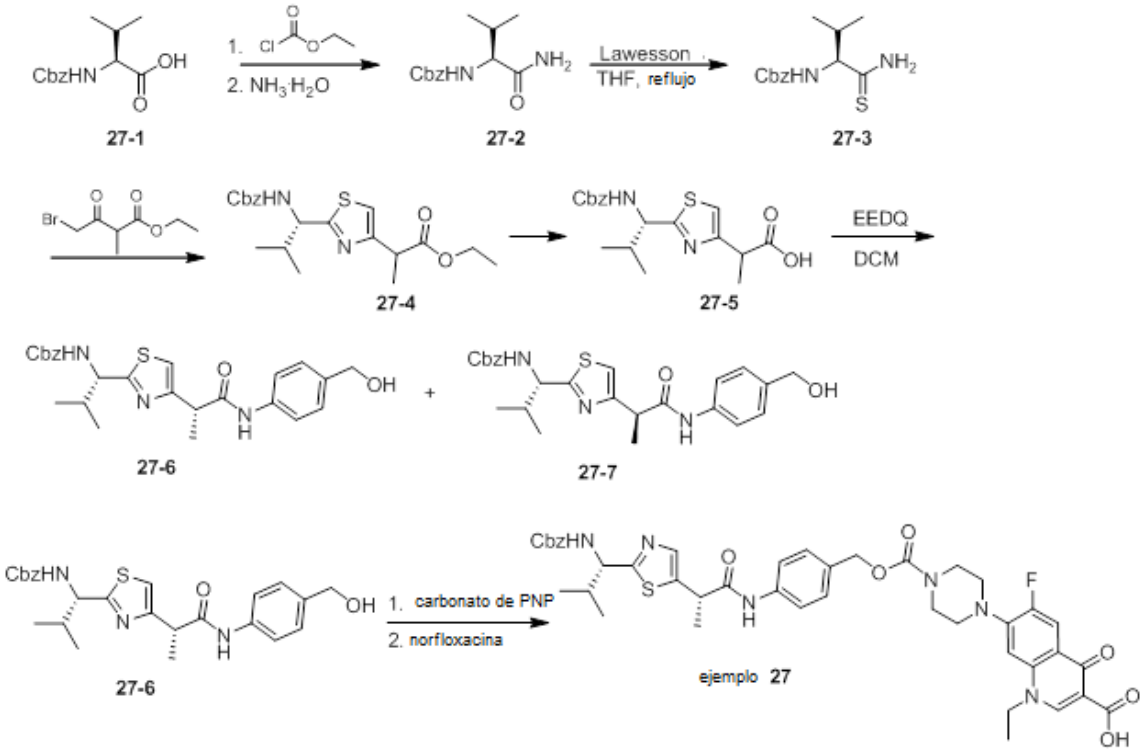
Etapa 6. Una mezcla de **26–8** (40 mg, 0,088 mmol), PNP (57 mg, 0,18 mmol) y DIPEA (34 mg, 0,26 mmol) en DCM (3 mL) se agitó a 50 ºC durante 12 h. Se concentró y se mezcló con Norfloxacina (82 mg, 0,26 mmol) y DIPEA (34 mg, 0,26 mmol) en DMF (5 mL). Después de agitar a temperatura ambiente durante 2 h, el solvente se removió y el residuo se purificó por HPLC prep para dar el ejemplo **26** (30,5 mg, 43,6%).

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO–d_6) δ 15,33 (s, 1 H), 10,44 (s, 1 H), 8,97 (s, 1 H), 8,12–8,08 (m, 1 H), 7,95 (d, *J* = 13,2 Hz, 1 H), 7,58 (d, *J* = 8,4 Hz, 2 H), 7,37–7,34 (m, 7 H), 7,21 (d, *J* =7,2 Hz, 1 H), 5,05 (d, *J* = 14,8 Hz, 4 H), 4,59–4,58 (m, 3 H), 4,19–4,17 (m, 1 H), 3,61 (s, 4 H), 3,38 (s, 4 H), 2,10–2,07 (m, 1 H), 1,58 (dd, *J* =2,0, 7,2 Hz, 3 H), 1,40 (t, *J* = 6,8 Hz, 3 H), 0,93 (d, *J* = 6,8 Hz, 3 H), 0,82 (d, *J* = 6,8 Hz, 3 H).

LCMS (ESI): m/z 798,3 [M+H$^+$], 820,2 [M+Na$^+$].

Ejemplo 27. Ácido 7–(4–((4–((S)–2–(2–((S)–1–(benciloxicarbonilamino)–2–metilpropil)tiazol–5–il)propanamido)benciloxi)carbonil)piperazin–1–il)–1–etil–6–fluoro–4–oxo–1,4–dihidroquinolin–3–carboxílico





Etapa 1. A una solución de **27–1** (8 g, 31,8 mmol) y Et_3N (6,43 g, 63,6 mmol) en THF seco (100 mL) a –78 ºC se añadió en porciones una solución de cloroformiato de etilo (3,45 g, 31,8 mmol) en THF (10 mL). Después de la reacción se agitó a –78 ºC durante 1 h, $NH_3.H_2O$ (5 mL) se añadió. La reacción se calentó hasta temperatura ambiente durante 2 h. El sólido blanco se recolectó por filtración y se secó para dar **27–2** (5,1 g, 63,8%).

Etapa 2. Una solución de **27–2** (3 g, 12 mmol) y reactivo de Lawesson (9,7 g, 24 mmol) en THF seco (60 mL) se agitó 70 ºC durante 16 h. El solvente se removió y el residuo se purificó por columna (EtOAc: hexano = 1:3) para dar **27–3** (2,9 g, 90,6%).

LCMS (ESI): m/z 267,1 [$M+H^+$], 289,1 [$M+Na^+$].

Etapa 3. A la solución de **27–3** (3 g, 11,26 mmol), $KHCO_3$ (3,38 g, 33,8 mmol) en DME seco (40 mL) se añadió en porciones una solución de **27–3a** (11,31 g, 22,52 mmol) en DME (10 mL). Después de la reacción

se agitó a –40 ºC durante 16 h, agua (50 mL) y EtOAc (100 mL) se añadió y la capa orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre Na_2SO_4, se concentró al vacío. A la mezcla de intermediario crudo y 2, 6–dimetilpiridina (3,3 g, 30,4 mmol) en THF (20 mL) se añadió en porciones una solución de anhídrido 2,2,2–trifluoroacético (3,2 g, 15,2 mmol) a –40 ºC lentamente. Después de la reacción se agitó a –10 ºC durante 2 h, agua (100 mL) y EtOAc (100 mL) se añadió. La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre Na_2SO_4, se concentró al vacío. El producto crudo se purificó por HPLC prep para obtener **27–4** (2 g, 67,7%).

LCMS (ESI): m/z 391,2 [$M+H^+$].

Etapa 4. A la solución de **27–4** (2 g, 5,13 mmol) en una mezcla de CH_3OH y H_2O (60 mL/20 mL) se añadió hidróxido de litio (2,15g, 51,3 mmol). Después de agitar la mezcla a temperatura ambiente durante 16 h, pH se ajustó a 5 con HCl diluido (5%) y la mezcla se extrajo con EtOAc (60 mL × 2). La capa orgánica se lavó con salmuera (60 mL), se secó sobre Na_2SO_4, se concentró al vacío para dar **27–5**.

LCMS (ESI): m/z 363,2 [$M+H^+$].

Etapa 5. A la solución de **27–5** (1 g, 2,76 mmol) y EEDQ (750 mg, 5,52 mmol) en CH_2Cl_2 (20 mL) se añadió (4–aminofenil)metanol (680 mg, 5,52 mmol) a 0 ºC. La mezcla de reacción se agitó a 0 ºC durante 2 h y luego a temperatura ambiente. durante 16 h. La mezcla de reacción se diluyó con CH_2Cl_2 (50 mL) y se lavó con salmuera (50 mL), se secó sobre Na_2SO_4, se filtró, se concentró, se purificó por HPLC prep y SFC para dar **27–6 y 27–7** (370 mg cada uno, 28,7%).

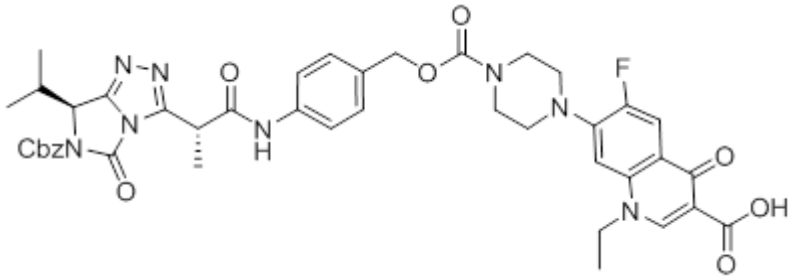
^{1}H RMN (400 MHz, MeOD) δ 7,55 (d, J = 8,4 Hz, 2 H), 7,36–7,29 (m, 8 H), 5,11 (s, 2 H), 4,80 (d, J = 6,8 Hz, 1 H), 4,56 (s, 2 H), 4,07–4,01 (m, 1 H), 2,33–2,25 (m, 1 H), 1,60 (d, J = 6,8 Hz, 3 H), 0,96–0,91 (m, 6 H).
LCMS (ESI): m/z 468,0 [$M+H^+$], 490,2 [$M+Na^+$].

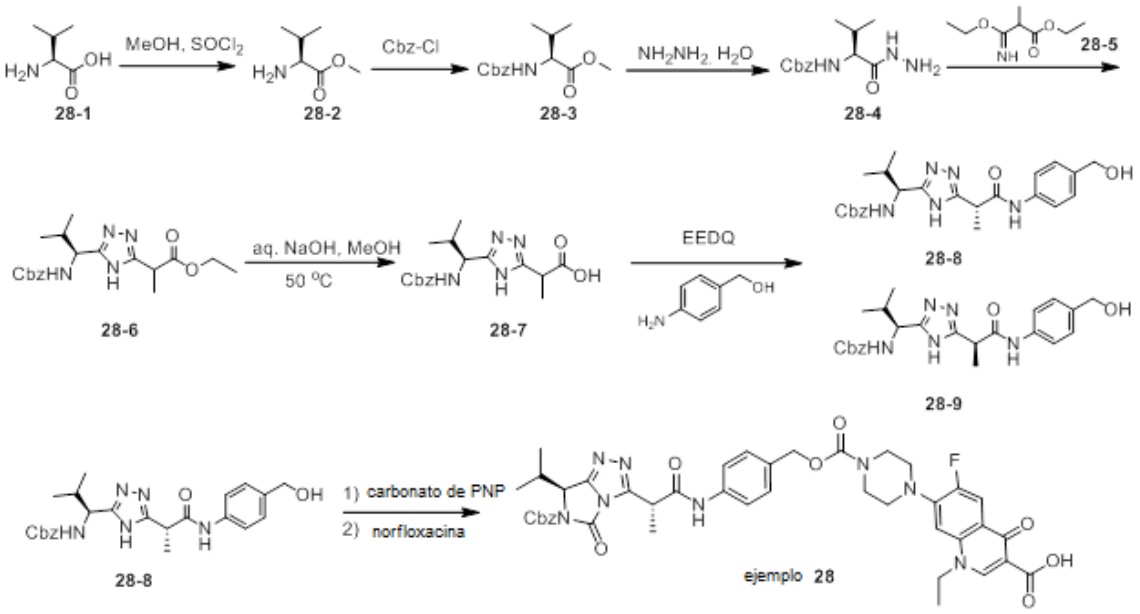
^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8,90 (s, 1 H), 7,49–7,23 (m, 9 H), 7,05 (s, 1 H), 5,48–5,45 (m, 1 H), 5,14–5,10 (m, 2 H), 5,03–4,99 (m, 1 H), 4,61 (s, 2 H), 3,94–3,88 (m, 1 H), 2,42–2,34 (m, 1 H), 1,63 (d, *J* = 7,2 Hz, 3 H), 1,02–1,94 (m, 6H). LCMS (ESI): m/z 489,9 [M+Na^+].

Etapa 6. A la solución de **27–6** (50 mg, 0,11 mmol) en DCM seca (2 mL) se añadió carbonato de PNP (67 mg, 0,22 mmol) y DIPEA (28 mg). La mezcla se calentó a reflujo durante 16 h. Después de remover el solvente, el residuo se disolvió en DMF seca (5 mL). DIPEA (60 mg, 047 mmol) y norfloxacina (60 mg, 0,188 mmol) se añadió. Después de agitar la mezcla a temperatura ambiente durante 1 h, el solvente se removió y el residuo se purificó por HPLC prep para obtener el ejemplo **27**.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO–d_6) δ 15,34 (s, 1 H), 10,17 (s, 1 H), 8,97 (s, 1 H), 8,10 (d, *J* = 8,4 Hz, 1 H), 7,95 (d, *J* = 8,4 Hz, 1 H), 7,60 (d, *J* = 8,4 Hz, 2 H), 7,36–7,31 (m, 7 H), 7,21 (d, *J* = 7,2 Hz, 1 H), 5,05 (s, 4 H), 4,66–4,56 (m, 3 H), 4,03–3,97 (m, 1 H), 3,61 (s, 4 H), 3,35 (s, 4 H), 2,20–2,14 (m, 1 H), 1,47–1,39 (m, 6 H), 0,87–0,80 (m, 6 H). LCMS (ESI): m/z 813,1, [M+H^+], 407,1 [M/2+H^+].

Ejemplo 28. Ácido 7–(4–((4–((R)–2–((S)–6–(benciloxicarbonil)–7–isopropil–5–oxo–6,7–dihidro–5H–imidazo[5,1–c][1,2,4]triazol–3–il)propanamido)benciloxi)carbonil)piperazin–1–il)–1–etil–6–fluoro–4–oxo–1,4–dihidroquinolin–3–carboxílico





Etapa 1. A la solución de **28–1** (12 g, 0,1 mol) en MeOH (200 mL) se añadió $SOCl_2$ (10 mL) en 10 min a 0 ºC. Después de agitar la mezcla a temperatura ambiente durante 12 h, solvente se removió, para dar el producto deseado **28–2**.

Etapa 2. A la solución de **28–2** (2,6 g, 5 mmol) en DCM (50 mL) se añadió TEA (2 mL) y se agitó a 0 ^{o}C hasta que la solución se volviera clara. CbzCl (10,2 g, 6 mmol) luego se añadió en porciones en 1 h y mantuvo la temperatura a menos de 5 ^{o}C. La mezcla luego se agitó a temperatura ambiente durante otras 10 h. La solución se extrajo en con DCM (100 mL) y se lavó con HCl acuoso, NaHCO3 ac. y agua, la capa orgánica se secó sobre Na2SO4 anhidro y solventes se evaporaron luego para dar **28–3**.

LCMS (ESI): m/z 265,9 [M+H^{+}].

Etapa 3. A la solución de **28–3** (2,65 g, 10 mmol) en MeOH (25 mL) se añadió $NH_2NH_2.H_2O$ (5 mL, 80%). Después de agitar la mezcla a temperatura ambiente durante 6 h, el sólido se recolectó por filtración para dar **28–4**.

^{1}H RMN (400 MHz, MeOD) δ 7,36–7,30 (m, 5 H), 5,07 (s, 2 H), 4,59 (s, 1

H), 3,84–3,82 (m, 1 H), 0,94–0,91 (m, 6 H).

Etapa 4. Compuesto **28–4** (2,65 g, 10 mmol), **28–5** (4,2 g, 20,2 mmol) y MeOH seco (50 mL) se calentó a 150 ºC en un recipiente sellado durante 24 h. El solvente se removió del producto deseado **28–6**.

Etapa 5. A la solución de **28–6** (740 mg, 2 mmol) en EtOH (20 mL) y agua (10 mL) se añadió NaOH (400 mg, 10 mmol). Después de agitar la mezcla a 50 ºC durante 1 h, el solvente se removió y el residuo se purificó por columna para dar **28–7**.

^{1}H RMN (400 MHz, MeOD) δ 7,32–7,26 (m, 5 H), 5,10–5,05 (m, 2 H), 4,61–4,59 (m, 1 H), 3,94–3,92 (m, 1 H), 2,16–2,14 (m, 1 H), 1,55–1,53 (m, 3 H), 0,99–0,82 (m, 6 H).

Etapa 6. A la solución de **28–7** (100 mg, 0,28 mmol) en DCM seca (5 mL) se añadió (4–aminofenil)metanol (250 mg, 2 mmol) y EEDQ (247 mg, 1 mmol). Después de agitar la mezcla a 0 ºC durante 2 h, el solvente se removió y el residuo se purificó por HPLC prep y SFC para dar **28–8 y 28–9**.

^{1}H RMN (400 MHz, MeOD) δ 7,57 (d, J = 8,4 Hz, 2 H), 7,35–7,30 (m, 7 H), 5,13–5,05 (m, 2 H), 4,63 (d, J = 7,6 Hz, 1 H), 4,57 (s, 2 H), 4,07–4,02 (m, 1 H), 2,23–2,17 (m, 1 H), 1,66 (d, J = 7,2 Hz, 3 H), 0,98 (d, J = 6,8 Hz, 3 H), 0,87 (d, J = 6,8 Hz, 3 H).

LCMS (ESI): m/z 452,0 [M+H$^+$].

^{1}H RMN (400 MHz, MeOD) δ 7,57 (d, J = 8,4 Hz, 2 H), 7,35–7,30 (m, 7 H), 5,13–5,05 (m, 2 H), 4,63 (d, J = 7,6 Hz, 1 H), 4,57 (s, 2 H), 4,00–3,99 (m, 1 H), 2,19–2,17 (m, 1 H), 1,66 (s, 3 H), 0,98 (d, J = 5,6 Hz, 3 H), 0,87 (d, J = 6,8 Hz, 3 H).

LCMS (ESI): m/z 473,9 [M+Na$^+$].

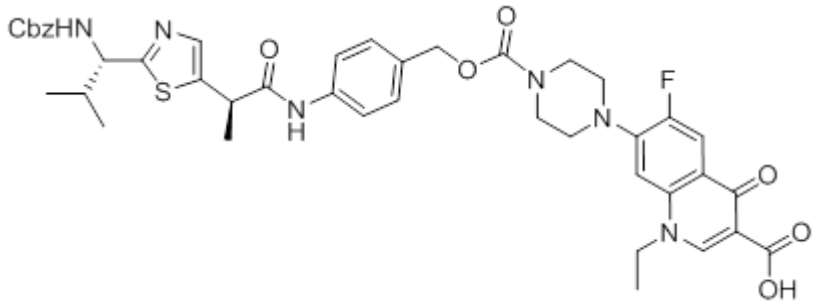
Etapa 7. A la solución de **28–8** (45 mg, 0,1 mmol) en DCM seca (30 mL) se añadió carbonato de PNP (62 mg, 0,2 mmol) y DIPEA (1 mL).

Después de la mezcla se calentó a reflujo durante 16 h, el solvente se removió y el residuo se disolvió en DMF (5 mL). DIPEA (1,0 mL) y norfloxacina (65 mg, 0,2 mmol) se añadieron. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. Después de la eliminación del solvente, el residuo se purificó por HPLC prep para dar el ejemplo **28.**

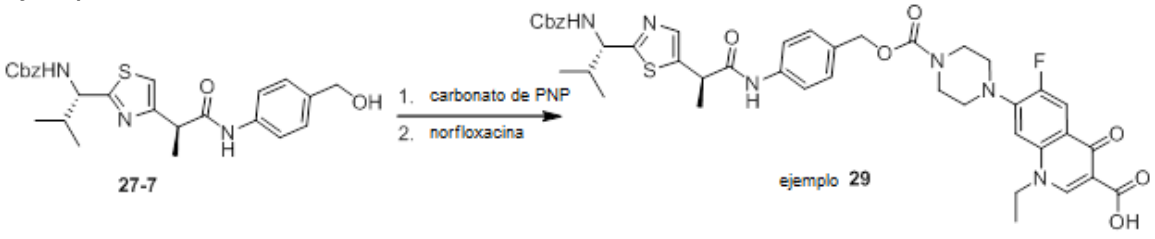
^{1}H RMN (400 MHz, DMSO–d_6) δ 8,97 (s, 1 H), 7,97–7,94 (m, 2 H), 7,48–7,23 (m, 10 H), 5,17 (s, 2 H), 5,04 (s, 2 H), 4,61–4,58 (m, 2 H), 4,50–4,40 (m, 1 H), 3,69–3,63 (m, 4 H), 3,40–3,35 (m, 1 H), 3,29–3,26 (m, 4 H), 2,09–2,08 (m, 1 H), 1,91–1,88 (m, 2 H), 1,41 (t, J = 7,2 Hz, 3 H), 0,96–0,89 (m, 6 H).

LCMS (ESI): 823,3 m/z [M+H$^+$].

Ejemplo 29. Ácido 7–(4–((4–((R)–2–(2–((S)–1–(benciloxicarbonilamino)–2–metilpropil)tiazol–5–il)propanamido)benciloxi)carbonil)piperazin–1–il)–1–etil–6–fluoro–4–oxo–1,4–dihidroquinolin–3–carboxílico



ejemplo 29

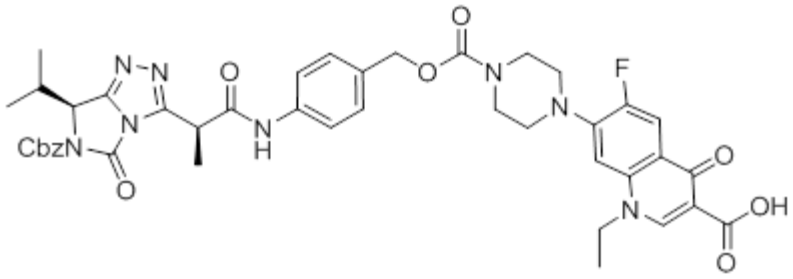


Ejemplo 29 se preparó usando el procedimiento como en el Ejemplo **27**.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO–d_6) δ 15,33 (brs, 1 H), 10,17 (s, 1 H), 8,96 (s, 1 H), 8,10 (d, J = 8,4 Hz, 1 H), 7,95 (d, J = 8,4 Hz, 1 H), 7,60 (d, J = 8,4 Hz, 2 H), 7,36–7,31 (m, 7 H), 7,21 (d, J = 7,2 Hz, 1 H), 5,05 (s, 4 H),

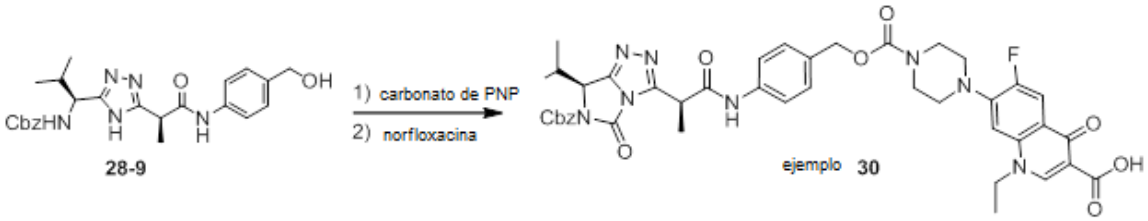
4,66–4,56 (m, 3 H), 4,03–3,97 (m, 1 H), 3,61 (s, 4 H), 3,35 (s, 4 H), 2,20–2,14 (m, 1 H), 1,47–1,39 (m, 6 H), 0,87–0,80 (m, 6 H). LCMS (ESI): m/z 813,1, $[M+H^+]$, 407,3 $[M/2+H^+]$.

Ejemplo 30. Ácido 7–(4–((4–((S)–2–((S)–6–(benciloxicarbonil)–7–isopropil–5–oxo–6,7–dihidro–5H–imidazo[5,1–c][1,2,4]triazol–3–il)propanamido)benciloxi)carbonil)piperazin–1–il)–1–etil–6–fluoro–4–oxo–1,4–dihidroquinolin–3–carboxílico.



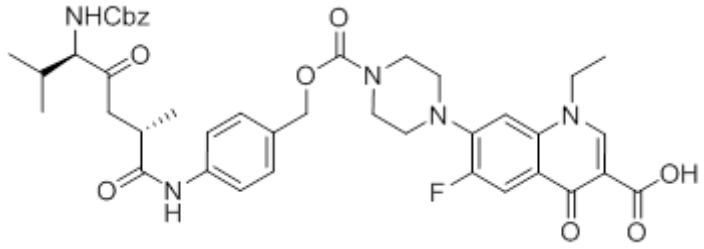
ejemplo 30

El Ejemplo 30 se preparó usando el procedimiento como en el Ejemplo **28**.

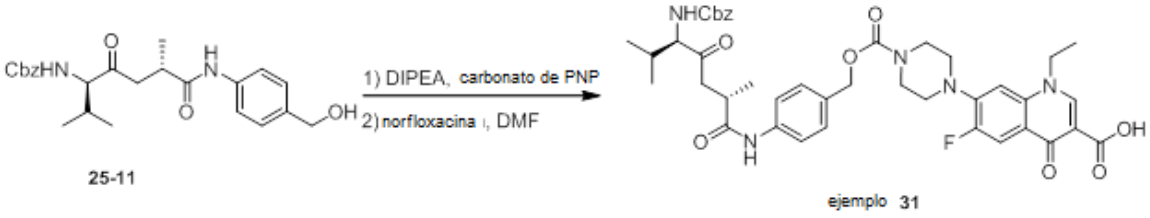


^{1}H RMN (400 MHz, DMSO–d_6) δ 8,99 (s, 1 H), 8,14–7,93 (m, 2 H), 7,57–7,19 (m, 10 H), 5,19 (s, 2 H), 5,11–5,03 (m, 2 H), 4,62–4,56 (m, 2 H), 4,51–4,47 (m, 1 H), 3,67–3,57 (m, 4 H), 3,52–3,50 (m, 1 H), 3,40–3,35 (m, 4 H), 2,25–2,15 (m, 1 H), 1,90 (s, 2 H), 1,41 (t, J = 7,2 Hz, 3 H), 0,98–0,84 (m, 6 H).

Ejemplo 31: ácido 7–(4–((4–((2S,5S)–5–(benciloxicarbonilamino)–2,6–dimetil–4–oxoheptanamido)benciloxi) carbonil)piperazin–1–il)–1–etil–6–fluoro–4–oxo–1,4–dihidroquinolin–3–carboxílico.



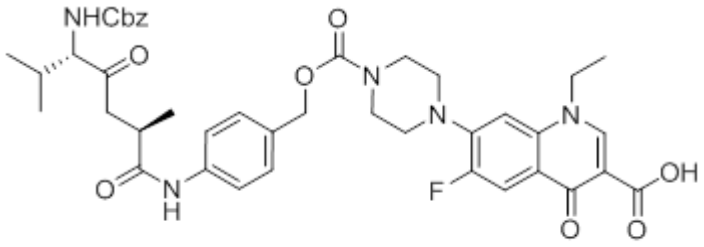
ejemplo 31



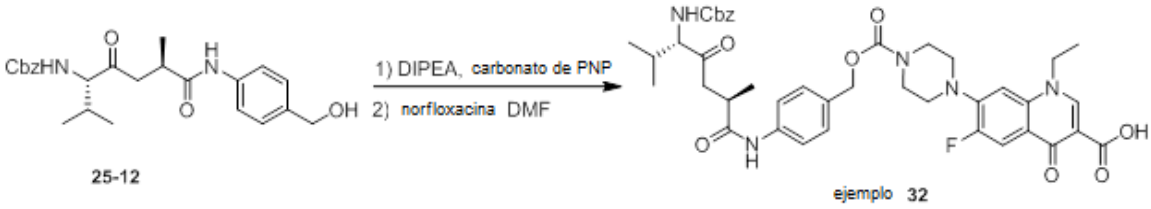
Etapa 1. Ejemplo 31 se preparó usando el procedimiento como en el Ejemplo **25**.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO–d_6) δ 15,29 (s, 1 H), 9,98 (s, 1 H), 8,92 (s, 1 H), 7,90 (d, J = 13,2 Hz, 1 H), 7,57–7,54 (m, 3 H), 7,32–7,24 (m, 7 H), 7,17 (d, J = 7,6 Hz, 1 H), 5,05–4,97 (m, 4 H), 4,56–4,54 (m, 2 H), 3,95–3,92 (m, 1 H), 3,58 (s, 4 H), 3,26 (s, 4 H), 2,93–2,83 (m, 2 H), 2,57–2,52 (m, 1 H), 2,16–2,08 (m, 1 H), 1,45–1,35 (m, 3 H), 1,07 (d, J = 6,4 Hz, 3 H), 0,85 (d, J = 8,2 Hz, 3 H), 0,75 (d, J = 8,0 Hz, 3 H). LCMS (ESI): m/z 772,1 [M+H$^+$].

Ejemplo 32: ácido 7–(4–((4–((2R,5R)–5–(benciloxicarbonilamino)–2,6–dimetil–4–oxoheptanamido)benciloxi)carbonil)piperazin–1–il)–1–etil–6–fluoro–4–oxo–1,4–dihidroquinolin–3–carboxílico.



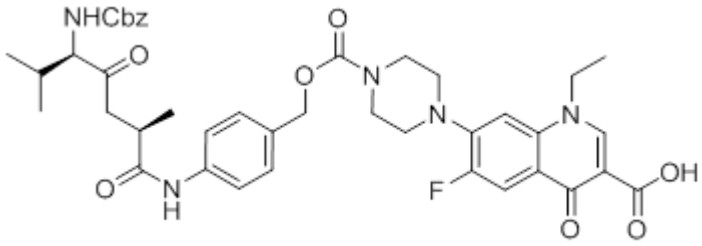
Etapa 1. El ejemplo 32 se preparó usando el procedimiento como en el Ejemplo **25**, con el intermediario de la síntesis del Ejemplo **25**.



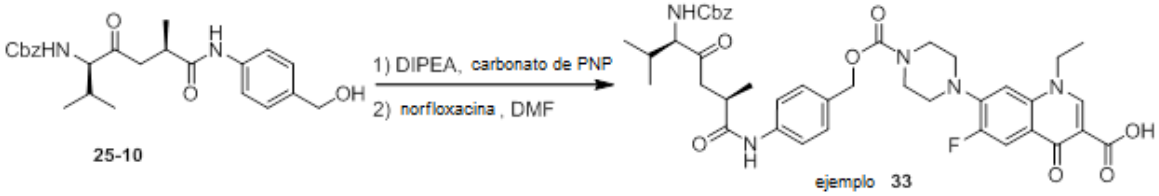
25-12 ejemplo 32

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO–d_6) δ 15,30 (s, 1 H), 10,03 (s, 1 H), 8,97 (s, 1 H), 7,95 (d, J = 12,8 Hz, 1 H), 7,74 (d, J = 8,4 Hz, 1 H), 7,58 (d, J = 8,4 Hz, 2 H) 7,37–7,31 (m, 7 H), 7,21 (d, J = 7,2 Hz, 1 H) 5,09–5,02 (m, 4 H), 4,60–4,56 (m, 2 H), 3,84–3,80 (m, 1 H), 3,61 (s, 4 H), 3,34 (s, 4 H), 2,92–2,85 (m, 2 H), 2,12–2,08 (m, 1 H), 2,05 (s, 1 H), 1,42–1,39 (m, 3 H), 1,07 (d, J = 6,8 Hz, 3 H), 0,82 (d, J = 6,8 Hz, 6 H). LCMS (ESI): m/z 772,4 [M+H$^+$].

Ejemplo 33: ácido 7–(4–((4–((2R,5S)–5–(benciloxicarbonilamino)–2,6–dimetil–4–oxoheptanamido)benciloxi)carbonil)piperazin–1–il)–1–etil–6–fluoro–4–oxo–1,4–dihidroquinolin–3–carboxílico



ejemplo 33



25-10 ejemplo 33

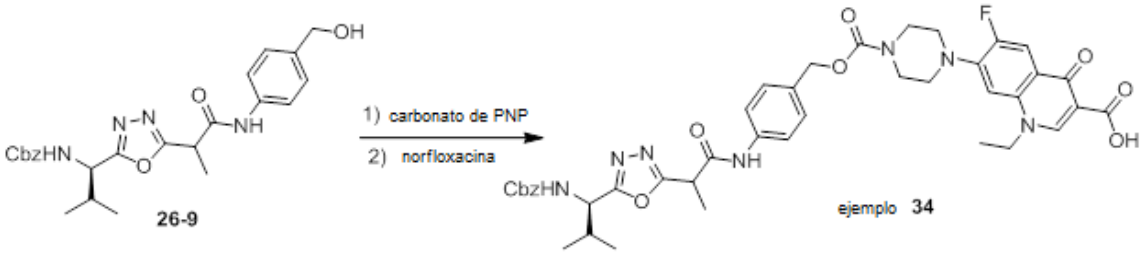
Etapa 1. Ejemplo 33 se preparó usando el procedimiento como en el Ejemplo **25**, con el intermediario de la síntesis del Ejemplo **25**.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO–d_6) δ 15,34 (s, 1 H), 10,02 (s, 1 H), 8,97 (s, 1 H), 7,95 (d, J = 12,8 Hz, 1 H), 7,58 (d, J = 8,4 Hz, 3 H), 7,36–7,29 (m, 7

H), 7,21 (d, *J* = 7,2 Hz, 1 H), 5,08–5,00 (m, 4 H), 4,61–4,56 (m, 2 H), 3,99–3,95 (m, 1 H), 3,61 (s, 4 H), 3,31 (s, 4 H), 2,96–2,85 (m, 2 H), 2,50–2,47 (m, 1 H), 2,19–2,13 (m, 1 H), 1,42–1,39 (m, 3 H), 1,08 (d, *J* = 6,0 Hz, 3 H), 0,90 (d, *J* = 6,0 Hz, 3 H), 0,82 (d, *J* = 6,4 Hz, 3 H). LCMS (ESI): m/z 772,0 [M+H$^+$].

Ejemplo 34. Ácido 7–(4–((4–(2–(5–((R)–1–(benciloxicarbonilamino)–2–metilpropil)–1,3,4–oxadiazol–2–il)propanamido)benciloxi)carbonil)piperazin–1–il)–1–etil–6–fluoro–4–oxo–1,4–dihidroquinolin–3–carboxílico.

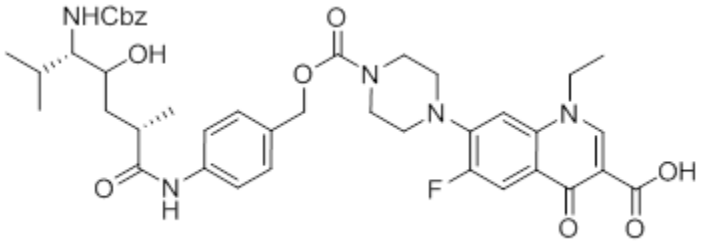
El Ejemplo 34 se preparó usando el procedimiento como en el Ejemplo **26**, con el intermediario de la síntesis del Ejemplo **26**.



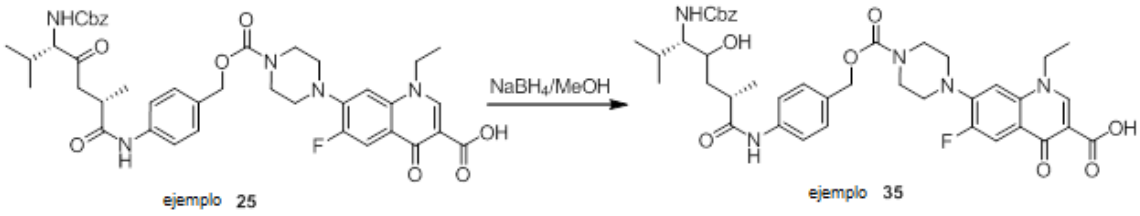
^{1}H RMN (400 MHz, DMSO–d_6) δ 15,32 (s, 1 H), 10,46 (s, 1 H), 8,95 (s, 1 H), 8,09 (s, 1 H), 7,94 (d, *J* = 13,2 Hz, 1 H), 7,58 (d, *J* = 8,0 Hz, 2 H), 7,36–7,33 (m, 7 H), 7,20 (d, *J* = 6,4 Hz, 1 H), 5,04 (d, *J* =15,2 Hz, 4 H), 4,62–4,57 (m, 3 H), 4,22–4,21 (m, 1 H), 3,61 (s, 4 H), 3,35 (s, 4 H), 2,13–2,11 (m, 1 H), 1,58 (d, *J* = 5,6 Hz, 3 H), 1,40 (t, *J* = 6,8 Hz, 3 H), 0,93 (d, *J* = 6,0 Hz, 3 H), 0,81 (d, *J* =6,4 Hz, 3H).

LCMS (ESI): m/z 798,1 [M+H$^+$].

Ejemplo 35: ácido 7–(4–((4–((2S,5S)–5–(benciloxicarbonilamino)–4–hidroxi–2,6–dimetilheptanamido) benciloxi)carbonil)piperazin–1–il)–1–etil–6–fluoro–4–oxo–1,4–dihidroquinolin–3–carboxílico.



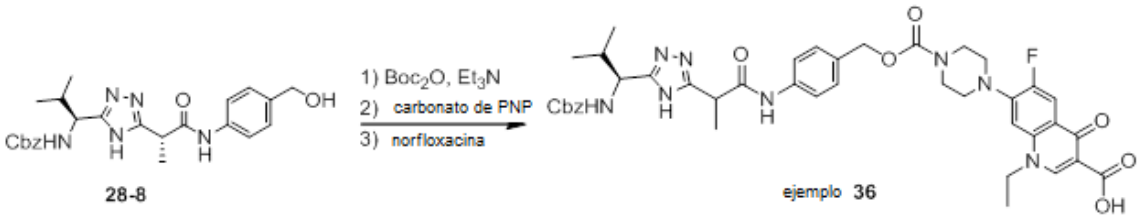
ejemplo 35



Etapa 1. A la solución del ejemplo **25** (120 mg, 0,156 mmol) en dri CH_3OH (20 mL) se añadió $NaBH_4$ (6 mg, 0,158 mmol) en baño de hielo. Después de agitar la mezcla a temperatura ambiente durante 2 h, el solvente se removió y el residuo se purificó por HPLC prep para dar el ejemplo **35** en forma de un sólido (40 mg).

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO–d_6) δ 15,33 (s, 1 H), 9,88 (s, 1 H), 8,96 (s, 1 H), 7,94 (d, J = 12,8 Hz, 1 H), 7,62 (d, J = 8,4 Hz, 2 H), 7,37–7,20 (m, 8 H), 6,95 (d, J = 10,0 Hz, 1 H), 5,05–4,99 (m, 4 H), 4,59–4,57 (m, 3 H), 3,61 (s, 4 H), 3,47–3,42 (m, 1 H), 3,30 (s, 4 H), 2,72–2,66 (m, 1 H) 2,07–2,04 (m, 1 H), 1,59–1,51 (m, 2 H), 1,45–1,35 (m, 3 H), 1,05 (d, J = 8,0 Hz, 3 H), 0,85–0,75 (m, 6 H). LCMS (ESI): m/z 387,7 [M/2+H$^+$].

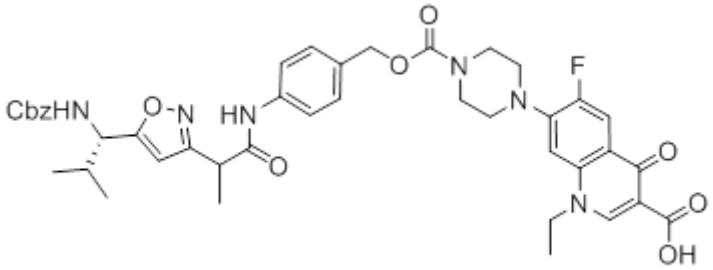
Ejemplo 36. Ácido 7–(4–((4–(2–(5–((S)–1–(benciloxicarbonilamino)–2–metilpropil)–4H–1,2,4–triazol–3–il)propanamido)benciloxi)carbonil)piperazin–1–il)–1–etil–6–fluoro–4–oxo–1,4–dihidroquinolin–3–carboxílico.



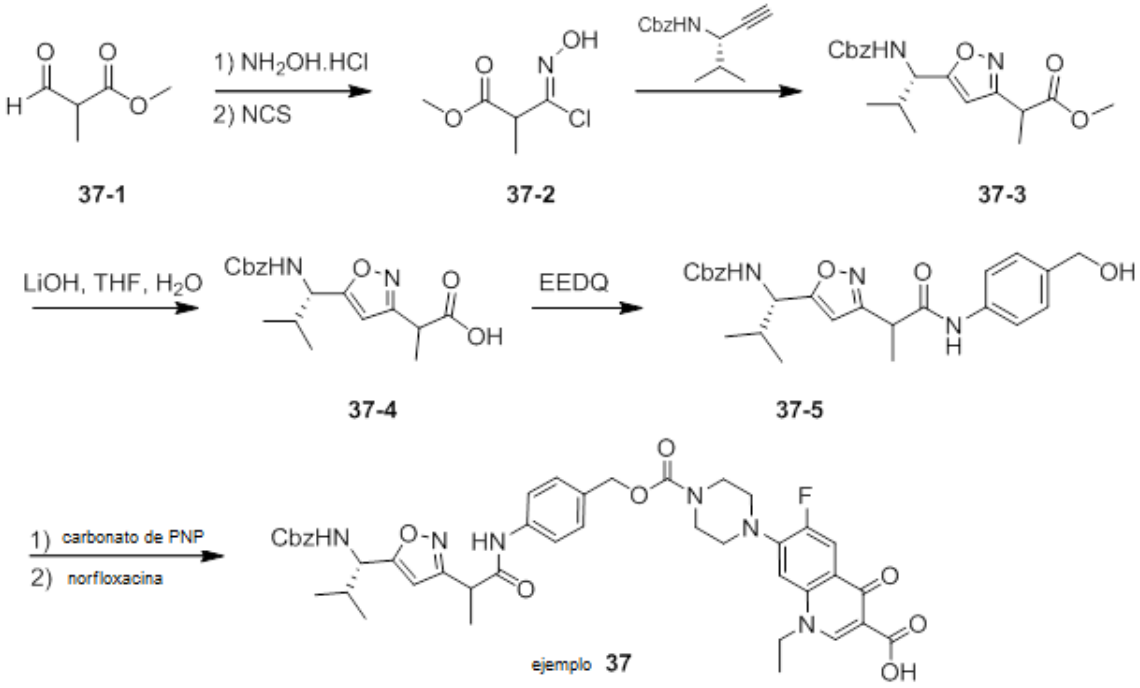
Etapa 1. A una solución de **28–8** (80 mg, 0,177 mmol) en DCM (3 mL) se añadió Boc_2O (232 mg, 1,062 mmol) y Et_3N (107 mg, 1,062 mmol) a 15 ºC. Después de agitar la solución a 15 ºC durante 16 h, DCM se removió a presión reducida y el residuo se lavó con éter de petróleo (5 mL × 3). El sólido resultante se disolvió en DCM (3 mL) y carbonato de PNP (108 mg, 0,354 mmol) DIPEA (92 mg, 0,708 mmol) se añadieron. Después de agitar la solución a 15 ºC durante 2 h, el solvente se removió a presión reducida y el residuo se disolvió DMF (3 mL) y norfloxacina (170 mg, 0,531 mmol) y DIPEA (92 mg, 0,708 mmol) se añadieron. Se agitó a 15 ºC durante 1 h. Después de remover el solvente, el residuo se purificó por HPLC prep para dar una mezcla de **ejemplo 36** (37 mg, 26%).

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO–d_6) δ 8,96 (s, 1 H), 7,95 (d, J = 13,2 Hz, 1 H), 7,60 (d, J = 8,4 Hz, 2 H), 7,34–7,20 (m, 8 H), 5,06–5,00 (m, 4 H), 4,59–4,41 (m, 3 H), 4,08–3,82 (m, 1 H), 3,61 (s, 4 H), 3,29 (s, 4 H), 2,15–2,07 (m, 1 H), 1,50–1,49 (m, 3 H), 1,40 (t, J = 7,2 Hz, 3 H), 0,88–0,87 (m, 3 H), 0,75–0,73 (m, 3 H).

Ejemplo 37. Ácido 7–(4–((4–(2–(5–((S)–1–(benciloxicarbonilamino)–2–metilpropil)isoxazol–3–il)propanamido)benciloxi)carbonil)piperazin–1–il)–1–etil–6–fluoro–4–oxo–1,4–dihidroquinolin–3–carboxílico.



ejemplo 37



Etapa 1. Una mezcla de **37–1** (5 g, 43,1 mmol) y clorhidrato de hidroxilamina (3,02 g, 43,1 mmol) en piridina (50 mL) se agitó a 70 ºC durante 16 h. El solvente se removió y el residuo se disolvió en DMF (30 mL) y NCS (5,73 g, 43,1 mmol) se añadió a 0 ºC. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. Después de remover el solvente, el residuo (**37–2**) se usó directamente en la siguiente etapa sin purificación.

Etapa 2. A una mezcla de **37–2** (5 g, 30,2 mmol), $CuSO_4{\cdot}^5H_2O$ (250 mg, 1 mmol), ascorbato de sodio (198 mg, 1 mmol), Na_2CO_3 (1,1 g, 10,4 mmol) en una mezcla de *t*–BuOH y H_2O (20 mL/20 mL) se añadió éster bencílico de ácido (1–isopropil–prop–2–inil)–carbámico (1,2 g, 5,2 mmol) a 0 ºC. Después de agitar la mezcla a 60 ºC durante 16 h, se extrajo con EtOAc (80 mL × 3). La capa orgánica se lavó con salmuera (60 mL), se secó sobre Na_2SO_4, se concentró al vacío y se purificó por HPLC prep para dar **37–3**.

LCMS (ESI): m/z 361,1 [$M+H^+$]

Etapa 3. A la solución de **37–3** (150 mg, 0,417 mmol) en una mezcla de

THF y H_2O (8 mL/4 mL) se añadió hidróxido de litio hidratado (145 mg, 4,17 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. El solvente se removió y la mezcla se lavó con EtOAc. Después de acidificar, se extrajo con EtOAc (30 mL×3). La capa orgánica se lavó con salmuera (30 mL), se secó sobre Na_2SO_4, se concentró para dar el producto crudo **37–4**, que se usó en la siguiente etapa sin ulterior purificación (123 mg, 84,8%).

LCMS (ESI): m/z 347,2 [$M+H^+$].

Etapa 4. A una mezcla de **37–4** (123 mg, 0,35 mmol) y (4–aminofenil)metanol (87 mg, 0,71 mmol) en CH_2Cl_2 (5 mL) se añadió EEDQ (174 mg, 0,71 mmol) a 0 ºC. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 h y se extrajo con EtOAc (30 mL × 3). La capa orgánica se lavó con salmuera (30 mL), se secó sobre Na_2SO_4, se concentró y se purificó por HPLC prep para dar **37–5** (63 mg, 39,4%).

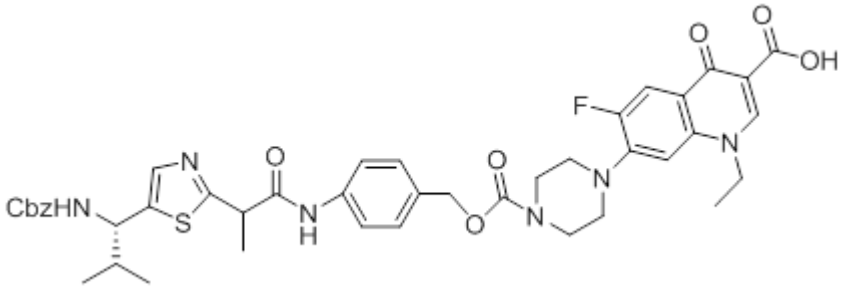
^{1}H RMN (400 MHz, MeOD) δ 7,44–7,42 (m, 2 H), 7,23–7,19 (m, 7 H), 6,23 (d, J = 2,8 Hz, 1 H), 4,99–4,98 (m, 2 H), 4,58–4,54 (m, 1 H), 4,46 (s, 2 H), 3,90–3,85 (m, 1 H), 2,10–2,01 (m, 1 H), 1,45–1,43 (m, 3 H), 089–0,79 (m, 6 H). LCMS (ESI): m/z 434,1 [M–OH].

Etapa 5. A una solución de **37–5** (40 mg, 0,089 mmol) en DCM seca (2 mL) se añadió carbonato de PNP (57 mg, 0,177 mmol) y DIPEA (23 mg). La mezcla se calentó a reflujo durante 16 h. Después de remover el solvente, el residuo se disolvió en DMF (2 mL), DIPEA (23 mg) y norfloxacina (54 mg, 0,178 mmol) se añadió. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. Después de remover el solvente, el residuo se purificó por HPLC prep para dar el ejemplo **37**.

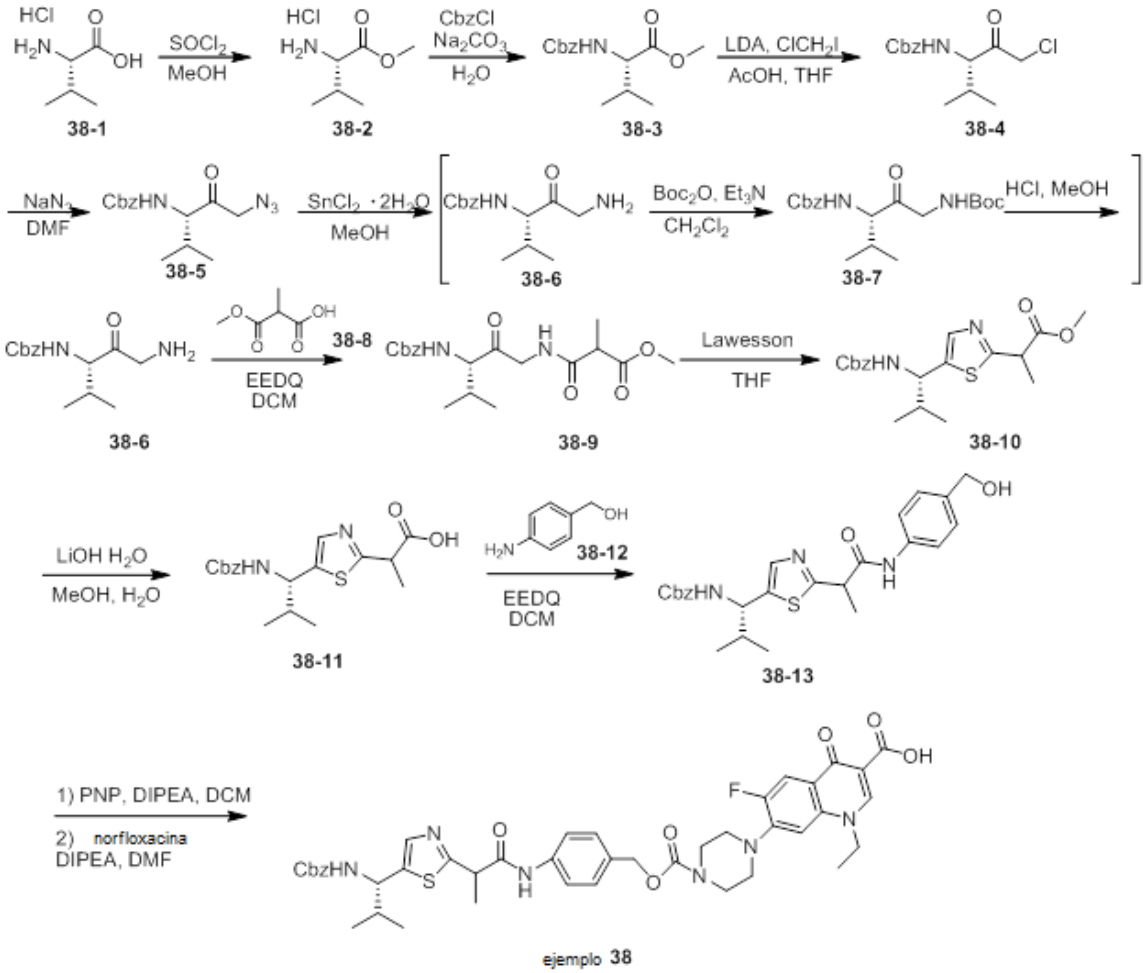
^{1}H RMN (400 MHz, DMSO–d_6) δ 15,30 (s, 1 H), 10,28 (s, 1 H), 8,93 (s, 1 H), 7,95–7,89 (m, 2 H), 7,57 (d, J = 8,8 Hz, 2 H), 7,35–7,12 (m, 8 H), 6,32 (d, J = 4,4 Hz, 1 H), 5,02 (d, J = 11,6 Hz, 4 H), 4,56–4,52 (m, 3 H),

3,97–3,91 (m, 1 H), 3,57 (s, 4 H), 3,29 (s, 4 H), 2,03–1,96 (m, 1 H), 1,41–1,35 (m, 6 H), 0,85–0,75 (m, 6 H). LCMS (ESI): m/z 797,3 [$M+H^+$], 399,3 [$M/2+H^+$].

Ejemplo 38. Ácido 7–(4–((4–(2–(5–((S)–1–(benciloxicarbonilamino)–2–metilpropil)tiazol–2–il)propanamido)benciloxi)carbonil)piperazin–1–il)–1–etil–6–fluoro–4–oxo–1,4–dihidroquinolin–3–carboxílico



ejemplo 38



Etapa 1. A una solución de **38–1** (40 g, 0,34 mol) en MeOH (200 mL) a 0 ºC se añadió $SOCl_2$ (28 mL, 0,38 mol) bajo N_2. Después de agitar la mezcla a temperatura ambiente durante 12 h, el solvente se removió para dar el producto crudo **38–2**.

Etapa 2. CbzCl (53 mL, 0,37 mol) se añadió en porciones durante 20 min a una mezcla de **38–2** (57 g, 0,34 mol) y Na_2CO_3 (72 g, 0,68 mol) en agua (300 mL). Después de agitar la mezcla a temperatura ambiente durante 12 h, se extrajo con EtOAc (500 mL × 3). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na2SO4 y se concentraron para dar el producto crudo, que se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (PE: EtOAc = 5:1) para dar el compuesto **38–3**.

Etapa 3. A la solución del compuesto **38–3** (10 g, 37,7 mmol) en THF (20 mL) se añadió $ClCH_2I$ (26,6 g, 151 mmol). Después de se enfrió hasta –78 ºC, LDA se añadió lentamente en 2 h. Después de agitar a –78 ºC durante 30 min bajo N_2, HOAc (21 mL, 377 mmol) en THF se añadió bajo –70 ºC. Se calentó hasta temperatura ambiente y EtOAc (30 mL) se añadió y la mezcla se vertió en salmuera. Se extrajo con EtOAc (80 mL × 3), se secó sobre Na_2SO_4, se concentró y se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (PE: EtOAc = 5:1) para dar el compuesto **38–4**.

Etapa 4. Después de una mezcla del compuesto **38–4** (5 g, 17,6 mmol) y NaN_3 (1,8 g, 26,4 mmol) se agitó a temperatura ambiente durante 1 h, se vertió en agua y se extrajo con EtOAc (150 mL × 3). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na2SO4 y se concentraron a presión reducida para dar el producto crudo de compuesto **38–5**.

Etapa 5. A la solución del compuesto **38–5** (4,84 g, 16,7 mmol) en MeOH (50 mL) se añadió $SnCl{\cdot}2H_2O$ (7,5 g, 33,3 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. Después de remover el solvente; el

residuo (**38–6**) se usó directamente en la siguiente etapa.

Etapa 6. Una mezcla del compuesto **38–6** (3,75 g, 14,2 mmol), $NaHCO_3$ (11,93 g, 142 mmol), Boc_2O (3,41 g, 15,6 mmol) en H_2O (15 mL) y dioxano (15 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. La mezcla se extrajo con EtOAc (150 mL × 3), se secó sobre Na_2SO_4, se concentró y se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (PE: EtOAc = 5:1 a 2:1) para dar el compuesto **38–7**. Después de una mezcla del compuesto **38–7** (1,6 g, 4,43 mmol) y 4 M HCl en MeOH (20 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 1 h, se evaporó para dar el compuesto **38–6**, que se usó para la siguiente etapa sin ulterior purificación.

Etapa 7. A la solución del compuesto **38–6** (1,17 g, 4,43 mmol) y compuesto **38–8** (643 mg, 4,87 mmol) en DCM (20 mL) se añadió EEDQ (1,31 g, 5,31 mmol). Después de agitar la mezcla a temperatura ambiente durante 1 h, el solvente se removió y el residuo se purificó por HPLC prep para dar el compuesto **38–9**.

Etapa 8. A una solución del compuesto **38–9** (1 g, 2,64 mmol) en THF (20 mL) bajo N_2 se añadió reactivo de Lawesson (1,18 g, 2,91 mmol). Después de agitar la mezcla a 60 ºC durante 1 h, el solvente se removió y el residuo se purificó por HPLC prep para dar el compuesto **38–10**.

Etapa 9. A una solución del compuesto **38–10** (630 mg, 1,67 mmol) en MeOH (5 mL) y H_2O (1 mL) se añadió $LiOH·H_2O$ (105 mg, 2,51 mmol). Después de la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 1 h, se acidificó con HCl conc. a pH = 6. La mezcla se extrajo con (50 mL × 3) y se concentró a presión reducida para dar el compuesto **38–11**.

Etapa 10. Una mezcla del compuesto **38–11** (438 mg, 1,21 mmol), compuesto **38–12** (446 mg, 3,62 mmol), HATU (690 mg, 1,82 mmol), DIPEA (468 mg, 3,62 mmol) y EEDQ (895 mg, 3,62 mmol) en DCM (10 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. Después de remover

el solvente, se purificó por HPLC prep para dar **38–13** (200 mg, 35,4%).

^{1}H RMN (400 MHz, MeOD) δ 7,54 (d, J = 8,4 Hz, 3 H), 7,31–7,25 (m, 7 H), 5,06–5,04 (m, 2 H), 4,64 (d, J = 8,0 Hz, 1 H), 4,55 (s, 2 H), 4,21 (m, 1 H), 2,14–2,04 (m, 1 H), 1,63 (d, J = 6,8 Hz, 3 H), 0,99 (d, J = 6,8 Hz, 3 H), 0,89–0,86 (m, 3 H).

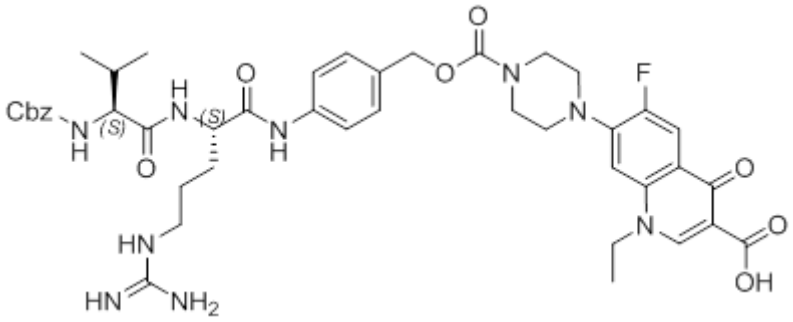
LCMS (ESI): m/z 467,9 [M+H$^+$].

Etapa 11. Una mezcla de **38–13** (50 mg, 0,107 mmol), PNP (65 mg, 0,214 mmol) y DIPEA (41 mg, 0,321 mmol) en DCM (5 mL) se agitó a 50 ºC durante 12 h. Se concentró y se añadió a una mezcla de norfloxacina (102 mg, 0,321 mmol) y DIPEA (41 mg, 0,321 mmol) en DMF (5 mL). Después de agitar a temperatura ambiente durante 2 h, el solvente se removió y el residuo se purificó por HPLC prep para dar el ejemplo **38** (24 mg, 27,6%).

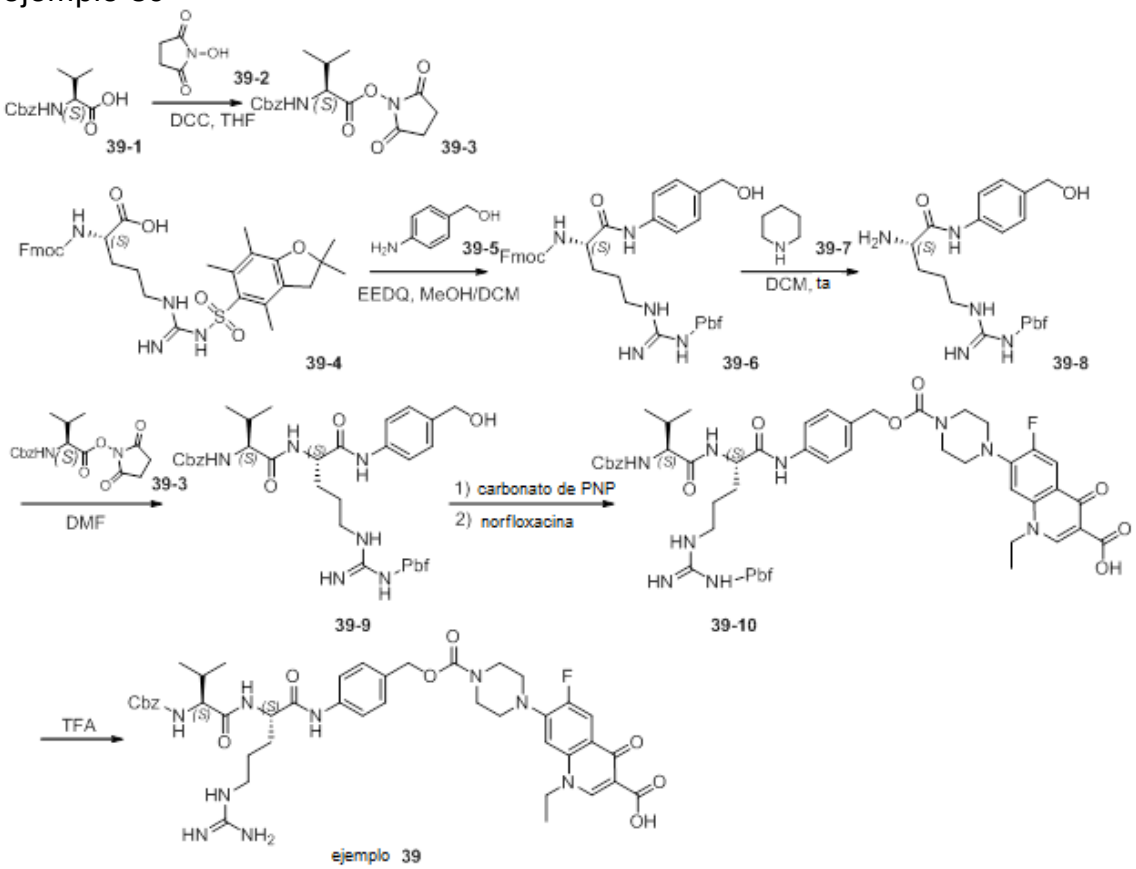
^{1}H RMN (400 MHz, DMSO–d_6) δ 15,32 (s, 1 H), 10,40 (s, 1 H), 8,96 (s, 1 H), 7,96–7,88 (m, 2 H), 7,61 (d, J = 8,4 Hz, 2 H), 7,51 (s, 1 H), 7,36–7,20 (m, 8 H), 5,07 (s, 2 H), 5,02–5,00 (m, 2 H), 4,59–4,55 (m, 3 H), 4,24–4,22 (m, 1 H), 3,61 (s, 4 H), 3,32 (s, 4 H), 1,97–1,92 (m, 1 H), 1,52 (d, J = 6,8 Hz, 3 H), 1,40 (t, J = 6,8 Hz, 3 H), 0,92 (d, J = 6,0 Hz, 3 H), 0,79–0,77 (m, 3 H).

LCMS (ESI): m/z 813,2 [M+H$^+$].

Ejemplo 39. Ácido7–(4–((4–((S)–2–((S)–2–(benciloxicarbonilamino)–3–metilbutanamido)–5–guanidinopentanamido)benciloxi)carbonil)piperazin–1–il)–1–etil–6–fluoro–4–oxo–1,4–dihidroquinolin–3–carboxílico



ejemplo 39



Etapa 1. A una solución agitada del compuesto **39–1** (1 g, 4 mmol), compuesto **39–2** (459 mg, 4 mmol) en THF (20 mL) se añadió DCC (908 mg, 4,4 mmol) a 0 ºC. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. La mezcla se filtró y el filtrado se concentró para dar el compuesto **39–3** (Rendimiento: 90 %).

Etapa 2. A una solución del compuesto **39–4** (2 g, 3,1 mmol) en DCM / MeOH (20 mL / 20 mL) se añadieron 4–amino–fenil–metanol (**39–60**) (570 mg, 4,6 mmol) y EEDQ (1,532 mg, 6,2 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 h y se purificó por cromatografía en columna (PE/EtOAc = 1/3) para dar el compuesto **39–6** (2 g, rendimiento: 86 %).

Etapa 3. A una solución del compuesto **39–6** (2 g, 2,65 mmol) en DCM (50 mL) se añadió el compuesto **39–7** (1,3 mL, 13,3 mmol) a temperatura ambiente. Después de agitar la mezcla a temperatura ambiente durante

16 h, se concentró y se lavó con MTBE y se filtró para dar el compuesto **39–8** (Rendimiento: 80 %).

Etapa 4. A una solución del compuesto **39–8** (640 mg, 1,2 mmol) en DME (10 mL) se añadió una solución del compuesto **39–3** (640 mg, 1,8 mmol) y $NaHCO_3$ (304 mg, 3,6 mmol) en agua (10 mL). Después de agitar la mezcla a temperatura ambiente durante 16 h, se lavó con EtOAc y se acidificó a pH 3 con 10% de HCl. La suspensión resultante se extrajo con EtOAc. La capa orgánica combinada se concentró y se purificó por cromatografía en columna (PE/EtOAc = 1/2) para dar **39–9** (510 mg, rendimiento: 55 %).

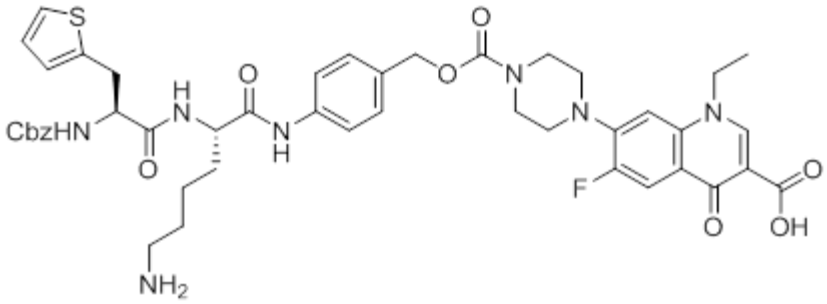
Etapa 5. A una solución del compuesto **39–9** (200 mg, 0,26 mmol), carbonato de PNP (158 mg, 0,52 mmol) en DMF (4 mL) se añadió DIPEA (101 mg, 0,78 mmol) a 0 ºC. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. A la mezcla se añadió norfloxacina (170 mg, 0,52 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 h y se purificó por HPLC prep y SFC para dar Compuesto **39–10** (Rendimiento: 30 % en dos etapas).

Etapa 6. To el compuesto **39–10** (100 mg, 0,1 mmol) se añadió una mezcla de TFA y DCM (TFA/DCM=1/5) a 0 ^{o}C. Después de agitar la mezcla a temperatura ambiente durante 3 h, se alcalinizó a pH = 9 por $NH_3.H_2O$. El residuo se purificó por HPLC prep y SFC para dar el ejemplo **39** (13,8 mg, 15 %).

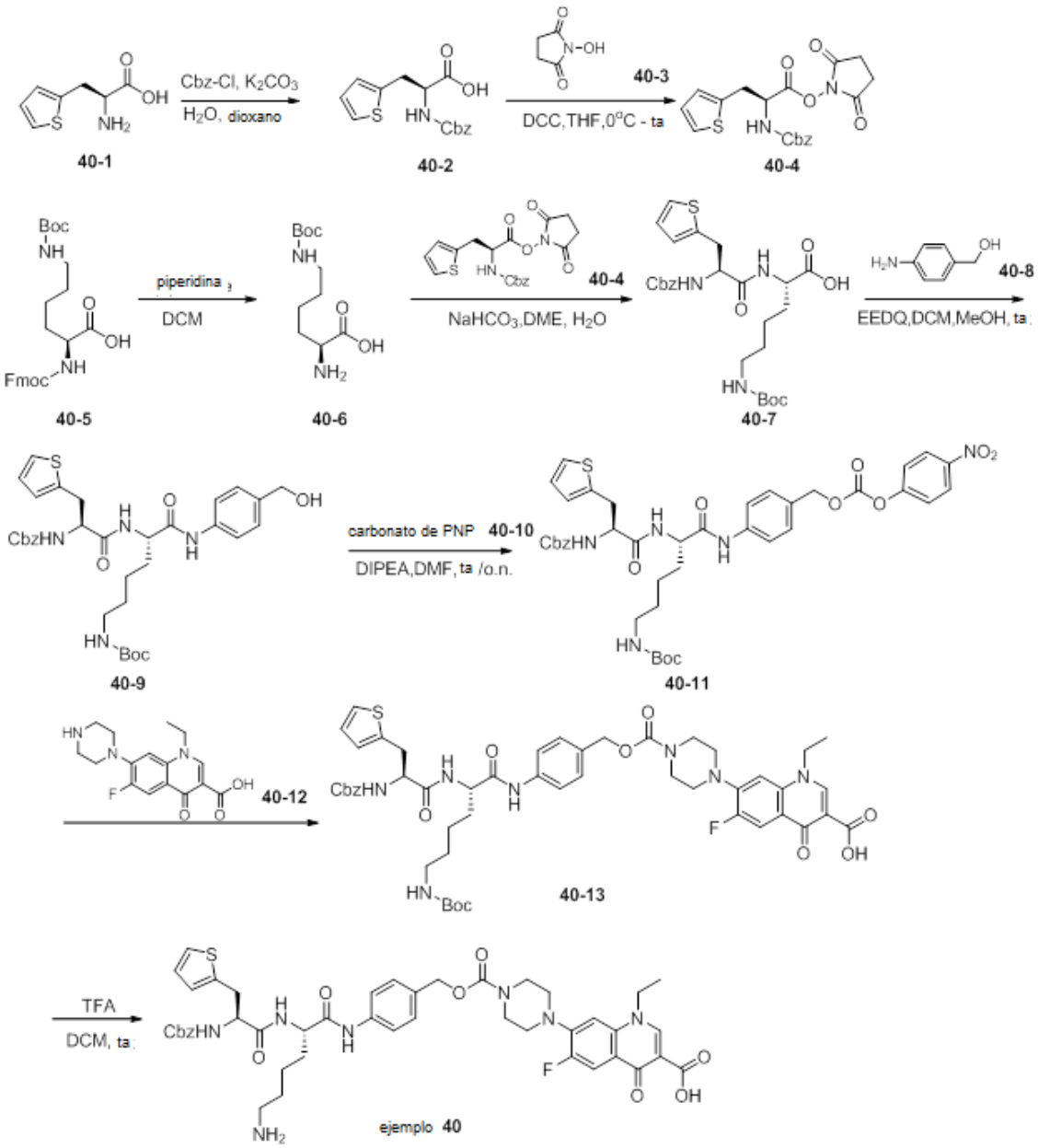
LCMS: (5–95, AB, 1,5 min, ESI), 0,826 min, MS = 858,2[M+1]

^{1}H RMN Metanol–d_4 400 MHz, δ 8,80 (s, 1 H), 8,55 (s, 1 H), 7,98 (d, J = 13,2 Hz, 1 H), 7,58 (s, 2 H), 7,36 – 7,27 (m, 9 H),7,15 (m, 1H), 5,11 (d, J = 16,4 Hz, 4 H), 4,57 – 4,50 (m, 4 H), 3,94 (d, J = 7,2 Hz, 1 H), 3,71 (m, 4 H), 3,22 (s, 2 H), 2,07 (d, J = 6,8 Hz, 1 H), 1,95 (s, 1 H), 1,83 – 1,79 (m, 1 H), 1,70 (d, J = 1,6 Hz, 2 H), 1,51 (s, 3 H), 0,97 – 0,96 (m, 6 H).

Ejemplo 40. Ácido 7–(4–((4–((S)–6–amino–2–((S)–2–(benciloxicarbonilamino)–3–(tiofen–2–il)propanamido)hexanamido)benciloxi)carbonil)piperazin–1–il)–1–etil–6–fluoro–4–oxo–1,4–dihidroquinolin–3–carboxílico



ejemplo 40



Etapa 1. A la mezcla del compuesto **40–1** (1 g, 5,85 mmol) en H_2O (6 mL) y dioxano (9 mL) se añadió K_2CO_3 (2,02 g, 14,63 mmol) y Cbz–Cl (1,2 g, 7,01 mmol) a 0 ºC. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. La mezcla se lavó con EtOAc (20 mL). La fase acuosa se acidificó con HCl 1 N a pH = 3 y se extrajo con EtOAc (25 ml x 2), las capas orgánicas se secaron sobre Na_2SO_4, se filtró y se concentró a presión reducida para dar el compuesto crudo **40–2** en forma de un aceite (1,5 g, rendimiento: 84,3%).

LCMS: (10–80, AB, 2 min, ESI), 0,954 min, MS = 305,8[M+1], 327,8[M+Na^+]

^{1}H RMN DMSO–d_6 400 MHz δ 7,65 – 7,63 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,37 – 7,29 (m, 6 H), 6,94 – 6,90 (m, 2H), 5,01 (s, 2 H), 4,2 – 4,1 (m, 1 H), 3,31 – 3,27 (m, 1H), 3,12 – 3,06 (m, 1 H).

Etapa 2. A una solución del compuesto **40–2** (2,0 g, 6,55 mmol), compuesto **40–3** (829,15 mg, 7,2 mmol) en THF seco (25 mL) se añadió DCC (1,49 g, 7,21 mmol) a 0 ºC. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 h bajo N_2. La mezcla se filtró y el filtrado se concentró para dar el compuesto crudo **40–4** que se usó para la siguiente etapa directamente sin ulterior purificación (2,2 g, rendimiento: 84,6%).

LCMS: (10–80, AB, 2 min, ESI), 1,040 min, MS = 424,8 [M+Na^+]

Etapa 3. A una solución agitada del compuesto **40–5** (5 g, 10,7 mmol) en DCM (80 mL) se añadió piperidina (4,5 g, 52,8 mmol) en porciones con jeringa a temperatura ambiente. Después de agitar la mezcla a temperatura ambiente durante 30 min, se concentró a presión reducida y el residuo se dividió entre EtOAc (30 mL) y H_2O (50 ml). La fase acuosa se concentró para dar el compuesto crudo **40–6** (2,0 g, 76%) en forma de sólido blanco que se usó en la siguiente etapa directamente.

Etapa 4. A una solución del compuesto **40–4** (980 mg, 2,44 mmol) en DME (10 mL) se añadió una solución del compuesto **40–6** (500 mg, 2,03 mmol) y $NaHCO_3$ (374 mg, 4,46 mmol) en agua (10 mL). Después de agitar la mezcla a temperatura ambiente durante 16 h, se lavó con EtOAc (20 mL) y la fase acuosa se acidificó a pH=3 con solución al 15% de ácido cítrico. La suspensión resultante se extrajo con EtOAc (30 mL x 2). La capa orgánica se purificó por HPLC prep para dar el compuesto **40–7** en forma de sólido blanco (200 mg, 18,4%).

LCMS: (10–80, AB, 2 min, ESI), 1,123 min, MS = 434,1 [M+1–Boc$^+$], 556,1 [M+Na$^+$]

Etapa 5. A una solución del compuesto **40–7** (300 mg, 0,563 mmol) en DCM / MeOH (20 mL / 10 mL) se añadieron 4–amino–fenil–metanol (**40–8**) (103,9 mg, 0,845 mmol) y EEDQ (208,82 mg, 0,845 mmol). Después de agitar la mezcla a temperatura ambiente durante 16 h, se concentró. El residuo se purificó por cromatografía en columna (PE : EtOAc = 2:3) para dar el compuesto **40–9** en forma de sólido blanco (260 mg, rendimiento: 72,3 %).

LCMS: (5–95, AB, 1,5 min, ESI), 0,880 min, MS = 539,0 [M+1–Boc$^+$], 661,0 [M+Na$^+$]

^{1}H RMN $CDCl_3$ 400 MHz, δ 8,51 (s, 1 H), 7,44 (d, *J* = 8 Hz, 2 H), 7,24 – 7,19 (m, 6 H), 7,05 – 7,03 (m, 1 H), 6,78 – 6,73 (m, 3 H), 5,52 (d, *J* = 3,2 Hz, 1 H), 5,03 (s, 2 H), 4,56 (s, 2 H), 4,46 – 4,39 (m, 2 H), 3,25 (d, *J* = 5,6 Hz, 2 H), 2,98 (s, 2 H), 1,87 – 1,83 (m, 1 H), 1,39 (d, *J* = 7,6 Hz, 2 H), 1,35 (s, 9 H), 1,25 – 1,17 (m, 2 H).

Etapa 6. A una solución del compuesto **40–9** (250 mg, 0,39 mmol) en DMF seca (5 mL) se añadió carbonato de PNP (237,14 mg, 0,78 mmol) y DIPEA (251,6 mg, 1,95 mmol) a 0 ºC. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. La mezcla (**40–11**) se usó para la siguiente etapa directamente sin ulterior purificación.

Etapa 7. A la mezcla de **40–11** se añadió norfloxacina (249,1 mg, 0,78 mmol) a temperatura ambiente. Después de agitar la mezcla a temperatura ambiente durante 1 h, se purificó por HPLC prep para dar el compuesto crudo **40–13** (220 mg Rendimiento: 57,3 %).

LCMS: (5–95, AB, 1,5 min, ESI), 0,964 min, MS = 442,6 [1/2M+1], 984,4[M+1]

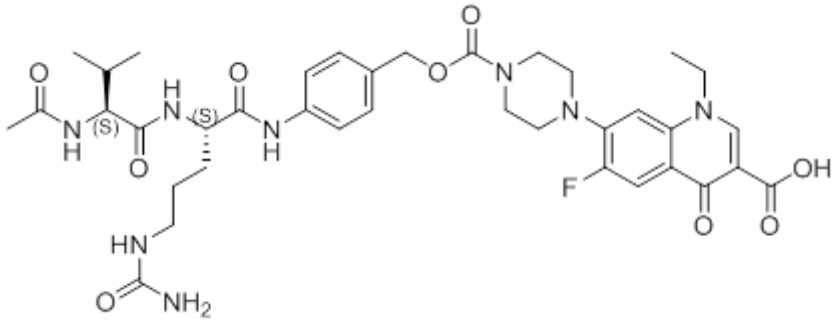
Etapa 8. Al compuesto **40–13** (120 mg, 0,12 mmol) se añadió una

mezcla de DCM:TFA (5:1, 3 mL) a temperatura ambiente. Después de agitar la mezcla a temperatura ambiente durante 1 h, se ajustó a pH=7 con amoníaco, luego se concentró, el residuo se purificó por HPLC prep para dar el ejemplo **40** (29 mg, rendimiento: 16,9%).

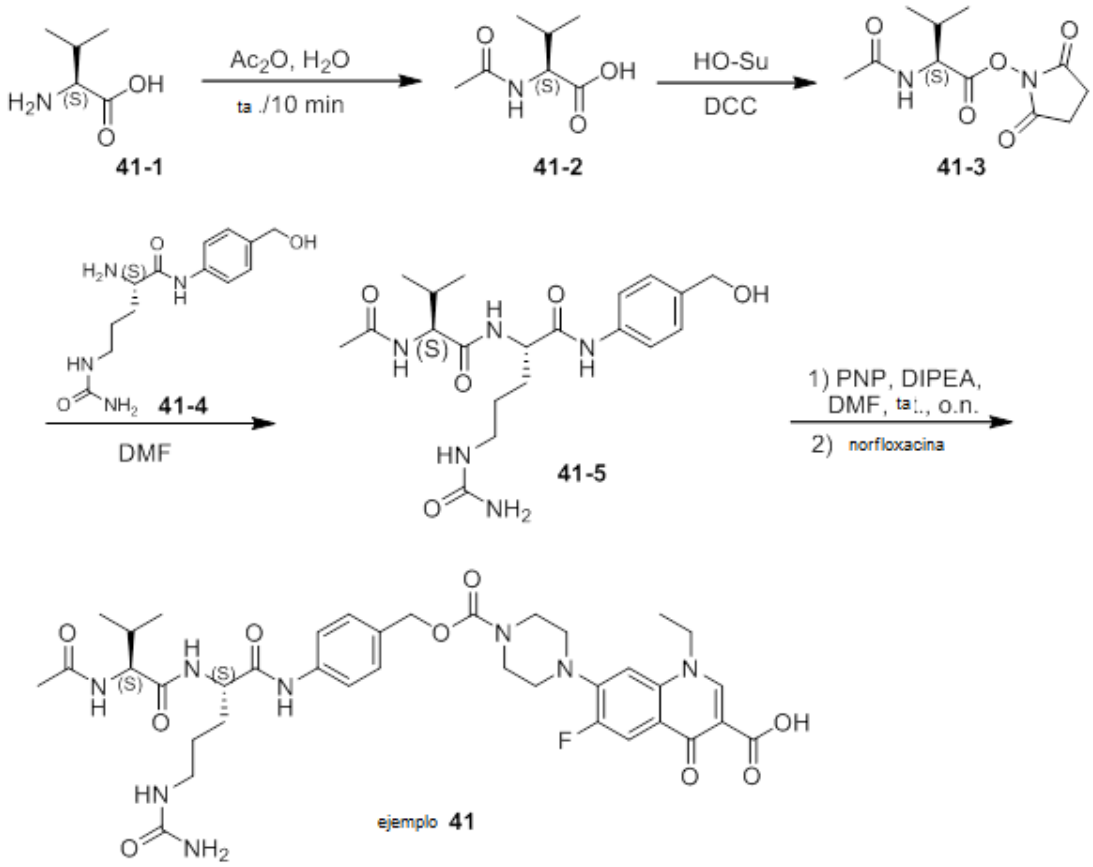
LCMS: (5–95, AB, 1,5 min, ESI), 0,826 min, MS = 884,3 [M+1], 442,8 [1/2M+1]

^{1}H RMN DMSO–d_6 400 MHz, δ 10,23 (s, 1 H), 8,93 (s, 1 H), 8,44 (s, 1 H), 8,42 (s, 0,5 H, HCOOH), 7,92 (d, J = 13,2 Hz, 1 H), 7,93 – 7,61 (m, 3 H), 7,33 – 7,25 (m, 8 H), 7,20 – 7,16 (m, 1 H), 6,88 – 6,86 (m, 2 H), 5,63 (s, 2 H), 4,97 (s, 2 H), 4,58 – 4,53 (m, 2 H), 4,40 – 4,31 (m, 1 H), 4,30 – 4,19 (m, 1 H), 3,58 (s, 4 H), 3,28 – 3,19 (m, 4 H), 3,19 – 3,03 (m, 2 H), 3,04 – 2,96 (m, 2 H), 2,69 – 2,64 (m, 2 H), 1,73 – 1,67 (m, 2 H), 1,57 – 1,49 (m, 2 H), 1,47 – 1,34 (m, 3 H), 1,32 – 1,28 (m, 2 H).

Ejemplo 41. Ácido 7–(4–((4–((S)–2–((S)–2–acetamido–3–metilbutanamido)–5–ureidopentanamido)benciloxi) carbonil)piperazin–1–il)–1–etil–6–fluoro–4–oxo–1,4–dihidroquinolin–3–carboxílico



ejemplo 41



Etapa 1. Después de compuesto **41–1** (470,6 mg, 4 mmol) en agua (10 mL) se sonicó durante 6 min, Ac_2O se añadió durante 4 min. La mezcla se concentró y el residuo se disolvió en MeOH, se filtró, se concentró para dar **41–2** crudo en forma de un sólido blanco (350 mg, 55%).

^{1}H RMN DMSO–d_6 400 MHz, δ 7,94 – 7,92 (d, J = 8,0 1 H), 4,10 – 4,08 (m, 1H), 2,01 – 1,99 (m, 1 H), 1,84 (s, 1 H), 0,83 – 0,80 (m, 6 H)

Etapa 2. A una solución del compuesto **41–2** (160 mg, 1 mmol) y HO–Su (122 mg, 1,05 mmol) en THF (10 mL) se añadió DCC (218 mg, 1,05 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 h bajo N_2. La mezcla se filtró y el filtrado se concentró para dar **41–3** (242 mg, rendimiento: 95 %).

Etapa 3. Compuesto **41–3** (242 mg, 0,94 mmol), **41–4** (265 mg, 0,94 mmol) se disolvieron en DMF (15 mL). Después de agitar la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 3 h, se filtró y se purificó por

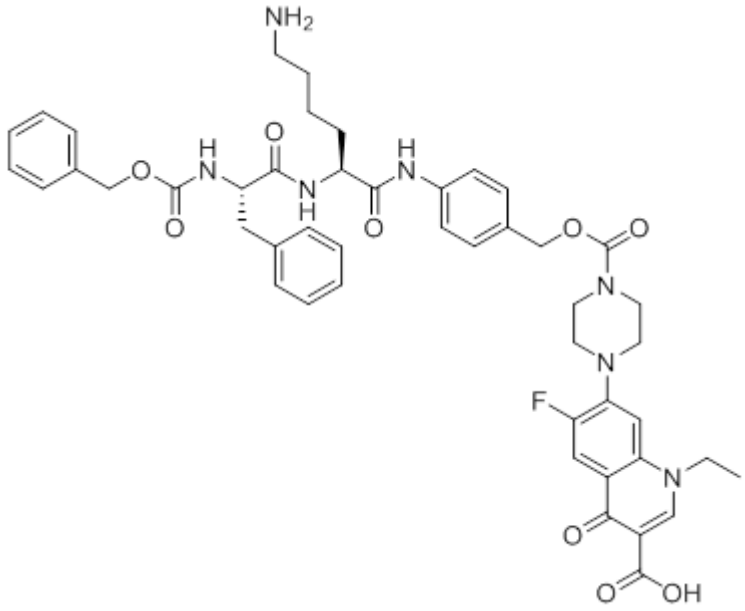
HPLC prep para dar **41–5** (70 mg, rendimiento: 17,7 %).

Etapa 4. A una solución del compuesto **41–5** (60 mg, 0,142 mmol) en DMF seca (3 mL) se añadió carbonato de PNP (87 mg, 0,285 mmol) y DIPEA (56 mg, 0,427 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. Norfloxacina (91 mg, 0,285 mmol) se añadió. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante otra hora. La mezcla se concentró, se filtró y se purificó por HPLC prep (FA) para dar el ejemplo **41** (40 mg, rendimiento: 37%).

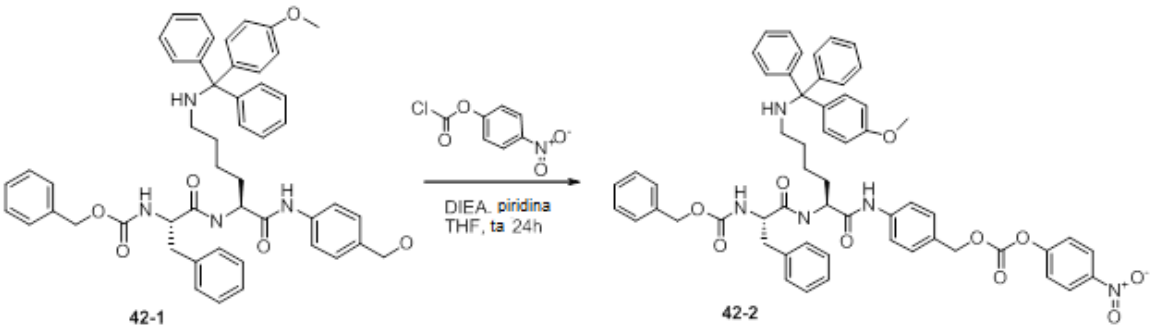
LCMS: (5–95, AB, 1,5 min, ESI), 0,784 min, MS = 767,1 [M+1]

^{1}H RMN DMSO–d_6 400 MHz, δ 9,96 (s, 1 H), 8,93 (s, 1 H), 8,10 (d, J = 7,6 Hz, 1 H), 7,92 (d, J = 12,4 Hz, 1 H), 7,86 (d, J = 8,8 Hz, 1 H), 7,58 (d, J = 8,4 Hz, 2 H), 7,31 (d, J = 8,8 Hz, 2 H), 7,18 (d, J = 7,2 Hz, 1 H), 5,96 – 5,94 (m, 1 H), 5,38 (s, 2 H), 5,03 (s, 2 H), 4,58 – 4,53 (m, 2 H), 4,38 – 4,32 (m, 1 H), 4,17 – 4,14 (m, 1 H), 3,58 (s, 4 H), 3,26 (s, 4 H), 3,00 – 2,91 (m, 2 H), 1,96 – 1,92 (m, 1 H), 1,86 (s, 3 H) , 1,68 – 1,55 (m, 2 H) , 1,38 (m, 5 H), 0,85 – 0,80 (m, 6 H).

Ejemplo 42: ácido 7–(4–{4–[(S)–6–Amino–2–((S)–2–benciloxicarbonilamino–3–fenil–propionilamino)–hexanoilamino]–benciloxicarbonil}–piperazin–1–il)–1–etil–6–fluoro–4–oxo–1,4–dihidro–quinolin–3–carboxílico



ejemplo 42

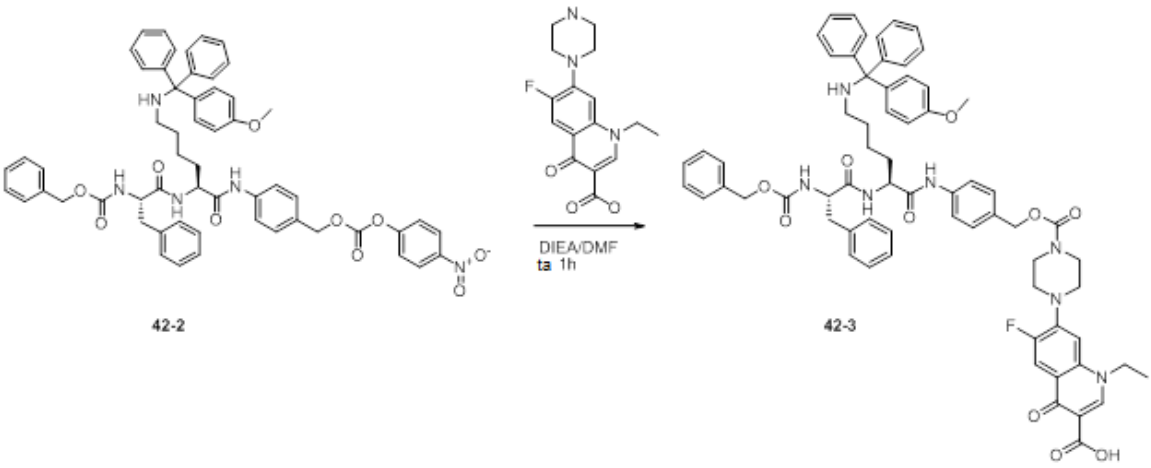


42-1

42-2

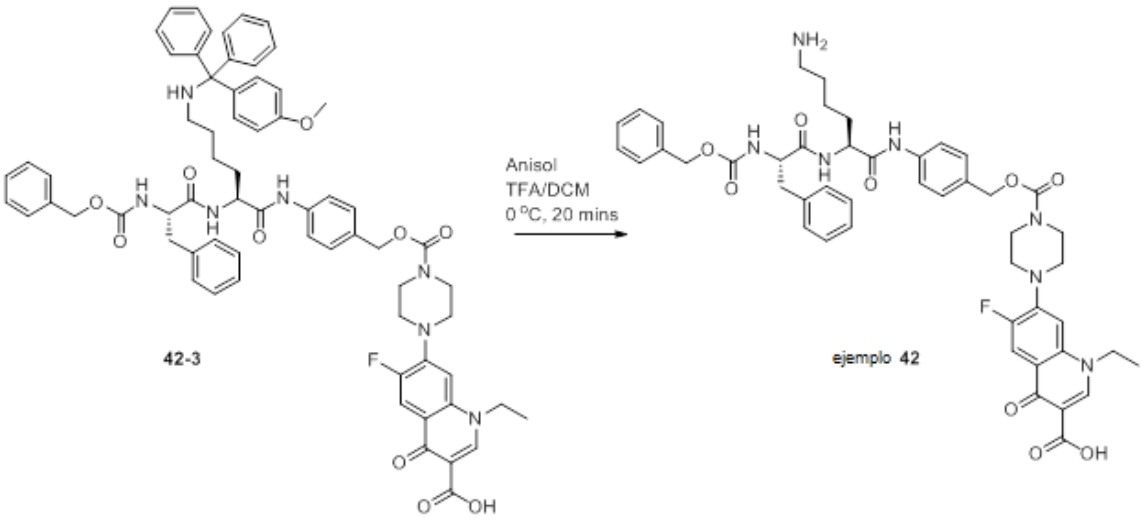
Etapa 1. A los 5 ml de solución en THF de **42–1** (200 mg, 0,25 mmol) se añadió DIEA (0,18 ml, 0,99 mmol), luego se añadió (4–nitrofenil)carbonocloridato (150 mg, 0,75 mmol), seguido por piridina (0,03 ml, 0,32 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 28 ºC durante la noche. La mezcla se concentró hasta sequedad, se disolvió en EtOAc, se lavó por NH4Cl sat., salmuera. La capa orgánica se secó sobre MgSO4, se concentró. El producto crudo se trituró con éter, se filtró para obtener un sólido amarillo claro 42–2 (190 mg, 79%).

LCMS (ESI): m/z 970,7 [$M+H^+$].



Etapa 2. A la suspensión de ácido 1–etil–6–fluoro–4–oxo–7–(piperazin–1–il)–1,4–dihidroquinolin–3–carboxílico (59 mg, 0,18 mmol) en 2 ml de DMF, se añadió DIEA (0,11 mL, 0,62 mmol), luego se añadió 42–2 (120 mg, 0,12 mmol) como una porción, lentamente se volvió solución amarilla hasta completar la reacción. La mezcla de reacción se vertió en agua helada, se extrajo con DCM. La capa orgánica se lavó con NH_4Cl sat., salmuera, se secó sobre $MgSO_4$, se concentró para obtener iield 42–3 (140 mg, 99%).

LCMS (ESI): m/z 1150,9 [$M+H^+$].



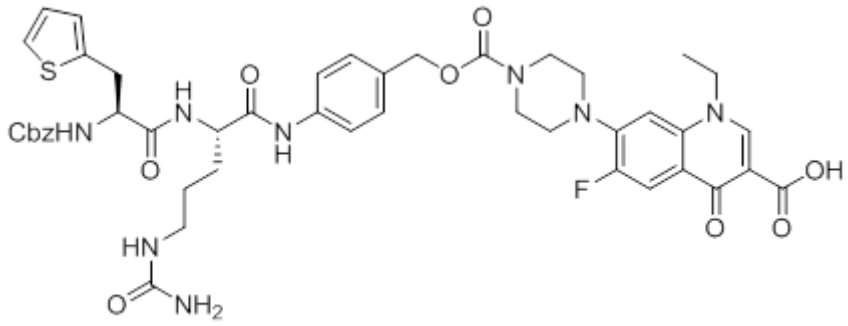
Etapa 3. A 10 ml de solución en DCM de **42–3** (145 mg, 0,13 mmol) se añadió anisol (0,05 ml, 0,50 mmol), se enfrió en baño de hielo, luego se

añadió en porciones TFA (0,1 ml, 1,00 mmol). Después de 10 min, la reacción se completó, se retiró el baño de hielo. La mezcla de reacción se concentró hasta sequedad, se disolvió en DCM, se lavó por NaHCO3 sat./agua, salmuera. La capa orgánica se secó sobre MgSO4, se concentró. El producto crudo se trituró con DCM, se filtró para obtener un sólido amarillo claro 42 (38 mg, 34%).

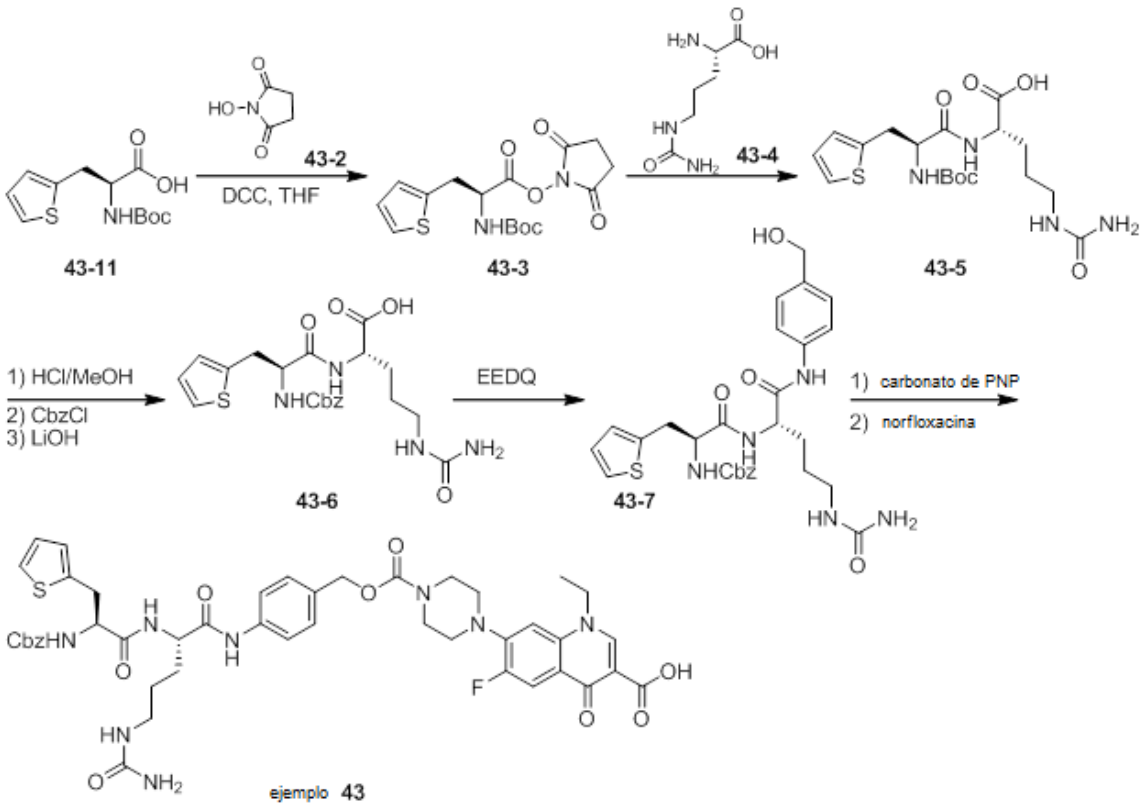
LCMS (ESI): m/z 878,7 [$M+H^+$].

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO–d_6) δ 10,13 (s, 1H), 8,86 (s, 1H), 8,26 (s, 1H), 7,91 (d, *J* = 12,7 Hz, 1H), 7,62 (d, *J* = 8,2 Hz, 2H), 7,48 (d, *J* = 9,2 Hz, 1H), 7,38 – 7,10 (m, 13H), 5,07 (s, 2H), 4,95 (s, 2H), 4,51 (s, 2H), 4,40 (s, 1H), 4,33 (s, 1H), 3,61 (s, 4H), 3,03 (d, *J* = 12,2 Hz, 2H), 1,69 (d, *J* = 15,5 Hz, 3H), 1,39 (t, *J* = 6,8 Hz, 8H).

Ejemplo 43. Ácido 7–(4–((4–((S)–2–((S)–2–(benciloxicarbonilamino)–3–(tiofen–2–il)propanamido) –5–ureidopentanamido)benciloxi)carbonil)piperazin–1–il)–1–etil–6–fluoro–4–oxo–1,4–dihidroquinolin–3–carboxílico



ejemplo 43



Etapa 1. A una solución del compuesto **43–1** (178 mg, 0,665 mmol) y el compuesto **43–2** (79 mg, 0,688 mmol) en THF (3 mL) se añadió DCC (149 mg, 0,721 mmol) en THF (0,5 mL) a 10 ºC. La solución se agitó a 10 ºC durante 6 h. El sólido se filtró y solvente se removió. El residuo se disolvió en DCM (5 mL). La mezcla se dejó reposar durante 1 h y se filtró para remover más DCU. El filtrado se evaporó para dar el compuesto crudo **43–3** (245 mg).

^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,21 (d, J = 5,2Hz, 1 H), 7,02–6,96 (m, 2 H), 5,30–4,93 (m, 1 H), 3,54–3,40 (m, 2 H), 2,82 (s, 4 H), 1,44 (s, 9 H).

Etapa 2. A una solución del compuesto **43–3** (245 mg, 0,665 mmol) en DME (2 mL) se añadió una solución del compuesto **43–4** (175 mg, 0,998 mmol) en agua (2 mL). La solución se agitó a 10 ºC durante 16 h. Solución saturada de $NaHCO_3$ (3 mL) se añadió y la mezcla se lavó con DCM (15 mL x 2). La capa acuosa se acidificó a pH 3 con solución 1 M de HCl y se extrajo con EtOAc (15 mL x 3). La capa orgánica se secó

sobre Na_2SO_4, se filtró, se concentró para dar el producto crudo **43–5** (270 mg).

LCMS (ESI): m/z 429,2 [$M+H^+$].

Etapa 3. Una solución del compuesto **43–5** (270 mg, 0,63 mmol) en MeOH de HCl (4 M, 5 mL) se agitó durante 2 h a 10 ºC. El solvente se removió a presión reducida y el residuo se disolvió en H_2O/THF (v/v 1:1, 3 mL), luego Na_2CO_3 (134 mg, 1,26 mmol) y CbzCl (167 mg, 0,979 mmol) se añadieron. La mezcla se agitó durante 2 h a 10 ºC, luego $LiOH{\cdot}H_2O$ (79 mg, 1,89 mmol) se añadió y la solución resultante se agitó durante 1 h a 10 ºC. El solvente orgánico se removió y la solución acuosa se lavó con DCM (15 mL x 2). La capa acuosa se acidificó a pH 2 con solución 1 M de HCl y se extrajo con EtOAc (15 mL x 3). La capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4, se filtró, se concentró para dar el producto crudo (182 mg).

LCMS (ESI): m/z 463,2 [$M+H^+$].

Etapa 4. A una solución del compuesto **43–6** (180 mg, 0,389 mmol) y (4–aminofenil) metanol (144 mg, 1,17 mmol) en DMF (4 mL) se añadió EEDQ (289 mg, 1,17 mmol) bajo N_2. La mezcla se agitó a 30 ºC durante 16 h. La mezcla se purificó por HPLC prep para dar **43–6** (80 mg, 36%).

^{1}H RMN (400 MHz, MeOD) δ 7,55–7,53 (m, 2 H), 7,32–7,27 (m, 7 H), 7,17–7,15 (m, 1 H), 6,88–6,84 (m, 2 H), 5,11–5,03 (m, 2 H), 4,55 (s, 2 H), 4,50–4,39 (m, 2 H), 3,38–3,36 (m, 1 H), 3,19–3,05 (m, 3 H), 1,89–1,50 (m, 4 H).

LCMS (ESI): m/z 568,1 [$M+H^+$].

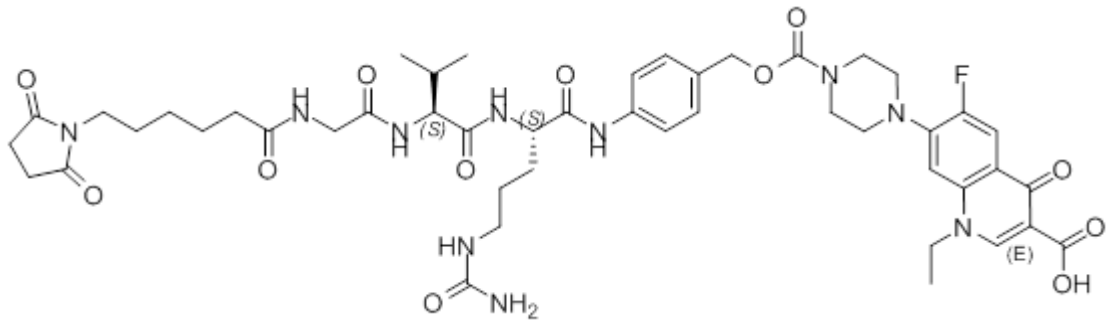
Etapa 5. A una solución de **43–7** (20 mg, 0,035 mmol) en DMF (2 mL) se añadieron carbonato de PNP (21 mg, 0,070 mmol) y DIPEA (18 mg, 0,141 mmol) a 10 ºC. Después de agitar la mezcla durante 24 h a 10 ºC, norfloxacina (17 mg, 0,053 mmol) y DIPEA (9 mg, 0,0695 mmol) se

añadieron. La solución resultante se agitó a 10 ºC durante 1 h y se purificó por HPLC prep para dar el ejemplo **43** (7 mg, 22%).

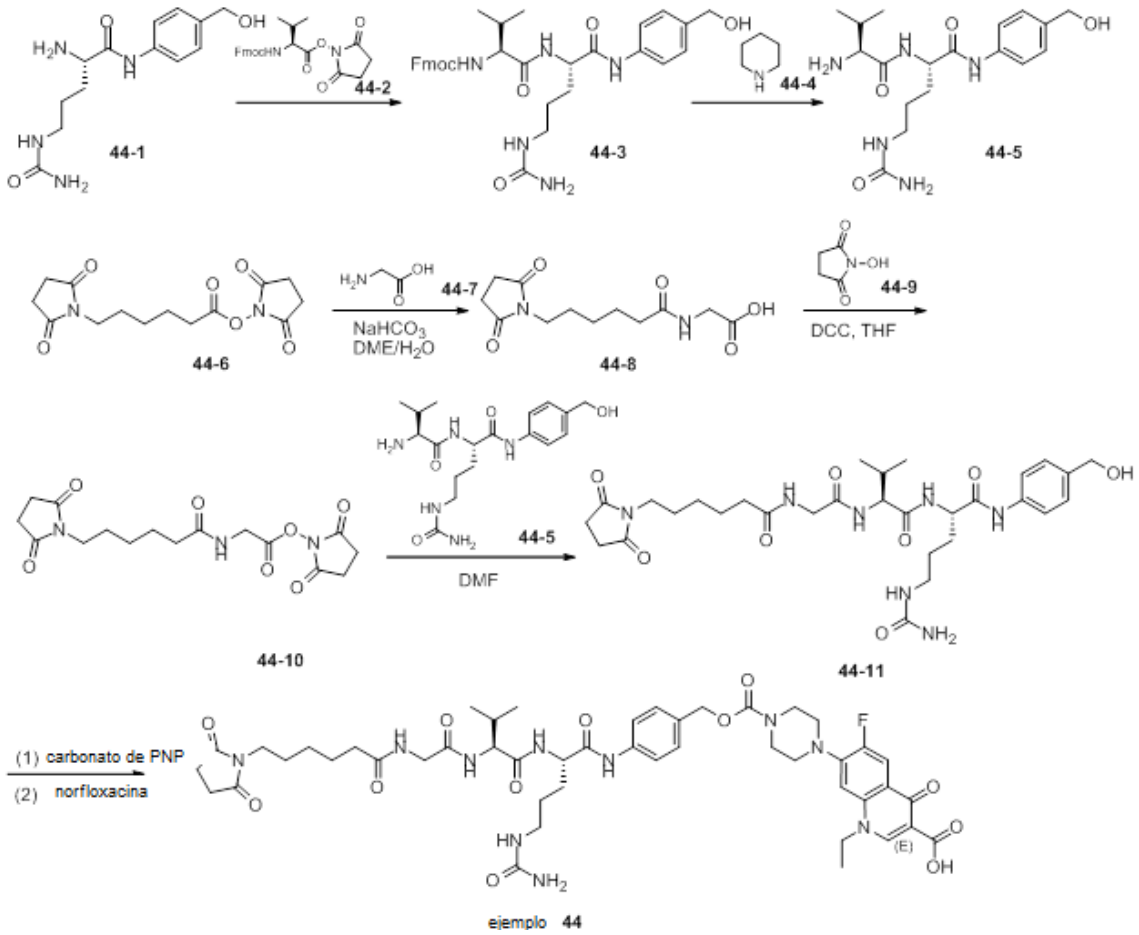
^{1}H RMN (400 MHz, DMSO–d_6) δ 10,16 (s, 1 H), 8,95 (s, 1 H), 8,33–8,32 (m, 1 H), 7,94 (d, J = 12,0Hz, 1 H), 7,63–7,57 (m, 3 H), 7,35–7,19 (m, 10 H), 6,91–6,90 (m, 2 H), 6,04 (m, 1 H), 5,44 (s, 2 H), 5,06 (s, 2 H), 5,00 (s, 2 H), 4,59–4,29 (m, 4 H), 3,61 (s, 4 H), 3,21 (s, 4 H), 3,04–2,94 (m, 4 H), 1,71–1,61 (m, 2 H), 1,45–1,38 (m, 5 H).

LCMS (ESI): m/z 913,3 [M+H$^+$].

Ejemplo 44. Ácido 7–(4–((4–((S)–2–((S)–2–(2–(6–(2,5–dioxopirrolidin–1–il)hexanamido)acetamido)–3–metilbutanamido)–5–ureidopentanamido)benciloxi)carbonil)piperazin–1–il)–1–etil–6–fluoro–4–oxo–1,4–dihidroquinolin–3–carboxílico



ejemplo 44



Etapa 1. Compuesto **44–1** (600 mg, 2,14 mmol) y compuesto **44–2** (936 mg, 2,14 mmol) se disolvieron en DMF (5 mL) y se agitó a temperatura ambiente durante 3 h para dar **44–3** como una mezcla.

Etapa 2. A una solución del compuesto **44–3** (2,14 mmol) en DMF (10 mL) se añadió el compuesto **44–4** (0,6 mL, 4,5 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. La mezcla se concentró y se lavó con MTBE (30 mL x 3), se filtró y el filtrado se concentró para dar **44–5** (597 mg, rendimiento: 70 %).

Etapa 3. A una solución del compuesto **44–7** (75 mg, 1 mmol) en DME (10 mL) se añadió una solución del compuesto **44–6** (340 mg, 1,1 mmol) y $NaHCO_3$ (252 mg, 3 mmol) en agua (10 mL). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. La mezcla se lavó con EtOAc y se acidificó a pH = 3 con 10% de HCl. La suspensión resultante se extrajo

con EtOAc. La capa orgánica combinada se concentró para dar el compuesto crudo **44–8** (350 mg)

Etapa 4. A una solución de **44–8** (350 mg, 1,3 mmol) y **44–9** (157 mg, 1,36 mmol) en THF (15 mL) se añadió DCC (281 mg, 1,36 mmol). Después de agitar durante 16 h bajo nitrógeno, se concentró para dar **44–10** (480 mg, rendimiento: 100 %).

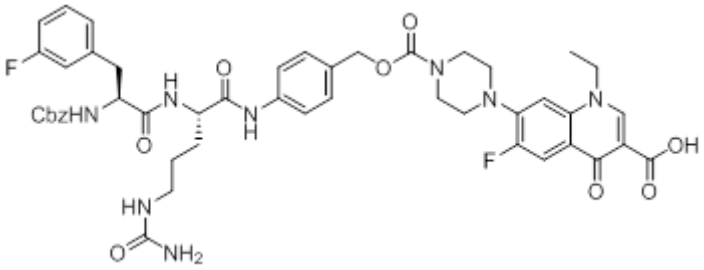
Etapa 5. Compuesto **44–10** (404 mg, 1,1 mmol), compuesto **44–5** (835 mg, 2,2 mmol) se disolvieron en DMF (6 mL). Después de agitar la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 3 h, se filtró y se purificó por HPLC prep para dar el compuesto **44–11** (110 mg, rendimiento: 16 %).

Etapa 6. A una solución del compuesto **44–11** (85 mg, 0,135 mmol) en DMF seca (5 mL) se añadió carbonato de PNP (82 mg, 0,27 mmol) y DIPEA (52 mg, 0,40 mmol) a temperatura ambiente. Se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. Norfloxacina (85 mg, 0,27 mmol) se añadió y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante otra hora. La mezcla se concentró, se filtró y se purificó por HPLC prep (FA) para dar el ejemplo **44** (70 mg, rendimiento: 51%).

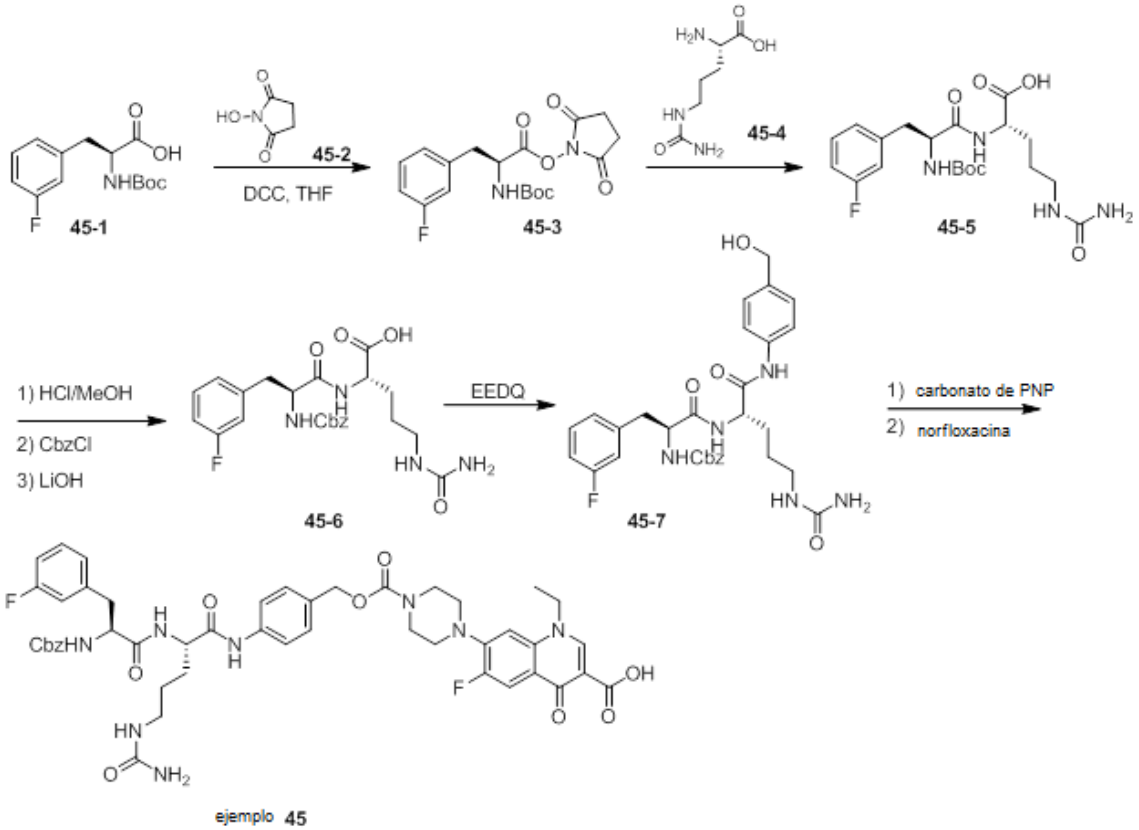
LCMS: (5–95, AB, 1,5 min, ESI), 0,794 min, MS = 977,3 [M+1], 489,3 [1/2M+1]

^{1}H RMN DMSO–d_6 400 MHz, δ 15,32 (s, 1 H), 9,90 (s, 1 H), 8,96 (s, 1 H), 8,17 (s, 2 H), 8,11 (s, 1 H), 7,95 (d, J = 13,6 Hz, 1 H), 7,82 (d, J = 8,4 Hz, 1 H), 7,62 (d, J = 8,8 Hz, 2 H), 7,33 (d, J = 8,4 Hz, 2 H), 7,21 (d, J = 9,6 Hz, 1 H), 5,98 (s, 1 H), 5,41 (s, 2 H), 5,06 (s, 2 H), 4,59 (d, J = 7,2 Hz, 2 H), 4,35 (s, 1 H), 4,22 (d, J = 14,8 Hz, 1 H), 3,76 – 3,73 (m, 2 H), 3,61 (s, 4 H), 3,28 (s, 4 H), 3,12 – 2,86 (m, 2 H), 2,60 (s, 4 H), 2,07 (d, J = 6,8 Hz, 2 H), 1,98 (s, 1 H) , 1,80 – 1,56 (m, 2 H), 1,47 – 1,39 (m, 9 H), 1,18 (s, 2 H), 0,87 – 0,82 (m, 6 H).

Ejemplo 45. Ácido 7–(4–((4–((S)–2–((S)–2–(benciloxicarbonilamino)–3–(3–fluorofenil)propanamido)–5–ureidopentanamido)benciloxi)carbonil)piperazin–1–il)–1–etil–6–fluoro–4–oxo–1,4–dihidroquinolin–3–carboxílico



ejemplo 45



Etapa 1. A una solución del compuesto **45–1** (178 mg, 0,63 mmol) y compuesto **45–2** (76 mg, 0,662 mmol) en THF (3 mL) se añadió DCC (143 mg, 0,693 mmol) en THF (0,5 mL) a 10 ºC. Después de agitar la solución a 10 ºC durante 3 h, el sólido se filtró y solvente se removió. El residuo se disolvió en DCM (5 mL). La mezcla se dejó reposar durante 1

hora y luego se filtró para remover more DCU. El filtrado se evaporó para dar el compuesto crudo **45–3** (250 mg).

^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,69–7,27 (m, 1 H), 7,23–6,95 (m, 3 H), 4,98–4,85 (m, 1 H), 3,33–3,14 (m, 2 H), 2,82 (s, 4 H), 1,37 (s, 9 H).

Etapa 2. A una solución del compuesto **45–3** (250 mg, 0,63 mmol) en DME (2 mL) se añadió una solución del compuesto **45–4** (173 mg, 0,986 mmol) en agua (2 mL). La solución se agitó a 10 ºC durante 16 h. Solución saturada de NaHCO3 (3 mL) se añadió y la mezcla se lavó con DCM (5 mL x 2). La capa acuosa se acidificó a pH 3 con solución 1 M de HCl, se extrajo con EtOAc (10 mL x 3). La capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4, se filtró, se concentró para dar el producto crudo **45–5** (280 mg).

LCMS (ESI): m/z 441,2 [M+H$^+$].

Etapa 3. Después de una solución del compuesto **45–5** (240 mg, 0,545 mmol) en HCl 4 M en MeOH (5 mL) se agitó durante 2 h a 10 ºC, el solvente se removió a presión reducida y el residuo se disolvió en H_2O/THF (v/v 1:1, 3 mL). Na_2CO_3 (116 mg, 1,09 mmol) y CbzCl (139 mg, 0,817 mmol) se añadió. La mezcla se agitó durante 2 h a 10 ºC, luego $LiOH{\cdot}H_2O$ (67 mg, 1,63 mmol) se añadió y la solución resultante se agitó durante 1 h a 10 ºC. El solvente se removió y la solución acuosa se lavó con DCM (5 mL x 2) y se acidificó a pH 2 con solución 1 M de HCl. Se extrajo con EtOAc (10 mL x 3). La capa orgánica combinada se secó sobre Na_2SO_4, se filtró, se concentró para dar del producto crudo **45–6** (198 mg).

LCMS (ESI): m/z 475,2 [M+H$^+$].

Etapa 4. A una solución del compuesto **45–6** (192 mg, 0,405 mmol) y (4–aminofenil) metanol (150 mg, 1,21 mmol) en DMF (4 mL) se añadió EEDQ (300 mg, 1,21 mmol) bajo N_2. Después de agitar la mezcla a 30

ºC durante 16 h, se purificó por HPLC prep para dar **45–7** (70 mg, 30%).

^{1}H RMN (400 MHz, MeOD) δ 7,55–7,53 (m, 2 H), 7,31–7,17 (m, 8 H), 7,05–7,00 (m, 2 H), 6,91–6,86 (m, 1 H), 5,07–4,99 (m, 2 H), 4,56 (s, 2 H), 4,49–4,41 (m, 2 H), 3,17–3,06 (m, 3 H), 2,91–2,85 (m, 1 H), 1,87–1,50 (m, 4 H).

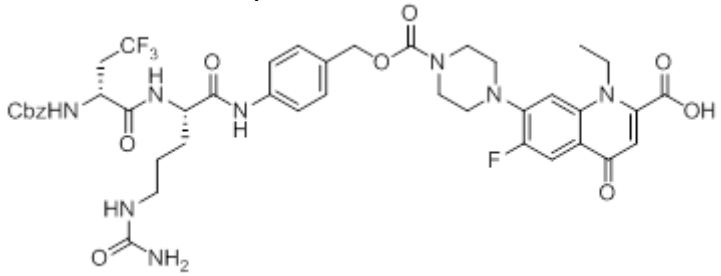
LCMS (ESI): m/z 580,2 [M+H$^+$].

Etapa 5. A una solución de **45–7** (20 mg, 0,0345 mmol) en DMF (2 mL) se añadió carbonato de PNP (21 mg, 0,069 mmol) y DIPEA (18 mg, 0,139 mmol) a 10 ºC. Después de agitar la mezcla durante 24 h a 10 ºC, norfloxacina (17 mg, 0,053 mmol) y DIPEA (9 mg, 0,0695 mmol) se añadieron. La mezcla de reacción se agitó a 10 ºC durante 1 h y se purificó por HPLC prep para dar el ejemplo **45** (17 mg, 53%).

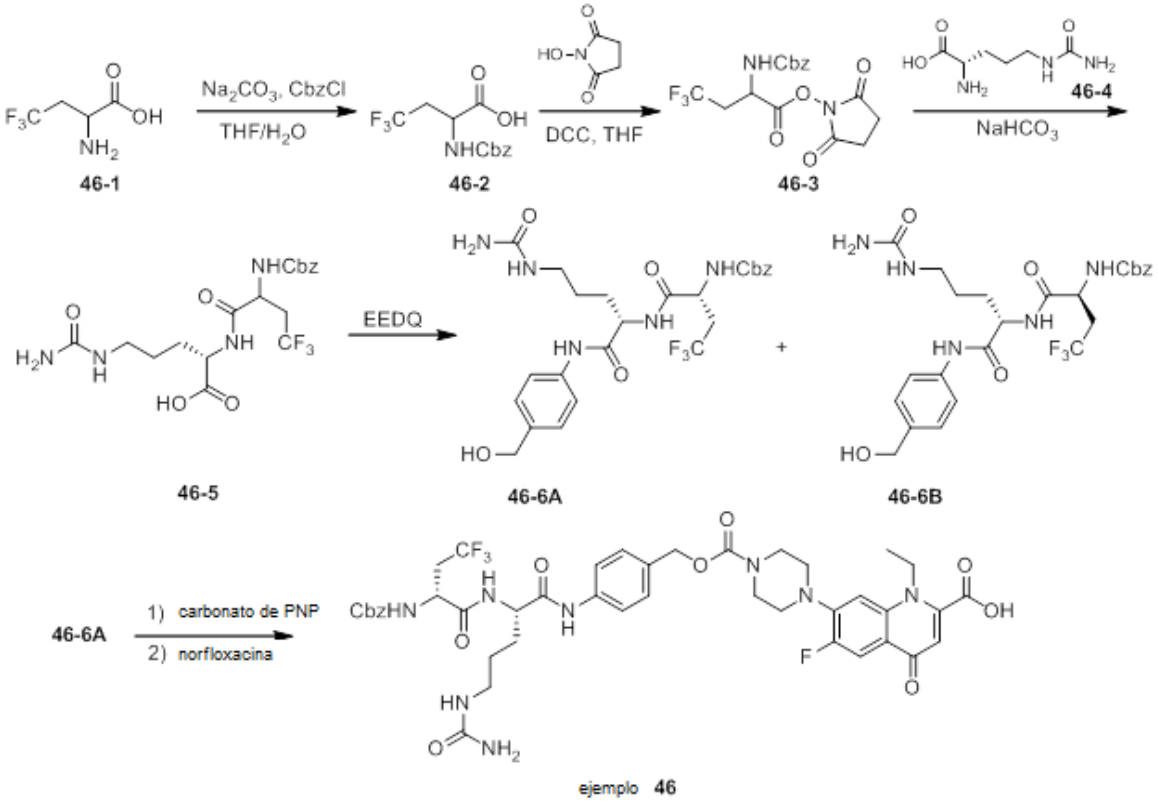
^{1}H RMN (400 MHz, DMSO–d_6) δ 15,32 (br, 1 H), 10,12 (s, 1 H), 8,96 (s, 1 H), 8,30–8,28 (m, 1 H), 7,94 (d, J = 13,2 Hz, 1 H), 7,62 (d, J = 8,4 Hz, 2 H), 7,52 (d, J = 8,8 Hz, 1 H),7,35–7,13 (m, 11 H), 7,04–7,00 (m, 1 H), 5,99 (m, 1 H), 5,43 (s, 2 H), 5,06 (s, 2 H), 4,95 (s, 2 H), 4,61–4,33 (m, 4 H), 3,61 (s, 4 H), 3,32 (s, 4 H), 3,06–2,66 (m, 4 H), 1,75–1,60 (m, 2 H), 1,45–1,35 (m, 5 H).

LCMS (ESI): m/z 925,5 [M+H$^+$].

Ejemplo 46. Ácido 7–(4–((4–((S)–2–((R)–2–(benciloxicarbonilamino)–4,4,4–trifluorobutanamido)–5–ureidopentanamido)benciloxi)carbonil)piperazin–1–il)–1–etil–6–fluoro–4–oxo–1,4–dihidroquinolin–2–carboxílico



ejemplo 46



ejemplo 46

Etapa 1. A la solución del compuesto **46–1** (200 mg, 1,27 mmol) en THF (10 mL) se añadió carbonocloridato de bencilo (226 mg, 1,33 mmol) en un baño de hielo. Una solución de Na_2CO_3 (270 mg, 2,54 mmol) en agua (10 mL) se añadió en porciones con vigorosa agitación a 7 ^{o}C o menos. Después de agitar la mezcla durante 16 h, la capa orgánica se separó, se lavó con HCl diluido (0,1 M, 60 mL) y solución saturada de NaHCO3 (60 mL), se secó sobre Na2SO4 anhidro, se concentró para obtener el compuesto **46–2** en forma de un sólido blanco (250 mg, 67,6%).

Etapa 2. A una mezcla del compuesto **46–2** (250 mg, 0,887 mmol), 1–hidroxipirrolidin–2, 5–diona (102 mg, 0,887 mmol) en THF seco (10 mL) se añadió DCC (183 mg, 0,887 mmol) a 0 ºC. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 h y se filtró. El filtrado se concentró al vacío para dar el producto crudo de compuesto **46–3**, que se usó para la siguiente etapa sin ulterior purificación.

Etapa 3. A la solución del compuesto **46–3** (710 mg, 1,87 mmol) en una mezcla de DME y H_2O (10 mL/10 mL) se añadió el compuesto **46–4** (327 mg, 1,87 mmol) y $NaHCO_3$ (236 mg, 2,8 mmol) a 0 ºC. Después de agitar la mezcla a temperatura ambiente durante 16 h, se extrajo con EtOAc (50 mL x 3). La capa orgánica se lavó con salmuera (50 mL), se secó sobre Na_2SO_4 y se concentró al vacío. El producto crudo se purificó por HPLC prep para obtener el producto deseado de compuesto **46–5** en forma de un sólido blanco (421 mg, 50,2%).

LCMS (ESI): m/z 449,2 [$M+H^+$].

Etapa 4. A la solución del compuesto **46–5** (410 mg, 0,915 mmol) en DCM (10 mL) se añadió EEDQ (448 mg, 1,83 mmol) y 4–aminofenil–metanol (225 g, 1,83 mmol). Después de agitar la mezcla a 0 ºC durante 1 h, el solvente se removió y el residuo se purificó con HPLC prep y separación por SFC para obtener **46–6A y 46–6B.**

46–6A

^{1}H RMN (400 MHz, MeOD–d_4) δ 7,54 (d, J = 8,4 Hz, 2 H), 7,35–7,29 (m, 7 H), 5,12 (s, 2 H), 4,55–4,49 (m, 4 H), 3,30–3,03 (m, 2 H), 2,83–2,53 (m, 2 H), 1,93–1,75 (m, 4 H). LCMS: m/z 553,9 [$M+H^+$].

46–6B

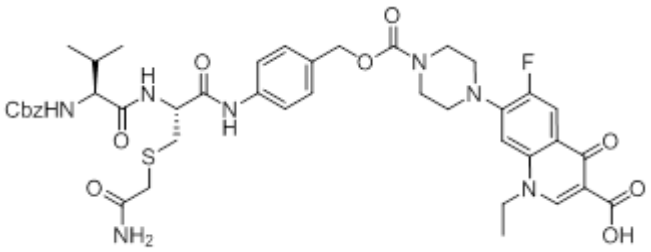
^{1}H RMN (400 MHz, DMSO–d_6) δ 10,94 (s, 1 H), 9,31(d, J = 9,2 Hz, 1 H), 8,53 (d, J = 9,6 Hz, 1 H), 8,26(d, J = 9,6 Hz, 2H), 8,00–7,96 (m, 5 H), 7,90 (d, J = 9,6 Hz, 2 H), 6,45–6,44 (m, 1 H), 5,81 (s, 1 H), 5,48–5,36 (m, 3 H), 4,77–4,69 (m, 4 H), 3,09–2,95 (m, 2 H), 2,79–2,64 (m, 2 H), 1,64–1,20 (m, 4 H). LCMS (ESI): m/z 553,9 [$M+H^+$].

Etapa 5. A la solución de **46–6A** (20 mg, 0,036 mmol) en DCM seca (2 mL) se añadió carbonato de PNP (22 mg, 0,072 mmol) y DIPEA (14 mg). La mezcla se calentó a reflujo durante 16 h. Después de remover el solvente, el residuo se disolvió en DMF (5 mL). DIPEA (9 mg, 0,072

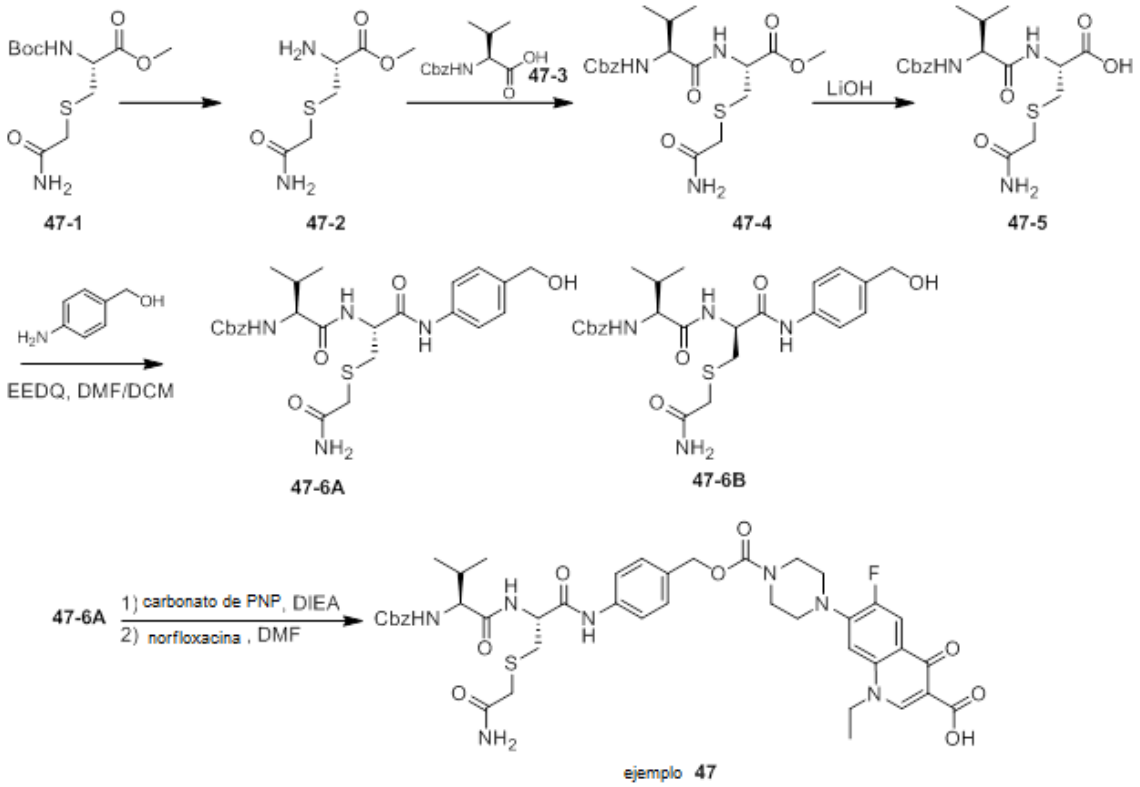
mmol) y norfloxacina (23 mg, 0,072 mmol) se añadió. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. El solvente se removió y el residuo se purificó por HPLC prep para obtener el ejemplo **46.**

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO–d_6) δ 15,33 (s, 1 H), 10,11 (s, 1 H), 8,97 (s, 1 H), 8,34 (d, J = 7,6 Hz, 1 H), 7,95 (d, J = 12,8 Hz, 1 H), 7,78 (d, J = 8,4 Hz, 1 H), 7,60 (d, J = 8,4 Hz, 2 H), 7,37–7,21 (m, 8 H), 6,00–5,98 (m, 1 H), 5,97 (s, 2 H), 5,43–5,03 (m, 4 H), 4,61–4,37 (m, 4 H), 3,61 (s, 4 H), 3,31 (s, 4 H), 3,04–2,49 (m, 4 H), 1,70–1,20 (m, 7 H). LCMS (ESI): m/z 450,3 [M/2+H$^+$].

Ejemplo 47. Ácido 7–(4–((4–((R)–3–(2–amino–2–oxoetiltio)–2–((S)–2–(benciloxicarbonilamino)–3–metilbutanamido)propanamido)benciloxi)carbonil)piperazin–1–il)–1–etil–6–fluoro–4–oxo–1,4–dihidroquinolin–3–carboxílico.



ejemplo 47



Etapa 1. La mezcla del compuesto **47–1** (120 mg, 0,411 mmol) en 4 M HCl / 1, 4–dioxano (5 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. La mezcla se concentró para dar **47–2**.

LCMS (ESI): m/z 193,0 [$M+H^+$].

Etapa 2. A una solución del compuesto **47–2** (1,3 g, 6,85 mmol) en DCM (20 mL) se añadió el compuesto **47–3** (2,065 g, 8,22 mmol), DIPEA (4,418 g, 34,25 mmol), HOBt (1,018 g, 7,535 mmol) y EDCI (1,7 g, 8,905 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. La solución se filtró y el sólido se usó en la siguiente etapa sin ulterior purificación (**47–4**).

LCMS (ESI): m/z 425,9 [$M+H^+$].

Etapa 3. A una solución del compuesto **47–4** (500 mg, 1,176 mmol) en THF / MeOH / H_2O (6 mL /2 mL / 2 mL) se añadió LiOH (85 mg, 7,05 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 h. La mezcla se concentró y el residuo se purificó por HPLC prep para dar el

compuesto **47–5**.

LCMS (ESI): m/z 412,0 [M+H^+].

Etapa 4. A una solución del compuesto **47–5** (600 mg, 1,46 mmol) en DCM / DMF (10 mL / 2 mL) se añadieron 4–amino–fenil–metanol (216 mg, 1,75 mmol) y EEDQ (541 mg, 2,19mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. La mezcla se neutralizó con H_2O. El residuo se purificó por HPLC prep y luego se purificó por SFC para dar **47–6A** y **47–6B**.

47–6A

^{1}H RMN (400 MHz, MeOD–d_4) δ 7,57 (d, J = 8,4 Hz, 2 H), 7,35–7,26 (m, 7 H), 5,06 (s, 2 H), 4,71–4,68 (m, 1 H), 4,54 (s, 2 H), 3,97 (d, J = 6,4 Hz, 2 H), 3,25 (m, 2 H), 3,13–3,08 (m, 1 H), 3,0–2,93 (m, 1 H), 2,13–2,01 (m, 1 H), 0,98–0,95 (m, 6 H).

LCMS (ESI): m/z 517,2 [M+H^+].

47–6B

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO–d_6) δ 9,93 (m, 1 H), 8,597–8,56 (m, 1 H), 7,61–7,1 (m, 11 H), 5,13–5,00 (m, 3 H), 4,63–4,59 (m, 1 H), 4,44–4,41 (m, 2 H), 3,92–3,90 (m, 2 H), 3,17–2,84 (m, 4 H), 2,00–1,96 (m, 1 H), 0,90–0,89 (m, 6 H).

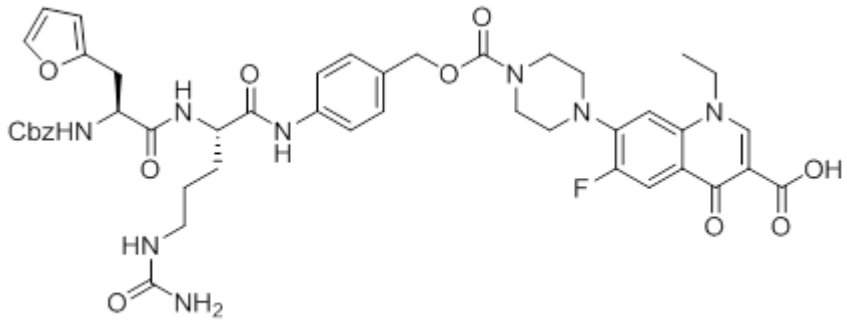
LCMS (ESI): m/z 517,1 [M+H^+].

Etapa 5. A una solución de **47–6A** (40 mg, 0,0775 mmol) en DCM (3 mL) se añadió éster bis–(4–nitro–fenílico) de ácido carbónico (20 mg, 0,093 mmol) y DIPEA (15 mg, 0,116 mmol). La mezcla se agitó a 45 ºC durante 16 h. La solución se concentró y se disolvió en DMF (3 mL) y norfloxacina (50 mg, 0,155 mmol) se añadió. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. Después de la eliminación del solvente, el residuo se purificó por pre–HPLC para dar el ejemplo **47** (5,5 mg).

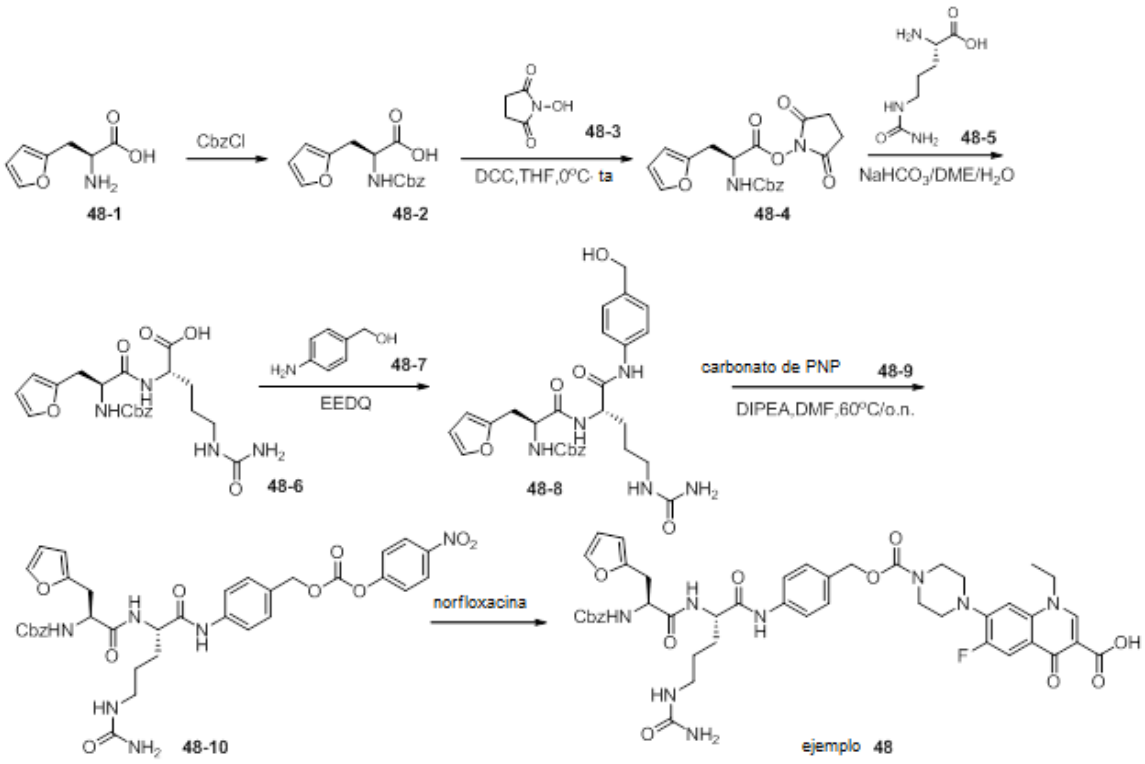
^{1}H RMN (400 MHz, DMSO–d_6) δ 10,25 (s, 1 H), 8,93–8,89 (m, 1 H), 8,40–8,34 (m, 2 H), 7,63–7,61 (m, 4 H), 7,36–7,35 (m, 8 H), 7,13 (m, 2 H), 5,06–5,03 (4 H), 4,62–4,52 (m, 3 H), 3,94–3,91 (m, 1 H), 3,36 (m, 4 H), 3,19 (m, 4 H), 3,00–2,86 (m, 3 H), 2,03–1,95 (m, 1 H), 1,38 (m, 3 H), 0,88–0,83 (m, 6 H).

LCMS (ESI): m/z 862,4 [M+H$^+$].

Ejemplo 48. Ácido 7–(4–((4–((S)–2–((S)–2–(benciloxicarbonilamino)–3–(furan–2–il)propanamido)–5–ureidopentanamido)benciloxi)carbonil)piperazin–1–il)–1–etil–6–fluoro–4–oxo–1,4–dihidroquinolin–3–carboxílico



ejemplo 48



Etapa 1. A la mezcla del compuesto **48–1** (1,0 g, 6,45 mmol) en THF y solución de $NaHCO_3$ se añadió CbzCl por medio de jeringa a 0 ºC. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 h y se purificó por HPLC prep para dar **48–2** (Rendimiento: 32 %).

Etapa 2. A una solución del compuesto **48–2** (380 mg, 1,31 mmol), compuesto **48–3** (151 mg, 1,31 mmol) en THF (25 mL) se añadió DCC (271 mg, 1,31 mmol) a 0 ºC. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 h bajo N_2. La solución se filtró y el filtrado se concentró para dar **48–4** que se usó en la siguiente etapa sin ulterior purificación (Rendimiento: 90 %).

Etapa 3. A una solución del compuesto **48–4** (540 mg, 1,38 mmol) en DME (15 ml) se añadió una solución del compuesto **48–5** (364 mg, 2,07 mmol) y $NaHCO_3$ (174 mg, 2,07 mmol) en agua (15 mL). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. La mezcla se lavó con EtOAc y se acidificó a pH 3,0 con 10% de HCl. La suspensión resultante

se extrajo con EtOAc. La capa orgánica combinada se concentró para dar el compuesto **48–6** (Rendimiento: 90 %).

LCMS: (10–80, AB, 2 min, ESI), 0,826 min, MS = 447,1 [M+1]

Etapa 4. A una solución del compuesto **48–6** (420 mg, 0,94 mmol) en DCM / MeOH (20 mL / 10 mL) se añadieron 4–amino–fenil–metanol (174 mg, 1,4 mmol) y EEDQ (495 mg, 1,88 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. La mezcla se neutralizó con H_2O. El residuo se purificó por HPLC prep y SFC para dar **48–8** (Rendimiento: 50 %).

^{1}H RMN DMSO–d_6 400 MHz, δ 9,98 (s, 1 H), 8,20 (d, J = 8 Hz, 1 H), 7,56 – 7,49 (m, 3 H), 7,37 (s, 1 H), 7,35 – 7,30 (m, 5 H), 7,24 (d, J = 8,8 Hz, 3 H), 6,33 – 6,32 (m, 1 H), 6,13 (d, J = 3,2 Hz, 1 H), 5,98 – 5,95 (t, J = 6,0 Hz, 1 H), 5,41 (s, 2 H), 5,11 – 5,08 (t, J = 5,6 Hz, 1 H), 4,99 (d, J = 13,2 Hz, 2 H), 4,44 – 4,35 (m, 3 H), 3,33 – 2,83 (m, 4 H), 1,71 – 1,58 (m, 2 H), 1,44 – 1,34 (m, 2 H).

Etapa 5. A una solución del compuesto **48–9** (30 mg, 0,06 mmol) en DMF (5 mL) se añadió una solución de carbonato de PNP (37 mg, 0,12 mmol) y DIPEA (24 mg, 0,18 mmol) a 0 ºC. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. La mezcla (**48–10**) se usó para la siguiente etapa sin ulterior purificación (Rendimiento: 95 %)

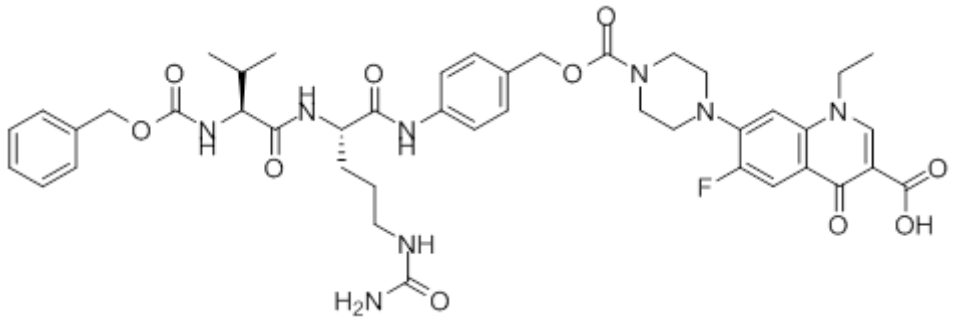
LCMS: (10–80, AB, 2 min, ESI), 1,092 min, MS = 717,1[M+1]

Etapa 6. Una mezcla de **48–10** de la última etapa y norfloxacina se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. El residuo se purificó por HPLC prep y luego se purificó por SFC para dar el ejemplo **48**. (Rendimiento: 30 %)

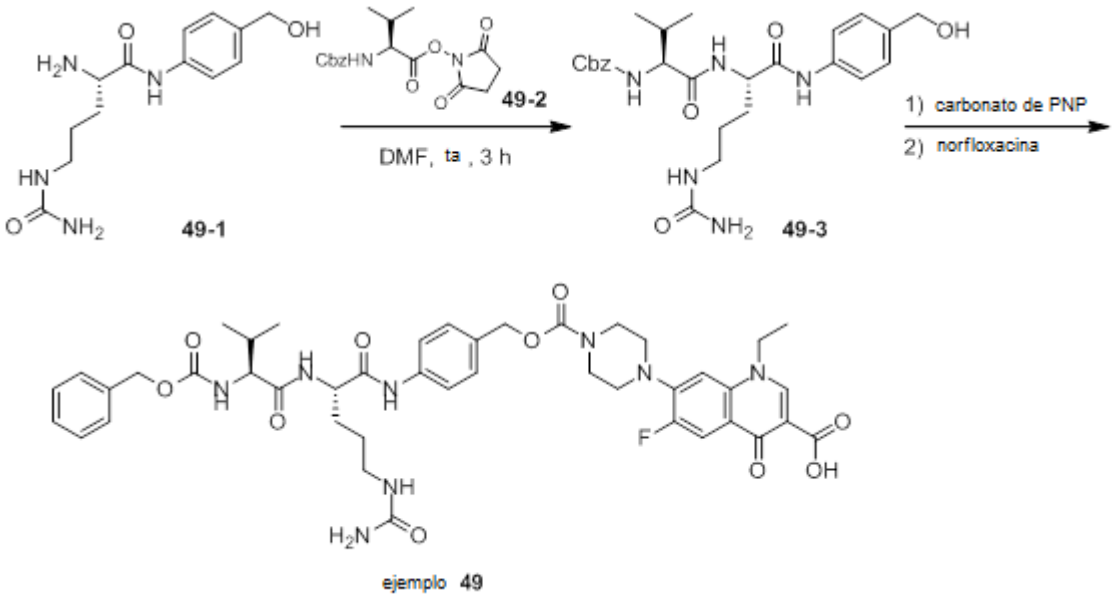
^{1}H RMN DMSO–d_6 400 MHz δ 10,08 (s, 1 H), 8,96 (s, 1 H), 8,22 (d, J = 7,2 Hz, 1 H), 7,95 (d, J = 13,2 Hz, 1 H), 7,62 (s, 1 H), 7,60 (s, 1 H), 7,53 (d, J = 8,4 Hz, 1 H), 7,50 (s, 1 H), 7,36 – 7,33 (m, 5 H), 7,30 (d, J = 7,6

Hz, 4 H), 7,21 (d, *J* = 7,2 Hz, 1 H), 6,33 – 6,32 (m, 1 H), 6,13 (d, *J* = 2,4 Hz, 1 H), 5,99 – 5,96 (m, 1 H), 5,42 (s, 2 H), 5,07 (s, 2 H), 5,01 (d, *J* = 1,6 Hz, 2 H), 4,61 – 4,56 (m, 2 H), 4,45 – 4,35 (m, 2 H), 3,62 (d, *J* = 10,4 Hz, 5 H), 3,06 – 3,01 (m, 2 H), 2,89 – 2,83 (m, 2 H), 2,55 – 2,45 (m, 2 H), 1,71 – 1,58 (m, 2 H), 1,42 (s, 5 H).

Ejemplo 49. Ácido 7–(4–((4–((S)–2–((S)–2–(benciloxicarbonilamino)–3–metilbutanamido)–5–ureidopentanamido)benciloxi)carbonil)piperazin–1–il)–1–etil–6–fluoro–4–oxo–1,4–dihidroquinolin–3–carboxílico



ejemplo 49



Etapa 1. Compuesto **49–1** (100 mg, 0,26 mmol) y compuesto **49–2** (138 mg, 0,38 mmol) se disolvieron en DMF (5 mL) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 h, se

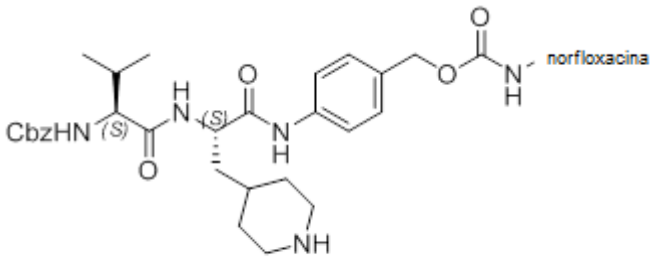
filtró y se purificó por HPLC prep para dar **49–3** (100 mg, rendimiento: 54 %).

Etapa 2. A una solución del compuesto **49–3** (60 mg, 0,142 mmol) en DMF seca (3 mL) se añadió carbonato de PNP (87 mg, 0,285 mmol) y DIPEA (56 mg, 0,427 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. Norfloxacina (91 mg, 0,285 mmol) se añadió. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante otra hora. La mezcla se concentró, se filtró y se purificó por HPLC prep (FA) para dar el ejemplo **49** (40 mg, rendimiento: 37%).

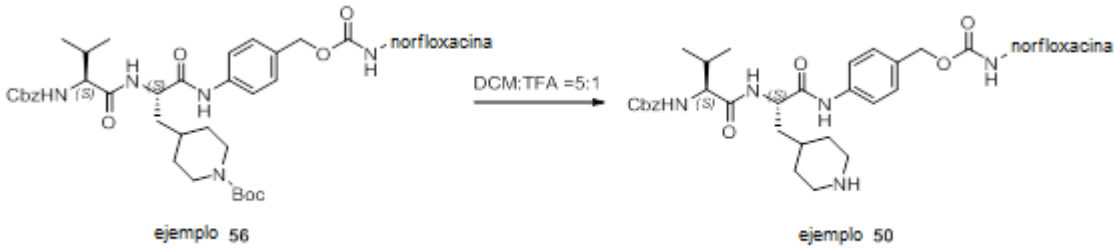
LCMS: (5–95, AB, 1,5 min, ESI), 0,866 min, MS = 859,2 [M+1]

^{1}H RMN DMSO–d_6 400 MHz, δ 15,32 – 15,28 (m, 1 H), 10,08 (s, 1 H) , 8,96 (s, 1 H), 8,11 (d, *J* = 7,2 Hz, 1 H), 7,94 (d, *J* = 13,2 Hz, 1 H), 7,61 (d, *J* = 8,4 Hz, 2 H), 7,37 – 7,30 (m, 8 H), 7,21 (d, *J* = 7,2 Hz, 1 H), 5,78 (d, *J* = 4,8 Hz, 1 H), 5,41 (s, 2 H), 5,05 (d, *J* = 9,6 Hz, 4 H), 4,58 (d, *J* = 7,2 Hz, 2 H), 4,41 (d, *J* = 5,6 Hz, 1 H), 3,93 (s, 1 H), 3,33 (s, 4 H), 3,04 – 2,93 (m, 2 H), 2,00 – 1,95 (m, 1 H), 1,68 (s, 2 H), 1,60 – 1,58 (m, 5 H), 1,42 (d, *J* = 7,2 Hz, 6 H).

Ejemplo 50. Ácido 7–(4–((4–((S)–2–((S)–2–(benciloxicarbonilamino)–3–metilbutanamido)–3–(piperidin–4–il)propanamido)benciloxi)carbonil)piperazin–1–il)–1–etil–6–fluoro–4–oxo–1,4–dihidroquinolin–3–carboxílico.



ejemplo **50**



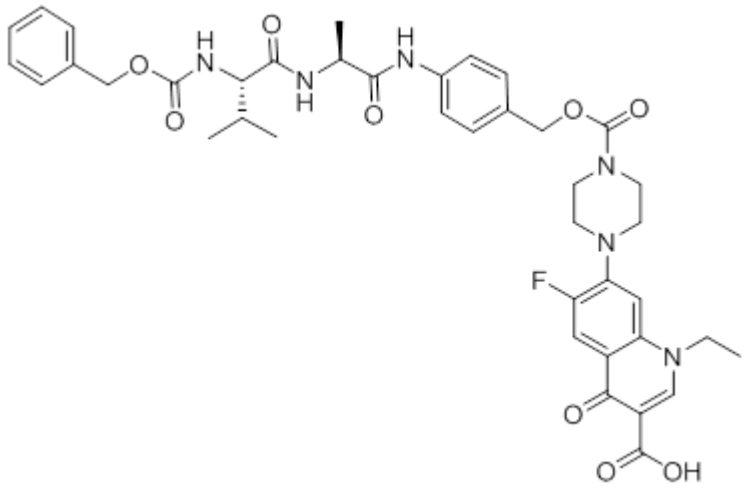
ejemplo 56 ejemplo 50

Etapa 1. Una mezcla de DCM/TFA (5:1,v:v) (1 mL) se añadió a **ejemplo 56** (50 mg, 52 mmol) a 0 ºC. La mezcla se dejó bajo agitación a 0 ºC durante 1 h. LCMS mostró 80% del producto deseado y 20% de STM. La mezcla se purificó por HPLC prep (FA), para dar el ejemplo **50** (31,2 mg, 70%).

LCMS: (5–95, AB, 1,5 min, ESI), 0,811 min, MS = 856,2 [M+1], 428,8 [1/2M+1]

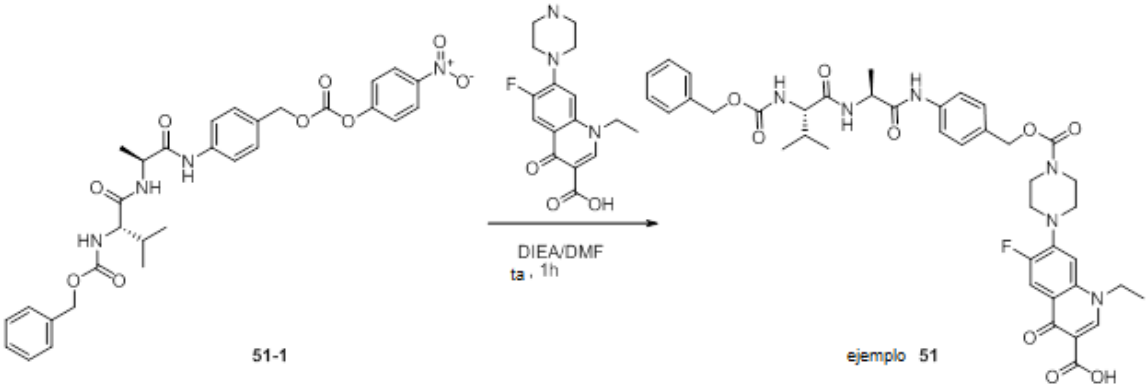
^{1}H RMN Metanol–d_4 400 MHz, δ 8,81 (s, 1H), 8,54(s, 1H), 7,98 – 7,95 (m, 1H), 7,59 – 7,57 (m, 2H), 7,36 – 7,32 (m, 7H), 7,2 – 7,1(m, 1H), 5,12 – 5,09 (m, 4H), 4,7 – 4,4 (m, 3H), 3,88 – 3,86 (m, 1H), 3,70 (m, 4H), 3,3(m, 4H), 3,0 – 2,8 (m, 2H), 2,1 – 1,7 (m, 6H), 1,6 – 1,3 (m, 5H), 0,98 – 0,96 (m, 6H).

Ejemplo 51: Ácido 7–(4–{4–[(S)–2–((S)–2–Benziloxicarbonilamino–3–metil–butirilamino)–propionilamino]–benciloxicarbonil}–piperazin–1–il)–1–etil–6–fluoro–4–oxo–1,4–dihidro–quinolin–3–carboxílico



ejemplo 51

El Ejemplo 51 se preparó usando el procedimiento como en el Ejemplo **42**.

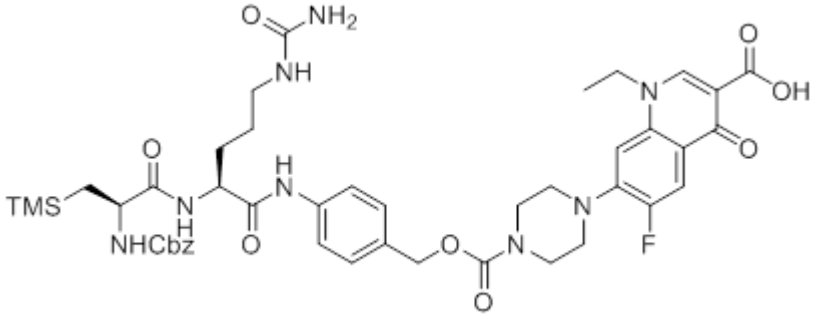


Etapa 1. A la suspensión de ácido 1–etil–6–fluoro–4–oxo–7–(piperazin–1–il)–1,4–dihidroquinolin–3–carboxílico (129 mg, 0,40 mmol) en 2 ml de DMF, se añadió DIEA (0,30 ml, 1,69 mmol), luego se añadió 51–1 (120 mg, 0,34 mmol) as una porción, lentamente se volvió una solución amarilla hasta completar la reacción. La mezcla de reacción se vertió en agua helada, se extrajo con DCM. La capa orgánica se lavó con NH4Cl sat., salmuera, se secó sobre MgSO4, se concentró, se purificó por Pre–HPLC para obtener 51 (125 mg, 48%).

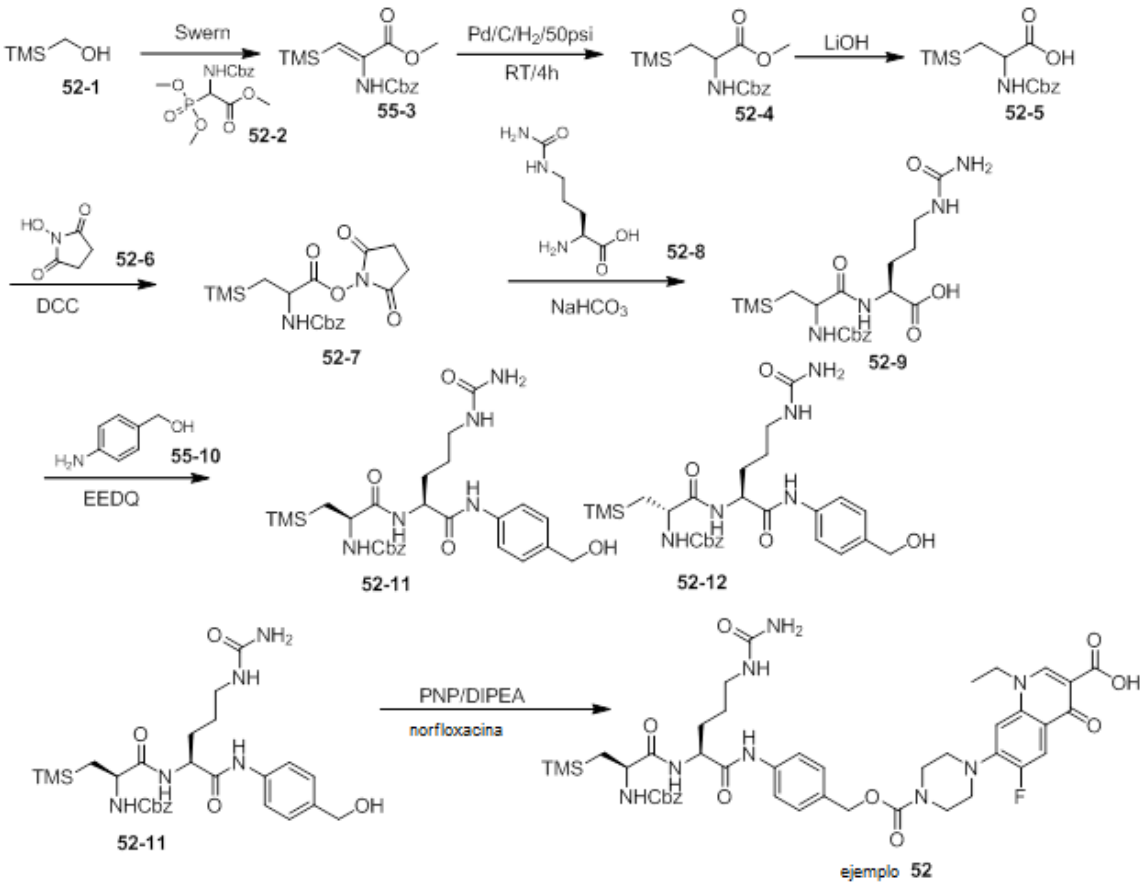
LCMS (ESI): m/z 773,3 [M+H^+].

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO–d_6) δ 15,29 (s, 1H), 9,98 (s, 1H), 8,95 (s, 1H), 8,14 (d, *J* = 6,8 Hz, 1H), 7,95 (d, *J* = 13,1 Hz, 1H), 7,59 (d, *J* = 8,3 Hz, 2H), 7,47 – 7,12 (m, 8H), 5,05 (d, *J* = 9,9 Hz, 4H), 4,70 – 4,48 (m, 2H), 4,42 (t, *J* = 7,0 Hz, 1H), 3,91 (t, *J* = 7,8 Hz, 1H), 3,61 (s, 4H), 1,98 (d, *J* = 6,8 Hz, 1H), 1,53 – 1,14 (m, 6H), 0,86 (dd, *J* = 17,7, 6,7 Hz, 6H).

Ejemplo 52. Ácido 7–(4–((4–((S)–2–((R)–2–(benciloxicarbonilamino)–3–(trimetilsilil)propanamido)–5–ureidopentanamido)benciloxi)carbonil)piperazin–1–il)–1–etil–6–fluoro–4–oxo–1,4–dihidroquinolin–3–carboxílico



ejemplo 52



Etapa 1. A una solución agitada de **52–1** (3,31 g, 10,0 mmol) en DCM (10 mL) a 10 ºC se añadió DBU (1,67 g, 11,0 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. A una solución agitada de $(COCl)_2$ (1,83 g, 14,4 mmol) en DCM (30 mL) a –78 ºC se añadió DMSO (1,28 g, 16,32 mmol). Después de 15 min, una mezcla del compuesto **52–1** (1,0 g, 9,60 mmol) con DBU se añadió durante 5 min. Después de 30 min, Et_3N (3,59 g, 35,52 mmol) se añadió y después de 30 min, el iluro **52–2** se añadió a –78 ºC. Después de 30 min, la mezcla de reacción se calentó hasta temperatura ambiente y se agitó a temperatura ambiente durante 6 h. La mezcla se neutralizó con solución 1 M de HCl. Después de la eliminación del solvente, el residuo se extrajo con EtOAc (60 mL x 3). La capa orgánica se lavó con salmuera (60 mL), se secó con Na_2SO_4 y se concentró. El residuo se purificó por HPLC prep para dar el compuesto **52–3** (940 mg, 32%).

^{1}H RMN: 400 MHz, $CDCl_3$, δ 7,37 – 7,30 (m, 5 H), 6,58 (s, 1 H), 5,15 (s, 2 H), 3,76 (s, 3 H), 0,16 – 0,13 (s, 9 H). LCMS (ESI): m/z 308,1 [M+H$^+$].

Etapa 2. Pd/C húmedo (0,1 g) se añadió a la solución del compuesto **52–3** (0,5 g, 1,6 mmol) en MeOH (50 mL) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó bajo H_2 (50 psi) a temperatura ambiente durante 4 h. La mezcla de reacción se filtró y el filtrado se concentró para obtener el compuesto **52–4**, que se usó directamente en la siguiente etapa sin ulterior purificación.

^{1}H RMN: $CDCl_3$, 400 MHz, δ 7,36 – 7,30 (m, 5 H), 5,10 (s, 2 H), 4,42 – 4,36 (m, 1 H), 3,72 (s, 3 H), 1,17 – 1,11 (dd, *J* = 6,4, 14,8 Hz, 1 H), 0,99 – 0,93 (dd, *J* = 9,2, 14,8 Hz, 1 H), 0,04 (s, 9 H). LCMS (ESI): m/z 310,1 [M+H$^+$].

Etapa 3. A una solución del compuesto **52–4** (220 mg, 0,7 mmol) en THF/H_2O (5 mL/5 mL) se añadió LiOH (44 mg, 1 mmol) a 0 ºC. La mezcla de reacción se calentó hasta temperatura ambiente y se agitó durante 20 h. Después de la eliminación del solvente, el residuo se extrajo con EtOAc (20 mL) y la capa acuosa se acidificó con 1 M HCl a pH = 2 y se extrajo con EtOAc (30 mL x 2). La capa orgánica se lavó con salmuera (20 mL x 2), se secó sobre sulfato de sodio y se concentró. El residuo se purificó por HPLC prep para obtener el compuesto **52–5**.

LCMS (ESI): m/z 280,1 [M+H$^+$].

Etapa 4. A una solución del compuesto **52–5** (145 mg, 0,49 mmol) y **52–6** (57 mg, 0,495 mmol) en THF seco (20 mL) se añadió una solución de DCC (102,3 mg, 0,495 mmol) en THF seco (10 mL) en porciones a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó a 0–5 °C durante 3 h. Después de la eliminación del solvente, el residuo se disolvió en DCM (20 mL). The precipitate se filtró y el filtrado se concentró para obtener el producto crudo **52–7** en forma de un sólido blanco, que se usó en la siguiente

etapa sin ulterior purificación.

Etapa 5. A la solución del compuesto **52–7** (obtained above, 0,49 mmol) en DME (15 mL) y H_2O (15 mL) se añadió el compuesto **52–8** (129,5 mg, 0,74 mmol) y $NaHCO_3$ (61,8 mg, 0,74 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 h bajo N_2. Después de la eliminación del solvente, el residuo (**52–9**) se usó en la siguiente etapa sin ulterior purificación.

^{1}H RMN: DMSO–d_6, 400 MHz, δ 7,97 (dd, J = 7,6, 29,2 Hz, 1 H), 7,35 – 7,29 (m, 5 H), 5,93 – 5,92 (m, 1 H), 5,36 (s, 2 H), 5,07 – 4,98 (m, 2 H), 4,15 – 4,07 (m, 2 H), 2,95 – 2,90 (m, 2 H), 1,75 – 1,64 (m, 1 H), 1,58 – 1,49 (m, 1 H), 0,98 – 0,87 (m, 2 H), –0,01 (s, 9 H).

Etapa 6. A la solución del compuesto **52–9** (160 mg, 0,35 mmol) y (4–aminofil)metanol (65,2 mg, 0,53 mmol) en DCM seca (10 mL) se añadió EEDQ (175 mg, 0,71 mmol) a 0 ^{o}C bajo N_2. La mezcla de reacción se calentó hasta temperatura ambiente y se agitó durante 1 h bajo N_2. Después de la eliminación del solvente, el residuo se purificó por HPLC prep y SFC para dar **52–10 y 52–11.**

LCMS: (10–80, AB, 2 min, ESI), 1,151 min, MS = 558,1[M+1]

^{1}H RMN Metanol–d_4, 400 MHz, δ 9,99 (s, 1 H), 7,92 (d, J = 8,0 Hz, 1 H), 7,55 (d, J = 8,8 Hz, 1 H), 7,45 – 7,24 (m, 8 H), 6,01 – 5,98 (m, 1 H), 5,41 (s, 2 H), 5,11 (t, J = 5,2 Hz, 1 H), 5,05 (d, J = 4,8 Hz, 2 H), 4,44 (d, J = 5,6 Hz, 3 H), 4,15 – 4,08 (m, 1 H), 3,08 – 2,87 (m, 2 H), 1,72 – 1,41 (m, 4 H), 1,02 – 0,90 (m, 2 H), 0 (s, 9 H).

LCMS: (10–80, AB, 2 min, ESI), 1,130 min, MS = 558,1[M+1]

^{1}H RMN Metanol–d_4, 400 MHz, δ 9,89 (s, 1 H), 8,16 (d, J = 8,0 Hz, 1 H), 7,59 – 7,57 (d, J = 8,8 Hz, 2 H), 7,45 – 7,24 (m, 8 H), 6,01 – 5,95 (m, 1 H), 5,41 (s, 2 H), 5,11 (t, J = 5,6 Hz, 1 H), 5,03 (d, J = 11,2 Hz, 2 H), 4,43 (d, J = 5,6 Hz, 2 H), 4,42 – 4,38 (m, 1 H), 4,20 – 4,12 (m, 1 H), 3,05 –

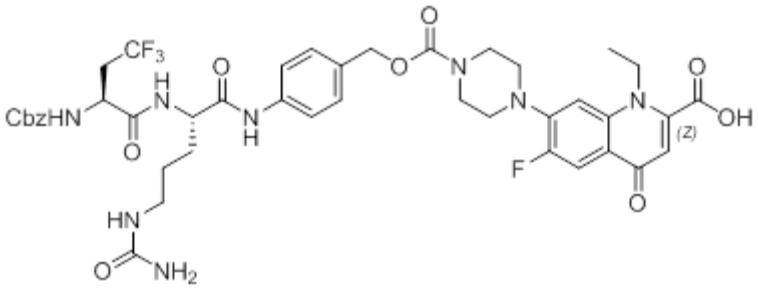
2,87 (m, 2 H), 1,72 – 1,41 (m, 4 H), 0,95 (d, *J* = 8,0 Hz, 2 H), 0 (s, 9 H).

Etapa 7. A la solución **52–11** (30 mg, 0,066 mmol) en DCM seca (5 mL), se añadió carbonato de PNP (40,4 mg, 0,13 mmol) y DIPEA (0,5 mL). La mezcla se calentó a reflujo durante 20 h. Después de la eliminación del solvente, el residuo se disolvió en DMF (3 mL). DIPEA (0,5 mL) y norfloxacina (63,5 mg, 0,2 mmol) se añadieron. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. La mezcla de reacción se purificó por HPLC prep para dar el ejemplo **52**.

LCMS: (10–80, AB, 2 min, ESI), 1,269 min, MS = 903,0 [M+1]

^{1}H RMN DMSO–d_6, 400 MHz, δ 10,00 (s, 1 H), 8,97 (s, 1 H), 8,18 (d, *J* = 10,4 Hz, 1 H), 7,94 (d, *J* = 13,2 Hz, 1 H), 7,63 (d, *J* = 8,4 Hz, 2 H), 7,40 (d, *J* = 8,4 Hz, 1 H), 7,35 – 7,30 (m, 7 H), 7,21 (d, *J* = 7,6 Hz, 1 H), 5,96 (t, *J* = 6,4 Hz, 1 H), 5,41 (s, 2 H), 5,06 (s, 2 H), 5,02 (d, *J* = 9,6 Hz, 2 H), 4,61 – 4,55 (m, 2 H), 4,41 – 4,36 (m, 1 H), 4,21 – 4,12 (m, 1 H), 3,61 (s, 4 H), 3,33 (s, 4 H), 3,03 – 2,90 (m, 2 H), 1,71 – 1,68 (m, 1 H), 1,58 – 1,53 (m, 1 H), 1,41 (t, *J* = 7,2 Hz, 4 H), 1,42 – 1,31 (m, 1 H), 0,93 (d, *J* = 6,8 Hz, 2 H), –0,01 (s, 9 H).

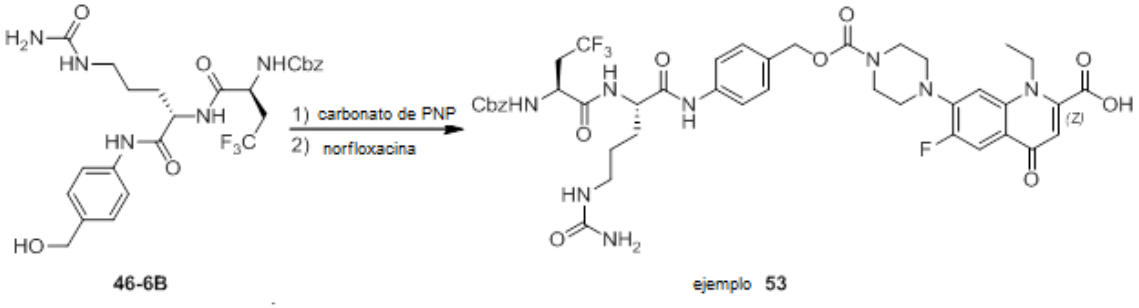
Ejemplo 53. Ácido 7–(4–((4–((S)–2–((S)–2–(benciloxicarbonilamino)–4,4,4–trifluorobutanamido)–5–ureidopentanamido)benciloxi)carbonil)piperazin–1–il)–1–etil–6–fluoro–4–oxo–1,4–dihidroquinolin–2–carboxílico



ejemplo 53

El Ejemplo 53 se preparó usando el procedimiento como en el Ejemplo

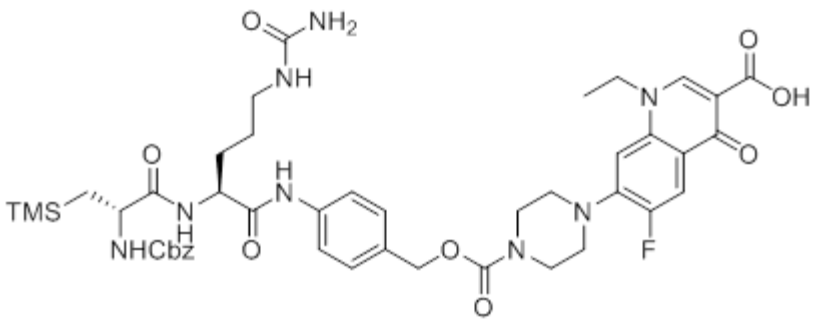
46, con el intermediario de la síntesis del Ejemplo **46**.



Etapa 1. A la solución de **46–6B** (23 mg, 0,041 mmol) en DCM seca (2 mL) se añadió carbonato de PNP (25 mg, 0,082 mmol) y de DIPEA (16 mg). La mezcla se calentó a reflujo durante 16 h. Después de remover el solvente, el residuo se disolvió en de DMF (5 mL). DIPEA (16 mg, 0,123 mmol) y norfloxacina (26 mg, 0,082 mmol) se añadió y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. El solvente se removió y el residuo se purificó por HPLC prep para obtener el ejemplo **53.**

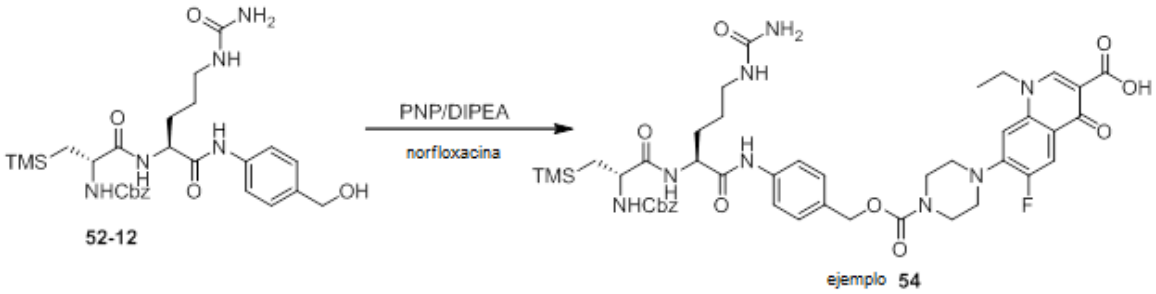
^{1}H RMN (400 MHz, DMSO–d_6) δ 15,33 (s, 1 H), 10,03 (s, 1 H), 8,97 (s, 1 H), 8,51 (d, J = 8,0 Hz, 1 H), 7,45 (d, J = 13,2 Hz, 1 H), 7,79(d, J = 8,4 Hz, 1 H), 7,63 (d, J = 8,4 Hz, 2 H), 7,36–7,21(m, 8 H), 5,98–5,96 (m, 1 H), 5,41 (s, 2 H), 5,07–5,01 (m, 4 H), 4,59–4,42 (m, 4 H), 3,61(s, 4 H), 3,31(s, 4 H), 3,17–2,50 (m, 4 H), 1,71–1,60 (m, 7 H). LCMS (ESI): m/z 898,8 [M+H$^+$], 450,3 [M/2+H$^+$].

Ejemplo 54. Ácido 7–(4–((4–((S)–2–((S)–2–(benciloxicarbonilamino)–3–(trimetilsilil)propanamido)–5–ureidopentanamido)benciloxi)carbonil)piperazin–1–il)–1–etil–6–fluoro–4–oxo–1,4–dihidroquinolin–3–carboxílico



ejemplo 54

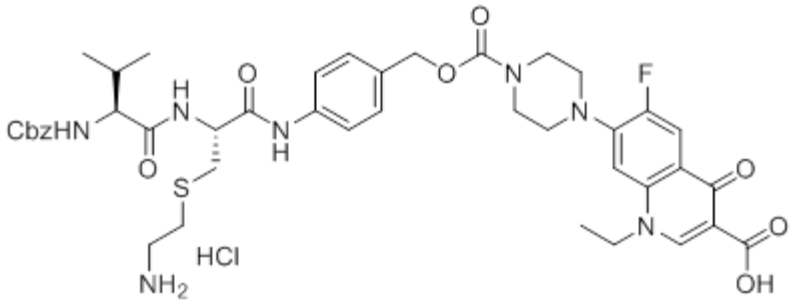
El Ejemplo 54 se preparó usando el procedimiento como en el Ejemplo **52**, con el intermediario de la síntesis del Ejemplo **52**.



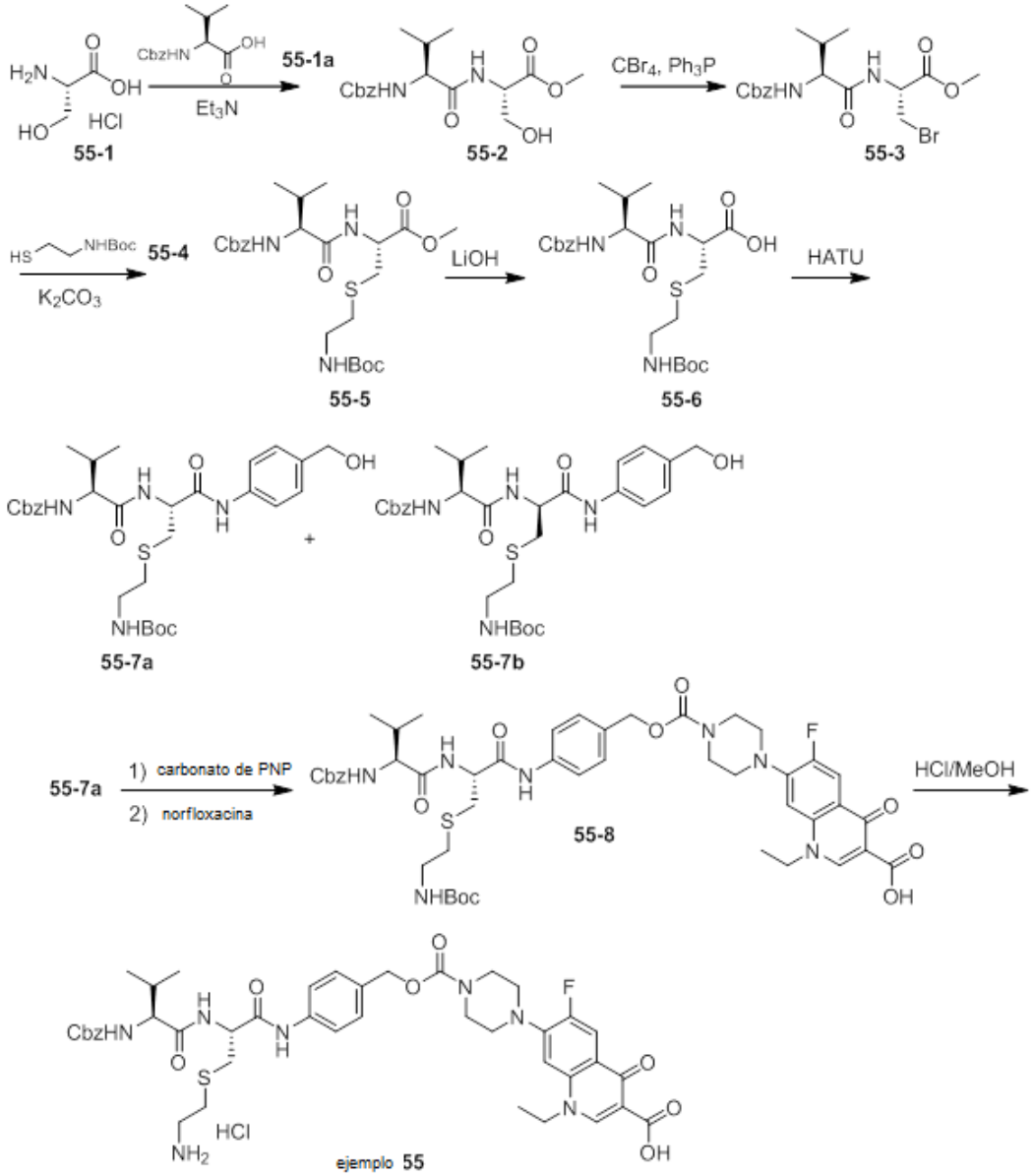
LCMS: (10–80, AB, 2 min, ESI), 1,274 min, MS = 903,0 [M+1]

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO–d_6) δ 10,10 (s, 1 H), 8,97 (s, 1 H), 7,95 (d, J = 13,2 Hz, 2 H), 7,61 (d, J = 8,4 Hz, 2 H), 7,40 (d, J = 8,4 Hz, 1 H), 7,37 – 7,29 (m, 7 H), 7,21 (d, J = 10,8 Hz, 1 H), 5,98 (t, J = 6,4 Hz, 1 H), 5,05 (d, J = 8,8 Hz, 2 H), 5,01 (d, J = 13,2 Hz, 2 H), 4,62 – 4,56 (m, 2 H), 4,43 – 4,40 (m, 1 H), 4,14 – 4,08 (m, 1 H), 3,61 (s, 4 H), 3,33 (s, 4 H), 3,05 – 2,91 (m, 2 H), 1,76 – 1,52 (m, 2 H), 1,48 – 1,39 (m, 5 H), 1,01 – 0,89 (m, 2 H), –0,01 (s, 9 H).

Ejemplo 55. Ácido 7–(4–((4–((R)–3–(2–aminoetiltio)–2–((S)–2–(benciloxicarbonilamino)–3–metilbutanamido) propanamido)benciloxi)carbonil)piperazin–1–il)–1–etil–6–fluoro–4–oxo–1,4–dihidroquinolin–3–carboxílico



ejemplo 55



Etapa 1. A una mezcla del compuesto **55–1** (1,55 g, 10 mmol), **55–1a** (2,51 g, 10 mmol) y Et_3N (3,03 g, 30 mmol) en DMF (20 mL) se añadió

HATU (3,8 g, 10 mmol). Después de agitar la mezcla a temperatura ambiente durante 3 h, se extrajo con EtOAc (60 mL x 3). La capa orgánica se lavó con salmuera (60 mL x 3), se secó sobre $NaSO_4$, se concentró al vacío y se purificó por columna (20% de EtOAc en hexano) para dar el compuesto **55–2** (3,21 g, 91,2%).

LCMS (ESI): m/z 353,1 [$M+H^+$].

Etapa 2. Trifenilfosfina (2,87 g, 10,94 mmol) en DCM seca (60 mL) se añadió en porciones durante 10–15 min a una solución bien agitada de compuesto **55–2** (3,21 g, 9,12 mmol) y tetrabromometano (4,54 g, 13,68 mmol) en DCM seca a 0 ºC. Después de agitar la mezcla a temperatura ambiente durante 9–10 h, se trató con pentano (200 mL) y el precipitado resultante se removió por filtración y se lavó varias veces con pentano. La solución combinada de pentano se lavó con 5% de $NaHCO_3$, agua, salmuera y se secó sobre Na_2SO_4. El solvente se evaporó y el aceite se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (hexano: EtOAc = 4:1) para dar el compuesto **55–3** (3,43 g, 90,7%).

LCMS (ESI): m/z 414,9 [$M+H^+$].

Etapa 3. A la solución del compuesto **55–3** (3,43 g, 8,3 mmol) en DMF (5 mL) se añadió el compuesto **55–4** (1,12 g, 4,0 mmol) y K_2CO_3 (1,15 g, 8,3 mmol). Después de agitar la mezcla a temperatura ambiente durante 16 h, se extrajo con EtOAc (100 mL x 2). La capa orgánica se lavó con salmuera (60 mL), se secó sobre Na_2SO_4 y se concentró para dar el producto crudo de compuesto **55–5** (3,67 g, 86,4%).

LCMS (ESI): m/z 412,0 [$M–BOC+H^+$], 534,1 [$M+Na^+$].

Etapa 4. A una solución del compuesto **55–5** (3,67 g, 6,22 mmol) en THF/H_2O (30 mL/10 mL) se añadió $LiOH.H_2O$ (2,6 g, 62,2 mmol). Después de agitar la mezcla a temperatura ambiente durante 16 h, el solvente se removió y agua (30 mL) se añadió. Se extrajo con EtOAc

(80 mL x 3). La capa orgánica se lavó con salmuera (60 mL), se secó sobre Na_2SO_4, se concentró al vacío para dar el compuesto **55–6**, que se usó para la siguiente etapa sin ulterior purificación (3 g, 96,9%).

LCMS (ESI): m/z 398,2 [M–BOC+H^+].

Etapa 5. A una solución del compuesto **55–6** (500 mg, 1,0 mmol), (4–amino–fenil)–metanol (246 mg, 2 mmol) y DIPEA (258 mg, 2 mmol) en DCM (10 mL) se añadió HATU (380 mg, 1,0 mmol) a 0 ºC. Después de agitar la mezcla a 0 ºC durante 2 h, el solvente se removió y el residuo se purificó con HPLC prep y separación por SFC para obtener **55–7a y 55–7b**.

55–7a

^{1}H RMN (400 MHz, MeOD) *δ* 7,60 (d, *J* = 8,8 Hz, 2 H), 7,31–7,24 (m, 7 H), 5,06 (s, 2 H), 4,67–4,64 (m, 1 H), 4,53 (s, 2 H), 3,88 (d, *J* = 7,6 Hz, 1 H), 3,28–3,11 (m, 3 H), 2,89–2,84 (m, 1 H), 2,67–2,57 (m, 2 H), 2,08–1,99 (m, 1 H), 1,41 (s, 9 H), 1,01–1,99 (m, 6 H). LCMS (ESI): m/z 503,0 [M+H^+–BOC].

55–7b

^{1}H RMN (400 MHz, MeOD) *δ* 7,56 (d, *J* = 8,8 Hz, 2 H), 7,34–7,25 (m, 7 H), 5,08 (s, 2 H), 4,66–4,63 (m, 1 H), 4,54 (s, 2 H), 3,96 (d, *J* = 7,6 Hz, 1 H), 3,22–3,04 (m, 3 H), 2,90–2,80 (m, 1 H), 2,69–2,57 (m, 2 H), 2,13–2,03 (m, 1 H), 1,40 (s, 9 H), 0,98–0,94 (m, 6 H). LCMS (ESI): m/z 502,9 [M+H^+–BOC], 624,5 [M+Na^+].

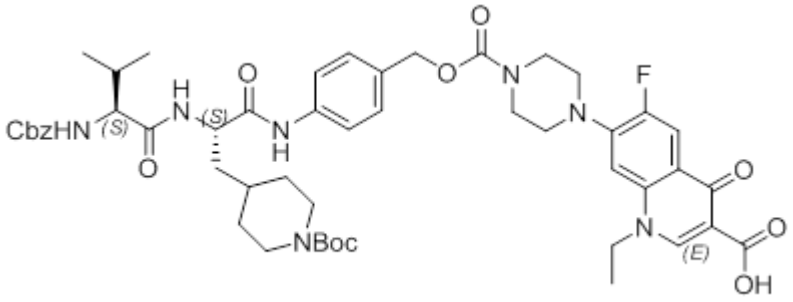
Etapa 6. A una solución de **55–7a** (28 mg, 0,047 mmol) en DCM seca (2 mL) se añadió carbonato de PNP (30 mg, 0,094 mmol) y DIPEA (0,2 mL). La mezcla se calentó a reflujo durante 16 h. Después de remover el solvente, el residuo se disolvió en DMF (2 mL). DIPEA (0,2 mL) y norfloxacina (29 mg, 0,094 mmol) se añadió. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. El solvente se removió y el residuo

se purificó por HPLC prep para dar el compuesto **55–8** (38 mg, 84,4%). LCMS (ESI): m/z 948,4 [M+H$^+$].

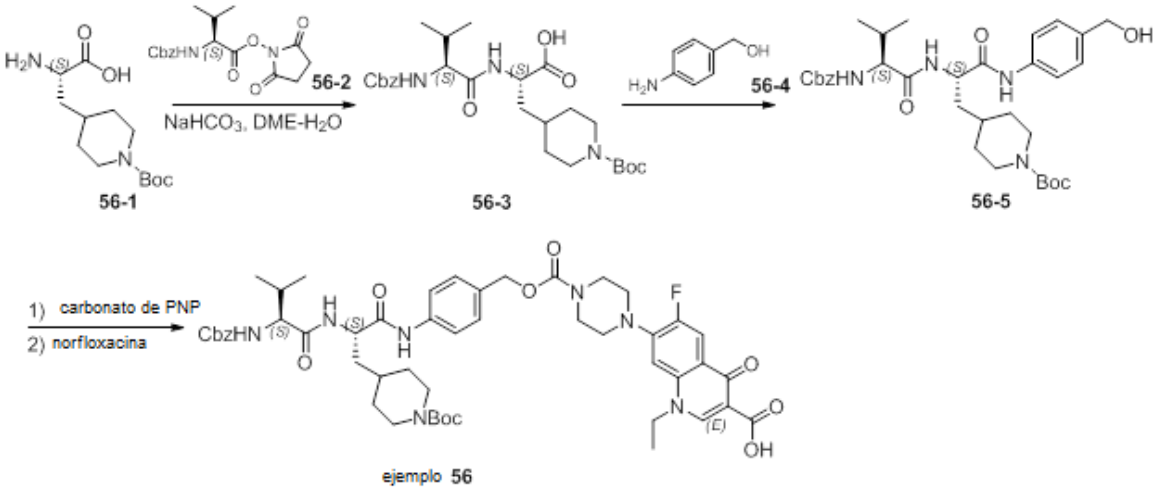
Etapa 7. A una solución del compuesto **55–8** (38 mg, 0,04 mmol) en DCM seca (10 mL) se añadió HCl/CH_3OH (4 mol/L) a 0 ºC durante 10 min. Después de agitar la mezcla a temperatura ambiente durante 1 h, el solvente se removió y el residuo se purificó por HPLC prep para dar el ejemplo **55** en forma de un sólido blanco.

^{1}H RMN (400 MHz, MeOD) δ 8,86 (s, 1 H), 7,97 (d, J = 13,2 Hz, 1 H), 7,66 (d, J = 8,4 Hz, 2 H), 7,34 (d, J = 8,8 Hz, 2 H), 7,27–7,22 (m, 5 H), 7,14 (d, J = 7,2 Hz, 1 H), 5,08 (d, J = 21,6 Hz, 4 H), 4,73–4,51 (m, 1 H), 4,50–4,48 (m, 2 H), 3,81 (d, J = 8,0 Hz, 1 H), 3,69 (s, 4 H), 3,34 (s, 4 H), 3,25–2,91 (m, 3 H), 2,90–2,79 (m, 3 H), 2,09–2,00 (m, 1 H), 1,55–1,45 (m, 3 H), 1,09–1,00 (m, 6 H). LCMS (ESI): m/z 848,1 [M+H$^+$].

Ejemplo 56. Ácido 7–(4–((4–((S)–2–((S)–2–(benciloxicarbonilamino)–3–metilbutanamido)–3–(1–(ter–butoxicarbonil)piperidin–4–il)propanamido)benciloxi)carbonil)piperazin–1–il)–1–etil–6–fluoro–4–oxo–1,4–dihidroquinolin–3–carboxílico



ejemplo 56



Etapa 1. A una solución del compuesto **56–2** (150 mg, 0,551 mmol) en THF / H_2O (10 mL / 2 mL) se añadieron $NaHCO_3$ (138 mg, 1,653 mmol) y compuesto **56–1** (287 mg, 0,827 mmol). Después de agitar la mezcla a 25 ºC durante la noche, se acidificó a pH = 6 con HCl (1 N), se extrajo con EtOAc (50 mL x 3). Las capas orgánicas se secaron y se concentraron para dar **56–3**, que se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (PE / EtOAc =10 / 1 a 1 / 10).

LCMS: (0–60, AB, 2 min, ESI), 1,309 min, MS = 406,3 [M+1–Boc$^+$]

Etapa 2. A una solución del compuesto **56–3** (1,2 g, 2,376 mmol) en DCM (20 mL) se añadieron compuesto **56–4** (439 mg, 3,56 mmol) y HATU (1,7 g, 5,064 mmol). La mezcla se agitó a 25 ºC durante la noche. La solución se neutralizó con H_2O y se extrajo con DCM (50 mL x 3). Las capas orgánicas se secaron y se concentraron y se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (PE / EtOAc = 10 / 1 a 1 / 10) para dar **56–5**.

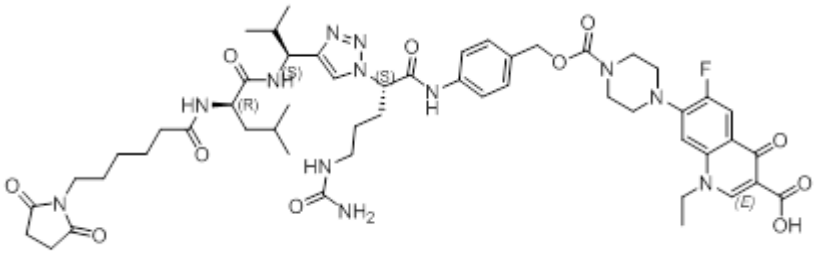
LCMS: (0–60, AB, 2 min, ESI), 1,413 min, MS = 511,2 [M+1–Boc$^+$]

Etapa 3. Al compuesto **56–5** (100 mg, 0,16 mmol) en DMF seca (2 mL) a 0 ºC, se añadió DIPEA (0,5 mL, 3 mmol) y carbonato de PNP (200 mg, 0,66 mmol, 4,1 eq) bajo N_2. La mezcla se agitó a temperatura ambiente

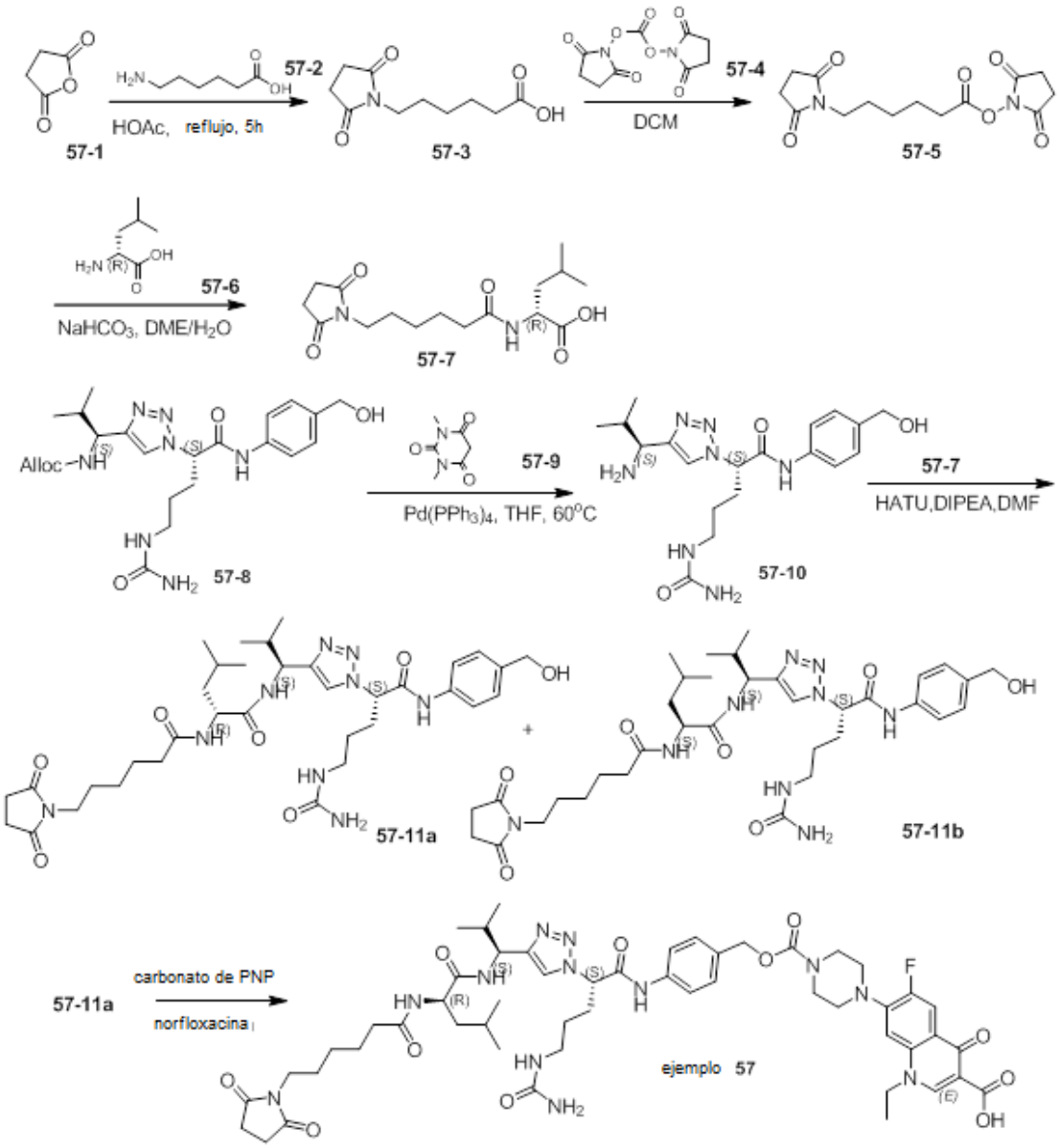
durante la noche. A la mezcla se añadió norfloxacina (102 mg, 0,32 mmol, 2eq) y se agitó durante 1 h. La mezcla se purificó por HPLC prep (FA), para dar el ejemplo **56** (60 mg, 40%).

LCMS: (5–95, AB, 1,5 min, ESI), 1,064 min, MS = 956,3[M+1]

^{1}H RMN: MeOH–d_4 400 MHz, δ 8,84 (s, 1H), 7,97 – 7,93 (dd, J = 16, 1H), 7,59 – 7,57 (m, 2H), 7,35 – 7,27 (m, 7H), 7,20 – 7,10 (m, 1H), 5,11 – 5,07 (m, 4H), 4,6 – 4,5 (m, 1H), 4,55 – 4,45 (m, 2H), 4,10 – 3,90 (m, 3H), 3,75 – 3,65 (m, 4H), 3,3 (m, 4H), 2,80 – 2,50 (m, 2H), 2,1 – 2,0 (m, 1H), 1,8 – 1,6 (m, 5H), 1,6 – 1,5 (m, 3H), 1,43 (s, 9H), 1,2 – 1,0 (m, 2H), 0,96 – 0,94 (d, J = 6,8 Hz, 6H).



ejemplo 57



Etapa 1. Una solución del compuesto **57–2** (10 g, 100 mmol) en ácido acético glacial (30 mL) se añadió a una solución del compuesto **57– 1** (13,1 g, 100 mmol) en ácido acético glacial (150 mL) bajo N_2 durante un período de 15 min. Después de agitar a temperatura ambiente durante 1 h, la mezcla de reacción heterogénea blanca se calentó a reflujo durante 5 h. La mayor parte del ácido acético se removió al vacío. El residuo se dividió entre agua y DCM. DCM se removió y el aceite marrón se disolvió en una pequeña cantidad de EtOAc y se vertió en PE. El precipitado blanco se recolectó por filtración para dar **57–3** (12 g, rendimiento: 56

%).

^{1}H RMN DMSO–d_6 400 MHz, δ 11,98 (s, 1 H), 3,34 – 3,31 (m, 2 H), 2,61 (m, 4 H), 2,19 – 2,16 (m, 2 H), 1,50 – 1,43 (m, 4 H), 1,23 (d, J = 7,2 Hz, 2 H).

Etapa 2. A una solución del compuesto **57–3** (12 g, 56,3 mmol) y exceso de trietilamina (25 mL, 168,9 mmol) en DCM (100 mL) se añadió exceso de compuesto **57–4** (36 g, 140,8 mmol) durante 15 min. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 6 h bajo N_2. La mezcla se volvió homogénea y se agitó a 40 ºC durante 3 h. Se concentró, se lavó con agua y salmuera, se secó sobre $MgSO_4$ anhidro. Se concentró y se purificó por cromatografía en columna (EtOAc), para dar **57–5** (4 g, rendimiento: 23 %).

^{1}H RMN MeOD–d_4 400 MHz, δ 3,54 – 3,50 (m, 2 H), 2,86 (d, J = 3,2 Hz, 4 H), 2,71 (d, J = 2,8 Hz, 4 H), 2,66 – 2,63 (m, 2 H), 1,79 – 1,75 (m, 2 H), 1,65 – 1,59 (m, 2 H), 1,45 – 1,41 (m, 2 H).

Etapa 3. A una solución del compuesto **57–6** (375 mg, 2,86 mmol) en DME (10 mL) se añadió una solución del compuesto **57–5** (800 mg, 2,6 mmol) y $NaHCO_3$ (656 mg, 7,8 mmol) en agua (10 mL). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. La mezcla se lavó con EtOAc y se acidificó a pH = 3 con 10% de HCl. La suspensión resultante se extrajo con EtOAc. Las capas orgánicas combinadas se concentró para dar el compuesto crudo **57–7** (1,2 g, contiene impurezas).

Etapa 4. A una mezcla del compuesto **57–8** (2,0 g, 4,10 mmol) en THF (50 mL) se añadió el compuesto **57–9** (3,8 g, 24,34 mol) y $Pd(PPh_3)_4$ (946 mg, 0,82 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 60 ^{o}C durante 3 h. La mezcla se enfrió hasta temperatura ambiente y se filtró, la torta filtrante se purificó por HPLC prep para dar **57–10** (1,0 g, 60,4 %).

Etapa 5. Compuesto **57–7** (100 mg, 0,31 mmol), HATU (175 mg, 0,46

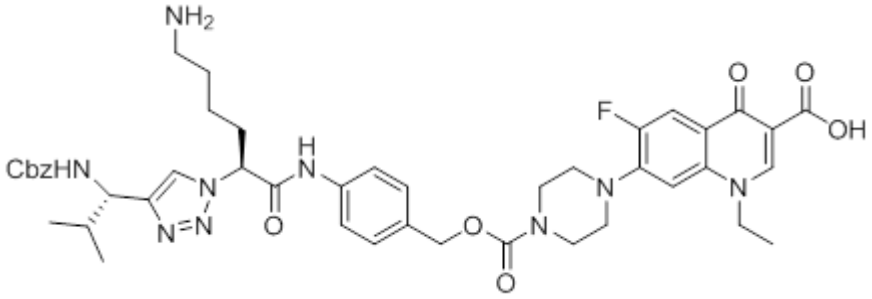
mmol), DIPEA (119 mg, 0,92 mmol) se disolvieron en DMF (10 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. A continuación, compuesto **57–10** (124 mg, 119 mmol) se añadió. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. A continuación, la mezcla se concentró y se purificó por HPLC prep para dar **57–11a** y **57–11b** (30 mg cada uno, 5 %).

Etapa 6. A una solución del compuesto **57–11a** (30 mg, 0,042 mmol) y carbonato de PNP (26 mg, 0,084 mmol) en DMF (2 mL) se añadió DIPEA (17 mg, 0,127 mmol) a 0 ºC . La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 h y norfloxacina (27 mg, 0,084 mmol) se añadió a temperatura ambiente. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. El residuo se purificó por HPLC prep para dar el ejemplo **57** (14 mg, rendimiento: 15 %).

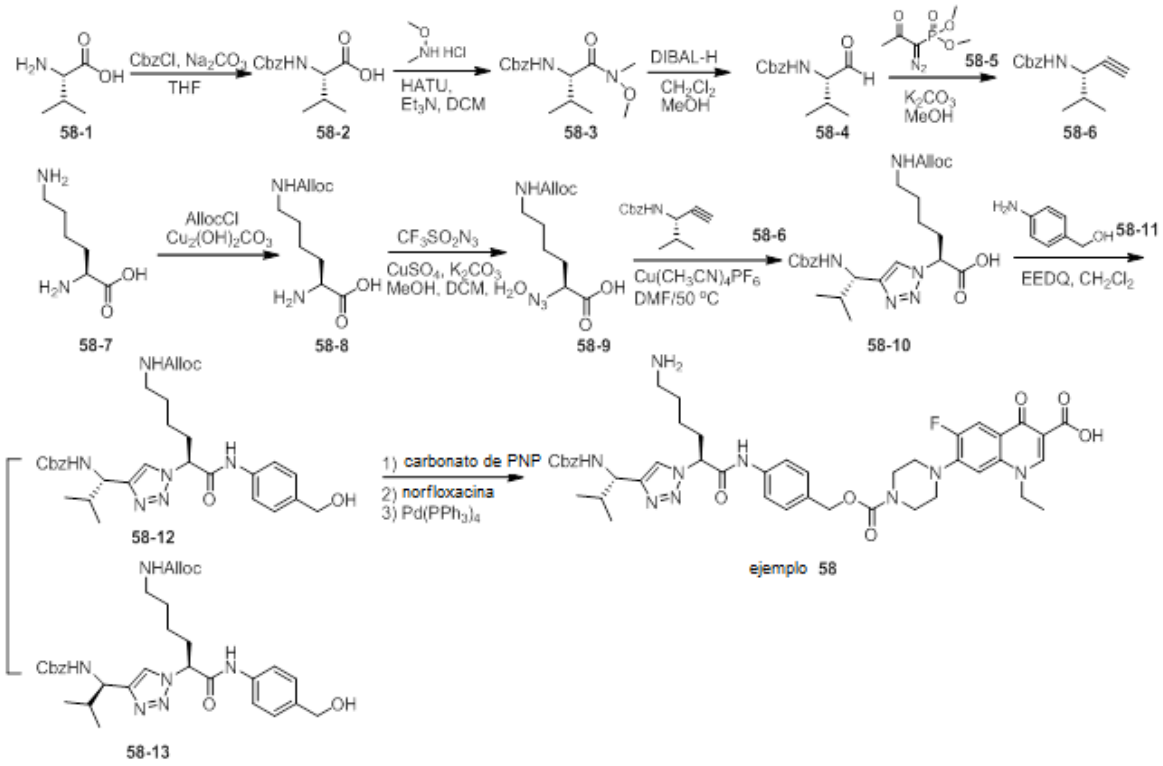
LCMS: (5–95, AB, 1,5 min, ESI), 0,832 min, MS = 529,4[1/2M+1]

^{1}H RMN Metanol–d_4 400 MHz, δ 8,89 (s, 1 H), 8,33 (d, J = 4,6 Hz, 1 H), 8,06 – 8,01 (m, 2 H), 7,63 (d, J = 8,4 Hz, 2 H), 7,50 – 7,40 (m, 1 H), 7,39 (d, J = 8,4 Hz, 2 H), 7,21 (s, 1 H), 5,55 – 5,51 (m, 1 H), 5,15 (s, 2 H), 4,92 (s, 1 H), 4,58 (s, 6 H), 3,74 (s, 4 H), 3,49 – 3,46 (m, 2 H), 3,35 – 3,33 (m, 4 H), 2,69 (s, 4 H), 2,26 – 2,22 (m, 4 H), 1,65 – 1,57 (m, 9 H), 1,56 – 1,29 (m, 5 H), 1,01 (d, J = 6,8 Hz, 3 H) , 0,93 (d, J = 6,4 Hz, 3 H) , 0,92 – 0,81 (m, 6 H)

Ejemplo 58. Ácido 7–(4–((4–((S)–6–amino–2–(4–((S)–1–(benciloxicarbonilamino)–2–metilpropil)–1H–1,2,3–triazol–1–il)hexanamido)benciloxi)carbonil)piperazin–1–il)–1–etil–6–fluoro–4–oxo–1,4–dihidroquinolin–3–carboxílico



ejemplo 58



Etapa 1. CbzCl (26,7 mL, 0,19 mol) se añadió en porciones durante 20 min a una mezcla de **58–1** (20 g, 0,17 mol) y Na_2CO_3 (36 g, 0,34 mol) en agua (100 mL). Después de agitar a temperatura ambiente durante 12 h, se lavó con EtOAc (200 mL × 2). La capa acuosa se ajustó a pH = 2 y se extrajo con EtOAc (200 mL × 4). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na_2SO_4 y se concentraron para dar **58–2**.

Etapa 2. A una solución de **58–2** (20 g, 79,3 mmol), *N,O*–dimetilhidroxilamina (8,4 g, 87,2 mmol) y HATU (45,2 g, 118,9 mmol) en DCM (200 mL) se añadió Et_3N (45,8 mL, 317,1 mmol). La mezcla se

agitó a temperatura ambiente durante 1 h. Después de la eliminación del solvente, el residuo se extrajo con EtOAc (200 mL × 3). La capa orgánica se lavó con HCl conc., NaHCO3 acuoso, NaCl saturado y se concentró. El producto crudo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (PE: EtOAc = 2:1) para dar **58–3**.

Etapa 3. Compuesto **58–3** (6,0 g, 20,4 mmol) en DCM (100 mL) se enfrió hasta –78 ºC en un baño de hielo seco/acetona. DIBAL–H (30,6 mL, 30,6 mmol) se añadió en porciones y la mezcla se agitó a –78 ºC durante 4 h. Exceso de hidruro se neutralizó con MeOH (5 mL) y la solución se calentó hasta temperatura ambiente Después de remover el solvente, **58–4** se usó en la siguiente etapa sin ulterior purificación.

Etapa 4. La mezcla de **58–4** (4,80 g, 20,4 mmol), compuesto **5** (4,70 g, 24,5 mmol) y K_2CO_3 (5,64 g, 40,8 mmol) en MeOH (60 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 12 h. Después de la eliminación del solvente, el residuo se extrajo con EtOAc (100 mL × 3). La capa orgánica se lavó con salmuera (60 mL) y se secó sobre Na_2SO_4. El solvente se removió y el producto crudo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (PE: EtOAc = 10:1) para dar **58–6**.

Etapa 5. Una solución de **58–7** (10 g, 68,4 mmol) y $Cu(OH)_2CO_3$ (15,12 g, 68,4 mmol) en H_2O (100 mL) se calentó a reflujo durante 30 min. Los sólidos formados durante el reflujo se eliminaron por filtración mientras estaban calientes. El filtrado se enfrió hasta 0 ºC y se ajustó a pH 9 por adición de Na_2CO_3 sólido (1,0 g). AllocCl (10,8 mL, 102,6 mmol) se añadió en porciones, mientras que la solución se agitaba a 0 ºC. Durante la adición, la mezcla de reacción se mantuvo a pH 9 por adición de Na_2CO_3 sólido (20 g). La mezcla de reacción se dejó calentar hasta temperatura ambiente y se agitó durante 12 h. El producto sólido azul formado durante la reacción se recolectó por filtración en rendimiento

cuantitativo. La sal de cobre sólida de Orn(Alloc) recolectada con anterioridad se suspendió en H_2O (200 mL) y dos equivalentes de tioacetamida (6,511 g, 86,66 mmol) se añadieron. La suspensión alcalina se agitó a 50 ºC durante 3 h, durante lo cual se disolvió el sólido lentamente. La solución luego se acidificó a pH 2 con HCl 2 M y luego se hirvió durante 5 min. El CuS precipitado se removió por filtración. El filtrado se concentró al vacío a aproximadamente 100 mL, en cuyo punto la sal clorhidrato de producto de Orn(Alloc) **58–8** se precipitó en forma de un sólido blanco en rendimiento cuantitativo.

Etapa 6. Una solución de NaN_3 (8,5 g, 129,7 mmol) en H_2O destilada (45 mL) y CH_2Cl_2 (75 mL) se enfrió en un baño de hielo. Tf_2O (4,4 mL, 25,94 mmol) se añadió lentamente durante 5 min con agitación continua durante 2 h. La mezcla tuvo lugar en un embudo de separación y la fase de CH_2Cl_2 se removió. La porción acuosa se extrajo con CH_2Cl_2 (35 mL × 2). Las fracciones de capa orgánica, que contenía la azida de triflilo se reunieron y se lavaron una vez con Na_2CO_3 saturado y se usó sin ulterior purificación. El compuesto **58–8** (2,99 g, 12,97 mmol) se combinó con K_2CO_3 (2,69 g, 19,46 mmol) y $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (486 mg, 1,94 mmol) en H_2O destilada (90 mL) y MeOH (180 mL). La azida de triflilo en CH_2Cl_2 (150 mL) se añadió y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 12 h. Posteriormente, los solventes orgánicos se eliminaron a presión y la suspensión acuosa se diluyó con tampones de fosfato 0,2 M a pH 6,2 (100 mL) y se extrajo con EtOAc (200 mL × 2) para remover subproducto de sulfonamida. La fase acuosa luego se acidificó a pH 2 con HCl conc. El producto se obtuvo de otra ronda de extracciones de EtOAc (400 mL × 3). Los extractos de EtOAc se combinaron, se secaron sobre Na_2SO_4 y se evaporaron para dar **58–9**, que se usó para la siguiente etapa sin ulterior purificación.

Etapa 7. La mezcla de **58–9** (3,32 g, 12,97 mmol), **58–6** (1,50 g, 6,48 mmol) y $Cu(CH_3CN)_4PF_6$ (362 mg, 0,97 mmol) en DMF (10 mL) se agitó a 50 ºC durante 2 h. Después de la eliminación del solvente, el residuo se purificó por HPLC prep para dar **58–10** (2,3 g, 36,4%).

Etapa 8. La mezcla de **58–10** (2,33 g, 4,78 mmol), **58–11** (1,76 mg, 14,3 mmol) y EEDQ (3,55 g, 14,3 mmol) en DCM (50 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. Después de la eliminación del solvente, el residuo se purificó por HPLC prep y separación por SFC para obtener **58–12** (326 mg) y **58–13** (30 mg).

^{1}H RMN (400 MHz, MeOD) δ 8,04 (s, 1 H), 7,55–7,53 (m, 2 H), 7,33–7,30 (m, 7 H), 5,91–5,87 (m, 1 H), 5,45–5,41 (m, 1 H), 5,27–5,23 (m, 1 H), 5,15–5,11 (m, 1 H), 5,07 (d, *J* = 2,8 Hz, 2 H), 4,70–4,68 (m, 1 H), 4,55 (s, 2 H), 4,48–4,46 (m, 2 H), 3,34–3,32 (m, 1 H), 3,09–3,07 (m, 2 H), 2,28–2,22 (m, 3 H), 1,54–1,50 (m, 2 H), 1,44–1,35 (m, 2 H), 0,93 (d, *J* = 6,8 Hz, 3 H), 0,87 (d, *J* = 6,8 Hz, 3 H).

LCMS (ESI): m/z 593,0 [M+H$^+$].

^{1}H RMN (400 MHz, MeOD) δ 8,04 (s, 1 H), 7,55–7,52 (m, 2 H), 7,32–7,27 (m, 7 H), 5,91–5,87 (m, 1 H), 5,43–5,42 (m, 1 H), 5,27–5,22 (m, 1 H), 5,15–5,12 (m, 1 H), 5,07 (d, *J* =3,6 Hz, 2 H), 4,70–4,68 (m, 1 H), 4,55 (s, 2 H), 4,47 (d, *J* = 5,2 Hz, 2 H), 3,07–3,05 (m, 2 H), 2,22–2,14 (m, 3 H), 1,54–1,50 (m, 2 H), 1,44–1,20 (m, 2 H), 0,92 (d, *J* = 6,8 Hz, 3 H), 0,87 (d, *J* = 6,8 Hz, 3 H).

LCMS (ESI): m/z 593,0 [M+H$^+$].

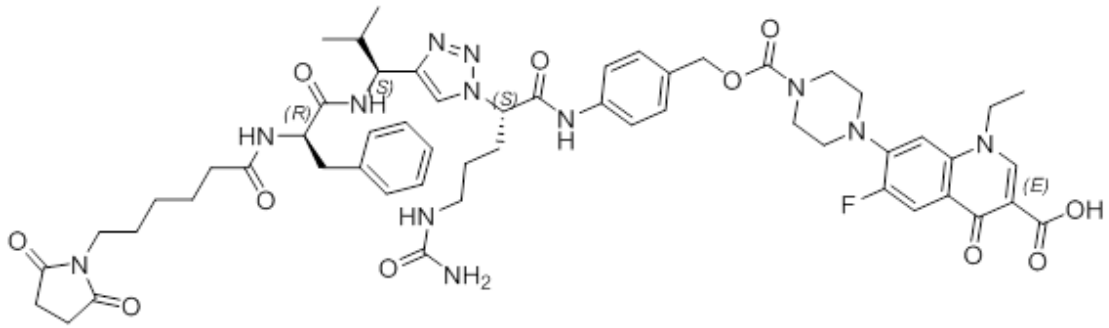
Etapa 9. La mezcla de **58–12** (100 mg, 0,169 mmol), PNP (103 mg, 0,338 mmol) y DIPEA (66 mg, 0,507 mmol) en DCM (5 mL) se agitó a 50 ºC durante 12 h y solvente se removió. Una mezcla del producto crudo anterior (128 mg, 0,169 mmol), Norfloxacina (160 mg, 0,507 mmol) y DIPEA (66 mg, 0,507 mmol) en DMF (5 mL) se agitó a temperatura

ambiente durante 2 h. Después de la eliminación del solvente, el residuo se purificó por HPLC prep para dar 100 mg de intermediario. Al intermediario (50 mg, 0,053 mmol) y ácido 1,3–dimetilbarbitúrico (67 mg, 0,426 mmol) en THF (5 mL) se añadió $Pd(PPh_3)_4$ (12 mg, 0,0106 mmol). La mezcla se agitó a 50 ºC durante 12 h. Después de la eliminación del solvente, el residuo se purificó por HPLC prep para dar el ejemplo **58** (20,6 mg).

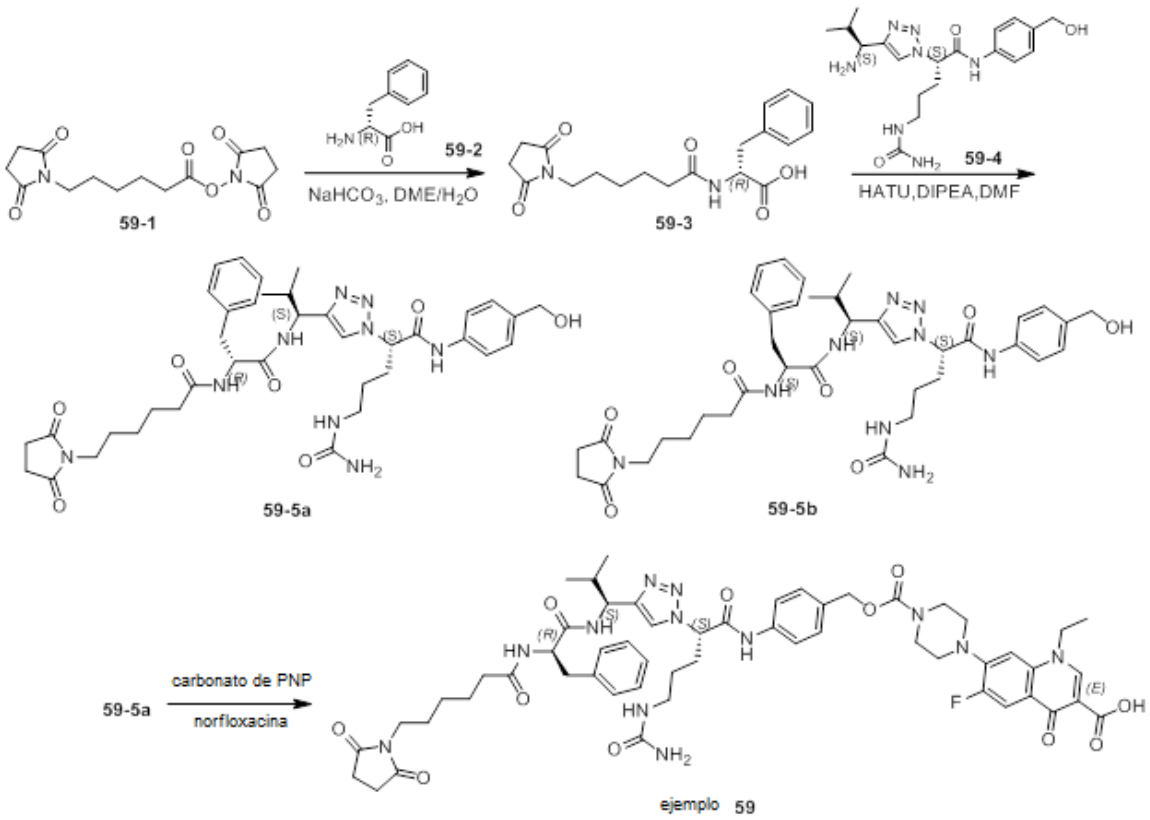
^{1}H RMN (400 MHz, DMSO–d_6) δ 8,96 (s, 1 H), 8,47–8,43 (m, 1 H), 8,09 (s, 1 H), 7,96–7,93 (m, 1 H), 7,74–7,72 (m, 1 H), 7,62–7,60 (m, 2 H), 7,38–7,29 (m, 7 H), 7,22–7,20 (m, 1 H), 5,52–5,49 (m, 1 H), 5,07 (s, 2 H), 5,02 (d, *J* = 4,8 Hz, 2 H), 4,62–4,58 (m, 3 H), 3,62 (s, 4 H), 3,15 (s, 4 H), 2,67–2,66 (m, 2 H), 2,15–2,09 (m, 3 H), 1,54–1,52 (m, 2 H), 1,40 (t, *J* = 7,2 Hz, 3 H), 1,23–1,18 (m, 2 H), 0,84 (d, *J* = 6,4 Hz, 3 H), 0,78 (d, *J* = 6,4 Hz, 3 H).

LCMS (ESI): m/z 854,1 [M+H$^+$].

Ejemplo 59. Ácido 7–(4–((4–((S)–2–(4–((S)–1–((R)–2–(6–(2,5–dioxopirrolidin–1–il)hexanamido)–3–fenilpropanamido)–2–metilpropil)–1H–1,2,3–triazol–1–il)–5–ureidopentanamido)benciloxi) carbonil)piperazin–1–il)–1–etil–6–fluoro–4–oxo–1,4–dihidroquinolin–3–carboxílico



ejemplo 59



Etapa 1. A una solución del compuesto **59–2** (118 mg, 0,71 mmol) en DME (5 mL) se añadió una solución del compuesto **59–1** (200 mg, 0,71 mmol) y $NaHCO_3$ (122 mg, 1,42 mmol) en agua (5 mL). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. La mezcla se lavó con EtOAc y se acidificó a pH = 3 con 10% de HCl. La suspensión resultante se extrajo con EtOAc. La capa orgánica combinada se concentró para dar el compuesto crudo **59–3** (240 mg).

Etapa 2. Compuesto **59–3** (240 mg, 0,67 mmol), HATU (506 mg, 1,34 mmol), DIPEA (258 mg, 2,01 mmol) se disolvieron en DMF (5 mL) y se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. A continuación, el compuesto **59–4** (269 mg, 0,67 mmol) se añadió. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. La mezcla se concentró y se purificó por HPLC prep para dar **59–5a** y **59–5b** (40 mg cada uno, 8 %).

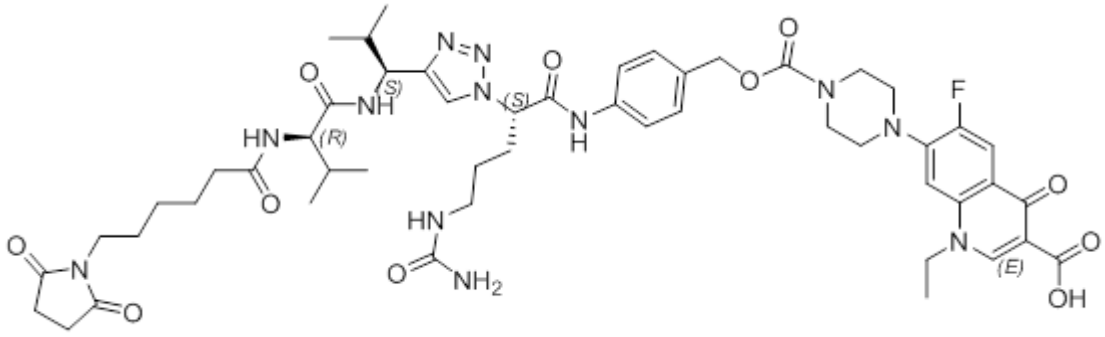
Etapa 3. A una solución del compuesto **59–5a** (40 mg, 0,054 mmol) en

DMF seca (3 mL) se añadió carbonato de PNP (34 mg, 0,11 mmol) y DIPEA (21 mg, 0,162 mmol) a temperatura ambiente y se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 h. Norfloxacina (35 mg, 0,11 mmol) se añadió. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante otra hora y se concentró, se filtró y se purificó por HPLC prep (FA) (14 mg, rendimiento: 20 %).

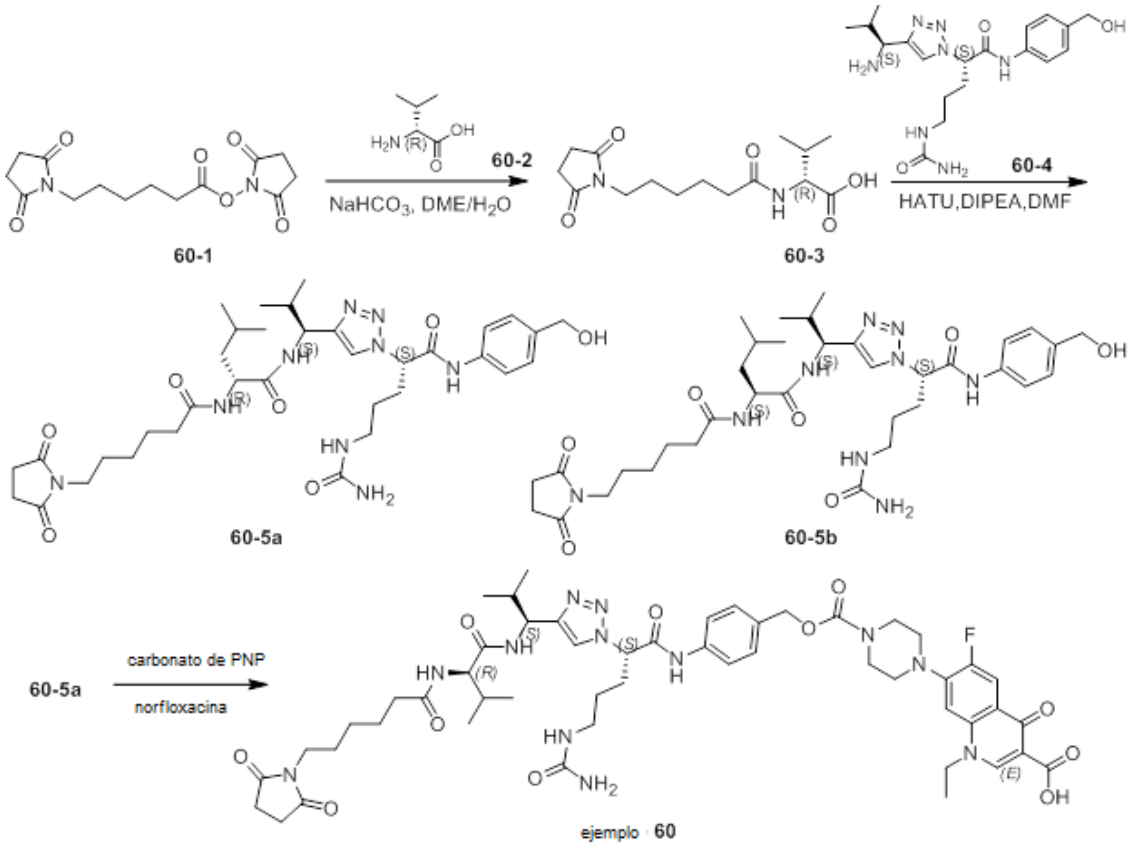
LCMS: (5–95, AB, 1,5 min, ESI), 0,838 min, MS = 546,5 [1/2M+1]

^{1}H RMN DMSO–d_6 400 MHz, δ 10,64 (s, 1 H), 8,96 (s, 1H), 8,22 (d, J = 9,2 Hz, 1 H), 8,04 (d, J = 8,4 Hz, 1 H), 8,04 – 7,92 (m , 2 H), 7,61 (d, J = 8,4 Hz , 2 H), 7,36 (d, J = 8,4 Hz, 2 H), 7,22 – 7,20 (m, 5 H), 7,14 (s, 1 H), 6,06 (d, J = 6 Hz, 1 H), 5,50 – 5,47 (m, 1 H), 5,44 (s, 2 H), 5,07 (s, 2 H), 4,90 – 4,86 (m, 1 H), 4,61 – 4,58 (m, 3 H), 3,61 (s, 4 H), 3,34 – 3,25 (m, 4 H), 3,04 – 2,91 (m, 4 H), 2,75 – 2,71 (m, 2 H), 2,60 (s, 4 H), 2,14 – 2,11 (m , 2 H), 2,09 – 2,00 (m, 2H), 1,42 – 1,29 (m, 10H), 1,40 (d, J = 7,2 Hz, 2 H), 0,85 – 0,79 (m, 6H).

Ejemplo 60. Ácido 7–(4–((4–((S)–2–(4–((S)–1–((R)–2–(6–(2,5–dioxopirrolidin–1–il)hexanamido)–3–metilbutanamido)–2–metilpropil)–1H–1,2,3–triazol–1–il)–5–ureidopentanamido)benciloxi) carbonil)piperazin–1–il)–1–etil–6–fluoro–4–oxo–1,4–dihidroquinolin–3–carboxílico



ejemplo 60



Etapa 1. A una solución del compuesto **60–2** (83 mg, 0,71 mmol) en DME (5 mL) se añadió una solución del compuesto **60–1** (200 mg, 0,71 mmol) y $NaHCO_3$ (122 mg, 1,42 mmol) en agua (5 mL). Después de agitar la mezcla a temperatura ambiente durante 16 h, se lavó con EtOAc y se acidificó a pH 3 con 10% de HCl. La suspensión resultante se extrajo con EtOAc. La capa orgánica combinada se concentró para dar el compuesto **60–3** (160 mg, con impureza, rendimiento: 80 %.

Etapa 2. Compuesto **60–3** (160 mg, 0,51 mmol), HATU (390 mg, 1,02 mmol), DIPEA (200 mg, 0,68 mmol) se disolvieron en DMF (5 mL) y se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. A continuación, compuesto **60–4** (207 mg, 0,51 mmol) se añadió. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. A continuación, la mezcla se concentró y se purificó por HPLC prep para dar **60–5a** y **60–5b** (60 mg y 60 mg, 8 % y 8%, respectivamente)

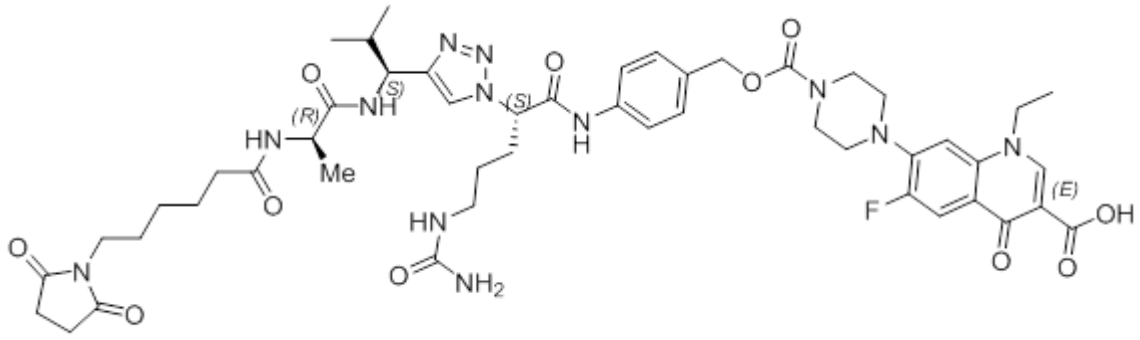
Etapa 3. A una solución del compuesto **60–5a** (60 mg, 0,086 mmol) en

DMF seca (3 mL) se añadió carbonato de PNP (60 mg, 0,2 mmol) y DIPEA (0,5 mL, 3 mmol) a temperatura ambiente y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 h. Norfloxacina (60 mg, 0,19 mmol) se añadió. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 h más. La mezcla se concentró, se filtró y se purificó por HPLC prep (FA) para dar el ejemplo **60** (47,9 mg, rendimiento: 54%).

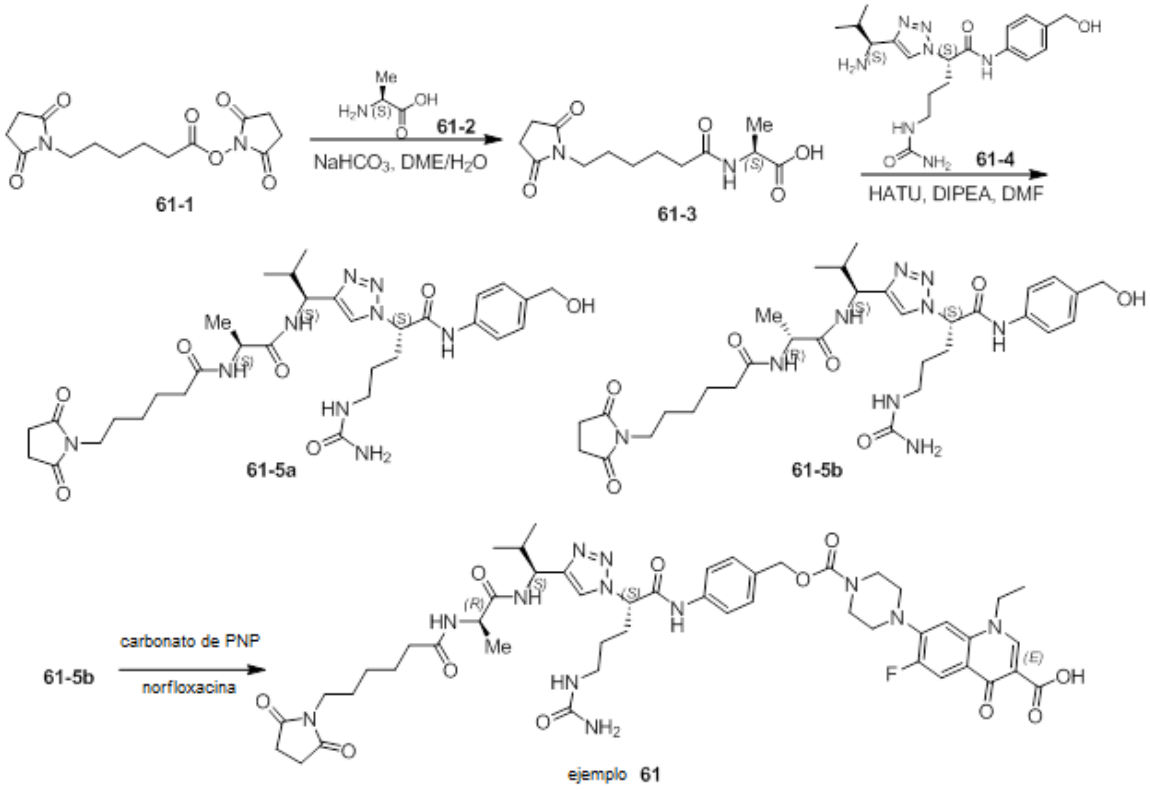
LCMS: (5–95, AB, 1,5 min, ESI), 0,824 min, MS = 522,4 [1/2M+1]

^{1}H RMN DMSO–d_6 400 MHz, δ 10,1 (s, 1H), 8,93 (s, 1 H), 8,15 – 8,13 (d, 1H), 7,99 (s, 1 H), 7,93 – 7,90 (d, 1 H), 7,81 – 7,79 (d, 1H), 7,57 – 7,55 (d, *J* = 8,0 Hz , 2 H), 7,35 – 7,33 (d, *J* = 8,0 Hz , 2 H), 7,20 – 7,18 (m, 1 H), 6,0 (m, 1 H), 5,5 (m, 1 H), 5,40 (s, 2 H), 5,04 (s, 2 H), 4,8 (m, 1 H), 4,6 – 4,5 (m, 2 H), 4,2 – 4,1(m, 1 H), 3,6 (s, 4 H), 3,2 (m, 6 H), 3,05 – 2,9 (m, 2 H), 2,57 (s, 4 H), 2,15 – 2,0 (m, 5 H), 1,9 – 1,8 (m, 1 H), 1,5 – 1,35 (m, 7 H), 1,3 – 1,1 (m , 4 H), 0,82 – 0,80 (m, *J* = 8,0 Hz, 3H), 0,76 – 0,70 (m, 9H).

Ejemplo 61. Ácido 7–(4–((4–((S)–2–(4–((S)–1–((R)–2–(6–(2,5–dioxopirrolidin–1–il)hexanamido)propanamido)–2–metilpropil)–1H–1,2,3–triazol–1–il)–5–ureidopentanamido)benciloxi)carbonil)piperazin–1–il)–1–etil–6–fluoro–4–oxo–1,4–dihidroquinolin–3–carboxílico



ejemplo 61



Etapa 1. A una solución del compuesto **61–2** (64 mg, 0,71 mmol) en DME (5 mL) se añadió una solución del compuesto **61–1** (200 mg, 0,71 mmol) y $NaHCO_3$ (122 mg, 1,42 mmol) en agua (5 mL). Después de agitar la mezcla a temperatura ambiente durante 16 h, se lavó con EtOAc y se acidificó a pH = 3 con 10% de HCl. La suspensión resultante se extrajo con EA. La capa orgánica combinada se concentró para dar el compuesto **61–3**. (100 mg, contiene impureza, rendimiento: 60 %)

Etapa 2. Compuesto **61–3** (100 mg, 0,35 mmol), HATU (267 mg, 0,7 mmol), DIPEA (136 mg, 1,05 mmol) se disolvieron en DMF (5 mL) y se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. Compuesto **61–4** (142 mg, 0,35 mmol) se añadió y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. La mezcla se concentró y se purificó por HPLC prep para dar **61–5a** y **61–5b** (43 mg, 22 mg, 6 %, 3 %, respectivamente)

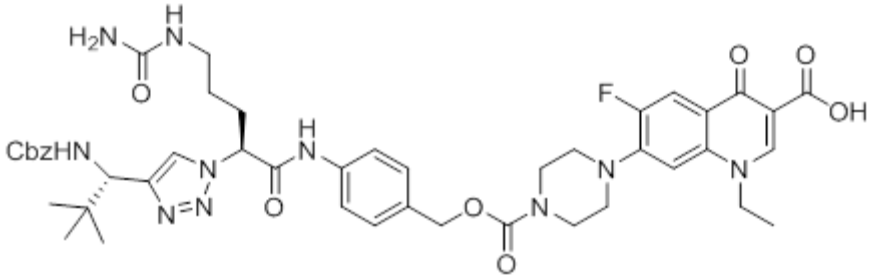
Etapa 3. A una solución del compuesto **61–5b** (22 mg, 0,033 mmol) en DMF seca (2 mL) se añadió carbonato de PNP (20 mg, 0,066 mmol) y

DIPEA (0,2 mL, 1,2 mmol) a temperatura ambiente y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 h. Norfloxacina (20 mg, 0,066 mmol) se añadió. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante otra hora. La mezcla se concentró, se filtró y se purificó por HPLC prep (FA), para dar el ejemplo **61** (14,6 mg rendimiento: 43%).

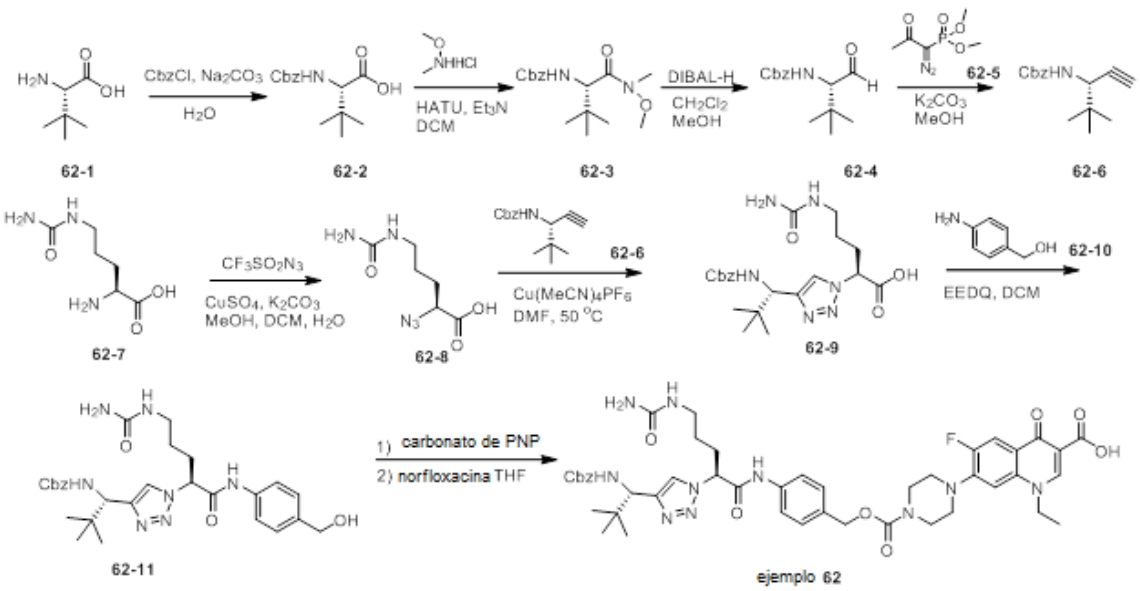
LCMS: (5–95, AB, 1,5 min, ESI), 0,805 min, MS = 508,3[1/2M+1]

^{1}H RMN metanol–d_4 + $CDCl_3$ 400 MHz, δ 8,83 (s, 1 H), 8,02 – 7,99 (m, 2 H), 7,77 (solvente:$CDCl_3$), 7,59 – 7,57 (d, J = 8,0 Hz , 2 H), 7,36 – 7,34 (d, J = 8,0 Hz , 2 H), 7,15 – 7,13 (m, 1 H), 5,5 (m, 1 H), 5,11 (s, 2 H), 4,95 – 4,9 (m, 1 H), 4,55 – 4,45 (m, 2 H), 4,4 – 4,35 (m, 1 H), 3,7 (s, 4 H), 3,45 (m, 2 H), 3,4 (s, 4 H), 3,25 – 3,05 (m, 2 H), 2,66 (s, 4 H), 2,3 – 2,1 (m, 5 H), 1,6 – 1,5 (m, 7 H), 1,5 – 1,3 (m, 2 H), 1,3 – 1,2 (m, 5 H), 0,96 – 0,94 (d, J = 8,0 Hz , 3 H), 0,87 – 0,85 (d, J = 8,0 Hz , 3 H).

Ejemplo 62. Ácido 7–(4–((4–((S)–2–(4–((S)–1–(benciloxicarbonilamino)–2,2–dimetilpropil)–1H–1,2,3–triazol–1–il)–5–ureidopentanamido)benciloxi)carbonil)piperazin–1–il)–1–etil–6–fluoro–4–oxo–1,4–dihidroquinolin–3–carboxílico



ejemplo 62



Etapa 1. CbzCl (24 mL, 0,17 mol) se añadió a en porciones durante 20 min a una mezcla de **62–1** (20 g, 0,15 mol) y Na_2CO_3 (32 g, 0,30 mol) en agua (100 mL). Después de agitar la mezcla de reacción durante 12 h, se lavó con EtOAc (200 mL × 2). La capa acuosa se ajustó a pH = 2 y se extrajo con EtOAc (200 mL × 4). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na2SO4 y se concentraron a presión reducida para dar **62–2**, que se usó para la siguiente etapa sin ulterior purificación.

Etapa 2. A una mezcla de **62–2** (10 g, 37,7 mmol), *N,O*–dimetilhidroxilamina (4,0 g, 41,5 mmol) y HATU (21,3 g, 56,0 mmol) en DCM (100 mL) se añadió Et_3N (21,8 mL, 150,8 mmol). Después de agitar la mezcla a temperatura ambiente durante 1 h, el solvente se removió y el producto crudo se extrajo en con agua (200 mL). La capa acuosa se extrajo con EtOAc (200 mL × 3). Los extractos se lavaron con HCl conc., NaHCO3 ac., saturated NaCl. Se concentró y se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (PE: EtOAc = 2:1) para dar **62–3**.

Etapa 3. DIBAL–H (19,5 mL, 19,46 mmol) se añadió en porciones a una solución del compuesto **3** (4 g, 12,97 mmol) en DCM (60 mL) a –78 ºC.

Después de agitar la mezcla a –78 ºC durante 4 h, exceso hidruro se neutralizó con MeOH (5 mL) y la solución resultante se calentó hasta temperatura ambiente La solución se concentró para dar el compuesto **4**, que se usó para la siguiente etapa sin ulterior purificación.

Etapa 4. Después de una mezcla de **62–4** (3,23 g, 12,97 mmol), **62–5** (2,99 g, 15,56 mmol) y K_2CO_3 (3,58 g, 25,94 mmol) en MeOH (40 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 12 h, el solvente se removió y el residuo se extrajo con EtOAc (60 mL × 3). Las capas orgánicas se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na_2SO_4, se concentró y se purificó por columna (PE: EtOAc = 10:1) para dar **62–6**.

Etapa 5. Tf_2O (4,4 mL, 25,94 mmol) se añadió lentamente durante 5 min a una solución de NaN_3 (8,3 g, 129,7 mmol) en una mezcla de H_2O (45 mL) y DCM (75 mL) a 0 ^oC. Después de agitar durante 2 h, la capa de DCM se separó y la porción acuosa se extrajo con DCM (35 mL×2). Las fracciones de capa orgánica, que contenían la azida de triflilo se reunieron y se lavaron una vez con Na2CO3 saturado y se añadieron a una mezcla de **62–7** (2,27 g, 12,97 mmol), K_2CO_3 (2,69 g, 19,46 mmol) y $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (323 mg, 1,30 mmol) en H_2O (90 mL) y MeOH (180 mL). Después de agitar la mezcla durante 12 h, los solventes orgánicos se eliminaron a presión y la suspensión acuosa se diluyó con tampones de fosfato (0,2 M, pH 6,2, 100 mL) y se extrajo con EtOAc (200 mL × 2). La fase acuosa luego se acidificó a pH = 2 con HCl conc. y se extrajo con (400 mL × 3). Las capas orgánicas se combinaron, se secaron sobre Na2SO4 y se concentraron para dar **62–8**, que se usó para la siguiente etapa sin ulterior purificación.

Etapa 6. Después de una mezcla de **62–8** (2,61 g, 12,97 mmol), **62–6** (1,59 g, 6,48 mmol) y $Cu(CH_3CN)_4PF_6$ (362 mg, 0,97 mmol) en DMF (5 mL) se agitó a 50 ºC durante 2 h, el solvente se removió y el residuo se

purificó por HPLC prep para dar **62–9**.

Etapa 7. Después de una mezcla de **62–9** (968 mg, 2,17 mmol), **62–10** (801 mg, 6,50 mmol) y EEDQ (1,61 g, 6,50 mmol) en DCM (50 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 2 h, el solvente se removió y el residuo se purificó por HPLC prep para dar **62–11** (395,9 mg, 33,1%).

^{1}H RMN (400 MHz, MeOD) δ 8,11 (s, 1 H), 7,59–7,56 (m, 2 H), 7,37–7,27 (m, 7 H), 5,55–5,51 (m, 1 H), 5,13–5,05 (m, 2 H), 4,79 (s, 1 H), 4,58 (s, 2 H), 3,34–3,32 (m, 1 H), 3,25–3,11 (m, 1 H), 2,28–2,22 (m, 2 H), 1,48–1,41 (m, 2 H), 0,96 (s, 9 H).

LCMS (ESI): m/z 551,9 [M+H$^+$].

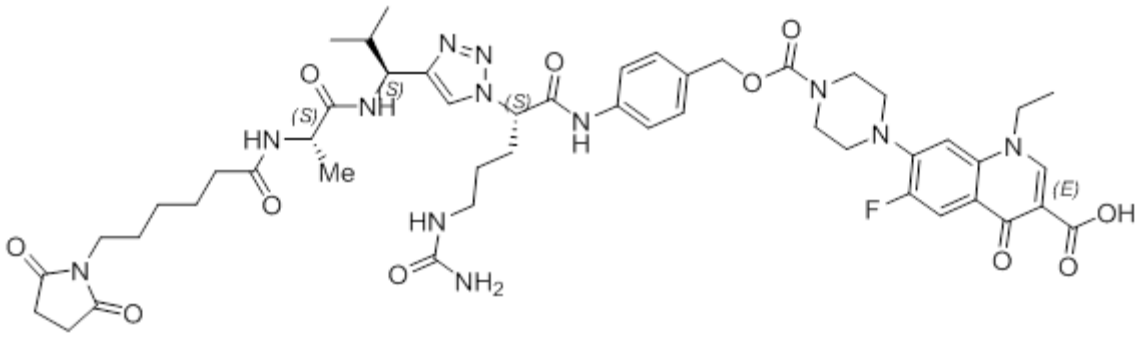
Etapa 8. Después de una mezcla de **62–11** (190 mg, 0,34 mmol), carbonato de PNP (126 mg, 0,41 mmol) y DIPEA (132 mg, 1,02 mmol) en DCM (5 mL) se agitó a 50 ºC durante 12 h, el solvente se removió y se añadió a una mezcla de norfloxacina (323 mg, 1,02 mmol) y DIPEA (132 mg, 1,02 mmol) en DMF (5 mL). Después de agitar a temperatura ambiente durante 2 h solvente se removió y el residuo se purificó por HPLC prep para dar el ejemplo **62** (6,2 mg).

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO–d_6) δ 15,31 (s, 1 H), 10,66 (s, 1 H), 8,96 (s, 1 H), 8,15 (s, 1 H), 7,94 (d, *J* =13,2 Hz, 1 H), 7,72–7,70 (m, 1 H), 7,60 (d, *J* = 8,0 Hz, 2 H), 7,38–7,28 (m, 8 H), 6,04–6,03 (m, 1 H), 5,52–5,51 (m, 1 H), 5,42 (s, 2 H), 5,07 (s, 2 H), 5,03–5,01 (m, 2 H), 4,66 (d, *J* = 9,6 Hz, 1 H), 4,58–4,56 (m, 2 H), 3,61 (s, 4 H), 3,41 (s, 4 H), 3,02–2,98 (m, 2 H), 2,12–2,02 (m, 2 H), 1,42–1,39 (m, 3 H), 1,26–1,23 (m, 2 H), 0,84 (s, 9 H).

LCMS (ESI): m/z 897,1 [M+H$^+$].

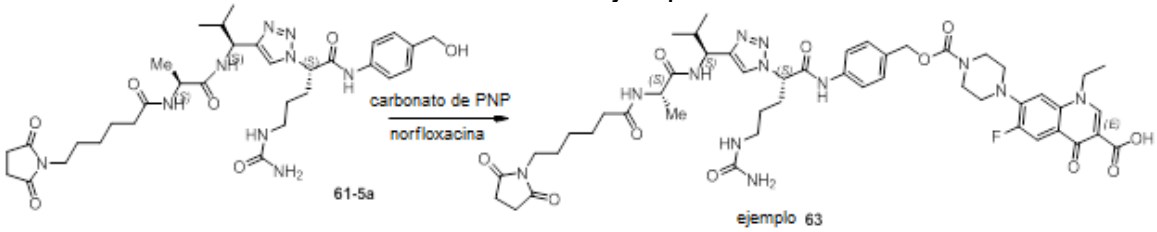
Ejemplo 63. Ácido 7–(4–((4–((S)–2–(4–((S)–1–((S)–2–(6–(2,5–dioxopirrolidin–1–il)hexanamido)propanamido)–2–metilpropil)–1H–1,2,3–triazol–1–il)–5–ureidopentanamido)benciloxi)carbonil)piperazin–1–il)–1–

etil–6–fluoro–4–oxo–1,4–dihidroquinolin–3–carboxílico



ejemplo 63

El Ejemplo 63 se preparó usando el procedimiento como en el Ejemplo 61, con intermediario de la síntesis del Ejemplo **61.**



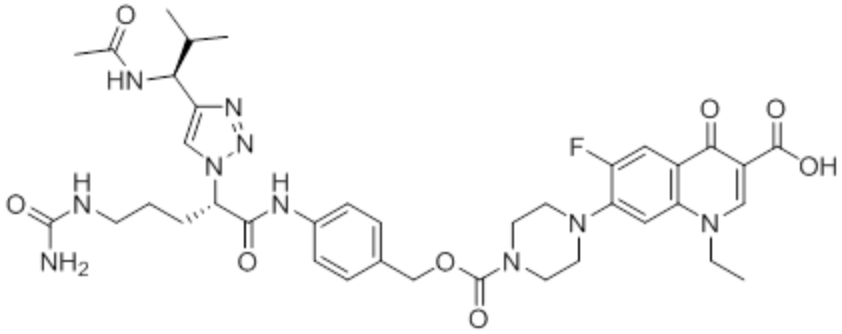
Etapa 1. A una solución del compuesto **61–5a** (43 mg, 0,064 mmol) en DMF seca (3 mL) se añadió carbonato de PNP (40 mg, 0,128 mmol) y DIPEA (0,4 ml, 2,4 mmol) a temperatura ambiente y la mezcla se dejó bajo agitación a temperatura ambiente durante 1,5 h. Norfloxacina (40 mg, 0,128 mmol) se añadió. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante otra hora. La mezcla se concentró, se filtró y se purificó por HPLC prep (FA), para dar el ejemplo **63** (33,8 mg, rendimiento: 52%).

LCMS: (5–95, AB, 1,5 min, ESI), 0,803 min, MS = 508,4 [1/2M+1]

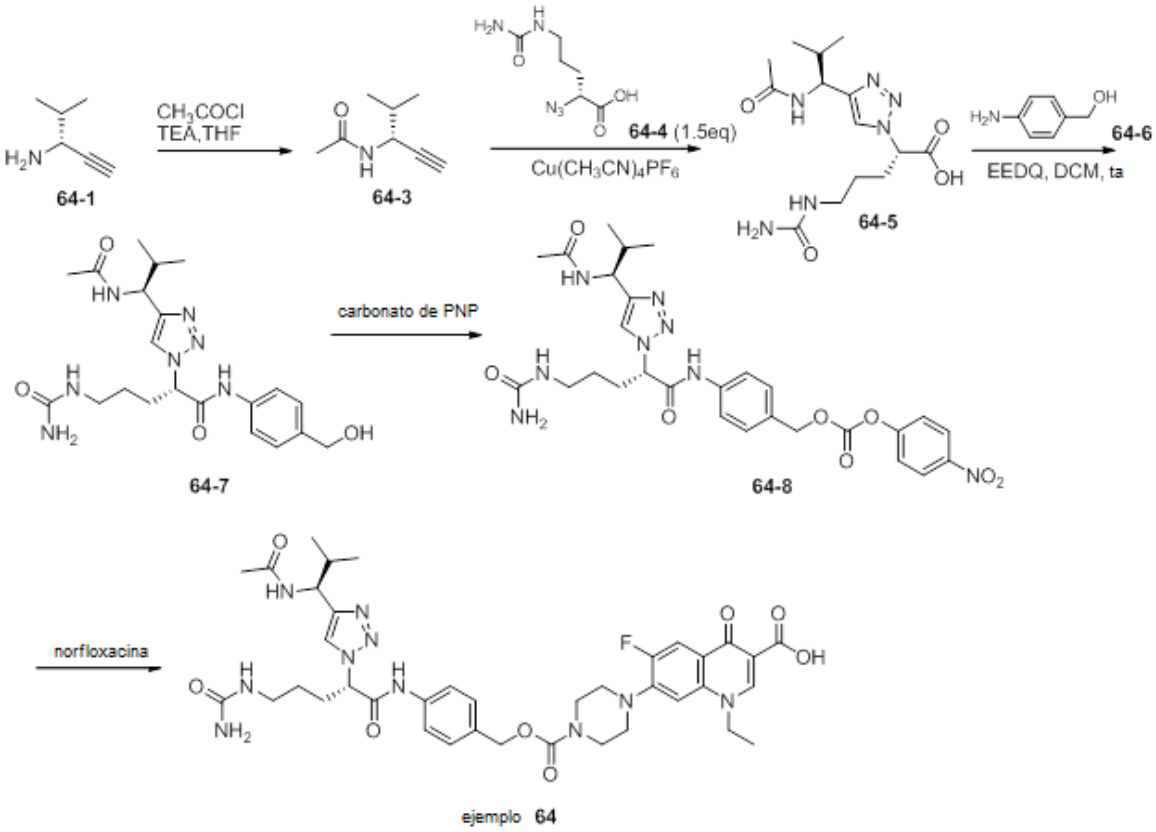
^{1}H RMN Metanol–d_4 400 MHz, δ 8,86 (s, 1 H), 8,15 – 8,12 (d, 1H), 8,10 – 8,05 (m, 1 H), 8,05 – 7,98 (d, 1 H), 7,62 – 7,60 (d, J = 8,0 Hz , 2 H), 7,37 – 7,35 (d, J = 8,0 Hz , 2 H), 7,20 – 7,18 (m, 1 H), 5,5 (m, 1 H), 5,12 (s, 2 H), 4,95 – 4,9 (m, 1 H), 4,6 – 4,5 (m, 2 H), 4,42 – 4,38 (m, 1 H), 3,7 (s, 4 H), 3,41 (m, 2 H), 3,3 (s, 4 H), 3,25 – 3,1 (m, 2 H), 2,63 (s, 4 H), 2,35 – 2,2 (m, 5 H), 1,6 – 1,5 (m, 7 H), 1,5 – 1,3 (m, 2 H), 1,35 – 1,33 (d, J = 8,0

Hz , 3 H), 1,3 – 1,2 (m, 2H), 0,95 – 0,93 (d, *J* = 8,0 Hz , 3 H), 0,91 – 0,88 (d, *J* = 8,0 Hz , 3 H).

Ejemplo 64. Ácido 7–(4–((4–((S)–2–(4–((S)–1–acetamido–2–metilpropil)–1H–1,2,3–triazol–1–il)–5–ureidopentanamido)benciloxi)carbonil)piperazin–1–il)–1–etil–6–fluoro–4–oxo–1,4–dihidroquinolin–3–carboxílico



ejemplo 64



Etapa 1. A una solución agitada de **64–1** (1,1 g, 11,4 mmol) en THF se añadió **64–2** (4,5 mL, 57 mmol), TEA (9 mL, 62,7 mmol) a 0 ºC. La

mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 h bajo N_2. La mezcla de reacción se vertió en agua (30 mL) y se extrajo con DCM, las capas orgánicas combinadas se lavaron con NaCl acuoso y se concentraron para dar **64–3** (Rendimiento: 95 %).

Etapa 2. Compuesto **64–3** (139 mg, 1 mmol), **64–4** (302 mg, 1,5 mmol), $Cu(CH_3CN)_4PF_6$ (75 mg, 0,2 mmol) se disolvió en DMF (8 mL) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó a 60 ^oC durante 2 h. La mezcla **64–5** se usó para la siguiente etapa sin ulterior purificación.

Etapa 3. A la mezcla cruda de **64–5** se añadió **64–6** (1,123 g, 9,12 mmol) y EEDQ (3 g, 12,2 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 h bajo atmósfera de N_2. El residuo se purificó por HPLC prep y luego se purificó por SFC para dar **64–7**. (Rendimiento: 80 %)

LCMS (ESI): m/z 446,0 [$M+H^+$].

Etapa 4. A una solución de **64–7** (30 mg, 0,068 mmol) en DMF (2 mL) se añadió carbonato de PNP (42 mg, 0,136 mmol) y DIPEA (27 mg, 0,21 mmol) a 0 ºC. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. La mezcla **64–8** se usó para la siguiente etapa sin ulterior purificación. (Rendimiento: 95 %)

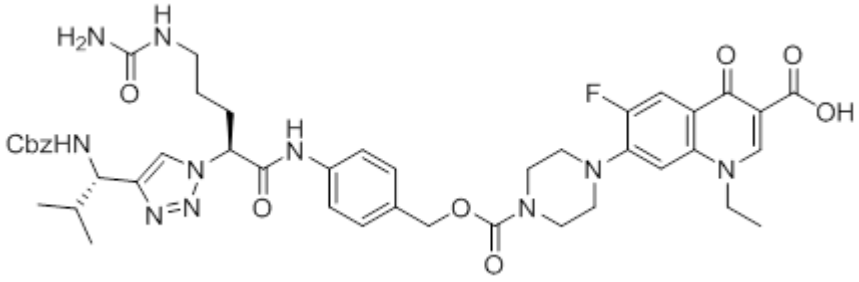
LCMS (ESI): m/z 611,2 [$M+H^+$].

Etapa 5. A la mezcla de **64–8** se añadió norfloxacina (44 mg, 0,136 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. El residuo se purificó por HPLC prep y luego se purificó por SFC para dar el ejemplo **64** (Rendimiento: 30 %).

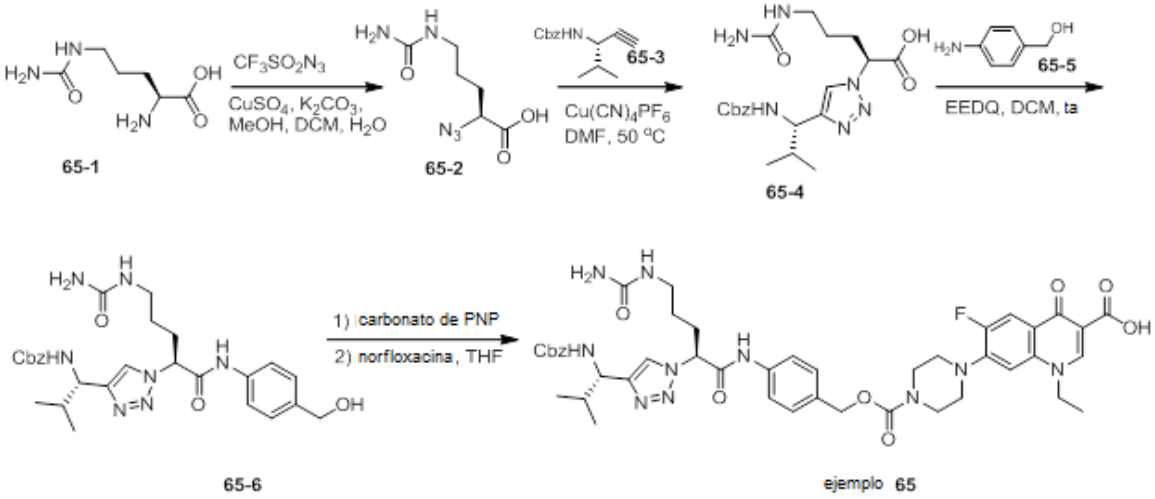
^1H RMN (400 MHz, DMSO–d_6) δ 10,62 (s, 1 H), 8,96 (s, 1 H), 8,17 (d, J = 9,2 Hz, 1 H), 8,06 (d, J = 6,8 Hz, 1 H), 7,94 (d, J = 13,2 Hz, 1 H), 7,60 (d, J = 8,4 Hz, 2 H), 7,36 (d, J = 8,0 Hz, 2 H), 7,21 (d, J = 6,0 Hz, 1 H), 6,02 (d, J = 4,4 Hz, 1 H), 5,51 – 5,42 (m, 3 H), 5,07 (s, 2 H), 4,90 – 4,86 (m, 1

H), 4,59 – 4,57 (m, 2 H), 3,65 – 3,61 (m, 4 H), 3,06 – 2,96 (m, 2 H), 2,12 – 1,87 (m, 3 H), 1,86 (s, 3 H), 1,48 – 1,35 (m, 3 H), 1,28 (s, 2 H), 0,89 – 0,72 (m, 6 H).

Ejemplo 65: ácido 7–(4–((4–((S)–2–(4–((S)–1–(benciloxicarbonilamino)–2–metilpropil)–1H–1,2,3–triazol–1–il)–5–ureidopentanamido)benciloxi)carbonil)piperazin–1–il)–1–etil–6–fluoro–4–oxo–1,4–dihidroquinolin–3–carboxílico.



ejemplo 65



Etapa 1. Tf_2O (8,8 mL, 51,9 mmol) se añadió lentamente durante 5 min a una solución de NaN_3 (16,9 g, 259,4 mmol) en una mezcla de H_2O destilada (30 mL) y CH_2Cl_2 (45 mL) a 0 °C. Después de agitar durante 2 h, la fase orgánica se separó y una porción acuosa se extrajo con CH_2Cl_2 (40 mL×2). Las fracciones de capa orgánica, que contenía la azida de triflilo, se reunieron y se lavaron una vez con Na2CO3 saturado y se añadieron a una mezcla de **65–1** (2,3 g, 12,97 mmol), K_2CO_3 (2,69

g, 19,46 mmol) y $CuSO_4$,$5H_2O$ (65 mg, 0,26 mmol) en H_2O (90 mL) y MeOH (180 mL). Después de agitar la mezcla a 26 °C durante 12 h, los solventes orgánicos se eliminaron a presión reducida y la suspensión acuosa se diluyó con H_2O (50 mL). La mezcla se acidificó a pH = 6 con HCl conc. y luego se diluyó con tampones de fosfato (0,2 M, pH 6,2, 50 mL). La mezcla se lavó con EtOAc (100 mL × 2) y la fase acuosa luego se acidificó a pH = 2 con HCl conc. La mezcla se extrajo con EtOAc (200 mL × 3). La capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4 y se concentró para dar **65–2**, que se usó para la siguiente etapa sin ulterior purificación.

Etapa 2. Después de una mezcla de **65–2** (2,6 g, 12,97 mmol), **65–3** (1,5 g, 6,48 mmol) y $Cu(MeCN)_4PF_6$ (304 mg, 0,97 mmol) en DMF (10 mL) se agitó a 50 °C durante 2 h, el solvente se removió y el residuo se purificó por HPLC prep para dar **65–4** (516 mg, 18%).

Etapa 3. Después de una mezcla de **65–4** (285 mg, 0,66 mmol), **65–5** (244 mg, 1,98 mmol) y EEDQ (490 mg, 1,98 mmol) en DCM (30 mL) se agitó a 24 °C durante 2 h, el solvente se removió y el residuo se purificó por HPLC prep para dar **65–6** (250 mg, 70,4%).

^{1}H RMN (400 MHz, MeOD) δ 8,10 (s, 1 H), 7,58 (s, 2 H), 7,45–7,20 (m, 7 H), 5,55–5,52 (m, 1 H), 5,10–5,05 (m, 2 H), 4,77–4,58 (m, 3 H), 3,22–3,21 (m, 2 H), 2,33–2,15 (m, 3 H), 1,49–1,47 (m, 2 H), 0,97 (s, 3 H), 0,90 (s, 3 H).

LCMS (ESI): m/z 538,3 [$M+H^+$].

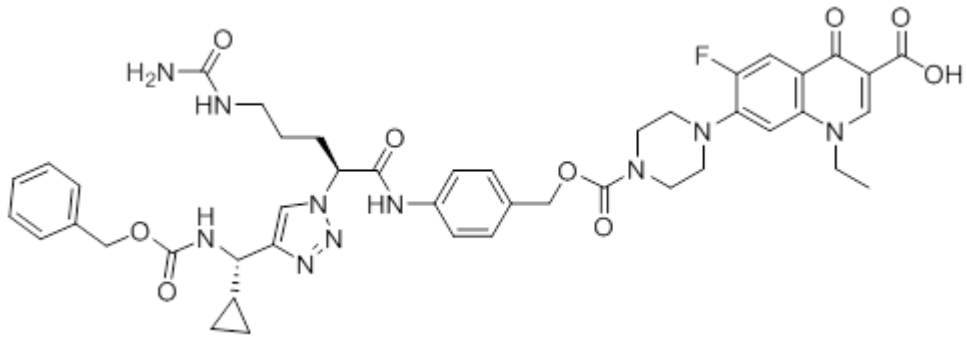
Etapa 4. Después de una mezcla de **65–6** (127 mg, 0,24 mmol), PNP (143 mg, 0,47 mmol) y DIPEA (92 mg, 0,71 mmol) en DCM (10 mL) se agitó a 50 °C durante 12 h, el solvente se removió y el residuo se mezcló con DIPEA (93 mg, 0,72 mmol) y norfloxacina (230 mg, 0,72 mmol) en DMF (10 mL). Después de agitar a 24 °C durante 4 h, el solvente se removió y el residuo se purificó por HPLC prep para dar el ejemplo **65**

(30 mg, 14,1%).

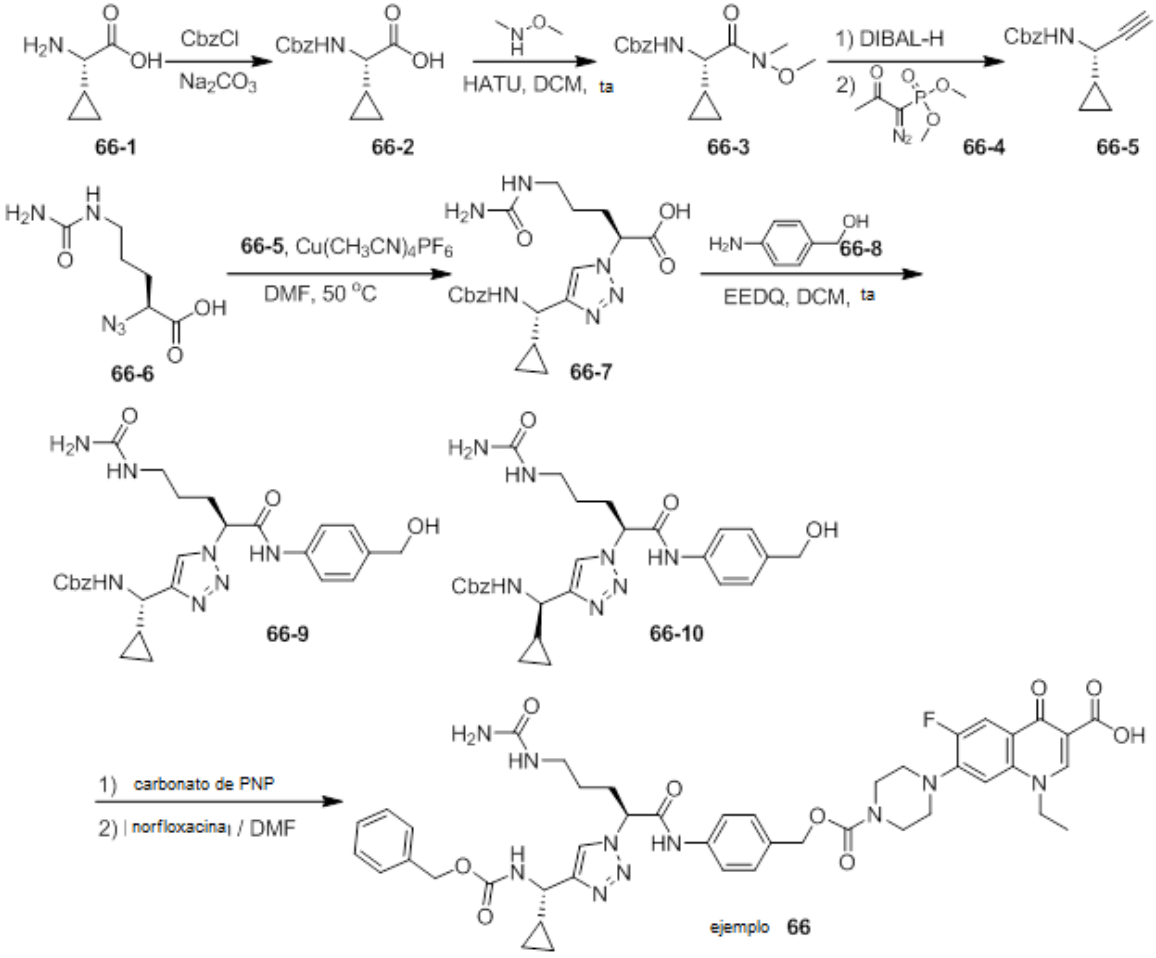
^{1}H RMN (400 MHz, DMSO–d_6) δ 15,32 (s, 1 H), 10,63 (s, 1 H), 8,96 (s, 1 H), 8,08 (s, 1 H), 7,94 (d, J = 13,2 Hz, 1 H), 7,71 (d, J = 9,2 Hz, 1 H), 7,60 (d, J = 8,4 Hz, 2 H), 7,38–7,29 (m, 8 H), 7,21 (d, J = 7,6 Hz, 1 H), 6,02 (s, 1 H), 5,48–5,47 (m, 1 H), 5,42 (s, 2 H), 5,06 (s, 2 H), 5,02 (s, 2 H), 4,62–4,60 (m, 3 H), 3,61 (s, 4 H), 3,44 (s, 4 H), 3,02–2,99 (m, 2 H), 2,12–2,02 (m, 3 H), 1,40 (t, J = 6,8 Hz, 3 H), 1,27–1,24 (m, 2 H), 0,84 (d, J = 6,8 Hz, 3 H), 0,78 (d, J = 6,8 Hz, 3 H).

LCMS (ESI): m/z 883,7 [M+H$^+$].

Ejemplo 66. Ácido 7–(4–((4–((S)–2–(4–((S)–(benciloxicarbonilamino)(ciclopropil)metil)–1H–1,2,3–triazol–1–il)–5–ureidopentanamido)benciloxi)carbonil)piperazin–1–il)–1–etil–6–fluoro–4–oxo–1,4–dihidroquinolin–3–carboxílico



ejemplo 66



Etapa 1. A una mezcla de **66–1** (5,0 g, 43,43 mmol) y Na_2CO_3 (6,9 g, 65,15 mmol) en H_2O (50 mL) se añadió CbzCl (8,89 g, 52,12 mmol) en porciones a 0 ºC. Después de agitar la mezcla de reacción a 25 ºC durante 16 h, se lavó con EtOAc (30 mL × 2). La fase acuosa se acidificó a pH 2 con HCl conc. y se extrajo con EtOAc (50 mL × 2). La capa orgánica combinada se secó sobre Na_2SO_4 y se concentró a presión reducida para dar **66–2** (11 g, crudo).

^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,38–7,29 (m, 5 H), 5,13–5,08 (m, 2 H), 4,72–4,68 (m, 1 H), 1,12–1,09 (m, 1 H), 0,61–0,43 (m, 4 H).

Etapa 2. A una mezcla de **66–2** (500 mg, 2,006 mmol), clorhidrato de N,O–dimetilhidroxilamina (235 mg, 2,407 mmol) y Et_3N (609 mg, 6,018 mmol) en DCM (10 mL) se añadió HATU (1,14 g, 3,009 mmol) a 25 ºC.

Después de agitar a 25 ºC durante 2 h, el solvente se removió y el residuo se extrajo en con agua (10 mL). La capa acuosa se extrajo con EtOAc (8 mL × 2). La capa orgánica se lavó con solución saturada de Na2CO3 (10 mL), solución 1 N de HCl (10 mL), luego agua (10 mL). La capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4, se filtró y se concentró. El producto crudo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (PE/EtOAc = 2:1) para dar **66–3** (400 mg, 68%).

LCMS (ESI): m/z 293,1 [$M+H^+$].

Etapa 3. DIBAL–H en tolueno (1M, 18 mL, 18 mmol) se añadió a una mezcla de **66–3** (3,5 g, 11,97 mmol) en DCM (30 mL) a –78 ºC. Después de agitar la mezcla a –78 ºC durante 3 h, MeOH (5 mL) se añadió en porciones. La mezcla se calentó hasta 25 ºC. El solvente se removió y se disolvió en MeOH (25 mL) y K_2CO_3 (3,31 g, 23,94 mmol) y **66–4** (2,76 g, 14,36 mmol) se añadió a 0 ºC. La mezcla se agitó a 25 ºC durante 16 h. Después de remover el solvente, el producto crudo se extrajo en con solución 1 N de HCl (30 mL), se extrajo con EtOAc (20 mL × 3). La capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4, se concentró y se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (PE/EtOAc = 5:1–2:1) para dar **66–5** (1,5 g, 55%).

^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,41–7,30 (m, 5 H), 5,12–5,05 (m, 3 H), 4,47 (m, 1 H), 2,24 (s, 1 H), 1,18–1,11 (m, 1 H), 0,56–0,47 (m, 4 H).

Etapa 4. $Cu(CH_3CN)_4PF_6$ (366 mg, 0,981 mmol) se añadió a una solución de **66–6** (2,63 g, 13,08 mmol) y **66–5** (1,5 g, 6,54 mmol) en DMF (10 mL) a 25 ºC. La mezcla de reacción se agitó a 50 ºC durante 2 h bajo N_2. El solvente se removió y el residuo se purificó por HPLC prep para dar **66–7** (3,0 g, 53%).

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO–d_6) δ 8,01 (s, 1 H), 7,83–7,81 (m, 1 H), 7,37–7,14 (m, 5 H), 5,97 (br, 1 H), 5,40–5,38 (m, 1 H), 5,03–4,99 (m, 2 H),

4,32–4,28 (m, 1 H), 2,94 (s, 2 H), 2,17–2,07 (m, 2 H), 1,30–1,10 (m, 3 H), 0,50–0,26 (m, 4 H).

Etapa 5. Una solución de **66–7** (1,0 g, 2,32 mmol), **66–8** (571 mg, 4,64 mmol) y EEDQ (1,15 g, 4,64 mmol) en DCM (15 mL) se agitó a 25 ºC durante 2 h. Después de la eliminación del solvente, el residuo se purificó por HPLC prep y SFC para dar **66–9** (500 mg) y de **66–10** (112 mg).

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO–d_6) δ 10,60 (s, 1 H), 8,10 (s, 1 H), 7,82 (d, J = 9,2 Hz, 1 H), 7,56–7,54 (m, 2 H), 7,36–7,25 (m, 7 H), 6,08–6,05 (m, 1 H), 5,51–5,43 (m, 3 H), 5,14 (t, *J* = 5,6 Hz, 1 H), 5,03 (s, 2 H), 4,44 (d, *J* = 5,6 Hz, 2 H), 4,31 (t, *J* = 8,4 Hz, 1 H), 3,04–2,97 (m, 2 H), 2,15–2,08 (m, 2 H), 1,30–1,23 (m, 3 H), 0,49–0,30 (m, 4 H).

LCMS (ESI): m/z 536,3 [M+H$^+$].

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO–d_6) δ 10,54 (s, 1 H), 8,09 (s, 1 H), 7,82–7,80 (m, 1 H), 7,56–7,54 (m, 2 H), 7,36–7,26 (m, 7 H), 6,03–6,01 (m, 1 H), 5,49–5,42 (m, 3 H), 5,13 (t, *J* = 5,6 Hz, 1 H), 5,03 (s, 2 H), 4,44 (d, *J* = 5,6 Hz, 2 H), 4,29 (t, *J* = 8,4 Hz, 1 H), 3,04–2,97 (m, 2 H), 2,14–2,05 (m, 2 H), 1,30–1,25 (m, 3 H), 0,49–0,30 (m, 4 H).

LCMS (ESI): m/z 536,4 [M+H$^+$].

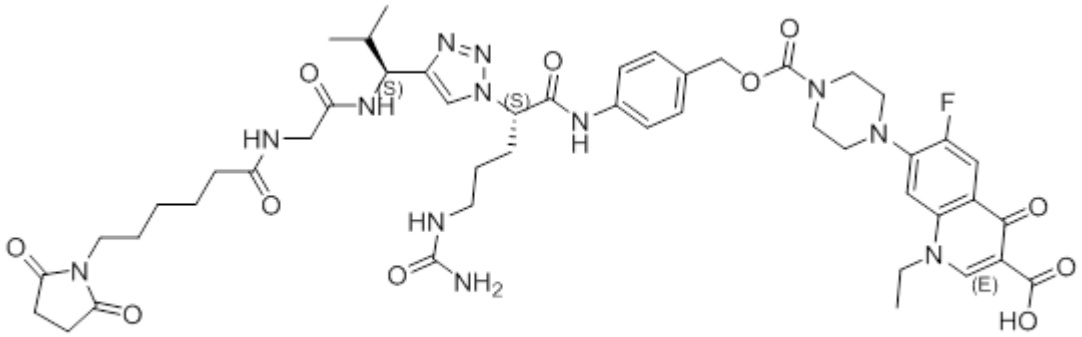
Etapa 6. A una solución de **66–9** (80 mg, 0,149 mmol) en DCM (2 mL) se añadieron carbonato de PNP (136 mg, 0,447 mmol) y DIPEA (77 mg, 0,596 mmol) a 25 ºC. La mezcla se calentó a reflujo durante 20 h. El solvente se removió y el residuo se disolvió en DMF (2 mL) y norfloxacina (72 mg, 0,224 mmol) y DIEA (96 mg, 0,745 mmol) se añadieron a 25 ºC y mezcla se agitó a 25 ºC durante 2 h. Después de la eliminación del solvente, el residuo se purificó por TLC prep (DCM/MeOH =10:1) para dar el ejemplo **66** (23 mg, 18%).

^{1}H RMN (400 MHz, MDSO–d_6) δ 15,33 (s, 1 H), 10,65 (s, 1 H), 8,96 (s, 1

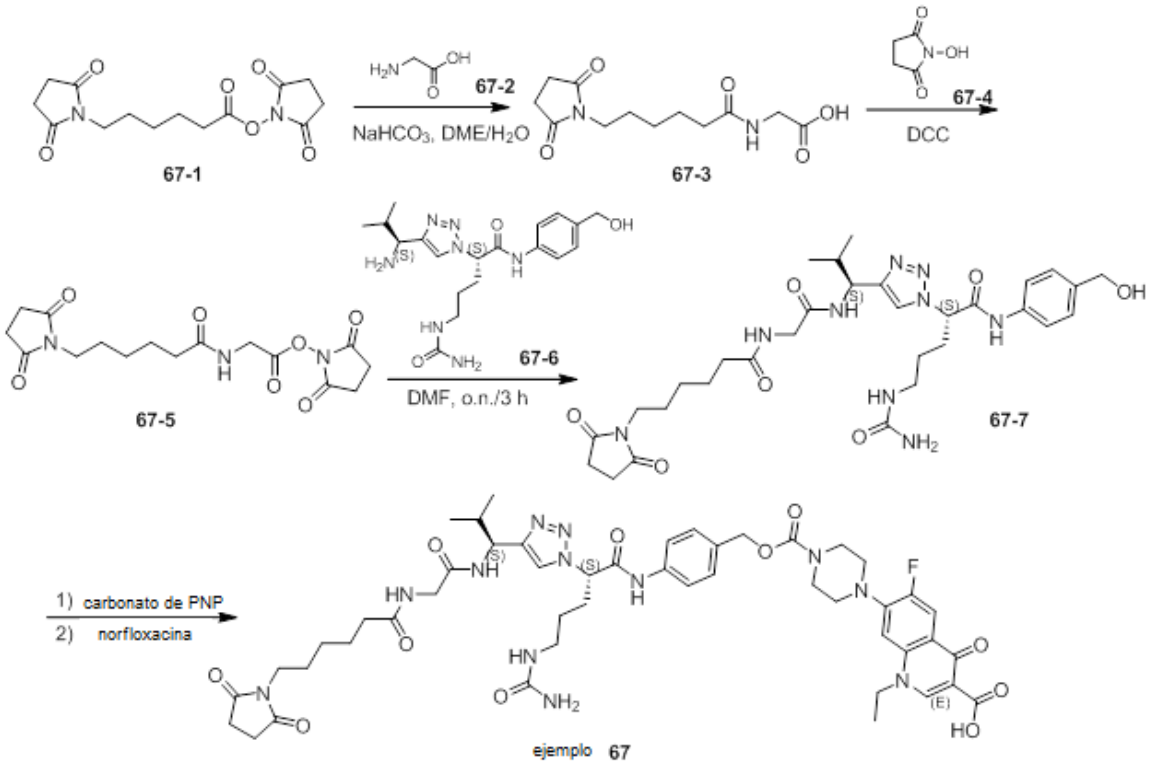
H), 8,14 (s, 1 H), 8,09 (s, 1 H), 7,96–7,81 (m, 2 H), 7,62–7,60 (m, 2 H), 7,38–7,20 (m, 8 H), 6,04–6,00 (m, 1 H), 5,48–5,43 (m, 1 H), 5,07 (s, 2 H), 5,02 (s, 2 H), 4,59–4,57 (m, 2 H), 4,40–4,31 (m, 1 H), 3,61 (s, 4 H), 3,32 (s, 4 H), 3,03–2,99 (m, 2 H), 2,20–2,11 (m, 2 H), 1,40 (t, *J* = 7,2 Hz, 3 H), 1,30–1,23 (m, 3 H), 0,48–0,23 (m, 4 H).

LCMS (ESI): m/z 881,4 [$M+H^+$].

Ejemplo 67. Ácido 7–(4–((4–((S)–2–(4–((S)–1–(2–(6–(2,5–dioxopirrolidin–1–il)hexanamido)acetamido)–2–metilpropil)–1H–1,2,3–triazol–1–il)–5–ureidopentanamido)benciloxi)carbonil)piperazin–1–il)–1–etil–6–fluoro–4–oxo–1,4–dihidroquinolin–3–carboxílico



ejemplo **67**



Etapa 1. A una solución del compuesto **67–2** (75 mg, 1 mmol) en DME (10 mL) se añadió una solución del compuesto **67–1** (310 mg, 1 mmol) y $NaHCO_3$ (252 mg, 3 mmol) en agua (10 mL). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. La mezcla se lavó con EtOAc y se acidificó a pH = 3 con 10% de HCl. La suspensión resultante se extrajo con EtOAc. La capa orgánica combinada se concentró para dar el compuesto **67–3** (270 mg, contiene impureza).

Etapa 2. A una solución del compuesto **67–3** (200 mg, 0,74 mmol) y compuesto **67–4** (90 mg, 0,777 mmol) en THF (10 mL) se añadió DCC (161 mg, 0,777 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 h bajo N_2. Se concentró y el filtrado se concentró para dar **67–5** (200 mg, rendimiento: 74 %).

Etapa 3. Compuesto **67–5** (200 mg, 0,53 mmol), compuesto **67–6** (107 mg, 0,265 mmol) se disolvieron en DMF (6 mL) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. La mezcla se filtró y se

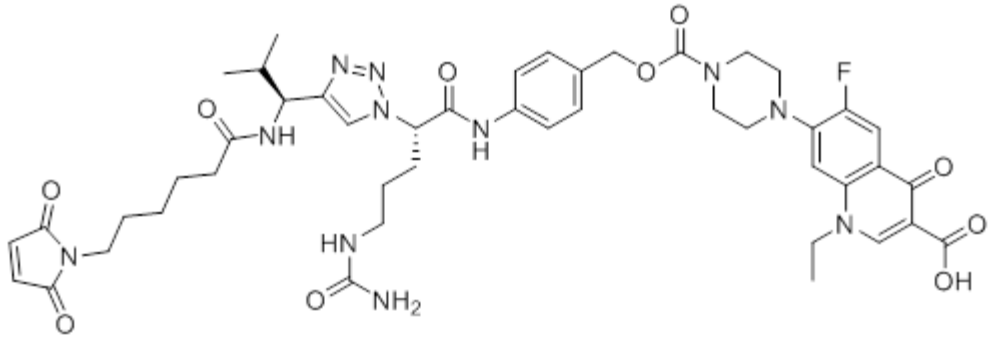
purificó por HPLC prep para dar **67–7** (25 mg, rendimiento: 6,3 %)

Etapa 4. A una solución del compuesto **67–7** (25 mg, 0,038 mmol) en DMF seca (3 mL) se añadió carbonato de PNP (25 mg, 0,076 mmol) y DIPEA (15 mg, 0,114 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 h. Norfloxacina (30 mg, 0,076 mmol) se añadió. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante otra hora. La mezcla se concentró, se filtró y se purificó por HPLC prep (FA), para dar el ejemplo **67** (20 mg, rendimiento: 48%).

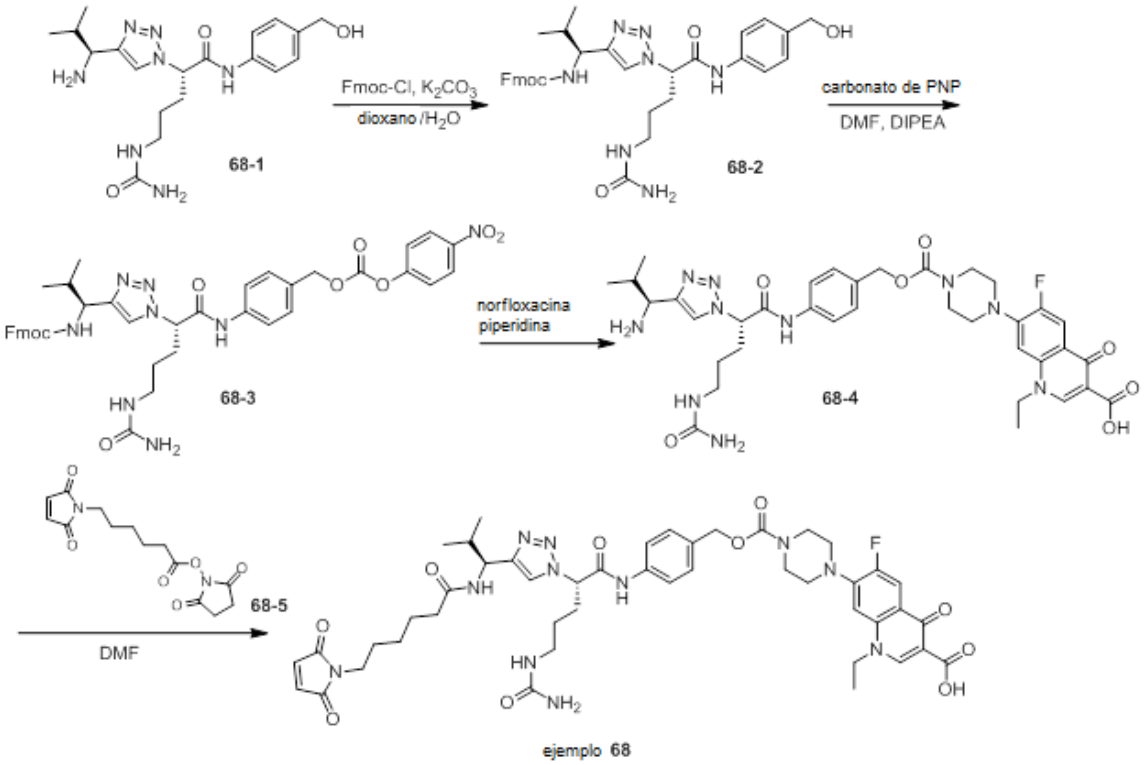
LCMS: (5–95, AB, 1,5 min, ESI), 0,802 min, MS = 501,3[1/2M+1]

^{1}H RMN Metanol–d_4 +$CDCl_3$ 400 MHz, δ 8,83 (s, 1 H), 7,99 (d, J = 13,2 Hz, 2 H), 7,59 (d, J = 6,8 Hz, 2 H), 7,35 (d, J = 8,0 Hz, 2 H), 7,11 (s, 1 H), 5,51 (s, 1 H), 5,12 (s, 2 H), 4,95 (s, 1 H), 4,47 (s, 2 H), 3,86 (s, 2 H), 3,71 (s, 4 H), 3,48 – 3,44 (m, 2 H), 3,31 (s, 4 H), 3,25 (s, 1 H), 3,15 (s, 1 H), 2,67 (s, 4 H), 2,26 – 2,20 (m, 5 H), 1,65 – 1,61 (m, 6 H), 1,58 – 1,52 (m, 1 H), 1,33 – 1,29 (m, 4 H), 0,95 (d, J = 6,8 Hz, 3 H) , 0,88 (d, J = 6,4 Hz, 3 H).

Ejemplo 68. Ácido 7–(4–((4–((S)–2–(4–((S)–1–(6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)hexanamido)–2–metilpropil)–1H–1,2,3–triazol–1–il)–5–ureidopentanamido)benciloxi)carbonil)piperazin–1–il)–1–etil–6–fluoro–4–oxo–1,4–dihidroquinolin–3–carboxílico



ejemplo 68



Etapa 1. A una solución de compuesto crudo **68–1** (500 mg, 1,24 mmol) en 1,4–dioxano/H_2O (10 mL/5 mL) se añadió K_2CO_3 (428 mg, 3 mmol) y Fmoc–Cl (416 mg, 1,6 mmol) en dioxano (10 mL) en porciones. Después de agitar la mezcla a temperatura ambiente durante 16 h, se concentró y se purificó por cromatografía en columna (15%–20% de MeOH en DCM) para dar el compuesto **68–2** (286 mg, 37%).

LCMS: (5–95, AB, 1,5 min, ESI), 0,709 min, MS = 626,1 [M+1]

^{1}H RMN Metanol–d_4 400 MHz, δ 8,06 (s, 1H), 7,80 – 7,78 (d, J = 7,2 Hz, 2 H), 7,67 – 7,63 (t, J = 6,8 Hz, 2 H), 7,58 – 7,56 (d, J = 8,4 Hz, 2 H), 7,39 – 7,27 (m, 6 H), 5,6 – 5,5 (m, 1 H), 4,69 – 4,67 (d, J = 7,2 Hz, 1 H), 4,57 (s, 2 H), 4,40 – 4,36 (m, 2 H), 4,25 – 4,15 (m, 1 H), 3,3 – 3,2 (m, 1 H), 3,2 – 3,1 (m, 1 H), 2,35 – 2,15 (m, 3 H), 1,55 – 1,35 (m, 2 H), 0,98 – 0,97(d, J = 6,8 Hz, 3 H), 0,90 – 0,88(d, J = 6,8 Hz, 3 H).

Etapa 2. A una solución del compuesto **68–2** (200 mg, 0,31 mmol) en DMF seca (5 mL) se añadió carbonato de PNP (185 mg, 0,62 mmol) y

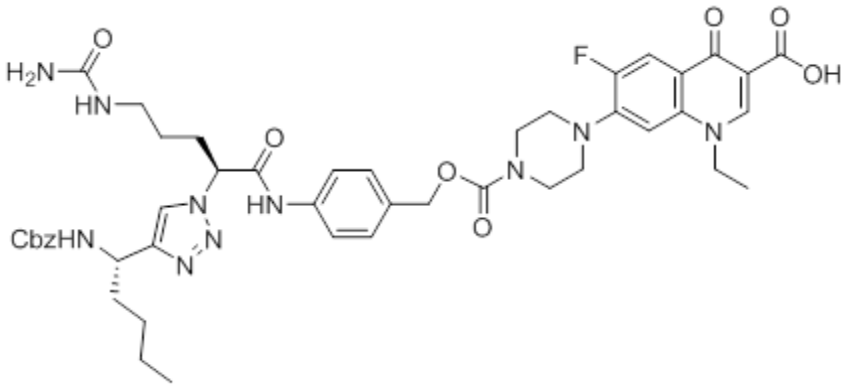
DIPEA (0,5 mL, 3,0 mmol) a temperatura ambiente y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 h bajo nitrógeno. Norfloxacina (197 mg, 0,62 mmol) se añadió. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante otra hora. A continuación, piperidina (0,1 mL, 1 mmol) se añadió. Después de 30 min, la mezcla se purificó por HPLC prep para dar el compuesto **68–4** (250 mg, contenía 4–nitrofenol). Se usó en la siguiente etapa sin ulterior purificación.

Etapa 3. A una solución del compuesto **68–4** (100 mg, 0,134 mmol) en DMF seca (2 mL) se añadió el compuesto **5** (50 mg, 0,162 mmol). La mezcla se agitó a 23 ºC durante 2 h. La mezcla se purificó por HPLC prep para dar el ejemplo **68** (20 mg, rendimiento del 16 %).

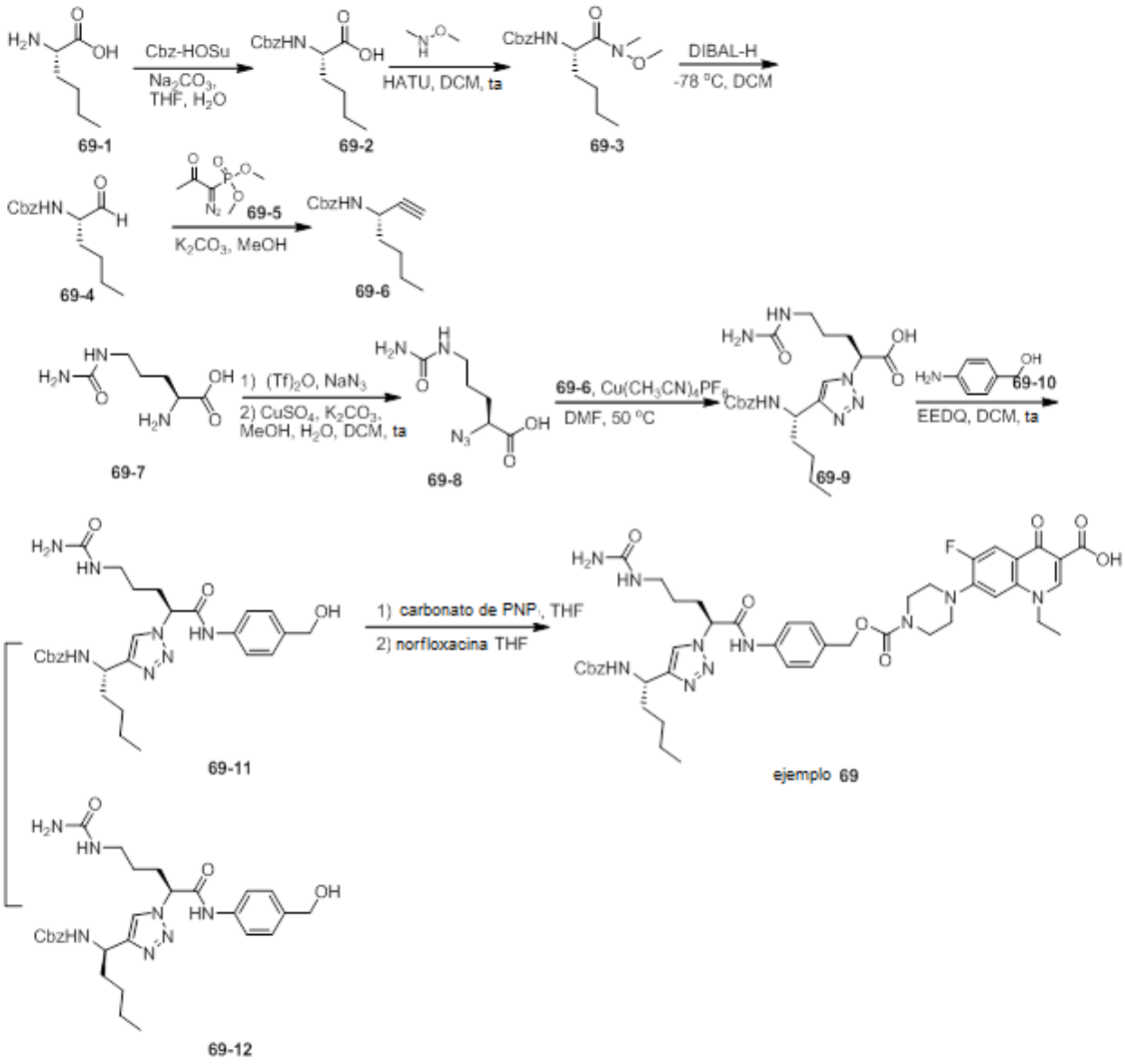
LCMS: (5–95, AB, 1,5 min, ESI), 0,803 min, MS = 942,4 [M+1], 471,8 [1/2M+1]

^{1}H RMN DMSO–d_6 400 MHz, δ 15,3 (s, 1H), 10,60 (s, 1H), 8,94 (s, 1H), 8,1(d, 1H) 8,01 (s, 1H),7,94 – 7,90 (dd, *J* = 12,8 Hz, 1 H), 7,58 – 7,56 (d, *J* = 8,8 Hz, 2 H), 7,34 – 7,32 (d, *J* = 8,8 Hz, 2 H), 7,2 (d, 1 H), 6,97 (s, 2 H), 6,0 (m, 1H), 5,5 – 5,4 (m, 1H), 5,40 (s, 2H), 5,04 (s, 2H), 4,9 – 4,85 (m, 1H), 4,6 – 4,5 (m, 2H), 3,58 (s, 4H), 3,4 – 3,3(m, 6H), 3,1 – 2,9 (m, 2H), 2,2 – 2,0 (m, 5H), 1,6 – 1,4 (m, 7H), 1,3 – 1,2 (m, 4H), 0,80 – 0,78 (d, *J* = 6,8 Hz, 3 H), 0,76 – 0,74 (d, *J* = 6,8 Hz, 3 H).

Ejemplo 69. Ácido 7–(4–((4–((S)–2–(4–((S)–1–(benciloxicarbonilamino)pentil)–1H–1,2,3–triazol–1–il)–5–ureidopentanamido)benciloxi)carbonil)piperazin–1–il)–1–etil–6–fluoro–4–oxo–1,4–dihidroquinolin–3–carboxílico



ejemplo 69



Etapa 1. A una mezcla de Na_2CO_3 acuoso (16 g, 152,5 mmol) y **69–1** (5 g, 38,1 mmol) se añadió Cbz–OSu (11,4 g, 45,7 mmol) en THF (40 mL).

Después de agitar la mezcla a temperatura ambiente durante 16 h, se ajustó a pH > 10 y se lavó con EtOAc (100 mL × 2). La capa acuosa se acidificó a pH < 1 con HCl conc. La solución se extrajo con EtOAc (200 mL × 3). La capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4 y se concentró para dar **69–2** (9,7 g, 95,9%), que se usó para la siguiente etapa sin ulterior purificación.

Etapa 2. A una mezcla de **69–2** (9,7 g, 36,6 mmol), clorhidrato de N,O–dimetilhidroxilamina (3,9 g, 40,2 mmol) y HATU (20,8 g, 54,8 mmol) en DCM (100 mL) se añadió Et_3N (21 mL, 146,2 mmol). Después de agitar la mezcla a temperatura ambiente durante 2 h, el solvente se removió y el producto crudo se extrajo en con agua (150 mL) y se extrajo con EtOAc (150 mL × 3). La capa orgánica se lavó con NaHCO3 saturado, HCl conc., NaCl saturado y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (PE: EtOAc = 2: 1) para dar **69–3** (10,1 g, 89,6%).

Etapa 3. DIBAL–H (19,5 mL, 1 M en Tol) se añadió en porciones a una solución de **69–3** (4,0 g, 13,0 mmol) en CH2Cl2 anhidro (50 mL) a –78 °C. Después de agitar la mezcla de reacción a –78 °C durante 2 h, exceso DIBAL se neutralizó con MeOH anhidro (15 mL) y la mezcla se calentó hasta temperatura ambiente Se concentró para dar **69–4** (3,2 g, crudo), que se usó para la siguiente etapa sin ulterior purificación.

Etapa 4. Después de una mezcla de **69–4** (3,2 g, 13,0 mmol), **69–5** (3,0 g, 15,6 mmol) y K_2CO_3 (3,6 g, 26,0 mmol) en MeOH (60 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 16 h, el solvente se removió y el residuo se extrajo con EtOAc (80 mL × 3). Las capas orgánicas se lavaron con salmuera (60 mL) y se secó sobre Na2SO4 anhidro, se concentró y se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (PE: EtOAc = 10: 1) para dar **69–6** (1,9 g, 60,3%).

Etapa 5. Tf_2O (3,3 mL, 19,6 mmol) se añadió lentamente a una solución de NaN_3 (6,3 g, 97,8 mmol) en H_2O (30 mL) y CH_2Cl_2 (48 mL) a 0 ºC. Después de agitar durante 2 h, la fase orgánica se separó y la fase acuosa se extrajo con CH_2Cl_2 (24 mL×2). Las fracciones de capa orgánica, que contenían la azida de triflilo, se reunieron y se lavaron una vez con Na2CO3 saturado y se usó sin ulterior purificación. La solución de azida de triflilo en CH_2Cl_2 se añadió a una mezcla de **69–7** (1,71 g, 13,9 mmol), K_2CO_3 (2,03 g, 14,67 mmol) y $CuSO_4{,}5H_2O$ (245 mg, 0,98 mmol) en H_2O (54 mL) y MeOH (108 mL). Después de agitar la mezcla a 26 °C durante 12 h, los solventes orgánicos se eliminaron a presión reducida y la suspensión acuosa se diluyó con H_2O (200 mL). La mezcla se acidificó a pH 6 con HCl conc. y se diluyó con tampones de fosfato (0,2 M, pH 6,2, 200 mL) y se lavó con EtOAc (300 mL × 2). La fase acuosa luego se acidificó a pH = 2 con HCl conc. Se extrajo con (300 mL × 3) y los extractos se secaron sobre Na2SO4 y se concentraron para dar **69–8**, que se usó para la siguiente etapa sin ulterior purificación.

Etapa 6. Después de una mezcla de **69–8** (2,0 g, 9,78 mmol), **69–6** (1,2 g, 4,89 mmol) y $Cu(CH_3CN)_4PF_6$ (273 mg, 0,73 mmol) en DMF (5 mL) se agitó a 50 °C durante 2 h, el solvente se removió y el residuo se purificó por HPLC prep para dar **69–9** (600 mg, 27,5%).

Etapa 7. Después de una mezcla de **69–9** (600 mg, 1,34 mmol), **69–10** (496 mg, 4,03 mmol) y EEDQ (996 mg, 4,03 mmol) en DCM (15 mL) se agitó a 23 °C durante 4 h, el solvente se removió y el residuo se purificó por HPLC prep y SFC para dar **69–11** (350 mg, 47,4%) y **69–12** (23,1 mg).

^{1}H RMN (400 MHz, MeOD) δ 8,02 (s, 1 H), 7,54 (d, J = 6,8 Hz, 2 H), 7,34–7,25 (m, 7 H), 5,49–5,46 (m, 1 H), 5,08 (s, 2 H), 4,55 (s, 2 H), 3,37–3,33 (m, 1 H), 3,24–3,16 (m, 1 H), 2,24–1,80 (m, 3 H), 1,45–1,43

(m, 7 H), 1,41 (s, 3 H).

LCMS (ESI): m/z 552,1 [M+H$^+$].

^{1}H RMN (400 MHz, MeOD) δ 10,53 (s, 1 H), 8,03 (s, 1 H), 7,55 (d, J = 9,2 Hz, 1 H), 7,35 (d, J = 4,0 Hz, 2 H), 7,31–7,26 (m, 7 H), 6,04 (s, 1 H), 5,50–5,43 (m, 3 H), 5,12 –5,03 (m, 3 H), 4,77–4,73 (m, 1 H), 4,44 (d, J = 3,2 Hz, 2 H), 3,08–2,91 (m, 2 H), 2,24–2,16 (m, 2 H), 1,90–1,71 (m, 2 H), 1,35–1,20 (m, 6 H), 0,86–0,83 (m, 3 H).

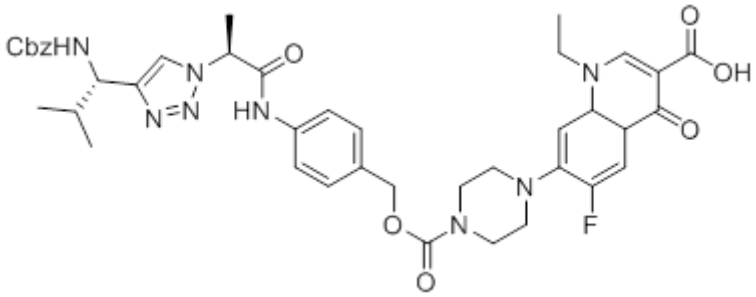
LCMS (ESI): m/z 552,2 [M+H$^+$].

Etapa 8. Una mezcla de **69–11** (100 mg, 0,18 mmol), carbonato de PNP (109 mg, 0,36 mmol) y DIPEA (70 mg, 0,54 mmol) en DCM (5 mL) se agitó a 50 °C durante 12 h. Se concentró y se añadió a una mezcla de DIPEA (70 mg, 0,54 mmol) y norfloxacina (172 mg, 0,54 mmol) en DMF (5 mL). Después de agitar a 23 °C durante 4 h, el solvente se removió y el residuo se purificó por HPLC prep para dar el ejemplo **69** (69,3 mg, 43%).

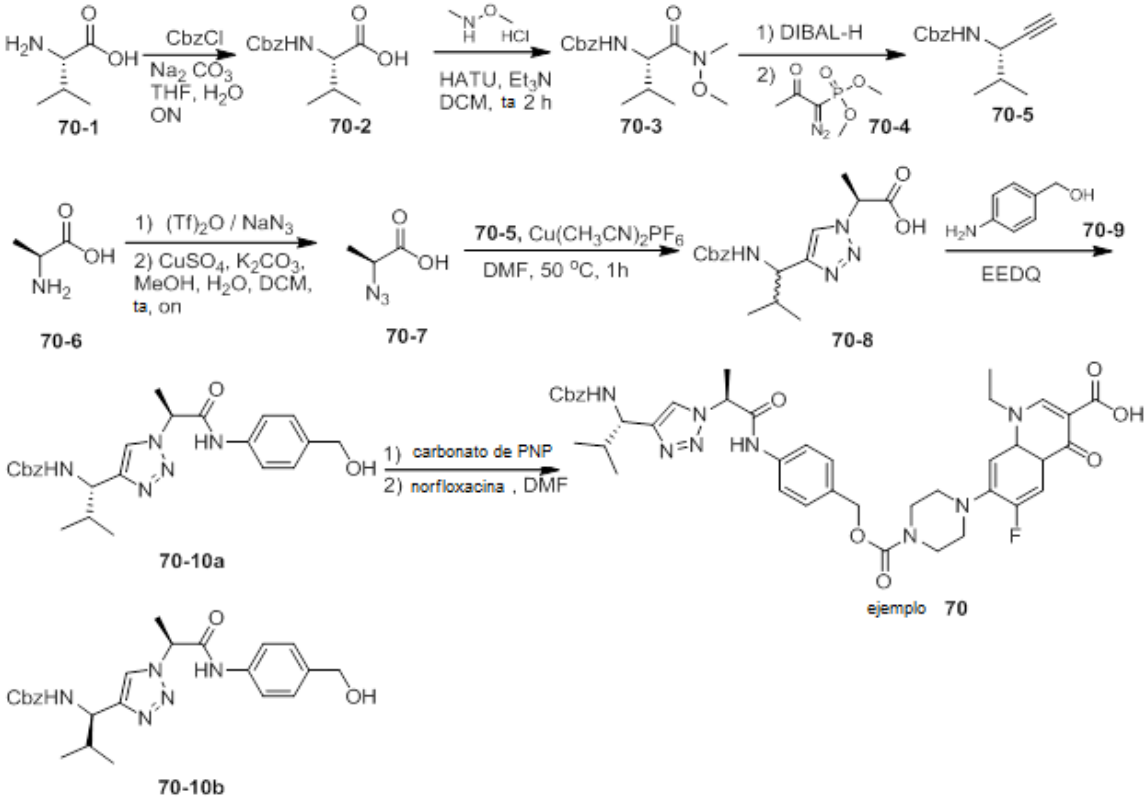
^{1}H RMN (400 MHz, DMSO–d_6) δ 15,32 (s, 1 H), 10,63 (s, 1H), 8,96 (s, 1 H), 8,02 (s, 1 H), 7,94 (d, J =12,8 Hz, 1 H), 7,70 (d, J = 8,0 Hz, 1 H), 7,60 (d, J = 8,8 Hz, 2 H), 7,38–7,20 (m, 8 H), 6,03 (s, 1 H), 5,49–5,42 (m, 3 H), 5,07 (s, 2 H), 5,04 (d, J = 4,0 Hz, 2 H), 4,72–4,71 (m, 1 H), 4,58–4,57 (m, 2 H), 3,67 (s, 4 H), 3,61 (s, 4 H), 3,06–3,01 (m, 2 H), 2,12–2,07 (m, 2 H), 1,80–1,68 (m, 2 H), 1,42–1,38 (m, 3 H), 1,34 (s, 6 H), 0,84 (s, 3 H).

LCMS (ESI): m/z 897,4 [M+H$^+$].

Ejemplo 70: ácido 7–(4–((4–((S)–2–(4–((S)–1–(benciloxicarbonilamino)–2–metilpropil)–1H–1,2,3 triazol–1–il)propanamido)benciloxi)carbonil)piperazin–1–il)–1–etil–6–fluoro–4–oxo–1,4,4a,8a–tetrahidroquinolin–3–carboxílico



ejemplo 70



Etapa 1. A una mezcla del compuesto **70–1** (3,0 g, 25,61 mmol) en agua (20 mL) se añadió Na_2CO_3 (2,71 g, 25,61 mmol). CbzCl (4,81 g, 28,17 mmol) se añadió y la mezcla de reacción se agitó a 28 ºC durante 16 h. La mezcla se filtró y se extrajo con EtOAc (15 mL × 2). La capa orgánica combinada se secó sobre Na_2SO_4 y se concentró a presión reducida para dar el compuesto **70–2** (5,9 g, 92%).

^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8,21–7,30 (m, 5 H), 5,86 (br, 1 H), 5,15 (s, 2 H), 4,37–4,34 (m, 1 H), 2,28–2,21 (m, 1 H), 1,01–0,84 (m, 6 H).

Etapa 2. A una solución del compuesto **70–2** (5,9 g, 23,48 mmol),

clorhidrato de N–metoximetanamina (2,52 g, 25,83 mmol) y Et_3N (7,13 g, 70,44 mmol) en DCM (60 mL) se añadió HATU (13,4 g, 35,22 mmol) a 28 ºC. Después de agitar la mezcla a 28 ºC durante 3 h, el solvente se removió y el residuo se disolvió en agua (30 mL). La capa acuosa se extrajo con EtOAc (80 mL × 3). Las capas orgánicas se combinaron, se secaron sobre Na_2SO_4 y se concentró. El producto crudo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (PE/EtOAc = 2:1) para dar el compuesto **70–3** (4,5 g, 65%).

LCMS (ESI): m/z 295,1 [$M+H^+$].

Etapa 3. A una mezcla del compuesto **70–3** (588 mg, 2,0 mmol) en DCM (8 mL) a –78 ºC se añadió en porciones DIBAL–H en tolueno (1 M, 2,4 mL, 2,4 mmol). Después de agitar la mezcla a –78 ºC durante 2 h, MeOH (1 mL) se añadió en porciones. La mezcla se dejó calentar hasta temperatura ambiente El solvente se removió y el producto crudo se usó directamente en la siguiente etapa.

A una solución del crudo anterior en MeOH (5 mL) se añadió K_2CO_3 (553 mg, 4,0 mmol) y compuesto **70–4** (461 mg, 2,4 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 26 ^oC durante 8 h. El solvente se removió y el residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (PE/EtOAc = 20:1) para dar el compuesto **70–5** (300 mg, 65,2%).

LCMS (ESI): m/z 232,1 [$M+H^+$].

Etapa 4. A la mezcla de NaN_3 (2,0 g, 30,76 mmol) en H_2O destilada (4,5 mL) y DCM (7,5 mL) se añadió Tf_2O (1,57 g, 5,55 mmol) en porciones a 0 ºC. La mezcla se agitó a 0 ºC durante 3 h. La capa acuosa se extrajo con DCM (4 mL × 2) y se lavó con solución saturada de Na2CO3 (8 mL).

A una mezcla del compuesto **70–6** (249 mg, 2,79 mmol), K_2CO_3 (578 mg, 4,19 mmol) y $CuSO_4$ $5H_2O$ (7 mg, 27,9 umol) en H_2O (9 mL) y MeOH (18 mL) se añadió la azida de triflilo en DCM (15,5 mL) en porciones.

Después de agitar la mezcla a 26 ^{o}C durante la noche, los solventes orgánicos se eliminaron a presión reducida y la suspensión acuosa se diluyó con H_2O (50 mL). Se acidificó a pH 6 con HCl conc., se diluyó con tampones de fosfato (0,2 M, pH 6,2, 50 mL) y se extrajeron con EtOAc (50 mL × 2). La fase acuosa luego se acidificó a pH 2 con HCl conc. y se extrajo con EtOAc (80 mL × 3). La capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4 y se evaporó para dar **70–7**, que se usó para la siguiente etapa sin ulterior purificación.

Etapa 5. A una solución del compuesto **70–7** (321 mg, 2,79 mmol) y compuesto **70–5** (278 mg, 1,2 mmol) en DMF (3 mL), se añadió $Cu(CH_3CN)_4PF_6$ (67 mg, 0,18 mmol). La mezcla de reacción se calentó a 50 ºC durante 2 h bajo N_2. Después de la eliminación del solvente, el residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (2,5–5% de MeOH en DCM) para dar el compuesto **70–8** (90 mg, 22%).

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO–d_6) δ 7,65 (s, 1 H), 7,37–7,32 (m, 5 H), 5,05 (s, 2 H), 4,64 (s, 1 H), 3,35 (s, 4 H), 2,02 (s, 1 H), 0,85–0,67 (m, 6 H).

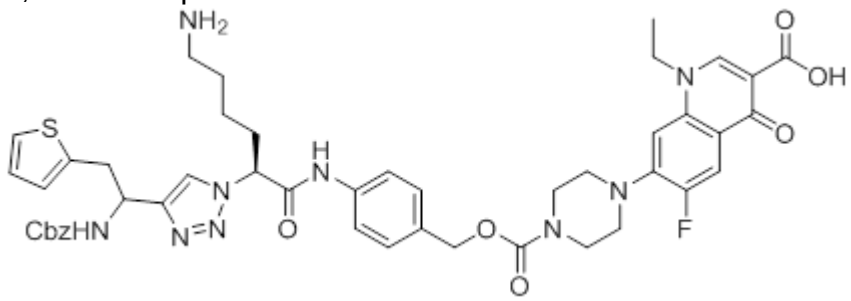
Etapa 6. A una solución del compuesto **70–8** (1,4 g, 4,04 mmol) y compuesto **70–9** (1,49 g, 12,12 mmol) en DCM (15 mL) se añadió EEDQ (3,0 g, 12,12 mmol) a 25 ºC. Después de agitar la mezcla de reacción a 25 ºC durante 2 h, el solvente se removió, el residuo se purificó por HPLC prep para dar una mezcla (1,1 g). Los dos isómeros se purificaron por separación por SFC para dar **70–10a** (250 mg) y otro enantiómero **70–10b** (116 mg).

^{1}H RMN (400 MHz, MeOD) δ 8,03 (s, 1 H), 7,57–7,54 (m, 2 H), 7,35–7,28 (m, 7 H), 5,57 (q, J = 7,2 Hz, 1 H), 5,13–5,06 (m, 2 H), 4,72–4,65 (m, 1 H), 4,58 (s, 2 H), 2,21–2,17 (m, 1 H), 1,87 (d, J = 7,2 Hz, 3 H), 0,97 (d, J = 6,8 Hz, 3 H), 0,90 (d, J = 6,8 Hz, 3 H). LCMS (ESI): m/z 452,2 [M+H^{+}].

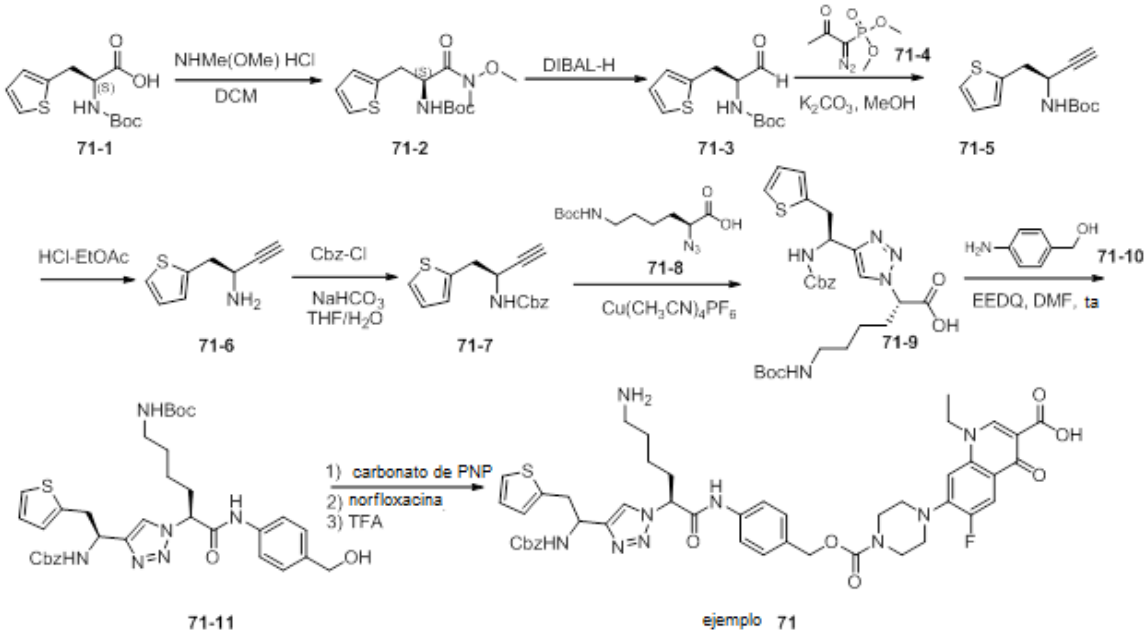
Etapa 7. A una solución de **70–10a** (100 mg, 0,221 mmol) en THF (3 mL) se añadieron carbonato de PNP (202 mg, 0,663 mmol) y DIPEA (114 mg, 0,884 mmol) a 25 ºC. Después de la mezcla se calentó a reflujo durante 24 h, el solvente se removió y el residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (DCM/MeOH = 20:1) para dar el intermediario (90 mg). A una solución de norfloxacina (70 mg, 0,219 mmol) en DMF (2 mL) se añadió DIPEA (94 mg, 0,73 mmol). Después de agitar la solución a 25 ºC durante 15 min, el intermediario anterior (90 mg, 0,219 mmol) se añadió. La mezcla se agitó a 25 ºC durante 2 h. El solvente se removió y el residuo se purificó por TLC prep (DCM/MeOH = 10:1) para dar el ejemplo **70** (26,5 mg, 23%).

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO–d_6) δ 15,32 (s, 1 H), 10,61 (s, 1 H), 8,98 (s, 1 H), 8,07 (s, 1 H), 7,95–7,92 (m, 1 H), 7,71–7,58 (m, 3 H), 7,38–7,16 (m, 8 H), 5,52 (m, 1 H), 5,10–5,00 (m, 4 H), 4,63–4,52 (m, 3 H), 3,60 (s, 4 H), 3,30 (s, 4 H), 2,10–2,00 (m, 1 H), 1,75 (d, J = 7,6 Hz, 3 H), 1,42 (t, J = 7,6 Hz, 3 H), 0,88–0,75 (m, 6H). LCMS (ESI): m/z 797,6 [M+H$^+$].

Ejemplo 71. Ácido 7–(4–((4–((2S)–6–amino–2–(4–(1–(benciloxicarbonilamino)–2–(tiofen–2–il)etil)–1H–1,2,3–triazol–1–il)hexanamido)benciloxi)carbonil)piperazin–1–il)–1–etil–6–fluoro–4–oxo–1,4–dihidroquinolin–3–carboxílico



ejemplo 71



Etapa 1. A una mezcla del compuesto **71–1** (500 mg, 1,84 mmol) en DCM anhidra (20 mL) se añadió Et_3N (559 mg, 5,52 mmol) y HATU (1,049 g, 2,76 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 15 min, luego NHMe(OMe)HCl (269 mg, 2,76 mmol) se añadió. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla se extrajo con EtOAc (30 mL× 3) y agua (30 mL), La capa orgánica combinada se secó, se concentró y se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (PE: EtOAc = 2: 1) para dar **71–2** (500 mg, 86,4 %).

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO–d_6) δ 7,34 (d, J = 4,8 Hz, 1H), 7,22 (d, J = 9,2 Hz, 1H), 6,94 – 6,89 (m, 2H), 4,56 (s, 1H), 3,70 (s, 3H), 3,11 (s, 3H), 3,09 – 2,95 (m, 2H), 1,35 (s, 9H).

Etapa 2. Compuesto **71–2** (500 mg, 1,59 mmol) se disolvió en CH2Cl2 anhidro (5 mL) y se enfrió hasta –78 °C en un baño de hielo seco / acetona. DIBAL–H (4,8 mL, 4,77 mmol, 1,0 M en tolueno) se añadió en porciones y la solución resultante se agitó a –78 °C durante 3 h. Exceso de hidruro se neutralizó con MeOH (5 mL) y la solución resultante se calentó hasta temperatura ambiente La solución se evaporó para dar el

compuesto **71–3** sin ulterior purificación.

Etapa 3. A una solución de compuesto crudo **71–3** (406 mg, 1,59 mmol), compuesto **71–4** (611 mg, 3,18 mmol) en MeOH (20 mL) se añadió K_2CO_3 (659 mg, 4,77 mmol). La mezcla de reacción se agitó a r.t durante la noche. La mezcla se concentró al vacío y se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (PE: EtOAc = 5: 1) para dar **71–5** (250 mg, 62,3 %).

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO–d_6) δ 7,45 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,35 (dd, J = 4,8, 1,2 Hz, 1H), 6,96 – 6,92 (m, 2H), 4,35 – 4,31 (m, 1H), 3,19 (d, J = 1,2 Hz, 1H), 3,10 – 3,08 (m, 2H), 1,36 (s, 9H).

Etapa 4. A una solución del compuesto **71–5** (250 mg, 0,99 mmol) en DCM (5 mL) se añadió HCl–EtOAc (5 mL, 4,0 M, 20,00 mmol) en porciones a 0 ^{o}C. La mezcla de reacción se agitó a 0 ^{o}C durante 1 h. La mezcla se concentró al vacío a 25 ^{o}C para dar **71–6** en forma de una sal de HCl (180 mg, 96,9 %).

Etapa 5. Cbz–Cl (287 mg, 1,68 mmol) en THF (2 mL) se añadió en porciones en una solución del compuesto **71–6** (170 mg, 0,91 mmol) en solución acuosa saturada de $NaHCO_3$ (2 mL). La mezcla de reacción se agitó a 0 ^{o}C durante 1 h. La mezcla se extrajo con EtOAc (10 mL × 3) y H_2O (10 mL). La capa orgánica combinada se secó sobre Na_2SO_4, se filtró y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (PE: EtOAc = 5:1) para dar el compuesto **71–7** (250 mg, 96,3 %).

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO–d_6) δ 7,93 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,38 – 7,31 (m, 6H), 6,96 – 6,93 (m, 2H), 5,02 (s, 2H), 4,45 – 4,39 (m, 1H), 3,26 (d, J = 2,0 Hz, 1H), 3,13 (dd, J = 6,8, 2,0 Hz, 2H).

Etapa 6. A la solución del compuesto **71–7** (280 mg, 0,98 mmol) y Compuesto **71–8** (400 mg, 1,47 mmol) en DMF (5 mL) se añadió

$Cu(CH_3CN)_4PF_6$ (37 mg, 0,1 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 50 °C durante 2 h para dar **71–9** que se usó directamente para la siguiente etapa.

Etapa 7. A la mezcla de compuesto crudo **71– 9** (547 mg, 0,98 mmol) en DMF (5 mL) se añadió EEDQ (484 mg, 1,96 mmol) y compuesto **71–10** (181 mg, 1,47 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente bajo N_2 durante la noche. La mezcla se purificó por HPLC prep para dar **71–11** (100 mg, 15,4 %).

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO–d_6) δ 10,54 (s, 1H), 8,11 – 8,06 (m, 1H), 7,90 (t, J = 8,4 Hz, 1H), 7,53 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 7,36 – 7,26 (m, 8H), 6,92 – 6,89 (m, 1H), 6,85 (d, J = 3,2 Hz, 1H), 6,79 (t, J = 4,8 Hz, 1H), 5,44 – 5,40 (m, 1H), 5,14 (t, J = 6,0 Hz, 1H), 5,06 – 4,93 (m, 3H), 4,44 (d, J = 5,6 Hz, 2H), 3,43 – 3,38 (m, 1H), 3,01 – 3,24 (m, 1H), 2,90 – 2,85 (m, 2H), 2,12 – 2,07 (m, 2H), 1,43 – 1,39 (m, 2H), 1,37 (s, 9H), 1,18 – 1,10 (m, 2H).

Etapa 8. A la solución del compuesto **71–11** (100 mg, 0,15 mmol) en DMF anhidra (2 mL) se añadió DIPEA (116 mg, 0,90 mmol), carbonato de PNP (91 mg, 0,30 mmol) 0 ^{o}C. Después de agitar la mezcla de reacción a 0 ^{o}C durante 2 h, norfloxacina se añadió. La mezcla se agitó a ^{o}C durante otra hora y se purificó por HPLC prep para dar el compuesto **71–12** (120 mg, 79,4 %).

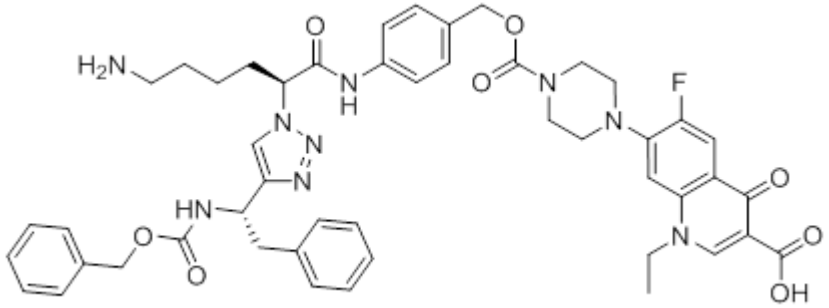
Etapa 9. A la mezcla del compuesto **71–12** (100 mg, 0,10 mmol) en DCM anhidra (2,5 mL) se añadió TFA (0,5 mL). La mezcla de reacción se agitó a 0 ºC durante 1 h. A continuación, la mezcla se diluyó con DMF y se ajustó a pH 8 con NH_3H_2O en porciones. La mezcla resultante se purificó por HPLC prep para obtener el ejemplo **71** (63 mg, 69,4 %).

LCMS (ESI): RT = 0,830 min, M/2+H$^+$ = 454,8. Método = 5–95 /2 min.

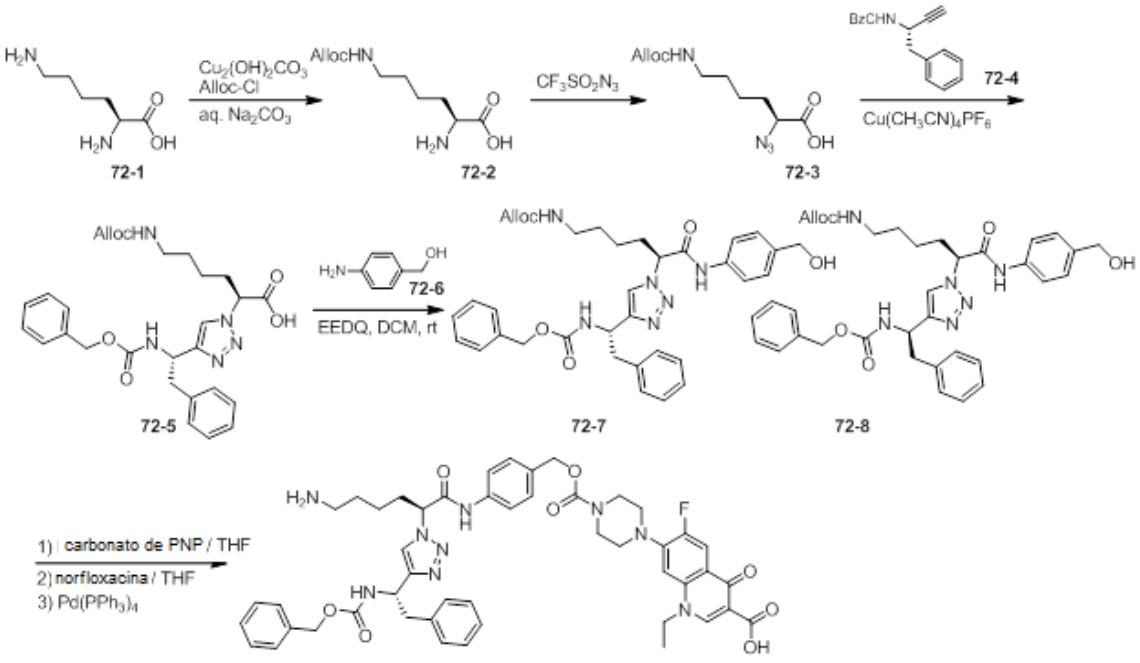
^{1}H RMN (400 MHz, DMSO–d_6) δ 10,84 (bs, 1H), 8,96 (s, 1H), 8,46 (s,

1H), 8,13 – 8,09 (m, 1H), 7,96 – 7,89 (m, 2H), 7,61 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H), 7,38 – 7,30 (m, 8H), 7,21 (d, *J* = 7,2 Hz, 1H), 6,92 – 6,90 (m, 1H), 6,86 (d, *J* = 2,0 Hz, 1H), 5,49 – 5,45 (m, 1H), 5,08 – 4,92 (m, 5H), 4,60 – 4,55 (m, 2H), 3,61 (s, 4H), 3,34 – 3,26 (m, 6H), 2,70 – 2,66 (m, 2H), 2,19 – 2,08 (m, 2H), 1,57 – 1,49 (m, 2H), 1,42 – 1,37 (m, 3H), 1,23 – 1,16 (m, 2H).

Ejemplo 72. Ácido 7–(4–((4–((S)–6–amino–2–(4–((S)–1–(benciloxicarbonilamino)–2–feniletil)–1H–1,2,3–triazol–1–il)hexanamido)benciloxi)carbonil)piperazin–1–il)–1–etil–6–fluoro–4–oxo–1,4–dihidroquinolin–3–carboxílico.



ejemplo 21



ejemplo 72

Etapa 1. A una solución del compuesto **72–1** (14,7 g, 0,1 mol) en agua (300 mL) se añadió $Cu_2(OH)_2CO_3$ (38 g, 0,1 mol). Se calentó a reflujo durante 1 h. El sólido se filtró y el pH del filtrado se ajustó a 9,0 por adición de Na_2CO_3. Alloc–Cl (14,4 g, 0,12 mmol) se añadió en porciones a 0 ºC, mientras que el pH se mantuvo a 9,0 por adición de Na_2CO_3. La mezcla se agitó durante 12 h a temperatura ambiente. El sólido azul se recolectó por filtración y se redisolvió en agua (300 mL). Tioacetamida (20 mmol) se añadió y la solución se agitó a 50 ^oC durante 3 h. La solución se acidificó con HCl a pH 2,0 y se hirvió durante 10 min. CuS se filtró y la solución se concentró a 100 mL y **72–2** se recolectó por filtración.

^1H RMN (400 MHz, MeOD) δ 5,94–5,88 (m, 1 H), 5,30–5,26 (m, 1 H), 5,18–5,15 (m, 1 H), 4,55–4,93 (m, 1 H), 3,50 (brs, 1 H), 3,13–3,09 (m, 2 H), 2,00–1,70 (m, 2 H), 1,54–1,41 (m, 4 H).

Etapa 2. A la solución de NaN_3 (1,78 g, 27,45 mmol) en una mezcla de H_2O (5 mL) y DCM (7,5 mL) se añadió Tf_2O (0,93 mL, 5,55 mmol). Después de agitar la mezcla a temperatura ambiente durante 2 h, se extrajo con DCM (50 mL×3). La capa orgánica se lavó con Na_2CO_3 acuoso y se concentró a 10 mL. El compuesto **72–2** (640 mg, 2,8 mmol) se añadió, seguido por K_2CO_3 (577 mg, 4,19 mmol), $CuSO_4$ (7 mg, 0,028 mmol), H_2O (9 mL) y MeOH (18 mL). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 12 h. La capa orgánica solventes se evaporaron, la solución se diluyó con agua y el pH se ajustó a 6,0 con HCl y se diluyó con tampones de fosfato (0,25 M, pH 6,2, 50 mL). La mezcla se extrajo con EtOAc (50 mL × 3). La capa orgánica se secó para dar el compuesto **72–3**, que se usó para la siguiente etapa sin ulterior purificación.

Etapa 3. A la solución de **72–3** (560 mg, 2 mmol) en DMF (5 mL) se añadió **72–4** (1,12 g, 4,0 mmol) y cat. $Cu(CH_3CN)_4PF_6$. La mezcla se

agitó a 50 ºC durante 3 h bajo N_2. Después de remover el solvente, el residuo se purificó por HPLC prep para dar **72–5**.

LCMS (ESI): m/z 536,2 [M+H^+]

Etapa 4. A la solución de **72–5** (480 mg, 1,0 mmol) en DCM (10 mL) se añadió EEDQ (247 mg, 1,0 mmol) y **72–6** (123 g, 1,0 mmol) y la mezcla se agitó a 0 ºC durante 1 h bajo N_2. Después de remover el solvente, el residuo se purificó con HPLC prep y separación por SFC para dar **72–7** y **72–8**.

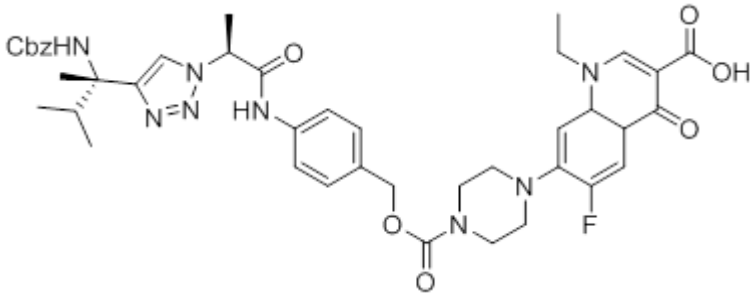
^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,91 (s, 1 H), 7,55–7,52 (m, 2 H), 7,33–7,15 (m, 12 H), 5,89–5,87 (m, 1 H), 5,42–5,38 (m, 1 H), 5,28–5,23 (m, 1 H), 5,15–5,02 (m, 3 H), 4,58 (s, 2 H), 4,51–4,47 (m, 2 H), 3,31–3,05 (m, 4 H), 2,20–2,15 (m, 2 H), 1,53–1,50 (m, 2 H), 1,31–1,21 (m, 2 H). LCMS (ESI): m/z 641,1 [M+H^+].

^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,95 (s, 1 H), 7,56 (d, J = 8,4 Hz, 2 H), 7,35–7,17 (m, 12 H), 5,95–5,88 (m, 1 H), 5,45–5,41 (m, 1 H), 5,30–5,26 (m, 1 H), 5,18–5,03 (m, 3 H), 4,58 (s, 2 H), 4,51–4,50 (m, 2 H), 3,31–3,23 (m, 1 H), 3,15–3,01 (m, 3 H), 2,23–2,15 (m, 2 H), 1,56–1,53 (m, 2 H), 1,32–1,22 (m, 2 H). LCMS: m/z 641,1 [M+H^+].

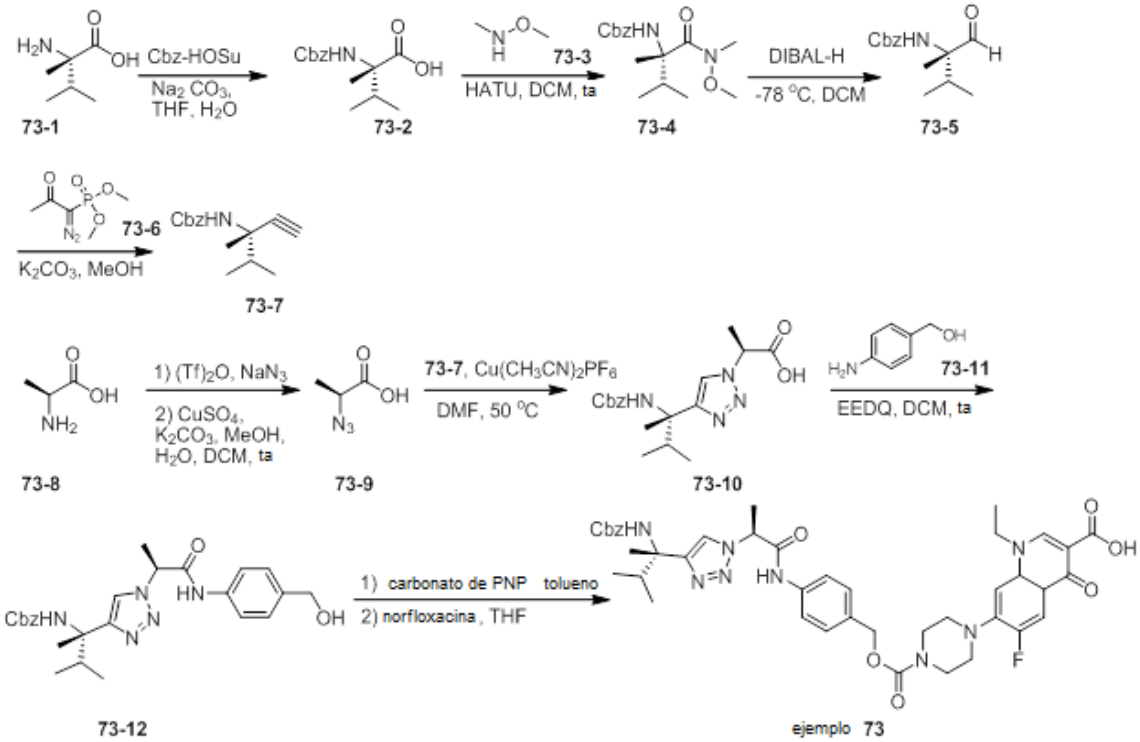
Etapa 5. A la solución de **72–7** (59 mg, 0,1 mmol) en DCM seca (30 mL) se añadió carbonato de PNP (62 mg, 0,2 mmol) y DIPEA (1 mL). La mezcla se calentó a reflujo durante 16 h. Después de remover el solvente, el residuo se disolvió en DMF (5 mL). DIPEA (0,2 mL) y norfloxacina (65 mg, 0,2 mmol) se añadieron. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. Después de remover el solvente, el residuo se purificó por columna. Al intermediario en THF seco (10 mL) se añadió $Pd(PPh_3)_4$ (116 mg, 0,1 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 12 h bajo N_2. Después de remover el solvente, el residuo se purificó por columna en gel de sílice para dar el ejemplo **72**.

^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8,86 (s, 1 H), 8,47 (s, 1 H), 8,01–7,93 (m, 2 H), 7,59–7,57 (m, 2 H), 7,39–7,37 (m, 2 H), 7,27–7,14 (m, 11 H), 5,41 (s, 1 H), 5,14 (s, 2 H), 5,09–4,92 (m, 3 H), 4,59–4,50 (m, 2 H), 3,72–3,71 (m, 4 H), 3,30 (s, 4 H), 3,21–3,19 (m, 2 H), 2,89–2,85 (m, 2 H), 2,25–2,23 (m, 2 H), 1,69–1,67 (m, 2 H), 1,52–1,49 (m, 3 H), 1,40–1,20 (m, 2 H). LCMS (ESI): m/z 902,5 [M+H$^+$].

Ejemplo 73: ácido 7–(4–((4–((S)–2–(4–((S)–2–(benciloxicarbonilamino)–3–metilbutan–2–il)–1H–1,2,3–triazol–1–il)propanamido)benciloxi)carbonil)piperazin–1–il)–1–etil–6–fluoro–4–oxo–1,4,4a,8a–tetrahidroquinolin–3–carboxílico



ejemplo 73



Etapa 1. A una mezcla de Na_2CO_3 acuoso (82 g, 0,78 mol) y compuesto **73–1** (20 g, 0,19 mol) se añadió Cbz–OSu (57 g, 0,23 mol) en THF (150 mL). Después de agitar la mezcla a temperatura ambiente durante 16 h, se ajustó a pH > 10 y la solución se extrajo con EtOAc (400 mL × 2). La capa acuosa se acidificó a pH < 1 con HCl conc. y la solución se extrajo con EtOAc (500 mL × 2). Las capas orgánicas se secaron sobre Na2SO4 y se concentraron para dar el compuesto **73–2** (45 g, 0,19 mol), que se usó para la siguiente etapa sin ulterior purificación.

Etapa 2. A una mezcla del compuesto **73–2** (20 g, 84,3 mmol), Clorhidrato de *N,O*–dimetilhidroxilamina (8,9 g, 92,7 mmol) y HATU (48,1 g, 126,4 mmol) en DCM (200 mL) se añadió Et_3N (48,7 mL, 337,2 mmol). Después de agitar la mezcla a temperatura ambiente durante 2 h, el solvente se removió y el residuo se extrajo en con agua (300 mL). La capa acuosa se extrajo con EtOAc (300 mL × 3). La capa orgánica se lavó con NaHCO3 saturado (100 mL), HCl conc. (100 mL), NaCl saturado (100 mL). El solvente se removió y el residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (PE: EtOAc = 2: 1) para dar el compuesto **73–4** (12,9 g, 46,0 mmol).

Etapa 3. DIBAL (17,8 mL, 1 M en Tol) se añadió en porciones a una solución del compuesto **73–4** (4,15 g, 14,8 mmol) en CH2Cl2 anhidro (100 mL) at–78 °C. La solución resultante se agitó a –78 °C durante 2 h y exceso DIBAL se neutralizó con MeOH anhidro (5 mL) y la solución resultante se calentó hasta temperatura ambiente La solución se concentró para dar el compuesto **73–5** (3,27 g, 14,8 mmol), que se usó para la siguiente etapa sin ulterior purificación.

Etapa 4. Después de una mezcla del compuesto **75–5** (3,27 g, 14,8 mmol), **73–6** (2,96 g, 17,8 mmol) y K_2CO_3 (4,1 g, 29,7 mmol) en MeOH (60 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 16 h, solventes se

eliminaron a presión reducida y el residuo crudo se dividió entre EtOAc (200 mL) y agua (100 mL). La capa orgánica se lavó con salmuera y se secó sobre Na2SO4 anhidro. Después de la eliminación del solvente, el residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (PE: EtOAc = 10: 1) para dar el compuesto **73–7** (606 mg, 2,79 mmol).

Etapa 5. A una mezcla de NaN_3 (3,2 g, 49,3 mmol) en H_2O destilada (10 mL) y CH_2Cl_2 (16 mL) se añadió Tf_2O (1,7 mL, 9,9 mmol) lentamente durante 5 min a 0 ^oC. Después de agitar durante 2 h la fase orgánica se separó y la fase acuosa se extrajo con CH_2Cl_2 (8 mL × 2). Las fracciones de capa orgánica, que contenía la azida de triflilo, se lavaron una vez con Na2CO3 saturado y se añadió a una mezcla de compuesto **73–8** (0,86 g, 4,93 mmol), K_2CO_3 (1,02 g, 7,40 mmol) y $CuSO_4$,$5H_2O$ (25 mg, 0,099 mmol) en H_2O destilada (18 mL) y MeOH (36 mL). Después de agitar la mezcla a 26 °C durante 12 h, los solventes orgánicos se eliminaron a presión reducida y la suspensión acuosa se diluyó con H_2O (50 mL) y se acidificó a pH 6 con HCl conc. y se diluyó con 0,2 M pH 6,2 tampones de fosfato (50 mL). Se lavó con EtOAc (100 mL × 2) y la fase acuosa luego se acidificó a pH 2 con HCl conc. Se extrajo con EtOAc (200 mL × 3) y las capas combinadas se secaron sobre Na_2SO_4, se concentraron y se usaron para la siguiente etapa sin ulterior purificación.

Etapa 6. Una mezcla del compuesto **73–9** (0,99 g, 4,93 mmol), compuesto **73–7 (**0,54 g, 2,46 mmol) y $Cu(CH_3CN)_2PF_6$ (115 mg, 0,37 mmol) en DMF (5 mL) se agitó a 50 °C durante 2 h. El solvente se removió y el residuo se purificó por HPLC prep para dar el compuesto **73–10** (250 mg, 23%).

Etapa 7. Una mezcla del compuesto **73–10** (199 mg, 0,55 mmol), compuesto **73–11** (176 mg, 1,43 mmol) y EEDQ (353 mg, 1,43 mmol) en DCM (10 mL) se agitó a 24 ^oC durante 2 h. El solvente se removió y el

residuo se purificó por HPLC prep para dar **73–12** (100 mg, 39,1%).

^{1}H RMN (400 MHz, MeOD) δ 7,98 (s, 1 H), 7,54 (d, *J* = 8,4 Hz, 2 H), 7,33–7,31 (m, 6 H), 7,10 (s, 1 H), 5,55–5,49 (m, 1 H), 4,98 (s, 2 H),4,55 (s, 3 H), 2,35 (s, 1 H), 1,84 (d, *J* = 6,4 Hz, 3 H), 1,69 (s, 3 H) ,0,94 (d, *J* = 6,8 Hz, 3 H), 0,79 (d, *J* = 6,8 Hz, 3 H).

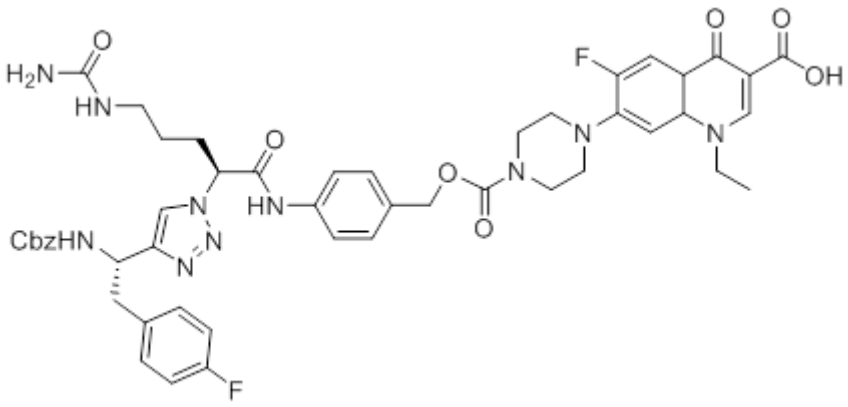
LCMS (ESI): m/z 465,9 [M+H$^+$].

Etapa 8. Una mezcla de **73–12** (150 mg, 0,29 mmol), PNP (173 mg, 0,57 mmol) y DIPEA (111 mg, 0,86 mmol) en DCM (5 mL) se agitó a 50 °C durante 12 h. El solvente se removió y el residuo se usó en la siguiente etapa sin ulterior purificación. La mezcla (200 mg, 0,29 mmol), DIPEA (112 mg, 0,87 mmol) y norfloxacina (316 mg, 0,87 mmol) en DMF (5 mL) se agitó a 25 °C durante 4 h. El solvente se removió y el residuo se purificó por HPLC prep para dar el ejemplo **73** (38,9 mg, 14,8%).

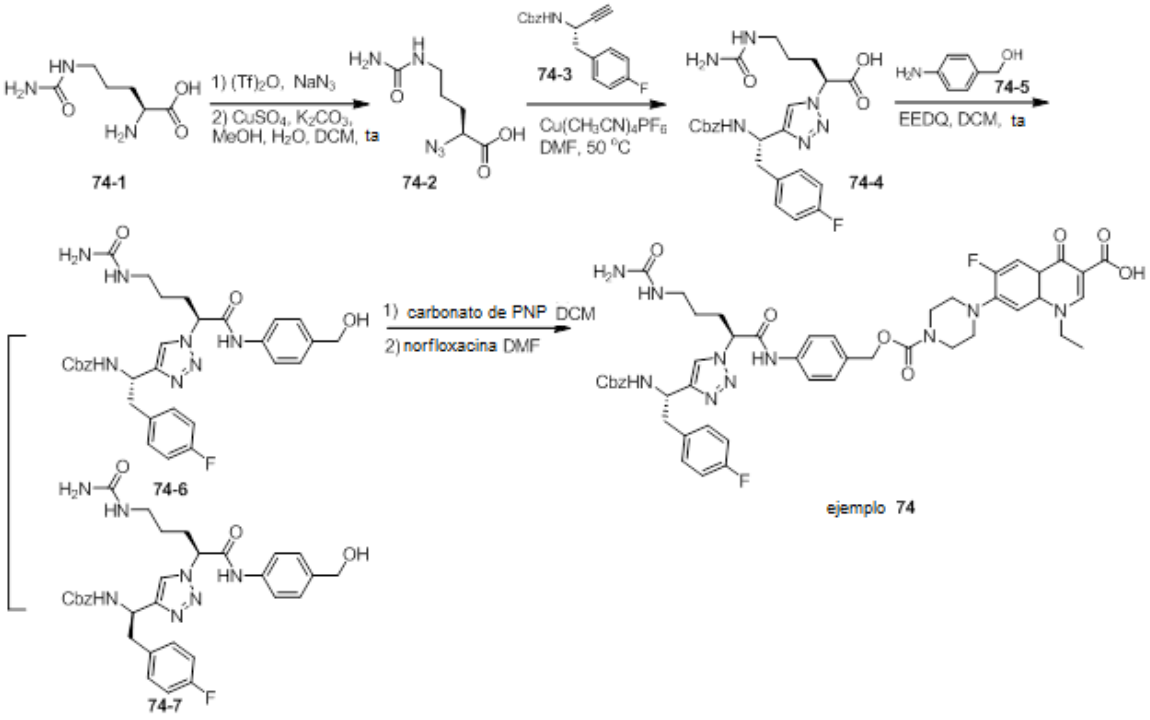
^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8,69 (s, 1 H), 8,11 (d, *J* = 12,8 Hz, 1 H), 7,94 (s, 1 H), 7,59 (s, 1 H), 7,50 (d, *J* = 8,0 Hz, 2 H), 7,32–7,27 (m, 6 H), 6,82 (d, *J* = 6,4 Hz, 1 H), 5,45 (s, 1 H), 5,38–5,37 (m, 1 H). 5,10 (s, 2 H) ,4,97 (s, 2 H), 4,34–4,29 (m, 2 H), 3,71 (d, *J* = 2,4 Hz, 4 H), 3,25 (s, 4 H), 2,52–2,46 (m, 1 H), 1,94–1,91 (m, 3 H), 1,74 (s, 3 H) ,1,58–1,56 (m, 3 H), 0,93 (d, *J* = 7,2 Hz, 3 H), 0,82 (d, *J* = 6,8 Hz, 3 H).

LCMS (ESI): m/z 811,2 [M+H$^+$].

Ejemplo 74. Ácido 7–(4–((4–((S)–2–(4–((S)–1–(benciloxicarbonilamino)–2–(4–fluorofenil)etil)–1H–1,2,3–triazol–1–il)–5–ureidopentanamido)benciloxi)carbonil)piperazin–1–il)–1–etil–6–fluoro–4–oxo–1,4,4a,8a–tetrahidroquinolin–3–carboxílico.



ejemplo 74



Etapa 1. Tf_2O (3,15 mL, 18,4 mmol) se añadió lentamente durante 5 min con agitación a una solución de NaN_3 (5,93 g, 91,3 mmol) en H_2O (18 mL) y DCM (30 mL) en baño de hielo. Después de agitar a 0 °C durante 2 h, la fase orgánica se separó. La porción acuosa se extrajo con DCM (30 mL × 2). Las fracciones de capa orgánica, que contenían la azida de triflilo se reunieron y se lavaron una vez con Na2CO3 saturado y se usó sin ulterior purificación. Compuesto **74–1** (1,6 g, 9,14 mmol), K_2CO_3 (1,90 g, 13,7 mmol) y $CuSO_4{\cdot}^5H_2O$ (46 mg, 0,183 mmol) se mezclaron en

H_2O (33 mL) y MeOH (66 mL). La azida de triflilo en DCM se añadió y la mezcla se agitó a 20 °C durante 12 h. Los solventes orgánicos se eliminaron a presión reducida y la suspensión acuosa se diluyó con H_2O (60 mL), se acidificó a pH 6 con HCl conc. y se diluyó con tampones de fosfato 0,2 M a pH 6,2 (60 mL). Se extrajo con EtOAc (150 mL×2) para remover el subproducto de sulfonamida. La fase acuosa luego se acidificó a pH 2 con HCl conc. Se extrajo con EtOAc (200 mL × 3) y las capas orgánicas se combinaron, se secaron sobre Na_2SO_4 y se evaporaron para dar **74–2**, que se usó para la siguiente etapa sin ulterior purificación.

Etapa 2. La mezcla de **74–2** (1,84 g, 9,14 mmol), **74–3** (1,36 g, 4,57 mmol) y $Cu(CN)_4PF_6$ (213 mg, 0,687 mmol) en DMF (10 mL) se agitó a 50 °C durante 2 h. Después de la eliminación del solvente, el residuo se purificó por HPLC prep para dar **74–4** (470 mg, 20,6%).

LCMS (ESI): m/z 499,2 [$M+H^+$].

Etapa 3. La mezcla de **74–4** (300 mg, 0,602 mmol), **74–5** (148 mg, 1,20 mmol) y EEDQ (294 mg, 1,20 mmol) en DCM (10 mL) se agitó a 20 °C durante 10 h. Después de la eliminación del solvente, el residuo se purificó por HPLC prep y SFC para dar **74–6** (160 mg, 44,1%) **y 74–7** (95 mg, 26,2%).

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO–d_6) δ 10,5 (s, 1 H), 8,07 (s, 1 H), 7,80 (d, J = 9,2 Hz, 1 H), 7,53 (d, J = 6,8 Hz, 2 H), 7,51–7,18 (m, 8 H), 7,05–7,00 (m, 2 H), 6,03–6,00 (m, 1 H), 5,47–5,41 (m, 3 H), 5,12–5,09 (m, 1 H), 4,99–4,88 (m, 3 H) 4,42 (d, J = 5,6 Hz, 2 H), 3,17–2,92 (m, 4 H) ,2,14–2,05 (m, 2 H), 1,28–1,22 (m, 2 H).

LCMS (ESI): m/z 604,1 [$M+H^+$].

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO–d_6) δ 10,56 (s, 1 H), 8,03 (s, 1 H), 7,81 (d, J = 9,2 Hz, 1 H), 7,51 (d, J = 6,8 Hz, 2 H), 7,28–7,18 (m, 8 H), 7,04–7,00 (m,

2 H), 6,06–6,03 (m, 1 H), 5,49–5,41 (m, 3 H), 5,13–5,10 (m, 1 H), 4,99–4,87 (m, 3 H) 4,42 (d, *J* = 5,6 Hz, 2 H), 3,18–2,92 (m, 4 H) ,2,13–2,02 (m, 2 H), 1,24–1,23 (m, 2 H).

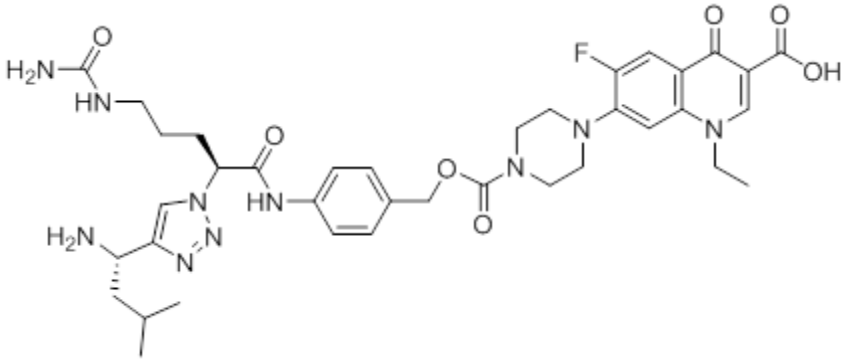
LCMS (ESI): m/z 604,1 [M+H$^+$].

Etapa 4. La mezcla de **74–6** (50 mg, 0,082 mmol), PNP (53 mg, 0,166 mmol) y DIPEA (32 mg, 0,246 mmol) en DCM (5 mL) se agitó a 50 °C durante 12 h. Después de la eliminación del solvente, el residuo se usó sin ulterior purificación. La mezcla del producto crudo anterior (110 mg, crudo, 0,082 mmol), DIPEA (32 mg, 0,246 mmol) y norfloxacina (51 mg, 0,166 mmol) en DMF (5 mL) se agitó a 20 °C durante 2 h. Después de la eliminación del solvente, el residuo se purificó por HPLC prep para dar el ejemplo **74** (25 mg, 32,1%).

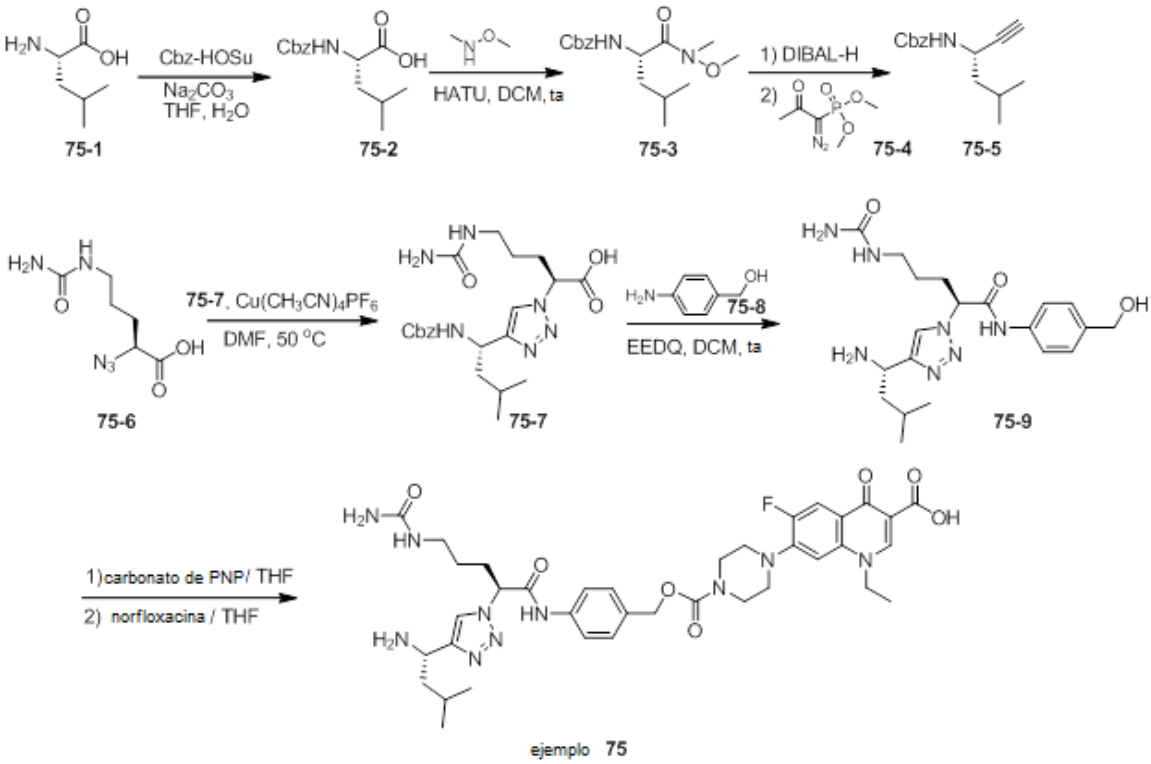
^{1}H RMN (400 MHz, DMSO–d_6) δ 15,64–15,33 (m, 1 H), 10,67 (s, 1 H), 8,96 (s, 1 H), 8,21–7,03 (m, 17 H), 6,08 (s, 1 H), 5,47 (s, 3 H), 5,08 (s, 2 H), 5,01–4,91 (m, 3 H), 4,58 (s, 2 H). 3,61 (s, 4 H) ,3,31 (s, 4 H), 3,20–2,96 (m, 4 H), 2,12 (s, 2 H), 1,41–1,24 (m, 5 H).

LCMS (ESI): m/z 949,1 [M+H$^+$], 475,3 [M/2+H$^+$].

Ejemplo 75. Ácido 7–(4–((4–((S)–2–(4–((S)–1–amino–3–metilbutil)–1H–1,2,3–triazol–1–il)–5–ureidopentanamido)benciloxi)carbonil)piperazin–1–il)–1–etil–6–fluoro–4–oxo–1,4–dihidroquinolin–3–carboxílico.



ejemplo 75



ejemplo **75**

Etapa 1. Cbz–HOSu (22,8 g, 91,4 mmol) en THF (60 mL) se añadió en porciones durante 15 min a una mezcla de **75–1** (10,0 g, 76,2 mmol) en una mezcla de agua (60 mL) y THF (30 mL). La mezcla se trató con Na_2CO_3 (24,2 g, 228,6 mmol). Después de agitar la mezcla de reacción a 25 ºC durante 16 h, el solvente se removió y el residuo se extrajo con EtOAc (150 mL × 3). La fase acuosa se acidificó a pH = 2 con HCl conc. y se extrajo con EtOAc (60 mL×3). La capa orgánica combinada se secó sobre Na_2SO_4 y se concentró a presión reducida para dar **75–2** (21,0 g crude).

LCMS (ESI): m/z 288,1 [M+Na^+].

Etapa 2. A una solución de **75–2** (5,0 g, 18,85 mmol), clorhidrato de N,O–dimetilhidroxilamina (2,2 g, 22,62 mmol) y Et_3N (5,7 g, 56,55 mmol) en DCM (150 mL) se añadió HATU (10,8 g, 28,28 mmol) a 25 ºC. Después de agitar la mezcla a 25 ºC durante 2 h, el solvente se removió y el residuo se extrajo en con agua (80 mL). La capa acuosa se extrajo

con EtOAc (80 mL × 2). La capa orgánica se lavó con solución 2 N de HCl (80 mL) y se secó sobre Na_2SO_4, se filtró y se concentró. El producto crudo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (PE/EtOAc = 2:1) para dar **75–3** (4,1 g, 71%).

LCMS (ESI): m/z 309,2 [$M+H^+$].

Etapa 3. DIBAL–H en tolueno (1 M, 16 mL, 16 mmol) se añadió en porciones a una mezcla de **75–3** (4,1 g, 13,3 mmol) en DCM (25 mL) a –78 ºC. Después de agitar la mezcla a –78 ºC durante 2 h, MeOH (1 mL) se añadió en porciones. La mezcla se calentó hasta 25 ºC, el solvente se removió y se disolvió en MeOH (40 mL). A esta solución K_2CO_3 (3,68 g, 26,6 mmol) y **75–4** (3,07 g, 16,0 mmol) se añadieron a 0 ºC. Después de agitar la solución a 25 ºC durante 16 h, el solvente se removió y el producto crudo se extrajo en con solución 1 N de HCl (30 mL) y se extrajo con EtOAc (360 mL × 3). La capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4, se filtró y se concentró al vacío. El producto crudo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (PE/EtOAc = 20:1) para dar **75–5** (1,9 g, 58%).

LCMS (ESI): m/z 246,1 [$M+H^+$].

Etapa 4. $Cu(CH_3CN)_4PF_6$ (432 mg, 1,16 mmol) se añadió a una solución de **75–6** (3,11 g, 15,48 mmol) y compuesto **5** (1,9 g, 7,74 mmol) en DMF (15 mL) a 25 ºC. Después de la mezcla de reacción se calentó a 50 ºC durante 2 h bajo N_2, el solvente se removió y el residuo se purificó por HPLC prep para dar **75–7** (2,1 g, 61%).

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO–d_6) δ 7,95 (s, 1 H), 7,69 (d, J = 8,8 Hz, 1 H), 7,36–7,29 (m, 5 H), 5,96 (br, 1 H), 5,38–5,35 (m, 1 H), 5,07–4,99 (m, 2 H), 4,82–4,77 (m, 1 H), 2,94 (s, 2 H), 2,16–2,06 (m, 2 H), 1,68–1,56 (m, 3 H), 1,28–1,05 (m, 2 H), 0,92–0,80 (m, 6 H).

Etapa 5. Una mezcla de **75–7** (500 mg, 1,12 mmol), **75–8** (414 mg, 3,36

mmol) y EEDQ (831 mg, 3,36 mmol) en DCM (10 mL) se agitó a 25 ºC durante 2 h. El solvente se removió y el residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (DCM/MeOH = 5:1) para dar **75–9** (350 mg, 57%).

^{1}H RMN (400 MHz, MeOD) δ 8,02 (s, 1 H), 7,56–7,54 (m, 2 H), 7,33–7,27 (m, 7 H), 5,50–5,46 (m, 1 H), 5,07 (s, 2 H), 4,95–4,91 (m, 1 H), 4,55 (s, 2 H), 3,25–3,07 (m, 2 H), 2,25–2,21 (m, 2 H), 1,77–1,64 (m, 3 H), 1,44–1,40 (m, 2 H), 0,96–0,95 (m, 6 H).

LCMS (ESI): m/z 552,2 [M+H$^+$].

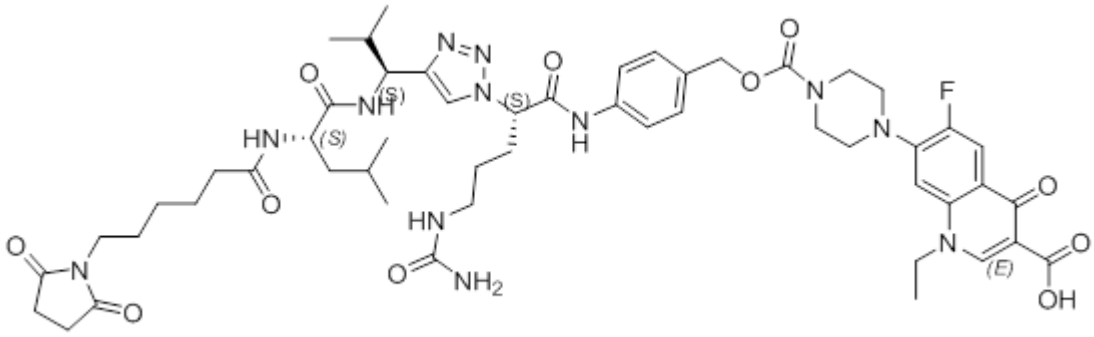
Etapa 6. A una solución de **75–9** (120 mg, 0,218 mmol) en THF (3 mL) se añadió carbonato de PNP (199 mg, 0,654 mmol) y DIPEA (113 mg, 0,872 mmol) a 25 ºC. Después de la mezcla se calentó a 50 ºC durante 18 h, el solvente se removió y el residuo se disolvió en DMF (3 mL). Norfloxacina (104 mg, 0,327 mmol) y DIPEA (141 mg, 1,09 mmol) se añadió y la mezcla se agitó a 25 ºC durante 6 h. El solvente se removió y el residuo se purificó por HPLC prep para dar el ejemplo **75** (90 mg, 46%).

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO–d_6) δ 15,34 (s, 1 H), 10,64 (s, 1 H), 8,97 (s, 1 H), 8,13 (s, 1 H), 8,04 (s, 1 H), 7,97–7,93 (m, 1 H), 7,73–7,70 (m, 1 H), 7,61–7,59 (m, 2 H), 7,38–7,20 (m, 8 H), 6,03 (m, 1 H), 5,47–5,43 (m, 1 H), 5,07–5,03 (m, 4 H), 4,82–4,74 (m, 1 H), 4,59–4,57 (m, 2 H), 3,61 (s, 4 H), 3,34 (s, 4 H), 2,90–3,01 (m, 2 H), 2,10–2,07 (m, 2 H), 1,62–1,56 (m, 3 H), 1,42–1,38 (m, 3 H), 1,27 (m, 2 H), 0,90–0,89 (m, 6 H).

LCMS (ESI): m/z 897,4 [M+H$^+$].

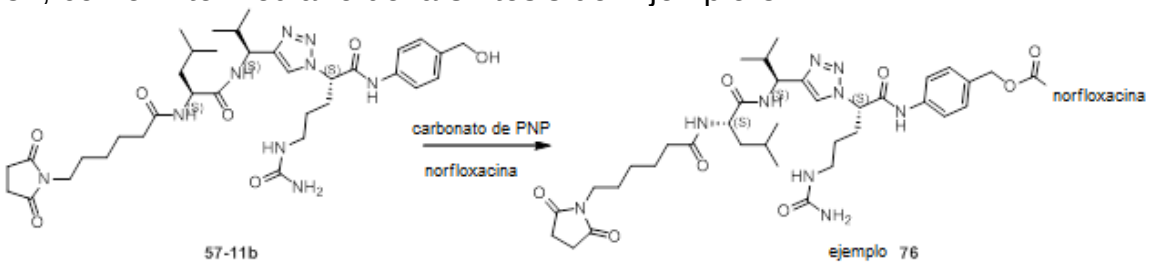
Ejemplo 76. Ácido 7–(4–((4–((S)–2–(4–((S)–1–((S)–2–(6–(2,5–dioxopirrolidin–1–il)hexanamido)–4–metilpentanamido)–2–metilpropil)–1H–1,2,3–triazol–1–il)–5–ureidopentanamido)benciloxi)carbonil)piperazin–1–il)–1–etil–6–fluoro–4–

oxo–1,4–dihidroquinolin–3–carboxílico.



ejemplo 76

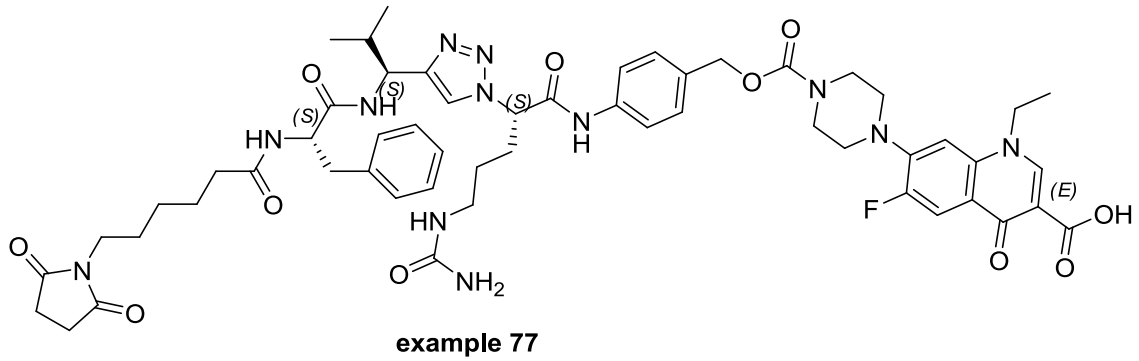
El Ejemplo 76 se preparó usando el procedimiento como en el Ejemplo **57**, con el intermediario de la síntesis del Ejemplo **57**.



LCMS: (5–95, AB, 1,5 min, ESI), 0,828 min, MS = 529,4 [1/2M+1]

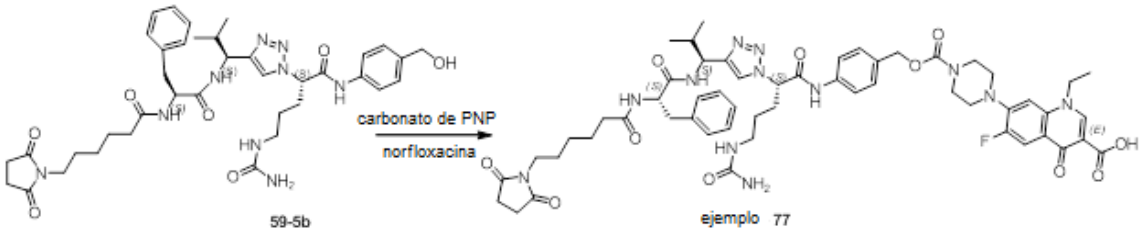
^{1}H RMN Metanol–d_4 400 MHz, δ 8,89 (s, 1 H), 8,09 (s, 1 H), 8,00 (d, J = 13,2 Hz, 1 H), 7,62 (d, J = 8 Hz, 2 H), 7,38 (d, J = 8 Hz, 2 H), 7,20 (s, 1 H), 5,51 (d, J = 5,2 Hz, 1 H), 5,15 (s, 2 H), 4,96 (d, J = 6,8 Hz, 1 H), 4,88 (s, 2 H), 4,60 (s, 4 H), 3,73 (s, 4 H), 3,46 – 3,42 (m, 2 H), 3,35 (s, 4 H), 2,65 (s, 4 H), 2,30 – 2,22 (m, 4 H), 1,65 – 1,56 (m, 9 H), 1,54 – 1,28 (m, 5 H), 1,00 – 0,97 (m, 12 H).

Ejemplo 77. Ácido 7–(4–((4–((S)–2–(4–((S)–1–((S)–2–(6–(2,5–dioxopirrolidin–1–il)hexanamido)–3–fenilpropanamido)–2–metilpropil)–1H–1,2,3–triazol–1–il)–5–ureidopentanamido)benciloxi) carbonil)piperazin–1–il)–1–etil–6–fluoro–4–oxo–1,4–dihidroquinolin–3–carboxílico.



example 77

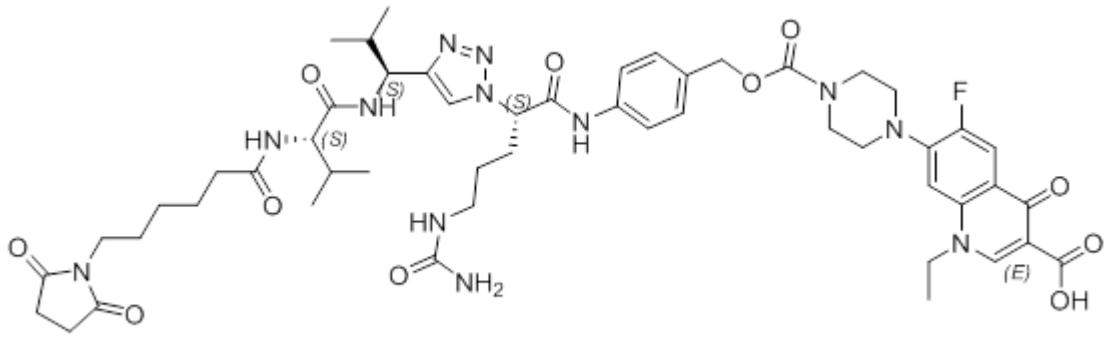
Ejemplo 77 se preparó usando el procedimiento como en el Ejemplo **59**, con intermediarios de la síntesis del Ejemplo **59**.



LCMS: (5–95, AB, 1,5 min, ESI), 0,841 min, MS = 546,5 [1/2M+1]

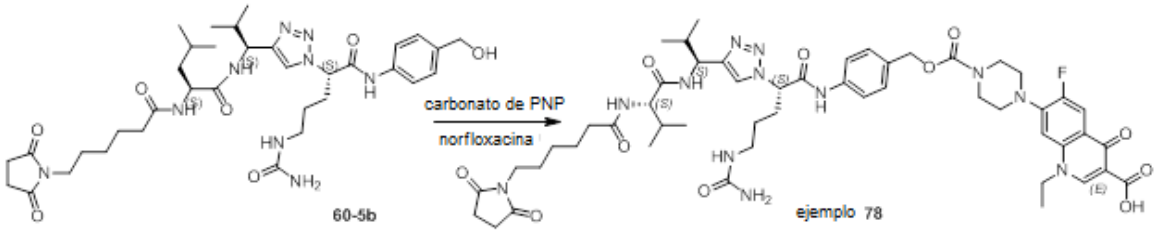
^{1}H RMN DMSO–d_6 400 MHz, δ 10,66 (s, 1 H), 8,96 (s, 1H), 8,34 (d, J = 9,2 Hz, 1 H), 8,09 (s, 1 H), 8,04 (d, J = 8,8 Hz , 1 H), 7,95 (d, J = 12,8 Hz , 1 H), 7,61 (d, J = 8,4 Hz, 2 H), 7,36 (d, J = 8,8 Hz, 2 H), 7,28 – 7,17 (m, 6 H), 6,05 (s, 1 H), 5,55 – 5,48 (m, 1 H), 5,43 (s, 2 H), 5,07 (s, 2 H), 4,90 – 4,86 (m, 1 H), 4,59 – 4,58 (m, 3 H), 3,61 (s, 4 H), 3,34 – 3,23 (m, 4 H), 3,04 – 2,95 (m, 4 H), 2,78 (s, 1 H), 2,59 (s, 4 H), 2,05 – 1,98 (m , 4 H), 1,43 – 1,22 (m, 10H), 1,04 (d, J = 7,2 Hz, 2 H) , 0,77 (d, J = 6,8 Hz, 3 H) , 1,42 (d, J = 6,8 Hz, 3 H),.

Ejemplo 78. Ácido 7–(4–((4–((S)–2–(4–((S)–1–((S)–2–(6–(2,5–dioxopirrolidin–1–il)hexanamido)–3–metilbutanamido)–2–metilpropil)–1H–1,2,3–triazol–1–il)–5–ureidopentanamido) benciloxi)carbonil)piperazin–1–il)–1–etil–6–fluoro–4–oxo–1,4–dihidroquinolin–3–carboxílico



ejemplo 78

El Ejemplo 78 se preparó usando el procedimiento como en el Ejemplo **60**, con intermediario de la síntesis del Ejemplo **60**.



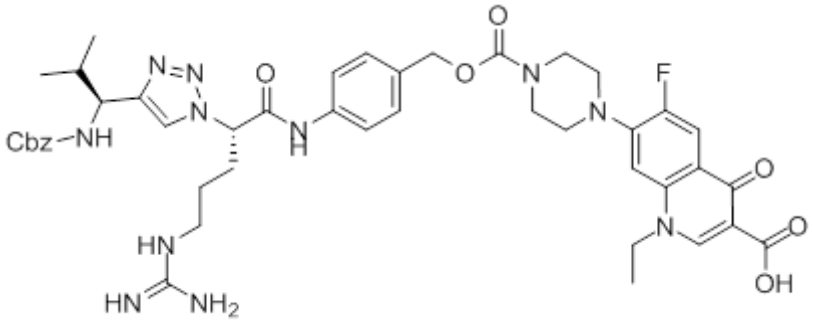
Etapa 1. A una solución del compuesto **60–5b** (50 mg, 0,072 mmol) en DMF seca (3 mL) se añadió carbonato de PNP (50 mg, 0,16 mmol) y DIPEA (0,5 mL, 3 mmol) a temperatura ambiente y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 h. Norfloxacina (50 mg, 0,16 mmol) se añadió. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 h más. La mezcla se concentró, se filtró y se purificó por HPLC prep (FA), para dar el ejemplo **78** (38,8 mg, rendimiento: 52%).

LCMS: (5–95, AB, 1,5 min, ESI), 0,833 min, MS = 522,4 [1/2M+1]

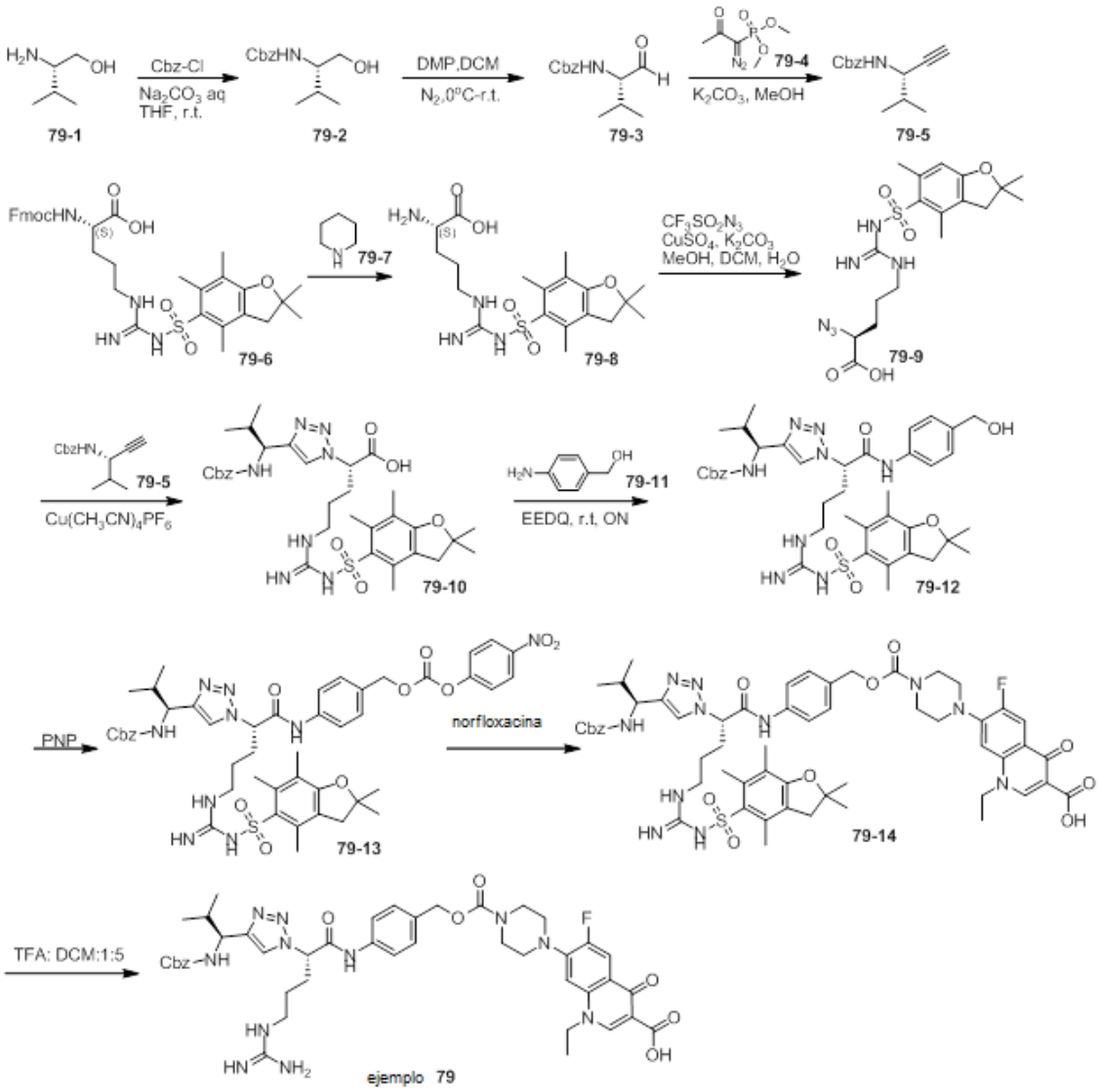
^{1}H RMN DMSO–d_6 400 MHz, δ 10,1 (s, 1H), 8,93 (s, 1 H), 8,25 – 8,22 (d, 1H), 8,04 (s, 1 H), 7,93 – 7,90 (d, 1 H), 7,81 – 7,79 (d, 1H), 7,58 – 7,56 (d, J = 8,0 Hz , 2 H), 7,35 – 7,33 (d, J = 8,0 Hz , 2 H), 7,20 – 7,18 (m, 1 H), 6,0 (m, 1 H), 5,5 (m, 1 H), 5,40 (s, 2 H), 5,04 (s, 2 H), 4,9 – 4,87 (m, 1 H), 4,6 – 4,5 (m, 2 H), 4,2 – 4,1(m, 1 H), 3,6 (s, 4 H), 3,2 (m, 6 H), 3,05 – 2,9 (m, 2 H), 2,55 (s, 4 H), 2,18 – 2,0 (m, 5 H), 1,9 – 1,8 (m, 1 H), 1,5 –

1,35 (m, 7 H), 1,3 – 1,05 (m , 4 H), 0,84 – 0,77 (m, 12H).

Ejemplo 79. Ácido 7–(4–((4–((S)–2–(4–((S)–1–(benciloxicarbonilamino)–2–metilpropil)–1H–1,2,3–triazol–1–il)–5–guanidinopentanamido)benciloxi)carbonil)piperazin–1–il)–1–etil–6–fluoro–4–oxo–1,4–dihidroquinolin–3–carboxílico



ejemplo 79



Etapa 1. A una solución del compuesto **79–1** (2 g, 19,4 mmol) en THF (4 mL) se añadió K_2CO_3 sat. ac. (30 mL), seguido por Cbz–Cl (3,958 g, 23,2 mmol) a 0 °C. Después de agitar la mezcla de reacción a 28 °C durante 1 h, se extrajo con EtOAc (20 mL × 3) y H_2O (20 mL). La capa orgánica combinada se secó sobre Na_2SO_4, se filtró y se concentró para dar el compuesto **79–2** (5 g, 100%) que se usó en la siguiente etapa sin ulterior purificación.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO–d_6) δ 7,36 – 7,31 (m, 5H), 6,92 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 5,01 (s, 2H), 3,39 – 3,32 (m, 3H), 1,80 – 1,76 (m, 1H), 0,85 – 0,80 (m, 6H).

Etapa 2. A una solución del compuesto **79–2** (6,8 g, 28,7 mmol) en DCM

(100 mL) bajo N_2 se añadió DMP (14,59 mg, 343,4 mmol) a 0 ºC. Después de 5 min, la mezcla de reacción se calentó hasta temperatura ambiente y se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. La mezcla de reacción se enfrió hasta 0 ºC y se lavó con una solución saturada de $NaHCO_3/Na_2SO_3$ (1:1). Después de la separación, la capa orgánica se lavó una vez más. Las capas combinadas acuosas se extrajeron con DCM (30 mL × 2). Se secó sobre Na_2SO_4, se filtró y se concentró para dar el compuesto **79–3** (5,3 g, 79%), que se usó en la siguiente etapa sin ulterior purificación.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO–d_6) δ 9,51 (d, J = 0,8 Hz, 1H), 7,72 – 7,61 (m, 1H), 7,43 – 7,30 (m, 5H), 5,04 (s, 2H), 3,91 – 3,88 (m, 1H), 2,18 – 2,13 (m, 6H), 0,94 – 0,82 (m, 6H).

Etapa 3. A una solución del compuesto **79–3** (crudo, 4,9 g, 12,76 mmol), compuesto **79–4** (4,9 g, 25,5 mmol) en MeOH (50 mL) se añadió K_2CO_3 (5,28 g, 38,28 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla se concentró y se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (PE: EtOAc = 10: 1) para dar el producto deseado **79–5** (1,30 g, 44 %).

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO–d_6) δ 7,74 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 7,37 – 7,29 (m, 5H), 5,01 (s, 2H), 4,09 – 4,05 (m, 1H), 3,16 (d, J = 2,4 Hz, 1H), 1,76 (d, J = 6,8 Hz, 1H), 0,91 (d, J = 6,8 Hz, 3H) , 0,87 (d, J = 6,8 Hz, 3H).

Etapa 4. A una solución del compuesto **79–6** (2 g, 3,09 mmol) en DCM (30 mL) se añadió el compuesto **79–7** (1,6 mL, 15,4 mmol). Después de agitar la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 16 h, se concentró al vacío y se lavó con MTBE, se filtró para dar el producto deseado **79–8** (1,315 g, 100 %).

Etapa 5. Una mezcla de NaN_3 (1,6 g, 15,45 mmol) en H_2O destilada (5 mL) y CH_2Cl_2 (10 mL) se enfrió en un baño de hielo. Tf_2O (1,1 mL, 6,18

mmol) se añadió lentamente durante 5 min y se agitó durante 2 h. La fase de CH_2Cl_2 se removió y la fase acuosa se extrajo con CH_2Cl_2 (5 mL × 2). Las fracciones de capa orgánica, que contenían la azida de triflilo se reunieron y se lavaron una vez con Na2CO3 saturado (40 mL) y se usaron sin ulterior purificación. Compuesto **79–8** (1,315 g, 3,09 mmol), K_2CO_3 (641 mg, 4,635 mmol) y $CuSO_4$•$5H_2O$ (155 mg, 0,618 mmol) se añadió a H_2O destilada (10 mL) y MeOH (20 mL). La solución de azida de triflilo en CH_2Cl_2 (50 mL) se añadió y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Los solventes orgánicos se eliminaron a presión reducida y la suspensión acuosa se diluyó con H_2O (50 mL) y se acidificó a pH 6 con HCl conc. luego se diluyó con tampón de fosfato 0,2 M pH 6,2 (50 mL) y se extrajo con EtOAc (3 × 100 mL) para remover el subproducto de sulfonamida. La fase acuosa luego se acidificó a pH 2 con HCl conc. El producto se obtuvo de otra ronda de extracciones de EtOAc/MeOH (20: 1) (4 × 100 mL). Estos extractos de EtOAc/MeOH se combinaron, se secaron sobre Na_2SO_4 y se evaporaron para dar el compuesto **79–9** sin ulterior purificación (600 mg, 43 %).

Etapa 6. A la solución del compuesto **79–9** (500 mg, 1,1 mmol) y **79–5** (307 g, 1,33 mmol) en DMF (5 mL) se añadió $Cu(CH_3CN)_4PF_6$ (165 mg, 0,44 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 50 °C durante 2 h, la mezcla (**79–10**) se usó directamente para la siguiente etapa.

Etapa 7. A la mezcla del compuesto **79–10** (crudo, 752 mg, 1,1 mmol) en DMF (5 mL) se añadió EEDQ (544 mg, 2,2 mmol) y compuesto **79–11** (203 g, 1,65 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 0 ^oC y se calentó hasta temperatura ambiente bajo N_2 durante la noche. La mezcla se purificó por HPLC prep y separación por SFC para dar el compuesto **79–12** (250 mg, 30 %).

Etapa 8. A la solución del compuesto **79–12** (90 mg, 0,114 mmol) y

carbonato de PNP (69 mg, 0,228 mmol) en DMF (3 mL) se añadió DIPEA (45 mg, 0,342 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 21°C durante 3 h bajo N_2. La mezcla (**79–13**) se usó directamente para la siguiente etapa sin purificación.

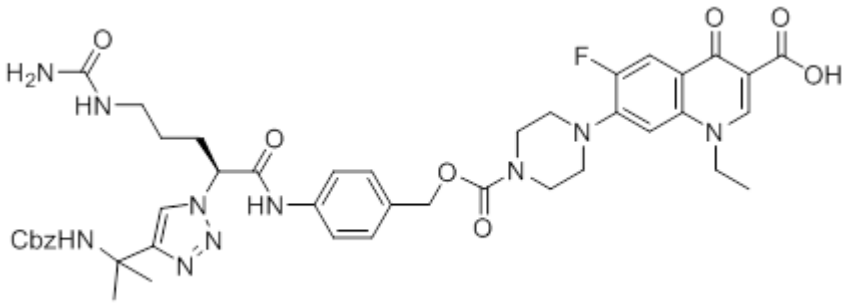
Etapa 9. A la solución de la etapa previa se añadió norfloxacina (75 mg, 0,228 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 21 ^{o}C durante 1 h. La mezcla se purificó por HPLC prep para dar el compuesto **79–14** (80 mg, 62 %).

Etapa 10. A la solución del compuesto **79–14** (60 mg, 0,053 mmol) en DCM (5 mL) se añadió TFA (1 mL) a 0 ºC. La mezcla de reacción se agitó a 16 °C durante 5 h. La mezcla se purificó por HPLC prep y SFC para dar el ejemplo **79** (30 mg, 64 %).

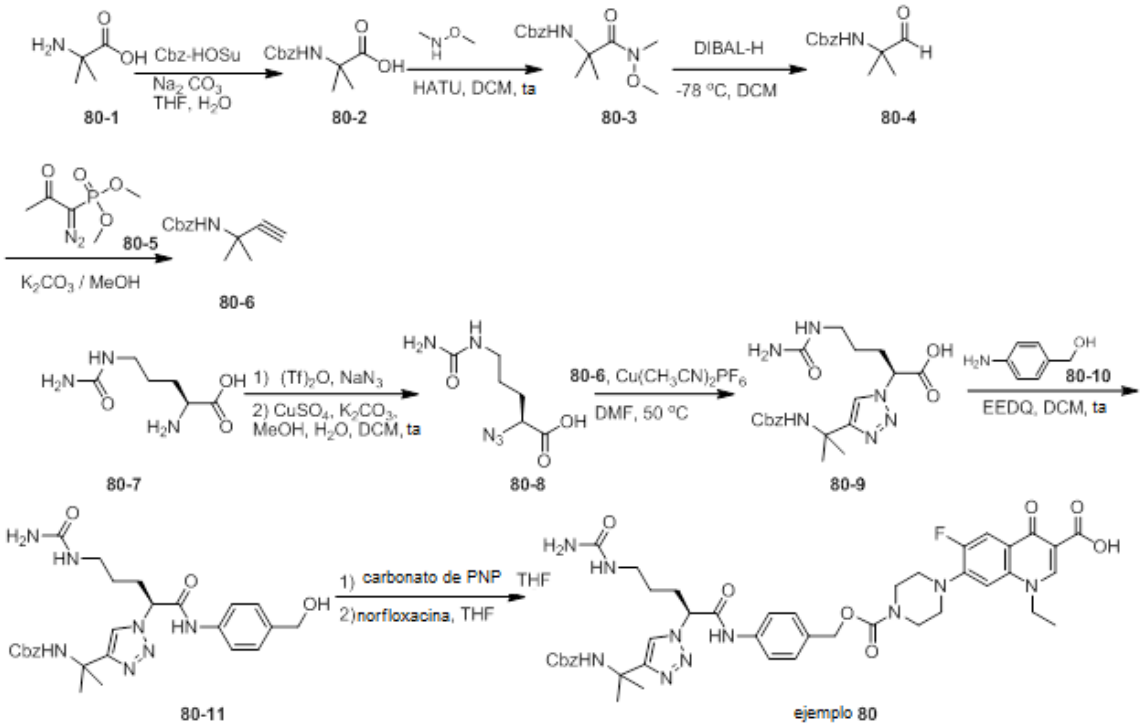
LCMS (ESI): RT = 0,837 min, $M+H^+$ = 882,2. Método = 5–95 /1,5 min.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO–d_6) δ 8,94 (s, 1H), 8,48 (s, 1H), 8,12 (s, 1H), 7,92 (d, *J* = 12,4 Hz, 1H), 7,76 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H), 7,61 (s, 1H), 7,34 (m, 10H), 5,07 – 4,99 (m, 5H), 4,59 (d, *J* = 7,2 Hz, 1H), 3,61 (s, 4H), 3,17 (m, 6H), 3,12 (s, 2H), 2,18 – 2,03 (m, 4H), 1,39 (s, 5H), 0,84 (d, *J* = 6,4 Hz, 3H), 0,78 (d, *J* = 6,0 Hz, 3H).

Ejemplo 80. Ácido (S)–7–(4–((4–(2–(4–(2–(benciloxicarbonilamino)propan–2–il)–1H–1,2,3–triazol–1–il)–5–ureidopentanamido)benciloxi)carbonil)piperazin–1–il)–1–etil–6–fluoro–4–oxo–1,4–dihidroquinolin–3–carboxílico.



ejemplo 80



Etapa 1. Cbz–OSu (57 g, 0,23 mol) en THF (150 mL) se añadió una mezcla de aq Na_2CO_3 (82 g, 0,78 mol) y **80–1** (20 g, 0,19 mol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 16 h, se ajustó a pH > 10 y se lavó con EtOAc (400 mL × 2). La capa acuosa se reunió y se acidificó a pH < 1 con HCl conc. Se extrajo con EtOAc (500 mL × 2). La capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4 y se evaporó para dar **80–2** (45 g, 97,8%).

Etapa 2. A una mezcla de **80–2** (20 g, 84,3 mmol), clorhidrato de N,O–dimetilhidroxilamina (8,9 g, 92,7 mmol) y HATU (48,1 g, 126,4 mmol) en DCM (200 mL) se añadió Et_3N (48,7 mL, 337,2 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. Después de remover el solvente, el residuo se extrajo en con agua (300 mL). La capa acuosa se extrajo con EtOAc (300 mL × 3) y las capas orgánicas se lavaron con NaHCO3 saturado (150 mL), HCl conc. (100 mL) y NaCl saturado (100 mL). La capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4, se concentró y se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (PE: EtOAc = 2: 1) para

dar **80–3** (12,9 g, 54,6%).

Etapa 3. DIBAL–H (17,8 mL, 1M en tolueno) se añadió en porciones a una solución de **80–3** (4,15 g, 14,8 mmol) en CH2Cl2 anhidro (100 mL) a –78 °C y la solución resultante se agitó a –78 °C durante 2 h. Exceso de DIBAL se neutralizó con MeOH anhidro (5 mL) y la solución se calentó hasta temperatura ambiente La solución se concentró para dar **80–4** (3,27 g), que se usó en la siguiente etapa sin ulterior purificación.

Etapa 4. Una mezcla de **80–4** (3,27 g, 14,8 mmol), **80–5** (2,96 g, 17,8 mmol) y K_2CO_3 (4,1 g, 29,7 mmol) en MeOH (60 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. Los solventes se eliminaron a presión reducida y el residuo crudo se dividió en EtOAc (200 mL) y agua (100 mL). La capa orgánica se lavó con salmuera (50 mL) y se secó sobre Na2SO4 anhidro. El solvente se removió a presión reducida y se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (PE: EtOAc = 10: 1) para dar **80–6** (606 mg, 18,9%).

Etapa 5. Tf_2O (1,7 mL, 9,9 mmol) se añadió lentamente durante 5 min a una solución de NaN_3 (3,2 g, 49,3 mmol) en H_2O destilada (10 mL) y CH_2Cl_2 (16 mL) a 0 ^oC. Después de calentar durante 2 h, la fase orgánica se separó y la fase acuosa se extrajo con CH_2Cl_2 (20 mL × 2). Las fracciones orgánicas combinadas, que contenían la azida de triflilo se reunieron y se lavaron una vez con Na2CO3 saturado y se usaron sin ulterior purificación.

A una mezcla de **80–7** (0,86 g, 4,93 mmol) y K_2CO_3 (1,02 g, 7,40 mmol), $CuSO_4{,}5H_2O$ (25 mg, 0,099 mmol) en H_2O (18 mL) y MeOH (36 mL) se añadió la azida de triflilo en CH_2Cl_2 (32 mL) y la mezcla se agitó a 26 °C durante 12 h. La capa orgánica solventes se eliminaron a presión reducida y la suspensión acuosa se diluyó con H_2O (50 mL). Se acidificó a pH 6 con HCl conc. y se diluyó con tampones de fosfato (0,2 M, pH

6,2, 50 mL) y se lavó con EtOAc (100 mL × 2). La fase acuosa luego se acidificó a pH 2 con HCl conc. y se extrajo con EtOAc (100 mL × 2), se secó sobre Na_2SO_4 y se concentró para dar **80–8**, que se usó en la siguiente etapa sin ulterior purificación.

Etapa 6. Una mezcla de **80–8** (0,99 g, 4,93 mmol), **80–6** (0,54 g, 2,46 mmol) y $Cu(CH_3CN)_4PF_6$ (115 mg, 0,37 mmol) en DMF (5 mL) se agitó a 50 °C durante 2 h. Después de remover el solvente, el residuo se purificó por HPLC prep para dar **80–9** (250 mg, 23%).

Etapa 7. La mezcla de **80–9** (199 mg, 0,48 mmol), **80–10** (176 mg, 1,43 mmol) y EEDQ (353 mg, 1,43 mmol) en DCM (10 mL) se agitó a 24 °C durante 2 h. Después de la eliminación del solvente, el residuo se purificó por HPLC prep para dar **80–11** (211 mg, 84%).

^{1}H RMN (400 MHz, MeOD) δ 8,00 (s, 1 H), 7,56 (dd, J =1,6, 8,4 Hz, 2 H), 7,33–7,31 (m, 7 H), 5,48–5,44 (m, 2 H), 4,99 (s, 2 H), 4,56 (s, 2 H), 3,23–3,16 (m, 1 H), 3,09–3,03 (m, 1 H), 2,26–2,20 (m, 2 H), 1,68 (s, 6 H), 1,51–1,45 (m, 1 H), 1,39–1,29 (m, 1 H).

LCMS (ESI): m/z 524,3 [M+H$^+$].

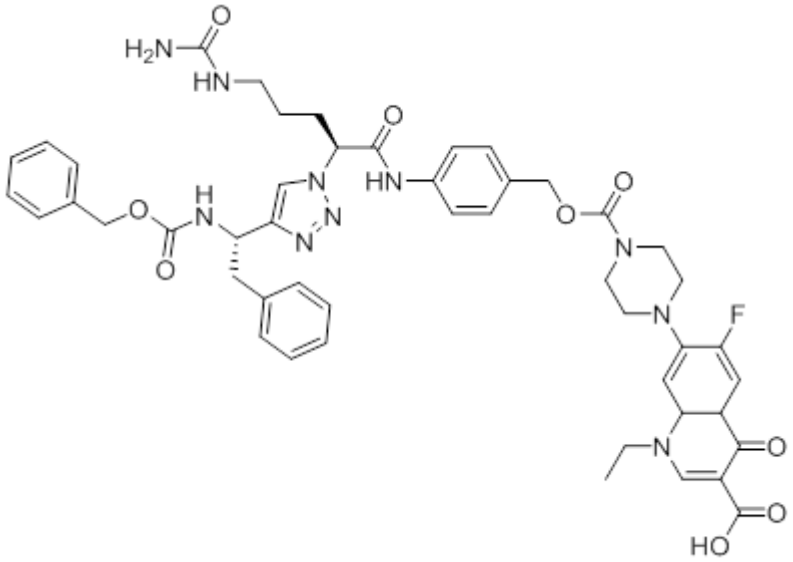
Etapa 8. Después de una mezcla de **80–11** (150 mg, 0,29 mmol), carbonato de PNP (173 mg, 0,57 mmol) y DIPEA (111 mg, 0,86 mmol) en DCM (5 mL) se agitó a 50 °C durante 12 h solvente se removió y se añadió a una solución de DIPEA (112 mg, 0,87 mmol) y norfloxacina (316 mg, 0,87 mmol) en DMF (5 mL) y se agitó a 25 °C durante 4 h. El solvente se removió y el residuo se purificó por HPLC prep para dar el ejemplo **80** (113 mg, 45%).

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO–d_6) δ 10,65 (s, 1 H), 8,96 (s, 1 H), 7,98–7,93 (m, 2 H), 7,63–7,60 (m, 3 H), 7,38–7,20 (m, 9 H), 6,05 (s, 1 H), 5,44 (s, 3 H), 5,07 (s, 2 H), 4,93 (s, 2 H), 4,59–4,57 (m, 2 H), 3,61 (s, 4 H), 3,02–2,98 (m, 2 H), 2,12–2,02 (m, 2 H), 1,57 (d, J = 4,0 Hz, 6 H), 1,42–1,38

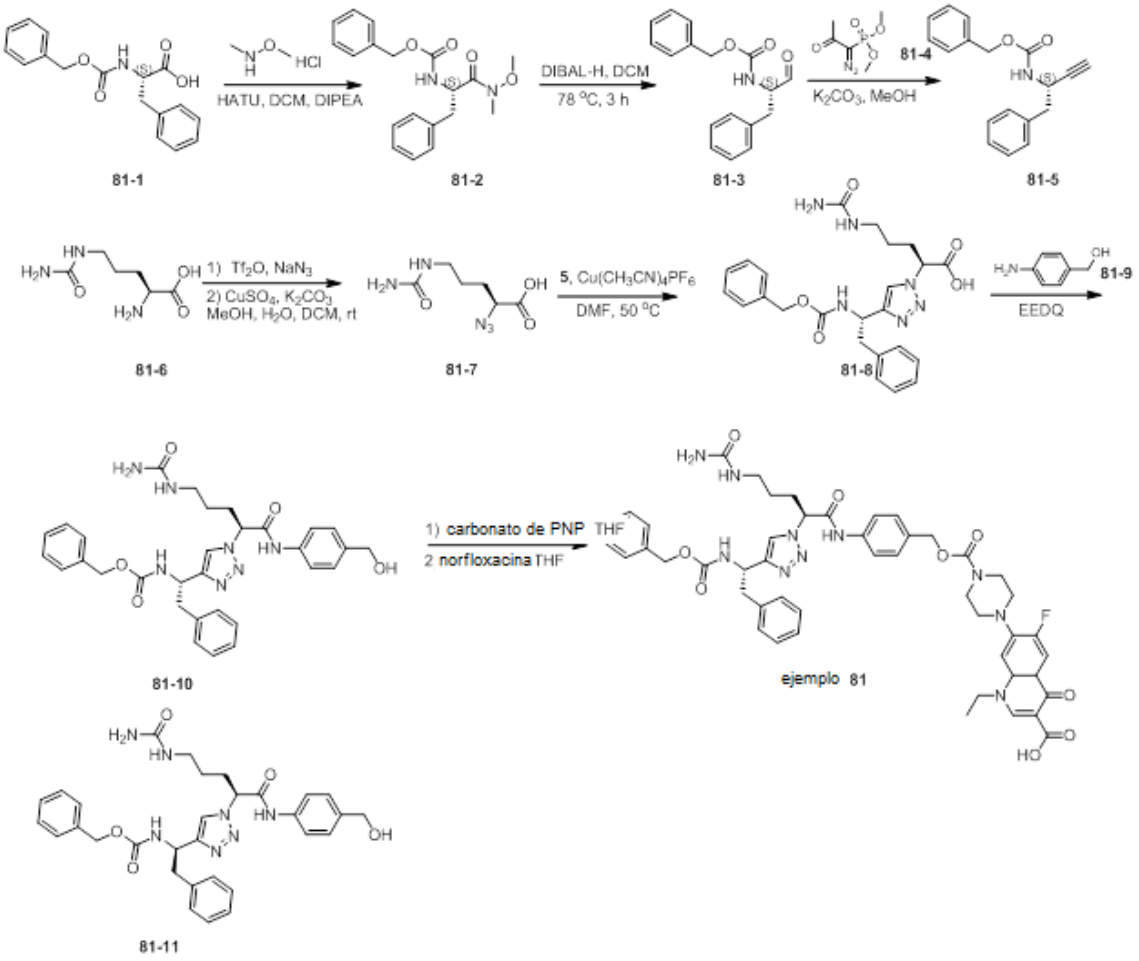
(m, 3 H), 1,28–1,23 (m, 2 H).

LCMS (ESI): m/z 869,3 [M+H$^+$].

Ejemplo 81. Ácido 7–(4–((4–((S)–2–(4–((S)–1–(benciloxicarbonilamino)–2–feniletil)–1H–1,2,3–triazol–1–il)–5–ureidopentanamido)benciloxi)carbonil)piperazin–1–il)–1–etil–6–fluoro–4–oxo–1,4,4a,8a–tetrahidroquinolin–3–carboxílico.



ejemplo 81



Etapa 1. A la solución de Cbz–L–fenilalanina (3,0 g, 10 mmol) en DCM (100 mL) se añadió HATU (4,57 g, 12,0 mmol) y DIPEA (3,87 g, 30,0 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 15 min, clorhidrato de N–metoximetanamina (1,2 g, 12 mmol) se añadió. Después de agitar la solución durante otra hora, se extrajo con DCM (60 mL × 3), se lavó con 10% HCl acuoso (60 mL) y agua (60 mL). La capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4, se concentró y se purificó por la columna cromatografía en gel de sílice para dar **81–2** (3,2 g, 94%).

^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,36–7,14 (m, 10 H), 5,42–5,40 (m, 1 H), 5,13–5,02 (m, 3 H), 3,69 (s, 3 H), 3,18 (s, 3 H), 3,11–3,06 (m, 1 H), 2,94–2,89 (m, 1 H).

Etapa 2. DIBAL–H (20 mL, 1 M en tolueno) se añadió a una solución de

81–2 (3,4 g, 10 mmol) en DCM seca (150 mL) a –78 ºC bajo N_2. Después de agitar la solución a –78 ºC durante 6 h, la mezcla se neutralizó con MeOH (50 mL) y agua (50 mL). It se filtró y el filtrado se secó sobre Na_2SO_4, se concentró y **81–3** se usó directamente en la siguiente etapa sin ulterior purificación.

LCMS (ESI): m/z 284,1 [$M+H^+$].

Etapa 3. A la solución de **81–3** (10 mmol) en MeOH (100 mL) se añadió K_2CO_3 (2,76 g, 20 mmol) y **81–4** (2,31 g, 12 mmol) a 0 ºC. Después de la reacción se agitó a 0 ºC durante 12 h, el solvente se removió y el residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice para dar **81–5**.

LCMS (ESI): m/z 280,1 [$M+H^+$].

Etapa 4. A una solución de NaN_3 (1,78 g, 27,45 mmol) en una mezcla de H_2O (5 mL) y DCM (7,5 mL) se añadió Tf_2O (0,93 mL, 5,55 mmol). Después de agitar la mezcla durante 2 h a temperatura ambiente, se extrajo con DCM (60 mL × 3). La capa orgánica se lavó con Na_2CO_3 acuoso y se concentró a 10 mL. **81–6** (500 mg, 2,8 mmol) luego se añadió, seguido por K_2CO_3 (577 mg, 4,19 mmol), $CuSO_4$ (7 mg, 0,028 mmol), H_2O (9 mL) y MeOH (18 mL). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 12 h. Después de los solventes orgánicos se evaporaron, se diluyó con agua (20 mL) y pH se ajustó a 6,0 con HCl y luego se diluyó con tampones de fosfato (0,25 M, pH 6,2, 50 mL). La mezcla se extrajo con EtOAc (50 mL × 3). La capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4 para obtener **81–7**, que se usó directamente en la siguiente etapa.

Etapa 5. A la solución de **81–5** (560 mg, 2 mmol) en DMF (5 mL) se añadió **81–7** (804 mg, 4,0 mmol) y cat. $Cu(CH_3CN)_4PF_6$. La mezcla se agitó a 50 ºC durante 3 h bajo N_2. Después de remover el solvente, el residuo se purificó por HPLC prep para dar **81–8**.

^{1}H RMN (400 MHz, MeOD) δ 8,00 (s, 1 H), 7,57 (d, J = 8,4 Hz, 2 H), 7,35–7,18 (m, 12 H), 5,50–5,45 (m, 1 H), 5,14–5,11 (m, 1 H), 5,05–5,03 (m, 2 H), 4,58 (s, 2 H), 3,26–3,24 (m, 2 H), 3,13–3,12 (m, 2 H), 2,35–2,15 (m, 2 H), 1,55–1,35 (m, 2 H).

Etapa 6. A una solución de **81–8** (480 mg, 1,0 mmol) en DCM (10 mL) se añadió EEDQ (247 mg, 1,0 mmol) y **81–9** (123 g, 1,0 mmol) bajo N_2 y la mezcla se agitó a 0 ºC durante 1 h. Después de remover el solvente, el residuo se purificó por HPLC prep y separación por SFC para dar **81–10** y **81–11**.

^{1}H RMN (400 MHz, MeOD) δ 8,00–7,95 (m, 1 H), 7,58–7,56 (m, 2 H), 7,35–7,18 (m, 12 H), 5,51–5,47 (m, 1 H), 5,15–5,09 (m, 1 H), 5,55–5,00 (m, 2 H), 4,58 (s, 2 H), 3,33–3,20 (m, 2 H), 3,16–3,09 (m, 2 H), 2,25–2,18 (m, 2 H), 1,43–1,38 (m, 2 H). LCMS (ESI): m/z 586,0 [M+H$^+$].

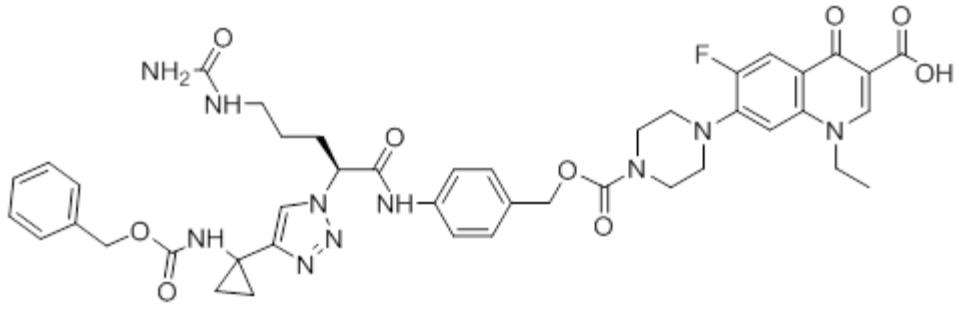
^{1}H RMN (400 MHz, MeOD) δ 7,96 (s, 1 H), 7,57 (d, J = 8,8 Hz, 2 H), 7,35–7,18 (m, 12 H), 5,52–5,48 (m, 1 H), 5,13–4,87 (m, 3 H), 4,58 (s, 2 H), 3,33–3,15 (m, 2 H), 3,14–3,07 (m, 2 H), 2,27–2,14 (m, 2 H), 1,46–1,31 (m, 2 H). LCMS (ESI): m/z 586,1 [M+H$^+$].

Etapa 7. A una solución de **81–10** (59 mg, 0,1 mmol) en DCM seca (30 mL) se añadió carbonato de PNP (62 mg, 0,2 mmol) y DIPEA (1 mL). La mezcla se calentó a reflujo durante 16 h. Después de remover el solvente, el residuo se disolvió en DMF (5 mL) y DIPEA (0,3 mL) y norfloxacina (65 mg, 0,2 mmol) se añadieron. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. Después de remover el solvente, el residuo se purificó por HPLC prep para dar el ejemplo **81.**

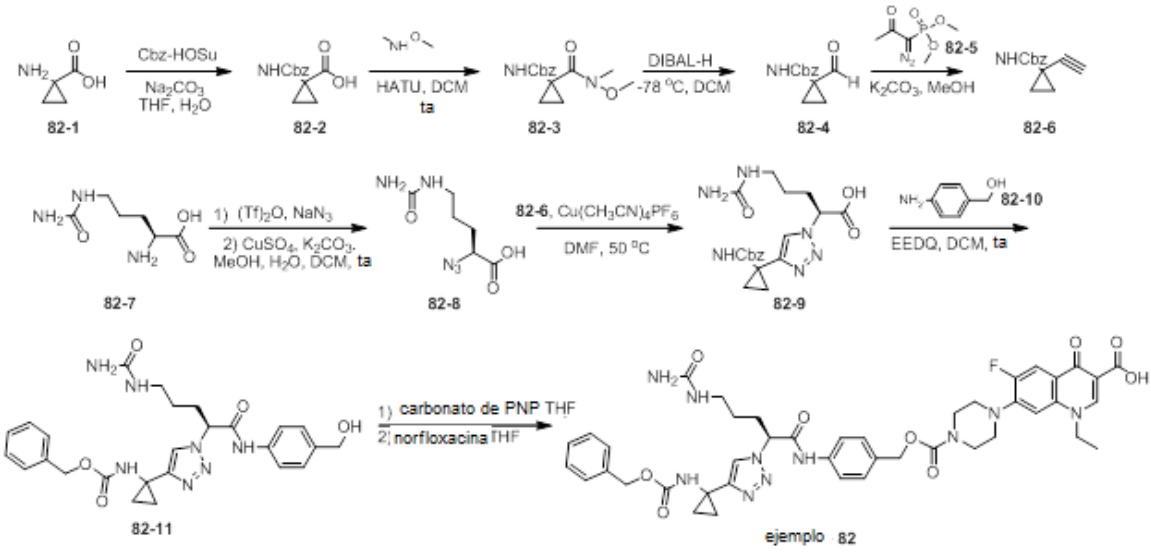
^{1}H RMN (400 MHz, DMSO–d_6) δ 15,35 (br s, 1 H), 10,66 (s, 1 H), 8,97 (s, 1 H), 8,10 (s, 1 H), 7,95 (d, J = 12,8 Hz, 1 H), 7,85–7,83 (m, 1 H), 7,62 (d, J = 8,4 Hz, 2 H), 7,39–7,19 (m, 13 H), 6,07–6,02 (m, 1 H), 5,51–5,45 (m, 3 H), 5,07 (s, 2 H), 5,01–4,92 (m, 3 H), 4,59 (d, J = 7,6 Hz, 2 H), 3,61

(s, 4 H), 3,44–3,38 (m, 4 H), 3,21–3,16 (m, 1 H), 3,06–2,98 (m, 3 H), 2,12–2,00 (m, 2 H), 1,45–1,15 (m, 5 H). LCMS (ESI): m/z 931,2 [M+H$^+$].

Ejemplo 82. Ácido (S)–7–(4–((4–(2–(4–(1–(benciloxicarbonilamino)ciclopropil)–1H–1,2,3–triazol–1–il)–5–ureidopentanamido)benciloxi)carbonil)piperazin–1–il)–1–etil–6–fluoro–4–oxo–1,4–dihidroquinolin–3–carboxílico



ejemplo 82



Etapa 1. A una mezcla de **82–1** (10 g, 98,9 mmol) en solución acuosa de Na_2CO_3 (41,9 g, 395,6 mmol) y se añadió Cbz–OSu (29,6 g, 118,7 mmol) en THF (150 mL). Después de agitar la mezcla a temperatura ambiente durante 16 h, se ajustó a pH > 10 y la solución se lavó con EtOAc (200 mL × 2). La capa acuosa se acidificó a pH < 1 con HCl conc. y la solución se extrajo con EtOAc (250 mL × 2). La capa orgánica se secó

sobre Na_2SO_4 y se concentró para dar **82–2** (23 g, crudo), que se usó para la siguiente etapa sin ulterior purificación.

Etapa 2. A una solución de **82–2** (10 g, 42,5 mmol), clorhidrato de *N,O*–dimetilhidroxilamina (4,5 g, 46,8 mmol) y HATU (24,2 g, 63,8 mmol) en DCM (100 mL) se añadió Et_3N (24,6 mL, 170,0 mmol). Después de agitar la mezcla a temperatura ambiente durante 2 h, el solvente se removió y el producto crudo se extrajo en con agua (300 mL). La capa acuosa se extrajo con EtOAc (300 mL × 3). La capa orgánica se lavó con NaHCO3 saturado, HCl diluido, NaCl saturado, se concentró y se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (PE: EtOAc = 2: 1) para dar **82–3** (10,8 g, 91,3%).

Etapa 3. DIBAL–H (22,5 mL, 1 M en tolueno) se añadió en porciones a una solución de **82–3** (4,2 g, 15,0 mmol) en CH2Cl2 anhidro (50 mL) –78 °C. Después de agitar la mezcla a –78 °C durante 2 h, exceso DIBAL se neutralizó con MeOH anhidro (15 mL) y la solución resultante se calentó hasta temperatura ambiente La solución se concentró para dar **82–4** (3,3 g, crudo), que se usó para la siguiente etapa sin ulterior purificación.

Etapa 4. Después de una mezcla de **82–4** (3,3 g, 15,0 mmol), **82–5** (3,0 g, 18,1 mmol) y K_2CO_3 (4,1 g, 30 mmol) en MeOH (60 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 16 h, solventes se eliminaron a presión reducida y el residuo crudo se dividió entre EtOAc (200 mL) y agua (100 mL). La capa orgánica se lavó con salmuera y se secó sobre Na2SO4 anhidro. Después de la eliminación del solvente, el residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (PE: EtOAc = 10: 1) para dar **82–6** (1,8 g, 55,6%).

Etapa 5. Tf_2O (4,7 mL, 27,9 mmol) se añadió lentamente a la mezcla de NaN_3 (9,2 g, 139,3 mmol) en H_2O destilada (30 mL) y DCM (48 mL) a 0 ^oC. Después de agitar durante 2 h, la capa de DCM se separó y la

porción acuosa se extrajo con CH_2Cl_2 (24 mL × 2). Las fracciones de capa orgánica, que contenía la azida de triflilo se reunieron y se lavaron una vez con Na2CO3 saturado y se usó sin ulterior purificación.

La azida de triflilo en CH_2Cl_2 (96 mL) se añadió a una mezcla de **82–7** (2,44 g, 13,9 mmol), K_2CO_3 (2,89 g, 20,9 mmol) y $CuSO_4$,$5H_2O$ (347 mg, 1,39 mmol) en H_2O (54 mL) y MeOH (108 mL). Después de agitar la mezcla a 26 °C durante 12 h, los solventes orgánicos se eliminaron a presión reducida y la suspensión acuosa se diluyó con H_2O (200 mL). La mezcla se acidificó a pH = 6 con HCl conc. y se diluyó con tampones de fosfato (0,2 M, pH 6,2, 200 mL) y se lavó con EtOAc (300 mL×2). La fase acuosa luego se acidificó a pH = 2 con HCl conc. Se extrajo con EtOAc (300 mL×3). La capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4 y se concentró para dar **82–8**, que se usó para la siguiente etapa sin ulterior purificación.

Etapa 6. Después de una mezcla de **82–8** (2,8 g, 14,0 mmol), **82–6** (1,5 g, 7,0 mmol) y $Cu(CN)_4PF_6$ (779 mg, 2,1 mmol) en DMF (20 mL) se agitó a 50 ºC durante 2 h, el solvente se removió y el residuo se purificó por HPLC prep para dar **82–9** (200 mg, 6,9%).

Etapa 7. Después de una mezcla de **82–9** (410 mg, 0,98 mmol), **82–10** (364 mg, 2,95 mmol) y EEDQ (730 mg, 2,95 mmol) en DCM (10 mL) se agitó a 24°C durante 2 h, el solvente se removió y el residuo se purificó por HPLC prep para dar **82–11** (350 mg, 68%).

^{1}H RMN (400 MHz, MeOD) δ 7,96 (s, 1 H), 7,60 (d, J = 8,4 Hz, 2 H), 7,42–7,35 (m, 7 H), 5,50–5,46 (m, 1 H), 5,14 (s, 2 H), 4,61 (s, 2 H), 3,24–3,22 (m, 1 H), 3,15–3,13 (m, 1 H), 2,30–2,15 (m, 2 H), 1,46–1,40 (m, 4 H), 1,29 (s, 2 H).

LCMS (ESI): m/z 522,0 [M+H$^+$].

Etapa 8. Después de una mezcla de **82–11** (200 mg, 0,38 mmol), PNP

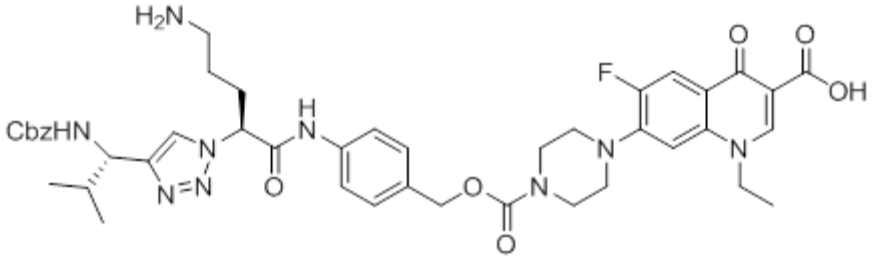
(234 mg, 0,77 mmol) y DIPEA (149 mg, 1,15 mmol) en DCM (10 mL) se agitó a 50 ^{o}C durante 12 h, se concentró y se añadió a una solución de DIPEA (149 mg, 1,15 mmol) y Norfloxacina (367 mg, 1,15 mmol) en DMF (8 mL). Después de agitar a 23 ^{o}C durante 4 h, el solvente se removió y el residuo se purificó por HPLC prep para dar el ejemplo **82** (50 mg, 15,2%).

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO–d_6) δ 10,62 (s, 1 H), 8,96 (s, 1 H), 8,18 (s, 1 H), 7,96–7,89 (m, 2 H), 7,62–7,60 (m, 2 H), 7,38–7,36 (m, 7 H), 7,22–7,20 (m, 1 H), 6,04 (s, 1 H), 5,43 (s, 3 H), 5,07 (s, 2 H), 5,03 (s, 2 H), 4,59–4,57 (m, 2 H), 3,67 (s, 6 H), 3,30––2,98 (m, 4 H), 2,20–2,09 (m, 2 H), 1,42–1,38 (m, 3 H), 1,25–1,22 (s, 4 H), 1,13 (s, 2 H).

MS (ESI): m/z 867,05 [M+H^{+}], 889,16 [M+Na^{+}].

Ejemplo 83. Ácido 7–(4–((4–((S)–5–amino–2–(4–((S)–1–(benciloxicarbonilamino)–2–metilpropil)–1H–1,2,3–triazol–1–il)pentanamido)benciloxi)carbonil)piperazin–1–il)–1–etil–6–fluoro–4–oxo–1,4–dihidroquinolin–3–carboxílico.

Ejemplo 83 se preparó usando el procedimiento como en el Ejemplo **58**.



ejemplo 83

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO–d_6) δ 8,96 (s, 1 H), 8,47–8,39 (m, 1 H), 8,08 (s, 1 H), 7,94 (d, J = 13,2 Hz, 1 H), 7,74 (d, J = 9,2 Hz, 1 H), 7,61 (d, J = 8,4 Hz, 2 H), 7,38–7,29 (m, 8 H), 7,22–7,20 (m, 1 H), 5,49–5,47 (m, 1 H), 5,07 (s, 2 H), 5,02 (d, J = 6,0 Hz, 2 H), 4,62–4,55 (m, 3 H), 3,60 (s, 4 H), 3,16 (s, 4 H), 2,77–2,70 (m, 2 H), 2,20–2,15 (m, 2 H), 2,09–2,00 (m, 1

H), 1,40 (t, *J* = 6,8 Hz, 5 H), 1,23 (s, 1 H), 0,85 (d, *J* = 6,8 Hz, 3 H), 0,78 (d, *J* = 6,8 Hz, 3 H).

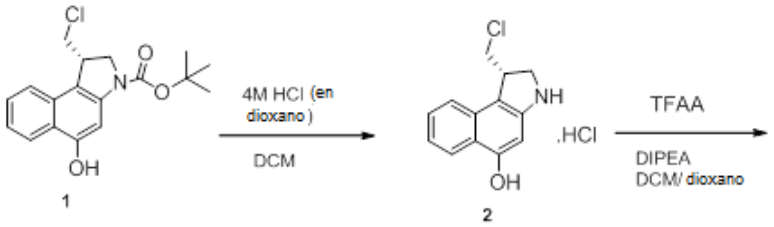
LCMS (ESI): m/z 840,2 [$M+H^+$].

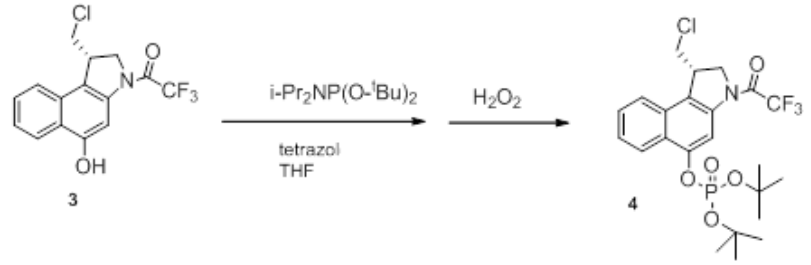
Método de preparación de compuestos de fármaco–ligador

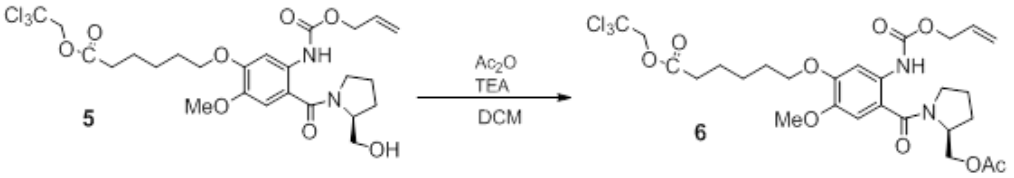
Preparación de CBI–PBD LD1

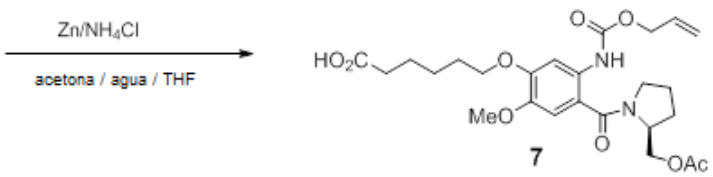
8–(6–((S)–1–(clorometil)–5–(fosfonooxi)–1H–benzo[e]indol–3(2H)–il)–6–oxohexiloxi)–11–hidroxi–7–metoxi–5–oxo–2,3,11,11a–tetrahidro–1H–benzo[e]pirrolo[1,2–a][1,4]diazepin–10(5H)–carboxilato de (11aS)–4–((S)–6–amino–2–(1–(5–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)pentilcarbamoil)ciclobutancarboxamido)hexanamido)bencilo

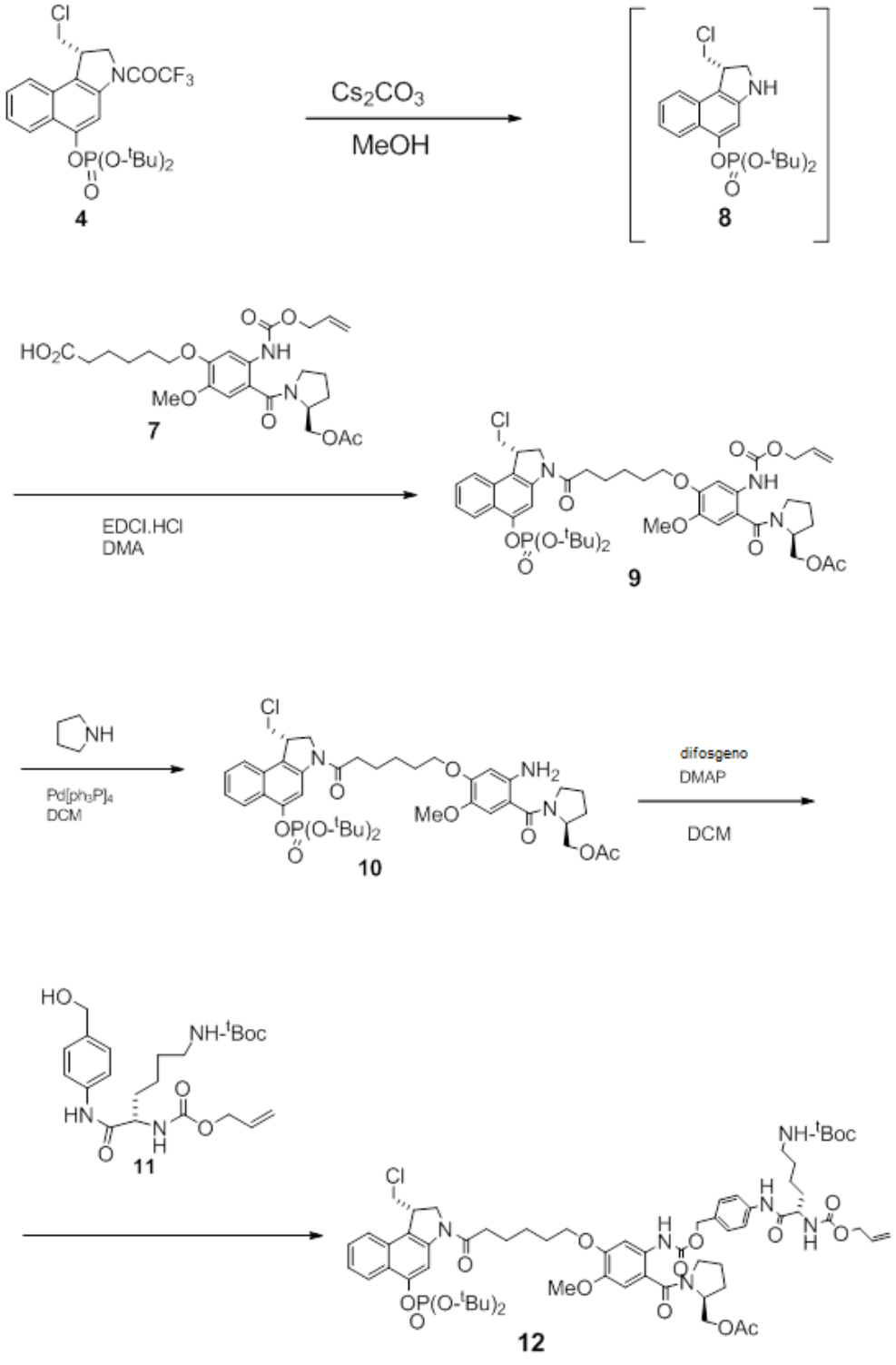
Esquema de síntesis

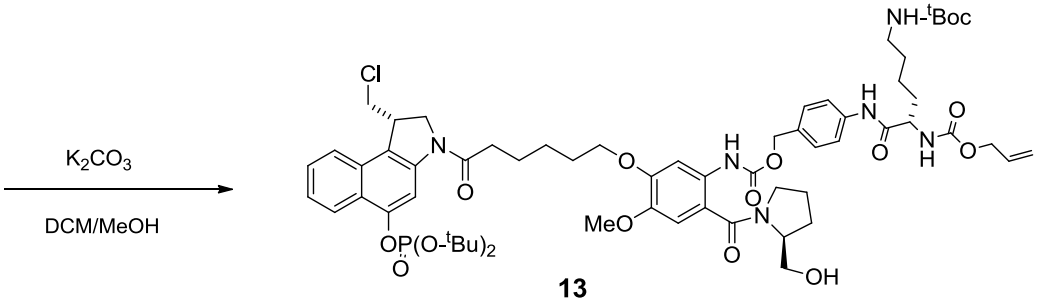

Cl
O
N
O
OH
1
4M HCl (en dioxano)
DCM
Cl
NH
.HCl
OH
2
TFAA
DIPEA
DCM/ dioxano


Cl
O
N
CF3
OH
3
i-Pr2NP(O-tBu)2
tetrazol
THF
H2O2
Cl
O
N
CF3
O
P
O
O
4

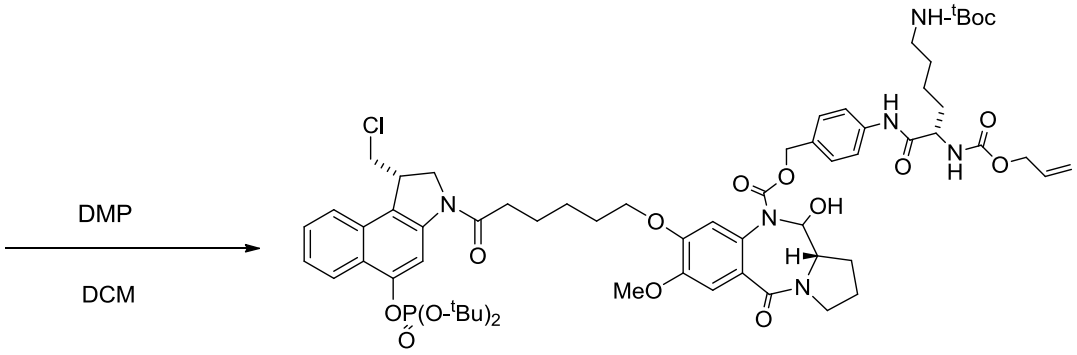

Cl3C
O
O
O
NH
O
O
MeO
N
O
OH
5
Ac2O
TEA
DCM
Cl3C
O
O
O
NH
O
O
MeO
N
O
OAc
6


Zn/NH4Cl
acetona / agua / THF
HO2C
O
O
NH
O
MeO
N
O
OAc
7

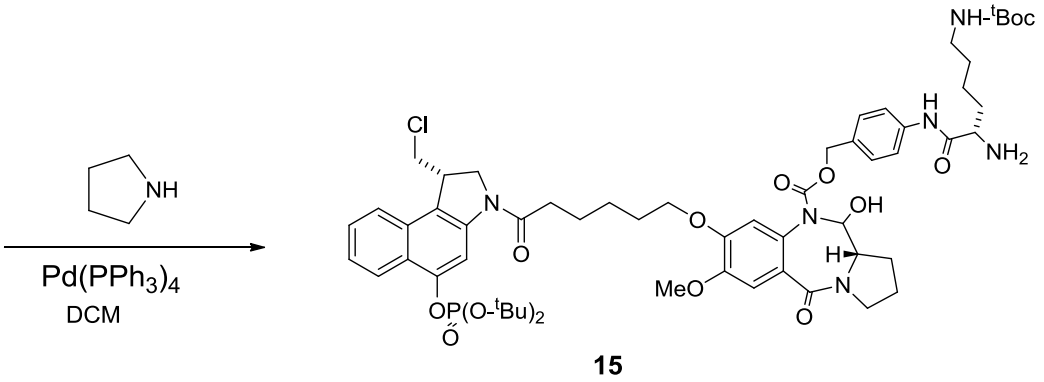

Cl
NCOCF3
OP(O-tBu)2
O
4
Cs2CO3
MeOH
Cl
NH
OP(O-tBu)2
O
8
HO2C
O
NH
MeO
N
O
OAc
7
EDCI.HCl
DMA
Cl
N
O
NH
MeO
N
O
OAc
OP(O-tBu)2
O
9
NH
Pd[ph3P]4
DCM
Cl
N
O
NH2
MeO
N
O
OAc
OP(O-tBu)2
O
10
difosgeno
DMAP
DCM
HO
NH-tBoc
HN
O
N
H
O
O
11
NH-tBoc
Cl
N
O
O
H
N
O
O
MeO
N
O
OAc
OP(O-tBu)2
O
12



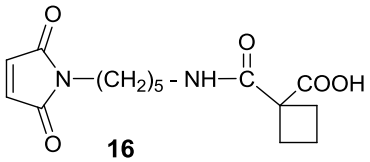
13



14

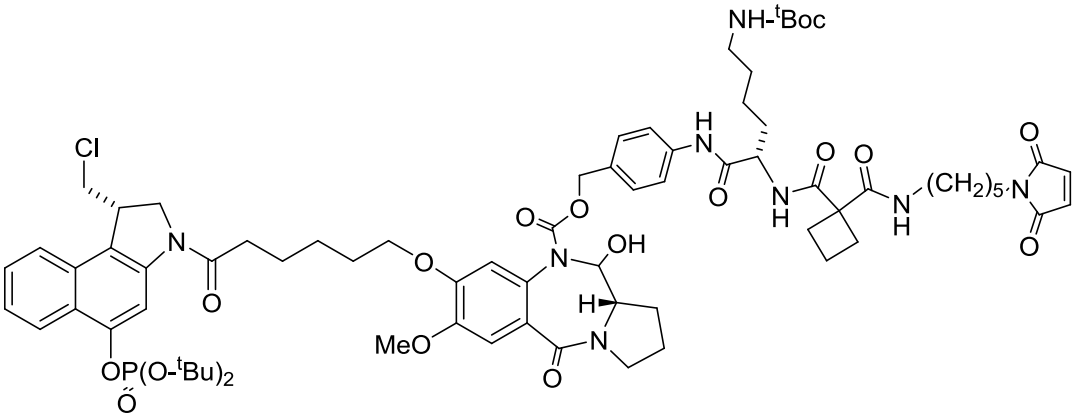


15

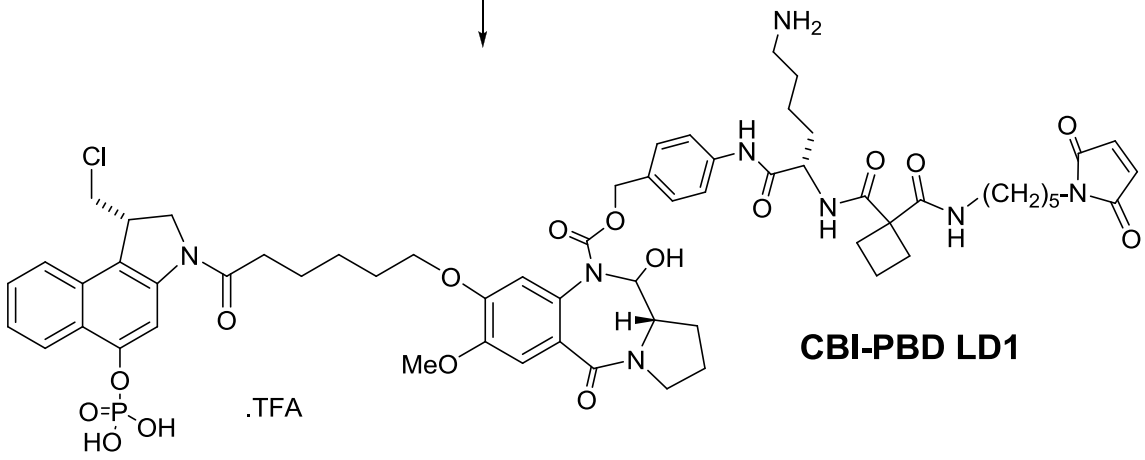


16

EDCI.HCl
DMA



17



CBI-PBD LD1

Ejemplo 1. Ácido 2,2,2–Trifluoroacético compuesto con 8–((6–((S)–1–(clorometil)–5–(fosfonooxi)–1H–benzo[e]indol–3(2H)–il)–6–oxohexil)oxi)–11–hidroxi–7–metoxi–5–oxo–2,3,11,11a–tetrahidro–1H–benzo[e]pirrolo[1,2–a][1,4]diazepin–10(5H)–carboxilato de (11aS)–4–((S)–6–amino–2–(1–((5–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)pentil)carbamoil) ciclobutancarboxamido)hexanamido)bencilo (1:1) (**CBI–PBD LD1**).

A una solución homogénea agitada de fenol **1** (3,34 g, 10,0 mmol) en DCM seca (25 mL) a 20 ^{o}C bajo una atmósfera de nitrógeno se añadió HCl 4 M en dioxano (12,5 mL, 50,0 mmol). Después de adición la mezcla de reacción se agitó a 20 ^{o}C bajo nitrógeno durante otras 20 h. La mezcla se diluyó con éter de petróleo (250 mL) y se agitó a 20 ^{o}C bajo nitrógeno durante 20 min. Los solventes se decantaron y el procedimiento se repitió una vez más con éter de petróleo (250 mL). El sólido resultante se secó al vacío a 25 ^{o}C durante 1 h para dar el compuesto **2** (2,7 g, 100%); ^{1}H RMN [$(CD_3)_2SO$] δ 10,80 (s, 1 H), 8,15 (d, *J* = 8,3 Hz, 1 H), 7,87 (d, *J* = 8,2 Hz, 1 H), 7,58 (br t, *J* = 7,5 Hz, 1 H), 7,43 (br t, *J* = 7,4 Hz, 1 H), 6,81 (s, 1 H), 4,27–4,17 (m, 1 H), 4,01 (dd, *J* = 11,0, 3,2 Hz, 1 H), 3,93–3,74 (m, 3 H), 2 protones no observados. El producto crudo se usó para la siguiente etapa sin ulterior purificación.

A una mezcla heterogénea agitada de amina **2** (2,7 g, 10,0 mmol) en DCM seca (10 mL) y dioxano (30 mL) a 0 ^{o}C bajo una atmósfera de nitrógeno se añadió anhídrido trifluoroacético (TFAA) (3,4 mL, 24,0 mmol), seguido por diisopropiletilamina (DIPEA) (8,71 mL, 50,0 mmol). Después de adición la mezcla de reacción se agitó a 0 ^{o}C bajo nitrógeno durante otros 50 min. Acetato de etilo (400 mL) se añadió y HCl 1 N (200 mL) se añadieron a 0 ^{o}C y la mezcla se agitó durante 20 min bajo nitrógeno. La capa de acetato de etilo se separó, se lavó sucesivamente con HCl 1 N (200 mL) y agua (2x200 mL) y luego se secó ($MgSO_4$) y se evaporó a presión reducida a una temperatura de baño de 25 ^{o}C para dar **3** (3,3 g, 100%) en forma de un sólido gris verdoso. Este material se usó para la siguiente etapa sin ulterior purificación.

A una solución homogénea agitada de fenol **3** (3,3 g, 10,0 mmol) en THF seco (40 mL) a 20 ^{o}C bajo una atmósfera de nitrógeno se añadió di–ter–butil–N,N–diisopropilfosforamidita (4,31 mL, 13,0 mmol). Después

de adición la mezcla de reacción se agitó a 20 ^{o}C bajo nitrógeno durante 5–10 min y luego tetrazol (solución al 3% en CH_3CN, 38,0 mL, 13,0 mmol) se añadió en porciones durante 17 min. La mezcla de reacción final se agitó luego a 20 ^{o}C bajo nitrógeno durante 19 h. La mezcla se enfrió en un baño de hielo y se añadió 30% de H_2O_2 (11,3 mL, 100,0 mmol). Después de adición la mezcla de reacción se agitó a 20 ^{o}C durante otra 1 h 30 min. La mezcla se diluyó con acetato de etilo (300 mL) y $Na_2S_2O_3$ acuoso al 10% (500 mL) se agitó a 0 ^{o}C durante 20 min. La capa de acetato de etilo se separó y se lavó sucesivamente con agua (200 mL), NaHCO3 saturado (200 mL) y agua (200 mL) y luego se secó ($MgSO_4$) y se evaporó a presión reducida a una temperatura de baño de 25 ^{o}C para dar un aceite ámbar. La purificación por cromatografía en un gel de sílice (eluyendo con acetato de etilo:éter de petróleo 1:3) dio el compuesto **4** (4,7 g, 90%) en forma de un sólido espumoso incoloro, p. f. 39–42 ^{o}C; $[\alpha]_D$ –61,8° (c 1,02, $CHCl_3$). Anal. ($C_{23}H_{28}ClF_3NO_5P$) Calc: C, 52,93; H, 5,41; N, 2,68. Exp.: C, 53,05; H, 5,43; N, 2,80.

A una solución agitada de alcohol **5** (4,14 g, 6,95 mmol) (J. Med. Chem. 2003, *46*, 2132–2151) en DCM seca (25 mL) se añadió anhídrido acético (3,30 mL, 34,8 mmol) y trietilamina (5,81 mL, 41,7 mmol). La mezcla se agitó a 20 ^{o}C durante 3 h 30 min. MeOH seco (4,0 mL) se añadió y la mezcla se agitó durante 30 min. La mezcla se dividió entre EtOAc (400 mL) y agua (400 mL). La capa de EtOAc se separó, se lavó con agua (2x200mL), y luego se secó ($MgSO_4$) y se evaporó para dar acetato **6** (4,28 g, 96%) en forma de un aceite; $[\alpha]_D$ –57,4° (*c* 0,21, $CHCl_3$); ^{1}H RMN [$(CD_3)_2SO$] δ 7,17 (s, 1 H), 6,87 (s, 1 H), 6,01–5,87 (m, 1 H), 5,32 (dd, *J* = 17,2, 1,5 Hz, 1 H), 5,21 (dd, *J* = 10,4, 1,4 Hz, 1 H), 4,89 (s, 2 H), 4,54 (d, *J* = 5,4 Hz, 2 H), 4,39–4,20 (m, 3 H), 3,93 (t, *J* = 6,4 Hz, 2 H), 3,75 (s, 3 H), 3,46–3,27 (m, 2 H), 2,13–1,90 (m, 4 H), 1,89–

1,60 (m, 7 H), 1,54–1,40 (m, 2 H), 2 protones oscurecidos por pico de DMSO. HRMS (ESI) m/z calc. para $C_{27}H_{36}Cl_3N_2O_9$: 637,1481, exp.: 637,1475 [MH^+]; calc. para $C_{27}H_{35}Cl_3N_2NaO_9$: 659,1300, exp.: 659,1303 [MNa^+]; calc. para $C_{27}H_{35}Cl_3KN_2O_9$: 675,1040, exp.: 675,1035 [MK^+].

A una solución agitada de acetato **6** (4,27 g, 6,69 mmol) en acetona (75 mL), agua (50 mL) y THF (30 mL) se añadió zinc en polvo (17,5 g, 268 mmol) y NH_4Cl (28,6 g, 535 mmol). La mezcla se agitó a 20 °C bajo una atmósfera de nitrógeno durante 42 h. Acetona (100 mL) se añadió, la mezcla se agitó durante 10 min y el sobrenadante se decantó. El procedimiento se repitió dos veces y los sobrenadantes combinados se evaporaron a presión reducida para remover acetona y THF. El residuo se diluyó con agua (50 mL) y se acidificó con HCl 1 N acuoso a pH de aproximadamente 1. La mezcla ácida se lavó con éter de petróleo (2x200 mL) y se extrajo con EtOAc (400 mL). El extracto de EtOAc se lavó con agua (200 mL) y se secó ($MgSO_4$) y el solvente se evaporó para dar el ácido **7** (2,72 g, 80%) en forma de un aceite; $[\alpha]_D$ –73,5° (*c* 1,12, $CHCl_3$); ^{1}H RMN [$(CD_3)_2SO$] δ 11,99 (s, intercambiable con D_2O, 1 H), 9,10 (s, intercambiable con D_2O, 1 H), 7,17 (s, 1 H), 6,87 (s, 1 H), 6,00–5,86 (m, 1 H), 5,32 (dd, *J* = 17,2, 1,5 Hz, 1 H), 5,20 (dd, *J* = 10,4, 1,5 Hz, 1 H), 4,57–4,52 (m, 2 H), 4,37–4,03 (m, 3 H), 3,93 (t, *J* = 6,5 Hz, 2 H), 3,75 (s, 3 H), 3,40–3,10 (m, 2 H), 2,23 (t, *J* = 7,3 Hz, 2 H), 2,07–1,93 (m, 4 H), 1,89–1,66 (m, 5 H), 1,62–1,49 (m, 2 H), 1,47–1,34 (m, 2 H). HRMS (ESI) m/z calc. para $C_{25}H_{35}N_2O_9$: 507,2337, exp.: 507,2340 [MH^+]; calc. para $C_{25}H_{34}KN_2O_9$: 545,1896, exp.: 545,1906 [MK^+]; calc. para $C_{25}H_{34}N_2NaO_9$: 529,2157, exp.: 529,2169 [MNa^+].

A una solución agitada de trifluoroacetamida **4** (1,38 g, 2,64 mmol) en MeOH (10 mL) a 0 °C bajo una atmósfera de nitrógeno se añadió Cs_2CO_3 (1,03 g, 3,17 mmol). La mezcla se agitó a 0 °C durante 2 h 30

min y luego se dividió en EtOAc (200 mL) y agua (150 mL). La capa de EtOAc se separó y se lavó otra vez con agua (100 mL) y luego se secó ($MgSO_4$) y se evaporó a presión reducida a una temperatura del baño de 25 °C para dar la amina inestable **8** (1,17 g) en forma de un sólido espumoso amarillo pálido.

Este material crudo se trató con ácido **7** (1,24 g, 2,45 mmol), EDCI.HCl (1,41 g, 7,35 mmol) y ácido p–toluensulfónico (84 mg, 0,49 mmol) en DMA seca (14 mL) a 0–20 °C durante 22 h. La mezcla se dividió entre EtOAc (400 mL) y agua (300 mL). La capa de EtOAc se separó y se lavó otra vez con agua (100 mL) y luego se secó ($MgSO_4$) y se evaporó. La purificación por cromatografía en gel de sílice (eluyendo con EtOAc:éter de petróleo 2:1) dio amida **9** (1,49 g, 66%) en forma de un sólido espumoso amarillo pálido, p. f. 55–59 °C; $[\alpha]_D$ –68,0° (*c* 1,00, $CHCl_3$); ^{1}H RMN [$(CD_3)_2SO$] δ 9,10 (s, intercambiable con D_2O, 1 H), 8,56 (s, 1 H), 8,03 (d, *J* = 8,1 Hz, 1 H), 7,92 (d, *J* = 8,4 Hz, 1 H), 7,57 (t, *J* = 8,1 Hz, 1 H), 7,47 (t, *J* = 7,6 Hz, 1 H), 7,19 (s, 1 H), 6,86 (s, 1 H), 5,99–5,86 (m, 1 H), 5,32 (dd, *J* = 17,2, 1,6 Hz, 1 H), 5,20 (dd, *J* = 10,4, 1,5 Hz, 1 H), 4,53 (d, *J* = 5,4 Hz, 2 H), 4,45–3,84 (m, 10 H), 3,74 (s, 3 H), 3,44–3,26 (m, 2 H), 2,68–2,47 (m, 2 H), 2,02 (br s, 3 H), 1,93–1,43 (m, 10 H), 1,474 y 1,469 (2 s, 18 H). HRMS (ESI) m/z calc. para $C_{46}H_{62}ClN_3O_{12}P$: 914,3754, exp.: 914,3749 [MH^+]; calc. for: $C_{46}H_{61}ClKN_3O_{12}P$: 952,3313, exp.: 952,3381 [MK^+]; calc. para $C_{46}H_{61}ClN_3NaO_{12}P$: 936,3574, exp.: 936,3589 [MNa^+].

A una solución agitada de carbamato de **9** (548 mg, 0,60 mmol) en DCM (8 mL) a 20 °C bajo una atmósfera de nitrógeno se añadió $Pd(Ph_3P)_4$ (17,1 mg; 9,8% Pd) y pirrolidina (0,49 mL, 6,00 mmol). La mezcla se agitó a 20 °C durante 30 min y luego se dividió en EtOAc (200 mL) y agua (150 mL). La capa de EtOAc se separó y se lavó otra vez

con agua (50 mL) y luego se secó ($MgSO_4$) y se evaporó a presión reducida a una temperatura de baño de 25 °C. El producto crudo se purificó por cromatografía en gel de sílice (eluyendo con EtOAc:MeOH 50:1) para dar anilina **10** (323 mg, 65%) en forma de un sólido espumoso amarillo pálido, p. f. 46–49 °C; $[\alpha]_D$ –85,2° (c 0,36, $CHCl_3$); ^{1}H RMN [$(CD_3)_2SO$] δ 8,56 (s, 1 H), 8,04 (d, *J* = 8,3 Hz, 1 H), 7,93 (d, *J* = 8,4 Hz, 1 H), 7,58 (t, *J* = 8,2 Hz, 1 H), 7,47 (t, *J* = 8,1 Hz, 1 H), 6,67 (s, 1 H), 6,37 (s, 1 H), 5,09 (s, intercambiable con D_2O, 2 H), 4,46–3,85 (m, 10 H), 3,63 (s, 3 H), 3,52–3,34 (m, 2 H), 2,69–2,50 (m, 2 H), 2,08–1,94 (m, 1 H), 2,01 (s, 3 H), 1,91–1,61 (m, 7 H), 1,58–1,44 (m, 2 H), 1,476 y 1,470 (2 s, 18 H). HRMS (ESI) m/z calc. para $C_{42}H_{58}ClN_3O_{10}P$: 830,3522, exp.: 830,3543 [MH^+].

A una solución agitada de anilina **10** (293 mg, 0,35 mmol) y DMAP (202 mg, 1,65 mmol) en DCM seca (7 mL) a 20 °C bajo una atmósfera de nitrógeno se añadió una solución de difosgeno en DCM seca (0,05 M, 6,7 mL, 0,33 mmol). La mezcla se agitó durante 25 min y luego una solución de alcohol **11** (1,54 g, 3,54 mmol) en DCM seca (20 mL) se añadió. La mezcla se agitó a 20 °C bajo una atmósfera de nitrógeno durante 68 h y luego se dividió en EtOAc (300 mL) y agua (200 mL). La capa de EtOAc se separó, se lavó otra vez con agua (100 mL) y luego se secó ($MgSO_4$) y se evaporó a una temperatura de baño de 30 °C. El aceite anaranjado resultante se purificó por cromatografía en gel de sílice (eluyendo con EtOAc:MeOH:éter de petróleo 30:0,5:10) para obtener carbamato de **12** (385 mg, 84%) en forma de un sólido espumoso, p. f. 72–75 °C; $[\alpha]_D$ –55,2° (c 0,53, $CHCl_3$); ^{1}H RMN [$(CD_3)_2SO$] δ 10,04 (s, intercambiable con D_2O, 1 H), 9,12 (br s, intercambiable con D_2O, 1 H), 8,56 (s, 1 H), 8,03 (d, *J* = 8,3 Hz, 1 H), 7,92 (d, *J* = 8,4 Hz, 1 H), 7,65–7,52 (m, 3 H, reducido a 2 H después de

D_2O), 7,46 (t, *J* = 7,8 Hz, 2 H), 7,31 (d, *J* = 8,5 Hz, 2 H), 7,20 (br s, 1 H), 6,86 (s, 1 H), 6,75 (t poco resuelto, intercambiable con D_2O, 1 H), 5,97–5,83 (m, 1 H), 5,30 (br d, *J* = 17,3 Hz, 1 H), 5,17 (br d, *J* = 10,6 Hz, 1 H), 5,18–4,97 (m, 2 H), 4,51–3,85 (m, 13 H), 3,74 (s, 3 H), 3,43–3,23 (m, 2 H, parcialmente oscurecido por pico de agua), 2,94–2,83 (m, 2 H), 2,65–2,50 (m, 2 H, parcialmente oscurecidos por pico de DMSO), 2,07–1,91 (m, 1 H), 2,01 (br s, 3 H), 1,88–1,43 (m, 11 H), 1,473–1,468 (2 s, 18 H), 1,43–1,20 (m, 4 H), 1,35 (s, 9 H). HRMS (ESI) m/z calc. para $C_{65}H_{89}ClN_6O_{17}P$: 1291,5665, exp.: 1291,5705 [MH^+]; calc. para $C_{65}H_{88}ClKN_6O_{17}P$: 1329,5262, exp.: 1329,5264 [MK^+]; calc. para $C_{65}H_{88}ClN_6NaO_{17}P$: 1313,5554, exp.: 1313,5524 [MNa^+].

Una mezcla de acetato **12** (366 mg, 0,28 mmol) y K_2CO_3 (1,14 g, 8,24 mmol) en DCM (9 mL) y MeOH (9 mL) se agitó a 0 °C durante 3 h 30 min. La mezcla se agitó con cold EtOAc (200 mL) y agua helada (150 mL) durante 10 min. La capa de EtOAc se separó, se lavó otra vez con agua (100 mL) y luego se secó ($MgSO_4$) y se evaporó a una temperatura de baño de 25 °C para dar alcohol **13** (343 mg, 97%) en forma de un sólido espumoso incoloro, p. f. 71–75 °C; $[\alpha]_D$ –58,2° (c 0,57, $CHCl_3$); ^{1}H RMN [$(CD_3)_2SO$] δ 10,04 (s, intercambiable con D_2O, 1 H), 9,11 (br s, intercambiable con D_2O, 1 H), 8,56 (s, 1 H), 8,03 (d, *J* = 8,3 Hz, 1 H), 7,92 (d, *J* = 8,4 Hz, 1 H), 7,65–7,53 (m, 3 H, reducido a 2 H después de D_2O), 7,46 (t, *J* = 7,6 Hz, 2 H), 7,32 (d, *J* = 8,6 Hz, 2 H), 7,27 (br s, 1 H), 6,93 (s, 1 H), 6,75 (t poco resuelto, intercambiable con D_2O, 1 H), 5,97–5,82 (m, 1 H), 5,29 (br d, *J* = 17,2 Hz, 1 H), 5,17 (br d, *J* = 10,5 Hz, 1 H), 5,03 (br s, 2 H), 4,73 (t, *J* = 5,8 Hz, intercambiable con D_2O, 1 H), 4,50–3,82 (m, 11 H), 3,74 (s, 3 H), 3,62–3,44 (m, 2 H), 3,40–3,21 (m, 2 H, parcialmente oscurecido por pico de agua), 2,95–2,80 (m, 2 H), 2,65–2,50 (m, 2 H, parcialmente oscurecidos por pico de DMSO), 1,93–1,21

(m, 16 H), 1,473–1,468 (2 s, 18 H), 1,35 (s, 9 H). HRMS (ESI) m/z calc. para $C_{63}H_{86}ClKN_6O_{16}P$: 1287,5158, exp.: 1287,5113 [MK^+]; calc. para $C_{63}H_{86}ClN_6NaO_{16}P$: 1271,5419, exp.: 1271,5381 [MNa^+].

A una solución agitada de alcohol **13** (322 mg, 0,26 mmol) en DCM seca (14 mL) a 0 °C se añadió peryodinano de Dess–Martin (DMP) (131 mg, 0,31 mmol) en porciones durante 3 min. La mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante otras 2 h, luego a 20 °C durante 50 h. La mezcla se diluyó con DCM (40 mL) y 10% de $Na_2S_2O_3$ (40 mL), se agitó a 20 °C durante 10 min y luego se dividió en DCM (200 mL) y solución saturada de NaHCO3 (150 mL). La capa de DCM se separó y la capa acuosa luego se extrajo con DCM (2x50 mL). Los extractos combinados de DCM se lavaron con solución saturada de NaHCO3 (2x100 mL) y agua (2x100 mL) y luego se secaron ($MgSO_4$) y se evaporó a una temperatura de baño de 25 °C. El aceite anaranjado resultante se purificó por cromatografía en gel de sílice (eluyendo con $CHCl_3$:MeOH 40:1) para dar **14** (228 mg, 71%) en forma de un sólido espumoso marrón pálido, p. f. 98 °C (descomp); $[\alpha]_D$ +74,5° (c 0,26, $CHCl_3$); ^{1}H RMN [$(CD_3)_2SO$] δ 10,02 (s, intercambiable con D_2O, 1 H), 8,56 (s, 1 H), 8,04 (d, *J* = 8,3 Hz, 1 H), 7,92 (d, *J* = 8,4 Hz, 1 H), 7,65–7,47 (m, 5 H, reducido a 4 H después de D_2O), 7,25–7,12 (m, 2 H, br s y 1 H en intercambio de D_2O), 7,03 (s, 1 H), 6,83–6,64 (m, 2 H), 6,48 (br s, intercambiable con D_2O, 1 H), 5,96–5,80 (m, 1 H), 5,52–5,39 (m, d en intercambio de D_2O, *J* = 9,6 Hz, 1 H), 5,27 (br d, *J* = 16,8 Hz, 1 H), 5,21–5,10 (m, 2 H), 4,81 (br d, *J* = 12,3 Hz, 1 H), 4,54–3,85 (m, 8 H), 3,83–3,70 (m, 5 H), 3,53–3,21 (m, 3 H, parcialmente oscurecido por pico de agua), 2,93–2,82 (m, 2 H), 2,64–2,47 (m, 2 H, parcialmente oscurecidos por pico de DMSO), 2,10–1,20 (m, 16 H), 1,470 y 1,464 (2 s, 18 H), 1,34 (s, 9 H). HRMS (ESI) m/z calc. para $C_{63}H_{84}ClKN_6O_{16}P$: 1285,5002, exp.: 1285,4938 [MK^+]; calc. para

$C_{63}H_{84}ClN_6NaO_{16}P$: 1269,5262, exp.: 1269,5220 [MNa^+].

A una solución agitada de **14** (125 mg, 0,10 mmol) en DCM (2 mL) a 20 °C bajo una atmósfera de nitrógeno se añadió $Pd(Ph_3P)_4$ (2,9 mg; 9,8% Pd) y pirrolidina (0,08 mL, 1,00 mmol). La mezcla se agitó a 20 °C y se controló con TLC (EtOAc:MeOH 20:1). Después de 40 min, se añadió más $Pd(Ph_3P)_4$ (5,8 mg; 9,8% Pd) y pirrolidina (0,16 mL, 2,00 mmol) y la mezcla se agitó durante otros 3 h. La mezcla se dividió entre EtOAc (100 mL) y agua (100 mL). La capa de EtOAc se separó y se lavó otra vez con agua (50 mL) y luego se secó ($MgSO_4$) y se evaporó a una temperatura de baño de 25 °C. El producto crudo **15** (94 mg, 81%) se usó para la siguiente etapa sin ulterior purificación. HRMS (ESI) m/z calc. para $C_{59}H_{81}ClN_6O_{14}P$: 1163,5231, exp.: 1163,5188 [MH^+].

Una solución de **15** (91 mg, 0,078 mmol) en DMA seca (1,0 mL) se trató con a pre–formed (at 20 °C durante 10 min) mezcla de ácido **16** (36 mg, 0,12 mmol), EDCI.HCl (34 mg, 0,18 mmol) y TsOH (4,0 mg, 0,023 mmol) en DMA seca (0,5 mL) a 20 ºC bajo una atmósfera de nitrógeno. Después de 10 min DIPEA (0,016 mL, 0,078 mmol) se añadió y la mezcla de reacción se agitó durante 23 h. La mezcla se dividió entre EtOAc (100 mL) y agua (100 mL). La capa de EtOAc se separó y se lavó luego con NaHCO3 saturado (50 mL), agua (50 mL) y luego se secó ($MgSO_4$). La evaporación del solvente a una temperatura de baño de 25 °C dio un producto crudo que se purificó por cromatografía en gel de sílice (eluyendo con $CHCl_3$:EtOAc:MeOH 30:10:2) para dar **17** (63 mg, 56%) en forma de un sólido espumoso marrón pálido; p. f. 67–70 °C; $[\alpha]_D$ +23,9° (c 2,09, $CHCl_3$); ^1H RMN [$(CD_3)_2SO$] δ 10,05 (s, intercambiable con D_2O, 1 H), 8,56 (s, 1 H), 8,03 (d, *J* = 8,3 Hz, 1 H), 7,92 (d, *J* = 8,4 Hz, 1 H), 7,84–7,71 (m, 2 H, intercambiable con D_2O), 7,62–7,52 (m, 3 H), 7,46 (t, *J* = 7,7 Hz, 1 H), 7,22–7,13 (m, 2 H), 7,03 (br s, 1 H), 6,96 (s,

2 H), 6,71 (br s, 2 H, reducido a 1 H después de D_2O), 6,49 (br s, intercambiable con D_2O, 1 H), 5,51–5,41 (m, pero d en intercambio de D_2O con *J* = 9,5 Hz, 1 H), 5,15 (d, *J* = 12,2 Hz, 1 H), 4,82 (br d, *J* = 12,4 Hz, 1 H), 4,47–3,85 (m, 8 H), 3,77 (br s, 3 H), 3,52–3,20 (m, 3 H, parcialmente oscurecido por pico de agua), 3,12–3,20 (m, pero t en intercambio de D_2O con *J* = 6,7 Hz, 2 H), 2,92–2,80 (m, 2 H), 2,65–2,50 (m, 2 H, parcialmente oscurecidos por pico de DMSO), 2,39 (t, *J* = 7,9 Hz, 2 H), 2,07–1,24 (m, 28 H), 1,469 y 1,463 (2 s, 18 H), 1,33 (s, 9 H). HRMS (ESI) m/z calc. para $C_{74}H_{98}ClN_8NaO_{18}P$: 1475,6317, exp.: 1475,6267 [MNa^+].

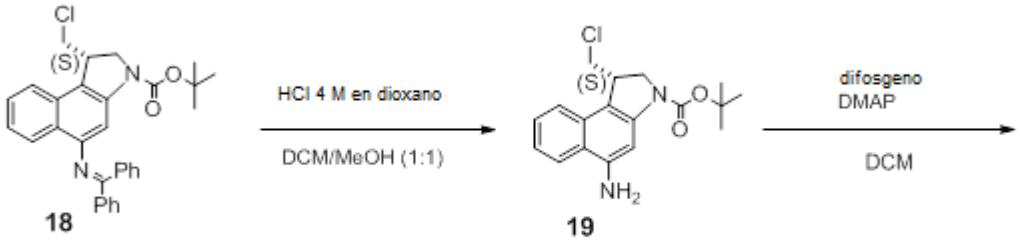
A una solución agitada de **17** (45 mg, 0,031 mmol) en DCM (1,0 mL) a 20 °C bajo nitrógeno se añadió TFA (1,0 mL) y la mezcla se agitó durante 15 min. Éter de petróleo (20 mL) se añadió y la mezcla se agitó durante 30 min. El sobrenadante se decantó y el procedimiento se repitió usando EtOAc:éter de petróleo (1:5) (2×20 mL). El sólido resultante se recolectó y se purificó por HPLC preparativa [columna Synergy PolarRP; TFA acuoso (pH = 2,56; 90% al 2%)/10% agua en CH_3CN (10% al 98%); elución en gradiente durante 23 min con una tasa de flujo de 12 mL/min] para dar **CBI–PBD LD1** puro (17,5 mg, 38%) en forma de un sólido beige, pureza (HPLC): 99,1%; $[\alpha]_D$ +54,9° (c 0,18, MeOH); ^1H RMN [$(CD_3)_2SO$] δ 10,20 (s, intercambiable con D_2O, 1 H), 8,50 (s, 1 H), 8,20–7,78 (m, 7 H, reducido a 1H después de D_2O), 8,12 (d, *J* = 9,1 Hz, 1 H), 7,72–7,47 (m, 4 H, reducido a 3H después de D_2O), 7,40 (t, *J* = 7,5 Hz, 1 H), 7,17 (br d, *J* = 7,3 Hz, 2 H), 7,03 (br s, 1 H), 6,97 (s, 2 H), 6,66 (br s, intercambiable con D_2O, 1 H), 5,51 (br s, 1 H), 5,48 (br d, *J* = 9,7 Hz, 1 H), 5,32–5,18 (m, pero d después de D_2O, *J* = 12,6 Hz, 1 H), 4,75 (br d, *J* = 12,4 Hz, 1 H), 4,44–3,81 (m, 8 H), 3,77 (s, 3 H), 3,52–3,21 (m, 5 H, parcialmente oscurecido por pico de agua), 3,04 (q, pero t después de

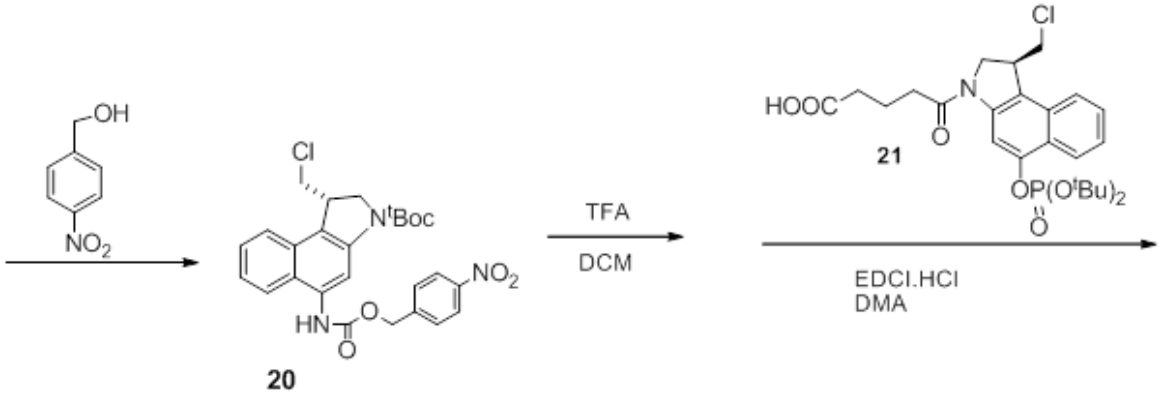
D_2O con *J* = 6,8 Hz, 2 H), 2,80–2,68 (m, 2 H), 2,39 (t, *J* = 7,7 Hz, 2 H), 2,12–1,08 (m, 28 H). HRMS (ESI) m/z calc. para $C_{61}H_{75}ClN_8O_{16}P$: 1241,4722, exp.: 1241,4700 [MH^+]; calc. para $C_{61}H_{74}ClN_8NaO_{16}P$: 1263,4541, exp.: 1263,4531 [MNa^+].

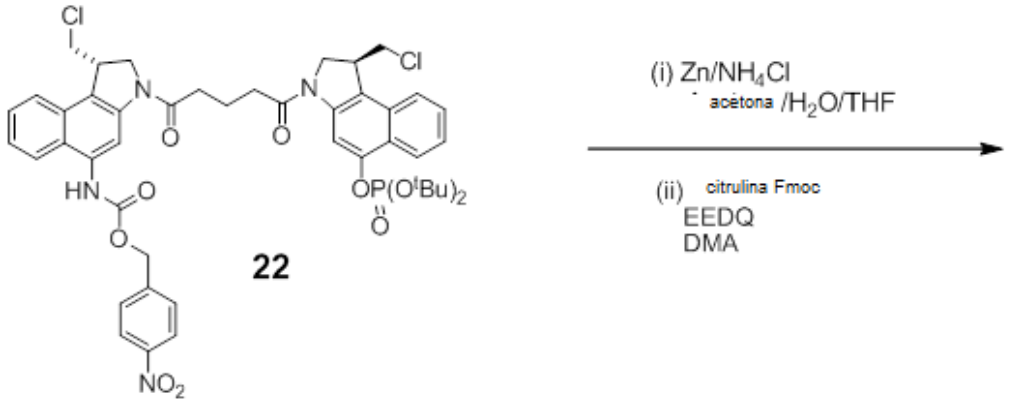
Síntesis de CBI–CBI LD4

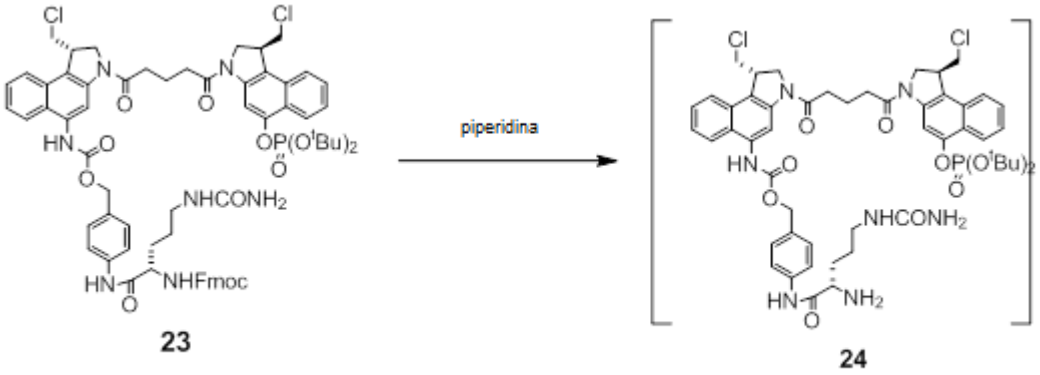
(S)–1–(clorometil)–3–(5–((S)–1–(clorometil)–5–(fosfonooxi)–1H–benzo[e]indol–3(2H)–il)–5–oxopentanoil)–2,3–dihidro–1H–benzo[e]indol–5–ilcarbamato de 4–((S)–2–(1–(5–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)pentilcarbamoil)ciclobutancarboxamido)–5–ureidopentanamido)bencilo

Esquema de síntesis

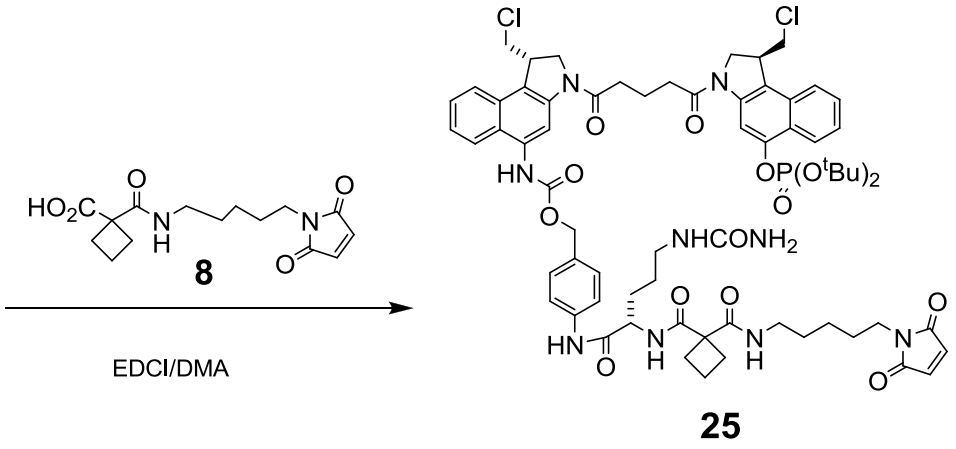



OH
NO2
Cl
NtBoc
NO2
HN
O
O
20
TFA
DCM
Cl
HOOC
N
O
21
OP(OtBu)2
O
EDCI.HCl
DMA

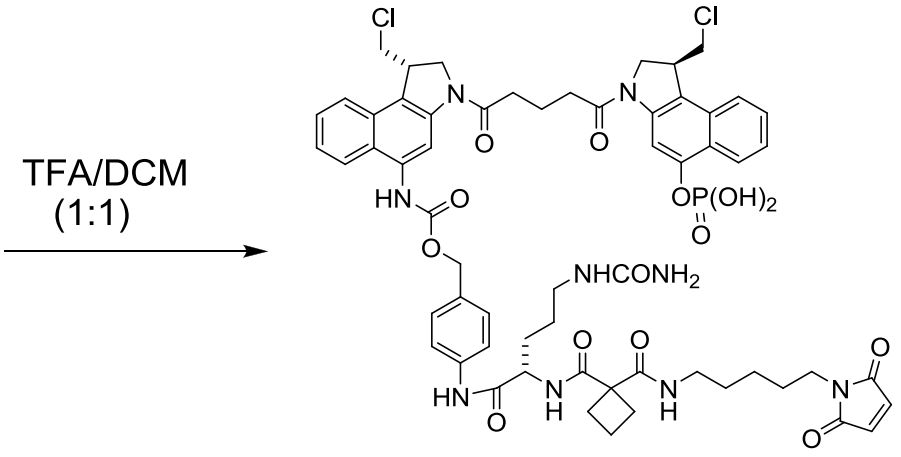

Cl
Cl
N
N
O
O
HN
O
O
OP(OtBu)2
O
22
NO2
(i) Zn/NH4Cl
acetona /H2O/THF
(ii) citrulina Fmoc
EEDQ
DMA


Cl
Cl
N
N
O
O
HN
O
O
OP(OtBu)2
O
NHCONH2
HN
NHFmoc
O
23
piperidina
Cl
Cl
N
N
O
O
HN
O
O
OP(OtBu)2
O
NHCONH2
HN
NH2
O
24

5



25



CBI-CBI LD4

Ejemplo 2. ((S)–1–(clorometil)–3–(5–((S)–1–(clorometil)–5–(fosfonooxi)–1H–benzo[e]indol–3(2H)–il)–5–oxopentanoil)–2,3–dihidro–1H–benzo[e]indol–5–il)carbamato de 4–((S)–2–(1–((5–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)pentil)carbamoil)ciclobutancarboxamido)–5–ureidopentanamido)bencilo (**CBI–CBI LD4).**

A una solución agitada de imina **18** (497 mg, 1,00 mmol) en DCM seca (10 mL) y MeOH (10 mL) a 20 °C bajo nitrógeno se añadió HCl 4 M en dioxano (0,63 mL, 2,5 mmol). Después de adición la mezcla de reacción se agitó a 20 °C durante 1 h. Las sustancias volátiles se

evaporaron a presión reducida a 20 °C para dar un sólido amarillo que se agitó con una mezcla de EtOAc y éter de petróleo (1:10) (200 mL) a 20 °C durante 30 min. El sobrenadante se decantó y el procedimiento se repitió. El sólido resultante se agitó con una mezcla de Na_2CO_3 acuoso (2 N, 200 mL) y DCM (200 mL) a 0 °C durante 15 min. La capa de DCM se separó, se lavó con agua (100 mL) y luego se secó ($MgSO_4$) y se evaporó a 25 °C para dar anilina **19** (322 mg, 97%) en forma de un sólido inestable; ^{1}H RMN [$(CD_3)_2SO$] δ 8,01 (d, *J* = 8,4 Hz, 1 H), 7,94–7,78 (m, 2 H), 7,52 (t, *J* = 7,3 Hz, 1 H), 7,39 (t, *J* = 7,5 Hz, 1 H), 4,20–3,72 (m, 5 H), 1,54 (s, 9 H), 2 protones no observado. HRMS (ESI) m/z calc. para $C_{18}H_{22}ClN_2O_2$: 333,1364, exp.: 333,1355 [MH^+]; calc. para $C_{18}H_{21}ClKN_2O_2$: 371,0923, exp.: 371,0920 [MK^+]; calc. para $C_{18}H_{21}ClN_2NaO_2$: 355,1184, exp.: 355,1179 [MNa^+]. Este material se usó para la siguiente etapa sin ulterior purificación.

A una mezcla homogénea agitada de anilina **19** (322 mg, 0,97 mmol) y DMAP (730 mg, 6,00 mmol) en DCM seca (30 mL) a 20 °C bajo nitrógeno se añadió una solución de difosgeno en DCM seca (0,10 M, 11 mL, 1,10 mmol). La mezcla se agitó durante 20 min y luego alcohol p–nitrobencílico sólido (1,53 g, 10,0 mmol) se añadió. La mezcla de reacción final se agitó a 20 °C bajo nitrógeno durante 18 h y luego se dividió en EtOAc (300 mL) y agua (300 mL). La capa de EtOAc se separó, se lavó con salmuera (200 mL) y se secó ($MgSO_4$). La evaporación del solvente a 30 °C dio un sólido amarillo blando que se purificó por cromatografía en gel de sílice (eluyendo con DCM:EtOAc:éter de petróleo 20:1:10) para obtener carbamato de **20** (411 mg, 83%) en forma de un sólido amarillo pálido, p. f. 141–142 °C; $[\alpha]_D$ –15,0° (c 0,20, $CHCl_3$); ^{1}H RMN [$(CD_3)_2SO$] δ 9,85 (s, 1 H), 8,36–8,15 (m, 3 H), 8,05 (d, *J* = 8,4 Hz, 1 H), 7,88 (d, *J* = 8,3 Hz, 1 H), 7,72 (d,

J = 8,6 Hz, 2 H), 7,57–7,49 (m, 1 H), 7,45–7,36 (m, 1 H), 5,35 (s, 2 H), 4,27–4,12 (m, 2 H), 4,10–3,96 (m, 2 H), 3,94–3,81 (m, 1 H), 1,52 (s, 9 H). Anal. ($C_{26}H_{26}ClN_3O_6$) Calc: C, 61,00; H, 5,12; N, 8,21. Exp.: C, 61,27; H, 5,05; N, 8,25.

A una solución agitada de **20** (282 mg, 0,55 mmol) en DCM (6 mL) a 0 °C bajo nitrógeno se añadió ácido trifluoroacético (TFA) (3 mL). Después de adición la mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 1 h 15 min y luego se dividió en DCM (300 mL) y Na_2CO_3 acuoso frío (2 N, 300 ml). La capa de DCM se separó, se lavó con Na_2CO_3 acuoso frío (2 N, 100 mL) y agua (100 mL) y luego se secó ($MgSO_4$) y se evaporó a 25 °C para dar un sólido anaranjado. Este sólido se disolvió en DMA seca (4 mL) y se trató con ácido **21** (297 mg, 0,55 mmol), EDCI.HCl (317 mg, 1,65 mmol) y TsOH (19 mg, 0,11 mmol). La mezcla se agitó a 20 °C bajo nitrógeno durante 22 h y luego se dividió en EtOAc (300 mL) y agua (300 mL). La capa de EtOAc se separó, se lavó con agua (200 mL) y se secó ($MgSO_4$). La evaporación de solvente a 25 °C dio un aceite que se purificó por cromatografía en gel de sílice (eluyendo con DCM:EtOAc 2:1) para obtener amida **22** (181 mg, 35%) en forma de un sólido viscoso, $[\alpha]_D$ –26,8° (c 0,37, $CHCl_3$); ^{1}H RMN [$(CD_3)_2SO$] δ 9,84 (s, 1 H), 8,62 (s, 1 H), 8,59 (s, 1 H), 8,28 (d, *J* = 8,5 Hz, 2 H), 8,04 (d, *J* = 8,5 Hz, 2 H), 7,92 (d, *J* = 8,2 Hz, 2 H), 7,72 (d, *J* = 8,3 Hz, 2 H), 7,63–7,57 (m, 2 H), 7,51–7,39 (m, 2 H), 5,34 (s, 2 H), 4,48–4,17 (m, 6 H), 4,10–3,97 (m, 2 H), 3,97–3,84 (m, 2 H), 2,82–2,54 (m, 4 H), 2,04–1,91 (m, 2 H), 1,49 (s, 18 H). HRMS (ESI) m/z calc. para $C_{47}H_{51}Cl_2KN_4O_{10}P$: 971,2351, exp.: 971,2344 [MK^+]; calc. para $C_{47}H_{51}Cl_2N_4NaO_{10}P$: 955,2612, exp.: 955,2621 [MNa^+].

A una solución agitada del compuesto nitro **22** (47 mg, 0,05 mmol) en acetona:agua:THF (10:5:1) (6 mL) a 0 °C bajo nitrógeno se añadió Zn

en polvo (65,4 mg, 1,00 mmol) y NH_4Cl (107 mg, 2,00 mmol). Después de adición la mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 40 min. La mezcla de reacción se filtró a través de celite, lavando varias veces con DCM frío. Los filtrados combinados se lavaron con agua fría (50 mL) y luego se secó ($MgSO_4$) y se evaporó a 25 °C para dar un sólido espumoso amarillo. Este sólido se disolvió en DMA seca (1 mL) y se añadió a una mezcla preformada (10 min a 20 °C) de Fmoc–L–citrulina (29,8 mg, 0,075 mmol) y EEDQ (18,5 mg, 0,075 mmol) en DMA (0,3 mL). La mezcla de reacción se agitó a 20 °C bajo nitrógeno durante 48 h y luego se dividió en EtOAc (100 mL) y agua (100 mL). La capa de EtOAc se separó, se lavó con agua (50 mL) y se secó ($MgSO_4$). La evaporación de solvente a 25 °C dio un aceite que se purificó por cromatografía en gel de sílice (EtOAc:MeOH 10:1) para dar **23** (24 mg, 38%) en forma de un sólido viscoso, $[\alpha]_D$ –31,9° (c 0,28, $CHCl_3$); ^{1}H RMN [$(CD_3)_2SO$] δ 9,66 (s, 1 H), 8,62 (s, 1 H), 8,59 (s, 1 H), 8,10–7,25 (m, 21 H), 6,04–5,94 (m, 1 H), 5,53–5,29 (m, 2 H), 5,13 (s, 2 H), 4,51–4,08 (m, 10 H), 4,08–3,82 (m, 4 H), 3,11–2,90 (m, 2 H), 2,80–2,54 (m, 4 H), 2,04–1,92 (m, 2 H), 1,80–1,30 (m, 4 H), 1,49 (s, 18 H). HRMS (ESI) m/z calc. para $C_{68}H_{75}Cl_2N_7O_{12}P$: 1282,4583, exp.: 1282,4536 [MH^+]; calc. para $C_{68}H_{74}Cl_2KN_7O_{12}P$: 1320,4142, exp.: 1320,4119 [MK^+]; calc. para $C_{68}H_{74}Cl_2N_7NaO_{12}P$: 1304,4402, exp.: 1304,4388 [MNa^+].

A una solución agitada de **23** (86 mg, 0,067 mmol) en DMA seca (3 mL) a 0 °C bajo nitrógeno se añadió una solución de piperidina en DMA (1,00 M, 0,58 mL, 0,58 mmol) y la mezcla se agitó a 0 °C durante 1 h 30 min. Una mezcla de EtOAc y éter de petróleo (1:10, 60 mL) se añadió y la mezcla se agitó a 0 °C durante 40 min. El sobrenadante se decantó y el procedimiento se repitió con más EtOAc–éter de petróleo (1:3, 50 mL, luego 30 mL). El aceite residual se secó al vacío a 20 °C

durante 1 h para dar intermediario amine **24** (67 mg, 94%) en forma de un sólido viscoso. Este sólido se usó para la siguiente etapa sin ulterior purificación.

Una mezcla de ácido **8** (30,4 mg, 0,098 mmol), EDCI.HCl (25,3 mg, 0,13 mmol) y TsOH (2,2 mg, 0,013 mmol) en DMA seca (0,7 mL) se agitó a 20 °C bajo nitrógeno durante 10 min. A esta mezcla se añadió una solución de la amina anterior **24** (67 mg, 0,060 mmol), seguido por DIPEA (0,011 mL, 0,065 mmol. La mezcla de reacción se agitó a 20 °C bajo nitrógeno durante 20 h. Agua helada (30 mL) se añadió y la mezcla se agitó a 0 °C durante 30 min. El sólido separado se filtró, se secó y se purificó por cromatografía en gel de sílice (eluyendo con DCM:EtOAc;MeOH 10:10:1) para dar **25** (44 mg, 54%) en forma de un sólido viscoso, $[\alpha]_D$ –51,6° (c 0,16, $CHCl_3$); ^{1}H RMN [$(CD_3)_2SO$] δ intercambiable con D_2O, 9,66 (s, intercambiable con D_2O, 1 H), 8,62 (s, 1 H), 8,59 (s, 1 H), 8,08–7,76 (m, 6 H, reducido a 4 H después de intercambio de D_2O), 7,69–7,34 (m, 8 H), 6,97 (s, 2 H), 5,96 (t, *J* = 5,7 Hz, intercambiable con D_2O, 1 H), 5,40 (s, intercambiable con D_2O, 2 H), 5,11 (s, 2 H), 4,50–4,15 (m, 7 H), 4,02–3,82 (m, 4 H), 3,25 (t, parcialmente oscurecido por pico de agua, *J* = 6,8 Hz, 2 H), 3,13–2,86 (m, 4 H), 2,81–2,56 (m, 4 H), 2,45–2,33 (m, 4 H), 2,05–1,91 (m, 2 H), 1,83–1,09 (m, 12 H), 1,49 (s, 18 H). HRMS (ESI) m/z calc. para $C_{68}H_{83}Cl_2N_9O_{14}P$: 1350,5169, exp.: 1350,5170 [MH^+]; calc. para $C_{68}H_{82}Cl_2KN_9O_{14}P$: 1388,4727, exp.: 1388,4771 [MK^+]; calc. para $C_{68}H_{82}Cl_2N_9NaO_{14}P$: 1372,4988, exp.: 1372,4992 [MNa^+].

A una solución agitada de **25** (30,3 mg, 0,022 mmol) en DCM (1,0 mL) a 20 ºC bajo nitrógeno se añadió TFA (1,0 mL). Después de adición la mezcla se agitó a esta temperatura durante 1 min. Éter de petróleo frío (20 mL) se añadió y la mezcla se agitó a 0 °C durante 15 min. El

sobrenadante se decantó y el procedimiento se repitió con EtOAc–éter de petróleo (1:3, 2×20 mL). El sólido resultante se recolectó y se secó al vacío a 20 °C para dar **CBI–CBI LD4** (25,3 mg, 93%) en forma de un sólido beige, $[\alpha]_D$ –186° (c 0,059, MeOH); ^{1}H RMN [$(CD_3)_2SO$] δ intercambiable con D_2O, 9,66 (s, intercambiable con D_2O, 1 H), 8,62 (s, 1 H), 8,51 (s, 1 H), 8,10 (d, *J* = 8,4 Hz, 1 H), 8,00 (d, *J* = 8,5 Hz, 1 H), 7,94–7,73 (m, 4 H, reducido a 2 H después de intercambio de D_2O), 7,65 (d, *J* = 8,4 Hz, 2 H), 7,60–7,32 (m, 6 H), 6,97 (s, 2 H), 6,00 (t, *J* = 5,5 Hz, intercambiable con D_2O, 1 H), 5,45 (br s, intercambiable con D_2O, 2 H), 5,13 (s, 2 H), 4,52–4,15 (m, 7 H), 4,10–3,82 (m, 4 H), 3,28 (t, parcialmente oscurecido por pico de agua, *J* = 6,9 Hz, 2 H), 3,13–2,84 (m, 4 H), 2,81–2,56 (m, 4 H), 2,47–2,34 (m, 4 H), 2,08–1,89 (m, 2 H), 1,84–1,53 (m, 4 H), 1,53–1,09 (m, 8 H), 2 H no observado. HRMS (ESI) m/z calc. para $C_{60}H_{65}Cl_2N_9O_{14}P$: 1236,3771, exp.: 1236,3772 $[M–H]^–$.

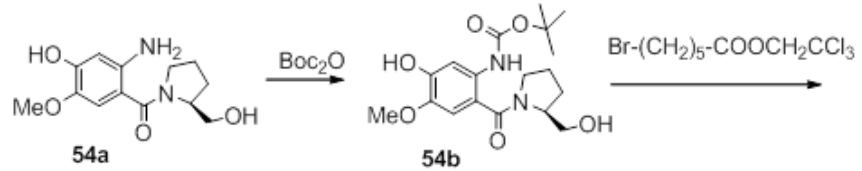
Preparación de 8–((6–((S)–1–(clorometil)–5–((4–metilpiperazin–1–carbonil)oxi)–1H–benzo[e]indol–3(2H)–il)–6–oxohexil)oxi)–11–hidroxi–7–metoxi–5–oxo–2,3,11,11a–tetrahidro–1H–benzo[e]pirrolo[1,2–a][1,4]diazepin–10(5H)–carboxilato de (11aS)–4–((S)–6–amino–2–(1–((5–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)pentil)carbamoil)ciclobutancarboxamido)hexanamido)bencilo bis(2,2,2–trifluoroacetato) (**CBI–PBD LD2**) y 8–((6–((S)–1–(clorometil)–5–((4–metilpiperazin–1–carbonil)oxi)–1H–benzo[e]indol–3(2H)–il)–6–oxohexil)oxi)–7,11–dimetoxi–5–oxo–2,3,11,11a–tetrahidro–1H–benzo[e]pirrolo[1,2–a][1,4]diazepin–10(5H)–carboxilato de (11aS)–4–((S)–6–amino–2–(1–((5–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)pentil)carbamoil)ciclobutancarboxamido)hexanamido)bencilo bis(2,2,2–trifluoroacetato) (**CBI–PBD LD3**)

Etapa A:

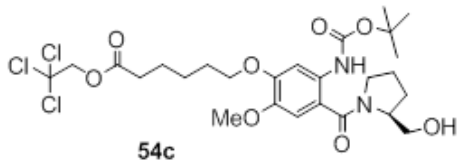
Síntesis de Compuesto 15 (65j en PCT/US2014/042560) :

8–(6–((S)–1–(clorometil)–5–(4–metilpiperazin–1–carboniloxi)–1H–benzo[e]indol–3(2H)–il)–6–oxohexiloxi)–11–hidroxi–7–metoxi–5–oxo–2,3,11,11a–tetrahidro–1H–benzo[e]pirrolo[1,2–a][1,4]diazepin–10(5H)–carboxilato de (S)–4–((S)–2–(aliloxicarbonilamino)–6–(ter–butoxicarbonilamino)hexanamido)bencilo

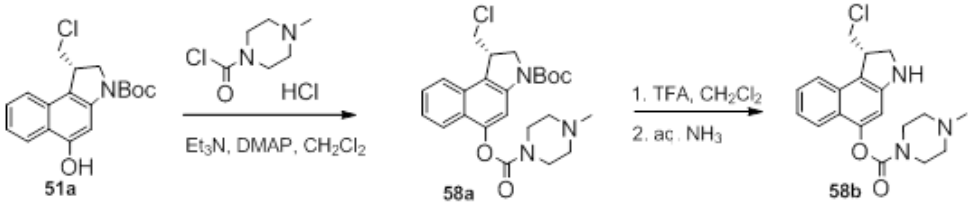
Esquema



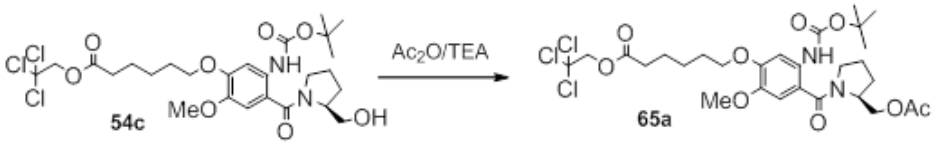
54a 54b



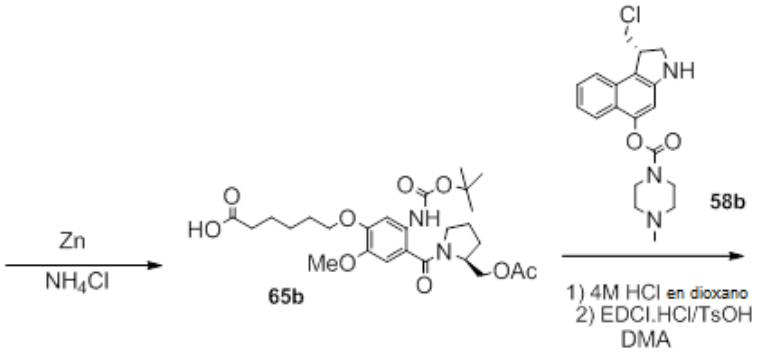
54c



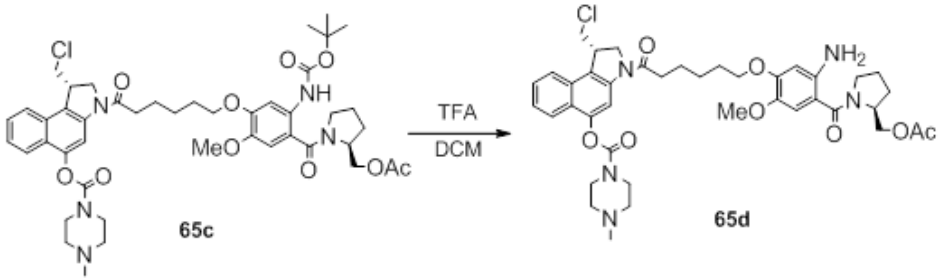
51a 58a 58b



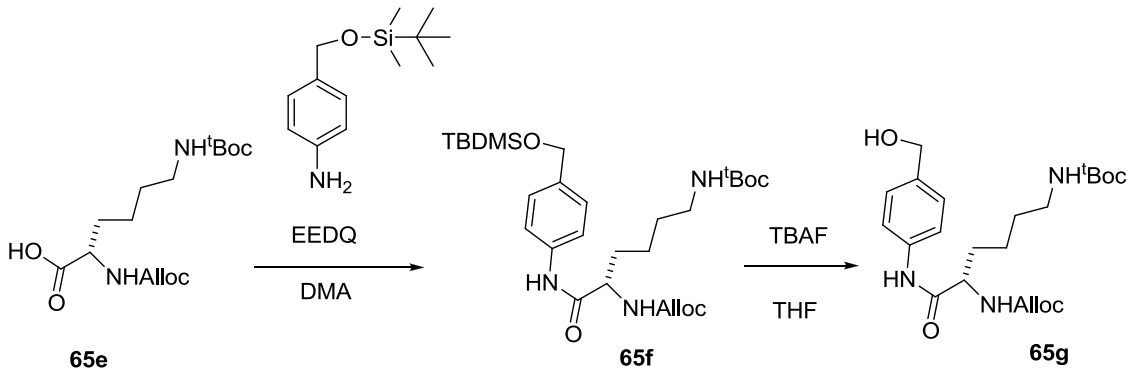
54c 65a

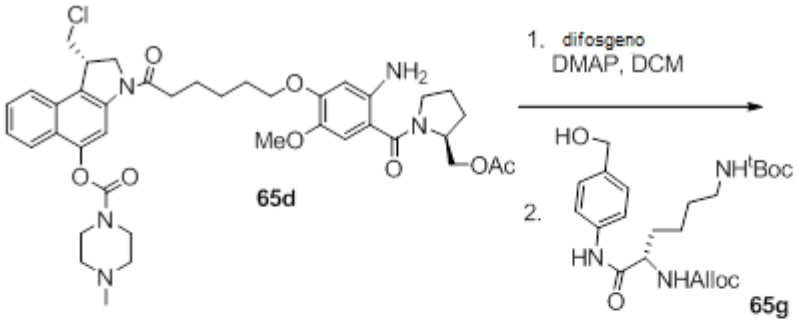


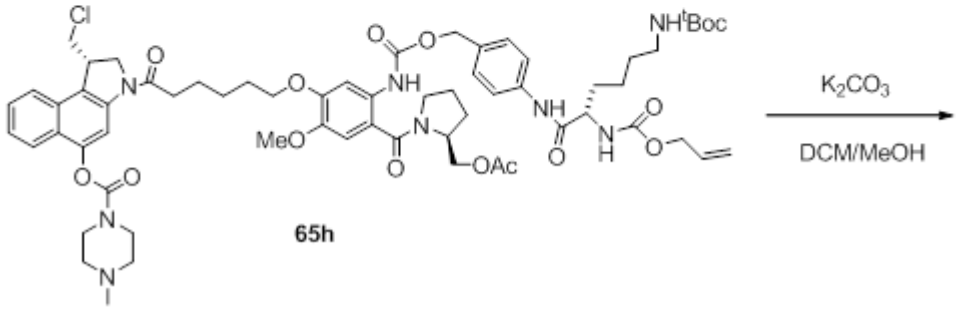
65b

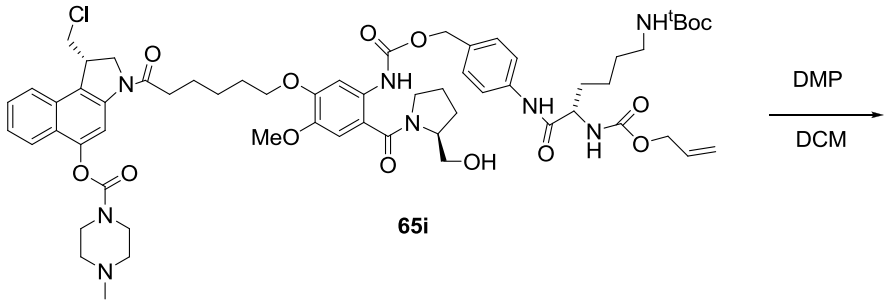


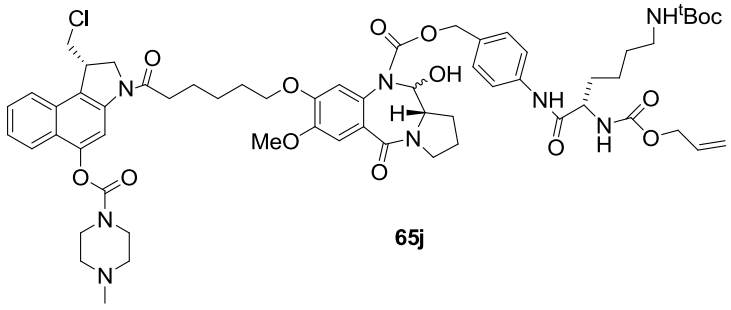
65c 65d


NHtBoc
HO
NHAlloc
O
65e
O-Si
NH2
EEDQ
DMA
TBDMSO
NHtBoc
HN
NHAlloc
O
65f
TBAF
THF
HO
NHtBoc
HN
NHAlloc
O
65g


Cl
O
N
O
O
NH2
MeO
N
O
OAc
O
O
N
N
65d
1. difosgeno
DMAP, DCM
2.
HO
NHtBoc
HN
NHAlloc
O
65g


Cl
O
N
O
O
NH
MeO
N
O
OAc
O
NHtBoc
NH
O
N
H
O
O
O
O
N
N
65h
K2CO3
DCM/MeOH


Cl
O
N
O
O
NH
MeO
N
O
OH
O
NHtBoc
NH
O
N
H
O
O
O
O
N
N
65i
DMP
DCM


Cl
O
N
O
O
N
OH
H
MeO
N
O
O
NHtBoc
NH
O
N
H
O
O
O
O
N
N
65j

Etapa 1. 6–(5–(ter–butoxicarbonilamino)–4–(2–(hidroximetil)pirrolidin–1–carbonil)–2–metoxifenoxi)hexanoato de (S)–2,2,2–tricloroetilo **54c**

Una mezcla de (S)–(2–amino–4–hidroxi–5–metoxifenil)(2–(hidroximetil)pirrolidin–1–il)metanona **54a** (7,6 g, 28,6 mmol), preparado por los procedimientos de Tercel et al (2003) J. Med. Chem 46:2132–2151 y dicarbonato de di–t–butilo (12,48 g, 57,2 mmol) en THF anhidro (140 mL) se agitó a reflujo en una atmósfera de nitrógeno durante 18 h. La mezcla de reacción se enfrió hasta temperatura ambiente y NaOH 2 N (57,2 mL, 114 mmol) y MeOH (70 mL) se añadieron. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 6 h. Las sustancias volátiles se evaporaron a presión reducida a 35–40 ^{o}C (temperatura del baño). Agua helada (250 mL) se añadió y el pH se ajustó a 8–9 a 0 ^{o}C. La mezcla se agitó con éter de petróleo–acetato de etilo (20:1) (2x400 mL) a temperatura ambiente durante 15 min. La capa orgánica se separó y se descartó. La capa acuosa se extrajo con DCM (4x300 mL) y los extractos combinados se secaron ($MgSO_4$) y se evaporaron a presión reducida para dar 5–hidroxi–2–(2–(hidroximetil)pirrolidin–1–carbonil)–4–metoxifenilcarbamato de (S)–ter–butilo de **54b** en forma de un sólido blanco rosado (9,36 g, 89%); p. f. 154–156 ^{o}C; ^{1}H RMN [$(CD_3)_2SO$] δ 9,51 (s, 1 H), 8,90 (s, 1 H), 7,27 (s, 1 H), 6,91 (s, 1 H), 4,73 (t, *J* = 5,8 Hz, 1 H), 4,16–4,02 (m, 1 H), 3,73 (s, 3 H), 3,64–3,34 (m, 4 H), 1,99–1,60 (m, 4 H), 1,43 (s, 9 H). Anal. ($C_{18}H_{26}N_2O_6$) Calc: C, 59,00; H, 7,15; N, 7,65. Exp.: C, 58,94; H, 7,31; N, 7,39.

A una solución de **54b** (2,88 g, 7,87 mmol) y 6–bromohexanoato de 2,2,2–tricloroetilo (3,86 g, 11,8 mmol), preparado por los procedimientos en Tercel et al (2003) J. Med. Chem 46:2132–2151, en DMA seca (7 mL) se añadió K_2CO_3 anhidro (2,61 g, 18,9 mmol). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 68 h. Se

vertió en agua helada (600 mL) y el producto se extrajo en acetato de etilo (600 mL). Los extractos se lavaron sucesivamente con solución helada (0 ^{o}C) acuosa 2 N de Na_2CO_3 (2x400 mL) y agua (400 mL) y luego se secó ($MgSO_4$). La evaporación del solvente dio un aceite marrón que se purificó por cromatografía en columna de SiO_2 (DCM–acetato de etilo = 2:1) para dar 6–(5–(ter–butoxicarbonilamino)–4–(2–(hidroximetil)pirrolidin–1–carbonil)–2–metoxifenoxi)hexanoato de (S)–2,2,2–tricloroetilo puro **54c** (3,62 g, 76%) en forma de una espuma amarilla pálida; p. f. 36–39 ^{o}C; ^{1}H RMN [$(CD_3)_2SO$] δ 9,90 (s, 1 H), 7,33 (s, 1 H), 6,93 (s, 1 H), 4,89 (s, 2 H), 4,74 (t, *J* = 5,8 Hz, 1 H), 4,17–4,02 (m, 1 H), 3,94 (t, *J* = 6,4 Hz, 2 H), 3,73 (s, 3 H), 3,63–3,26 (m, 4 H), 2,55–2,46 (m, 2 H, parcialmente oscurecidos por pico de DMSO), 2,00–1,55 (m, 8 H), 1,53–1,36 (m, 11 H). Anal. ($C_{26}H_{37}N_2O_8$) Calc: C, 51,03; H, 6,09; N, 4,58. Exp.: C, 51,33; H, 6,21; N, 4,35.

Etapa 2: 4–metilpiperazin–1–carboxilato de (S)–1–(clorometil)–2,3–dihidro–1H–benzo[e]indol–5–ilo **58b**

Una mezcla de 1–(clorometil)–5–hidroxi–1*H*–benzo[*e*]indol–3(2*H*)–carboxilato de (*S*)–*ter*–butilo **51a** (3,338 g, 10 mmol), clorhidrato de cloruro de 4–metilpiperazin–1–carbonilo (5,98 g, 30 mmol), Et_3N (3,5 g, 35 mmol) y DMAP (1,34 g, 11 mmol) en CH_2Cl_2 (80 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 2 días. Ver la Figura 12. La mezcla se lavó con agua y el solvente se secó y removed al vacío, para dar 1–(clorometil)–5–(4–metilpiperazin–1–carboniloxi)–1H–benzo[e]indol–3(2H)–carboxilato de (S)–ter–butilo **58a** (Boger D.L. et al, Synthesis, (1999), 1505–1509) en rendimiento cuantitativo: p. f. 98 °C; ^{1}H RMN ($CDCl_3$) *δ* 8,11 (br, 1H), 7,84 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 7,70 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 7,50 (ddd, *J* = 8,2, 6,9, 1,1 Hz, 1H), 7,37 (ddd, *J* = 8,1, 6,9, 1,0 Hz, 1H), 4,34–4,20 (m, 1H), 4,17–4,10 (m, 1H), 4,01–3,98 (m, 1H), 3,94 (dd, *J* =

9,6, 2,4 Hz, 1H), 3,87–3,80 (br, 2H), 3,68–3,60 (br, 2H), 3,47 (t, *J* = 10,8 Hz, 1H), 2,57–2,48 (m, 4H), 2,83 (s, 3H), 1,58 (s, 9H); MS (APCI+) m/z 461,2 MH^+. Calc. anal. para $C_{24}H_{30}ClN_3O_4$: C, 62,7; H, 6,6; N, 9,1. Exp.: C, 62,5; H, 6,8; N, 9,2%.

Una solución de **58a** (2,30 g, 5 mmol) en CH_2Cl_2 (50 mL) se trató con exceso ácido trifluoroacético (TFA) a 0 °C durante 4 h y la mezcla se neutralizó con NH_3 acuoso frío. La dilución con hexanos dio como resultado la precipitación de un sólido que se recolectó por filtración, se lavó con agua y hexano y se secó para dar 4–metilpiperazin–1–carboxilato de (S)–1–(clorometil)–2,3–dihidro–1H–benzo[e]indol–5–ilo **58b** (1,60 g, 89%): p. f. 144–147 °C; ^{1}H RMN ($CDCl_3$) *δ* 7,69 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 7,63 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 7,45 (ddd, *J* = 8,3, 6,9, 1,2 Hz, 1H), 7,25 (ddd, *J* = 8,4, 6,8, 1,2 Hz, 1H), 6,82 (s, 1H), 5,30 (s, 1H), 4,17–4,05 (m, 2H), 4,03–3,96 (m, 2H), 3,89–3,77 (m, 4H), 3,54 (t, *J* = 10,9 Hz, 1H), 3,20–2,90 (m, 4H), 2,76 (s, 3H). Calc. anal. para $C_{19}H_{22}ClN_3O_2$: C, 63,4; H, 6,2; N, 11,7. Exp.: C, 63,2; H, 6,2; N, 11,5%.

Etapa 3: (S)–3–(6–(4–((S)–2–(acetoximetil)pirrolidin–1–carbonil)–5–amino–2–metoxifenoxi)hexanoil)–1–(clorometil)–2,3–dihidro–1H–benzo[e]indol–5–il 4–metilpiperazin–1–carboxilato **65d**

A una solución agitada de 6–(5–(ter–butoxicarbonilamino)–4–(2–(hidroximetil)pirrolidin–1–carbonil)–2–metoxifenoxi)hexanoato de (S)–2,2,2–tricloroetilo **54c** (1,66 g, 2,71 mmol) en DCM seca (10 mL) a temperatura ambiente se añadió anhídrido acético (1,29 mL, 13,6 mmol) y trietilamina (2,27 mL, 16,3 mmol). Ver la Figura 17. La mezcla de reacción se agitó durante otras 4 h. MeOH seco (1,5 mL) se añadió y la mezcla se agitó durante 30 min. Acetato de etilo (200 mL) se añadió y la capa de acetato de etilo se separó y luego se lavó con agua varias veces. La solución de acetato de etilo se secó ($MgSO_4$) y se evaporó

para dar 6–(4–(2–(acetoximetil)pirrolidin–1–carbonil)–5–(ter–butoxicarbonilamino)–2–metoxifenoxi)hexanoato de (S)–2,2,2–tricloroetilo **65a** (1,8 g, 100%) en forma de una goma amarilla pálida; ^{1}H RMN [$(CD_3)_2SO$] δ 8,82 (br s, 1 H), 7,27 (s, 1 H), 6,86 (s, 1 H), 4,89 (s, 2 H), 4,39–4,20 (m, 3 H), 3,93 (t, *J* = 6,4 Hz, 2 H), 3,74 (s, 3 H), 3,50–3,33 (m, 2 H), 2,10–1,94 (m, 4 H), 1,92–1,61 (m, 7 H), 1,53–1,42 (m, 2 H), 1,43 (s, 9 H), 2 H oscurecidos por pico de DMSO. HRMS (ESI) *m/z* calc. para $C_{28}H_{39}Cl_3N_2NaO_9$: 675,1613, exp.: 675,1603 [MNa^+]. Calc. para $C_{28}H_{40}Cl_3N_2O_9$: 653,1794, exp.: 653,1778 [MH^+].

A una solución agitada de **65a** (1,76 g, 2,69 mmol) en una mezcla de acetona (30 mL), agua (20 mL) y THF (12 mL) bajo nitrógeno se añadió Zn (7,06 g, 108 mmol) y NH_4Cl (11,6 g, 216 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 23 h. Acetato de etilo (100 mL) se añadió y la mezcla se agitó durante 15 min. La capa orgánica se decantó. La extracción se repitió con más acetato de etilo (2x100 mL). La solución orgánica combinada se lavó con agua (2x100 mL), se secó ($MgSO_4$), se filtró a través de celite y se evaporó para dar ácido (S)–6–(4–(2–(acetoximetil)pirrolidin–1–carbonil)–5–(ter–butoxicarbonilamino)–2–metoxifenoxi)hexanoico **65b** (1,36 g, 96%) en forma de una espuma incolora pegajosa; ^{1}H RMN [$(CD_3)_2SO$] δ 11,49 (muy br s, 1 H), 8,83 (s, 1 H), 7,27 (s, 1 H), 6,86 (br s, 1 H), 4,39–4,02 (m, 3 H), 3,93 (t, *J* = 6,4 Hz, 2 H), 3,74 (s, 3 H), 3,51–3,33 (m, 2 H, parcialmente oscurecido por pico de agua), 2,21 (t, *J* = 7,1 Hz, 2 H), 2,11–1,93 (m, 4 H), 1,90–1,66 (m, 5 H), 1,62–1,50 (m, 2 H), 1,50–1,35 (m, 2 H), 1,43 (s, 9 H). Anal. ($C_{26}H_{38}N_2O_9$.) Calc: C, 59,76; H, 7,33; N, 5,36. Exp.: C, 59,66; H, 7,49; N, 5,29.

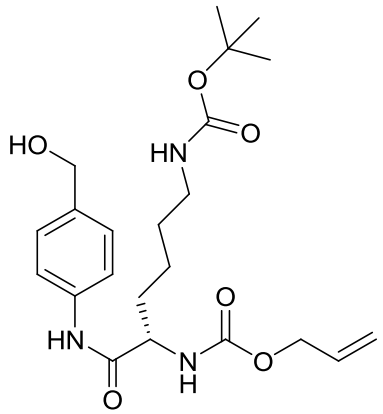
A una solución agitada de **65b** (0,87 g, 2,41 mmol) y 4–metilpiperazin–1–carboxilato de (S)–1–(clorometil)–2,3–dihidro–1H–

benzo[e]indol–5–ilo **58b** (1,26 g, 2,41 mmol) en DMA seca (5 mL) a 0 ^{o}C bajo una atmósfera de nitrógeno se añadió HCl 4 M en p–dioxano (1,21 mL, 4,82 mmol), seguido por EDCI.HCl (1,39 g, 7,23 mmol) y TsOH anhidro (83 mg, 0,48 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 0 ^{o}C bajo nitrógeno durante 21 horas, luego se dividió en acetato de etilo (500 mL) y agua (500 mL). La capa de acetato de etilo se separó y la capa acuosa luego se extrajo con more acetato de etilo (200 mL). Los extractos combinados de acetato de etilo se lavaron sucesivamente con agua (200 mL), solución saturada de NaHCO3 (2x200 mL) y agua (200 mL). La capa de acetato de etilo se secó y se evaporó para dar 4–metilpiperazin–1–carboxilato de (S)–3–(6–(4–((S)–2–(acetoximetil)pirrolidin–1–carbonil)–5–(ter–butoxicarbonilamino)–2–metoxifenoxi)hexanoil)–1–(clorometil)–2,3–dihidro–1H–benzo[e]indol–5–ilo **65c** (1,66 g, 80%) en forma de una espuma beige sólida; p. f. 84–87 ^{o}C; ^{1}H RMN [$(CD_3)_2SO$] δ 8,84 (br s, 1 H), 8,21 (s, 1 H), 7,95 (d, *J* = 8,3 Hz, 1 H), 7,81 (d, *J* = 8,3 Hz, 1 H), 7,58 (br t, *J* = 7,7, 1 H), 7,46 (br t, *J* = 8,1 Hz, 1 H), 7,29 (s, 1 H), 6,86 (s, 1 H), 4,40 (t, *J* = 10,0 Hz, 1 H), 4,36–3,86 (m, 10 H), 3,83–3,74 (m, 1 H), 3,73 (s, 3 H), 3,54–3,36 (m, 4 H), 2,67–2,34 (m, 6 H, parcialmente oscurecidos por pico de DMSO), 2,26 (s, 3 H), 2,02 (br s, 3 H), 1,93–1,62 (m, 8 H), 1,60–1,47 (m, 2 H), 1,42 (s, 9 H). Anal. ($C_{45}H_{58}ClN_5O_{10}$·1½H_2O) Calc: C, 60,63; H, 6,90; N, 7,86. Exp.: C, 60,39; H, 6,66; N, 8,08.

A una solución agitada de **65c** (2,17 g, 2,51 mmol) en DCM (20 mL) a 0 ^{o}C bajo una atmósfera de nitrógeno se añadió TFA (20 mL). Después de la adición, la mezcla se agitó luego a esta temperatura durante 2,5 h. La mezcla se vertió en una mezcla fría (0 ^{o}C) de $NaHCO_3$ (50 g), agua (700 mL) y DCM (500 mL) y se agitó durante 15 min. (pH aproximadamente 8). La capa de DCM se separó y se lavó con más

$NaHCO_3$ acuoso (200 mL) y agua (200 mL) y luego se secó ($MgSO_4$). El solvente se evaporó para dar 4–metilpiperazin–1–carboxilato de (S)–3–(6–(4–((S)–2–(acetoximetil)pirrolidin–1–carbonil)–5–amino–2–metoxifenoxi)hexanoil)–1–(clorometil)–2,3–dihidro–1H–benzo[e]indol–5–ilo **65d** en forma de una espuma sólida marrón pálida (1,76 g, 92%); p. f. 62 ^{o}C; ^{1}H RMN [$(CD_3)_2SO$] δ 8,21 (s, 1 H), 7,95 (d, *J* = 8,3 Hz, 1 H), 7,81 (d, *J* = 8,3 Hz, 1 H), 7,57 (br t, *J* = 7,6 Hz, 1 H), 7,46 (br t, *J* = 7,2 Hz, 1 H), 6,67 (s, 1 H), 6,37 (s, 1 H), 5,09 (s, 2 H), 4,41 (t, *J* = 9,7 Hz, 1 H), 4,36–4,20 (m, 3 H), 4,17–4,00 (m, 3 H), 3,97–3,86 (m, 3 H), 3,81–3,70 (m, 2 H), 3,63 (s, 3 H), 3,54–3,32 (m, 5 H), 2,66–2,34 (m, 6 H, parcialmente oscurecidos por pico de DMSO), 2,26 (s, 3 H), 2,08–1,96 (m, 1 H), 2,10 (s, 3 H), 1,93–1,63 (m, 7 H), 1,57–1,45 (m, 2 H). Anal. ($C_{40}H_{50}ClN_5O_8 \cdot ½H_2O$) Calc: C, 62,13; H, 6,65; N, 9,06. Exp.: C, 62,12; H, 6,76; N, 8,77.

Etapa 4: 65g



Una mezcla de ácido (S)–2–(aliloxicarbonilamino)–6–(ter–butoxicarbonilamino)hexanoico **65e** (3,30 g, 10,0 mmol) y EEDQ (3,71 g, 15,0 mmol) en DMA seca (10 mL) se agitó a temperatura ambiente bajo nitrógeno durante 15 min. Ver la Figura 18. A esta mezcla preformada se añadió una solución de 4–((ter–butildimetilsililoxi)metil)anilina (preparada a partir del correspondiente alcohol p–nitrobencílico y TBDMSCl en

DMF; seguido por reducción usando Zn/NH_4Cl) (2,37 g, 10,0 mmol) en DMA seca (3 mL). La mezcla de reacción final se agitó luego a temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno durante 23 h. La mezcla se dividió entre acetato de etilo (500 mL) y agua (500 mL). La capa de acetato de etilo se separó y se lavó sucesivamente con NaHCO3 saturado (2x300 mL) y agua (300 mL) y luego se secó ($MgSO_4$). La evaporación del solvente dio un aceite anaranjado que se purificó por una cromatografía en columna de sílice (éter de petróleo–acetato de etilo gradiente del 10–35%) para obtener la lisina protegida con TBDMS **65f** (4,87 g, 89%) en forma de una espuma sólida beige viscosa; ^{1}H RMN [$(CD_3)_2SO$] δ 9,97 (s, 1 H), 7,55 (d, *J* = 8,50 Hz, 2 H), 7,44 (d, *J* = 7,8 Hz, 1 H), 7,21 (d, *J* = 8,5 Hz, 2 H), 6,75 (t, *J* = 5,3 Hz, 1 H), 5,99–5,82 (m, 1 H), 5,28 (br d, *J* = 17,2 Hz, 1 H), 5,17 (br d, *J* = 10,5 Hz, 1 H), 4,64 (s, 2 H), 4,46 (d, *J* = 5,2 Hz, 2 H), 4,12–4,02 (m, 1 H), 2,93–2,83 (m, 2 H), 1,70–1,52 (m, 2 H), 1,46–1,20 (m, 4 H), 1,35 (s, 9 H), 0,89 (s, 9 H), 0,06 (s, 6 H). HRMS (ESI) *m/z* calc. para $C_{28}H_{47}N_3NaO_6Si$: 572,3126, exp.: 572,3136 [MNa^+].

A una solución agitada de **65f** (4,81 g, 8,75 mmol) en THF (30 mL) a temperatura ambiente se añadió una solución 1 M de fluoruro de tetrabutilamonio en THF (17,5 mL, 17,5 mmol). Después de la adición, la mezcla se agitó a esta temperatura durante otras 2,5 h. NH_4Cl acuoso (300 mL) se añadió y el producto se extrajo en acetato de etilo (500 mL). El acetato de etilo se lavó con agua (2x100 mL) y se secó ($MgSO_4$). El solvente se evaporó para dar alcohol bencílico lisina **65g** (3,81 g, 100%) en forma de un sólido beige; p. f. 101–103 ^{o}C; ^{1}H RMN [$(CD_3)_2SO$] δ 9,94 (s, 1 H), 7,52 (d, *J* = 8,4 Hz, 2 H), 7,44 (d, *J* = 7,8 Hz, 1 H), 7,23 (d, *J* = 8,4 Hz, 2 H), 6,76 (t, *J* = 5,4 Hz, 1 H), 5,97–5,84 (m, 1 H), 5,29 (br d, *J* = 17,2 Hz, 1 H), 5,17 (br d, *J* = 10,4 Hz, 1 H), 5,08 (t, *J* = 5,7 Hz, 1 H),

4,47 (d, *J* = 5,3 Hz, 2 H), 4,43 (d, *J* = 5,7 Hz, 2 H), 4,13–4,03 (m, 1 H), 2,96–2,82 (m, 2 H), 1,72–1,52 (m, 2 H), 1,46–1,20 (m, 4 H), 1,36 (s, 9 H). HRMS (ESI) *m/z* calc. para $C_{22}H_{33}N_3NaO_6$: 458,2262, exp.: 458,2272 [MNa^+]; calc. para $C_{22}H_{33}N_3KO_6$: 474,2001, exp.: 474,1998 [MK^+].

Etapa 5: 4–metilpiperazin–1–carboxilato de (S)–3–(6–(4–((S)–2–(acetoximetil)pirrolidin–1–carbonil)–5–((4–((S)–2–(aliloxicarbonilamino)–6–(ter–butoxicarbonilamino)hexanamido)benciloxi)carbonilamino)–2–metoxifenoxi)hexanoil)–1–(clorometil)–2,3–dihidro–1H–benzo[e]indol–5–ilo **65h**

A una solución agitada de **65d** (764 mg, 1,00 mmol) y DMAP (367 mg, 3,00 mmol) en DCM seca (15 mL) a temperatura ambiente bajo nitrógeno se añadió una solución de difosgeno en DCM seca (0,05 mmol por mL, 12 mL, 0,60 mmol) y la mezcla se agitó durante otros 20 min. Ver la Figura 19. A esta mezcla se añadió una solución de **65g** (3,97 g, 9,13 mmol) en DCM seca (80 mL). La mezcla de reacción final se agitó luego a temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno durante 48 h. La mezcla se dividió entre acetato de etilo (500 mL) y agua (300 mL). La capa de acetato de etilo se separó y la capa acuosa luego se extrajo con acetato de etilo (2x200 mL). La solución combinada de acetato de etilo se lavó con más agua (2x200 mL) y se secó ($MgSO_4$). La evaporación del solvente a 30 ^oC (temperatura del baño) dio un aceite anaranjado que se purificó por cromatografía en columna de sílice (acetato de etilo–MeOH = 10:1) para obtener 4–metilpiperazin–1–carboxilato de (S)–3–(6–(4–((S)–2–(acetoximetil)pirrolidin–1–carbonil)–5–((4–((S)–2–(aliloxicarbonilamino)–6–(ter–butoxicarbonilamino)hexanamido)benciloxi)carbonilamino)–2–metoxifenoxi)hexanoil)–1–(clorometil)–2,3–dihidro–1H–benzo[e]indol–5–ilo **65h** (1,04 g, 85%) en forma de un sólido anaranjado pálido; p. f. 90–

93 °C; ^{1}H RMN [$(CD_3)_2SO$] δ 10,04 (s, 1 H), 9,10 (br s, 1 H), 8,21 (s, 1 H), 7,95 (d, *J* = 8,3 Hz, 1 H), 7,81 (d, *J* = 8,3 Hz, 1 H), 7,63–7,53 (m, 3 H), 7,51–7,42 (m, 2 H), 7,32 (d, *J* = 8,5 Hz, 2 H), 7,21 (br s, 1 H), 6,85 (br s, 1 H), 6,79–6,72 (m, 1 H), 5,97–5,83 (m, 1 H), 5,29 (br d, *J* = 17,2 Hz, 1 H), 5,17 (br d, *J* = 10,4 Hz, 1 H), 5,08–4,96 (m, 2 H), 4,52–4,37 (m, 3 H), 4,37–3,85 (m, 10 H), 3,83–3,66 (m, 2 H), 3,74 (s, 3 H), 3,54–3,41 (m, 2 H), 3,41–3,23 (m, 2 H, parcialmente oscurecido por pico de agua), 2,95–2,83 (m, 2 H), 2,66–2,34 (m, 6 H, parcialmente oscurecidos por pico de DMSO), 2,25 (s, 3 H), 2,07–1,92 (m, 4 H), 1,87–1,45 (m, 11 H), 1,45–1,20 (m, 4 H), 1,35 (s, 9 H). HRMS (ESI) *m/z* calc. para $C_{63}H_{82}ClN_8O_{15}$: 1225,5583, exp.: 1225,5557 [MH^+]; calc. para $C_{63}H_{81}ClN_8NaO_{15}$: 1247,5402, exp.: 1247,5401 [MNa^+]; calc. para $C_{63}H_{81}ClKN_8O_{15}$: 1263,5142, exp.: 1263,5141 [MK^+].

Una mezcla de **65h** (1,01 g, 0,824 mmol) y K_2CO_3 (1,14 g, 8,24 mmol) en DCM (20 mL) y MeOH (10 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora y 40 min. La mezcla se diluyó con DCM (200 mL) y se agitó con agua helada (200 mL) durante 10 min. La capa de DCM se separó y la capa acuosa luego se extrajo con DCM (2x100 mL). La solución combinada de DCM se lavó con more agua (200 mL) y se secó ($MgSO_4$). La evaporación de solvente a 25 °C (temperatura del baño) dio 4–metilpiperazin–1–carboxilato de (S)–3–(6–(5–((4–((S)–2–(aliloxicarbonilamino)–6–(ter–butoxicarbonilamino)hexanamido)benciloxi)carbonilamino)–4–((S)–2–(hidroximetil)pirrolidin–1–carbonil)–2–metoxifenoxi)hexanoil)–1–(clorometil)–2,3–dihidro–1H–benzo[e]indol–5–ilo **65i** (0,94 g, 96%) en forma de un sólido beige; p. f. 104–107 °C; ^{1}H RMN [$(CD_3)_2SO$] δ 10,04 (s, 1 H), 9,17 (br s, 1 H), 8,21 (s, 1 H), 7,95 (d, *J* = 8,4 Hz, 1 H), 7,80 (d, *J* = 8,3 Hz, 1 H), 7,63–7,53 (m, 3 H), 7,51–7,42 (m, 2 H), 7,38–7,21 (m, 3

H), 6,93 (s, 1 H), 5,32 (t, *J* = 5,4 Hz, 1 H), 5,98–5,83 (m, 1 H), 5,30 (br d, *J* = 17,2 Hz, 1 H), 5,17 (br d, *J* = 11,7 Hz, 1 H), 5,03 (s, 2 H), 4,73 (t, *J* = 5,7 Hz, 1 H), 4,52–4,36 (m, 3 H), 4,36–4,17 (m, 2 H), 4,17–3,85 (m, 6 H), 3,83–3,66 (m, 2 H), 3,73 (s, 3 H), 3,61–3,40 (m, 4 H), 3,40–3,20 (m, 2 H, parcialmente oscurecido por pico de agua), 2,94–2,83 (m, 2 H), 2,67–2,34 (m, 6 H, parcialmente oscurecidos por pico de DMSO), 2,25 (s, 3 H), 1,96–1,45 (m, 12 H), 1,45–1,20 (m, 4 H), 1,35 (s, 9 H). HRMS (ESI) *m/z* calc. para $C_{61}H_{80}ClN_8O_{14}$: 1183,5477, exp.: 1183,5445 [MH^+]; calc. para $C_{61}H_{79}ClN_8NaO_{14}$: 1205,5296, exp.: 1205,5256 [MNa^+]; calc. para $C_{61}H_{79}ClKN_8O_{14}$: 1221,5036, exp.: 1221,5026 [MK^+].

A una solución agitada de **65i** (0,92 g, 0,78 mmol) en DCM seca (20 mL) a 0 ^oC se añadió peryodinano de Dess–Martin (DMP, 1,1,1–triacetoxi–1,1–dihidro–1,2–benciodoxol–3(1H)–ona, CAS Reg. No. 87413–09–0, 492 mg, 1,16 mmol) en porciones (durante 8 min). Una vez completa la adición la mezcla de reacción se agitó luego a 0 ^oC durante 2 h, luego a temperatura ambiente durante 45 h. La mezcla se diluyó con DCM (100 mL) y se agitó con 10% de $Na_2S_2O_3$ (100 mL) a temperatura ambiente durante 10 min. La mezcla resultante se dividió entre DCM (400 mL) y solución saturada de NaHCO3 (400 mL). La capa de DCM se separó y la capa acuosa se extrajo luego con DCM (2x100 mL). La solución combinada de DCM luego se lavó con solución saturada de NaHCO3 (200 mL) y agua (200 mL) y luego se secó ($MgSO_4$). La evaporación de solvente a 25 ^oC (temperatura del baño) dio un sólido marrón pálido que se purificó por SiO_2 cromatografía en columna (DCM–acetato de etilo–MeOH = 15:15:1, gradiente a 15:15:3) para dar 8–(6–((S)–1–(clorometil)–5–(4–metilpiperazin–1–carboniloxi)–1H–benzo[e]indol–3(2H)–il)–6–oxohexiloxi)–11–hidroxi–7–metoxi–5–oxo–2,3,11,11a–tetrahidro–1H–benzo[e]pirrolo[1,2–a][1,4]diazepin–10(5H)–

carboxilato de (S)–4–((S)–2–(aliloxicarbonilamino)–6–(ter–butoxicarbonilamino)hexanamido)bencilo **65j** (0,64 g, 70%) en forma de un sólido amarillo pálido; p. f. 137 ^{o}C (desc.); ^{1}H RMN [$(CD_3)_2SO$] δ 10,02 (s, 1 H), 8,21 (s, 1 H), 7,95 (d, *J* = 8,4 Hz, 1 H), 7,80 (d, *J* = 8,3 Hz, 1 H), 7,65–7,38 (m, 5 H), 7,18 (d, *J* = 7,0 Hz, 2 H), 7,03 (s, 1 H), 6,82–6,63 (m, 2 H), 6,49 (poco resuelto d, *J* = 4,7 Hz, intercambiable con D_2O, 1 H), 5,96–5,82 (m, 1 H), 5,46 (poco resuelto dd, *J* = 9,8, 4,7 Hz, became a d después de D_2O, *J* = 10,1 Hz, 1 H), 5,27 (br d, *J* = 17,1 Hz, 1 H), 5,21–5,10 (m, 2 H), 4,81 (br d, *J* = 12,3 Hz, 1 H), 4,51–4,17 (m, 5 H), 4,13–3,84 (m, 4 H), 3,84–3,67 (m, 2 H), 3,77 (s, 3 H), 3,55–3,20 (m, 6 H, parcialmente oscurecido por pico de agua), 2,66–2,30 (m, 6 H, parcialmente oscurecidos por pico de DMSO), 2,26 (s, 3 H), 2,10–1,20 (m, 16 H), 1,35 (s, 9 H). HRMS (ESI) *m/z* calc. para $C_{61}H_{78}ClN_8O_{14}$:1181,5321, exp.: 1181,5286 [MH^+]; calc. para $C_{61}H_{77}ClN_8NaO_{14}$: 1203,5140, exp.: 1203,5130 [MNa^+]; calc. para $C_{61}H_{77}ClKN_8O_{14}$: 1219,4879, exp.: 1219,4861 [MK^+].

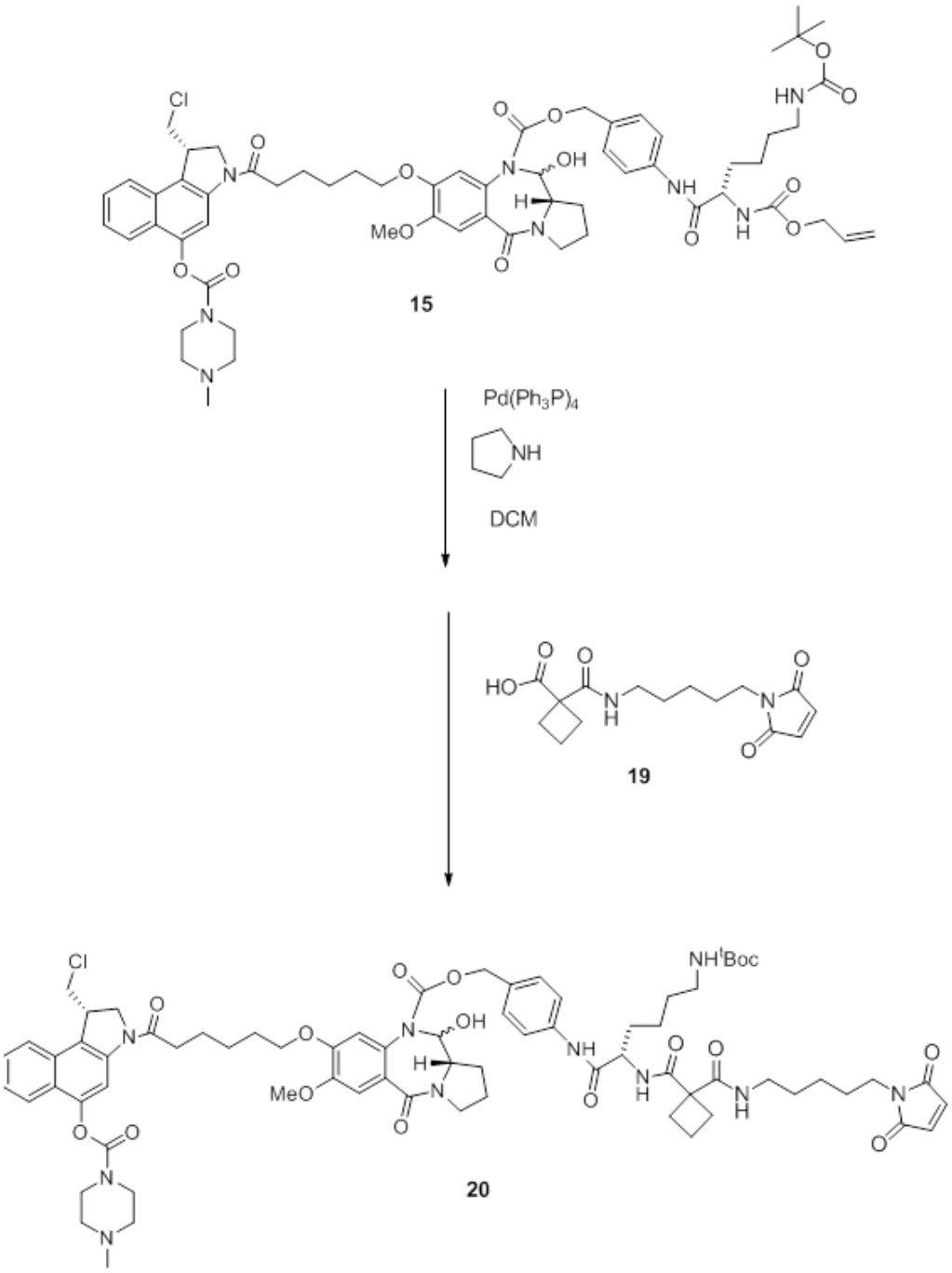
Etapa B:

8–((6–((S)–1–(clorometil)–5–((4–metilpiperazin–1–carbonil)oxi)–1H–benzo[e]indol–3(2H)–il)–6–oxohexil)oxi)–11–hidroxi–7–metoxi–5–oxo–2,3,11,11a–tetrahidro–1H–benzo[e]pirrolo[1,2–a][1,4]diazepin–10(5H)–carboxilato de (11aS)–4–((S)–6–amino–2–(1–((5–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)pentil)carbamoil)ciclobutancarboxamido)hexanamido)bencilo bis(2,2,2–trifluoroacetato) (**CBI–PBD LD2**) y 8–((6–((S)–1–(clorometil)–5–((4–metilpiperazin–1–carbonil)oxi)–1H–benzo[e]indol–3(2H)–il)–6–oxohexil)oxi)–7,11–dimetoxi–5–oxo–2,3,11,11a–tetrahidro–1H–benzo[e]pirrolo[1,2–a][1,4]diazepin–10(5H)–carboxilato de (11aS)–4–

((S)–6–amino–2–(1–((5–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)pentil)carbamoil)ciclobutancarboxamido)hexanamido)bencilo bis(2,2,2–trifluoroacetato) (**CBI–PBD LD3**)

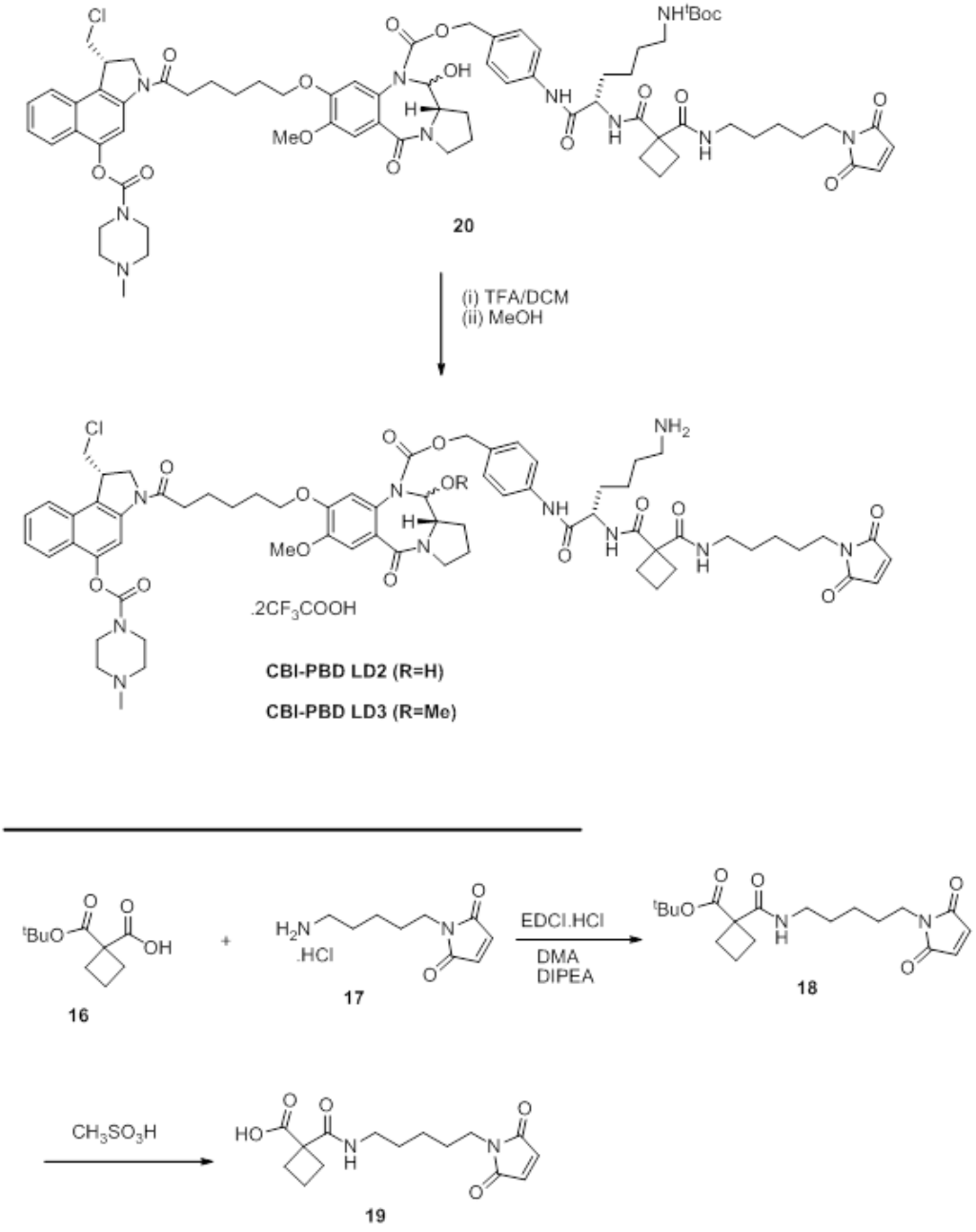
Síntesis de CBI–PBD LD2 y CBI–PBD LD3

Esquema de síntesis



Síntesis de CBI–PBD LD2 y CBI–PBD LD3

Esquema de síntesis (continuación)



A una mezcla de ácido 1–(ter–butoxicarbonil)ciclobutancarboxílico (**16**) (200 mg, 1,00 mmol) (solicitud internacional PCT 2002, WO 2002076968 A1), clorhidrato de 1–(5–aminopentil)–1H–pirrol–2,5–diona

(**17**) (218 mg, 1,00 mmol) (J. Med. Chem. 2013, 56, 7890–7901), EDCI.HCl (576 mg, 3,00 mmol) y TsOH (35 mg, 0,20 mmol) se añadió DMA (2 mL). La mezcla se agitó a 20 ºC durante 15 min y DIPEA (0,17 mL, 1,00 mmol) se añadió. La mezcla de reacción se agitó luego durante 20 h y se dividió en EtOAc (200 mL) y agua (100 mL). La capa de EtOAc se separó y se lavó sucesivamente con HCl 1 N frío (100 mL), NaHCO3 saturado (100 mL) y agua (100 mL) y luego se secó ($MgSO_4$). La evaporación de solvente dio 1–((5–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)pentil)carbamoil)ciclobutancarboxilato de ter–butilo (**18**) (290 mg, 80%) en forma de un sólido amarillo pálido, p. f. 63–65 ºC; ^{1}H RMN [$(CD_3)_2SO$] δ 7,58 (t, *J* = 5,6 Hz, 1 H), 7,00 (s, 2 H), 3,37 (t, *J* = 7,0 Hz, 2 H), 3,03 (q, *J* = 6,0 Hz, 2 H), 2,40–2,23 (m, 4 H), 1,85–1,64 (m, 2 H), 1,55–1,32 (m, 4 H), 1,38 (s, 9 H), 1,26–1,01 (m, 2 H). HRMS (ESI) m/z calc. para $C_{19}H_{29}N_2O_5$: 365,2071, exp.: 365,2071 [MH^+]; calc. para $C_{19}H_{28}N_2NaO_5$: 387,1890, exp.: 387,1898 [MNa^+]; calc. para $C_{19}H_{28}KN_2O_5$: 403,1630, exp.: 403,1629 [MK^+].

A una solución agitada de **18** (794 mg, 2,18 mmol) en DCM (50 mL) se añadió ácido metansulfónico (2,83 mL, 43,6 mmol). La mezcla turbia se agitó a 20 ºC durante 2h 30 min. La mezcla se diluyó con DCM (200 mL) y se lavó con agua (2×50 mL). La solución de DCM se secó ($MgSO_4$) y se evaporó a 25 ºC (temperatura del baño) para dar ácido 1–((5–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)pentil)carbamoil)ciclobutancarboxílico (**19**) (636 mg, 95%) en forma de un sólido amarillo pálido, p. f. 100–102 ºC; ^{1}H RMN [$(CD_3)_2SO$] δ br s, 1 H), 7,63 (t, *J* = 5,4 Hz, 1 H), 7,00 (s, 2 H), 3,37 (t, *J* = 7,0 Hz, 2 H), 3,02 (q, *J* = 5,9 Hz, 2 H), 2,42–2,28 (m, 4 H), 1,89–1,63 (m, 2 H), 1,55–1,32 (m, 4 H), 1,29–1,11 (m, 2 H). Anal. ($C_{15}H_{20}N_2O_5$) Calc: C, 58,43; H, 6,54; N, 9,09. Exp.: C, 58,54; H, 6,39; 8,84.

A una solución homogénea agitada de 8–((6–((S)–1–(clorometil)–5–((4–metilpiperazin–1–carbonil)oxi)–1H–benzo[e]indol–3(2H)–il)–6–oxohexil)oxi)–11–hidroxi–7–metoxi–5–oxo–2,3,11,11a–tetrahidro–1H–benzo[e]pirrolo[1,2–a][1,4]diazepin–10(5H)–carboxilato de (11aS)–4–((S)–2–(((aliloxi)carbonil)amino)–6–((ter–butoxicarbonil)amino)hexanamido)bencilo (**15**) (177 mg, 0,15 mmol) (patente presentada referida: GENENLAW–#446508) en DCM seca (2 mL) a 20 ºC y bajo una atmósfera de nitrógeno se añadió pirrolidina (0,122 mL, 1,50 mmol), seguido por $Pd(Ph_3P)_4$ (4,28 mg, 9,8% Pd). Después de adición la mezcla de reacción se agitó luego a 20 ºC (N_2) durante 25 min. La mezcla se diluyó con éter de petróleo (50 mL) y se agitó a 20 ºC (N_2) durante 10 min. Los solventes se decantaron y el procedimiento se repitió con DCM–éter de petróleo (1:10) (2×30 mL). El sólido dejado atrás se disolvió en DCM (100 mL) y se lavó con agua (50 mL), salmuera (50 mL) y luego se secó ($MgSO_4$). La evaporación de solvente a 25 ºC (temperatura del baño) dio la amina libre en forma de un sólido beige (140 mg, 85%). Un poco de este material (110 mg, 0,10 mmol) se trató con una mezcla preformada (a 20 ºC durante 10 min) de **19** (34 mg, 0,11 mmol), EDCI.HCl (58 mg, 0,30 mmol) y TsOH (3,4 mg, 0,02 mmol) en DMA seca (1 mL) a 20 ºC (bajo una atmósfera de nitrógeno). Después de 10 min de DIPEA (0,02 mL, 0,10 mmol) se añadió y la mezcla de reacción se agitó durante 22 h. La mezcla se dividió entre EtOAc (200 mL) y agua (100 mL). La capa de EtOAc se separó y se lavó luego con NaHCO3 saturado (100 mL), agua (100 mL) y luego se secó ($MgSO_4$). La evaporación de solvente a 25 ºC (temperatura del baño) dio un producto crudo que se purificó por cromatografía en columna de SiO_2 (DCM–EtOAc–MeOH = 20:10:3) para dar **20** (92 mg, 66%) en forma de un sólido amarillo pálido; p. f. 106–109

ºC; $[\alpha]_D$ +43,1° (*c* 0,418, $CHCl_3$); ^1H RMN [$(CD_3)_2SO$] δ 10,06 (s, intercambiable con D_2O, 1 H), 8,21 (s, 1 H), 7,95 (d, *J* = 8,4 Hz, 1 H), 7,85–7,77 (m, 2 H, reducido a 1 H después de D_2O), 7,75 (d, *J* = 8,0 Hz, intercambiable con D_2O, 1 H), 7,65–7,51 (m, 3 H), 7,46 (t, *J* = 7,6 Hz, 1 H), 7,24–7,11 (m, 2 H), 7,03 (s, 1 H), 6,96 (s, 2 H), 6,79–6,66 (m, 2 H, reducido a 1 H después de D_2O), 6,54–6,43 (m, intercambiable con D_2O, 1 H), 5,52–5,41 (m, pero d después de D_2O con *J* = 9,5 Hz, 1 H), 5,15 (d, *J* = 12,0 Hz, 1 H), 4,81 (d, *J* = 12,0 Hz, 1 H), 4,47–4,18 (m, 5 H), 4,08–3,98 (m, 1 H), 3,97–3,86 (m, 2 H), 3,84–3,67 (m, 5 H), 3,56–3,21 (m, 8 H, parcialmente oscurecido por pico de agua), 3,12–3,02 (m, pero t después de D_2O con *J* = 6,2 Hz, 2 H), 2,92–2,80 (m, 2 H), 2,65–2,33 (m, 10 H, parcialmente oscurecidos por pico de DMSO), 2,25 (s, 3 H), 2,15–1,12 (m, 23 H), 1,33 (s, 9 H). HRMS (ESI) m/z calc. para $C_{72}H_{92}ClN_{10}O_{16}$: 1387,6376, exp.: 1387,6319 [MH^+]; calc. para $C_{72}H_{91}ClN_{10}NaO_{16}$: 1409,6195, exp.: 1409,6146 [MNa^+]; calc. para $C_{72}H_{91}ClKN_{10}O_{16}$: 1425,5935, exp.: 1425,5875 [MK^+].

A una solución agitada de **20** (79 mg, 0,057 mmol) en DCM (5 mL) a 20 ºC y bajo nitrógeno se añadió TFA (5 mL). Después de adición la mezcla se agitó luego a esta temperatura durante 20 min. Éter de petróleo (100 mL) se añadió y la mezcla se agitó a 20 ºC durante 30 min. El solvente se removió y el aceite que quedó se agitó con más EtOAc–éter de petróleo (1:10) (3×50 mL). El aceite residual se disolvió en MeOH y la solución se evaporó para dar un sólido vítreo (76 mg) que se purificó por HPLC preparativa [columna SynergyMaxRP, 4µ, 21×250 mm; agua–TFA (pH = 2,56; 95% al 55%)/10% de H_2O en CH_3CN (5% al 45%); tiempo de gradiente 30 min; tasa de flujo: 12 mL/min] para dar (i) **CBI–PBD LD2** (26,2 mg, 30%) como un sólido ámbar pálido; pureza de HPLC: 98,5%; $[\alpha]_D$ +30,0° (*c* 0,233, MeOH); ^1H RMN [$(CD_3)_2SO$] δ 10,08

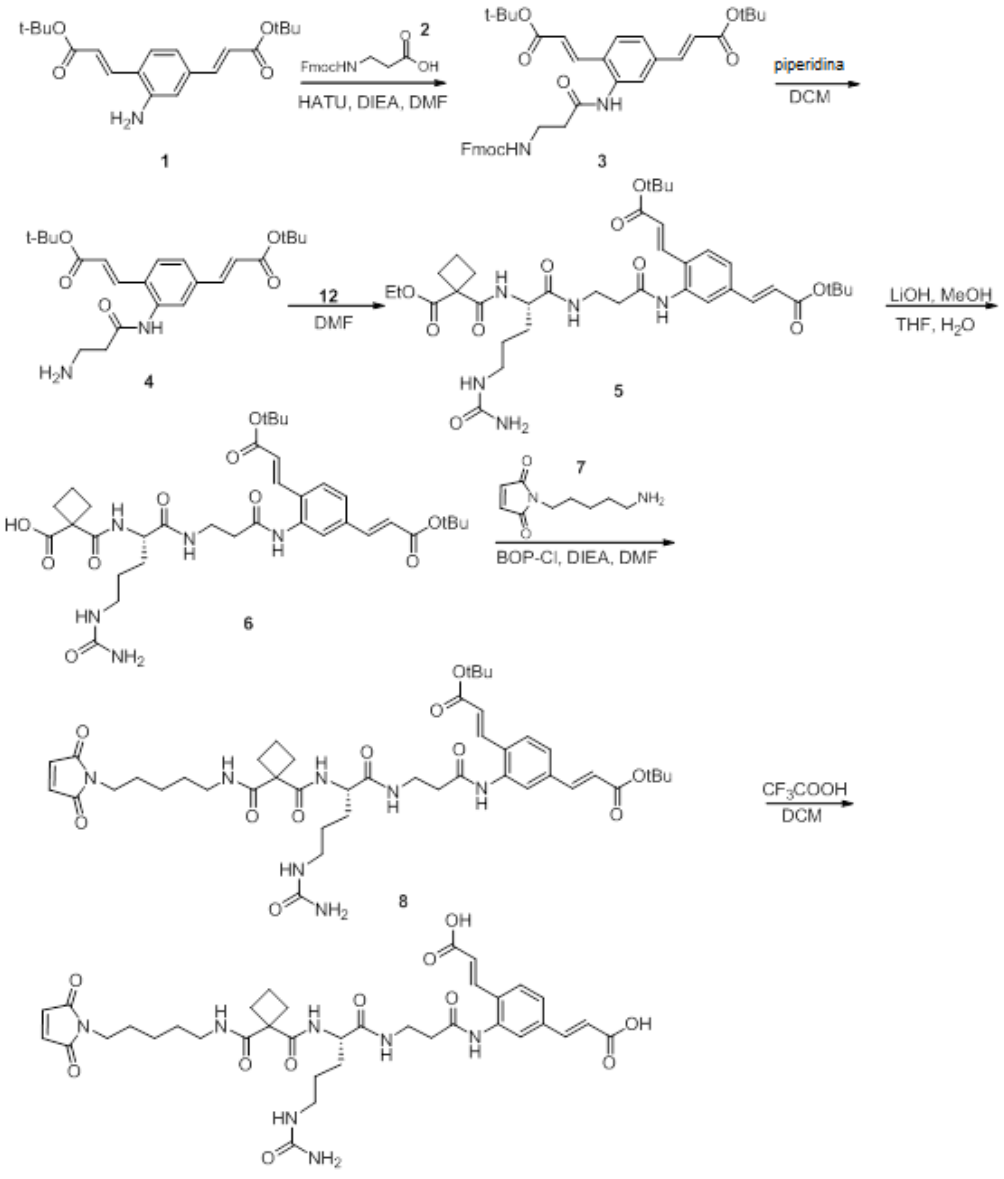
(s, intercambiable con D_2O, 1 H), 9,82 (br s, intercambiable con D_2O, 1 H), 8,27 (s, 1 H), 7,97 (d, *J* = 8,4 Hz, 1 H), 7,92–7,79 (m, 3 H, reducido a 1 H después de D_2O), 7,67–7,52 (m, 5 H, reducido a 3 H después de D_2O), 7,46 (t, *J* = 8,0 Hz, 1 H), 7,21–7,11 (m, 2 H), 7,04 (s, 1 H), 6,97 (s, 2 H), 6,75 (s, 1 H), 6,50 (br s, 1 H, intercambiable con D_2O), 5,45 (br d, pero d después de D_2O con *J* = 9,0 Hz, 1 H), 5,10 (br d, *J* = 13 Hz, 1 H), 4,87 (br d, *J* = 12 Hz, 1 H), 4,55–4,10 (m, 5 H), 4,50 (dd, *J* = 11,4, 3,4 Hz, 1 H), 4,01–3,88 (m, 2 H), 3,76 (s, 3 H), 3,39–3,22 (m, 4 H), 3,14–3,03 (m, 2 H), 2,89 (s, 3 H), 2,81–2,69 (m, 2 H), 2,65–2,55 (m, 1 H), 2,47–2,34 (m, 4 H), 2,07–1,13 (m, 23 H), 12H restante oscurecido por picos de agua y DMSO. HRMS (ESI) m/z calc. para $C_{67}H_{84}ClN_{10}O_{14}$:1287,5852, exp.: 1287,5845 [MH^+]; calc. para $C_{67}H_{83}ClN_{10}NaO_{14}$: 1309,5671, exp.: 1309,5654 [MNa^+].

También se purificó (ii) **CBI–PBD LD3** (11,2 mg, 15%) en forma de un sólido beige; pureza de HPLC: 92,6%; ^1H RMN [$(CD_3)_2SO$] δ 10,07 (s, intercambiable con D_2O, 1 H), 9,90 (br s, intercambiable con D_2O, 1 H), 8,27 (s, 1 H), 7,96 (d, *J* = 8,5 Hz, 1 H), 7,93–7,76 (m, 3 H, reducido a 1 H después de D_2O), 7,73–7,51 (m, 5 H, reducido a 3 H después de D_2O), 7,46 (t, *J* = 8,2 Hz, 1 H), 7,16–7,08 (m, 2 H), 7,04 (s, 1 H), 6,97 (s, 2 H), 6,85 (s, 1 H), 5,33 (br d, *J* = 7,8 Hz, 1 H), 5,07 (br d, *J* = 12 Hz, 1 H), 4,93 (br d, *J* = 13 Hz, 1 H), 4,56–4,10 (m, 5 H), 3,77 (s, 3 H), 3,62–3,23 (m, 6 H), 3,44 (s, 3 H), 3,15–3,01 (m, 2 H), 2,89 (s, 3 H), 2,82–2,69 (m, 2 H), 2,66–2,55 (m, 1 H), 2,46–2,34 (m, 4 H), 2,11–1,12 (m, 23 H), 13H restantes oscurecidos por picos de agua y DMSO. HRMS (ESI) m/z calc. para $C_{68}H_{86}ClN_{10}O_{14}$: 1301,6008, exp.: 1301,5952 [MH^+]; calc. para $C_{68}H_{85}ClN_{10}NaO_{14}$: 1323,5827, exp.: 1323,5778 [MNa^+].

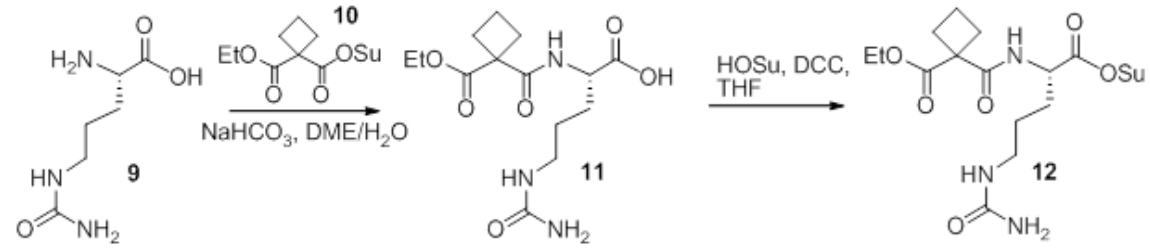
Preparación de

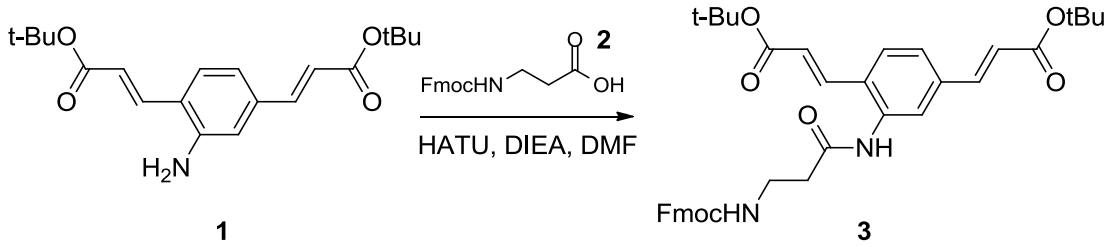
Ácido (2E,2'E)–3,3'–(2–(3–((S)–2–(1–(5–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)pentilcarbamoil)ciclobutancarboxamido)–5–ureidopentanamido)propanamido)–1,4–fenilen)diacrílico

Esquema

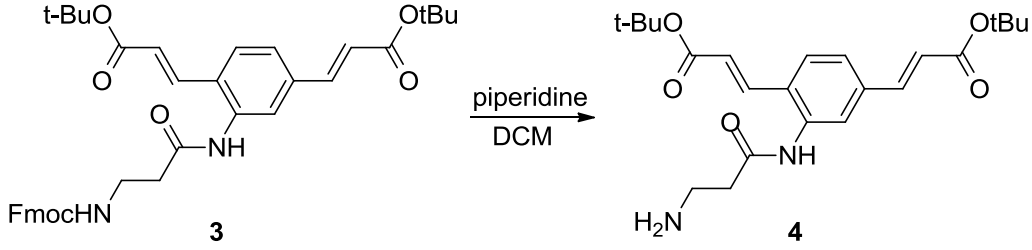


Síntesis de INT 12:



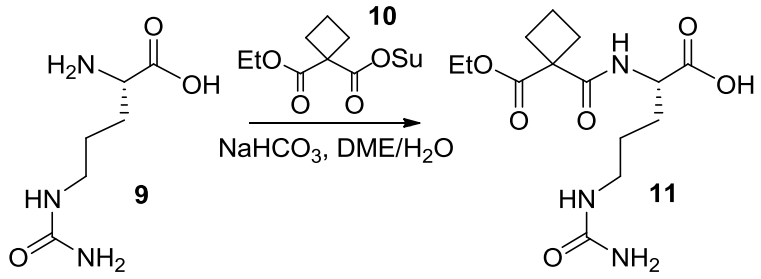


A una solución agitada de **2** (1,35 g, 4,34 mmol) en DMF seca (20 mL) se añadió HATU (2,20 g, 5,79 mmol), DIEA (1,12 g, 8,68 mmol). Después de agitar la mezcla a 25 ºC durante 10 min, el compuesto **1** (1,0 g, 2,89 mmol) se añadió. La mezcla de reacción se agitó a 25 ºC durante 15 h bajo N_2. Agua (20 mL) se añadió y se extrajo con EtOAc (30 mL×3). La fase orgánica combinada se lavó con salmuera, se secó sobre Na_2SO_4 y se concentró. Se purificó por columna flash (PE: EtOAc = 1:1) para dar el producto crudo **3** (2,25 g) en forma de un sólido amarillo. LCMS: (5–95 AB, 1,5 min), 1,075 min, $[M–114]^+$= 527,0.

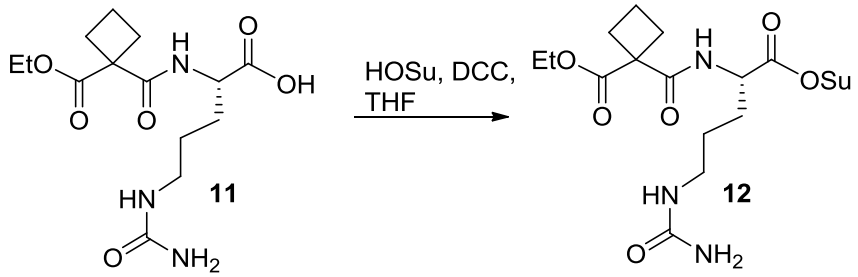


A una solución agitada del compuesto **3** (1,95 g, 3,05 mmol) en DCM seca (30 mL) se añadió piperidina (2,60 g, 30,5 mmol). La mezcla se agitó a 25 ºC durante 2,5 h bajo N_2. Se lavó con H_2O (20 mL×3), salmuera (15 mL) y se secó sobre Na_2SO_4. Se concentró, se lavó con PE (20 mL×3) y se secó para dar el producto crudo **4** (2,4 g) en forma de

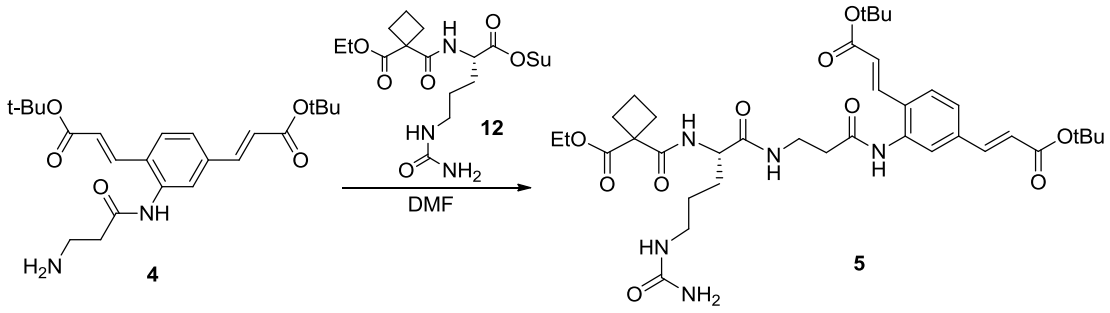
un sólido amarillo.



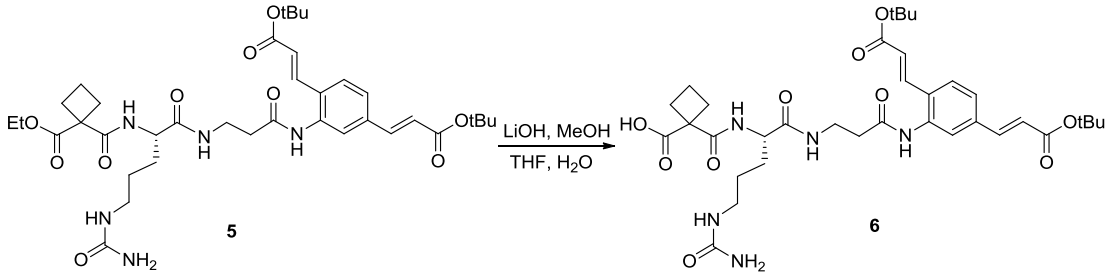
A una solución del compuesto **9** (3,0 g, 17,1 mmol) en DME/H_2O (40 mL / 20 mL) se añadió $NaHCO_3$ (2,88 g, 34,3 mmol). Después de agitar la mezcla a 25 ºC durante 15 min, compuesto **10** (5,54 g, 20,6 mmol) se añadió. La mezcla se agitó a 25 ºC durante 16 h bajo N_2. Los solventes se removieron y H_2O (5 mL) se añadió. Se extrajo con EtOAc (30 mL×3). El pH de fase acuosa se ajustó a 3 con solución de HCl y se extrajo con EtOAc (120 mL×3). La fase orgánica combinada se secó sobre Na_2SO_4 y se concentró para dar el producto crudo **11** en forma de aceite incoloro.



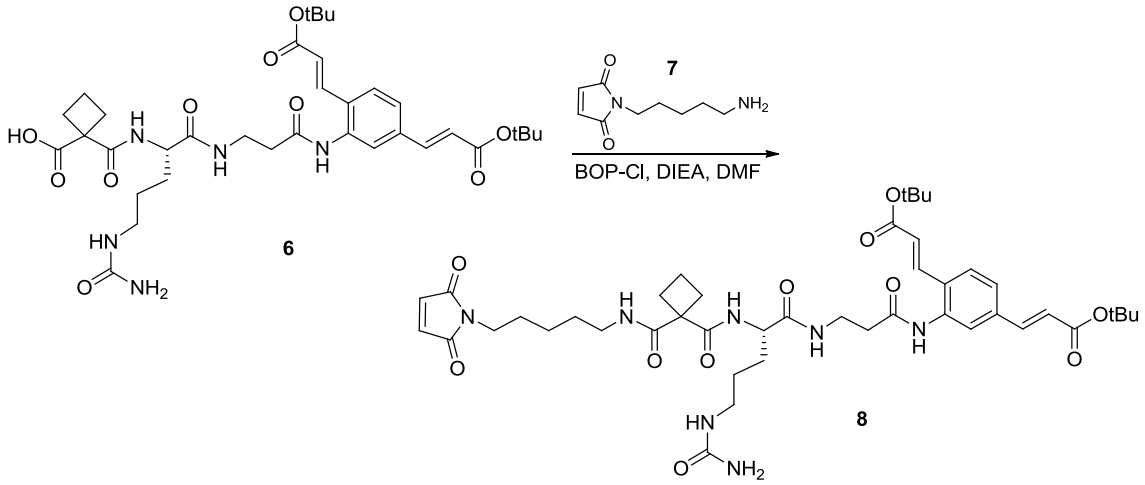
A una solución del compuesto **11** (5,64 g, 17,1 mmol) en THF seco (120 mL) se añadió HOSu (2,07 g, 17,98 mmol) y DCC (3,70 g, 17,98 mmol). La mezcla se agitó a 25 ºC durante 15 h bajo N_2. Se filtró y se concentró. El residuo se lavó con PE (30 mL×3), se secó y se concentró para dar el producto crudo **12** (8,30 g) en forma de sólido blanco.



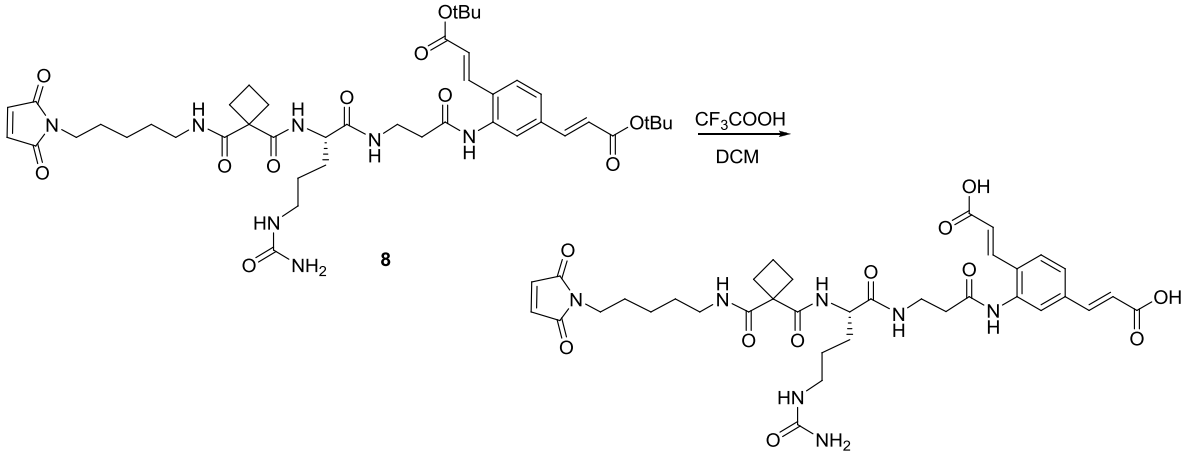
A una solución del compuesto **4** (1,65 g, 3,96 mmol) en DMF seca (20 mL) se añadió el compuesto **12** (2,03 g, 4,75 mmol). La mezcla se agitó a 25 ºC durante 15 h bajo N_2. El agua (30 mL) se añadió y se extrajo con EtOAc (30 mL×3). La fase orgánica combinada se lavó con salmuera (30 mL) y se secó sobre Na_2SO_4. Se concentró para dar el producto crudo que se lavó con PE (30 mL×4) y MTBE/PE (15 mL/45 mL ×2) y se secó para dar el producto **5** (0,96 g, rendimiento: 33%) en forma de sólido amarillo claro.



A una solución del compuesto **5** (0,96 g, 1,32 mmol) en MeOH (4 mL), THF (8 mL) y H_2O (8 mL) se añadió LiOH–H_2O (111 mg, 2,64 mmol). La mezcla se agitó a 25 ºC durante 30 min bajo N_2. Los solventes orgánicos se removió a presión reducida y H_2O (10 mL) se añadió. Una solución de HCl se añadió para ajustar pH a 3–4. Se extrajo con EtOAc (50 mL×4), se secó sobre Na_2SO_4 y se concentró para dar el producto crudo. El producto crudo se lavó con PE (30 mL) y MTBE (10 mL × 3) y se secó para dar el producto **6** (620 mg, rendimiento: 67%) en forma de sólido blanco.



A una solución del compuesto **6** (620 mg, 0,89 mmol) en DMF seca (10 mL) se añadió DIEA (573 mg, 4,43 mmol) y Bop–Cl (248 mg, 0,97 mmol) a 0 ºC. Compuesto 7 (177,59 mg, 0,97 mmol) se añadió. Después de agitar la mezcla a 0 ºC durante 30 min bajo N_2, H_2O (20 mL) se añadió y se extrajo con EtOAc (30 mL×3). La fase orgánica combinada se lavó con salmuera (30 mL), se secó sobre Na_2SO_4 y se concentró para dar el producto crudo. Se lavó con MTBE (10 mL ×2) y PE (50 mL×3) y se secó para dar el producto **8** (690 mg, rendimiento: 90%) en forma de sólido blanco. LCMS: (5–95 AB, 1,5 min), 0,875 min, MS=864,2 [M+1];

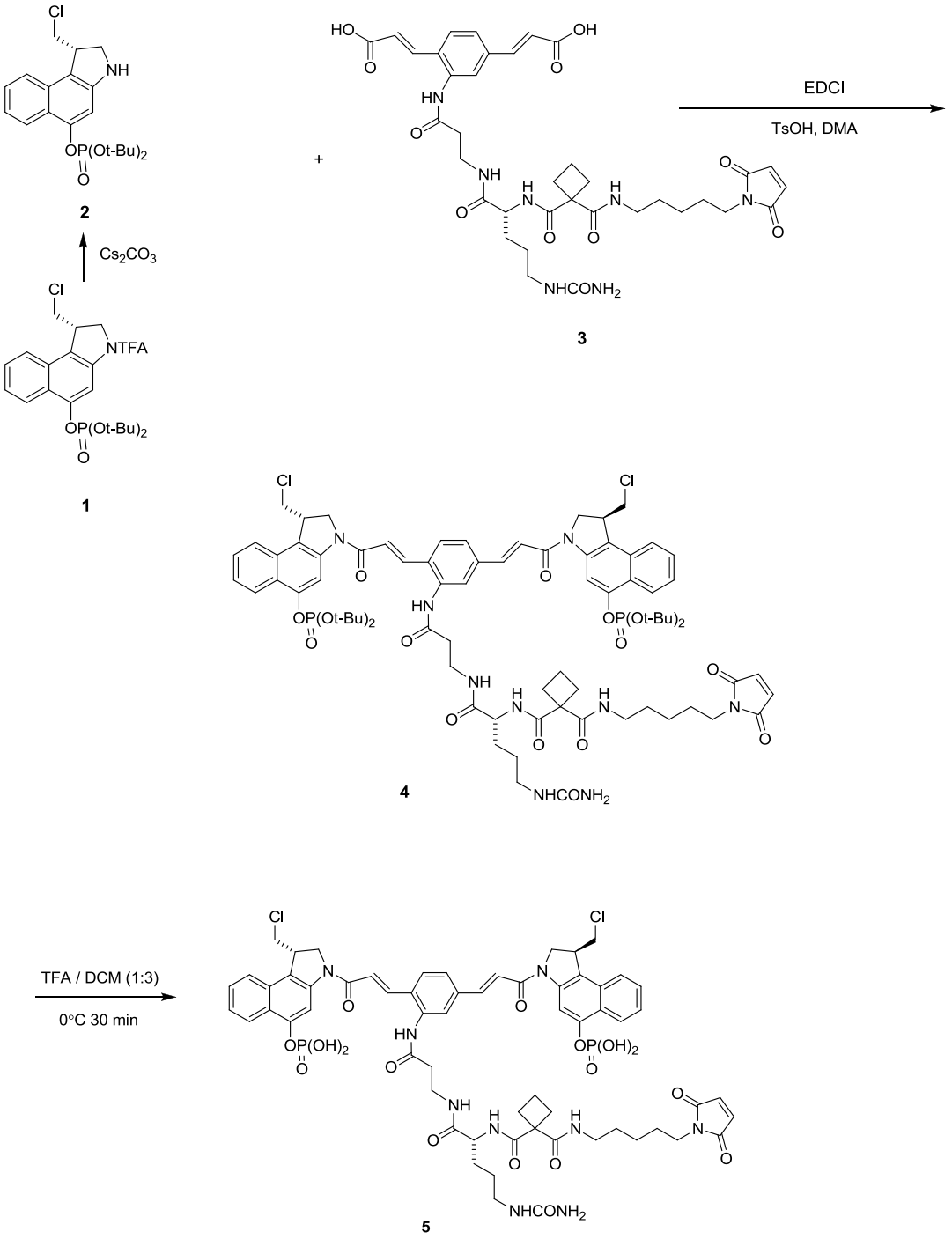


A una solución agitada del compuesto **8** (300 mg, 0,347 mmol) en DCM seca (4,0 mL) se añadió en porciones TFA (2,0 mL). Después de agitar la mezcla a 25 ºC durante 30 min bajo N_2, el solvente se removió. El

residuo se disolvió en DMF y se purificó por HPLC prep (HCOOH) para dar el producto ácido (2E,2'E)–3,3'–(2–(3–((S)–2–(1–(5–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)pentilcarbamoil)ciclobutancarboxamido)–5–ureidopentanamido)propanamido)–1,4–fenilen)diacrílico (81,4 mg, rendimiento: 31%) en forma de un polvo amarillo claro. ^{1}H RMN (400 MHz, DMSO–*d*6) δ 9,93 (s, 2H), 6,13 (s, 1H), 7,82 – 7,46 (m, 8H), 6,98 (s, 2H), 6,55 – 6,51 (d, *J* = 16,0 Hz, 2H), 5,98 (s, 1H), 5,41 (s, 2H), 4,22 (s, 1H), 3,03 – 2,90 (m, 6H), 2,67 – 2,50 (m, 4H), 2,36 (s, 4H), 1,69 (s, 3H), 1,46 – 1,33 (m, 7H), 1,23 – 1,16 (d, *J* = 28 Hz, 2H).

Preparación de CBI–CBI LD5

2,5–bis((E)–3–((S)–1–(clorometil)–5–(fosfonooxi)–1H–benzo[e]indol–3(2H)–il)–3–oxoprop–1–enil)fenilcarbamato de 4–((S)–2–(1–(5–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)pentilcarbamoil)ciclobutancarboxamido)–5–ureidopentanamido)bencilo



CBI-CBI LD5

2

A una solución de **1** (230 mg, 0,44 mmol) en MeOH (2 mL) enfriada en un baño de hielo se añadió Cs_2CO_3 (287 mg, 0,88 mmol) y varias gotas

de agua. La mezcla se agitó en el baño de hielo durante 1 h y luego se redistribuyó entre acetato de etilo y agua. La fase acuosa se extrajo con acetato de etilo tres veces. Los extractos orgánicos combinados se lavaron con agua y salmuera, se secaron sobre Na2SO4 anhidro, se filtraron a través de celite y el solvente se removió. El residuo resultante se disolvió en acetato de etilo y se filtró a través de un taco de Florisil para dar **2** crudo como una goma blanquecina (188 mg, 100%) que se usó directamente sin ulterior purificación.

4

A 180 mg (0,42 mmol) de **2** (recién preparado por el procedimiento mencionado con anterioridad) se añadió ácido (2E,2'E)–3,3'–(2–(3–((S)–2–(1–(5–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)pentilcarbamoil)ciclobutancarboxamido)–5–ureidopentanamido)propanamido)–1,4–fenilen)diacrílico **3** (100 mg, 0,12 mmol), EDCI.HCl (185 mg, 0,96 mmol), ácido toluensulfónico (2,1 mg, 0,012 mmol) y DMA (0,5 mL). Después de agitar la mezcla durante la noche, la mayor parte de DMA se removió al vacío y el residuo se redistribuyó entre acetato de etilo y NaHCO3 ac. La fase acuosa se extrajo con acetato de etilo tres veces. Los extractos orgánicos combinados se lavaron con agua seguido por salmuera, se secaron sobre Na2SO4 anhidro y se filtraron a través de un taco de Celite. El solvente se removió y el residuo resultante se disolvió en DCM mínima y se precipitó por adición de heptano para dar el producto crudo (207 mg), que luego se purificó por HPLC preparativa [columna: Synergy–Max RP 4µ, 250 × 21,20 mm; fase móvil: A/B = del 20% al 1% (A: formiato de amonio pH 3,45, B: 90% acetonitrilo en agua); tasa de flujo 12 mL/min] para dar **4** (65 mg, 33%) en forma de un sólido amarillo. ^{1}H RMN ($CDCl_3$) δ 9,67 (br s, 1H), 8,67 (br s, 2H), 8,18–7,98 (m, 4H), 7,90–7,72 (m, 3H),

7,66–7,58 (m, 6H), 7,50–7,28 (m, 8H), 6,84–6,62 (m, 4H), 6,66 (s, 2H, maleimida), 6,00 (br s, 1H), 5,23–5,13 (m, 2H), 4,80–4,70 (m, 1H), 4,40–3,85 (m, 6H), 3,50–3,40 (m, 6H), 3,20–3,14 (m, 2H), 2,90–2,75 (m, 2H), 2,60–2,45 (m, 4H), 1,92–1,80 (m, 2H), 1,62, 1,60, 1,57, 1,56 (4s, 36H), 1,55–1,40 (m, 6H), 1,30–1,20 (m, 3H). ^{31}P RMN ($CDCl_3$) δ –15,44 (s), 15,82 (s). HRMS (ESI) exp. *m/z* 1666,6051 (M + Na). $C_{83}H_{101}Cl_2N_9NaO_{18}P_2$ requiere 1666,6009.

5

A una solución de **4** (25 mg, 0,015 mmol) en DCM (0,6 mL) enfriada en un baño de hielo se añadió TFA (0,2 mL, 2,61 mmol). La mezcla se agitó en un baño de hielo durante 0,5 h. Todos los componentes volátiles se bombearon a 0 ºC y el residuo resultante se trituró con acetato de etilo, luego se lavó con THF y éter de petróleo para dar **5** (**CBI–CBI LD5**) en forma de un sólido amarillo (19 mg, 88%). ^{1}H RMN (DMSO) δ 10,33 (br s, 1H), 9,63 (s, 1H), 8,70 (s, 1H), 8,95 (s, 1H), 8,14–8,11 (m, 4H), 7,96–7,90 (m, 4H), 7,81–7,69 (m, 6H), 7,64–7,54 (m, 2H), 7,50–7,39 (m, 4H), 7,33–7,26 (m, 2H), 6,97 (s, 2H, maleimida), 6,13 (br s, 2H), 5,14 (s, 2H), 4,58 (s, 4H), 4,40–4,30 (m, 4H), 4,08–3,95 (m, 4H), 3,29 (t, *J* = 6,9 Hz, 2H), 2,99–2,94 (m, 4H), 2,39–2,33 (m, 2H), 1,71–1,67 (m, 4H), 1,40–1,35 (m, 6H), 1,12–1,10 (m, 3H). ^{31}P RMN (DMSO) δ –5,91 (s). HRMS (ESI) exp. *m/z* 1442,3438 (M + Na). $C_{67}H_{69}Cl_2N_9NaO_{18}P_2$ requiere 1442,3505.

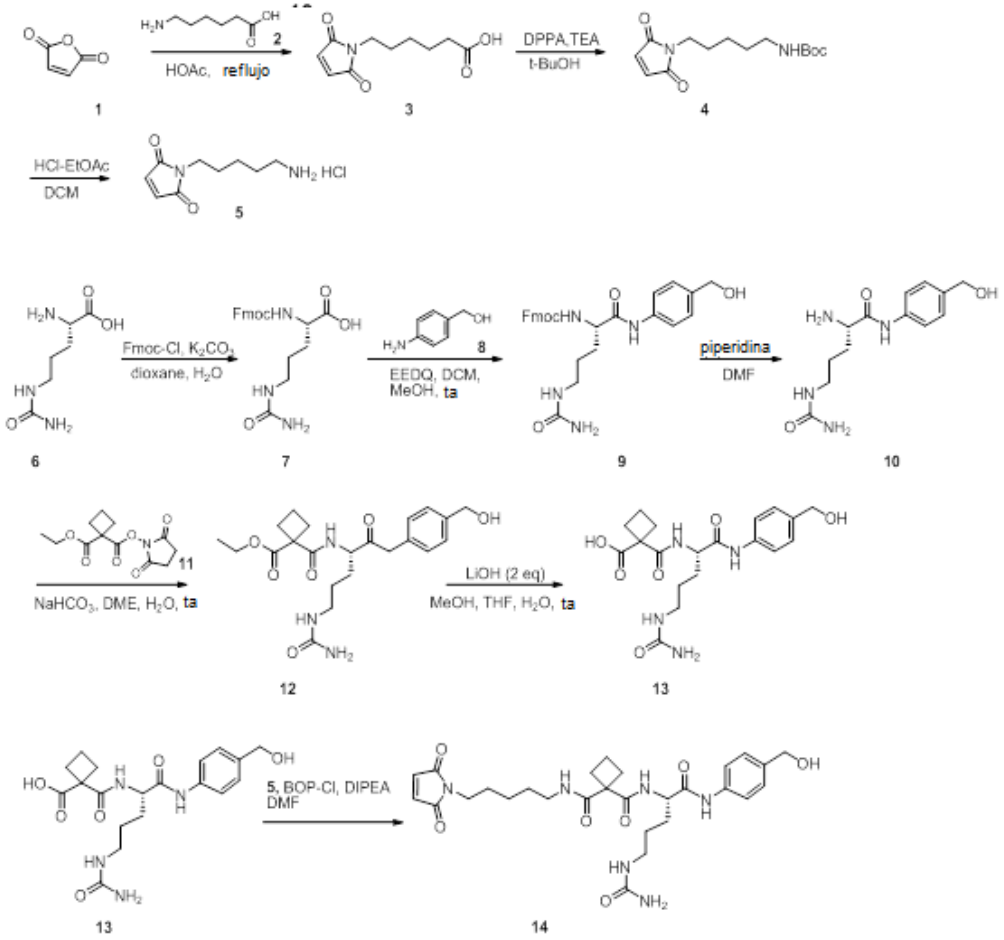
CBI–CBI LD6

2,5–bis((E)–3–((S)–1–(clorometil)–5–(fosfonooxi)–1H–benzo[e]indol–3(2H)–il)–3–oxoprop–1–enil)fenilcarbamato de 4–((S)–2–(1–(5–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)pentilcarbamoil)ciclobutancarboxamido)–5–ureidopentanamido)bencilo

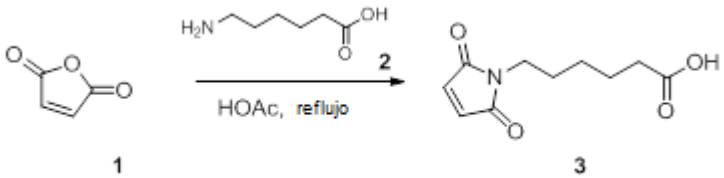
Etapa A: (S)–N–(5–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)pentil)–N–(1–

(4–(hidroximetil)fenilamino)–1–oxo–5–ureidopentan–2–il)ciclobutan–1,1–dicarboxamida

Esquema

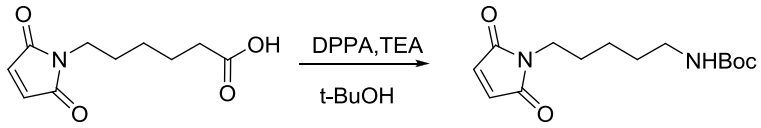


Procedimiento



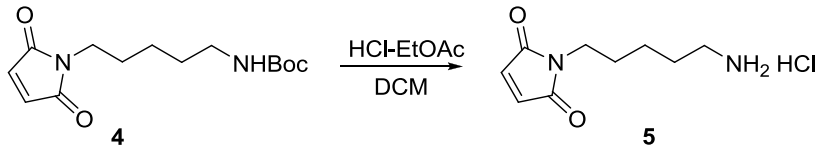
Compuesto **1** (150 g, 1,53 mol) se añadió a una solución agitada de Compuesto **2** (201 g, 1,53 mol) en HOAc (1000 mL). Después de agitar

la mezcla a temperatura ambiente durante 2 h, se calentó a reflujo durante 8 h. La capa orgánica solventes se eliminaron a presión reducida y el residuo se extrajo con EtOAc (500 mL × 3), se lavó con H_2O. Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na2SO4 y se concentraron para dar el producto crudo. Se lavó con éter de petróleo para dar el compuesto **3** en forma de sólido blanco (250 g, 77,4 %).



3 **4**

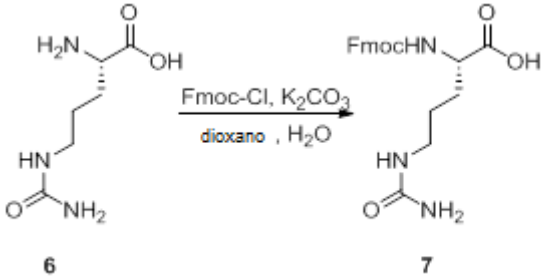
DPPA (130 g, 473 mmol) y TEA (47,9 g, 473 mmol) se añadió a una solución del compuesto **3** (100 g, 473 mmol) en t–BuOH (200 mL). La mezcla se calentó a reflujo durante 8 h bajo N_2. La mezcla se concentró y el residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (PE:EtOAc = 3:1) para dar el compuesto **4** (13 g, 10 %).



4 **5**

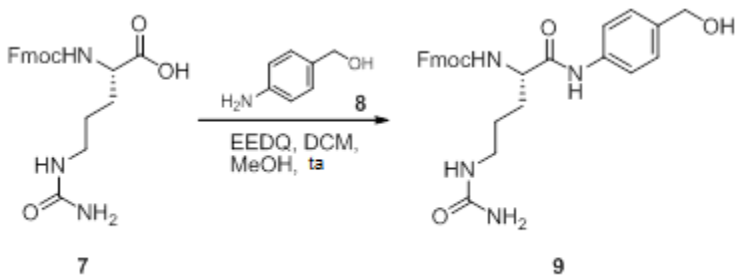
A una solución del compuesto **4** (28 g, 992 mmol) en EtOAc anhidro (30 mL) se añadió HCl/EtOAc (50 mL) en porciones. Después de agitar la mezcla a temperatura ambiente durante 5 h, se filtró y el sólido se secó para dar el compuesto **5** (16 g, 73,7%).

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO–d_6): δ 8,02 (s, 2H), 6,99 (s, 2H), 3,37–3,34 (m, 2H), 2,71–2,64 (m, 2H), 1,56–1,43 (m, 4H), 1,23–1,20 (m, 2H).



6 **7**

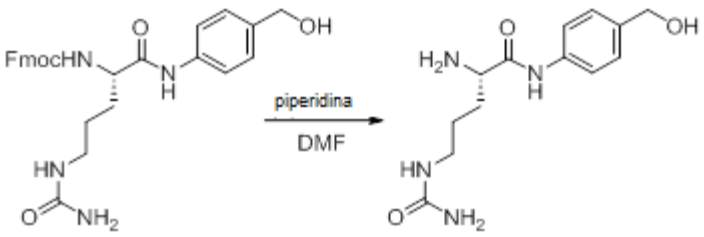
A una mezcla del compuesto **6** (17,50 g, 0,10 mol) en una mezcla de dioxano y H_2O (50 mL / 75 mL) se añadió K_2CO_3 (34,55 g, 0,25 mol). Fmoc–Cl (30,96 g, 0,12 mol) se añadió lentamente a 0 ^oC. La mezcla de reacción se calentó hasta temperatura ambiente durante 2 h. El solvente orgánico se removió a presión reducida la suspensión acuosa se ajustó a pH = 3 con solución 6 M de HCl y se extrajo con EtOAc (100 mL × 3). La capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4, se filtró y se concentró a presión reducida para dar el producto deseado **7** (38,0 g, 95,6 %) (el compuesto **7** después de volvió asequible en comercios).



7 9

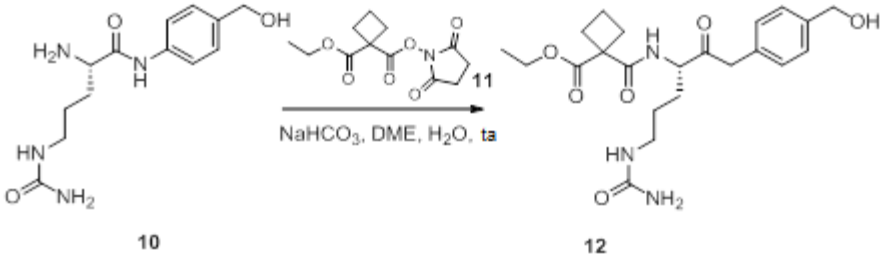
A una solución del compuesto **7** (4 g, 10 mmol) en una mezcla de DCM y MeOH (100 mL / 50 mL) se añadieron 4–amino–fenil–metanol (**8**) (1,6 g, 13 mmol, 1,3 eq) y EEDQ (3,2 g, 13 mmol, 1,3 eq). Después de agitar la mezcla a temperatura ambiente durante 16 h bajo N_2, se concentró para dar un sólido marrón. MTBE (200 mL) se añadió y se agitó a 15 ºC durante 2 h. El sólido se recolectó por filtración, se lavó con MTBE (50 mL × 2) para dar el producto crudo **9** en forma de un sólido anaranjado (4,2 g, 84%).

LCMS (ESI): m/z 503,0 [M+1].



9 **10**

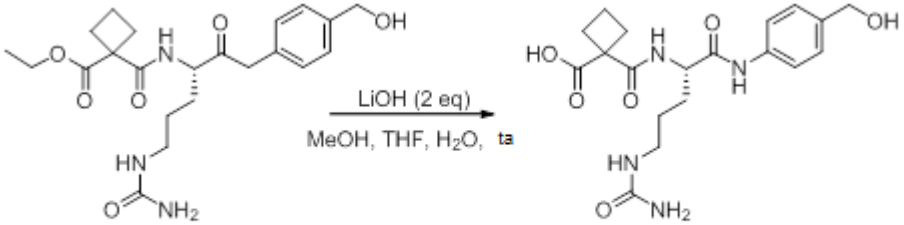
A una solución agitada del compuesto **9** (4,2 g, 8,3 mmol) en DMF seca (20 ml) se añadió piperidina (1,65 mL, 17 mmol, 2 eq) en porciones a temperatura ambiente. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 min y se formó un precipitado sólido. DCM seca (50 mL) se añadió y la mezcla se volvió transparente de forma inmediata. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante otros 30 min y LCMS mostró que el compuesto **9** se había consumido. Se concentró hasta sequedad a presión reducida (asegurarse de que no quede piperidina) y el residuo se dividió entre EtOAc y H_2O (50 mL / 20 mL). La fase acuosa se lavó con EtOAc (50 mL × 2) y se concentró para dar **10** en forma de un aceite residual (2,2 g, 94%) (pequeña cantidad contenida de DMF).



10 **12**

A una solución del compuesto **11** (8 g, 29,7 mmol) en DME (50 mL) se añadió una solución del compuesto **10** (6,0 g, 21,4 mmol) y $NaHCO_3$ (7,48 g, 89,0 mmol) en agua (30 mL). Después de agitar la mezcla a temperatura ambiente durante 16 h, se concentró hasta sequedad a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna (DCM:MeOH = 10:1) para dar el compuesto crudo **12** en forma de sólido blanco (6,4 g, 68,7%).

LCMS (ESI): m/z 435,0 [M+1].

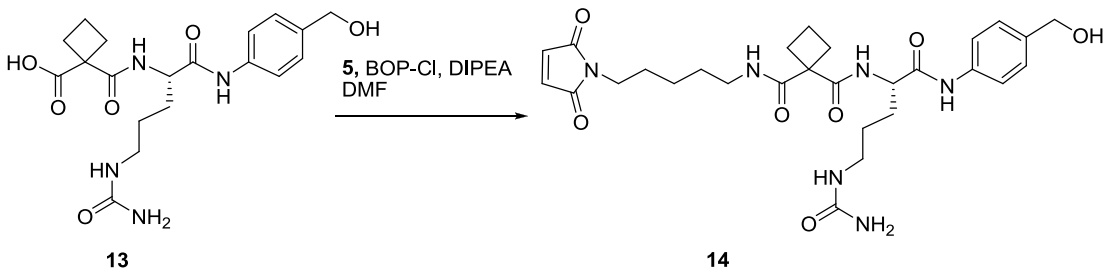


12 13

A una solución agitada del compuesto **12** (6,4 g, 14,7 mmol) en una mezcla de THF y MeOH (20 mL / 10 mL) se añadió una solución de $LiOH \cdot H_2O$ (1,2 g, 28,6 mmol) en H_2O (20 mL) a temperatura ambiente. Después de agitar la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 16 h, el solvente se removió a presión reducida, el residuo obtenido se purificó por HPLC prep para dar el compuesto **13** (3,5 g, rendimiento: 58,5%).

LCMS (ESI): m/z 406,9 [M+1].

^{1}H RMN (400 MHz, Metanol–d_4) δ 8,86 (d, J = 8,4 Hz, 2 H), 8,51 (d, J = 8,4 Hz, 2 H), 5,88 – 5,85 (m, 1 H), 5,78 (s, 2 H), 4,54 – 4,49 (m, 3 H), 4,38 – 4,32 (m, 1 H), 3,86 – 3,75 (m, 1 H), 3,84 – 3,80 (m, 2 H), 3,28 – 3,21 (m, 1 H), 3,30 – 3,24 (m, 1 H), 3,00 – 2,80 (m, 1 H), 2,37 – 2,28 (m, 2 H).



13 14

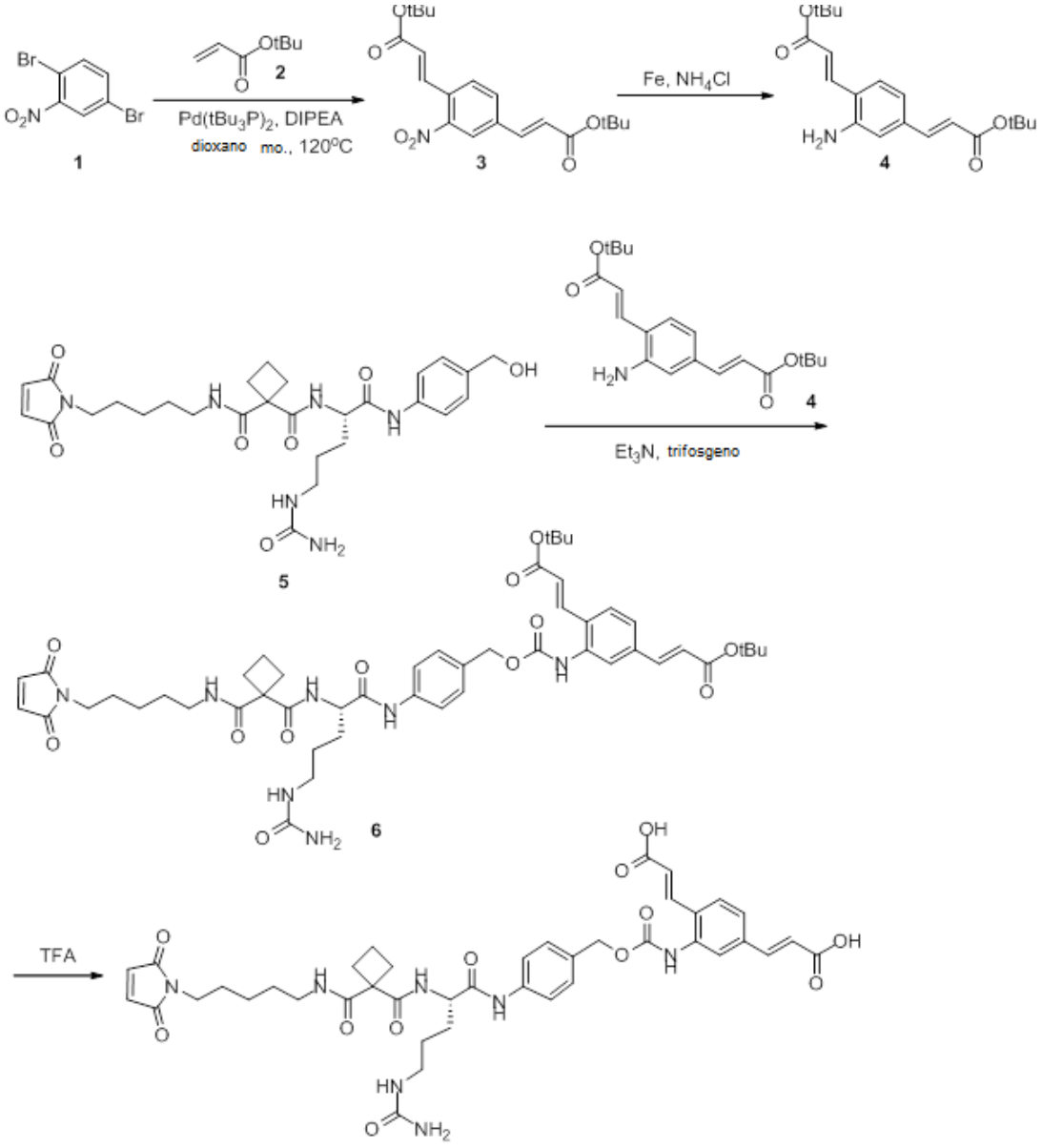
DIPEA (1,59 g, 12,3 mmol) y BOP–Cl (692 mg, 2,71 mmol) se añadió a una solución del compuesto **13** (1,0 g, 2,46 mmol) en DMF (10 mL) a 0 ºC, seguido por compuesto **5** (592 mg, 2,71 mmol). La mezcla se agitó a

0 ºC durante 0,5 h. La mezcla de reacción se neutralizó con una solución de ácido cítrico (10 mL), se extrajo con DCM/MeOH (10:1). La capa orgánica se secó y se concentró y el residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (DCM:MeOH = 10:1) para dar el compuesto **14** (1,0 g, 71 %).

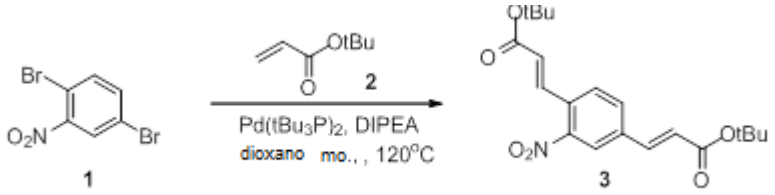
^{1}H RMN (400 MHz, DMSO–d_6): δ 10,00 (s, 1H), 7,82–7,77 (m, 2H), 7,53 (d, J = 8,4 Hz, 2 H), 7,19 (d, J = 8,4 Hz, 2 H), 6,96 (s, 2H), 5,95 (t, J = 6,4 Hz, 1H), 5,39 (s, 2H), 5,08 (t, J = 5,6 Hz, 1H), 4,40–4,35 (m, 3H), 4,09 (d, J = 4,8 Hz, 1 H), 3,01 (d, J = 3,2 Hz, 2 H), 3,05–2,72 (m, 4H), 2,68–2,58 (m, 3H), 2,40–2,36 (m, 4H), 1,72–1,70 (m, 3H), 1,44–1,42 (m, 1H), 1,40–1,23 (m, 6H), 1,21–1,16 (m, 4H).

Etapa B: Síntesis de ácido (2E,2'E)–3,3'–(2–((4–((S)–2–(1–(5–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)pentilcarbamoil)ciclobutancarboxamido)–5–ureidopentanamido)benciloxi)carbonilamino)–1,4–fenilen)diacrílico

Esquema

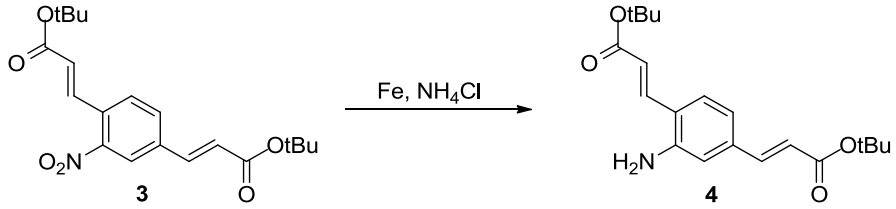


Procedimiento

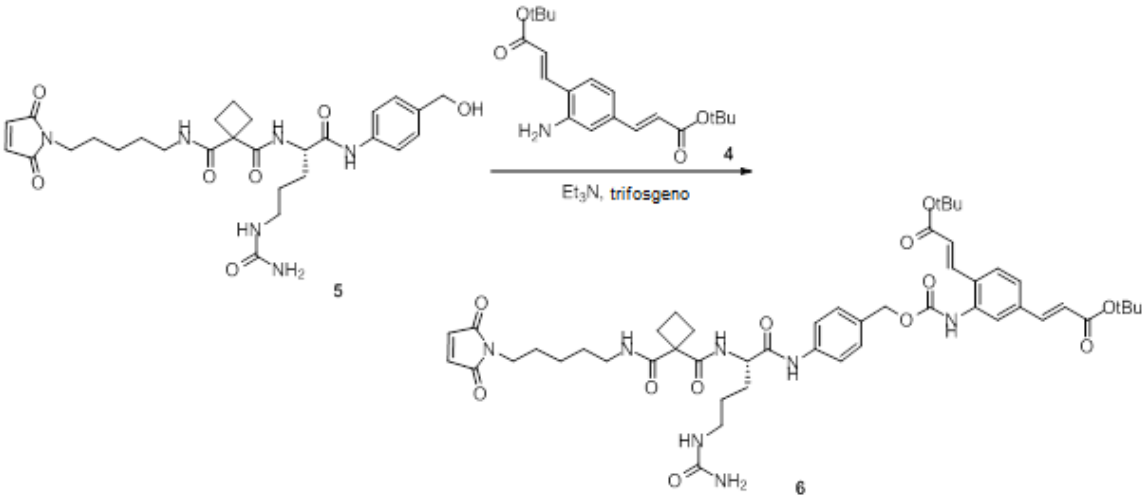


A una solución del compuesto **1** (1,5 g, 21,4 mmol) en dioxano (4,0 mL) se añadió el compuesto **2** (2,74 g, 85,6 mmol), DIPEA (3,45 g, 107 mmol) y Pd(t–$Bu_3P)_2$(0,55 g, 4,30 mmol). La reacción se agitó a 120 ºC durante 2,0 h bajo irradiación de microondas. La reacción se repitió 4

veces (se usó un total de 6,0 g de **1**). La mezcla de reacción combinada se concentró, se diluyó con agua (20 mL) y se extrajo con EtOAc (100,0 mL x 3). La capa orgánica se combinó, se secó sobre Na_2SO_4. Se concentró y se purificó por columna (PE: EtOAc = 10:1) para dar el producto deseado (3,8 g, 47%).

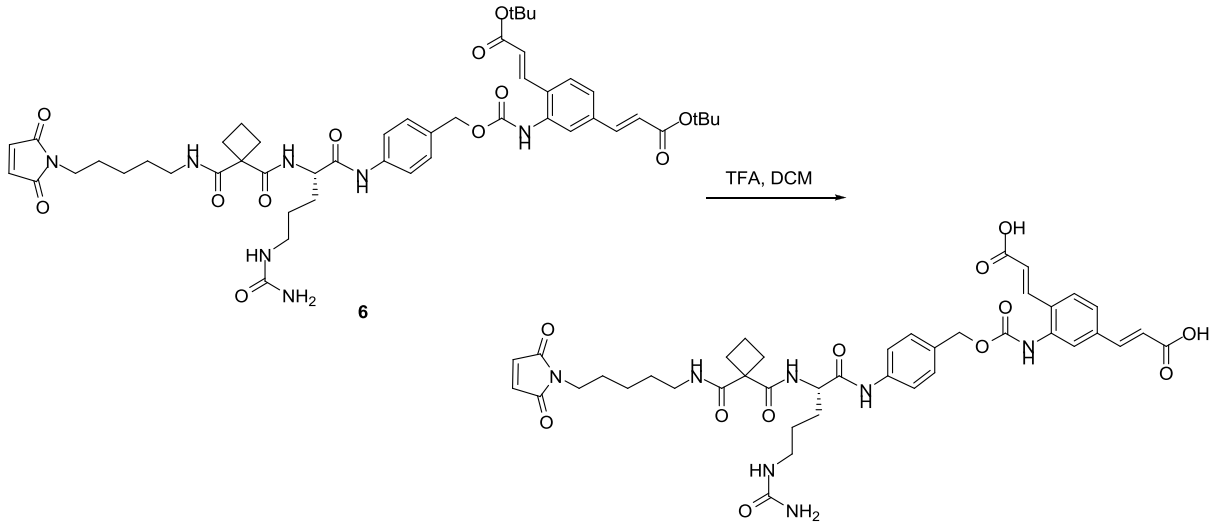


A una solución del compuesto **3** (3,8 g, 10,1 mmol) en EtOH/H_2O (120,0 mL) se añadió Fe (2,83 g, 50,7 mmol) y NH_4Cl (5,4 g, 101 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a 100 ºC durante 2,0 h. La mezcla de reacción se filtró y el filtrado se concentró y se extrajo con EtOAc (60,0 mL x 3). La capa orgánica se combinó, se secó sobre Na_2SO_4 y se concentró para dar el producto (2,5 g, 72%).



A una solución de trifosgeno (224 mg, 0,76 mmol) se añadió una solución del compuesto **4 (**725 mg, 2,1 mmol) y Et_3N (530,3 mg, 5,25 mmol) en DCM (5,0 mL) en porciones en baño de helado. La mezcla de reacción se agitó a 21 ^oC durante 1,0 h hasta que no quedara más

material inicial. La mezcla de reacción se lavó con agua (5,0 mL x 2) y se secó sobre Na_2SO_4. Se concentró y se disolvió en DCM (5,0 mL). Una solución del compuesto **5** (1,0 g, 1,75 mmol) se añadió y la mezcla de reacción se agitó a 21 ^oC durante 3,0 h. La reacción se neutralizó con MeOH (2,0 mL) y se purificó por columna (DCM: MeOH=10:1) para dar el producto deseado (380 mg, 23%).



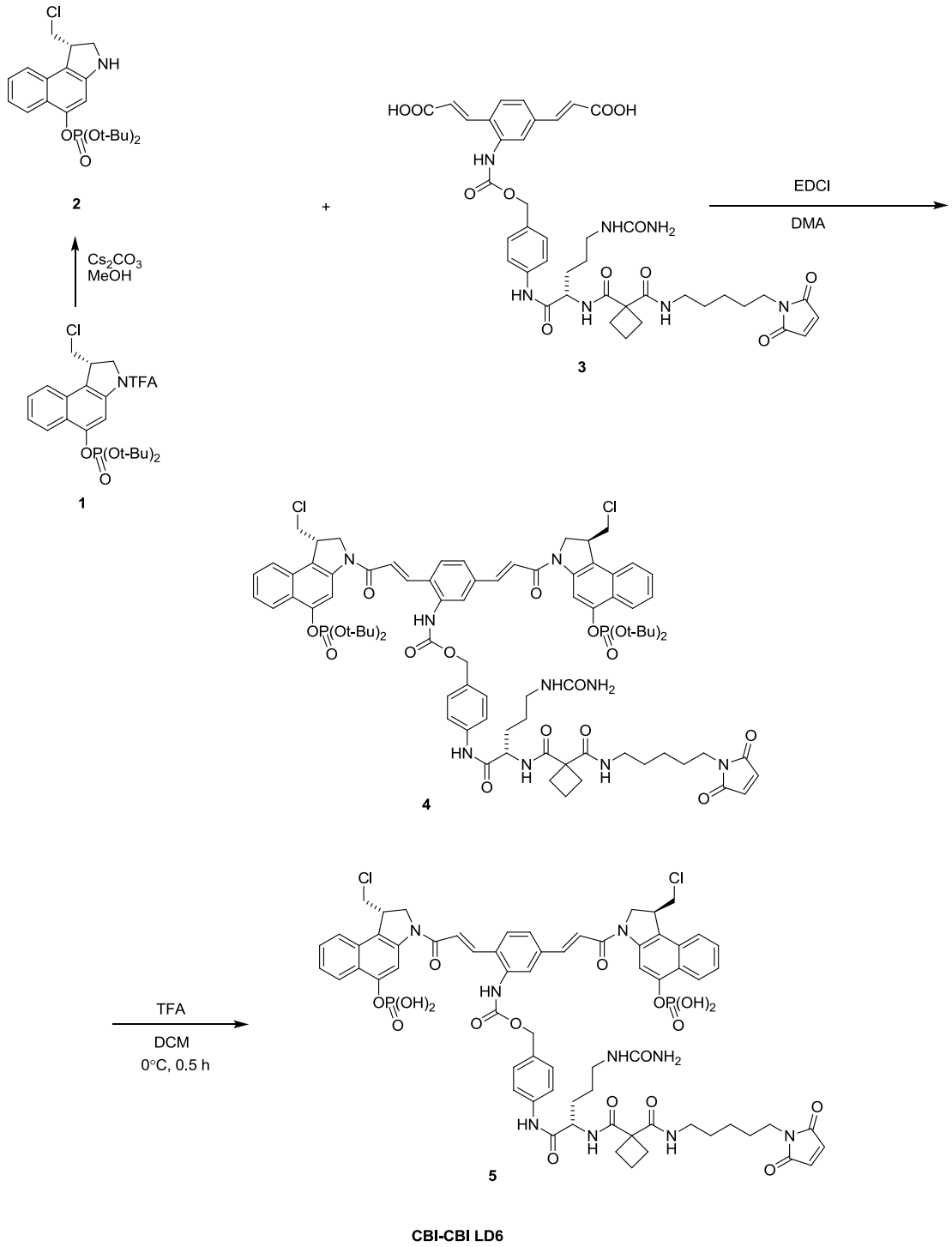
6

A una solución del compuesto **6** (300,0 mg, 0,32 mmol) in DCM (10,0 mL) se añadió TFA (2,0 mL) y la mezcla se agitó a 21 ^oC durante 30,0 min. La mezcla se ajustó a pH 6 con $NH_3•H_2O$. La precipitación se recolectó por filtración para dar el producto ácido (2E,2'E)–3,3'–(2–((4–((S)–2–(1–(5–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)pentilcarbamoil)ciclobutancarboxamido)–5–ureidopentanamido)benciloxi)carbonilamino)–1,4–fenilen)diacrílico (112,0 mg, rendimiento del 42 %).

LCMS (10–80, AB, 2,0 min) RT = 0,962 min, $[M+1]^+$ = 830,0;

^1H RMN (400 MHz, DMSO–d_6) δ 12,45 (br, 2H), 10,10 (s, 1H), 9,55 (s, 1H), 7,50–7,81 (m, 8H), 7,34 (m, 2H), 6,95 (s, 2H), 6,47–6,57 (m, 2H), 5,96 (s, 1H), 5,40 (s, 2H), 5,05 (s, 2H), 4,36–4,39 (m, 1H), 2,98–3,06 (m, 6H), 2,35–2,39 (m, 4H), 1,15–1,73 (m, 13H).

Etapa C:



8

A 184 mg (0,43 mmol) de **2** (recién hecho por el procedimiento mencionado con anterioridad) se añadió **3** (80 mg, 0,11 mmol), EDCI.HCl

(165 mg, 0,86 mmol), ácido toluensulfonico (2,0 mg, 0,011 mmol) y DMA (0,5 mL). Después de agitar la mezcla durante la noche, la mayor parte de DMA se removió al vacío y el residuo se redistribuyó entre acetato de etilo y NaHCO3 ac. La fase acuosa se extrajo con acetato de etilo tres veces. Los extractos orgánicos combinados se lavaron con agua seguido por salmuera, se secó sobre Na2SO4 anhidro y se filtró a través de un taco de Celite. El solvente se removió y el residuo resultante se disolvió en DCM mínima y se precipitó por adición de heptano para dar el producto crudo (195 mg), que luego se purificó por HPLC preparativa [columna: Synergy–Max RP 4µ, 250 × 21,20 mm; Fase móvil: A/B = del 90% al 2% (A: formiato de amonio pH 3,45, B: 90% acetonitrilo en agua); tasa de flujo 12 mL/min] para dar **4** (56 mg, 34%) en forma de un sólido amarillo. ^{1}H RMN (DMSO) δ 10,02 (s, 1H), 8,67 (s, 2H), 8,14–8,06 (m, 4H), 7,97 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 7,86–7,76 (m, 4H), 7,70 (d, *J* = 15,2 Hz, 1H), 7,63–7,59 (m, 2H), 7,53–7,49 (m, 2H), 7,29–7,23 (m, 2H), 6,96 (s, 2H, maleimida), 5,91 (br s, 1H), 5,36 (br s, 2H), 4,65–4,50 (m, 4H), 4,44–4,37 (m, 2H), 4,28–4,22 (m, 2H), 4,05–3,95 (m, 4H), 3,60 (t, *J* = 6,6 Hz, 1H), 3,07–3,00 (m, 2H), 2,95–2,88 (m, 2H), 2,68–2,58 (m, 2H), 2,42–2,32 (m, 3H), 1,78–1,62 (m, 4H), 1,51, 1,50, 1,49, 1,48 (4s, 36H), 1,49–1,28 (m, 11H). ^{31}P RMN ($CDCl_3$) δ –15,44 (s), 15,46 (s). HRMS (ESI) exp. *m/z* 1588,5827 (M + Na). $C_{78}H_{99}Cl_2N_9NaO_{17}P_2$ requiere 1588,5903.

5

A una solución de **4** (25 mg, 0,015 mmol) en DCM (0,6 mL) cooled en un baño de hielo se añadió TFA (0,2 mL, 2,61 mmol). La mezcla se agitó en un baño de hielo durante 0,5 h. Se añadió éter y el precipitado resultante se recolectó por filtración y se lavó con acetato de etilo, THF y éter de petróleo para dar **5** (**CBI–CBI LD6**) en forma de un sólido marrón (18 mg, 86%). ^{1}H RMN (DMSO) δ 10,01 (br s, 1H), 8,60 (br s, 2H), 8,16–8,09

(m, 4H), 7,96–7,93 (m, 2H), 7,88–7,58 (m, 8H), 7,46 (t, *J* = 7,7 Hz, 2H), 7,30–7,25 (m, 2H), 6,97 (s, 2H, maleimida), 6,10 (br s, 1H), 5,35 (br s, 2H), 4,60–4,18 (m, 6H), 4,05–3,95 (m, 4H), 3,45–3,29 (m, 5H), 3,04–2,87 (m, 4H), 2,68–2,60 (m, 2H), 2,40–2,30 (m, 4H), 1,72–1,57 (m, 4H), 1,43–1,28 (m, 5H), 1,20–1,07 (m, 3H). ^{31}P RMN (DMSO) δ –5,82 (s). HRMS (ESI) exp. *m/z* 1342,3562 (M + H). $C_{62}H_{68}Cl_2N_9O_{17}P_2$ requiere 1342,3580.

Método de preparación de ADC

Preparación de anticuerpos manipulados genéticamente con cisteína para conjugación mediante reducción y reoxidación

Bajo ciertas condiciones, los anticuerpos manipulados genéticamente con cisteína se pueden hacer reactivos para la conjugación con intermediarios ligador–fármaco de la invención por tratamiento con un agente reductor tal como DTT (reactivo de Cleland, ditiotreitol) o TCEP clorhidrato de tris (2–carboxietil) fosfina; Getz et al (1999) Anal Biochem Vol 273:73–80; Soltec Ventures, Beverly, MA). Los anticuerpos manipulados genéticamente con cisteína monoclonales de longitud completa (TioMabs) expresados en células CHO Gómez et al (2010) Biotechnology y Bioeng. 105(4):748–760; Gómez et al (2010) Biotechnol. Prog. 26:1438–1445) se redujeron, por ejemplo, con aproximadamente un exceso de 50 veces de DTT durante la noche a temperatura ambiente para reducir los enlaces disulfuro que se pueden formar entre los residuos de cisteína recién introducidos y la cisteína presente en el medio de cultivo.

Los aminoácidos de cadena liviana se numeran según Kabat (Kabat et al., *Sequences of proteins of immunological interest*, (1991) 5th Ed., US Dept of Health y Human Service, National Institutes of Health,

Bethesda, MD). Los aminoácidos de la cadena pesada se numeran según el sistema de numeración EU (Edelman et al (1969) Proc. Natl. Acad. of Sci. 63(1):78–85), excepto donde se indique como el sistema de Kabat. Se utilizan abreviaturas de aminoácidos de una sola letra.

Los anticuerpos manipulados genéticamente con cisteína monoclonales de longitud completa (ThioMabs) expresados en células CHO portan aductos de cisteína (cistinas) o están glutationilados en las cisteínas manipuladas genéticamente debido a las condiciones de cultivo de células. Para liberar los grupos tiol reactivos de las cisteínas manipuladas genéticamente, los TioMabs se disuelven en borato de sodio 500 mM y cloruro sódico 500 mM a aproximadamente pH 8,0 y se reducen con aproximadamente 50–100 veces en exceso de TCEP 1 mM (clorhidrato de tris (2–carboxietil) fosfina (Getz et al (1999) Anal Biochem Vol 273:73–80; Soltec Ventures, Beverly, MA). durante aproximadamente 1–2 horas a 37 ºC. Alternativamente, DTT se puede utilizar como agente reductor. La formación de enlaces disulfuro entre cadenas se controló por SDS–PAGE no reductor o mediante la cromatografía en columna de PLRP de HPLC de fase inversa desnaturalizante. El TioMab reducido se diluye y se carga en una columna HiTrap SP FF en acetato de sodio 10 mM, pH 5, y se eluye con PBS que contiene cloruro de sodio 0,3 M, Tris–Cl o 50 mM, pH 7,5 que contiene cloruro de sodio 150 mM.

Los enlaces disulfuro se restablecieron entre los residuos de cisteína presentes en el Mab progenitor mediante la realización de reoxidación. El TioMab reducido eluido se trata con ácido dehidroascórbico 15X o 2 mM (dhAA) a pH 7 durante 3 horas o durante 3 horas en Tris–Cl 50 mM, pH 7,5, o con solución acuosa de sulfato de cobre 2 mM ($CuSO_4$) a temperatura ambiente durante la noche. Se pueden usar otros oxidantes, es decir, agentes de oxidación, y

condiciones oxidantes, que son conocidas en la técnica. La oxidación al aire ambiente también puede ser efectiva. Esta etapa de reoxidación parcial leve forma disulfuros intracatenarios eficientemente con alta fidelidad. El buffer se intercambia por elución sobre resina Sephadex G25 y se eluye con PBS con 1 mM de DTPA. El valor tiol/Ab se verifica mediante la determinación de la concentración de anticuerpo reducido a partir de la absorbancia a 280 nm de la solución y la concentración de tiol mediante la reacción con DTNB (Aldrich, Milwaukee, WI) y la determinación de la absorbancia a 412 nm.

El análisis de cromatografía líquida/espectrometría de masas se realizó en un espectrómetro de masas TSQ Quantum triple cuadrupolo ™ con rango de masa extendida (Thermo Electron, San Jose California). Las muestras se sometieron a cromatografía en una columna microbore PRLP–S®, 1000 A 50mm × 2.1mm, Polymer Laboratories, Shropshire, UK) calentada a 75 ° C. Se usó un gradiente lineal de 30–40% B (solvente A: 0,05% TFA en agua, solvente B: 0,04% TFA en acetonitrilo) y el eluyente se ionizó directamente usando la fuente de electroaspersión. Los datos fueron recogidos por el sistema de datos Xcalibur® y la deconvolución se realizó mediante ProMass® (Novatia, LLC, New Jersey). Antes del análisis LC/MS, los anticuerpos o conjugados de fármaco (50 microgramos) se trataron con PNGasa F (2 unidades/ml; Prozyme, San Leandro, CA) durante 2 horas a 37 °C para eliminar los carbohidratos N–ligados.

Las muestras para cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) se inyectaron en una columna Butil HIC NPR (2,5 micrones de tamaño de partícula, 4,6 mm x 3,5 cm) (Tosoh Bioscience) y se eluyó con un gradiente lineal de 0 a 70% B a 0,8 ml/min (A : sulfato de amonio 1,5 M en fosfato de potasio 50 mM, pH 7, B: fosfato de potasio 50 mM pH 7,

isopropanol 20%). Se utilizó un sistema de HPLC Agilent 1100 series equipado con un detector de longitud de onda múltiple y software ChemStation para resolver y cuantificar especies de anticuerpos con diferentes relaciones de fármacos por anticuerpo. Los Anticuerpos manipulados genéticamente con cisteína de la presente invención se pueden preparar de acuerdo con el método general descrito anteriormente.

Conjugación de los intermediarios de ligador–fármaco a los anticuerpos (procedimiento 1)

Los anticuerpos manipulados genéticamente con cisteína se bloquearon como disulfuros mixtos con glutatión y/o cisteína tal como se expresa en células CHO. Estas cisteínas tenían que ser “desbloqueadas" antes de la conjugación.

El anticuerpo desbloqueado (5–12 mg/ml) en succinato 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM se llevó a 75–100 mM Tris, pH 7,5–8 (usando Tris 1 M). Se añadió cosolvente (DMSO, DMF, DMA o) a la solución de anticuerpo, seguido por ligador–fármaco (en DMSO o DMF) para dar un % de solvente orgánico final de 10–13% y concentración final de ligador–fármaco 2,5 –10X con respecto a la concentración de anticuerpo. Las reacciones se dejaron proceder a temperatura ambiente durante 1–12 horas (hasta que se alcanzó la máxima conjugación). Las reacciones de conjugación se purificaron mediante cromatografía de intercambio catiónico y/o filtración en gel usando columnas desechables (S maxi o Zeba, respectivamente). Se llevó a cabo la purificación adicional mediante filtración en gel preparativa (columnas S200) si el conjugado en bruto se agregó significativamente de acuerdo con la SEC analítica (por ejemplo,> 10%). Los conjugados posteriormente se intercambiaron

con buffer de formulación (His–acetato 20 mM, pH 5,5, sacarosa 240 mM) utilizando filtración en gel o diálisis. Se añadió posteriormente Tween–20 al conjugado purificado hasta alcanzar una concentración final de 0,02%. Las concentraciones de conjugado final variaron desde 2,4 hasta 7,5 mg/ml (% Rendimiento: 34–81% de anticuerpo desbloqueado). Los conjugados se analizaron por LCMS para obtener una medición de la relación de anticuerpo–fármaco (DAR), que varió desde 1,3 hasta 2,1 (promedio: 1,8). También se analizaron los conjugados para determinar la presencia de agregados de alto peso molecular usando SEC analítica (columnas Zenix o Shodex); conjugados purificados finales mostraron la agregación que van desde 0–10%. Los conjugados también se evaluaron para determinar la contaminación de endotoxina, que, en todos los casos, no excedió 1,3 UE/mg. El fármaco libre no conjugado no excedió 1% del conjugado final.

Conjugación de los intermediarios ligador–fármaco a los anticuerpos (procedimiento 2, procedimiento alternativo)

Después de los procedimientos de reducción y reoxidación del ejemplo anterior, el anticuerpo se disuelve en buffer PBS (solución salina regulada con fosfato) y se enfrió en hielo. Un exceso, de aproximadamente 1,5 molar a 20 equivalentes de un intermediario ligador–fármaco con un grupo funcional reactivo con tiol reactivo tales como maleimido o bromo–acetamida, se disuelve en DMSO, se diluye en acetonitrilo y agua, y se añade al anticuerpo reoxidado, reducido y enfriado en PBS. Después de aproximadamente una hora, se añade un exceso de maleimida para detener la reacción y aislar los grupos tiol de anticuerpos que no han reaccionado. La mezcla de conjugación se puede cargar y eluir a través de una columna HiTrap SP FF para eliminar

el exceso de intermediario ligador–fármaco y otras impurezas. La mezcla de reacción se concentra por ultrafiltración centrífuga y el conjugado del fármaco de anticuerpo manipulado genéticamente con cisteína se purifica y desaliniza mediante la elución a través de resina G25 en PBS, se filtra a través de filtros de 0,2 micrones en condiciones estériles y se congela para su almacenamiento.

Los ADCs de la presente invención se pueden preparar de acuerdo con el procedimiento descrito en la sección anterior.

ENSAYOS

Luego se analizaron los ligadores seleccionados y se halló que son activos en ensayos in vitro e in vivo. Los datos de escisión se muestra en la siguiente tabla.

Ensayo de escisión de catepsina B

Como en los ligadores peptídicos, se espera que los ligadores no peptídicos para ADC sean escindibles en el lisosoma con el fin de la liberación adecuada del fármaco. Como organela digestiva de la célula, el lisosoma está enriquecido con algunas proteasas que muestran actividad hidrolítica óptima a un pH ácido. La catepsina B es una proteasa lisosomal representativa y se ha demostrado que contribuye a la activación de los ligadores peptídicos ADC (ref). Como una prueba inicial, se desarrolló un ensayo usando catepsina B purificada para identificar los constructos s ligador–fármaco escindibles que son adecuados para la conjugación con el anticuerpo. La norfloxacina se usó para representar el componente de fármaco del ligador–fármaco. El porcentaje de escisión con respecto a los péptidos de control (como Val–Cit) se midió en un punto de tiempo dado, así como los parámetros cinéticos de la reacción de escisión (Km y Vmax). La descripción

detallada del ensayo se muestra a continuación. A partir de este ensayo, se identificó una variedad de ligadores proteolíticamente activos y estructuralmente diversos y posteriormente se usaron en la fabricación de ADC.

La actividad de escisión de la catepsina B utilizando ligadores–fármacos experimentales como sustrato se midió mediante el control de la liberación de norfloxacina usando LC/MS. Las diferentes concentraciones de ligadores–fármacos (diluciones seriadas de 3 veces) se incubaron en reacciones de 20 uL que contienen catepsina B 20 nM (EMD Millipore cat. # 219364, hígado humano), MES 10 mM pH 6,0, DTT 1 mM, CHAPS 0,03%, y el estándar interno norfloxacina–d5 25 nM (Santa Cruz Biotechnology, cat. #sc–301482). Las reacciones se incubaron durante 1 hora a 37 ° C, seguido por la adición de 60 uL de ácido fórmico 2% para inactivar las reacciones. Las muestras se analizaron mediante la inyección de 2 uL de las reacciones detenidas en una columna Waters Acquity UPLC BEH Fenilo (2,1 mm x 50 mm, Waters cat # 186002884.). Las muestras se purificaron usando un gradiente lineal de 2 minutos (0% a 80%) de acetonitrilo, ácido fórmico 0,1% en un Water Acquity UPLC. La norfloxacina y el estándar interno norfloxacina–d5 25 se detectaron utilizando un espectrómetro de masas triple cuadrupolo AB Sciex QTrap 5500 que opera en modo MRM positivo (Norfloxacina 320→233 m/z, Norfloxacina–d5 325 →233 m/z). La norfloxacina cuantificada (normalizado con estándar interno) se representó frente a la concentración de ligador–fármaco, y el gráfico resultante fue una curva ajustada con un ajuste de Michaelis–Menten usando el software GraphPad Prism para las constantes cinéticas de Km y Vmax.

Ensayo de proliferación celular *in vitro*

La eficacia de ADC se midió mediante un ensayo de proliferación celular que emplea el protocolo siguiente (ensayo de viabilidad celular luminiscente CELLTITER GLO™, Technical Bulletin TB288; Mendoza et al (2002) Cancer Res. 62:5485–5488):

1. Una alícuota de 100 μl de cultivo de células que contienen aproximadamente 10^4 células (SKBR–3, BT474, MCF7 o MDA–MB–468) en el medio se depositó en cada pocillo de una placa de paredes opacas de 96 pocillos.

2. Se prepararon pocillos de control que contienen medio y sin células.

3. Se añadió ADC a los pocillos experimentales y se incubó durante 3–5 días.

4. Las placas se equilibraron a temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos.

5. Se añadió un volumen de reactivo CELLTITER GLO™ igual al volumen de medio de cultivo celular presente en cada pocillo.

6. Los contenidos se mezclaron durante 2 minutos en un agitador orbital para inducir la lisis celular.

7. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos para estabilizar la señal de luminiscencia.

8. La luminiscencia se registró e informó en gráficos como RLU = unidades relativas de luminiscencia.

Los datos se graficaron como la media de la luminiscencia para cada conjunto de replicados, con barras de error de la desviación estándar. El protocolo es una modificación de CELLTITER GLO™ Luminescent Cell

Medio: SK–BR–3 crece en el 50/50/10% FBS/glutamina/250 μg/mL

de G–418 OVCAR–3 crece en RPMI/20% FBS/glutamina

Ensayo *in vivo*

1. La eficacia de los conjugados de anticuerpo–fármaco anti–CD33 (ADCs) se investigó en un modelo de xenoinjerto de ratón de HL–60 o EOL–1 (leucemia mieloide aguda humana). La línea celular HL–60 se obtuvo de ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA) y la línea celular EOL–1 se originó a partir de DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures; Braunschweig, Alemania).

Ratones SCID CB–17 hembra (Laboratorios Charles River, Hollister, CA) se inocularon subcutáneamente en el área del flanco con cinco millones de células de HL–60 o EOL–1. Cuando los tumores de xenoinjertos alcanzaron un volumen tumoral promedio de 100–300 mm3 (denominado como día 0), los animales se asignaron aleatoriamente en grupos de 7–10 ratones cada uno y recibieron una única inyección intravenosa de los ADCs. Aproximadamente 4 horas antes de la administración de ADCs, los animales se dosificaron por vía intraperitoneal con una cantidad en exceso (30 mg/kg) de anticuerpo de control anti–gD para bloquear posibles sitios de unión no específica de anticuerpos en las células tumorales. Los tumores y los pesos corporales de los ratones se midieron 1–2 veces a la semana durante todo el estudio. Los ratones se sacrificaron inmediatamente cuando la pérdida de peso corporal fue> 20% de su peso inicial. Todos los animales fueron sacrificados antes que los tumores alcanzaron 3.000 mm3 o mostraran señales de ulceración inminente.

2. La eficacia de los conjugados de anticuerpo–fármaco (ADCs) anti–Napi2B se investigó en un modelo de xenoinjerto de ratón de OVCAR3–X2.1 (cáncer de ovario humano). La línea celular OVCAR3 se

obtuvo de ATCC (American Type Culture Collection; Manassas, VA) y una sub–línea de OVCAR3–X2.1 se generó en Genentech para un crecimiento óptimo en ratones.

Los ratones SCID CB–17 beige hembra (Laboratorios Charles River, Hollister, CA) se inocularon cada uno en el área de la almohadilla de grasa mamaria torácica con diez millones de células OVCAR3–X2.1. Cuando los tumores de xenoinjertos alcanzaron un volumen tumoral promedio de 100–300 mm3 (denominado como día 0), los animales se asignaron aleatoriamente en grupos de 7–10 ratones cada uno y recibieron una única inyección intravenosa de los ADCs. Los tumores y los pesos corporales de los ratones se midieron 1–2 veces a la semana durante todo el estudio. Los ratones se sacrificaron inmediatamente cuando la pérdida de peso corporal fue> 20% de su peso inicial. Todos los animales fueron sacrificados antes que los tumores alcanzaron 3.000 mm3 o mostraran señales de ulceración inminente.

3. La eficacia de los conjugados anticuerpo–fármaco anti–CD22 (ADC) se investigó en un modelo de xenoinjerto de ratón de BJAB–luc (linfoma de Burkitt humano) o WSU–DLCL2 (linfoma difuso de células B grandes humano). La línea de células BJAB se obtiene de DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures; Braunschweig, Alemania), y una sub–línea BJAB luc se genera en Genentech para expresar de forma estable el gen de la luciferasa. La línea celular WSU–DLCL2 también se origina de DSMZ.

Ratones SCID CB–17 hembra (Laboratorios Charles River, Hollister, CA) se inocularon subcutáneamente en el área del flanco con 20 millones de células de BJAB–luc o WSU–DLCL2. Cuando los tumores de xenoinjertos alcanzaron un volumen tumoral promedio de 100–300 mm3 (denominado como día 0), los animales se asignaron

aleatoriamente en grupos de 7–10 ratones cada uno y recibieron una única inyección intravenosa de los ADCs. Los tumores y los pesos corporales de los ratones se midieron 1–2 veces a la semana durante todo el estudio. Los ratones se sacrificaron inmediatamente cuando la pérdida de peso corporal fue> 20% de su peso inicial. Todos los animales fueron sacrificados antes que los tumores alcanzaron 3.000 mm3 o mostraran señales de ulceración inminente.

4. La eficacia de los conjugados de anticuerpo–fármaco anti–Her2 (ADCs) se investigó en un modelo de aloinjerto de ratón de MMTV–HER2 Founder #5 (tumor mamario murino). El modelo de MMTV–HER2 Founder #5 FO5) (desarrollado en Genentech) es un modelo de ratón transgénico en el que el gen HER2 humano, bajo la regulación transcripcional del promotor del virus del tumor mamario murino (MMTV–HER2), se sobreexpresa en el epitelio mamario. La sobreexpresión causa el desarrollo espontáneo de tumores de mama que sobreexpresan el receptor HER2 humano. El tumor mamario de uno de los animales founder (founder #5, Fo5) se ha propagado en ratones FVB (Charles River Laboratories) mediante trasplante seriado de los fragmentos tumorales.

Para los estudios de eficacia, el tumor mamario transgénico FO5 se transplanta quirúrgicamente en la almohadilla de grasa mamaria torácica de ratones nu/nu hembras (Charles River Laboratories, Hollister, CA) como fragmentos de tumor de aproximadamente 2 mm x 2 mm de tamaño. Cuando los tumores alcanzaron de aloinjertos un volumen tumoral promedio de 100–300 mm3 (denominado como día 0), los animales se asignaron aleatoriamente en grupos de 7–10 ratones cada uno y recibieron una única inyección intravenosa de los ADCs. Los tumores y los pesos corporales de los ratones se midieron 1–2 veces a

la semana durante todo el estudio. Los ratones se sacrificaron inmediatamente cuando la pérdida de peso corporal fue> 20% de su peso inicial. Todos los animales fueron sacrificados antes que los tumores alcanzaron 3.000 mm3 o mostraran señales de ulceración inminente.

Datos biológicos

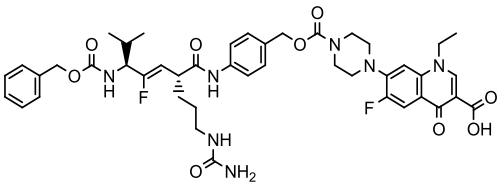
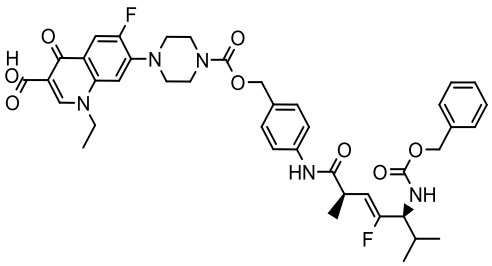
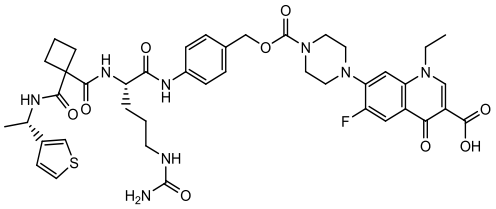
Estructuras de compuestos fármaco–ligador y los datos de escisión de la catepsina B

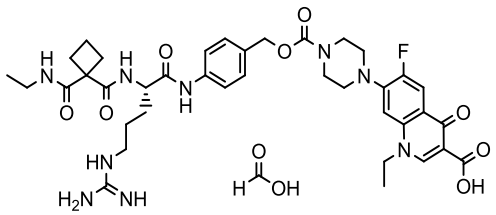
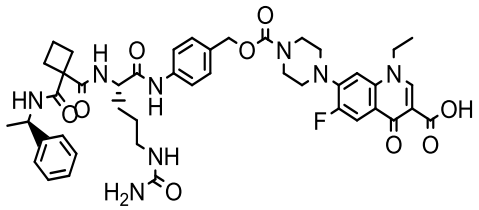
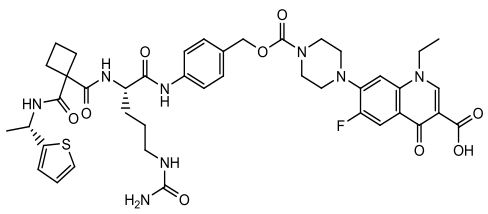
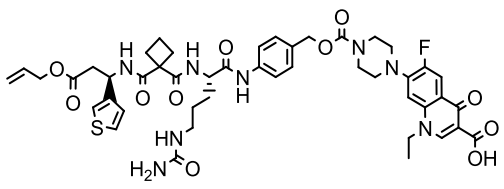
Los siguientes compuestos de ligador–fármaco se pueden generalizar como la siguiente fórmula

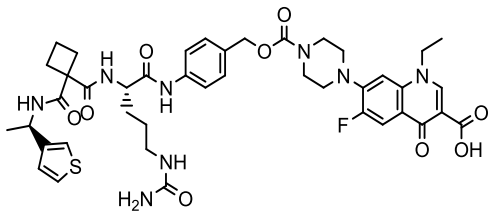
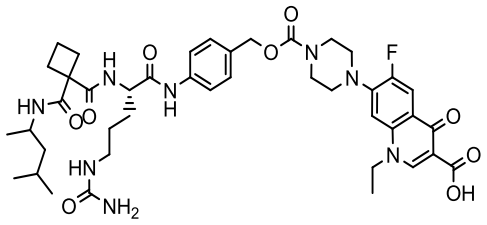
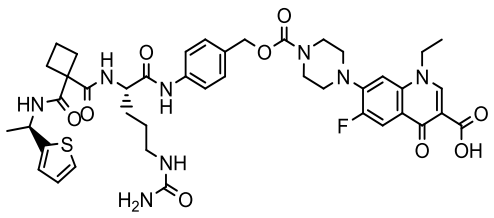
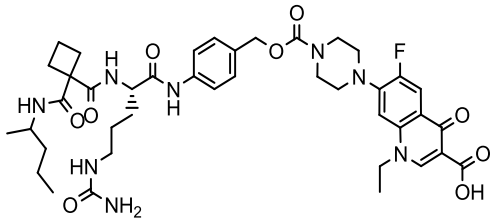
Cap–PM–Sp–T

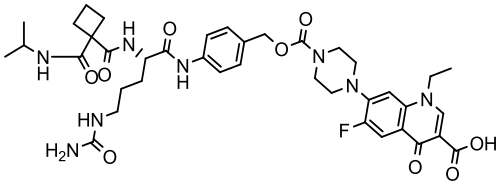
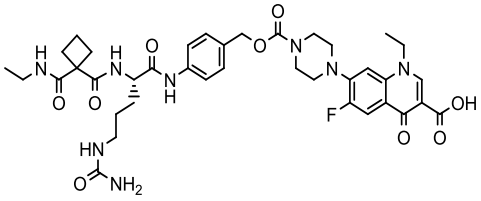
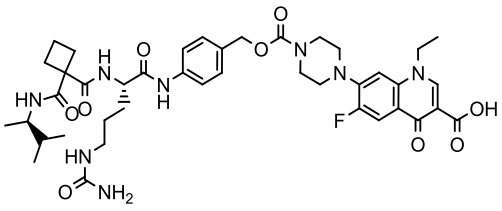
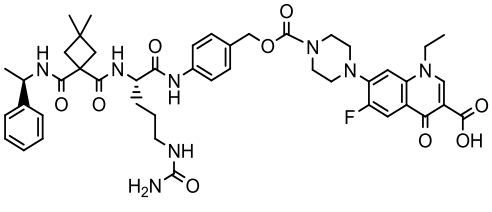
donde Cap es un grupo de terminación que protege el grupo amino en el ensayo de catepsina B (por ejemplo, CBZ y etilo); PM es un resto peptidomimético; sp es un espaciador, T es sustituto de resto de fármaco.

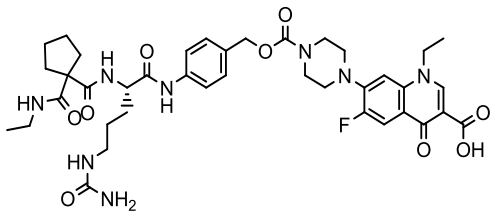
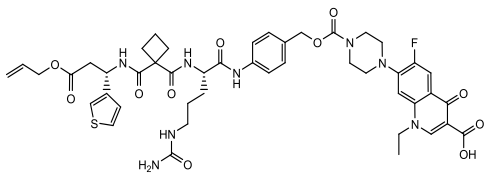
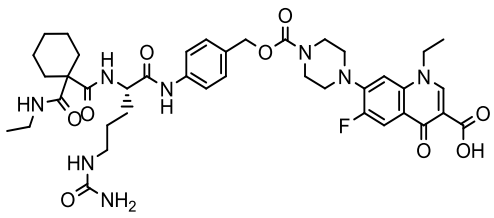
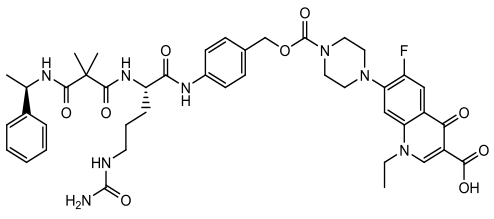
Los datos de escisión CAT B en la siguiente tabla muestran las tasas de escisión de los ligadores no peptídicos de las presentes invenciones que son comparables con los ligadores peptídicos (40–56). Los ligadores peptídicos han sido ampliamente utilizados en conjugados de fármaco–anticuerpo para liberar el resto de fármaco activo; por lo tanto, se espera que los conjugados que comprenden los presentes ligadores no peptídicos puedan lograr resultados similares in vitro e in vivo.

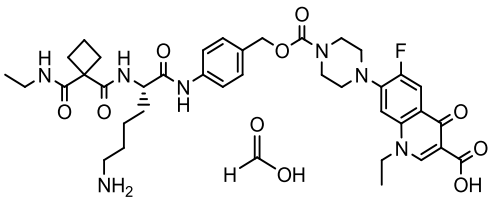
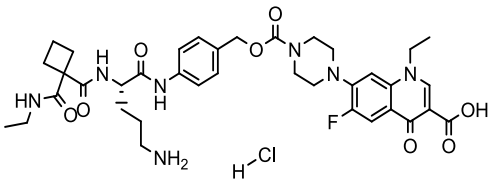
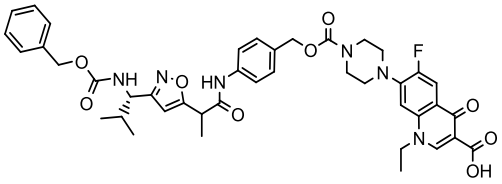
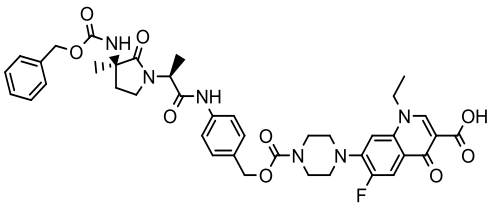
Ejemplo	Estructura	Series	Clivaje de CATBMS (Vmax/Km)	P3	Clivaje de CATBMS (Vmax/Km) – con corrección de fondo	Estéreo
1		F–olefina	0,0050	Cbz	0,001095	SKS
2		F–olefina	0,00132	Cbz	0,000189	SKS
3		ciclobutano–1,1–dicarbonilo	0,119	no Cbz	0,031021	SUS

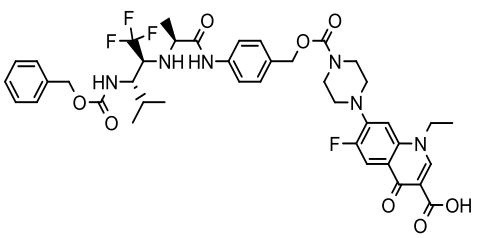
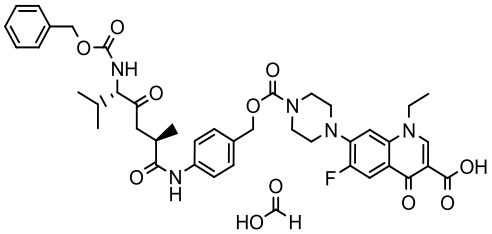
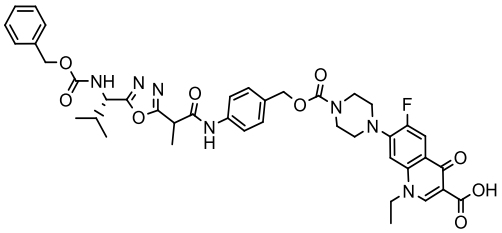
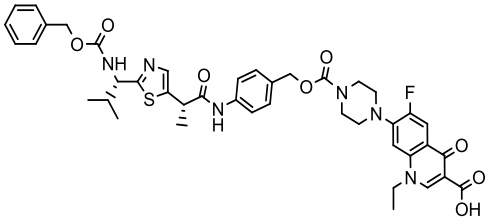
4		ciclobutano–1,1–dicarbonilo	0,105	no Cbz	0,023418	SKS
5		ciclobutano–1,1–dicarbonilo	0,072	no Cbz	0,014058	SKS
6		ciclobutano–1,1–dicarbonilo	0,065	no Cbz	0,019174	SUS
7		ciclobutano–1,1–dicarbonilo	0,0421	no Cbz	0,028017	SUS

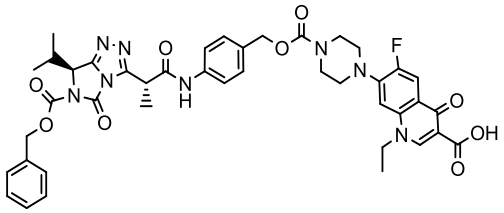
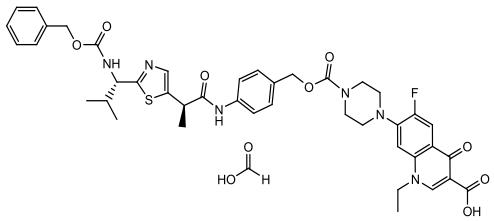
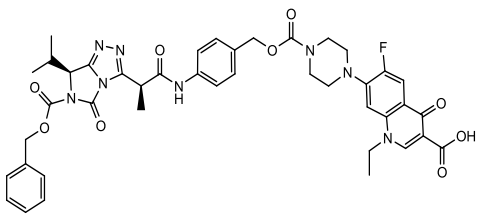
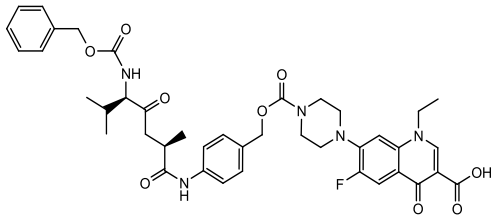
8		ciclobutano–1,1–dicarbonilo	0,023	no Cbz	0,004154	SUS
9		ciclobutano–1,1–dicarbonilo	0,023	no Cbz	0,004148	MD
10		ciclobutano–1,1–dicarbonilo	0,017	no Cbz	0,004573	SUS
11		ciclobutano–1,1–dicarbonilo	0,014	no Cbz	0,002728	MD

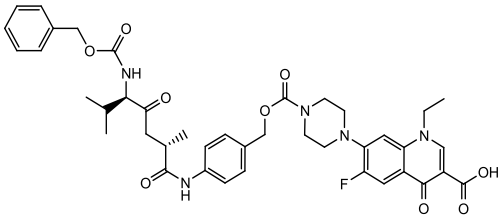
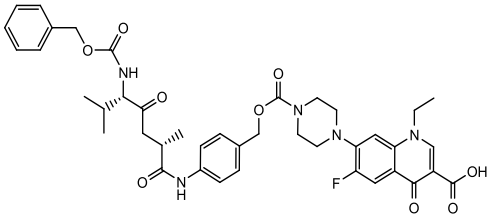
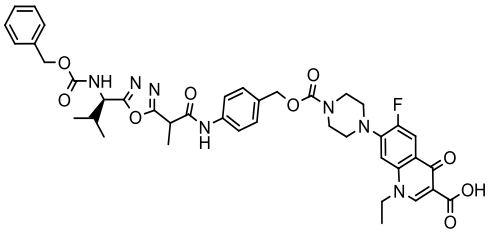
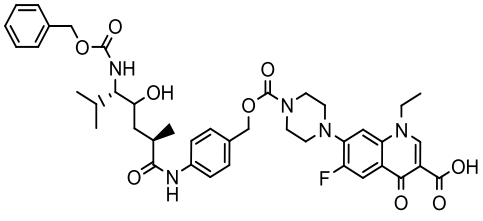
12		ciclobutano–1,1–dicarbonilo	0,0139	no Cbz	0,005125	SKS
13		ciclobutano–1,1–dicarbonilo	0,0101	no Cbz	0,003088	SKS
14		ciclobutano–1,1–dicarbonilo	0,0090	no Cbz	0,003064	SKS
15		ciclobutano–1,1–dicarbonilo	0,00628	no Cbz	0,002777	SKS

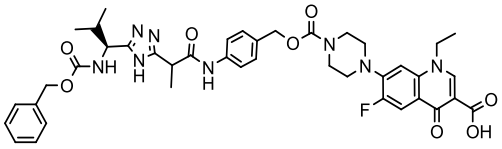
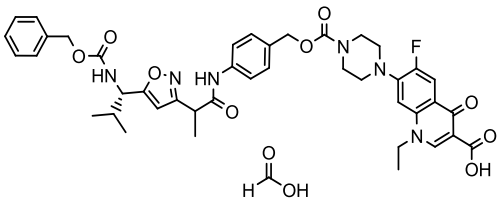
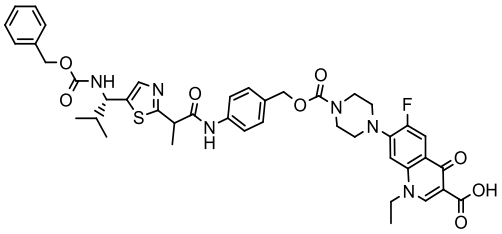
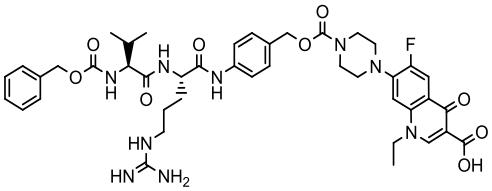
16		ciclobutano–1,1–dicarbonilo	0,0060	no Cbz	0,001749	SKS
17		ciclobutano–1,1–dicarbonilo	0,00295	no Cbz	0,002502	SUS
18		ciclobutano–1,1–dicarbonilo	0,000993	no Cbz	0,000904	SKS
19		ciclobutano–1,1–dicarbonilo	0,000409	no Cbz	0,000823	SKS

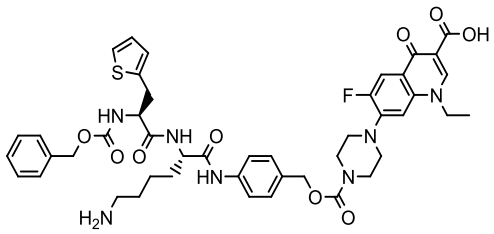
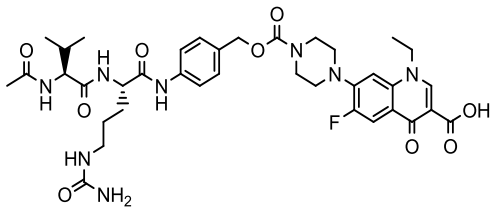
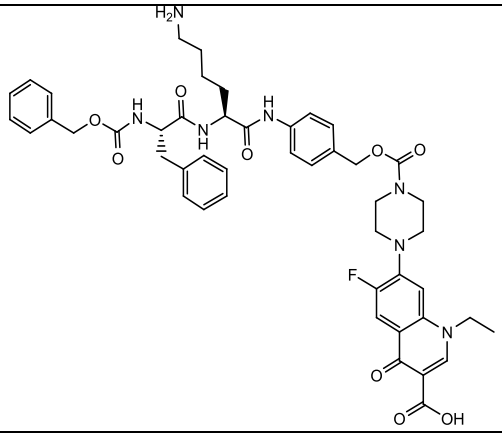
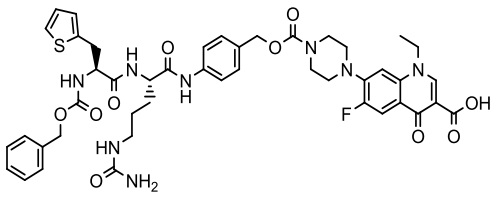
20		ciclobutano–1,1–dicarbonilo		no Cbz	0,004020	SKS
21		ciclobutano–1,1–dicarbonilo		no Cbz		SKS
22		isoxazol	0,000185	Cbz	0,000426	MD
23		otros		Cbz	0,000094	SKS

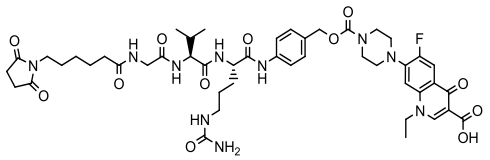
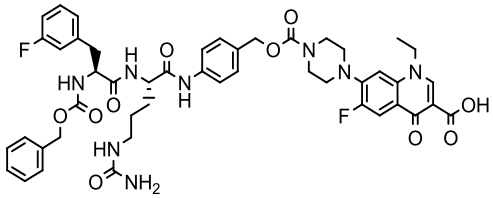
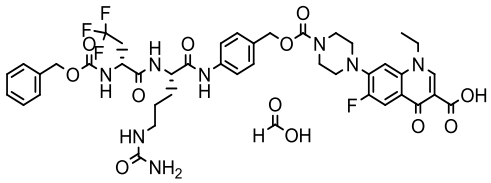
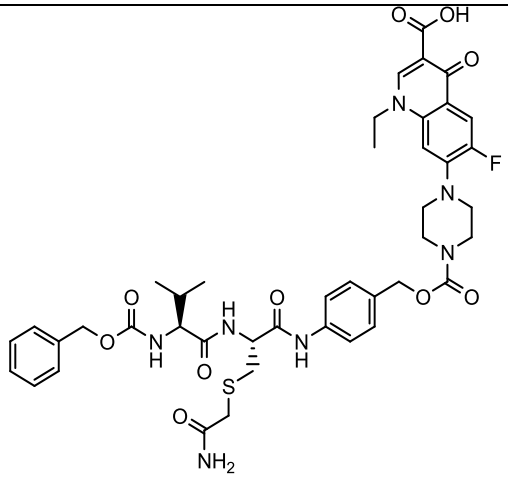
24		otros		Cbz		SUS
25		otros		Cbz		SUS
26		otros		Cbz		MD
27		otros		Cbz		SUS

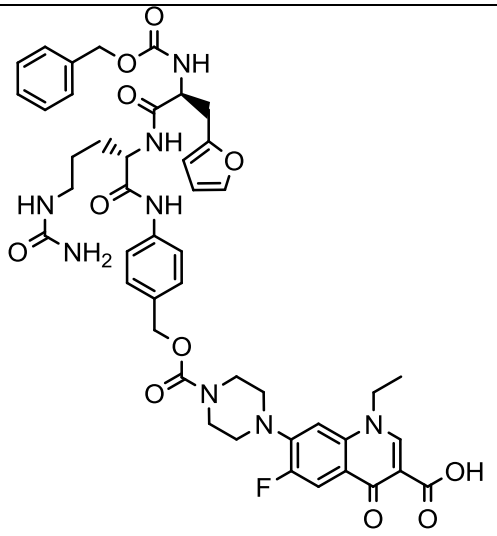
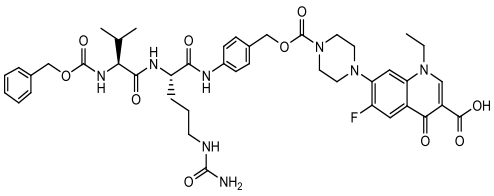
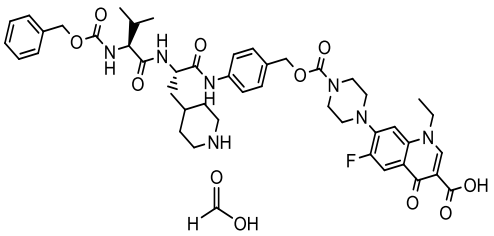
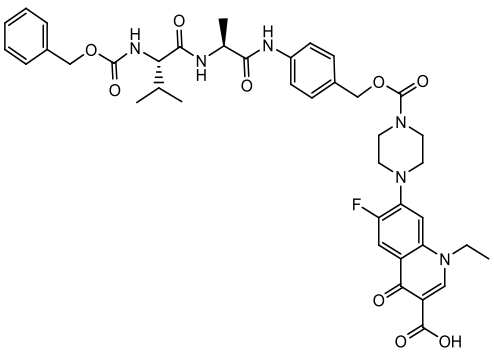
28		otros		Cbz		SUS
29		otros		Cbz	0,000047	SUS
30		otros		Cbz		SUS
31		otros		Cbz		SUS

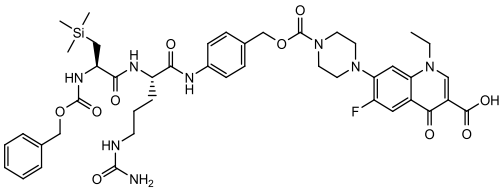
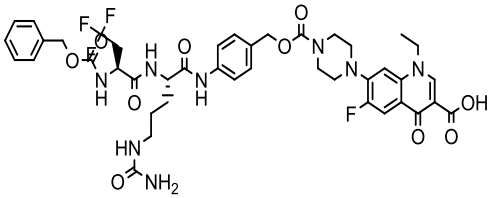
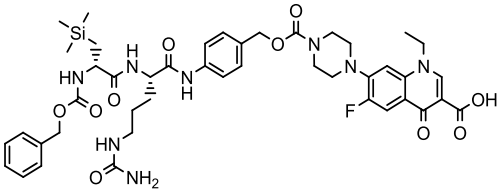
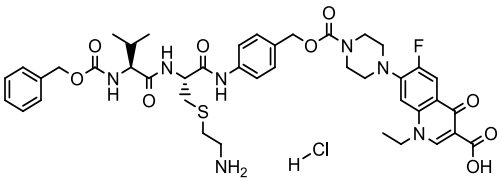
32		otros		Cbz		SUS
33		otros		Cbz	0,000013	SUS
34		otros		Cbz		ME
35		otros		Cbz	0,009123	MD

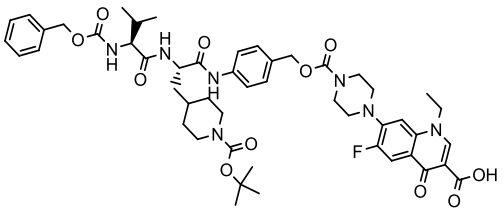
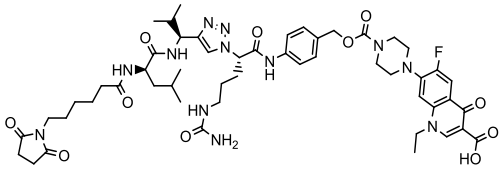
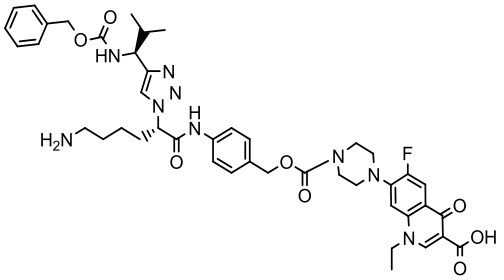
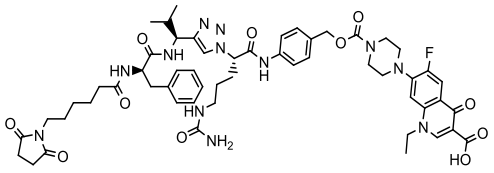
36		otros		Cbz	0,000014	MD
37		otros		Cbz	0,000054	MD
38		otros		Cbz		MD
39		péptido	0,356	Cbz	0,375066	SKS

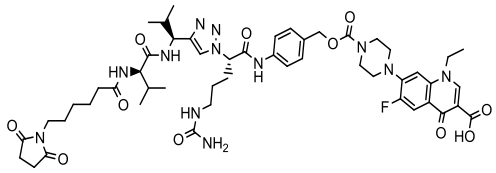
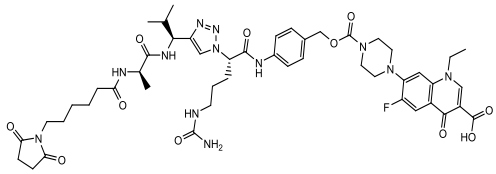
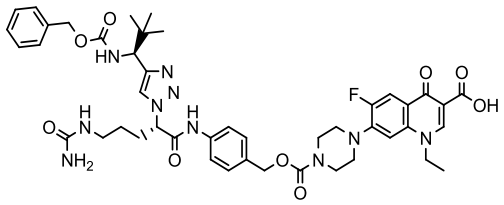
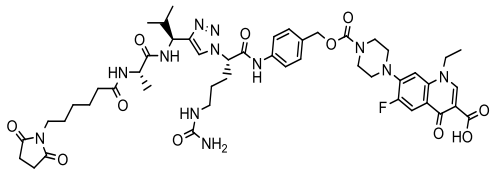
40		péptido	0,319	Cbz	0,257792	SKS
41		péptido	0,26	no Cbz	0,101536	SKS
42		péptido	0,245	Cbz		SKS
43		péptido	0,224	Cbz	0,032208	SKS

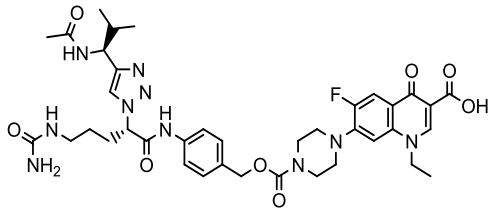
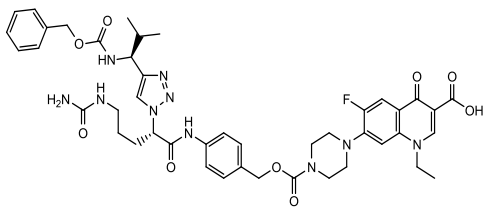
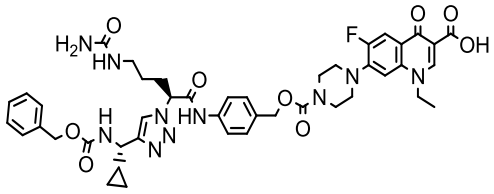
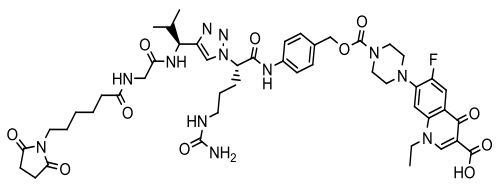
44		péptido	0,205	no Cbz	0,118705	SKS
45		péptido	0,204	Cbz	0,021417	SKS
46		péptido	0,204	Cbz	0,041089	SKS
47		péptido	0,168	Cbz	0,037286	SKS

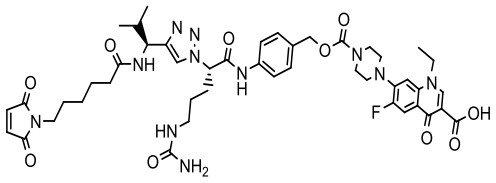
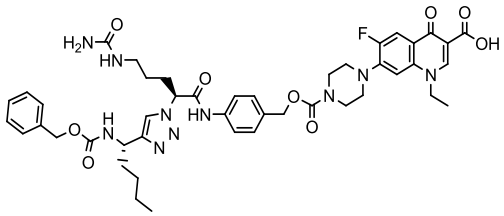
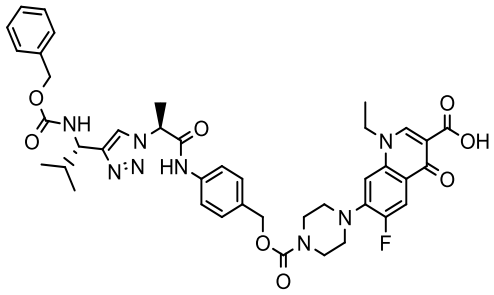
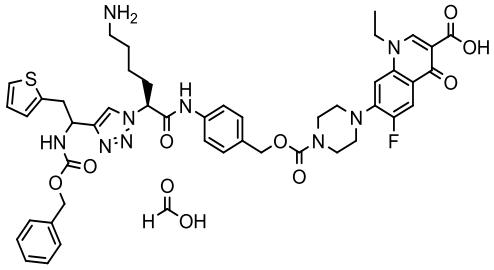
48		péptido	0,165	Cbz	0,068356	SKS
49		péptido	0,135	Cbz	0,041791	SKS
50		péptido	0,117	Cbz	0,025314	SKS
51		péptido	0,0786	Cbz	0,014192	SKS

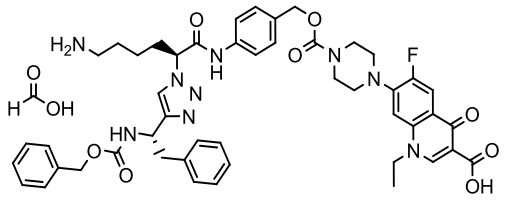
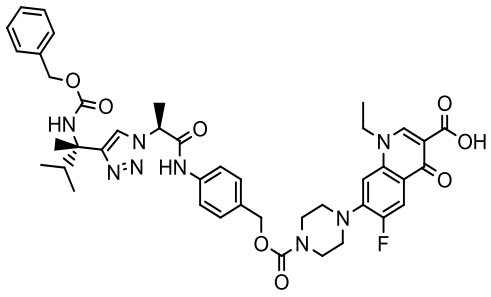
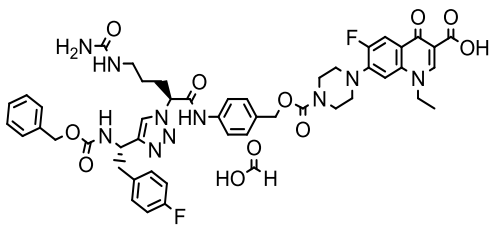
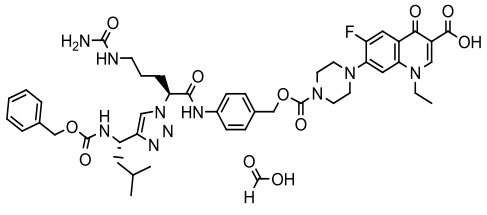
52		péptido	0,0261	Cbz	0,005928	SUS
53		péptido	0,00262	Cbz	0,000848	SKS
54		péptido	0,00218	Cbz	0,000186	SUS
55		péptido		Cbz	0,002961	SKS

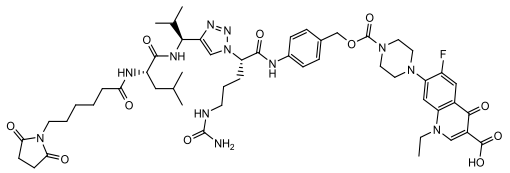
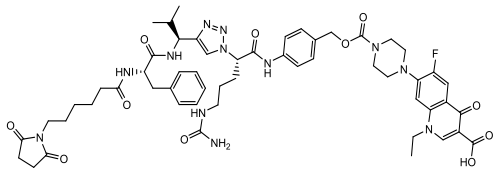
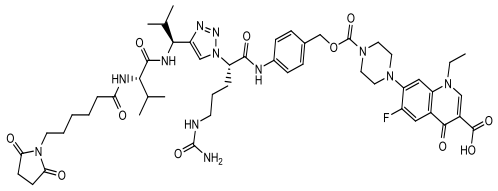
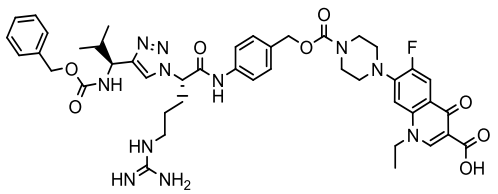
56		péptido		Cbz		SKS
57		triazol	0,036	no Cbz	0,007780	SUS
58		triazol	0,0176	Cbz	0,003519	SKS
59		triazol	0,013	no Cbz	0,003849	SUS

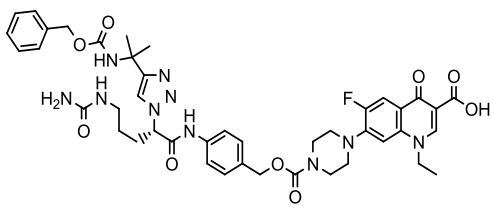
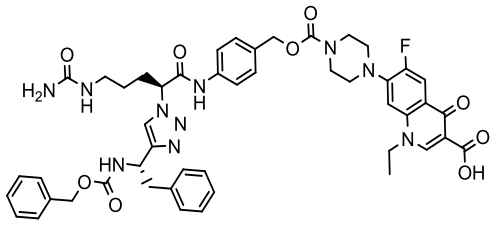
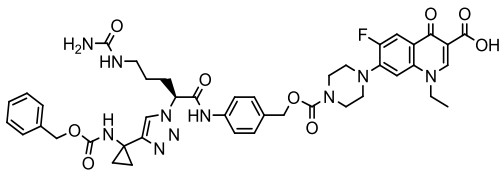
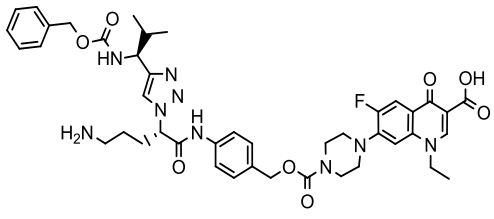
60		triazol	0,010	no Cbz	0,004285	SUS
61		triazol	0,0050	no Cbz	0,003133	SUS
62		triazol	0,00467	Cbz	0,000281	SKS
63		triazol	0,0030	no Cbz	0,000638	SUS

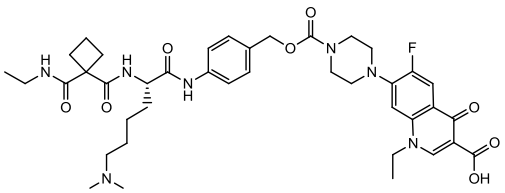
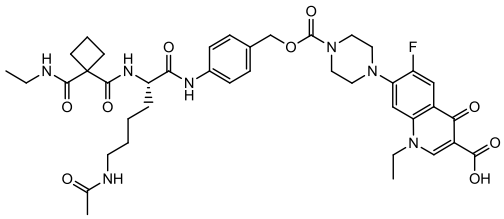
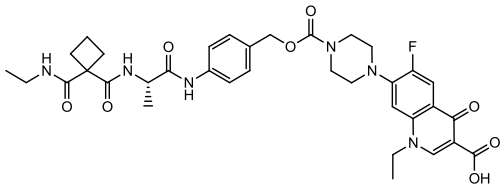
64		triazol	0,00273	no Cbz		SKS
65		triazol	0,00272	Cbz	0,000199	SKS
66		triazol	0,00218	Cbz	0,000169	SKS
67		triazol	0,0020	no Cbz	0,000245	SKS

68		triazol	0,0012		0,001601	SKS
69		triazol	0,000852	Cbz		SKS
70		triazol	0,000603	Cbz		SKS
71		triazol	0,000571	Cbz	0,000156	ME

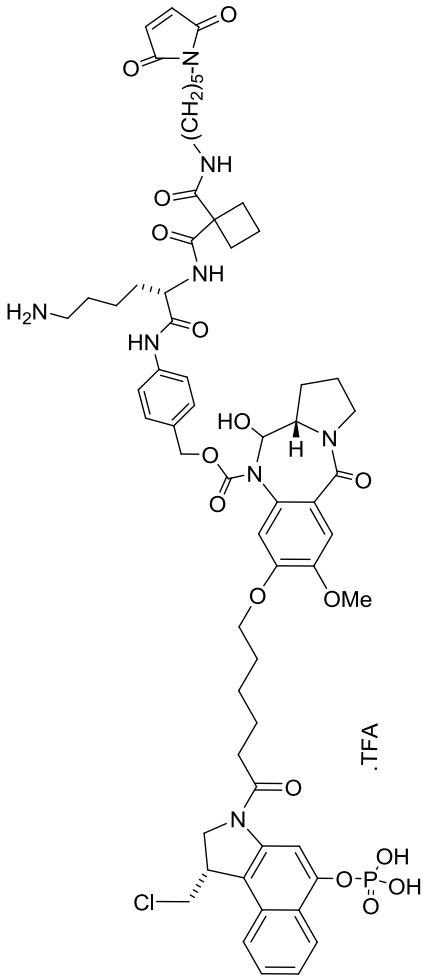
72		triazol	0,000437	Cbz	0,000108	SKS
73		triazol	0,000241	Cbz	0,000059	SKS
74		triazol	0,000195	Cbz		SKS
75		triazol	0,000152	Cbz		SKS

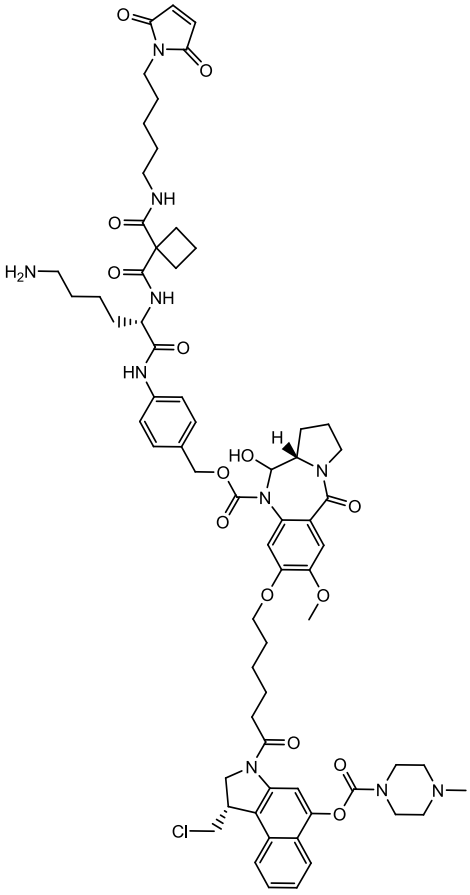
76		triazol	0,0	no Cbz	0,000138	SUS
77		triazol	0,0	no Cbz	0,000022	SUS
78		triazol	0,0	no Cbz		SUS
79		triazol	0,0	Cbz	0,005698	SKS

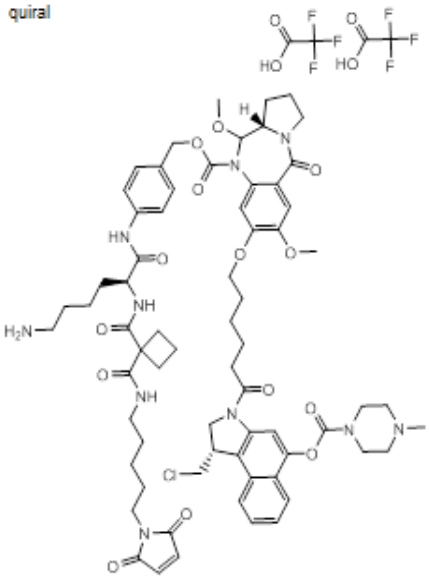
80		triazol		Cbz		SKS
81		triazol		Cbz	0,000019	SKS
82		triazol		Cbz		SKS
83		triazol		Cbz		SKS

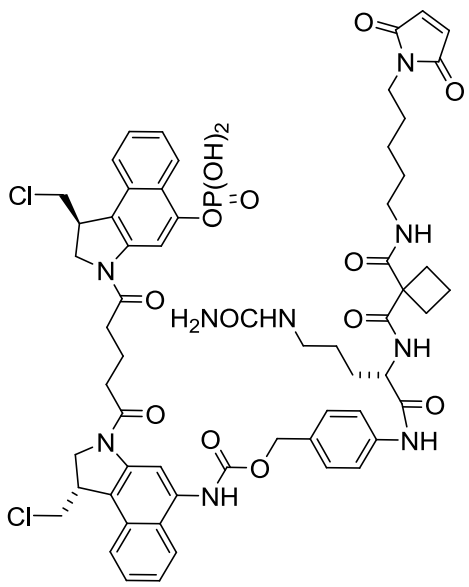
84		ciclobutano–1,1–dicarbonilo		no Cbz	0,009691	SKS
85		ciclobutano–1,1–dicarbonilo		no Cbz	0,001715	SKS
86		ciclobutano–1,1–dicarbonilo		no Cbz	0,007420	SKS

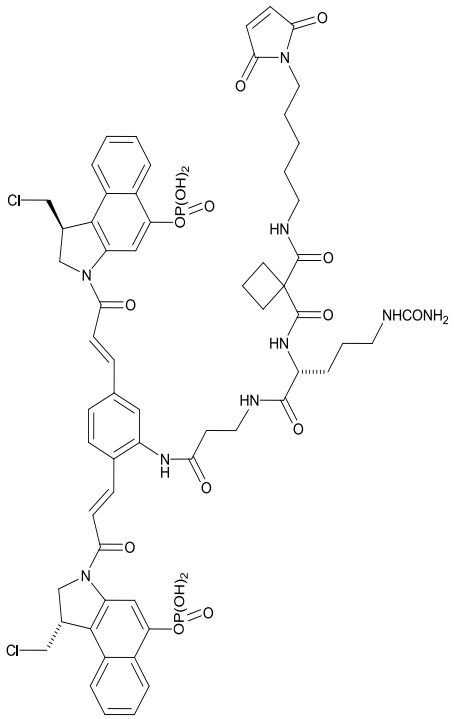
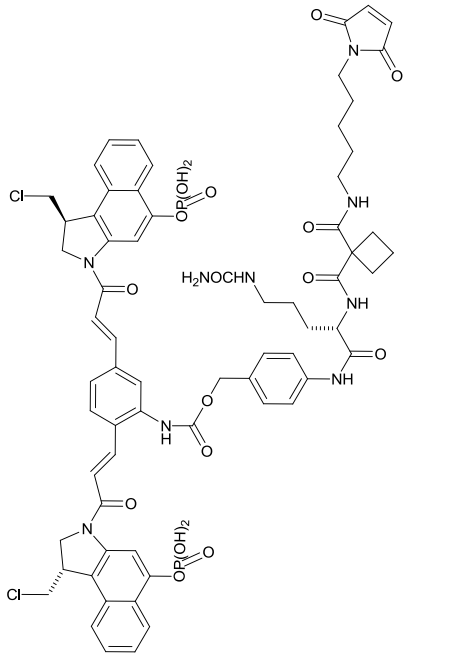
Estructuras de ligador–fármaco ADC

Compuesto de ligador–fármaco	ADC correspondiente	Estructura	Nombre
CBI–PBD LD1			8–(6–((S)–1–(clorometil)–5–(fosfonooxi)–1H–benzo[e]indol–3(2H)–il)–6–oxohexiloxi)–11–hidroxi–7–metoxi–5–oxo–2,3,11,11a–tetrahidro–1H–benzo[e]pirrolo[1,2–a][1,4]diazepin–10(5H)–carboxilato de (11aS)–4–((S)–6–amino–2–(1–(5–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)pentilcarbamoil)ciclobutancarboxamido)hexanamido)bencilo

CBI–PBD LD2	NaPi2b CBI–PBD ADC2–1 y CD33 CBI–PBD ADC2–2		(6aS)–3–[6–[(1S)–1–(clorometil)–5–(4–metilpiperazin–1–carbonil)oxi–1,2–dihidrobenzo[e]indol–3–il]–6–oxo–hexoxi]–6–hidroxi–2–metoxi–11–oxo–6a,7,8,9–tetrahidro–6H–pirrolo[2,1–c][1,4]benzodiazepin–5–carboxilato de [4–[[(2S)–6–amino–2–[[1–[5–(2,5–dioxopirrol–1–il)pentilcarbamoil]ciclobutancarbonil]amino]hexanoil]amino]fenil]metilo

CBI–PBD LD3	NaPi2b CBI–PBD ADC3–1 y CD33 CBI–PBD ADC3–2		(6aS)–3–[6–[(1S)–1–(clorometil)–5–(4–metilpiperazin–1–carbonil)oxi–1,2–dihidrobenzo[e]indol–3–il]–6–oxo–hexoxi]–2,6–dimetoxi–11–oxo–6a,7,8,9–tetrahidro–6H–pirrolo[2,1–c][1,4]benzodiazepin–5–carboxilato de [4–[[(2S)–6–amino–2–[[1–[5–(2,5–dioxopirrol–1–il)pentilcarbamoil]ciclobutancarbonil]amino]hexanoil]amino]fenil]metilo; ácido 2,2,2–trifluoroacético

CBI–CBI LD4			(S)–1–(clorometil)–3–(5–((S)–1–(clorometil)–5–(fosfonooxi)–1H–benzo[e]indol–3(2H)–il)–5–oxopentanoil)–2,3–dihidro–1H–benzo[e]indol–5–ilcarbamato de4–((S)–2–(1–(5–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)pentilcarbamoil)ciclobutancarboxamido)–5–ureidopentanamido) bencilo

CBI–CBI LD5	anti–Napi2b 10H1, 11,4B LC K149C (CBI–CBI LD5) y anti–CD22 10F4v3 LC K149C (CBI–CBI LD5)		2,5–bis((E)–3–((S)–1–(clorometil)–5–(fosfonooxi)–1H–benzo[e]indol–3(2H)–il)–3–oxoprop–1–enil)fenilcarbamato de 4–((S)–2–(1–(5–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)pentilcarbamoil)ciclobutancarboxamido)–5–ureidopentanamido) bencilo
CBI–CBI LD6	anti–Napi2b 10H1, 11,4B LC K149C (CBI–CBI LD6) /		2,5–bis((E)–3–((S)–1–(clorometil)–5–(fosfonooxi)–1H–benzo[e]indol–3(2H)–il)–3–oxoprop–1–enil)fenilcarbamato de 4–((S)–2–(1–(5–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–

	anti–CD2210F4v3 LCK149C (CBI–CBI LD6)		1–il)pentilcarbamoil)ciclobutancarboxamido)–5–ureidopentanamido)bencilo

SECUENCIAS

Anticuerpo humanizado NaPi2b:

En una forma de realización, el anticuerpo NaPi2b de ADCs de la presente invención comprende tres regiones hipervariables de cadena liviana y tres regiones hipervariable de cadena pesada (SEQ ID NO:1–6), cuyas secuencias se muestran más abajo.

En una forma de realización, el anticuerpo NaPi2b de ADCs de la presente invención comprende la secuencia de cadena liviana variable de SEQ ID NO: 7 y la secuencia de cadena pesada variable de SEQ ID NO: 8

En una forma de realización, el anticuerpo NaPi2b de ADCs de la presente invención comprende la secuencia de cadena liviana de SEQ ID NO: 9 y la secuencia de cadena pesada de SEQ ID NO: 10

10H1,11,4B HVR–L1	RSSETLVHSSGNTYLE	Seq ID No: 1
10H1,11,4B HVR–L2	RVSNRFS	Seq ID No: 2
10H1,11,4B HVR–L3	FQGSFNPLT	Seq ID No: 3
10H1,11,4B HVR–H1	GFSFSDFAMS	Seq ID No: 4
10H1,11,4B HVR–H2	ATIGRVAFHTYYPDSMKG	Seq ID No: 5
10H1,11,4B HVR–H3	ARHRGFDVGHFDF	Seq ID No: 6
10H1,11,4B V_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSETLVHSSGNTYLEWYQQKPGKAPKLLIYRVSNRFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCFQGSFNPLTFGQGTKVEIKR	SEQ ID NO: 7
10H1,11,4B V_H	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSDFAMSWVRQAPGKGLEWVATIGRVAFHTYYPDSMKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHRGFDVGHFDFWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO: 8
10H1,11,4B	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSETLVHSSGNTYLEWYQQKPGKAPKLLIYRVSNRFSGVPSRFSGSGSGTD	SEQ ID

cadena liviana	FTLTISSLQPEDFATYYCFQGSFNPLTFGQGTKVEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	NO: 9
10H1,11,4B cadena pesada	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSDFAMSWV RQAPGKGLEWVATIGRVAFHTYYPDSMKGRFTISRDNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHRGFDVGHFDFWGQ GTLVTVSSCSTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	SEQ ID NO: 10

Anticuerpo humanizado anti–CD33:

En una forma de realización, el anticuerpo anti–CD33 de ADCs de la presente invención comprende tres regiones hipervariable de cadena liviana y tres regiones hipervariable de cadena pesada, cuyas secuencias (SEQ ID NO:11–16) se muestran a continuación

En una forma de realización, el anticuerpo anti–CD33 de ADCs de la presente invención comprende la secuencia de cadena liviana variable de SEQ ID NO: 17 y la secuencia de cadena pesada variable de SEQ ID NO: 18

15G15,33 –HVR L1	RSSQSLLHSNGYNYLD	SEQ ID NO:11
15G15,33 –HVR L2	LGVNSVS	SEQ ID NO:12
15G15,33 –HVR L3	MQALQTPWT	SEQ ID NO:13
15G15,33 –HVR H1	NHAIS	SEQ ID NO:14
15G15,33 –HVR H2	GIIPIFGTANYAQKFQG	SEQ ID NO:15
15G15,33 –HVR H3	EWADVFDI	SEQ ID NO:16
15G15,33 V_L	EIVLTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGVNSVSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPWTFGQGTKVEIK	SEQ ID NO:17
15G15,33 V_H	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGIFSNHAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAFMELSSLRSEDTAVYYCAREWADVFDIWGQGTMVTVSS	SEQ ID NO:18

En una forma de realización, el anticuerpo anti–CD33 de ADCs de la presente invención comprende la secuencia de cadena liviana de SEQ ID NO: 19 y la secuencia de cadena pesada de SEQ ID NO: 20

En una forma de realización, el anticuerpo anti–CD33 de ADCs de la presente invención comprende tres regiones hipervariable de cadena liviana y tres regiones hipervariable de cadena pesada, cuyas secuencias (Seq ID NO: 19–24) se muestran a continuación.

En una forma de realización, el anticuerpo anti–CD33 de ADCs de la presente invención comprende la secuencia de cadena liviana variable de SEQ ID NO: 25 y la secuencia de cadena pesada variable de SEQ ID NO: 26

En una forma de realización, el anticuerpo anti–CD33 de ADCs de la presente invención comprende la secuencia de cadena liviana variable de SEQ ID NO: 27 y la secuencia de cadena pesada variable de SEQ ID NO: 28

En una forma de realización, el anticuerpo anti–CD33 de ADCs de la presente invención comprende la secuencia de cadena liviana variable de SEQ ID NO: 29 y la secuencia de cadena pesada variable de SEQ ID NO: 30

En una forma de realización, el anticuerpo anti–CD33 de ADCs de la presente invención comprende la secuencia de cadena liviana variable de SEQ ID NO: 31 y la secuencia de cadena pesada variable de SEQ ID NO: 32

9C3–HVR L1	RASQGIRNDLG	Seq ID NO:19
9C3–HVR L2	AASSLQS	Seq ID NO:20
9C3–HVR L3	LQHNSYPWT	Seq ID NO:21
9C3–HVR H1	GNYMS	Seq ID NO:22
9C3–HVR H2	LIYSGDSTYYADSVKG	Seq ID NO:23
9C3–	DGYYVSDMVV	Seq ID NO:24

HVR H3		
9C3 V_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRND LGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSGVPSRFS GSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNSYP WTFGQGTKLEIK	Seq ID NO:25
9C3 V_H	EVQLVESGGALIQPGGSLRLSCVASGFTISGN YMSWVRQAPGKGLEWVSLIYSGDSTYYADSV KGRFNISRDISKNTVYLQMNSLRVEDTAVYYC VRDGYYVSDMVVWGKGTTVTVSS	Seq ID NO:26
9C3,2 V_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRND LGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSGVPSRFS GSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNSYP WTFGQGTKLEIK	Seq ID NO:27
9C3,2 V_H	EVQLVESGGALIQPGGSLRLSCVASGFTISGN YMSWVRQAPGKGLEWVSLIYSGDSTYYADSV KGRFTISRDISKNTVYLQMNSLRVEDTAVYYCV RDGYYVSDMVVWGKGTTVTVSS	Seq ID NO:28
9C3,3 V_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRND LGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSGVPSRFS GSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNSYP WTFGQGTKLEIK	Seq ID NO:29
9C3,3 V_H	EVQLVESGGALIQPGGSLRLSCVASGFTISGN YMSWVRQAPGKGLEWVSLIYSGDSTYYADSV KGRFSISRDISKNTVYLQMNSLRVEDTAVYYCV RDGYYVSDMVVWGKGTTVTVSS	Seq ID NO:30
9C3,4 V_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRND LGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSGVPSRFS GSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNSYP	Seq ID NO:31

	WTFGQGTKLEIK	
9C3,4 V_H	EVQLVESGGALIQPGGSLRLSCVASGFTISGN YMSWVRQAPGKGLEWVSLIYSGDSTYYADSV KGRFAISRDISKNTVYLQMNSLRVEDTAVYYCV RDGYYVSDMVVWGKGTTVTVSS	Seq ID NO:32

Anticuerpo humanizado anti–CD22:

En una forma de realización, el anticuerpo anti–CD22 de ADCs de la presente invención comprende tres regiones hipervariable de cadena liviana y tres regiones hipervariable de cadena pesada (SEQ ID NO: 41–46), cuyas secuencias se muestran a continuación.

En una forma de realización, el anticuerpo anti–CD22 de ADCs de la presente invención comprende la secuencia de cadena liviana variable de SEQ ID NO: 47 y la secuencia de cadena pesada variable de SEQ ID NO: 48

En una forma de realización, el anticuerpo anti–CD22 de ADCs de la presente invención comprende la secuencia de cadena liviana de SEQ ID NO: 49 y la secuencia de cadena pesada de SEQ ID NO: 50

h10F4.V3.K149C HVR–L1	RSSQSIVHSVGNTFLE	Seq ID No: 41
h10F4.V3.K149C HVR–L2	KVSNRFS	Seq ID No: 42
h10F4.V3.K149C HVR–L3	FQGSQFPYT	Seq ID No: 43
h10F4.V3.K149	GYEFSRSWMN	Seq ID No:

C HVR–H1		44
h10F4.V3.K149C HVR–H2	RIYPGDGDTNYSGKFKG	Seq ID No: 45
h10F4.V3.K149C HVR–H3	DGSSWDWYFDV	Seq ID No: 46
h10F4.V3.K149C V_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSIVHSVGNTFLEWYQQKPGKAPKLLIYKVSNRFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCFQGSQFPYTFGQGTKVEIKR	SEQ ID NO: 47
h10F4.V3.K149C V_H	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYEFSRSWMNWVRQAPGKGLEWVGRIYPGDGDTNYSGKFKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGSSWDWYFDVWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO: 48
h10F4.V3.K149C cadena liviana	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSIVHSVGNTFLEWYQQKPGKAPKLLIYKVSNRFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCFQGSQFPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWCVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	SEQ ID NO: 49
h10F4.V3.K149	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	SEQ ID NO:

C cadena pesada	GYEFSRSWMNWVRQAPGKGLEWVG RIYPGDGDTNYSGKFKGRFTISADTS KNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGS SWDWYFDVWGQGTLVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK	50

Datos de ADC in vitro

Los siguientes ADCs se ensayaron en ensayos *in vitro* descritos con anterioridad y se hallaron activos. Las actividades de dichos ADCs se ilustran en la siguiente tabla. Los ADCs de NaPi2b se usaron como un control no blanco.

Código	ID de anticuerpo	EOL–1 IC_{50} (ng/mL)
NaPi2b CBI–PBD ADC2–1	10H1,11,4B	2187
CD33 CBI–PBD ADC2–2	15G15,33	370

NaPi2b CBI–PBD ADC3–1	10H1,11,4B	590
CD33 CBI–PBD ADC3–2	15G15,33	18,1

Nombre de molécula	DAR	IGROV–1 IC50		OVCAR–3x2,1 IC50		NCI–H441 IC50	
		nM	ng/mL	nM	ng/mL	nM	ng/mL
anti–Napi2b 10H1,11,4B LC K149C (CBI–CBI LD5)	2,0	0,398	59,7	0,147	22,1	2,9	435
anti–CD22 10F4v3 LC K149C (CBI–CBI LD5)	2,0	7,6	1140	17,4	2610	4,0	600

Nombre de molécula	DAR	BJAB IC50		WSU–DLCL2 IC50		Jurkat IC50	
		nM	ng/mL	nM	ng/mL	nM	ng/mL
anti–CD22 10F4v3 LC K149C (CBI–CBI LD5)	2,0	0,0243	3,6	0,0130	1,95	50,2	7530
anti–Napi2b 10H1,11,4B LC K149C (CBI–CBI LD5)	2,0	62,2	9330	48,1	7215	47,8	7170

Nombre de molécula	DAR	IGROV–1 IC50		OVCAR–3x2,1 IC50		NCI–H441 IC50	
		nM	ng/mL	nM	ng/mL	nM	ng/mL
anti–Napi2b 10H1,11,4B LC K149C (CBI–CBI LD6)	2,0	0,189	28,4	3,7	555	11,0	1650
anti–CD22 10F4v3 LC K149C (CBI–CBI LD6)	2,0	2,9	435	>133,3	>20000	81,2	12180

Nombre de molécula	DAR	BJAB IC50		WSU–DLCL2 IC50		Jurkat IC50	
		nM	ng/mL	nM	ng/mL	nM	ng/mL
anti–CD22 10F4v3 LC K149C (CBI–CBI LD6)	2,0	0,0441	6,6	0,0306	4,6	>133,3	>20000
anti–Napi2b 10H1,11,4B LC K149C (CBI–CBI LD6)	2,0	>133,3	>20000	>133,3	>20000	>133,3	>20000

Datos de ADC in vivo

La Figura 1 muestra comparación de la eficacia de CD33 ADCs en ratones SCID con tumores de leucemia mieloide aguda humana HL–60. CD33 CBI–PBD ADC3–2 mostró inhibición dependiente de la dosis de crecimiento tumoral en comparación con el grupo vehículo. El NaPi2b CBI–PBD ADC3–1 de control no blanco tenía mínimo efecto sobre el crecimiento tumoral.

La Figura 2 muestra comparación de la eficacia de NaPi2b ADCs en ratones beige SCID con tumores ováricos humanos OVCAR3X2,1. NaPi2b CBI–PBD ADC2–1 y ADC3–1 demostraron una modesta inhibición del crecimiento tumoral en comparación con el grupo vehículo. La actividad antitumoral de NaPi2b CBI–PBD ADC2–1 y ADC3–1 era comparable, dando como resultado un retraso en el crecimiento tumoral con la dosis de anticuerpo de 3 mg/kg (= dosis de fármaco de 73 ug/m2).

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> GENENTECH, INC. ET AL.

<120> COMPUESTOS PEPTIDOMIMÉTICOS Y SUS CONJUGADOS DE ANTICUERPO-FÁRMACO

<130> P5760-PCT

<140>

<141>

<150> 61/916.661

<151> 2013-12-16

<150> 61/916.691

<151> 2013-12-16

<160> 50

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /note="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 1

Arg Ser Ser Glu Thr Leu Val His Ser Ser Gly Asn Thr Tyr Leu Glu

1 5 10 15

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /note="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético”

<400> 2

Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /note="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético”

<400> 3

Phe Gln Gly Ser Phe Asn Pro Leu Thr

1 5

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /note="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético”

<400> 4

Gly Phe Ser Phe Ser Asp Phe Ala Met Ser

1 5 10

<210> 5

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /note="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético”

<400> 5

Ala Thr Ile Gly Arg Val Ala Phe His Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Met

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 6

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /note="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético”

<400> 6

Ala Arg His Arg Gly Phe Asp Val Gly His Phe Asp Phe

1 5 10

<210> 7

<211> 113

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /note="Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 7

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Glu Thr Leu Val His Ser
20 25 30

Ser Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75 80

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser Phe Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

<210> 8

<211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /note="Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 8

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Asp Phe
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Gly Arg Val Ala Phe His Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Met
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg His Arg Gly Phe Asp Val Gly His Phe Asp Phe Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 9
<211> 219
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /note="Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 9
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Glu Thr Leu Val His Ser
20 25 30

Ser Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75 80

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser Phe Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 10
<211> 450
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /note="Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 10
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Asp Phe
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Gly Arg Val Ala Phe His Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Met
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg His Arg Gly Phe Asp Val Gly His Phe Asp Phe Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Cys Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 11
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /note="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético”

<400> 11
Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp
1 5 10 15

<210> 12

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /note="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético”

<400> 12

Leu Gly Val Asn Ser Val Ser

1 5

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /note="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético”

<400> 13

Met Gln Ala Leu Gln Thr Pro Trp Thr

1 5

<210> 14

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /note="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético”

<400> 14

Asn His Ala Ile Ser

1 5

<210> 15

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /note="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético”

<400> 15

Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 16

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /note="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético”

<400> 16

Glu Trp Ala Asp Val Phe Asp Ile
1 5

<210> 17
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /note="Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 17
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Val Asn Ser Val Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
85 90 95

Leu Gln Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 18
<211> 117
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /note="Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 18
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Ile Phe Ser Asn His
20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Phe
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Trp Ala Asp Val Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 19
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /note="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético”

<400> 19
Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp Leu Gly
1 5 10

<210> 20
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /note="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético”

<400> 20

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 21
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /note="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético”

<400> 21
Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Trp Thr
1 5

<210> 22
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /note="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético”

<400> 22
Gly Asn Tyr Met Ser
1 5

<210> 23
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /note="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético”

<400> 23

Leu Ile Tyr Ser Gly Asp Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly

1 5 10 15

<210> 24

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /note="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético”

<400> 24

Asp Gly Tyr Tyr Val Ser Asp Met Val Val

1 5 10

<210> 25

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /note="Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético”

<400> 25

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp
20 25 30

Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 26
<211> 118
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /note="Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético”

<400> 26

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Ala Leu Ile Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Ile Ser Gly Asn
20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Leu Ile Tyr Ser Gly Asp Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Asn Ile Ser Arg Asp Ile Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val
85 90 95

Arg Asp Gly Tyr Tyr Val Ser Asp Met Val Val Trp Gly Lys Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 27
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /note="Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 27

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp
20 25 30

Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 28

<211> 118

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /note="Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 28

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Ala Leu Ile Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Ile Ser Gly Asn
20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Leu Ile Tyr Ser Gly Asp Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ile Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val
85 90 95

Arg Asp Gly Tyr Tyr Val Ser Asp Met Val Val Trp Gly Lys Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 29
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /note="Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 29
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp
20 25 30

Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 30
<211> 118
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /note="Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 30
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Ala Leu Ile Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Ile Ser Gly Asn
20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Leu Ile Tyr Ser Gly Asp Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Ser Ile Ser Arg Asp Ile Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val
85 90 95

Arg Asp Gly Tyr Tyr Val Ser Asp Met Val Val Trp Gly Lys Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 31
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /note="Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 31
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp
20 25 30

Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 32
<211> 118
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /note="Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético”

<400> 32
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Ala Leu Ile Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Ile Ser Gly Asn
20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Leu Ile Tyr Ser Gly Asp Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Ala Ile Ser Arg Asp Ile Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val
85 90 95

Arg Asp Gly Tyr Tyr Val Ser Asp Met Val Val Trp Gly Lys Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 33

<400> 33
000

<210> 34

<400> 34
000

<210> 35

<400> 35
000

<210> 36

<400> 36
000

<210> 37

<400> 37
000

<210> 38

<400> 38
000

<210> 39

<400> 39
000

<210> 40

<400> 40
000

<210> 41
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /note="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético”

<400> 41

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Val Gly Asn Thr Phe Leu Glu

1 5 10 15

<210> 42

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /note="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético”

<400> 42

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 43

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /note="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético”

<400> 43

Phe Gln Gly Ser Gln Phe Pro Tyr Thr

1 5

<210> 44

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /note="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético”

<400> 44

Gly Tyr Glu Phe Ser Arg Ser Trp Met Asn

1 5 10

<210> 45

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /note="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético”

<400> 45

Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Ser Gly Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 46

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /note="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético”

<400> 46

Asp Gly Ser Ser Trp Asp Trp Tyr Phe Asp Val

1 5 10

<210> 47

<211> 113

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /note="Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético”

<400> 47

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser

20 25 30

Val Gly Asn Thr Phe Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala

35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

50 55 60

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75 80

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser Gln Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

<210> 48
<211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /note="Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético”

<400> 48
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Glu Phe Ser Arg Ser
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Ser Gly Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Gly Ser Ser Trp Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 49
<211> 219
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /note="Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 49
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

```
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
            20                  25                  30

Val Gly Asn Thr Phe Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
        35                  40                  45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
    50                  55                  60

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65                  70                  75                  80

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
                85                  90                  95

Ser Gln Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105                 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
        115                 120                 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
    130                 135                 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Cys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145                 150                 155                 160
```

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 50
<211> 450
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /note="Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético”

<400> 50
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Glu Phe Ser Arg Ser
20 25 30

```
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Ser Gly Lys Phe
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Arg Asp Gly Ser Ser Trp Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln
            100                 105                 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
        115                 120                 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
    130                 135                 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145                 150                 155                 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
                165                 170                 175
```

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado de anticuerpo–fármaco representado por la fórmula (I)

Ab— (L—D)$_p$,

Ab es un anticuerpo;

L es un ligador peptidomimético representado por la siguiente fórmula

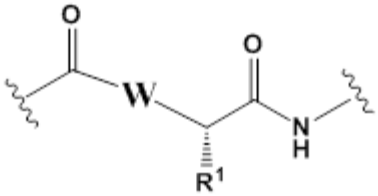
—Str—(PM)—Sp—

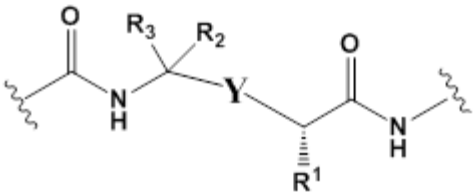
en donde

Str es una unidad extensora covalentemente unida a Ab;

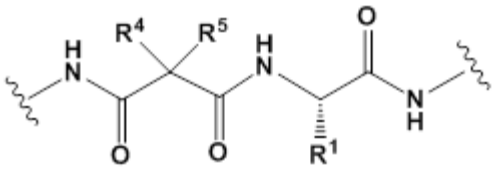
Sp es un enlace o unidad espaciadora covalentemente unida a un resto farmacológico;

PM es un resto químico no peptídico seleccionado del grupo que consiste en:





y



W es –NH–heterocicloalquilo o heterocicloalquilo;

Y es heteroarilo, arilo, –C(O)alquileno C1–C6, alquilen C1–C6–NH_2,

alquilen C1–C6–NH–CH_3, alquilen C1–C6–N–$(CH_3)_2$, alquenilo C1–C6 o alquilenilo C1–C6;

cada R^1 es, de modo independiente, alquilo C1–C10, alquenilo C1–C10, (alquil C1–C10)NHC(NH)NH_2 o (alquil C1–C10)NHC(O)NH_2;

R^3 y R^2 son cada uno, de modo independiente, H, alquilo C1–C10, alquenilo C1–C10, arilalquilo o heteroarilalquilo o R^3 y R^2 pueden formar juntos un cicloalquilo C3–C7;

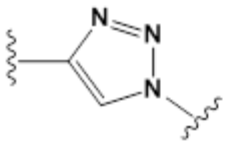
R^4 y R^5 son cada uno, de modo independiente, alquilo C1–C10, alquenilo C1–C10, arilalquilo, heteroarilalquilo, (alquil C_1–C_{10})OCH_2– o R^4 y R^5 pueden formar juntos un anillo cicloalquilo C3–C7;

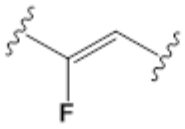
p es un número entero de 1 a 8;

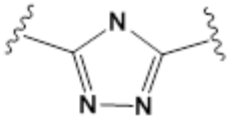
D es un resto farmacológico.

2. El conjugado de anticuerpo–fármaco de acuerdo con la reivindicación 1, en donde Y es heteroarilo; R^4 y R^5 forman juntos un anillo ciclobutilo.

3. El conjugado de anticuerpo–fármaco de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en donde Y es un resto seleccionado del grupo que consiste en

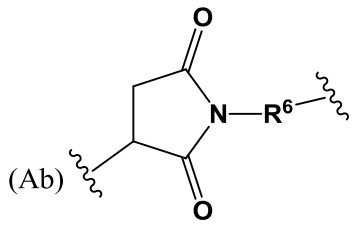




y


4. Un conjugado de anticuerpo–fármaco de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en donde

Str es un resto químico representado por la siguiente fórmula:

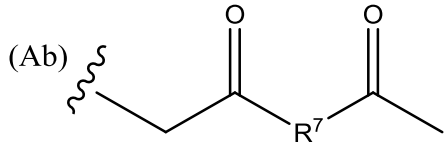


en donde R^6 se selecciona del grupo que consiste en alquileno C1–C10, alquenilo C1–C10, cicloalquilo C3–C8, (alquilen C1–C8)O– y alquilen

C1–C10–C(O)N(R^a)–alquileno C2–C6, donde cada alquileno puede estar sustituido con uno a cinco sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halo, trifluorometilo, difluorometilo, amino, alquilamino, ciano, sulfonilo, sulfonamida, sulfóxido, hidroxi, alcoxi, éster, ácido carboxílico, alquiltioarilo, cicloalquilo C3–C8, heterocicloalquilo C4–C7, heteroarilalquilo, arilarilalquilo, heteroarilalquilo y heteroarilo, cada R^a es, de modo independiente, H o alquilo C1–C6;

Sp es –alquilen C1–C6–C(O)NH– o —Ar—R^b—, en donde Ar es arilo o heteroarilo, R^b es (alquilen C1–C10)O–.

5. El conjugado de anticuerpo–fármaco de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en donde Str tiene la fórmula:



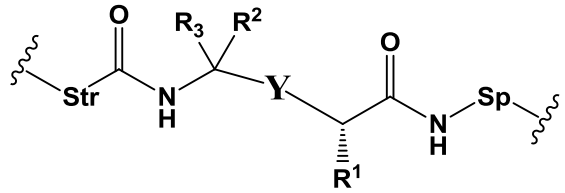
en donde R^7 se selecciona de alquileno C1–C10, alquenilo C1–C10, (alquilen C1–C10)O–, N(R^c)–(alquilen C2–C6)–N(R^c) y N(R^c)–(alquileno C2–C6); donde cada R^c es, de modo independiente, H o alquilo C1–C6;

Sp es –alquilen C1–C6–C(O)NH– o —Ar—R^b—, en donde Ar es arilo o heteroarilo, R^b es (alquilen C1–C10)O–.

6. El conjugado de anticuerpo–fármaco de acuerdo con la reivindicación 1 ó 4,

en donde Ab es un anticuerpo;

L es un resto químico no peptídico representado por la siguiente fórmula



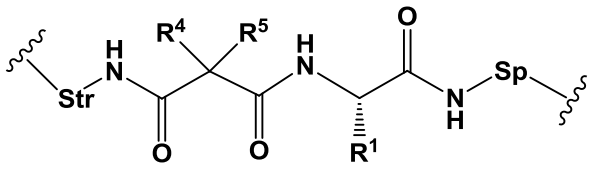
R^1 es alquilo C1–C6, alquenilo C1–C6, (alquil C1–C6)NHC(NH)NH_2 o (alquil C1–C6)NHC(O)NH_2;

R^3 y R^2 son cada uno, de modo independiente, H, alquilo C1–C10.

7. El conjugado de anticuerpo–fármaco de acuerdo con la reivindicación 1, 4 ó 5,

en donde Ab es un anticuerpo;

L es resto químico no peptídico representado por la siguiente fórmula



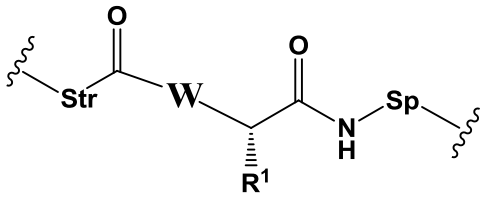
R^1 es alquilo C1–C6, (alquil C1–C6)NHC(NH)NH_2 o (alquil C1–C6)NHC(O)NH_2;

R^4 y R^5 forman juntos un anillo cicloalquilo C3–C7.

8. El conjugado de anticuerpo–fármaco de acuerdo con la reivindicación 1 ó 4,

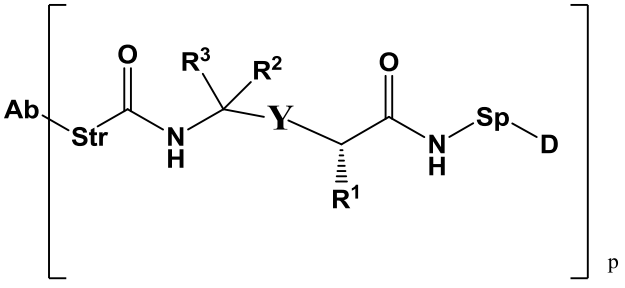
en donde Ab es un anticuerpo;

L es resto químico no peptídico representado por la siguiente fórmula



R^1 es alquilo C1–C6, (alquil C1–C6)NHC(NH)NH_2 o (alquil C1–C6)NHC(O)NH_2.

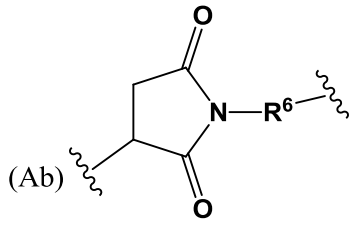
9. El conjugado de anticuerpo–fármaco compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 representado por la siguiente fórmula:



(I)(A1)

en donde

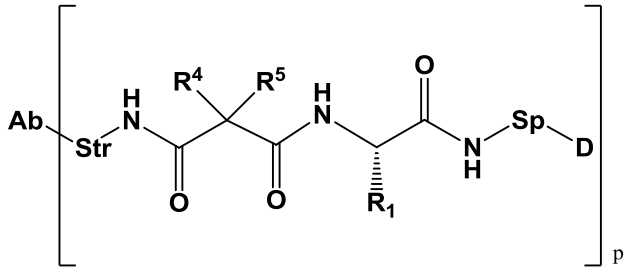
Str es un resto químico representado por la siguiente fórmula:



R^6 se selecciona del grupo que consiste en alquileno C1–C10 y alquilen C1–C10–C(O)N(R^a)–alquileno C2–C6, donde cada alquileno puede estar sustituido con uno a cinco sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halo, trifluorometilo, difluorometilo, amino, alquilamino, ciano, sulfonilo, sulfonamida, sulfóxido, hidroxi, alcoxi, éster, ácido carboxílico, alquiltioarilo, cicloalquilo C3–C8, heterocicloalquilo C4–C7, heteroarilalquilo, arilo, arilalquilo, heteroarilalquilo y heteroarilo, cada R^a es, de modo independiente, H o alquilo C1–C6;

p es 1, 2, 3 ó 4.

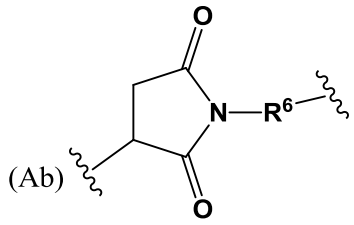
10. El conjugado de anticuerpo–fármaco de acuerdo con la reivindicación 1 representado por la siguiente fórmula:



(I)(B1)

en donde

Str es un resto químico representado por la siguiente fórmula:

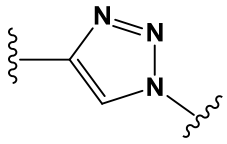


R^6 se selecciona del grupo que consiste en alquileno C1–C10 y alquilen C1–C10–C(O)N(R^a)–alquileno C2–C6, donde cada alquileno puede estar sustituido con uno a cinco sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halo, trifluorometilo, difluorometilo, amino, alquilamino, ciano, sulfonilo, sulfonamida, sulfóxido, hidroxi, alcoxi, éster, ácido carboxílico, alquiltioarilo, cicloalquilo C3–C8, heterocicloalquilo C4–C7, arilo, arilalquilo, heteroarilalquilo y heteroarilo, cada R^a es, de modo independiente, H o alquilo C1–C6;

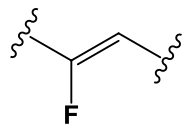
p es 1, 2, 3 ó 4.

11. El conjugado de anticuerpo–fármaco de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4–6, 9, en donde Y es heteroarilo, arilo o alquenilo; R^6 es alquileno C1–C10.

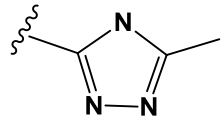
12. El conjugado de anticuerpo–fármaco de acuerdo con la reivindicación 1 ó 9, en donde Y es



13. El conjugado de anticuerpo–fármaco de acuerdo con la reivindicación 1 ó 9, en donde Y es



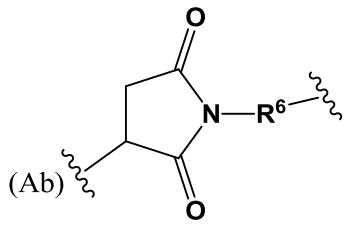
14. El conjugado de anticuerpo–fármaco de acuerdo con la reivindicación 1 ó 9, en donde Y es



15. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9–14,

en donde

Str es un resto químico representado por la siguiente fórmula:

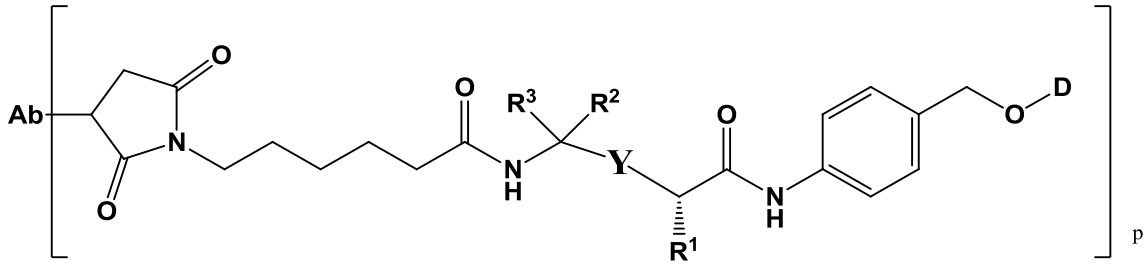


,

R^6 es alquileno C1–C6;

Sp es –alquilen C1–C6–C(O)NH– o —Ar—R^b—, donde Ar es arilo, R^b es (alquilen C1–C3)O–.

16. El conjugado de anticuerpo–fármaco compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, 4, 6 ó 9, que está representado por la siguiente fórmula:



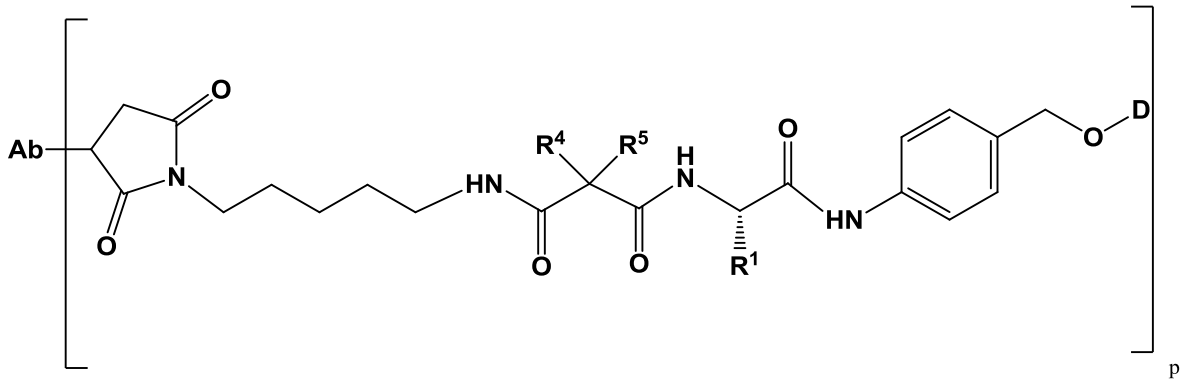
(I)(A2)

en donde

R^1 es alquil C1–C6–NH_2, (alquil C1–C6)NHC(NH)NH_2 o (alquil C1–C6)NHC(O)NH_2

p es 1, 2, 3 ó 4.

17. El conjugado de anticuerpo–fármaco compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, 4, 7 ó 10, que está representado por la siguiente fórmula:



(I)(B2)

en donde

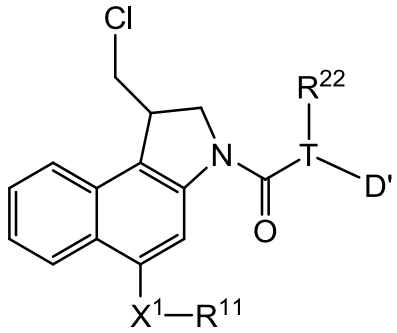
p es 1, 2, 3 ó 4;

R^1 es alquil C1–C6–NH_2, (alquil C1–C6)NHC(NH)NH_2 o (alquil C1–C6)NHC(O)NH_2;

R^4 y R^5 son cada uno, de modo independiente, alquilo C1–C6, en donde dicho alquilo no está sustituido o R^4 y R^5 pueden formar un anillo cicloalquilo C3–C7.

18. El conjugado de anticuerpo–fármaco de acuerdo con la reivindicación 1–17, en donde

D es el resto farmacológico dimérico que tiene la fórmula :



en donde

R^{11} se selecciona de H, $P(O)_3H_2$, $C(O)NR^{aa}R^{bb}$ o un enlace con L;

R^{22} se selecciona de H, $P(O)_3H_2$, $C(O)NR^{aa}R^{bb}$ o un enlace con L;

R^{aa} y R^{bb} se seleccionan, de modo independiente, de H y alquilo C1–C6 opcionalmente sustituido con uno o varios F,

o R^{aa} y R^{bb} forman un grupo heterocicloalquilo de cinco o seis miembros;

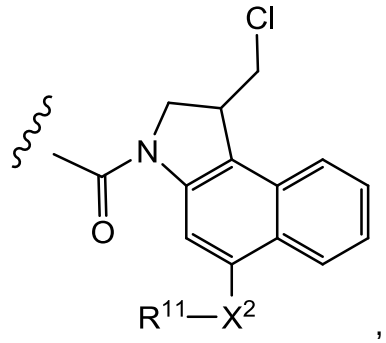
T es un grupo de traba seleccionado de alquileno C3–C12, Y^1, (alquilen C1–C6)– Y^1–(alquileno C1–C6), (alquilen C1–C6)– Y^1–(alquilen C1–C6)– Y^1–(alquileno C1–C6), (alquenilen C2–C6)–Y^1–(alquenileno C2–C6) y (alquinilen C2–C6)–Y^1–(alquinileno C2–C6);

donde Y^1 se selecciona, de modo independiente, de O, S, NR^{11}, arilo y heteroarilo;

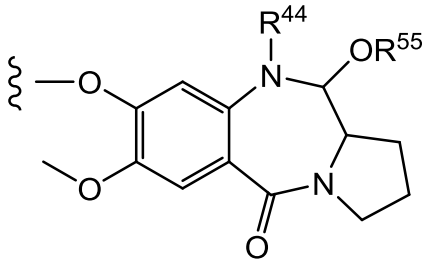
en donde alquileno, alquenileno, arilo y heteroarilo están independiente y opcionalmente sustituidos con F, OH, O(alquilo C1–C6), NH_2, $NHCH_3$, $N(CH_3)_2$, NHC(O)(alquileno C_1–$C_6)_m$, $OP(O)_3H_2$ y alquilo C1–C6, donde alquilo está opcionalmente sustituido con uno o varios F, m es 0 ó 1;

o alquileno, alquenileno, arilo y heteroarilo están independiente y opcionalmente sustituidos con un enlace con L, en donde el enlace con L se puede conectar a través de uno de los sustituyentes opcionales;

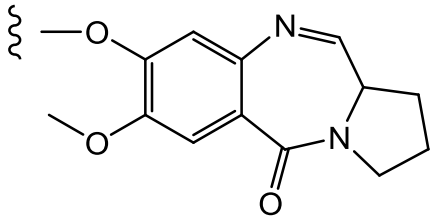
D' es un resto farmacológico seleccionado de:



,



, y



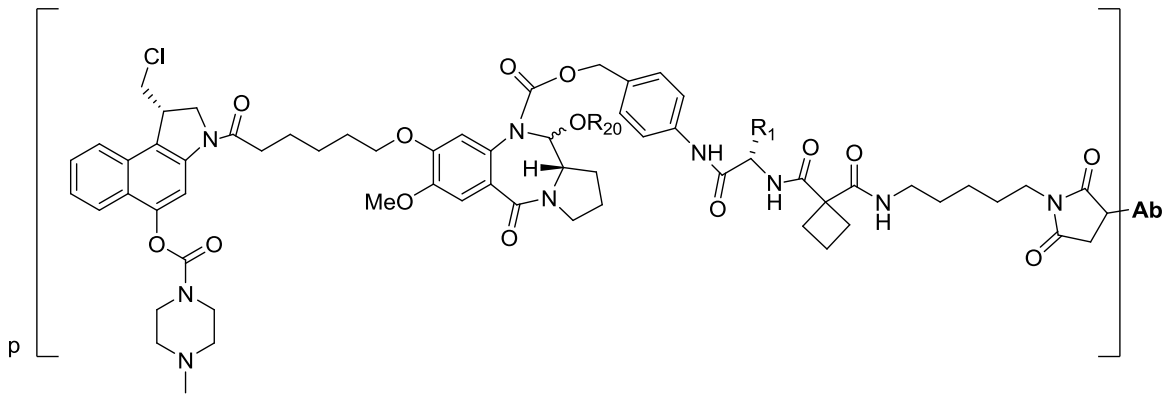
donde la línea ondulada indica el sitio de unión con T;

X^1 y X^2 se seleccionan, de modo independiente, de O y NR^{33}, donde R^{33} se selecciona de H, C(O) y alquilo C1–C6 opcionalmente sustituido con uno o varios F o X^1 y X^2 están cada uno, de modo independiente, ausentes;

R^{44} es H, CO_2R, C(O) o un enlace con L, donde R es alquilo C1–C6 o bencilo; y

R^{55} es H o alquilo C1–C6.

19. El conjugado de anticuerpo–fármaco de acuerdo con la reivindicación 1, que está representado por la siguiente fórmula:



(I)(B6)

en donde,

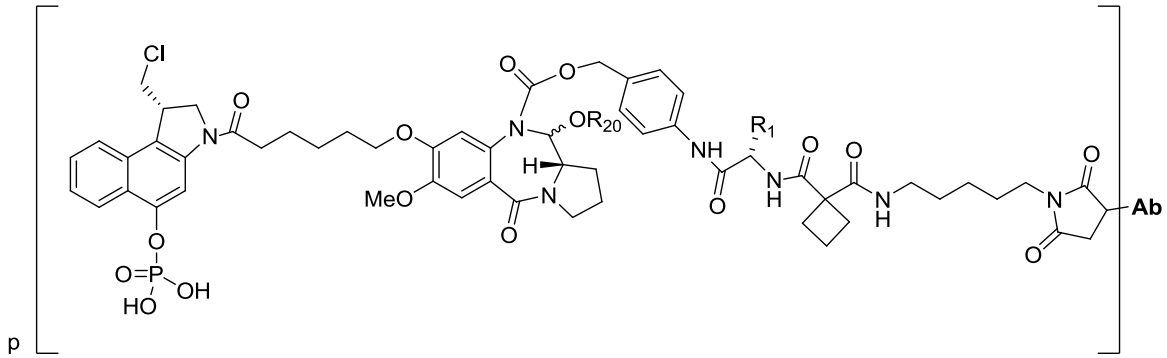
Ab es un anticuerpo que se une con un blanco seleccionado de Her2, CLL1, CD33, CD22 y NaPi2b;

P es 1–4; y

R^1 es alquil C1–C6–NH_2, (alquil C1–C6)NHC(NH)NH_2 o (alquil C1–C6)NHC(O)NH_2;

R^{20} es H o Me;

20. El conjugado de anticuerpo–fármaco de acuerdo con la reivindicación 1, que está representado por la siguiente fórmula:



(I)(B7)

en donde,

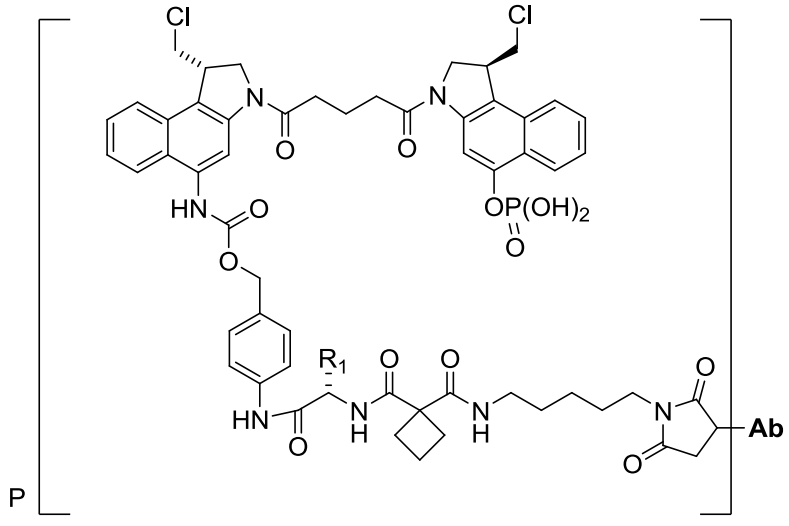
Ab es un anticuerpo que se une con un blanco seleccionado de Her2, CLL1, CD33, CD22 y NaPi2b;

P es 1–4;

R^1 es alquil C1–C6–NH_2, (alquil C1–C6)NHC(NH)NH_2 o (alquil C1–C6)NHC(O)NH_2;

R^{20} es H o Me;

21. El conjugado de anticuerpo–fármaco de acuerdo con la reivindicación 1, que está representado por la siguiente fórmula:



(I)(B8)

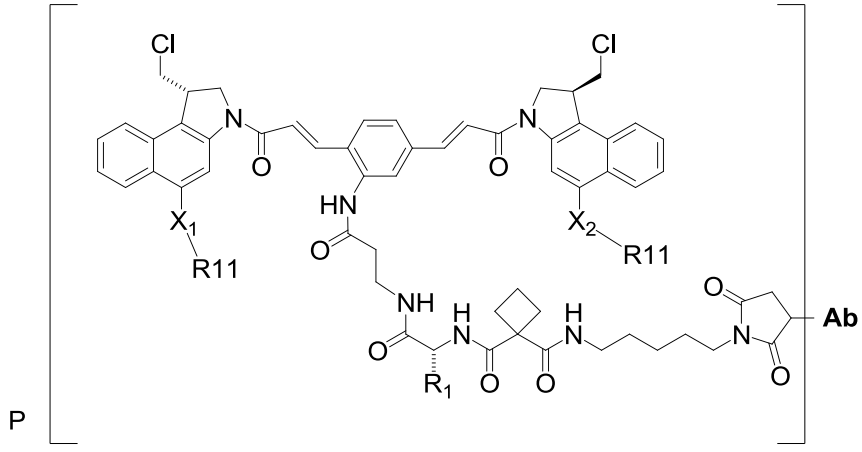
en donde

Ab es un anticuerpo que se une con un blanco seleccionado de Her2, CLL1, CD33, CD22 y NaPi2b;

P es 1–4; y

R^1 es alquil C1–C6–NH_2, (alquil C1–C6)NHC(NH)NH_2 o (alquil C1–C6)NHC(O)NH_2;

22. El conjugado de anticuerpo–fármaco de acuerdo con la reivindicación 1, que está representado por la siguiente fórmula:



(I)(B9)

en donde,

Ab es un anticuerpo que se une con un blanco seleccionado de Her2, CLL1, CD33, CD22 y NaPi2b;

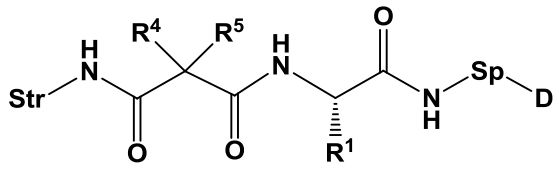
P es 1–4;

R^1 es alquil C1–C6–NH_2, (alquil C1–C6)NHC(NH)NH_2 o (alquil C1–C6)NHC(O)NH_2;

X^1 y X^2 están cada uno, de modo independiente, ausentes u O;

cada R^{11} es, de modo independiente, C(O)N–piperazin(CH_3) o $P(O)_3H_2$.

23. Un compuesto no peptídico de la fórmula (I)(B)(LD1):



(I)(D)(LD1)

en donde

Str es una unidad extensora que puede estar covalentemente unida a un anticuerpo;

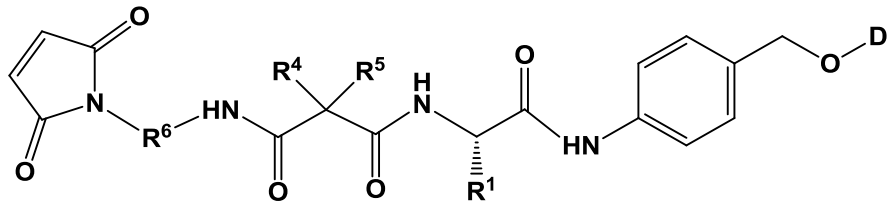
Sp es un enlace o una unidad espaciadora covalentemente unida a un resto farmacológico;

R^1 es alquilo C1–C10, (alquil C1–C10)NHC(NH)NH_2 o (alquil C1–C10)NHC(O)NH_2;

R^4 y R^5 son cada uno, de modo independiente, alquilo C1–C10, arilalquilo, heteroarilalquilo, (alquil C1–C10)OCH_2– o R^4 y R^5 pueden formar un anillo cicloalquilo C3–C7;

D es un resto farmacológico.

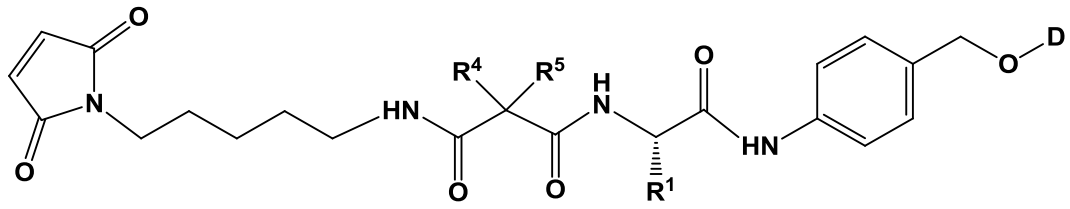
24. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 23 representado por la siguiente fórmula



(I)(B)(LD2)

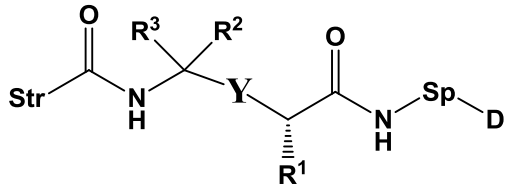
en donde R_6 es alquileno C1–C10; R^4 y R^5 forman juntos un anillo cicloalquilo C3–C7.

25. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 23 representado por la siguiente fórmula



(I)(B)(LD3)

26. Un compuesto de la fórmula:



(I)(A)(LD1)

en donde

Str es una unidad extensora que puede estar covalentemente unida a un anticuerpo;

Sp es una unidad espaciadora opcional covalentemente unida a un resto farmacológico;

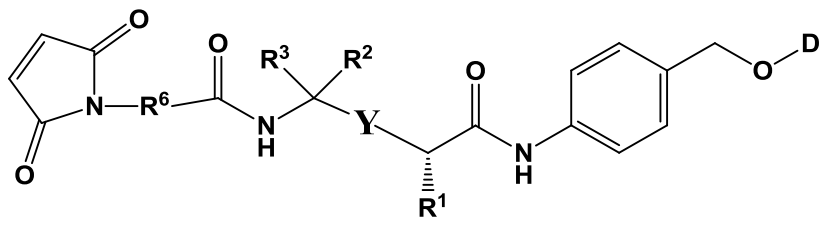
Y es heteroarilo, arilo, –C(O)alquenilo C1–C6, alquenilo C1–C6 o –alquenil C1–C6–NH–;

R^1 es alquilo C1–C10, (alquil C1–C10)NHC(NH)NH_2 o (alquil C1–C10)NHC(O)NH_2;

R^3 y R^2 son cada uno, de modo independiente, H, alquilo C1–C10, arilalquilo o heteroarilalquilo o R^3 y R^2 pueden formar juntos un cicloalquilo C3–C7;

D es un resto farmacológico.

27. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 26 representado por la siguiente fórmula:

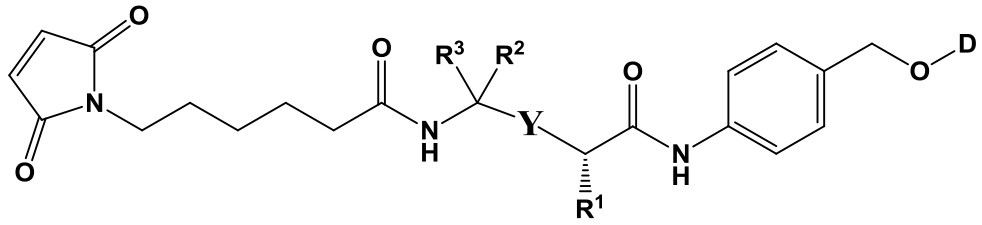


(I)(A)(LD2)

en donde

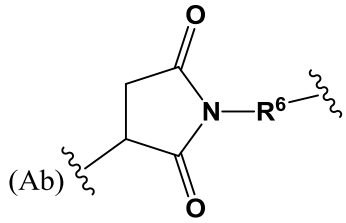
R_6 es alquileno C1–C10.

28. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 20, que está representado por la siguiente fórmula:



(I)(A)(LD3)

29. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 23 ó 26, en donde Str tiene la siguiente fórmula:



en donde R^6 se selecciona del grupo que consiste en alquileno C1–C10, cicloalquilo C3–C8, O–(alquileno C1–C8) y alquilen C1–C10–C(O)N(R^a)–alquileno C2–C6, donde cada alquileno puede estar sustituido con uno a cinco sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halo, trifluorometilo, difluorometilo, amino, alquilamino, ciano, sulfonilo, sulfonamida, sulfóxido, hidroxi, alcoxi, éster, ácido carboxílico, alquiltioarilo, cicloalquilo C3–C8, heterocicloalquil C4–C7–arilo, arilalquilo, heteroarilalquilo y heteroarilo, cada R^a es, de modo

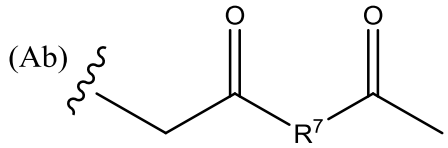
independiente, H o alquilo C1–C6;

Sp es –alquilen C1–C6–C(O)NH– o —Ar—R^b—, en donde Ar es arilo o heteroarilo, R^b es (alquilen C1–C10)O–.

30. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 26, en donde R^6 es alquileno C1–C10, Sp es —Ar—R^b—, en donde Ar es arilo, R^b es (alquilen C1–C6)O–.

31. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 23 y 26, donde R_6 es $–(CH_2)_q$ es 1–10.

32. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 18 ó 21, en donde Str tiene la fórmula:



en donde R^7 se selecciona de alquileno C1–C10, alquilen C1–C10–O, N(R^c)–(alquilen C2–C6)–N(R^c) y N(R^c)–(alquileno C2–C6); donde cada R^c es, de modo independiente, H o alquilo C1–C6;

Sp es –alquilen C1–C6–C(O)NH– o —Ar—R^b—, en donde Ar es arilo o heteroarilo, R^b es (alquilen C1–C10)O–.

33. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 26, en donde R^6 es alquileno C1–C10, Sp es —Ar—R^b—, en donde Ar es arilo, R^b es (alquilen C1–C6)O–.

34. El conjugado de anticuerpo–fármaco de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1–22, en donde p es 2.

35. El conjugado de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1–22, en donde el anticuerpo se une con uno o varios de polipéptidos seleccionados del grupo que consiste en:

CLL1;

BMPR1B;

E16;

STEAP1;

0772P;

MPF;

NaPi2b;

Sema 5b;

PSCA hlg;

ETBR;

MSG783;

STEAP2;

TrpM4;

CRIPTO;

CD21;

CD79b;

FcRH2;

HER2;

NCA;

MDP;

IL20Rα;

Brevican;

EphB2R;

ASLG659;

PSCA;

GEDA;

BAFF–R;

CD22;

CD79a;

CXCR5;

HLA–DOB;

P2X5 ;
CD72;
LY64;
FcRH1;
IRTA2;
TENB2;
PMEL17;
TMEFF1;
GDNF–Ra1;
Ly6E;
TMEM46;
Ly6G6D;
LGR5;
RET;
LY6K;
GPR19;
GPR54;
ASPHD1;
Tyrosinase;
TMEM118;
GPR172A;
MUC16 y
CD33.

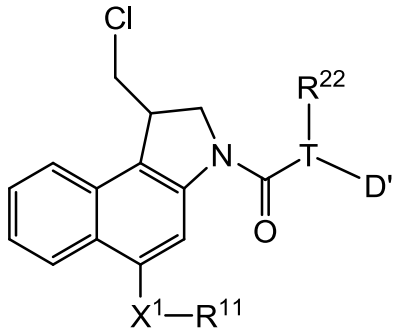
36. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde D es un agente antitumoral o un resto antibiótico.

37. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde D está seleccionado del grupo que consiste en:
metotrexato, adriamicina, vincristina, vinblastina, etopósido,

doxorrubicina, melfalano, mitomicina C, clorambucilo y daunorrubicina.

38. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones anteriores 23–33, en donde

D es el resto farmacológico dimérico que tiene la fórmula:



en donde

R^{11} se selecciona de H, $P(O)_3H_2$, $C(O)NR^{aa}R^{bb}$ o un enlace con L;

R^{22} se selecciona de H, $P(O)_3H_2$, $C(O)NR^{aa}R^{bb}$ o un enlace con L;

R^{aa} y R^{bb} se seleccionan, de modo independiente, de H y alquilo C1–C6 opcionalmente sustituido con uno o varios F,

o R^{aa} y R^{bb} forman un grupo heterocicloalquilo de cinco o seis miembros;

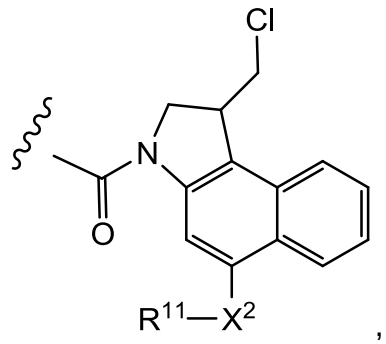
T es un grupo de traba seleccionado de alquileno C3–C12, Y^1, (alquilen C1–C6)– Y^1–(alquileno C1–C6), (alquilen C1–C6)– Y^1–(alquilen C1–C6)– Y^1–(alquileno C1–C6), (alquenilen C2–C6)–Y^1–(alquenileno C2–C6) y (alquinilen C2–C6)–Y^1–(alquinileno C2–C6);

donde Y^1 se selecciona, de modo independiente, de O, S, NR^{11}, arilo y heteroarilo;

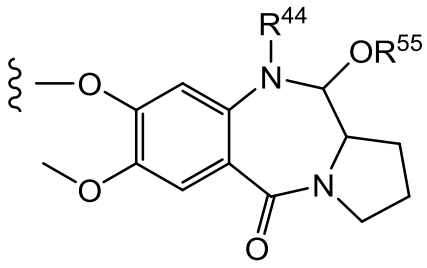
donde alquileno, alquenileno, arilo y heteroarilo están independiente y opcionalmente sustituidos con F, OH, O(alquilo C1–C6), NH_2, $NHCH_3$, $N(CH_3)_2$, $NHC(O)(alquileno\ C1–C6)_m$, $OP(O)_3H_2$ y alquilo C1–C6, donde alquilo está opcionalmente sustituido con uno o varios F, m es 0 ó 1;

o alquileno, alquenileno, arilo y heteroarilo están independiente y opcionalmente sustituidos con un enlace con L, en donde el enlace con L se puede conectar a través de uno de los sustituyentes opcionales;

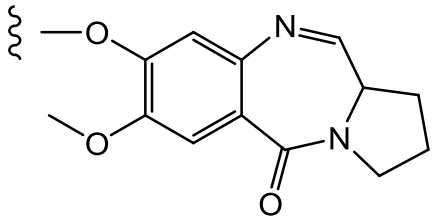
D' es un resto farmacológico seleccionado de:



,



, y



donde la línea ondulada indica el sitio de unión con T;

X^1 y X^2 se seleccionan, de modo independiente, de O y NR^{33}, donde R^{33} se selecciona de H, C(O) y alquilo C1–C6 opcionalmente sustituido con uno o varios F o X^1 y X^2 están cada uno, de modo independiente, ausentes;

R^{44} es H, CO_2R, C(O) o un enlace con L, donde R es alquilo C1–C6 o bencilo; y

R^{55} es H o alquilo C1–C6.

39. Un compuesto conjugado de anticuerpo que está preparado por unión covalente de un anticuerpo con uno a ocho compuestos de acuerdo con las reivindicaciones 23–33.

40. Un método de tratamiento de una enfermedad en un ser humano que lo necesita, que comprende la administración a dicho ser humano de una

cantidad efectiva de un conjugado de anticuerpo–fármaco de acuerdo con la reivindicación 1.

41. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 y uno de sus portadores farmacéuticamente aceptables.

42. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 30, en donde el anticuerpo se une con uno o varios de polipéptidos seleccionado del grupo que consiste en:

CLL1;
STEAP1;
NaPi2b;
STEAP2;
TrpM4;
CRIPTO;
CD21;
CD79b;
FcRH2;
HER2;
CD22;
CD79a;
CD72;
LY64;
Ly6E;
MUC16; y
CD33.

43. El conjugado de anticuerpo–fármaco de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1–22, en donde el anticuerpo se une con CD33.

44. El conjugado de anticuerpo–fármaco de acuerdo con la

reivindicación 34, en donde el anticuerpo anti–CD33 comprende una HVR–L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:11, una HVR–L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:12, una HVR–L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:13, una HVR–H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, una HVR–H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:15 y una HVR–H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16.

45. El conjugado de anticuerpo–fármaco de acuerdo con la reivindicación 34, en donde dicho anticuerpo anti–CD33 comprende un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:17 y un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:18.

46. El conjugado de anticuerpo–fármaco de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1–22, en donde el anticuerpo se une con NaPi2b.

47. El conjugado de anticuerpo–fármaco de acuerdo con la reivindicación 46, en donde el anticuerpo NaPi2b comprende una HVR–L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1, una HVR–L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2, una HVR–L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:3, una HVR–H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, una HVR–H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:5 y una HVR–H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

48. El conjugado de anticuerpo–fármaco de acuerdo con la reivindicación 46, en donde dicho anticuerpo NaPi2b comprende un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:7 y un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de

SEQ ID NO:8.

49. El conjugado de anticuerpo–fármaco de acuerdo con la reivindicación 46, en donde dicho anticuerpo NaPi2b comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9 y una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10.

50. El conjugado de anticuerpo–fármaco de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1–22, en donde el anticuerpo se une con CD–22.

51. El conjugado de anticuerpo–fármaco de acuerdo con la reivindicación 50, en donde el anticuerpo CD–22 comprende una HVR–L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:41, una HVR–L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42, una HVR–L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:43, una HVR–H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 44, una HVR–H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:45 y una HVR–H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46.

52. El conjugado de anticuerpo–fármaco de acuerdo con la reivindicación 50, en donde dicho anticuerpo CD–22 comprende un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:47 y un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:48.

53. El conjugado de anticuerpo–fármaco de acuerdo con la reivindicación 50, en donde dicho anticuerpo CD–22 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:49 y una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 50.

54. El conjugado de anticuerpo–fármaco de acuerdo con la reivindicación 50, en donde dicho anticuerpo CD–22 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 95% de identidad de

secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:49 y que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 95% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 50.

p.p.: GENENTECH, INC.

RESUMEN

La presente invención se refiere a ligadores peptidomiméticos y sus conjugados de anticuerpo–fármaco, a composiciones farmacéuticas que los contienen y a su uso en terapia para la prevención o el tratamiento de cáncer.