

PÉPTIDOS MODIFICADOS DE AURISTATINA

PC71886-Spec-PCT-26-OCT-2012

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

5 Esta solicitud reclama los beneficios de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos No. 61/561,255 presentada el 17 de noviembre de 2011, y la Solicitud Provisional de los Estados Unidos No. 61/676,423 presentada el 27 de julio de 2012, las cuales están incorporadas a la presente mediante
10 referencia en su totalidad.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

15 La presente invención está dirigida a compuestos en base a polipéptidos novedosos útiles como cargas útiles en conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC's, por sus siglas en inglés). La presente invención se refiere además a composiciones que incluyen los compuestos útiles antes mencionados, para tratar condiciones patológicas que incluyen cáncer.

20

ANTECEDENTES

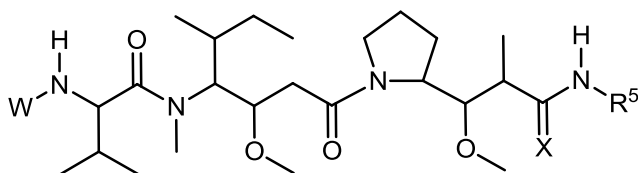
25 Las auristatinas son derivados del producto natural

dolastatina 10. Las auristatinas representativas incluyen MMAE (N-metilvalin-valin-dolaisoleuin-dolaproin-norefedrina) y MMAF (N-metilvalin-valin-dolaisoleuin-dolaproin-fenilalanina). Sin embargo, existe la necesidad de auristatinas adicionales con propiedades
5 mejoradas.

BREVE DESCRIPCIÓN

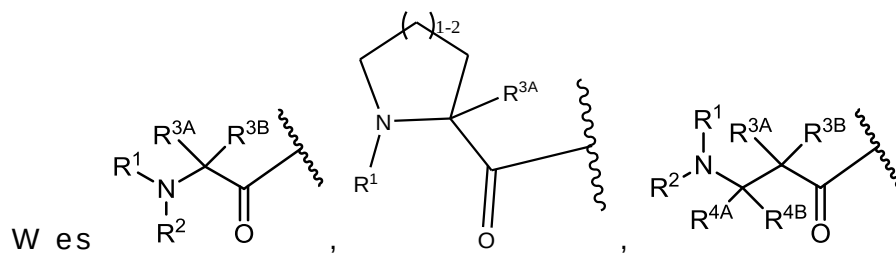
10

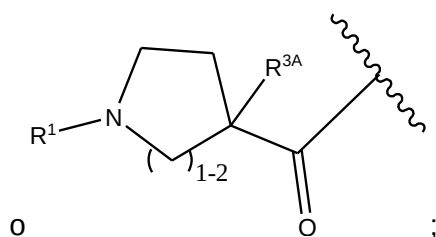
La presente invención se refiere a pentapéptidos citotóxicos representados por la fórmula I:



15

o una sal farmacéuticamente aceptable o solvato de los mismos, en donde, de modo independiente para cada ocurrencia,



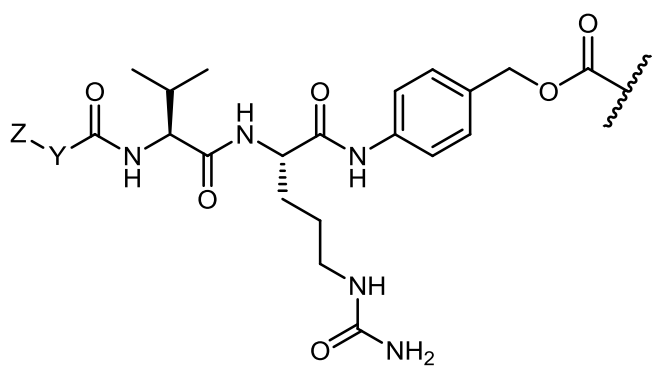
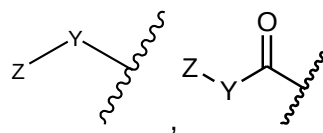


R¹ es hidrógeno, C₁-C₈ alquilo, C₁-C₈ haloalquilo, o R¹ es un

ligado

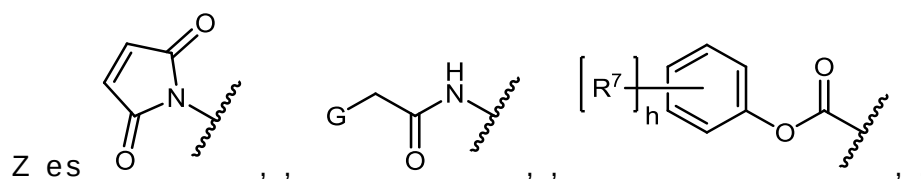
tal

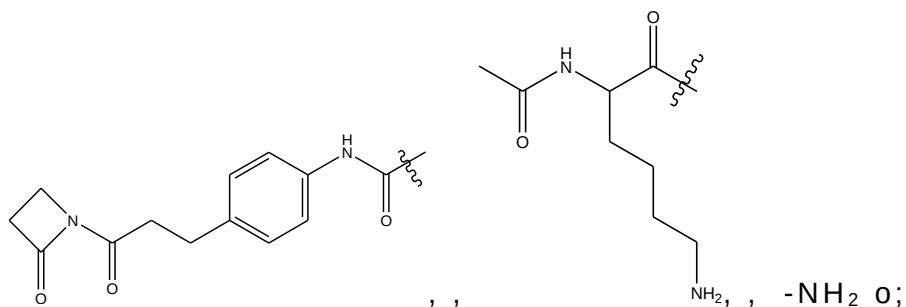
como



5 Y es -C₂-C₂₀ alquilenos, -C₂-C₂₀ heteroalquilenos, C₃-C₈ carbociclo-, -arileno-, -C₃-C₈heterociclo-, -C₁-C₁₀ alquilenos-arileno-, -arileno-C₁-C₁₀alquilenos-, -C₁-C₁₀alquilenos-(C₃-C₈carbociclo)-, -(C₃-C₈carbociclo)-C₁-C₁₀alquilenos-, -C₁-C₁₀alquilenos-(C₃-C₈heterociclo)- o -(C₃-C₈ heterociclo)-C₁-C₁₀alquilenos;

10





G es halógeno, -OH, -SH o -S-C₁-C₆ alquilo;

R² es hidrógeno, C₁-C₈ alquilo o C₁-C₈ haloalquilo;

5 R^{3A} y R^{3B} están definidos como cualquiera de los siguientes:

(i) R^{3A} es hidrógeno, C₁-C₈ alquilo, C₁-C₈ haloalquilo, C₃-C₈ carbociclilo, C₁-C₁₀ heterociclilo, arilo, heteroaralquilo, aralquilo o halógeno; y

10 R^{3B} es C₁-C₈ alquilo, C₁-C₈ haloalquilo, C₃-C₈ carbociclilo, C₁-C₁₀ heterociclilo, arilo, heteroaralquilo, aralquilo o halógeno; o

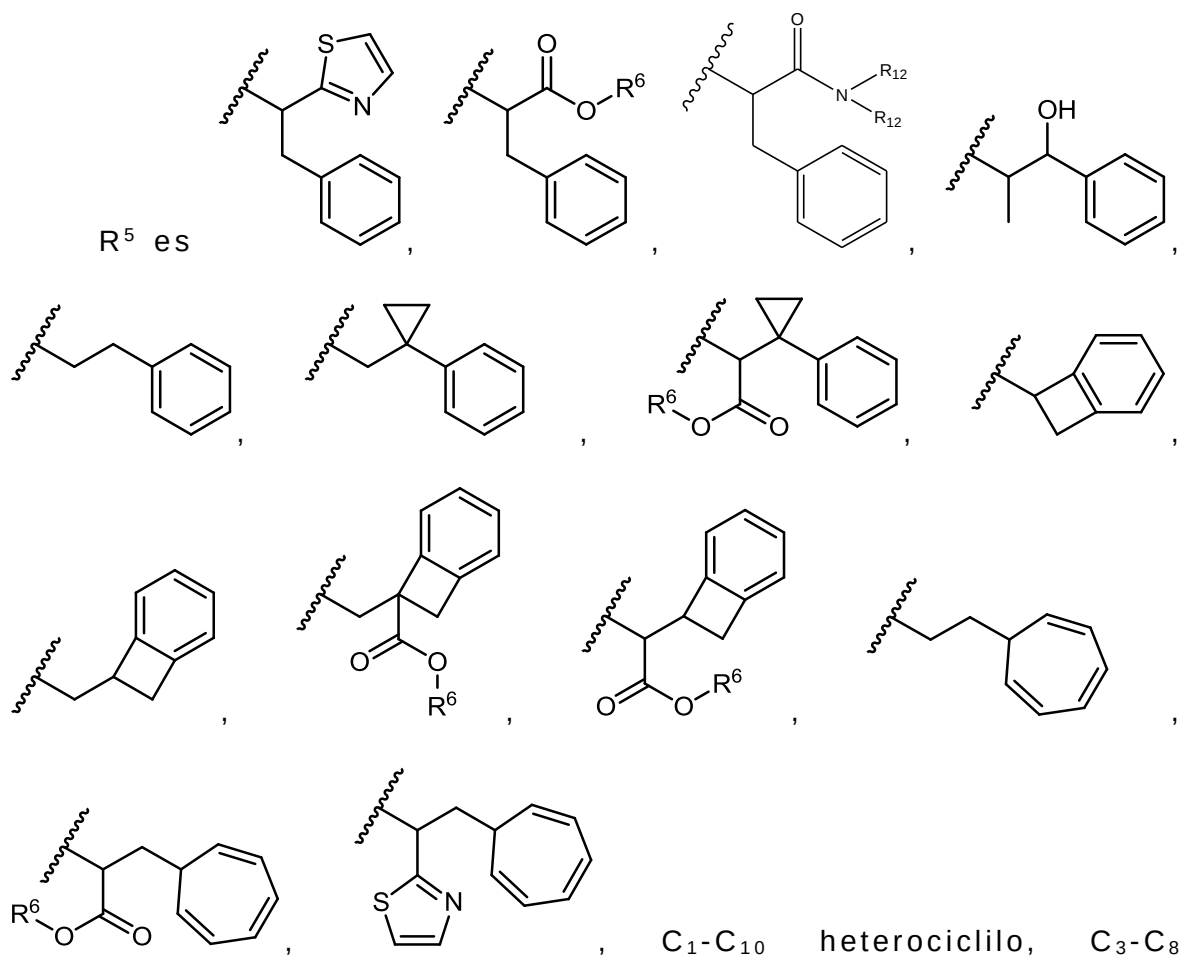
(ii) R^{3A} y R^{3B} tomados en conjunto son C₂-C₈ alquilenos o C₁-C₈ heteroalquilenos;

R^{4A} y R^{4B} están definidos como cualquiera de los siguientes:

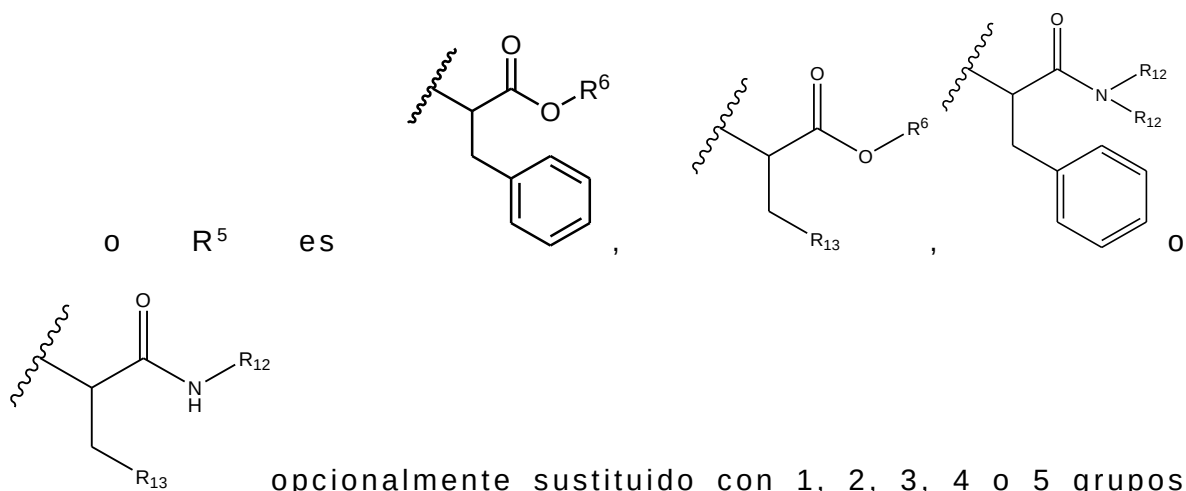
15 (i) R^{4A} es hidrógeno, C₁-C₈ alquilo, C₁-C₈ haloalquilo, C₃-C₈ carbociclilo, C₁-C₁₀ heterociclilo, arilo, heteroaralquilo o aralquilo; y

R^{4B} es hidrógeno, C₁-C₈ alquilo, C₁-C₈ haloalquilo, C₃-C₈ carbociclilo, C₁-C₁₀ heterociclilo, arilo, heteroaralquilo o aralquilo; o

20 (ii) R^{4A} y R^{4B} tomados en conjunto son C₂-C₈ alquilenos o C₁-C₈ heteroalquilenos;



- 5 carbociclilo y C_6-C_{14} arilo opcionalmente sustituido con 1, 2, 3, 4 o 5 grupos seleccionados de manera independiente a partir del grupo que consta de $-C_1-C_8$ alquilo, $-C_1-C_8$ alquil- $N(R')_2$, $-C_1-C_8$ alquil- $C(O)R'$, $-C_1-C_8$ alquil- $C(O)OR'$, $-O-(C_1-C_8$ alquil), $-C(O)R'$, $-OC(O)R'$, $-C(O)OR'$, $-C(O)N(R')_2$, $-NHC(O)R'$, $-S(O)_2R'$, $-S(O)R'$, $-OH$, halógeno,
- 10 $-N_3$, $-N(R')_2$, $-CN$, $-NHC(=NH)NH_2$, $-NHCONH_2$, $-S(=O)_2R'$ y $-SR'$, en donde cada R' es seleccionado de manera independiente a partir del grupo que consta de hidrógeno, C_1-C_8 alquilo y arilo no sustituido, o dos R' pueden, junto con el nitrógeno al cual se unen, formar un C_1-C_{10} heterociclilo;



seleccionados de manera independiente a partir del grupo que consta
 de C₁-C₈ alquilo, -C₁-C₈ alquil-N(R')₂, -C₁-C₈ alquil-C(O)R', -C₁-C₈
 5 alquil-C(O)OR', -O-(C₁-C₈ alquil), -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR',
 -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, halógeno, -N₃,
 -N(R')₂, -CN, -NHC(=NH)NH₂, -NHCONH₂, -S(=O)₂R', -SR' y arileno-
 R', en donde cada R' es seleccionado de manera independiente a
 partir del grupo que consta de hidrógeno, C₁-C₈ alquilo, C₁-
 10 C₈heterociclilo, C₁-C₁₀alquilenio-C₃-C₈heterociclilo and arilo, o dos R'
 pueden, junto con el nitrógeno al cual se unen, formar un C₁-C₁₀
 heterociclilo;

R⁶ es hidrógeno, -C₁-C₈ alquilo, -C₂-C₈ alquenilo, -C₂-C₈
 alquinilo o -C₁-C₈ haloalquilo;

15 R¹² es hidrógeno, C₁-C₄ alquilo, C₁-C₁₀ heterociclilo o C₆-C₁₄
 arilo;

R¹³ es C₁-C₁₀ heterociclilo; y

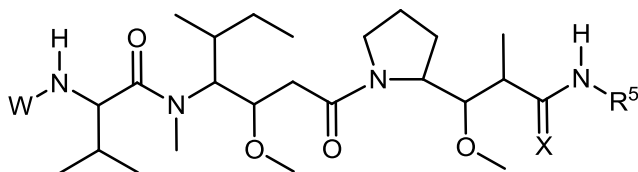
R⁷ es F, Cl, I, Br, NO₂, CN y CF₃;

h es 1, 2, 3, 4 o 5; y

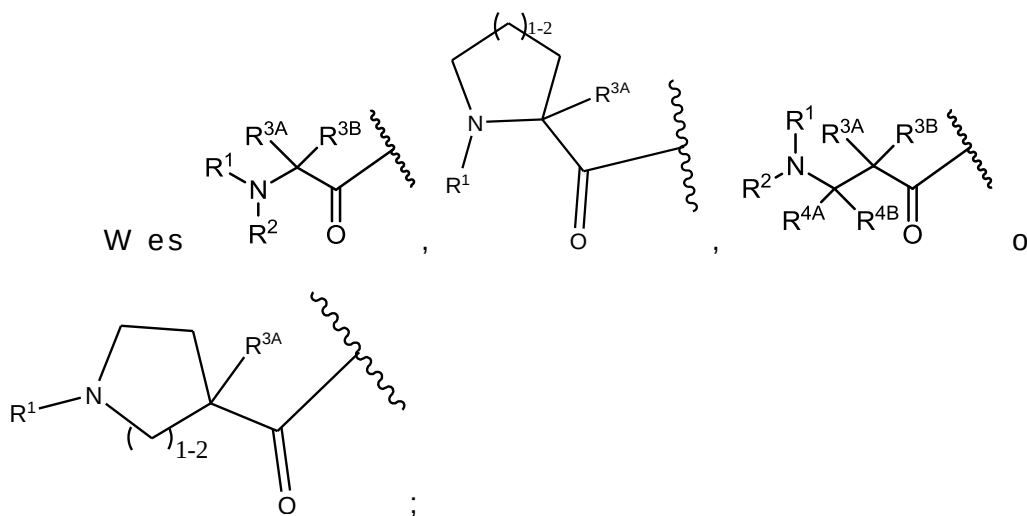
20 X es O o S;

a condición de que cuando R^{3A} es hidrógeno X es S.

La presente invención se refiere a pentapéptidos citotóxicos representados por la fórmula:



- 5 o una sal farmacéuticamente aceptable o solvato de los mismos, en donde, de modo independiente para cada ocurrencia,



R^1 es hidrógeno, C_1 - C_8 alquilo o C_1 - C_8 haloalquilo;

- 10 R^2 es hidrógeno, C_1 - C_8 alquilo o C_1 - C_8 haloalquilo;

R^{3A} y R^{3B} están definidos como cualquiera de los siguientes:

- (i) R^{3A} es hidrógeno, C_1 - C_8 alquilo, C_1 - C_8 haloalquilo, C_3 - C_8 carbociclilo, C_1 - C_{10} heterociclilo, arilo, heteroaralquilo, aralquilo o halógeno; y

- 15 R^{3B} es C_1 - C_8 alquilo, C_1 - C_8 haloalquilo, C_3 - C_8 carbociclilo, C_1 - C_{10} heterociclilo, arilo, heteroaralquilo, aralquilo, halógeno o hidrógeno; o

(ii) R^{3A} y R^{3B} tomados en conjunto son C_2-C_8 alquilenos o C_1-C_8 heteroalquilenos;

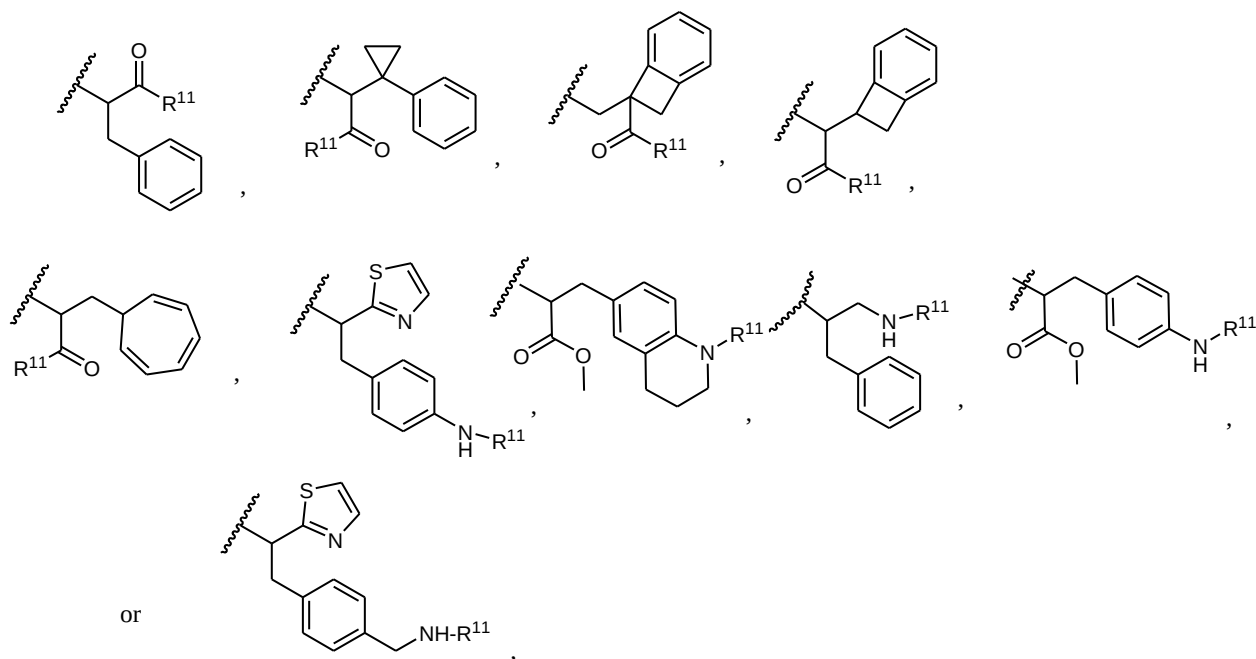
R^{4A} y R^{4B} están definidos como cualquiera de los siguientes:

(i) R^{4A} es hidrógeno, C_1-C_8 alquilo, C_1-C_8 haloalquilo, C_3-C_8 carbociclilo, C_1-C_{10} heterociclilo, arilo, heteroaralquilo o aralquilo; y

R^{4B} es hidrógeno, C_1-C_8 alquilo, C_1-C_8 haloalquilo, C_3-C_8 carbociclilo, C_1-C_{10} heterociclilo, arilo, heteroaralquilo o aralquilo; o

(ii) R^{4A} y R^{4B} tomados en conjunto son C_2-C_8 alquilenos o C_1-C_8 heteroalquilenos;

R^5 es

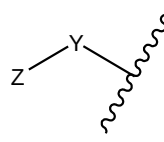
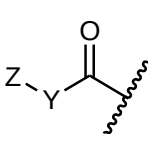


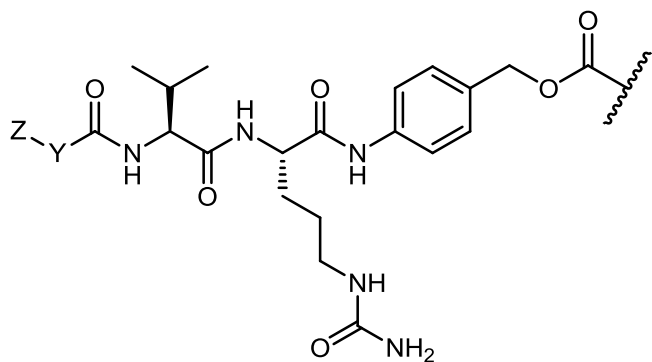
15 opcionalmente sustituido con 1, 2, 3, 4 o 5 grupos seleccionados de manera independiente a partir del grupo que consta de C_1-C_8 alquilo, $-O-(C_1-C_8$ alquilo), $-C(O)R'$, $-OC(O)R'$, $-C(O)OR'$, $-C(O)NH_2$,

-C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, halógeno, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂, -CN, -NHC(=NH)NH₂, -NHCONH₂, -S(=O)₂R' y -SR', en donde cada R' es seleccionado de manera independiente a partir del grupo que consta de hidrógeno,

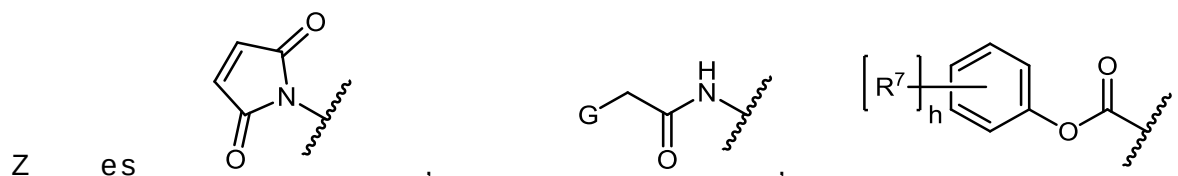
5 C₁-C₈ alquilo y arilo no sustituido;

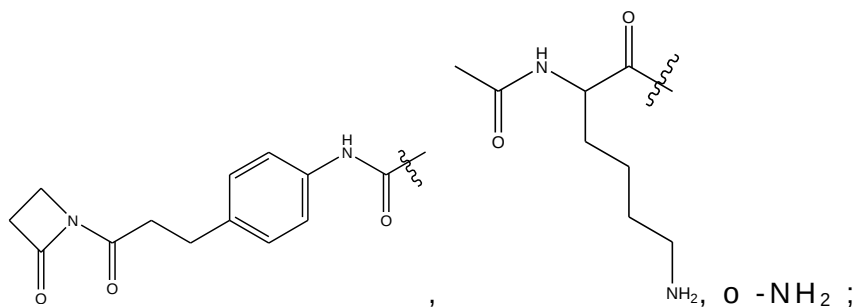
R¹¹ es hidrógeno, C₁-C₈ alquilo, C₁-C₈ haloalquilo, o R¹¹

es un ligador tal como ,  o



Y es C₂-C₂₀ alquilenos o C₂-C₂₀ heteroalquilenos; C₃-C₈ carbociclo-, -arileno-, -C₃-C₈ heterociclo-, -C₁-C₁₀ alquilenos-arileno-, -arileno-C₁-C₁₀ alquilenos-, -C₁-C₁₀ alquilenos-(C₃-C₈ carbociclo)-, -(C₃-C₈ carbociclo)-C₁-C₁₀ alquilenos-, -C₁-C₁₀ alquilenos-(C₃-C₈ heterociclo)-, o -(C₃-C₈ heterociclo)-C₁-C₁₀ alquilenos-;





G es halógeno, -OH, -SH o -S-C₁-C₆ alquilo;

R⁷ es F, Cl, I, Br, NO₂, CN y CF₃;

5 h es 1, 2, 3, 4 o 5; y

X es O o S.

Otro aspecto de la invención se refiere a composiciones farmacéuticas que incluyen una cantidad efectiva de cualquiera de los compuestos antes mencionados y un excipiente o vehículo
10 farmacéuticamente aceptable.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método para utilizar una cantidad efectiva de cualquiera de los compuestos antes citados para tratar el cáncer mediante la administración a un paciente que necesita de la misma, de una cantidad efectiva de dicho
15 compuesto.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método para tratar el cáncer en donde el cáncer incluye un tumor, metástasis, u otra enfermedad o padecimiento caracterizado por el crecimiento celular descontrolado en donde el cáncer es seleccionado a partir del grupo
20 que consta de carcinomas de la vejiga, mama, cervix, colon, gliomas, endometrio, riñón, pulmón, esófago, ovario, próstata, páncreas, melanoma, estómago y testículos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra una gráfica de actividad anti-tumoral de cuatro conjugados (cada uno administrado a 1 mk/kg, Q4dx4) graficada como volumen de tumor en función del tiempo.

La Figura 2 muestra una gráfica de actividad anti-tumoral de seis conjugados (cada uno administrado a 1 mk/kg, Q4dx4) graficada como volumen de tumor tratado con fármaco/ volumen de tumor tratado con vehículo en función del tiempo.

La Figura 3 muestra los resultados de la prueba de H(C)-#54 y H(C)-vcMMAE a 1 mg/kg s.

Las Figuras 4A, 4B y 4C muestran [A] resultados de la prueba de H(C)-#54 y H(K)-MCC-DM1 en un modelo de tamizado in vivo de xenoinjerto de ratón MDA-MB-361-DYT2; [B] resultados de la prueba de H(C)-vcMMAE y H(C)-mcMMAF en un modelo de tamizado in vivo de xenoinjerto de ratón MDA-MB-361-DYT2; [C] una comparación de T/C calculado para los cuatro conjugados. Los ratones fueron tratados q4dx4, iniciando en el día 1.

Las Figuras 5A, 5B, 5C, 5D, 5E y 5F muestran los resultados de respuesta de dosis de la prueba [A] H(C)-#D54, [B] H(C)-vcMMAE, [C] H(C)-mcMMAF y [D] H(K)-MCC-DM1 en un modelo in vivo de xenoinjerto de ratón; [E] una comparación

de H(C)-#D54 y H(C)-vcMMAE; y [F] una comparación de T/C para los cuarto conjugados. Los ratones fueron tratados q4dx4, iniciando el día 1.

La Figura 6 muestra los resultados de respuesta de dosis de la prueba H(C)-#A115 a 1 mpk, 3 mpk y 10 mpk, en un modelo in vivo de xenoinjerto de ratón N87. Los ratones fueron tratados q4dx4, iniciando en el día 1.

La Figura 7 muestra datos que comparan anticuerpo hu08 humanizado conjugado para vc-0101 o mc-3377, probado en un modelo de xenoinjerto in vivo con células PC3MM2, una línea celular de próstata humana que expresa el receptor IL-13R α 2.

Las Figuras 8A a E muestran [A] la eficacia de ADCs anti-Notch quiméricos rata-humano dosificado a 5mg/kg en xenoinjertos de pulmón HCC2429; [B y C] la eficacia de ADCs anti-Notch quiméricos rata-humano dosificado a 5mg/kg en xenoinjertos de mama MDA-MB-468; [D y E] la eficacia de ADCs anti-Notch quiméricos rata-humano dosificado a 5mg/kg en xenoinjerto gástrico N87.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

20

La presente invención está dirigida a pentapéptidos citotóxicos, , y a métodos para utilizar los mismos a fin de tratar el cáncer y otras condiciones patológicas. La invención se refiere también a métodos para utilizar dichos compuestos y/o conjugados in vitro, in situ e in vivo para la detección, diagnóstico o tratamiento de células

25

de mamífero, o condiciones patológicas asociadas.

Definiciones y Abreviaturas

5 A menos de que se establezca de otro modo, los
siguientes términos y frases como se utilizan en la presente
están destinados a tener los siguientes significados. Cuando se
usen nombres de marcas en la presente, las marcas incluyen la
formulación del producto, el fármaco genérico y el o los
10 ingredientes farmacéuticos activos del producto de la marca, a
menos de que el contexto indique lo contrario.

El término “anticuerpo” (o “Ab”) se utiliza en la presente
en el sentido más amplio y cubre de manera específica
anticuerpos monoclonales intactos, anticuerpos policlonales,
15 anticuerpos monoespecíficos, anticuerpos multiespecíficos (por
ejemplo, anticuerpos biespecíficos), y fragmentos de anticuerpo
que exhiben la actividad biológica deseada. Un anticuerpo
intacto tiene principalmente dos regiones: una región variable y
una región constante. La región variable se enlaza a e
20 interactúa con un antígeno de objetivo. La región variable
incluye una región de determinación complementaria (CDR) que
reconoce y se enlaza a un sitio de enlace específico en un
antígeno particular. La región constante puede ser reconocida
por e interactuar con el sistema inmune (véase por ejemplo,
25 Janeway et al., 2001, Immuno. Biology, 5th Ed., Garland

Publishing, New York). Un anticuerpo puede ser de cualquier tipo o clase (por ejemplo IgG, IgE, IgM, IgD e IgA) o subclase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2). El anticuerpo puede ser derivado a partir de cualesquiera especies adecuadas. En ciertas
5 modalidades, el anticuerpo es de origen humano o de murino. Un anticuerpo puede ser, por ejemplo, humano, humanizado o quimérico.

Los términos “se enlaza específicamente” y “que enlaza de manera específica” se refieren a un anticuerpo que se enlaza a un antígeno predeterminado. De manera común, el anticuerpo se enlaza
10 con una afinidad de por lo menos $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, y se enlaza al antígeno predeterminado con una afinidad que es por lo menos dos veces mayor que su afinidad para enlace a un antígeno no específico (por ejemplo, BSA, caseína) distinto al antígeno predeterminado o un antígeno estrechamente relacionado.

15 El término “anticuerpo monoclonal” como se usa en la presente se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto para mutaciones de presencia natural posibles que pueden estar
20 presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, son dirigidos contra un sitio antigénico individual. El modificador “monoclonal” indica el carácter del anticuerpo como es obtenido a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se interpretará que
25 requiere de la producción del anticuerpo a través de ningún método

particular.

El término “anticuerpos monoclonales” incluye de manera específica anticuerpos “quiméricos” en los cuales una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica a u homóloga con la
5 secuencia correspondiente de anticuerpos derivados a partir de una especie particular o que pertenece a una clase o subclase de anticuerpo particular, en tanto que el resto de la(s) cadena(s) es(son) idéntica(s) a u homóloga(s) con las secuencias correspondientes de anticuerpos derivados a partir
10 de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, en tanto que exhiban la actividad biológica deseada.

Como se usa en la presente, “H(C)-” se refiere a trastuzumab (marca HERCEPTIN®) que es un anticuerpo
15 monoclonal que interfiere con el receptor HER2/neu, enlazado a través de una de sus cistinas al compuesto de la invención. Como se utiliza en la presente “H(K)-” se refiere a trastuzumab que es un anticuerpo monoclonal que interfiere con el receptor HER2/neu, enlazado a través de una de sus ' lisinas al
20 compuesto de la invención.

Un “anticuerpo intacto” es uno que comprende una región variable de enlace de antígeno así como un dominio constante de cadena ligera (C_L), y dominios constantes de cadena pesada, C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} Y C_{H4} , según resulte adecuado para la
25 clase de anticuerpo. Los dominios constantes pueden ser

dominios constantes de secuencia nativa (por ejemplo, dominios constantes de secuencia nativa humana) o variantes de secuencia de aminoácido de los mismos.

Un anticuerpo intacto puede tener una o más “funciones
5 efectoras”, las cuales se refieren a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc (por ejemplo, una región Fc de secuencia nativa o una región Fc variante de secuencia de aminoácido) de un anticuerpo. Ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluyen citotoxicidad dependiente complementaria, citotoxicidad célula-
10 mediada dependiente de anticuerpo (ADCC) y fagocitosis célula-mediada dependiente de anticuerpo.

Un “fragmento de anticuerpo” comprende una porción de un anticuerpo intacto, que comprende de preferencia en enlace-antígeno o región variable del mismo. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo
15 incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpo de cadena sencilla, scFv, scFv-Fc, fragmentos de anticuerpo multiespecíficos formados a partir de fragmento(s) de anticuerpo, un fragmento(s) producido por medio de una biblioteca de expresión
20 Fab, o fragmentos de enlace de epítipo de cualquiera de los anteriores cuyo inmuno se enlaza de manera específica a un antígeno de objetivo (por ejemplo, un antígeno de célula cancerígena, un antígeno viral o un antígeno microbial).

El término “variable” en el contexto de un anticuerpo se refiere
25 a ciertas porciones de los dominios variables del anticuerpo que

difieren extensivamente en secuencia y son usados en el enlace y especificidad de cada anticuerpo particular para su antígeno particular. Esta variabilidad está concentrada en tres segmentos llamados “regiones hipervariables” en los dominios variables de cadena ligera y de cadena pesada. Las porciones más altamente conservadas de los dominios variables reciben el nombre de regiones de estructura (FRs). Cada uno de los dominios variables de las cadenas pesada y ligera nativas comprende cuatro FRs conectadas por tres regiones hipervariables.

El término “región hipervariable” cuando se utiliza en la presente se refiere a los residuos de aminoácido de un anticuerpo que son responsables del enlace de antígeno. La región hipervariable comprende por lo general residuos aminoácido a partir de una “región de determinación complementaria” o “CDR” (por ejemplo, residuos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (L3) en el dominio variable de cadena pesada; Kabat et al. (Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)) y/o aquellos residuos a partir de un “bucle hipervariable” (por ejemplo, residuos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de cadena pesada. Chothia y Lesk,

1987, J. Mol Biol. 196:901-917). Los residuos FR son aquellos residuos de dominio variable distintos a los residuos de región hipervariable como se definirá más adelante.

Un fragmento de anticuerpo “Fv de cadena sencilla” o “scFV”
5 comprende los dominios V.sub.H y V.sub.L de un anticuerpo, en donde estos dominios están presentes en una cadena de polipéptido sencilla. De manera común, el polipéptido Fv comprende además un ligador polipéptido entre los dominios V.sub.H y V.sub.L lo que permite que el scFv forme la estructura deseada para enlace de
10 antígeno. Para una revisión de scFv, véase Pluckthun in –the Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg y More eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994).

El término “diacuerpo” se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpo con dos sitios de enlace de antígeno, cuyos fragmentos
15 comprenden un dominio pesado variable (V_H) conectado a un dominio ligero variable (V_L) en la misma cadena de polipéptido. Mediante el uso de un ligador que es demasiado corto a fin de permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios son forzados a aparearse con los dominios
20 complementarios de otra cadena y crear dos sitios de enlace de antígeno. Los diacuerpos se describen de modo más completo, por ejemplo, en EP 0 404 097; WO 93/11161; y Hollinger et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448.

Las formas “humanizadas” de anticuerpos no humanos (por
25 ejemplo, roedores) son anticuerpos quiméricos que contienen

secuencia mínima derivada a partir de inmunoglobulina no humana. Casi en su totalidad, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en cuyos residuos a partir de una región hipervariable del receptor son
5 remplazados por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donador) tales como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En ciertos casos, los residuos de región e estructura (FR) de la inmunoglobulina humana son
10 remplazados por residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no son encontrados en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donador. Estas modificaciones se hacen para refinar de modo adicional el rendimiento de anticuerpo. En
15 general, el anticuerpo humanizado comprenderá de manera sustancial por lo menos uno, y comúnmente dos, dominios variables, en los cuales todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a aquellos de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas
20 las FRs son aquellas de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado comprenderá también de manera opcional al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), de forma común aquella de una inmunoglobulina humana. Para detalles adicionales, véase
25 Jones et al, 1986, Nature 321:522-525; Riechmann et al, 1988,

Nature 332-323-329; y Presta, 1992, Curr, Op. Struct. Biol. 2:593-596.

Como se usa en la presente “aislado” significa separado de los otros componentes de (a) una fuente natural, como una célula
5 vegetal o animal o cultivo celular, o (b) una mezcla de reacción química orgánica sintética. Como se utiliza en la presente, “purificado” representa que, cuando se aísla, el aislado contiene por lo menos 95% y en otro aspecto al menos 98% de un compuesto (por ejemplo, un conjugado) en peso del aislado.

10 Un anticuerpo “aislado” es uno que ha sido identificado y separado y/o recubierto a partir de un componente de su ambiente natural. Los componentes contaminantes de su ambiente natural son materiales que interferirían con el diagnóstico o los usos terapéuticos para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas
15 y otros solutos proteináceos o no proteináceos. En modalidades preferidas, el anticuerpo será purificado (1) hasta más de 95% en peso de anticuerpo según se determinó a través del método de Lowry y, de mayor preferencia hasta 99% en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener para obtener al menos 15 residuos de
20 secuencia N-terminal o aminoácido interna a través del uso de un secuenciador de taza giratoria, o (3) hasta homogeneidad mediante SDS-PAGE bajo condiciones de reducción o sin reducción utilizando azul de Coomasie o, de preferencia, tinción de plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo in situ dentro de células recombinantes
25 ya que por lo menos un componente del ambiente natural del

anticuerpo no estará presente. Sin embargo, de modo ordinario, el anticuerpo aislado será preparado a través de por lo menos una etapa de purificación.

Un anticuerpo que “induce apoptosis” es uno que induce la muerte celular programada como se determinó mediante el enlace de anexina V, fragmentación de ADN, contracción celular, dilatación del retículo endoplásmico, fragmentación celular y/o formación de vesículas de membrana (llamadas cuerpos apoptóticos). La célula es una célula tumoral, por ejemplo, una célula de mama, ovario, estómago, endometrial, glándula salival, pulmón, riñón, colon, tiroides, páncreas o vejiga. Están disponibles varios métodos para evaluar los eventos celulares asociados con la apoptosis. Por ejemplo, la translocación de fosfatidil serina (PS) puede ser medida a través del enlace de anexina; la fragmentación de ADN puede ser evaluada a través de encadenamiento de ADN; y la condensación nuclear/de cromatina junto con la fragmentación de ADN se pueden evaluar por medio de cualquier incremento en las células hipodiploides.

El término “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a una cantidad de un fármaco efectiva para tratar una enfermedad o padecimiento en un mamífero. En el caso del cáncer, la cantidad terapéuticamente efectiva del fármaco puede reducir el número de células cancerígenas; reducir el tamaño del tumor; inhibir (es decir, desacelerar hasta cierto

grado y de preferencia detener) la infiltración celular cancerígena en los órganos periféricos; inhibir (es decir, desacelerar hasta cierto grado y de preferencia detener) la metástasis del tumor; inhibir, hasta cierto grado, el crecimiento tumoral; y/o aliviar hasta cierto grado uno o más de los síntomas asociados con el cáncer. Hasta el grado que el fármaco puede inhibir el crecimiento de y/o eliminar las células cancerígenas existentes, puede ser citostático y/o citotóxico. Para la terapia del cáncer, la eficacia puede, por ejemplo, se puede medir a través de la evaluación de la progresión de la enfermedad en relación con el tiempo (TTP) y/o determinación de la tasa de respuesta (RR).

El término “cantidad sustancial” se refiere a una mayoría, es decir más del 50% de una población, de una mezcla o una muestra.

El término “metabolito intracelular” se refiere a un compuesto que resulta a partir de un proceso metabólico dentro de una célula en un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC). El proceso metabólico o reacción puede ser un proceso enzimático tal como escisión proteolítica de un ligador péptido del ADC. Los metabolitos intracelulares incluyen, aunque no se limitan a, anticuerpos y fármaco libre que han experimentado escisión intracelular después de la entrada, difusión, captación o transporte dentro de la célula.

Los términos “escindido intracelularmente” y escisión intracelular” se refieren a un proceso metabólico o reacción dentro de una célula en un ADC o similar, por lo que la unión covalente, por ejemplo, el ligador, entre la porción de fármaco y el anticuerpo se

rompe, resultando en el fármaco libre, u otro metabolito del conjugado disasociado desde el anticuerpo dentro de la célula. Las porciones escindidas del ADC son por tanto metabolitos intracelulares.

5 El término “biodisponibilidad” se refiere a la disponibilidad sistémica (es decir, niveles en sangre/plasma) de una cantidad determinada de un fármaco administrado a un paciente. La biodisponibilidad es un término absoluto que indica la medición tanto del tiempo (velocidad) como de la
10 cantidad total (extensión) del fármaco que alcanza la circulación general a partir de una forma de dosis administrada.

 El término “actividad citotóxica” se refiere a un efecto de eliminación celular, citostático o anti-proliferativo de un ADC o un metabolito intracelular de dicho ADC. La actividad citotóxica
15 puede ser expresada como el valor IC_{50} , el cual es la concentración (molar o masa) por unidad de volumen en cuya mitad sobreviven las células.

 Un “padecimiento” es cualquier condición que se mejoraría a partir del tratamiento con un fármaco o conjugado
20 anticuerpo-fármaco. Este incluye padecimientos o enfermedades crónicas y agudas que incluyen aquellas condiciones patológicas que predisponen a un mamífero al padecimiento en cuestión. Ejemplos no limitantes de padecimientos que serán tratados en la presente incluyen
25 cánceres benignos y malignos; leucemia y malignidades

linfoides, padecimientos neuronales, gliales, astrocitales, hipotalámicos y otro glandulares, macrofágicos, epiteliales, estromales y de blastocèle; y padecimientos inflamatorios, angiogénicos e inmunológicos.

5 El término “cáncer” y “canceroso” se refieren a o describen la condición fisiológica o padecimiento en mamíferos que comúnmente está caracterizado por crecimiento celular no regulado. Un “tumor” comprende una o más células cancerígenas.

Ejemplos de un “paciente” incluye, aunque no se limitan a, un
10 ser humano, rata, ratón, cobayo, mono, cerdo, cabra, vaca, caballo, perro, gato, ave y aves de corral. En una modalidad ilustrativa, el paciente es un ser humano.

Los términos “tratar” o “tratamiento”, a menos de que se indique lo contrario mediante el contexto, se refieren a tratamiento
15 terapéutico y medidas profilácticas para evitar recaída, en donde el objeto es inhibir o desacelerar (reducir) un cambio fisiológico o padecimiento indeseable, tal como el desarrollo o diseminación del cáncer. Para los fines de esta invención, los resultados benéficos o deseados incluyen, aunque no se limitan a, alivio de síntomas,
20 reducción de la extensión de la enfermedad, estado estabilizado de la enfermedad (es decir, que no empeore), retraso o desaceleración del avance de la enfermedad, mejoramiento o paliación del estado de la enfermedad, y remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o no detectable. “Tratamiento” puede significar también prolongar la
25 sobrevivencia en comparación con la sobrevivencia esperada en caso

de no recibir el tratamiento. Aquellos que necesitan de tratamiento incluyen a quienes ya tienen las condiciones o padecimiento así como quienes son propensos a tener la condición o padecimiento.

5 En el contexto del cáncer, el término “tratar” incluye cualquiera o todos de la inhibición de crecimiento de las células tumorales, células cancerígenas, o de un tumor; inhibir la replicación de células cancerosas o células cancerígenas, reducir la carga tumoral general o reducir el número de células
10 cancerosas, y mejorar uno o más de los síntomas asociados con la enfermedad.

 En el contexto de la enfermedad autoinmune, el término “tratar” incluye cualquiera o todos de inhibir la replicación de las células asociadas con el estado de enfermedad autoinmune
15 que incluye, aunque no se limita a, células que producen un anticuerpo autoinmune, reducir la carga de anticuerpo-autoinmune y mejorar uno o más de los síntomas de una enfermedad autoinmune.

 En el contexto de una enfermedad infecciosa, el término
20 “tratar” incluye cualesquiera o todos de: inhibir el crecimiento, multiplicación o replicación del patógeno que ocasiona la enfermedad infecciosa y mejorar uno o más de los síntomas de una enfermedad infecciosa.

 El término “inserto de paquete” se utiliza para referirse a
25 instrucciones comúnmente incluidas en los empaques

comerciales de productos terapéuticos, que contienen información acerca de la(s) indicación(es), uso, dosificación, administración, contraindicaciones y/o advertencias concernientes al uso de dichos productos terapéuticos.

5 Como se utilizan en la presente, los términos “célula”, “línea celular” y “cultivo celular” se emplean de manera intercambiable y tales designaciones incluyen progenie. Las palabras “transformantes” y “células transformadas” incluyen la célula primaria y los cultivos o progenie derivados de las mismas sin consideración del número de
10 transferencias. Se comprende también que no toda la progenie puede ser precisamente idéntica en el contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o inadvertidas. Se incluye la progenie mutante que tiene la misma función o actividad biológica como fue tamizada en la célula originalmente transformada. Cuando se
15 pretendan designaciones distintas, será evidente a partir del contexto.

A menos de que se indique de otro modo, el término “alquilo” en si mismo o como parte de otro término se refiere a un hidrocarburo saturado de cadena recta o ramificada, que tiene el
20 número indicado de átomos de carbono (por ejemplo, “C₁-C₈” alquilo se refiere a cualquier grupo alquilo que tiene de 1 hasta 8 átomos de carbono). Cuando el número de átomos de carbono no está indicado, el grupo alquilo tiene desde 1 hasta 8 átomos de carbono. Los C₁-C₈ alquilos de cadena recta representativos incluyen, aunque no se
25 limitan a metilo, etilo, n-propilo, n-butilo, n-pentilo, n-hexilo, n-

heptilo y n-octilo; entretanto los C_1 - C_8 alquilos ramificados incluyen, aunque no se limitan a, -isopropilo, -sec-butilo, -isobutilo, -tert-butilo, -isopentilo, y -2-metilbutilo; los C_1 - C_8 alquilos insaturados incluyen, aunque no se limitan a vinilo, alilo, 1-butenilo, 2-butenilo, isobutenilo, 1-pentenilo, 2-pentenilo, 3-metil-1-butenilo, 2-metil-2-butenilo, 2,3-dimetil-2-butenilo, 1-hexilo, 2-hexilo, 3-hexilo, acetilenilo, propinilo, 1-butenilo, 2-butenilo, 1-pentinilo, 2-pentinilo y 3-metil-1-butenilo.

A menos de que se indique de otro modo, “alquilenos”, en si mismo o como parte de otro término, se refiere a un radical hidrocarburo cíclico de cadena recta o ramificada, saturado del número establecido de átomos de carbono, de manera común 1-18 átomos de carbono y que tiene dos centros radicales monovalentes derivados mediante la remoción de dos átomos de hidrógeno a partir de los mismos o dos diferentes átomos de carbono de un alcano padre. Los radicales alquilenos comunes incluyen, aunque no se limitan a: metileno ($-CH_2-$), 1,2-etileno ($-CH_2CH_2-$), 1,3-propileno ($-CH_2CH_2CH_2-$), 1,4-butileno ($-CH_2CH_2CH_2CH_2-$), y similares. Un alquilenos de cadena recta “ C_1 - C_{10} ” es un grupo hidrocarburo saturado, de cadena recta de la fórmula $-(CH_2)_{1-10}-$. Ejemplos de un C_1 - C_{10} alquilenos incluye metileno, etileno, propileno, butileno, pentileno, hexileno, heptileno, octileno, nonileno y decaleno.

A menos de que se indique de otro modo, el término “heteroalquilo”, por si mismo o en combinación con otro término

significa, a menos de que se establezca lo contrario, un hidrocarburo de cadena recta o ramificada estable, o combinaciones del mismo, completamente saturado o que contiene desde 1 hasta 3 grados de insaturación, que consta del número establecido de átomos de carbono y desde uno hasta tres heteroátomos seleccionados a partir del grupo que comprende O, N, Si y S, y en donde los átomos de nitrógeno y azufre pueden ser oxidados de manera opcional y el heteroátomo de nitrógeno puede ser cuaternizado opcionalmente. El(los) heteroátomo(s) O, N y S pueden ser colocados en cualquier posición interior del grupo heteroalquilo. El heteroátomo Si puede ser colocado en cualquier posición del grupo heteroalquilo, que incluye la posición en la cual el grupo alquilo es unido al resto de la molécula. Hasta dos heteroátomos pueden ser consecutivos.

A menos de que se indique lo contrario, el término “heteroalquileno” por si mismo o como parte de otro sustituyente representa a un grupo divalente derivado a partir de heteroalquilo (como se describió con anterioridad). Para grupos heteroalquileno, los heteroátomos pueden ocupar también cualquiera o ambos extremos de la cadena.

A menos de que se indique de otra manera, “arilo” por si mismo o como una parte de otro término, representa un radical hidrocarburo aromático carbocíclico monovalente sustituido o no sustituido de 6-20, de preferencia 6-14, átomos de carbono derivado mediante la remoción de un átomo de hidrógeno desde un átomo de carbono

individual de un sistema de anillo aromático padre. Los grupos arilo comunes incluyen, aunque no se limitan a, radicales derivados a partir de benceno, benceno sustituido, naftaleno, antraceno, bifenilo, y similares. Un grupo aromático carbocíclico (por ejemplo, un grupo arilo) puede ser sustituido con uno o más, de preferencia 1 a 5, de los siguientes grupos: C₁-C₈ alquilo, -O-(C₁-C₈ alquilo), -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -S(O)R', -OH, halógeno, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ y -CN; en donde cada R' es seleccionado de manera independiente a partir de -H, C₁-C₈ alquilo y arilo no sustituido. En ciertas modalidades, un grupo aromático carbocíclico sustituido puede incluir además uno o más de: -NHC(=NH)NH₂, -NHCONH₂, -S(=O)₂R' y -SR'.R'. "Arileno" es la porción divalente correspondiente.

"Alquilo sustituido" representa un alquilo en el cual uno o más de los átomos de hidrógeno son remplazados cada uno de manera independiente con un sustituyente. Los sustituyentes comunes incluyen, aunque no se limitan a, -X, -R, -O-, -OR, -SR, -S⁻, -NR₂, -NR₃, =NR, -CX₃, -CN, -OCN, -SCN, -N=C=O, -NCS, -NO, -NO₂, =N₂, -N₃, -NRC(=O)R, -C(=O)NR₂, -SO₃⁻, -SO₃H, -S(=O)₂R, -OS(=O)₂OR, -S(=O)₂NR, -S(=O)R, -OP(=O)(OR)₂, -P(=O)(OR)₂, -PO₃²⁻, PO₃H₂, -AsO₂H₂, -C(=O)R, -C(=O)X, -C(=S)R, -CO₂R, -CO₂⁻, -C(=S)OR, -C(=O)SR, -C(=S)SR, -C(=O)NR₂, -C(=S)NR₂, o -C(=NR)NR₂, en donde cada X es de manera independiente un halógeno, -F, -Cl, -Br, o

-I; y cada R es de modo independiente -H, C₁-C₂₀ alquilo, C₁-C₂₀ heteroalquilo, C₆-C₂₀ arilo, C₁-C₁₀ heterociclilo, un grupo protector o una porción profármaco, grupos arilo, alquilenos y heteroalquilenos como se describió con anterioridad puede ser sustituido también de
5 manera similar.

A menos de que se indique lo contrario, "aralquilo" por si mismo o como parte de otro término, representa un grupo alquilo, como se definió con anterioridad, sustituido con un grupo arilo, como se definió antes.

10 A menos de que se indique de otro modo, "C₃-C₈ heterociclilo" en si mismo o como parte de otro término, se refiere a un sistema de anillo monocíclico o bicíclico, aromático o no aromático, sustituido o no sustituido monovalente que tiene desde 3 hasta 8 átomos de carbono (referido también como miembros de anillo) y uno a cuatro
15 miembros de anillo de heteroátomo seleccionados de manera independiente a partir de N, O, P o S, y derivados mediante la remoción de un átomo de hidrógeno desde un átomo de anillo de un sistema de anillo padre. Uno o más átomos de N, C o S en el heterociclilo pueden ser oxidados. El anillo que incluye el
20 heteroátomo puede ser aromático o no aromático. A menos de que se indique lo contrario, el heterociclilo es unido a su grupo dependiente en cualquier heteroátomo o átomo de carbono que el heterociclilo incluyen, aunque no se limitan a, tetrahidrofuranilo, osetanilo, piranilo, pirrolidinilo, piperidinilo, piperazinilo, benzofuranilo, benzotiofenona, benzotiazolilo, indolilo, benzopirazolilo, pirrolilo,
25

tiofenilo (tiofeno), furanilo, tiazolilo, imidazolilo, pirazolilo,
 triazolilo, quinolinilo, que incluyen porciones tales como
 1,2,3,4-tetrahiro-quinolinilo, pirimidinilo, piridinilo, piridonilo,
 pirazinilo, piridazinilo, isotiazolilo, tetrazolilo, epóxido, oxetano
 5 y BODIPY (sustituido o no sustituido). Un C_1-C_{10} puede ser
 sustituido hasta con siete grupos que incluyen, aunque no se
 limitan a, C_1-C_8 alquilo, C_1-C_8 heteroalquilo, $-OR'$, arilo, $-$
 $C(O)R'$, $-OC(O)R'$, $-C(O)OR'$, $-C(O)NH_2$, $-C(O)NHR'$, $-$
 $C(O)N(R')_2$, $-NHC(O)R'$, $-S(=O)_2R'$, $-S(O)R'$, halógeno, $-N_3$, $-$
 10 NH_2 , $-NH(R')$, $-N(R')_2$ y $-CN$; en donde cada R' es seleccionado
 de manera independiente a partir de $-H$, C_1-C_8 alquilo, C_1-C_8
 heteroalquilo y arilo. En ciertas modalidades, un heterociclilo
 sustituido puede incluir también uno o más de $-NHC(=NH)NH_2$, $-$
 $NHCONH_2$, $-S(=O)_2R'$ y $-SR''$. "Heterociclo" " C_1-C_{10} heterociclo"
 15 es la porción divalente correspondiente.

A menos que se indique de otra manera, "heteroalquilo"
 por si mismo o como parte de otro término, representa un grupo
 alquilo, como se definió con anterioridad, sustituido con un
 grupo heterociclilo aromático, como se definió antes.
 20 Heteroalquilo es la porción divalente correspondiente.

A menos de que se indique de otro modo, " C_3-C_8
 carbociclilo" en si mismo o como parte de otro término, es un
 anillo carbocíclico monocíclico o bicíclico no aromático,
 saturado o no saturado, sustituido o no sustituido, monovalente
 25 de 3-, 4-, 5- 6- 7- u 8- miembros derivado mediante la remoción

de un átomo de hidrógeno desde un átomo de anillo de un sistema anillo padre. El C₃-C₈ carbociclilo representativo incluye, aunque no se limita a, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclopentadienilo, ciclohexilo, ciclohexenilo, 1,3-ciclohexadienilo, 1,4-ciclohexadienilo, 5 cicloheptilo, 1,3-cicloheptadienilo, 1,3,5-cicloheptatrienilo, ciclooctilo, ciclooctadienilo, biciclo(111)pentano, y biciclo(222)octano. Un grupo C₁-C₈ carbociclilo puede ser no sustituido o sustituido con hasta siete grupos que incluyen, aunque no se limitan a, C₁-C₈ alquilo, C₁-C₈ heteroalquilo, -OR', arilo, - 10 C(O)R', -OC(O)OR', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -S(=O)₂R', -S(O)R', -OH, halógeno, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ y -CN; en donde cada R' es seleccionado de manera independiente a partir de -H, C₁-C₈ alquilo, C₁-C₈ heteroalquilo y arilo. "C₃-C₈ carbociclo" es la porción divalente correspondiente.

15 El término "quiral" se refiere a moléculas que tienen la propiedad de no superimposición del asociado de imagen de espejo, en tanto que el término "antiquiral" se refiere a moléculas que se pueden superimponer en su asociado de imagen de espejo.

El término "estereoisómeros" se refiere a compuestos que 20 tienen idéntica constitución química, aunque difieren con respecto a la disposición de los átomos o grupos en el espacio.

"Diastereómeros" se refiere a un estereoisómero con dos o más centros de quiralidad y cuyas moléculas no son imágenes de espejo una de la otra. Los diastereómeros tienen diferentes propiedades 25 físicas, por ejemplo, puntos de fusión, puntos de ebullición,

propiedades espectrales y reactividades. Las mezclas de diastereómeros pueden separarse bajo procedimientos analíticos de alta resolución tales como electroporesis y cromatografía.

5 A continuación siguen de manera general las definiciones y convenciones estereoquímicas utilizadas en la presente según S.P. Parker, Ed., McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms, McGraw-Hill Book Company, New York (1984); y Eliel y Wilen, Stereochemistry of Organic Compuestos, John Wiley & Sons, Inc., New York (1994). Muchos compuestos orgánicos
10 existen en formas ópticamente activas, es decir, tienen la habilidad de girar el plano de luz plana-polarizada. En la descripción de un compuesto ópticamente activo, los prefijos D y L, o R y S, son utilizados para denotar la configuración
15 absoluta de la molécula alrededor de su(s) centro(s) quiral(es). Los prefijos d y l (+) y (-) se emplean para designar el signo de rotación de la luz plana-polarizada mediante el compuesto, con (-) o l que significa que el compuesto es levorotatorio. Un compuesto con el prefijo (+) o d es dextrorotatorio. Para una
20 estructura química determinada, estos estereoisómeros son idénticos excepto que son imágenes de espejo unos de los otros. Un estereoisómero específico también puede ser referido como un enantiómero, y una mezcla de dichos isómeros con frecuencia recibe el nombre de mezcla enantiomérica. Una
25 mezcla 50:50 de enantiómeros es referida como una mezcla

racémica o un racemato, el cual puede estar presente cuando no ha habido una estereoselección o estereoespecificidad en una reacción o proceso químico. Los términos “mezcla racémica” y “racemato” se refieren a una mezcla equimolar de dos especies enantioméricas,
5 carente de actividad óptica.

Un “derivado” aminoácido incluye un aminoácido que tiene sustituciones o modificaciones a través de fijación covalente de un aminoácido padre, tal como, por ejemplo, mediante alquilación, glicosilación, acetilación, fosforilación y similares. Incluido además
10 dentro de la definición de “derivado” está, por ejemplo, uno o más análogos de un aminoácido con enlaces sustituidos, así como otras modificaciones conocidas en la técnica.

Un “aminoácido natural” se refiere a arginina, glutamina, fenilalanina, tirosina, triptofano, lisina, glicina, alanina, histidina,
15 serina, prolina, ácido glutámico, ácido aspártico, treonina, cisteína, metionina, leucina, asparagina, isoleucina y valina, a menos de que se indique de otra manera mediante el contexto.

“Grupo protector” se refiere a una porción que cuando es fijada a un grupo reactivo en una molécula enmascara, reduce o previene
20 esa reactividad. Los ejemplos de grupos protectores se pueden encontrar en T.W. Greene y P. G. M. Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 3rd edition, John Wiley & Sons, New York, 1999, y Harrison y Harrison et al., Compendium of Synthetic Organic Methods, Vols. 1-8 (John Wiley y Sons, 1971-1996), los cuales están
25 incorporados a la presente mediante referencia en su totalidad. Los

grupos protectores hidroxilo representativos incluyen grupos acilo, éteres de bencilo y tritilo, éteres de tetrahidropiraniolo, éteres de trialkilsililo y éteres de alilo. Los grupos protectores amino representativos incluyen formilo, acetilo, trifluoroacetilo, bencilo, benciloxycarbonilo (CBZ), ter-butoxycarbonilo (Boc), trimetil sililo (TMS), 2-trimetilsilil-etansulfonilo (SES), tritilo y grupos tritilo sustituidos, aliloxycarbonilo, 9-fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc), nitro-veratriloxycarbonilo (NVOC) y similares.

10 Ejemplos de un “grupo protector hidroxilo” incluyen, aunque no se limitan a, éter de metpoximetilo, éter de 2-metoxietoximetilo, éter de tetrahidropiraniolo, éter de bencilo, éter de p-metoxibencilo, éter de trimetilsililo, éter de trietilsililo, éter de triisopropil sililo, éter de t-butildimetil sililo, éter de trifenilmetil sililo, éster de acetato, ésteres de acetato
15 sustituidos, pivaloato, benzoato, metansulfonato y p-toluensulfonato..

“Grupo saliente” se refiere a un grupo funcional que puede ser sustituido por otro grupo. Dichos grupos salientes son bien conocidos en la técnica, y los ejemplos incluyen, aunque no se limitan a, un haluro (por ejemplo, cloruro, bromuro, yoduro), metansulfonilo (mesilo), p-toluensulfonilo (tosilo), trifluorometilsulfonilo (triflato) y trifluorometilsulfonato.

La frase “sal farmacéuticamente aceptable”, como se utiliza en la presente, se refiere a sales orgánicas o
25

inorgánicas farmacéuticamente aceptables de un compuesto. El compuesto contiene de manera común por lo menos un grupo amino, y en consecuencia se pueden formar las sales de adición de ácido con este grupo amino. Las sales ilustrativas incluyen, aunque no se

5 limitan a, sales de sulfato, citrato, acetato, oxalato, salicilato, citrato ácido, tartrato, oleato, tanato, bitartrato, ascorbato, succinato, maleato, gentisinato, fumarato, gluconato, glucuronato, sacarato, formato, benzoato, glutamato, metansulfonato, etansulfonato, bencensulfonato, p-toluensulfonato y pamoato (es decir, 1,1'-metilen-

10 bis-(2-hidroxi-3-naptoato)). Una sal farmacéuticamente aceptable puede involucrar la inclusión de otra molécula tal como un ión acetato, un ión succinato u otro contraión. El contraión puede ser cualquier porción orgánica o inorgánica que estabiliza la carga en el presente compuesto. Además, una sal farmacéuticamente aceptable

15 puede tener más de un átomo cargado en su estructura. Además, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener más de un átomo cargado en su estructura. Hay casos en los que múltiples átomos cargados son parte de la sal farmacéuticamente aceptable pueden tener múltiples contraiones. Por tanto, una sal farmacéuticamente

20 aceptable puede tener uno o más átomos cargados y/o una o más contraiones.

“Solvato farmacéuticamente aceptable” o “solvato” hace referencia a una asociación de una o más moléculas de solvente y un compuesto o conjugado de la invención. Ejemplos de solventes que

25 forman sales farmacéuticamente aceptables incluyen, aunque no se

limitan a, agua, isopropanol, etanol, metanol, DMSO, acetato de etilo, ácido acético y etanolamina.

Los términos “carga” o “carga de fármaco” o “carga de carga útil” representa o se refiere al número promedio de
5 cargas útiles (“carga útil” y “cargas útiles” se usan de manera intercambiable en la presente con “fármaco” y “antifármacos”) por anticuerpo en una molécula ADC. La carga de fármaco puede variar desde 1 hasta 20 fármacos por anticuerpo. En ocasiones es referido como el DAR, o relación fármaco a
10 anticuerpo. Las composiciones de los ADCs descritos en la presente de modo común tienen DAR’s desde 1-20, y en ciertas modalidades desde 1-8, desde 2-8, desde 2-6, desde 2-5 y desde 2-4. Los valores DAR comunes son 2, 4, 6 y 8. El número promedio de fármacos anticuerpo, o valor DAR, puede estar
15 caracterizado a través de medios convencionales tales como espectroscopia UV/visible, espectroscopia de masa, ensayo ELISA, y HPLC. El valor DAR cuantitativo se pueden determinar también. En ciertos casos, la separación, purificación, y caracterización de ADCs homogéneos tienen un valor DAR
20 particular se puede lograr a través de medios tales como HPLC de fase inversa o electroporesis. DAR puede estar limitado por el número de sitios de fijación en el anticuerpo. Por ejemplo, en donde la fijación es una cisteína tiol, un anticuerpo puede tener solo uno o varios grupos cisteína tiol, o puede tener sólo
25 uno o varios grupos tiol suficientemente reactivos a través del

cual se puede fijar una unidad Ligador. En ciertas modalidades, la cisteína tiol es un grupo tiol de un residuo cisteína que forma un enlace disulfuro intercadena. En ciertas modalidades, la cisteína tiol es un grupo tiol de un residuo cisteína que no forma un enlace disulfuro intercadena. De manera común, el menor al nivel máximo teórico de porciones fármaco son conjugadas a un anticuerpo durante una reacción de conjugación. Un anticuerpo puede contener, por ejemplo, por ejemplo, muchos residuos de lisina que no reaccionan con un ligador o intermediario ligador. Sólo los grupos lisina más reactivos pueden reaccionar con un agente de reacción ligador reactivo.

Generalmente, los anticuerpos no contienen, muchos, si es que los tienen, grupos cisteína tiol libres y reactivos los cuales pueden ser enlazados a un fármaco a través de un ligador. La mayoría de los residuos cisteína tiol en los anticuerpos existen como enlaces disulfuro y deben ser reducidos con un agente reductor tal como ditioneitol (DTT). El anticuerpo puede ser sometido a condiciones de desnaturalización para revelar grupos nucleofílicos reactivos tales como lisina o cisteína. La carga (relación fármaco/anticuerpo) de un ADC se puede controlar de varias maneras distintas, que incluyen (i) limitar el exceso molar de fármaco-ligador con relación al anticuerpo, (ii) limitar el tiempo o temperatura de la reacción de conjugación, y (iii) condiciones reductivas parciales o limitantes para la modificación de cisteína tiol. Cuando más de un grupo nucleofílica reacciona con un fármaco-ligador entonces el producto resultante es

una mezcla de ADC's con una distribución de una o más porciones fármaco por anticuerpo. El número promedio de fármacos por anticuerpo se puede calcular a partir de la mezcla, por ejemplo, a través de ensayo de anticuerpo ELISA dual, específico para anticuerpo y específico para el fármaco. Los ADC's individuales pueden ser identificados en la mezcla por medio de espectroscopía de masa y separados mediante HPLC, por ejemplo, cromatografía de interacción hidrofóbica.

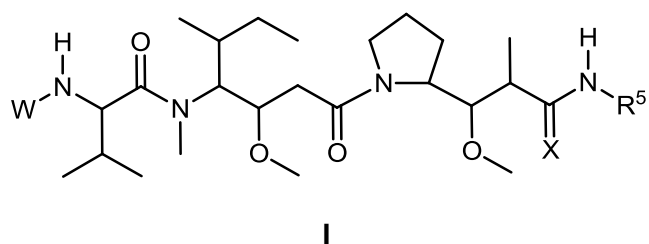
A continuación hay una lista de abreviaturas y definiciones que pueden no estar definidas o descritas en esta solicitud: DMSO (se refiere a dimetil sulfóxido), HRMS (se refiere a espectroscopía de masa de alta resolución), DAD (se refiere a detección de disposición de diodo), TFA (se refiere a ácido 2,2,2-trifluoroacético o ácido trifluoroacético), TFF (se refiere a filtración de flujo tangencial), EtOH (se refiere a etanol), MW (se refiere a peso molecular), HPLC (se refiere a cromatografía en líquido de alto rendimiento), HPLC preparatoria (se refiere a cromatografía en líquido de alto rendimiento preparatoria), etc. (se refiere a y así sucesivamente), tritilo (se refiere a 1,1',1''-etan-1,1,1-triiltribenceno), THF (se refiere a tetrahidrofurano), NHS (se refiere a 1-Hidroxi-2,5-pirrolidindiona), Cbz (se refiere a carboxibencilo), eq. (se refiere a equivalente), *n*-BuLi (se refiere a *n*-butilitio), OAc (se refiere a acetato), MeOH (se refiere a metanol), *i*-Pr (se refiere a isopropil o propan-2-il),

NMM (se refiere a 4-metilmorfolina), y “-” (en un cuadro se refiere a que no hay datos disponibles en este momento).

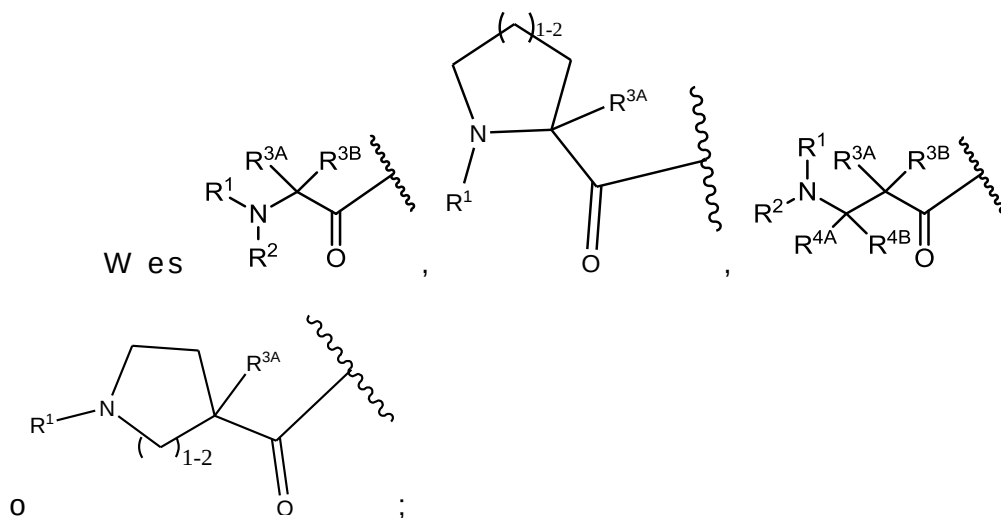
Compuestos

5

Un aspecto de la invención se refiere a un compuesto de la fórmula I:



10 o una sal farmacéuticamente aceptable o solvato de los mismos, en donde, de modo independiente para cada ocurrencia,



R^1 es hidrógeno, C_1 - C_8 alquilo o C_1 - C_8 haloalquilo;

15 R^2 es hidrógeno, C_1 - C_8 alquilo o C_1 - C_8 haloalquilo;

R^{3A} y R^{3B} son cualquiera de los siguientes:

(i) R^{3A} es hidrógeno, C_1 - C_8 alquilo, C_1 - C_8 haloalquilo, C_3 - C_8

carbociclilo, C₁-C₁₀ heterociclilo, arilo, heteroaralquilo,
halógeno o aralquilo; y

R^{3B} es C₁-C₈ alquilo, C₁-C₈ haloalquilo, C₃-C₈ carbociclilo,
C₁-C₁₀ heterociclilo, arilo, heteroaralquilo, aralquilo o

5 halógeno; o

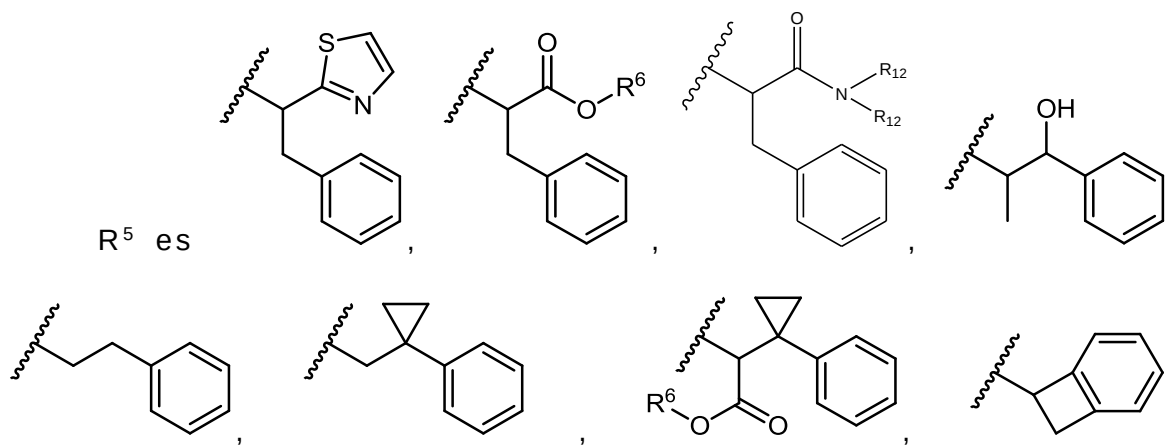
(ii) R^{3A} y R^{3B} tomados en conjunto son C₂-C₈ alquileo o C₁-
C₈ heteroalquileo;

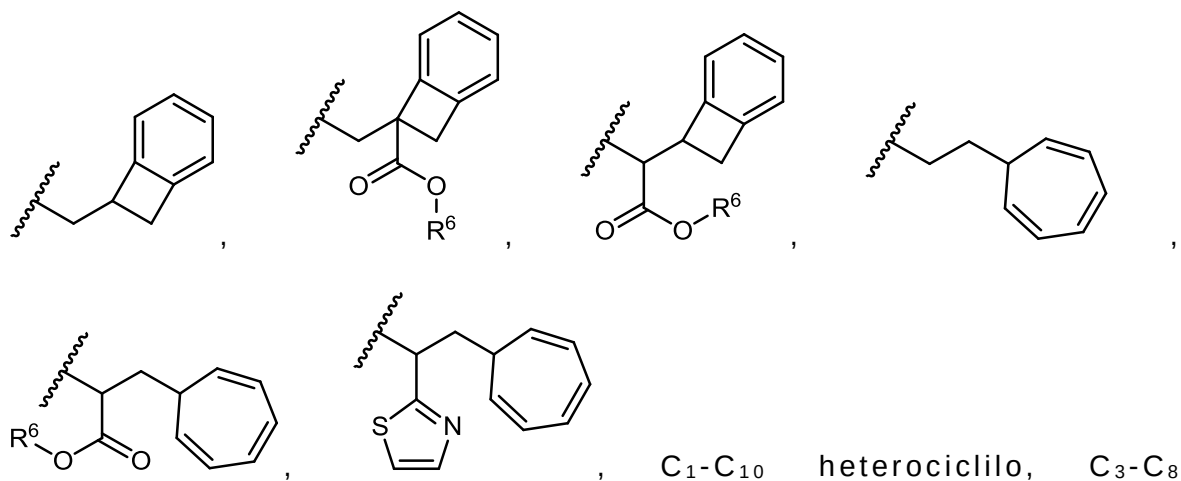
R^{4A} y R^{4B} son cualquiera de los siguientes:

(i) R^{4A} es hidrógeno, C₁-C₈ alquilo, C₁-C₈ haloalquilo, C₃-C₈
10 carbociclilo, C₁-C₁₀ heterociclilo, arilo, heteroaralquilo o
aralquilo; y

R^{4B} es hidrógeno, C₁-C₈ alquilo, C₁-C₈ haloalquilo,
C₃-C₈ carbociclilo, C₁-C₁₀ heterociclilo, arilo,
heteroaralquilo o aralquilo; o

15 (ii) R^{4A} y R^{4B} tomados en conjunto son C₂-C₈ alquileo o C₁-
C₈ heteroalquileo;

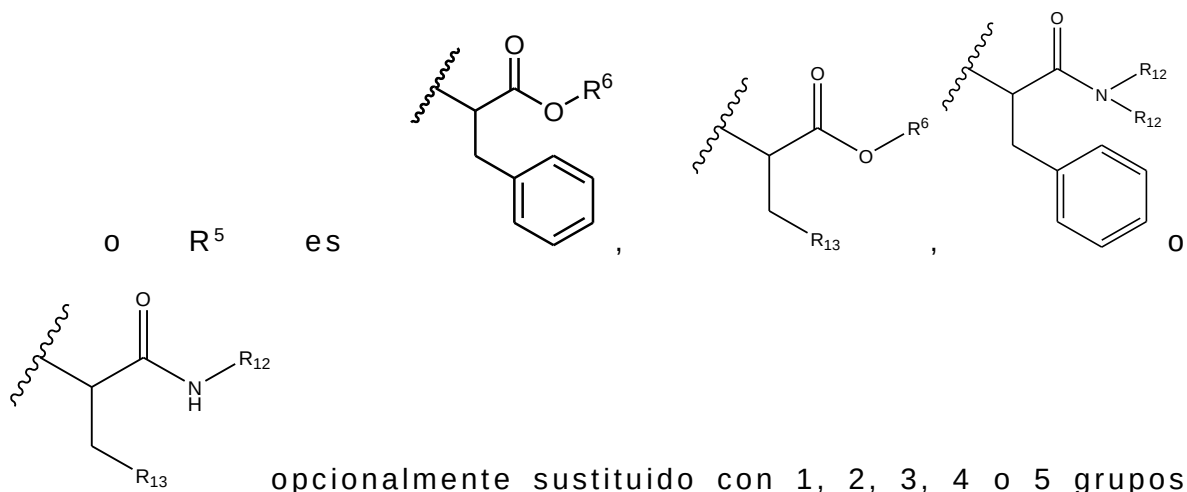




carbociclilo y C_6-C_{14} arilo opcionalmente sustituido con 1, 2, 3, 4 o 5 grupos seleccionados de manera independiente a partir del grupo

que consta de $-C_1-C_8$ alquilo, $-C_1-C_8$ alquil- $N(R')_2$, $-C_1-C_8$ alquil- $C(O)R'$, $-C_1-C_8$ alquil- $C(O)OR'$ $-O-(C_1-C_8$ alquilo), $-C(O)R'$, $-OC(O)R'$, $-C(O)OR'$, $-C(O)N(R')_2$, $-NHC(O)R'$, $-S(O)_2R'$, $-S(O)R'$, $-OH$, halógeno, $-N_3$, $-N(R')_2$, $-CN$, $-NHC(=NH)NH_2$, $-NHCONH_2$, $-S(=O)_2R'$ and $-SR'$, en donde cada R' es seleccionado de manera independiente a partir del

grupo que consta de hidrógeno, C_1-C_8 alquilo y arilo no sustituido, o dos R' pueden, junto con el nitrógeno al cual se unen, formar un C_1-C_{10} heterociclilo;



seleccionados de manera independiente a partir del grupo que consta de C₁-C₈ alquilo, -C₁-C₈ alquil-N(R')₂, -C₁-C₈ alquil-C(O)R', -C₁-C₈ alquil-C(O)OR', -O-(C₁-C₈ alquilo), -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, halógeno, -N₃,
 5 -N(R')₂, -CN, -NHC(=NH)NH₂, -NHCONH₂, -S(=O)₂R', -SR' y arileno-R', en donde cada R' es seleccionado de manera independiente a partir del grupo que consta de hidrógeno, C₁-C₈ alquilo, C₁-C₈ heterociclilo, C₁-C₁₀ alquilenio-C₃-C₈ heterociclilo and arilo, o dos R' pueden, junto con el nitrógeno al cual se unen, formar un C₁-C₁₀
 10 heterociclilo;

R⁶ es hidrógeno, -C₁-C₈ alquilo, -C₂-C₈ alquenilo, -C₂-C₈ alquinilo, -C₂-C₈ alquinilo o -C₁-C₈ haloalquilo;

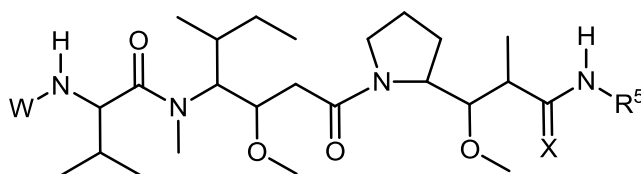
R¹² es hidrógeno, C₁-C₄ alquilo, C₁-C₁₀ heterociclilo o C₆-C₁₄ arilo;

15 R¹³ es C₁-C₁₀ heterociclilo; y

X es O o S;

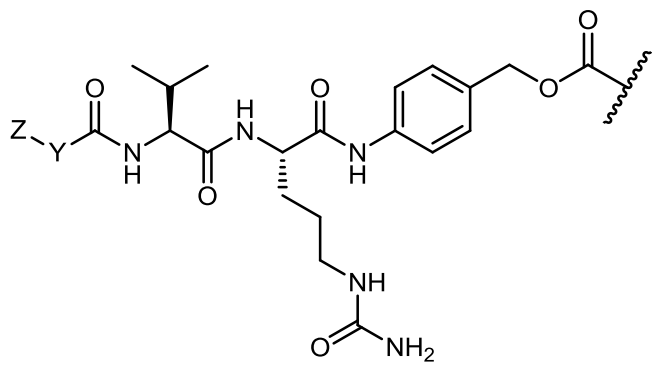
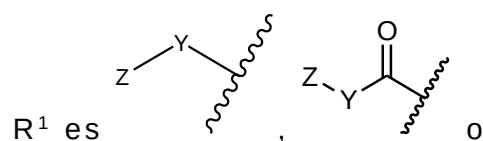
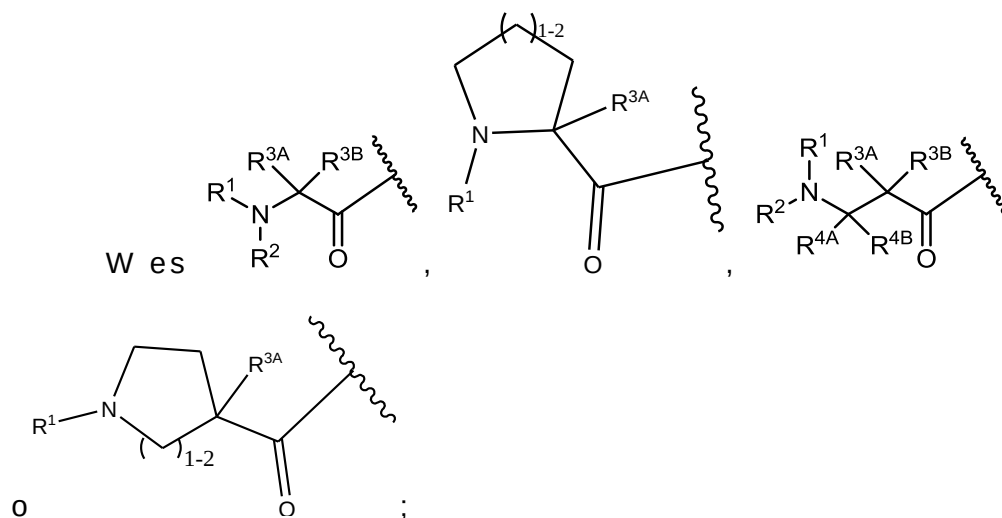
a condición de que cuando R^{3A} es hidrógeno X es S.

Otro aspecto de la invención se refiere a un compuesto de fórmula **IIa**:

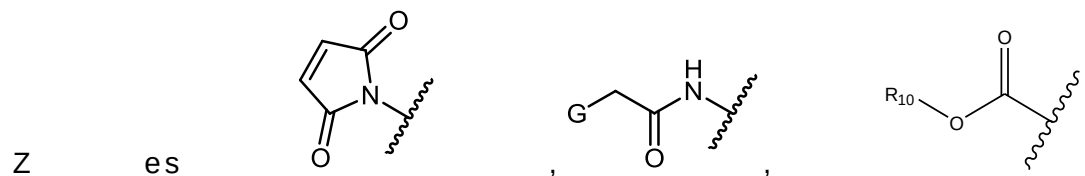


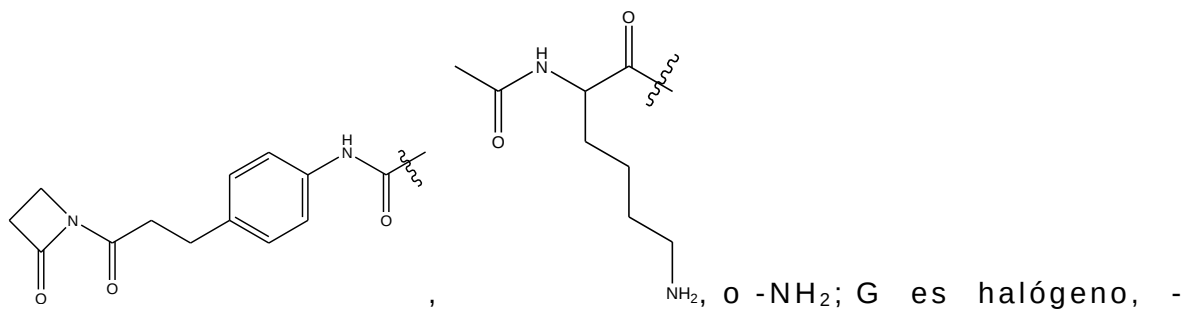
IIa

o una sal farmacéuticamente aceptable o solvato de los mismos, en donde, de modo independiente para cada ocurrencia,



- 5 Y es -C₂-C₂₀ alquileno-, -C₂-C₂₀ heteroalquileno-; -C₃-C₈ carbociclo-, -arileno-, -C₃-C₈ heterociclo-, -C₁-C₁₀ alquileno-arileno-, -arileno-C₁-C₁₀alquileno-, -C₁-C₁₀ alquileno-(C₃-C₈ carbociclo)-, -(C₃-C₈ carbociclo)-C₁-C₁₀ alquileno-, -C₁-C₁₀ alquileno-(C₃-C₈ heterociclo)- o -(C₃-C₈ heterociclo)-C₁-C₁₀ alquileno-;
- 10 alquileno-;





OH, -SH o -S-C₁-C₆ alquilo;

R² es hidrógeno, C₁-C₈ alquilo o C₁-C₈ haloalquilo;

R^{3A} y R^{3B} son cualquiera de los siguientes:

- 5 (i) R^{3A} es hidrógeno, C₁-C₈ alquilo, C₁-C₈ haloalquilo, C₃-C₈ carbociclilo, C₁-C₁₀ heterociclilo, arilo, heteroaralquilo, aralquilo o halógeno; y

R^{3B} es C₁-C₈ alquilo, C₁-C₈ haloalquilo, C₃-C₈ carbociclilo,

C₁-C₁₀ heterociclilo, arilo, heteroaralquilo o aralquilo o

10 halógeno; o

- (ii) R^{3A} y R^{3B} tomados en conjunto son C₂-C₈ alquilenos o C₁-C₈ heteroalquilenos;

R^{4A} y R^{4B} son cualquiera de los siguientes:

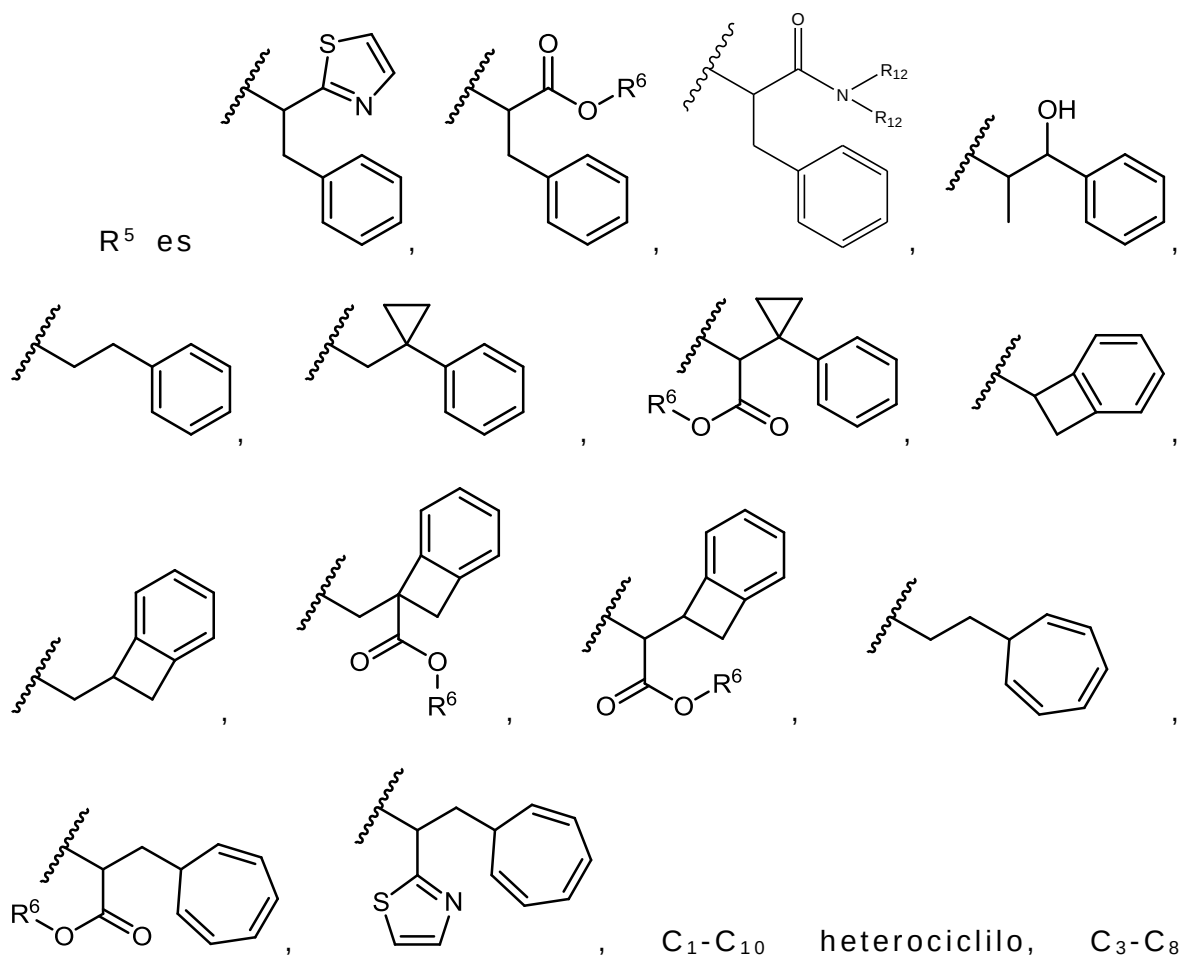
- 15 (i) R^{4A} es hidrógeno, C₁-C₈ alquilo, C₁-C₈ haloalquilo, C₃-C₈ carbociclilo, C₁-C₁₀ heterociclilo, arilo, heteroaralquilo o aralquilo; y

R^{4B} es hidrógeno, C₁-C₈ alquilo, C₁-C₈ haloalquilo,

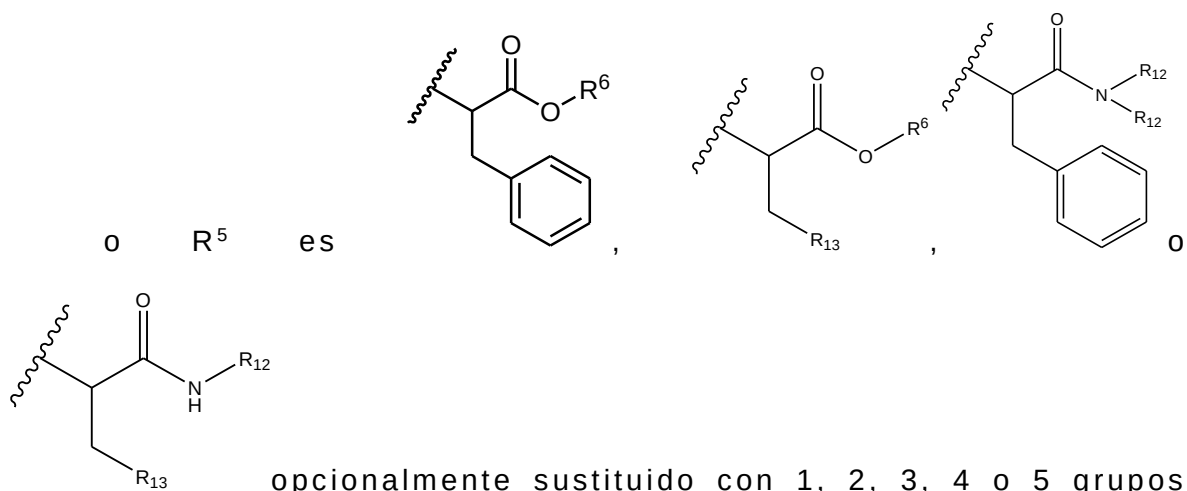
C₃-C₈ carbociclilo, C₁-C₁₀ heterociclilo, arilo,

heteroaralquilo o aralquilo; o

- 20 (ii) R^{4A} y R^{4B} tomados en conjunto son C₂-C₈ alquilenos o C₁-C₈ heteroalquilenos;



- 5 carbociclilo and C₆-C₁₄ arilo opcionalmente sustituido con 1, 2, 3, 4 o 5 grupos seleccionados de manera independiente a partir del grupo que consta de -C₁-C₈ alquilo, -C₁-C₈ alquil-N(R')₂, -C₁-C₈ alquil-C(O)R', -C₁-C₈ alquil-C(O)OR' -O-(C₁-C₈ alquilo), -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, halógeno,
- 10 -N₃, -N(R')₂, -CN, -NHC(=NH)NH₂, -NHCONH₂, -S(=O)₂R' and -SR', en donde cada R' es seleccionado de manera independiente a partir del grupo que consta de hidrógeno, C₁-C₈ alquilo y arilo no sustituido, o dos R' pueden, junto con el nitrógeno al cual se unen, formar un C₁-C₁₀ heterociclilo;



seleccionados de manera independiente a partir del grupo que consta de C_1 - C_8 alquilo, $-C_1$ - C_8 alquil- $N(R')$ ₂, $-C_1$ - C_8 alquil- $C(O)R'$, $-C_1$ - C_8 alquil- $C(O)OR'$, $-O$ -(C_1 - C_8 alquilo), $-C(O)R'$, $-OC(O)R'$, $-C(O)OR'$, $-C(O)N(R')$ ₂, $-NHC(O)R'$, $-S(O)_2R'$, $-S(O)R'$, $-OH$, halógeno, $-N_3$, $-N(R')$ ₂, $-CN$, $-NHC(=NH)NH_2$, $-NHCONH_2$, $-S(=O)_2R'$, $-SR'$ y arileno- R' , en donde cada R' es seleccionado de manera independiente a partir del grupo que consta de hidrógeno, C_1 - C_8 alquilo, C_1 - C_8 heterociclilo, C_1 - C_{10} alquilen- C_3 - C_8 heterociclilo y arilo, o dos R' pueden, junto con el nitrógeno al cual se unen, formar un C_1 - C_{10} heterociclilo;

R^6 es hidrógeno, $-C_1$ - C_8 alquilo, $-C_2$ - C_8 alquenilo, $-C_2$ - C_8 alquinilo o $-C_1$ - C_8 haloalquilo;

R^{12} es hidrógeno, C_1 - C_4 alquilo, C_1 - C_{10} heterociclilo o C_6 - C_{14} arilo;

R^{13} es C_1 - C_{10} heterociclilo; y

R^7 es seleccionado de manera independiente para cada ocurrencia a partir del grupo que consta de F, Cl, I, Br, NO_2 , CN and

CF_3 ;

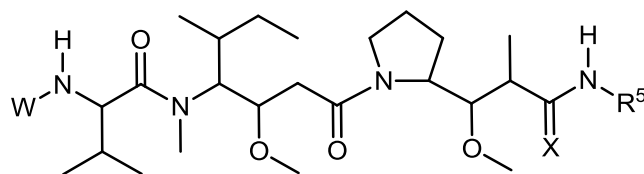
R^{10} es hidrógeno, $-C_1-C_{10}$ alquilo, $-C_3-C_8$ carbociclilo, -aril, $-C_1-C_{10}$ heteroalquilo, $-C_3-C_8$ heterociclo, $-C_1-C_{10}$ alquilen-aril, -arileno- $-C_1-C_{10}$ alquilo, $-C_1-C_{10}$ alquilen- $(C_3-C_8$ carbociclo), $-(C_3-C_8$ carbociclo)- $-C_1-C_{10}$ alquilo, $-C_1-C_{10}$ alquilen- $(C_3-C_8$ heterociclo), and $-(C_3-C_8$ heterociclo)- $-C_1-C_{10}$ alquilo, en donde el arilo en R_{10} que comprende arilo es opcionalmente sustituido con $[R_7]_h$;

h es 1, 2, 3, 4 o 5; y

X es O o S;

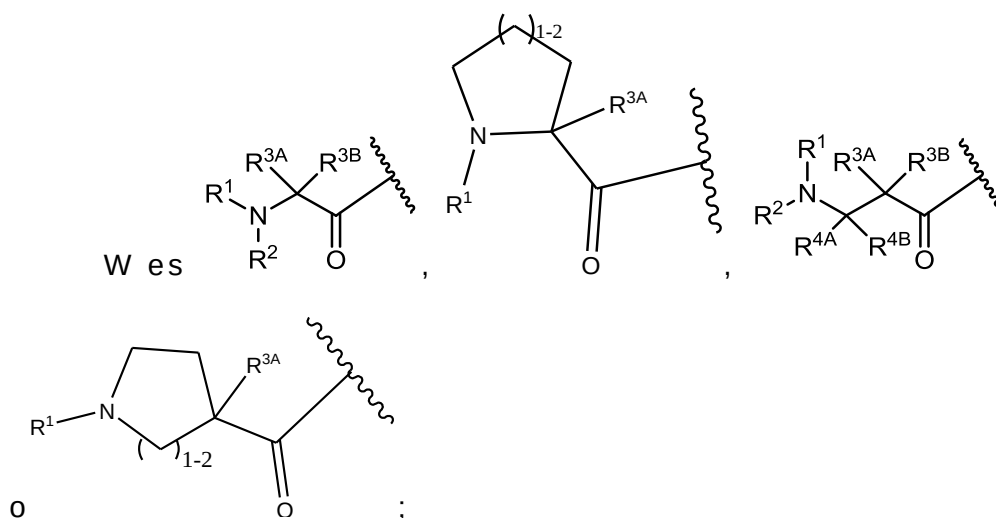
a condición de que cuando R^{3A} es hidrógeno X es S

Otro aspecto de la invención se refiere a un compuesto de fórmula **IIIa**:



IIIa

o una sal farmacéuticamente aceptable o solvato de los mismos, en donde, de modo independiente para cada ocurrencia,



R^1 es hidrógeno, C_1-C_8 alquilo o C_1-C_8 haloalquilo;

R^2 es hidrógeno, C_1-C_8 alquilo o C_1-C_8 haloalquilo;

R^{3A} y R^{3B} son cualquiera de los siguientes:

- 5 (i) R^{3A} es hidrógeno, C_1-C_8 alquilo, C_1-C_8 haloalquilo, C_3-C_8 carbociclilo, C_1-C_{10} heterociclilo, arilo, heteroaralquilo, aralquilo o halógeno; y

R^{3B} es C_1-C_8 alquilo, C_1-C_8 haloalquilo, C_3-C_8 carbociclilo, C_1-C_{10} heterociclilo, arilo, heteroaralquilo, halógeno o aralquilo; o

- 10 (ii) R^{3A} y R^{3B} tomados en conjunto son C_2-C_8 alquileno o C_1-C_8 heteroalquileno;

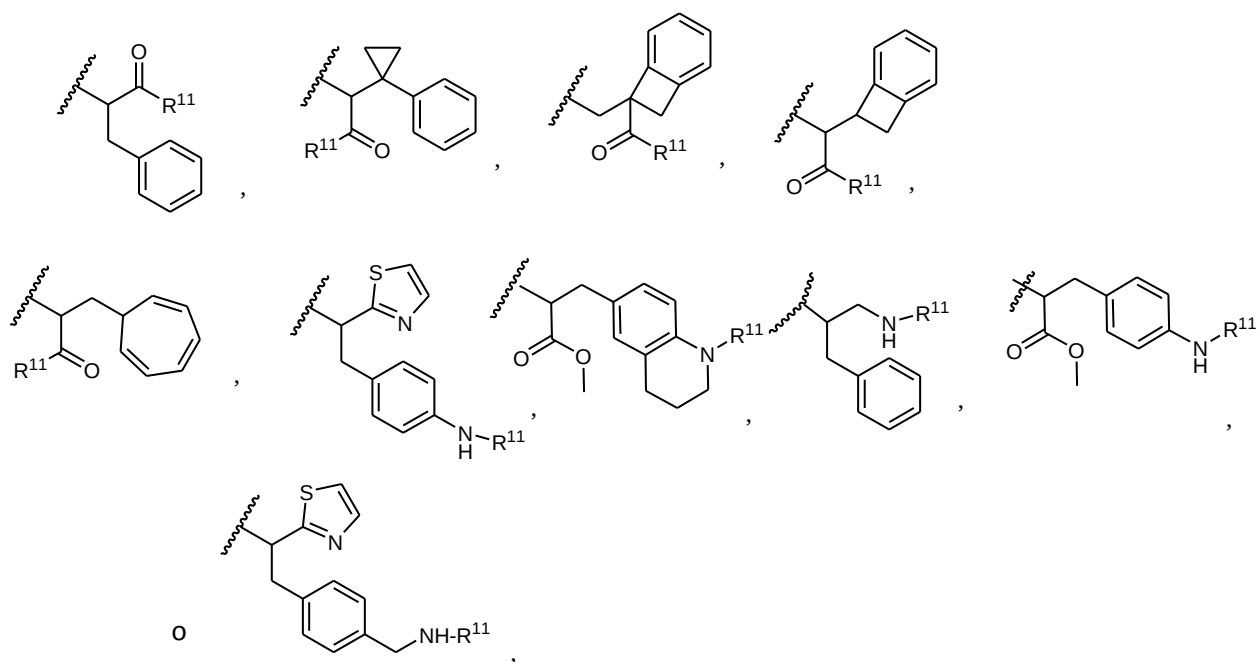
R^{4A} y R^{4B} son cualquiera de los siguientes:

- 15 (i) R^{4A} es hidrógeno, C_1-C_8 alquilo, C_1-C_8 haloalquilo, C_3-C_8 carbociclilo, C_1-C_{10} heterociclilo, arilo, heteroaralquilo o aralquilo; y

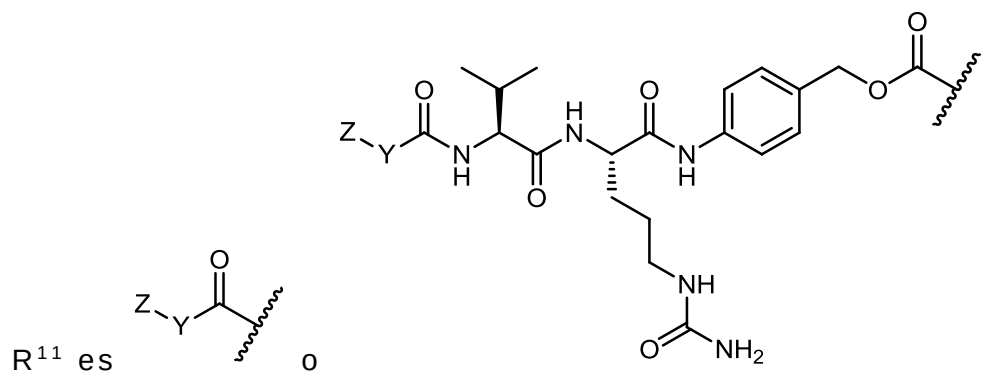
R^{4B} es hidrógeno, C_1-C_8 alquilo, C_1-C_8 haloalquilo, C_3-C_8 carbociclilo, C_1-C_{10} heterociclilo, arilo, heteroaralquilo o aralquilo; o

- 20 (ii) R^{4A} y R^{4B} tomados en conjunto son C_2-C_8 alquileno o C_1-C_8 heteroalquileno;

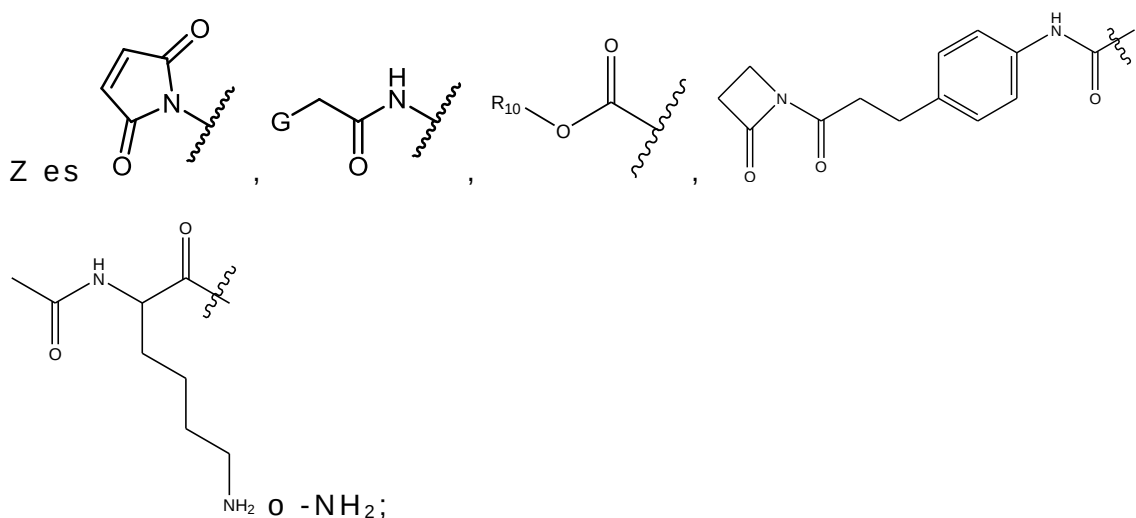
R^5 es



opcionalmente sustituido con 1, 2, 3, 4 o 5 grupos seleccionados de
 5 manera independiente a partir del grupo que consta de C_1 - C_8 alquilo,
 $-O-(C_1-C_8$ alquilo), $-C(O)R'$, $-OC(O)R'$, $-C(O)OR'$, $-C(O)NH_2$,
 $-C(O)NHR'$, $-C(O)N(R')_2$, $-NHC(O)R'$, $-S(O)_2R'$, $-S(O)R'$, $-OH$,
 halógeno, $-N_3$, $-NH_2$, $-NH(R')$, $-N(R')_2$, $-CN$, $-NHC(=NH)NH_2$,
 $-NHCONH_2$, $-S(=O)_2R'$ and $-SR'$, en donde cada R' es seleccionado de
 10 manera independiente a partir del grupo que consta de hidrógeno,
 C_1 - C_8 alquilo y arilo no sustituido;



Y es $-C_2-C_{20}$ alquilen-, $-C_2-C_{20}$ heteroalquilen-, C_3-C_8 carbociclo-, -arileno-, $-C_3-C_8$ heterociclo-, $-C_1-C_{10}$ alquilen-arileno-, -arileno- $-C_1-C_{10}$ alquilen-, $-C_1-C_{10}$ alquilen- $(C_3-C_8$ carbociclo)-, $-(C_3-C_8$ carbociclo)- $-C_1-C_{10}$ alquilen-, $-C_1-C_{10}$ alquilen- $(C_3-C_8$ heterociclo)-, o $-(C_3-C_8$ heterociclo)- $-C_1-C_{10}$ alquilen-;



R^7 es seleccionado de manera independiente para cada
10 ocurrencia a partir del grupo que consta de F, Cl, I, Br, NO₂, CN y CF₃;

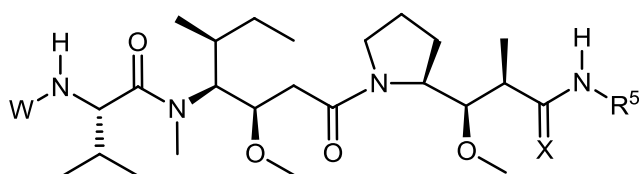
R^{10} es hidrógeno, $-C_1-C_{10}$ alquilo, $-C_3-C_8$ carbociclo, arilo, $-C_1-C_{10}$ heteroalquilo, $-C_3-C_8$ heterociclo, $-C_1-C_{10}$ alquilen-arilo, -arileno- $-C_1-C_{10}$ alquilo, $-C_1-C_{10}$ alquilen- $(C_3-C_8$ carbociclo), $-(C_3-C_8$ carbociclo)- $-C_1-C_{10}$ alquilo, $-C_1-C_{10}$ alquilen- $(C_3-C_8$ heterociclo), y $-(C_3-C_8$ heterociclo)- $-C_1-C_{10}$ alquilo, en donde arilo en R_{10} comprende arilo es
15 opcionalmente sustituido con $[R_7]_h$;

h es 1, 2, 3, 4 o 5; y

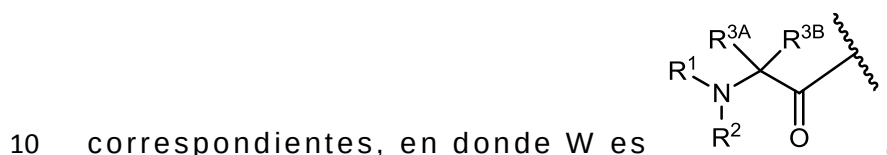
X es O o S.

R^6 es hidrógeno, C_1 - C_8 alquilo o C_1 - C_8 haloalquilo; y
 h es 1, 2, 3, 4 o 5.

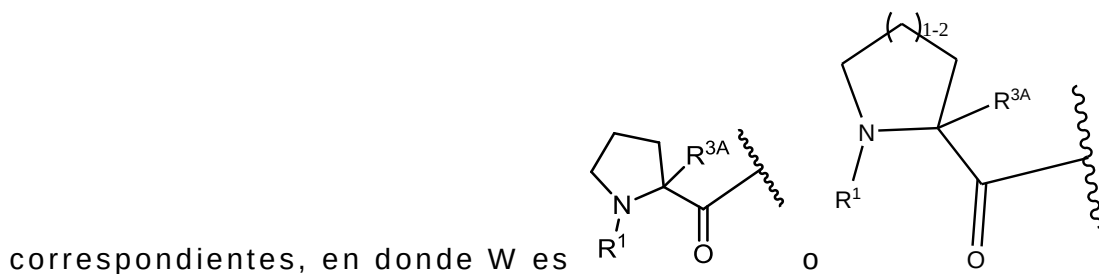
En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a
 5 cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones
 correspondientes, en donde el compuesto está representado por



En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a
 cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones



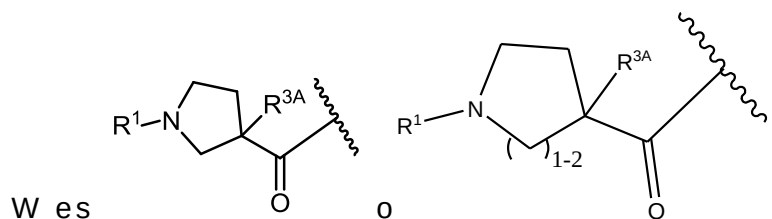
En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a
 cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones



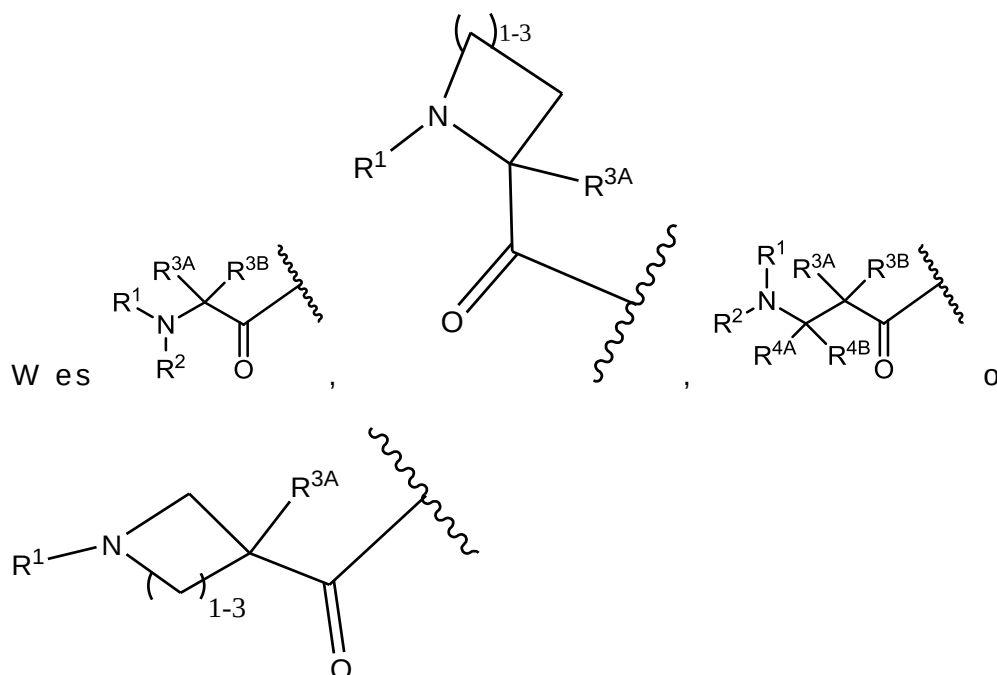
En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a
 15 cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones



En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones correspondientes, en donde



5 En ciertas modalidades de la invención W es:



En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones correspondientes, en donde R¹ es hidrógeno, C₁-C₈ alquilo o C₁-C₈ haloalquilo.

10

En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones correspondientes, en donde R¹ es hidrógeno.

En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones correspondientes, en donde R^1 es C_1 - C_8 alquilo.

En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a
5 cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones correspondientes, en donde R^1 es metilo.

En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones correspondientes, en donde R^2 es hidrógeno, C_1 - C_8 alquilo o C_1 - C_8
10 haloalquilo.

En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones correspondientes, en donde R^2 es hidrógeno.

En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a
15 cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones correspondientes, en donde R^2 es C_1 - C_8 alquilo.

En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones correspondientes, en donde R^2 es metilo.

20 En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones correspondientes, en donde R^1 es hidrógeno; y R^2 es metilo.

En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones
25 correspondientes, en donde R^1 es metilo; y R^2 es metilo.

En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones correspondientes, en donde R^{3A} es hidrógeno, C_1-C_8 alquilo, C_1-C_8 haloalquilo, C_3-C_8 carbociclilo, C_1-C_{10} heterociclilo, arilo, heteroaralquilo o aralquilo; y R^{3B} es C_1-C_8 alquilo, C_1-C_8 haloalquilo, C_3-C_8 carbociclilo, C_1-C_{10} heterociclilo, arilo, heteroaralquilo, halógeno o aralquilo.

En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones correspondientes, en donde R^{3A} es hidrógeno, C_1-C_8 alquilo, C_1-C_8 haloalquilo, C_3-C_8 carbociclilo, C_1-C_{10} heterociclilo, arilo, heteroaralquilo o aralquilo; y R^{3B} es C_1-C_8 alquilo, C_1-C_8 haloalquilo, C_3-C_8 carbociclilo, C_1-C_{10} heterociclilo, arilo, heteroaralquilo, aralquilo o halógeno.

En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones correspondientes, en donde R^{3A} es halógeno.

En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones correspondientes, en donde R^{3A} es hidrógeno.

En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones correspondientes, en donde R^{3A} es C_1-C_8 alquilo.

En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones

correspondientes, en donde R^{3A} es metilo.

En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones correspondientes, en donde R^{3B} es C_1-C_8 alquilo.

5 En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones correspondientes, en donde R^{3B} es metilo.

En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones correspondientes, en donde R^{3B} es isopropilo.

En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones correspondientes, en donde R^{3B} es C_3-C_8 carbociclilo.

En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones correspondientes, en donde R^{3B} es ciclohexilo.

En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones correspondientes, en donde R^{3A} es C_1-C_8 alquilo; y R^{3B} es C_1-C_8 alquilo.

En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones correspondientes, en donde R^{3A} es metilo; y R^{3B} es metilo.

En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones

correspondientes, en donde R^{3A} es hidrógeno; y R^{3B} es C_1 - C_8 alquilo.

En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones correspondientes, en donde R^{3A} es hidrógeno; y R^{3B} es isopropilo.

5 En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones correspondientes, en donde R^{3A} and R^{3B} tomados en conjunto son C_2 - C_8 alquilenos o C_1 - C_8 heteroalquilenos.

10 En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones correspondientes, en donde R^{3A} and R^{3B} tomados en conjunto son C_2 - C_8 alquilenos.

15 En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones correspondientes, en donde R^{3A} y R^{3B} tomados en conjunto son $-CH_2CH_2-$.

20 En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones correspondientes, en donde R^{3A} y R^{3B} tomados en conjunto son $-CH_2CH_2CH_2-$.

En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones correspondientes, en donde R^{3A} y R^{3B} tomados en conjunto son $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$.

25 En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a

cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones correspondientes, en donde R^{3A} y R^{3B} tomados en conjunto son C_1-C_8 heteroalquilenos.

En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a
5 cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones correspondientes, en donde R^{3A} y R^{3B} tomados en conjunto son $-CH_2OCH_2-$.

En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a
cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones
10 correspondientes, en donde R^{4A} es hidrógeno, C_1-C_8 alquilo, C_1-C_8 haloalquilo, C_3-C_8 carbociclilo, C_1-C_{10} heterociclilo, arilo, heteroaralquilo o aralquilo; y R^{4B} es C_1-C_8 alquilo, C_1-C_8 haloalquilo, C_3-C_8 carbociclilo, C_1-C_{10} heterociclilo, arilo, heteroaralquilo o aralquilo.

15 En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones correspondientes, en donde R^{4A} es hidrógeno.

En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a
cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones
20 correspondientes, en donde R^{4A} es C_1-C_8 alquilo.

En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a
cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones correspondientes, en donde R^{4A} es metilo.

En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a
25 cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones

correspondientes, en donde R^{4B} es hidrógeno.

En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones correspondientes, en donde R^{4B} es C_1 - C_8 alquilo.

5 En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones correspondientes, en donde R^{4B} es metilo.

En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones correspondientes, en donde R^{4A} es C_1 - C_8 alquilo; y R^{4B} es C_1 - C_8 alquilo.

En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones correspondientes, en donde R^{4A} es metilo; y R^{4B} es metilo.

15 En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones correspondientes, en donde R^{4A} es hidrógeno; y R^{4B} es hidrógeno.

En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones correspondientes, en donde R^{4A} es hidrógeno; y R^{4B} es C_1 - C_8 alquilo.

20 En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones correspondientes, en donde R^{4A} y R^{4B} tomados en conjunto son C_2 - C_8 alquilenos o C_1 - C_8 heteroalquilenos.

25 En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a

cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones correspondientes, en donde R^{4A} y R^{4B} tomados en conjunto son C_2-C_8 alquileo.

En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a
5 cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones correspondientes, en donde R^{4A} y R^{4B} tomados en conjunto son $-CH_2CH_2-$.

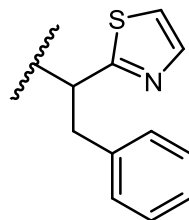
En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a
cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones
10 correspondientes, en donde R^{4A} y R^{4B} tomados en conjunto son $-CH_2CH_2CH_2-$.

En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a
cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones correspondientes, en donde R^{4A} y R^{4B} tomados en conjunto son $-$
15 $CH_2CH_2CH_2CH_2-$.

En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a
cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones correspondientes, en donde R^{4A} y R^{4B} tomados en conjunto son C_1-C_8 heteroalquileo.

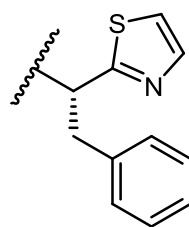
20 En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a
cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones correspondientes, en donde R^{4A} y R^{4B} tomados en conjunto son $-CH_2OCH_2-$.

En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a
25 cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones



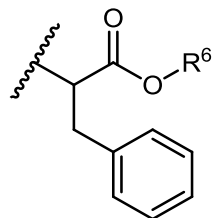
correspondientes, en donde R^5 es

En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones



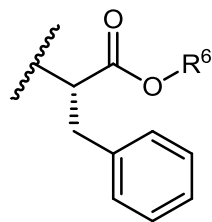
correspondientes, en donde R^5 es

5 En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones



correspondientes, en donde R^5 es

En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones



10 correspondientes, en donde R^5 es

En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones



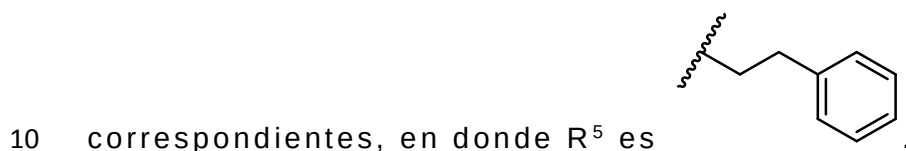
En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones



5 En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones



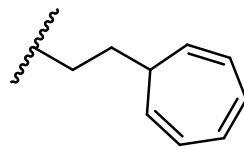
En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones



En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones

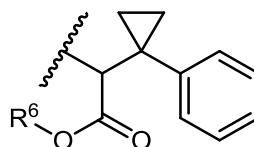


15 En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones



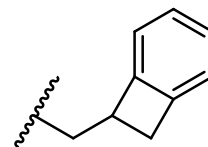
correspondientes, en donde R^5 es

En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones



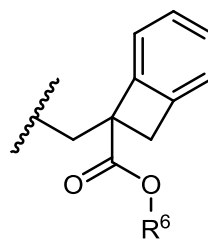
correspondientes, en donde R^5 es

5 En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones



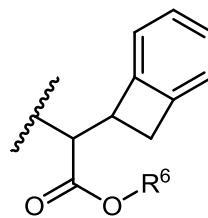
correspondientes, en donde R^5 es

En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones



10 correspondientes, en donde R^5 es

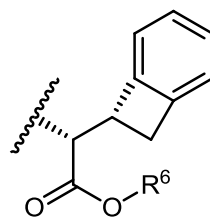
En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones



correspondientes, en donde R^5 es

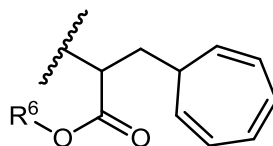
En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a

cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones



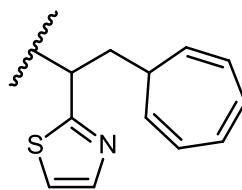
correspondientes, en donde R^5 es .

En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones



5 correspondientes, en donde R^5 es .

En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones



correspondientes, en donde R^5 es .

En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a
10 cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones correspondientes, en donde R^6 es hidrógeno.

En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones correspondientes, en donde R^6 es C_1 - C_8 alquilo.

15 En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones correspondientes, en donde R^6 es metilo.

En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a

cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones correspondientes, en donde X es O.

En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones correspondientes, en donde X es S.

En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos, y definiciones correspondientes, en donde el compuesto es seleccionado a partir del grupo que consta de:

N-Metil-L-valil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}-3-tioxopropil]pirrolidin-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida;

N²-[(1-Aminociclopentil)carbonil]-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}-3-tioxopropil]pirrolidin-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida;

2-Metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}-3-tioxopropil]pirrolidin-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida;

N-Metil-L-valil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-[(2-feniletil)amino]-3-tioxopropil]pirrolidin-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida;

N-Metil-L-valil-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1S)-1-carboxi-2-feniletil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-tioxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida;

N-Metil-L-valil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-3-[(2S)-1-metoxi-1-oxo-3-fenilpropan-2-il]amino}-2-metil-3-tioxopropil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida;

2-Metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1S)-1-carboxi-2-feniletil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-tioxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida;

2-Metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-3-[(2S)-1-metoxi-1-oxo-3-fenilpropan-2-il]amino}-2-metil-3-tioxopropil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida;

N²-[(1-Aminociclopentil)carbonil]-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}propil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida;

N²-[(1-Aminociclopropil)carbonil]-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}propil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida;

1-Amino-N-[(2S)-1-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}propil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-

- il](metil)amino}-3-metil-1-oxobutan-2-il]ciclohexancarboxamida;
- 2-Metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}propil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-
- 5 valinamida;
- 2-Metilalanil-N-{(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-[(2S)-2-{(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[(2-feniletil)amino]propil}pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il}-N-metil-L-valinamida;
- 2-Metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-
- 10 metoxi-2-metil-3-oxo-3-[(1-fenilciclopropil)metil]amino}propil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida;
- 2-Metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[2-(ciclohepta-2,4,6-trien-1-il)etil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-
- 15 oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida;
- 2-Metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1S)-1-carboxi-2-feniletil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida;
- 20 2-Metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-3-[(2S)-1-metoxi-1-oxo-3-fenilpropan-2-il]amino}-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida;
- N²-[(3-Aminooxetan-3-il)carbonil]-N-{(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-
- 25 [(2S)-2-{(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[(2-

feniletil)amino]propil}pirrolidin-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida;

N,2-Dimetilalanil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-3-[(2S)-1-metoxi-1-oxo-3-fenilpropan-2-il]amino}-2-metil-3-tioxopropil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida;

N,2-Dimetilalanil-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1S)-1-carboxi-2-feniletil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-tioxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida;

10 N,2-Dimetilalanil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}-3-tioxopropil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida;

15 N,2-Dimetilalanil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}propil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida;

20 N²-(3-Amino-2,2-dimetilpropanoil)-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}propil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida;

N²-(3-Amino-2,2-dimetilpropanoil)-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[(2-feniletil)amino]propil]pirrolidin-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida;

2-metil-L-prolil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-{[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}propil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida;

5 2-Metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[1-(biciclo[4.2.0]octa-1,3,5-trien-7-il)-2-metoxi-2-oxoetil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida;

2-Metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[biciclo[4.2.0]octa-1,3,5-trien-7-il(carboxi)metil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida;

10

2-Metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida;

15

N,2-Dimetilalanil-N-{(1S,2R)-4-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(1S)-1-carboxi-2-feniletil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-2-metoxi-1-{(1S)-1-metilpropil]-4-oxobutil}-N-metil-L-valinamida;

20 2-metil-L-prolil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-3-{[(2S)-1-metoxi-1-oxo-3-fenilpropan-2-il]amino}-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida;

2-metil-L-prolil-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(1S)-1-carboxi-2-feniletil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-

25

3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida;

2-Metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(2S)-1-ter-
butoxi-1-oxo-3-fenilpropan-2-il]amino}-1-metoxi-2-metil-3-
oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-
5 valinamida;

Metil N-[(2R,3R)-3-{(2S)-1-[(3R,4S,5S)-4-{[N-(3-amino-2,2-
dimetilpropanoil)-L-valil](metil)amino}-3-metoxi-5-
metilheptanoil]pirrolidin-2-il}-3-metoxi-2-metilpropanoil]-L-
fenilalaninato;

10 N,2-Dimetilalanil-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(2S)-1-
ter-butoxi-1-oxo-3-fenilpropan-2-il]amino}-1-metoxi-2-metil-3-
oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-
valinamida;

2-metil-D-prolil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-
15 metoxi-3-[(2S)-1-metoxi-1-oxo-3-fenilpropan-2-il]amino}-2-metil-3-
oxopropil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-
valinamida;

2-metil-L-prolil-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1S,2R)-1-
hidroxi-1-fenilpropan-2-il]amino}-1-metoxi-2-metil-3-
20 oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-
valinamida;

N,2-Dimetilalanil-N-[(1S,2R)-4-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1S)-1-
bencil-2-(metilamino)-2-oxoetil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-
oxopropil]pirrolidin-1-il}-2-metoxi-1-[(1S)-1-metilpropil]-4-oxobutil]-N-
25 metil-L-valinamida;

N,2-Dimetilalanil-N-{{(1S,2R)-4-{{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{{[(1S)-2-amino-1-bencil-2-oxoetil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-2-metoxi-1-[(1S)-1-metilpropil]-4-oxobutil}-N-metil-L-valinamida;

5 N,2-Dimetilalanil-N-{{(1S,2R)-4-{{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{{[(1S)-1-bencil-2-oxo-2-(propilamino)etil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-2-metoxi-1-[(1S)-1-metilpropil]-4-oxobutil}-N-metil-L-valinamida;

10 N,2-Dimetilalanil-N-{{(1S,2R)-4-{{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{{[(1S)-1-bencil-2-(diethylamino)-2-oxoetil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-2-metoxi-1-[(1S)-1-metilpropil]-4-oxobutil}-N-metil-L-valinamida;

15 N,2-Dimetilalanil-N-{{(1S,2R)-4-{{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{{[(1S)-1-bencil-2-(ter-butylamino)-2-oxoetil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-2-metoxi-1-[(1S)-1-metilpropil]-4-oxobutil}-N-metil-L-valinamida;

20 N,2-Dimetilalanil-N-[(3R,4S,5S)-1-{{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{{[(1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida;

3-metil-D-isovalil-N-{{(1S,2R)-4-{{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{{[(1S)-1-bencil-2-metoxi-2-oxoetil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-2-metoxi-1-[(1S)-1-metilpropil]-4-oxobutil}-N-metil-L-valinamida;

25 3-metil-L-isovalil-N-{{(1S,2R)-4-{{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{{[(1S)-1-

bencil-2-metoxi-2-oxoetil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-2-metoxi-1-[(1S)-1-metilpropil]-4-oxobutil}-N-metil-L-valinamida;

L-isovalil-N-[(1S,2R)-4-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1S)-1-bencil-2-metoxi-2-oxoetil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-2-metoxi-1-[(1S)-1-metilpropil]-4-oxobutil}-N-metil-L-valinamida;

D-isovalil-N-[(1S,2R)-4-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1S)-1-bencil-2-metoxi-2-oxoetil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-2-metoxi-1-[(1S)-1-metilpropil]-4-oxobutil}-N-metil-L-valinamida;

10 1,2-dimetil-L-prolil-N-[(1S,2R)-4-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1S)-1-carboxi-2-feniletal]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-2-metoxi-1-[(1S)-1-metilpropil]-4-oxobutil}-N-metil-L-valinamida;

1,2-dimetil-D-prolil-N-[(1S,2R)-4-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1S)-1-carboxi-2-feniletal]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-2-metoxi-1-[(1S)-1-metilpropil]-4-oxobutil}-N-metil-L-valinamida;

15 N~2~-[2,2-dimetil-3-(metilamino)propanoil]-N-[(1S,2R)-2-metoxi-4-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}propil]pirrolidin-1-il}-1-[(1S)-1-metilpropil]-4-oxobutil}-N-metil-L-valinamida;

20 iletil N-[(2R,3R)-3-[(2S)-1-[(3R,4S,5S)-4-[[N-[2,2-dimetil-3-(metilamino)propanoil]-L-valil}(metil)amino]-3-metoxi-5-metilheptanoil]pirrolidin-2-il]-3-metoxi-2-metilpropanoil]-L-fenilalaninato;

Metil N-[(2R,3R)-3-metoxi-3-[(2S)-1-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-5-metil-4-[metil(N-[(2S)-2-metilpiperidin-2-il]carbonil]-L-

valil)amino]heptanoil}pirrolidin-2-il]-2-metilpropanoil}-L-fenilalaninato;

Metil N-{(2R,3R)-3-metoxi-3-[(2S)-1-{(3R,4S,5S)-3-metoxi-5-metil-4-[metil(N-{[(2R)-2-metilpiperidin-2-il]carbonil})-L-valil)amino]heptanoil}pirrolidin-2-il]-2-metilpropanoil}-L-fenilalaninato;

N-{(2R,3R)-3-metoxi-3-[(2S)-1-{(3R,4S,5S)-3-metoxi-5-metil-4-[metil(N-{[(2S)-2-metilpiperidin-2-il]carbonil})-L-valil)amino]heptanoil}pirrolidin-2-il]-2-metilpropanoil}-L-fenilalanina;

10 N-{(2R,3R)-3-metoxi-3-[(2S)-1-{(3R,4S,5S)-3-metoxi-5-metil-4-[metil(N-{[(2R)-2-metilpiperidin-2-il]carbonil})-L-valil)amino]heptanoil}pirrolidin-2-il]-2-metilpropanoil}-L-fenilalanina;

Metil N-{(2R,3R)-3-[(2S)-1-{(3R,4S,5S)-4-[(N-{[(3R)-3-fluoropirrolidin-3-il]carbonil})-L-valil)(metil)amino]-3-metoxi-5-metilheptanoil}pirrolidin-2-il]-3-metoxi-2-metilpropanoil}-L-fenilalaninato;

Metil N-{(2R,3R)-3-[(2S)-1-{(3R,4S,5S)-4-[(N-{[(3R)-3-fluoropirrolidin-3-il]carbonil})-L-valil)(metil)amino]-3-metoxi-5-metilheptanoil}pirrolidin-2-il]-3-metoxi-2-metilpropanoil}-L-fenilalaninato;

(2S)-N-[(2S)-1-{[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[2-(ciclohepta-2,4,6-trien-1-il)etil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il]-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il](metil)amino}-3-metil-1-oxobutan-2-il]-2-metilpiperidin-2-carboxamida;

25

- (2R)-N-[(2S)-1-[[[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[2-(ciclohepta-2,4,6-trien-1-il)etil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il](metil)amino}-3-metil-1-oxobutan-2-il]-2-metilpiperidin-2-carboxamida;
- 5 2-metil-L-prolil-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[2-(ciclohepta-2,4,6-trien-1-il)etil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida;
- 10 N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[2-(ciclohepta-2,4,6-trien-1-il)etil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N~2~-{[(3R)-3-fluoropirrolidin-3-il]carbonil]-N-metil-L-valinamida;
- 15 N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[2-(ciclohepta-2,4,6-trien-1-il)etil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N~2~-{[(3S)-3-fluoropirrolidin-3-il]carbonil]-N-metil-L-valinamida;
- 20 (2S)-N-[(2S)-1-[[[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-{[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}propil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il](metil)amino}-3-metil-1-oxobutan-2-il]-2-metilpiperidin-2-carboxamida;
- 25 (2R)-N-[(2S)-1-[[[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-{[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}propil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il](metil)amino}-3-metil-1-oxobutan-2-il]-2-metilpiperidin-2-

carboxamida;

N-2-[[(3R)-3-fluoropirrolidin-3-il]carbonil]-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}propil]pirrolidin-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida;

N-2-[[(3S)-3-fluoropirrolidin-3-il]carbonil]-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}propil]pirrolidin-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida;

10 1,2-dimetil-D-prolil-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(2S)-3-(4-aminofenil)-1-metoxi-1-oxopropan-2-il]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il]-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida;

15 1,2-dimetil-D-prolil-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(2S)-3-(4-aminofenil)-1-metoxi-1-oxopropan-2-il]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il]-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida;

20 1,2-dimetil-L-prolil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-3-[(2S)-1-metoxi-1-oxo-3-(1,2,3,4-tetrahidroquinolin-6-il)propan-2-il]amino}-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida;

25 1,2-dimetil-L-prolil-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(2S)-3-(4-aminofenil)-1-metoxi-1-oxopropan-2-il]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il]-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida;

1,2-dimetil-L-prolil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-3-{[(2S)-1-metoxi-1-oxo-3-fenilpropan-2-il]amino}-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida;

5 N-{(2R,3R)-3-[(2S)-1-{(3R,4S,5S)-4-[(N-{[(3R)-3-fluoropirrolidin-3-il]carbonil}-L-valil)(metil)amino]-3-metoxi-5-metilheptanoil}pirrolidin-2-il]-3-metoxi-2-metilpropanoil}-L-fenilalanina;

10 N-{(2R,3R)-3-[(2S)-1-{(3R,4S,5S)-4-[(N-{[(3S)-3-fluoropirrolidin-3-il]carbonil}-L-valil)(metil)amino]-3-metoxi-5-metilheptanoil}pirrolidin-2-il]-3-metoxi-2-metilpropanoil}-L-fenilalanina;

2-Metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2R,4S)-4-carboxi-1-fenilpentan-2-il]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida;

2-Metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-(biciclo[1.1.1]pent-1-ilamino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida;

20 2-Metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-3-{[(1R)-2-metoxi-2-oxo-1-(1-fenilciclopropil)etil]amino}-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida;

2-Metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-3-{[(1S)-2-metoxi-2-oxo-1-(1-fenilciclopropil)etil]amino}-2-

25

metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida;

2-Metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-((1R)-1-
 [(7R)-biciclo[4.2.0]octa-1,3,5-trien-7-il]-2-metoxi-2-
 5 oxoetil}amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-
 metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida;

2-Metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-((1S)-1-
 [(7S)-biciclo[4.2.0]octa-1,3,5-trien-7-il]-2-metoxi-2-
 oxoetil}amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-
 10 metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida;

N,2-Dimetilalanil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{(2S)-2-
 [(1R,2R)-1-metoxi-3-[(2S)-1-metoxi-1-oxo-3-fenilpropan-2-
 il]amino}-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-
 oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida;

15 2-Metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-((1S)-1-
 [(7R)-biciclo[4.2.0]octa-1,3,5-trien-7-il]-2-metoxi-2-
 oxoetil}amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-
 metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida;

N,N,2-trimetilalanil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{(2S)-2-
 20 [(1R,2R)-1-metoxi-3-[(2S)-1-metoxi-1-oxo-3-fenilpropan-2-
 il]amino}-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-
 oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida;

N,N,2-trimetilalanil-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-
 {[(1S)-1-carboxi-2-feniletil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-
 25 oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-

metil-L-valinamida;

2-Metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(R)-
carboxi(1-fenilciclopropil)metil]amino}-1-metoksi-2-metil-3-
oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoksi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-
5 valinamida;

difluoro{2-Metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(3R,4R,7S)-7-
bencil-15-{2-[(3,5-dimetil-1H-pirrol-2-il-kappaN)metiliden]-2H-pirrol-
5-il-kappaN}-4-metil-5,8,13-trioxo-2-oxa-6,9,12-triazapentadecan-3-
il]pirrolidin-1-il}-3-metoksi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-
10 valinamidato}boro;

2-metil-D-prolil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoksi-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-
metoksi-2-metil-3-oxo-3-[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-
il)etil]amino}propil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-
valinamida;

15 metil N-[(2R,3R)-3-[(2S)-1-[(3R,4S,5S)-4-[[N-[(3-aminooxetan-
3-il)carbonil]-L-valil](metil)amino]-3-metoksi-5-
metilheptanoil]pirrolidin-2-il]-3-metoksi-2-metilpropanoil]-L-
fenilalaninato;

2-Metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(3R,4R,7S,12S)-7-bencil-
20 14-[3-cloro-4-(propan-2-iloxi)fenil]-4-metil-12-[4-(8-metilimidazo[1,2-
a]piridin-2-il)bencil]-5,8,14-trioxo-2,9-dioxa-6,13-diazatetradecan-3-
il]pirrolidin-1-il}-3-metoksi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-
valinamida;

2-Metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(2S)-1-[[4-
25 (5-fluoro-1,3-benzotiazol-2-il)-2-metilfenil]amino}-1-oxo-3-

fenilpropan-2-il]amino}-1-metoksi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoksi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida;

1,2-dimetil-D-prolil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoksi-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoksi-3-{[(2S)-1-metoksi-1-oxo-3-fenilpropan-2-il]amino}-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida;

N,2-Dimetilalanil-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2S)-3-(1H-indol-3-il)-1-metoksi-1-oxopropan-2-il]amino}-1-metoksi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoksi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida;

N,2-Dimetilalanil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoksi-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoksi-2-metil-3-oxo-3-{[(2S)-1-oxo-3-fenil-1-(prop-2-en-1-iloksi)propan-2-il]amino}propil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida;

2-metil-L-prolil-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2S)-1-ter-butoxi-1-oxo-3-fenilpropan-2-il]amino}-1-metoksi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoksi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida;

N,2-Dimetilalanil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoksi-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoksi-2-metil-3-oxo-3-{[(2S)-1-oxo-3-fenil-1-[(1H-1,2,3-triazol-4-ilmetil)amino]propan-2-il]amino}propil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida;

N,2-Dimetilalanil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoksi-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoksi-2-metil-3-oxo-3-{[(2S)-1-oxo-3-fenil-1-(prop-2-yn-1-ilamino)propan-2-il]amino}propil]pirrolidin-1-il}-5-metil-

1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida;

N,2-Dimetilalanil-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{(2S)-3-(1H-imidazol-4-il)-1-metoxi-1-oxopropan-2-il]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida;

N,2-Dimetilalanil-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{(2S)-3-(4-hidroxifenil)-1-metoxi-1-oxopropan-2-il]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida;

N,2-Dimetilalanil-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{(1R)-1-carboxi-2-feniletil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida;

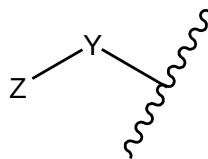
1,2-dimetil-L-prolil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-{(2S)-1-oxo-3-fenil-1-(piperazin-1-il)propan-2-il]amino}propil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida;

1,2-dimetil-L-prolil-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{(2S)-1-amino-3-fenilpropan-2-il]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida; y

2-metil-D-prolil-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{2-(ciclohepta-2,4,6-trien-1-il)etil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida.

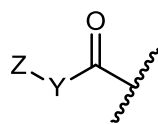
En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a

cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones



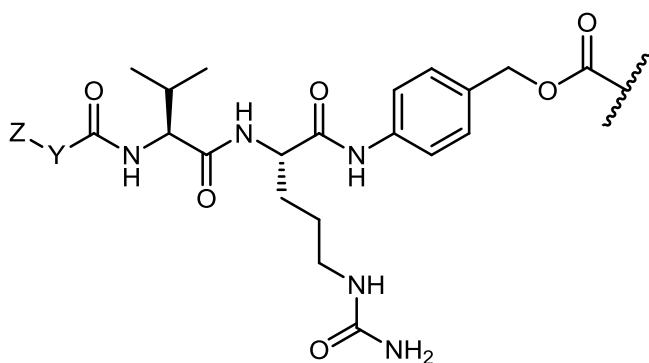
correspondientes, en donde R^1 es

En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones



5 correspondientes, en donde R^1 es

En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones correspondientes, en donde R^1 es



10 En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones correspondientes, en donde Y es C_2-C_{20} alquileo.

En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones correspondientes, en donde Y es $-(CH_2)_p-$; y p es 1-10.

En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones

correspondientes, en donde p es 1. En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones correspondientes, en donde p es 2. En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones correspondientes, en donde p es 3. En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones correspondientes, en donde p es 4. En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones correspondientes, en donde p es 5. En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones correspondientes, en donde p es 6. En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones correspondientes, en donde p es 7. En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones correspondientes, en donde p es 8. En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones correspondientes, en donde p es 9. En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones correspondientes, en donde p es 10.

En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones

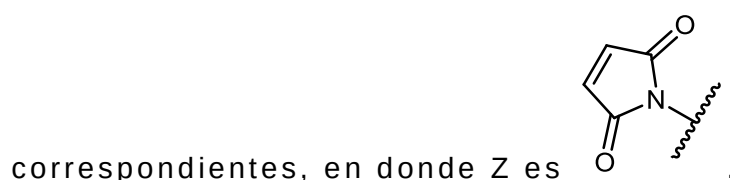
correspondientes, en donde Y es C₂-C₂₀ heteroalquileo.

En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones correspondientes, en donde Y es $-(CH_2CH_2O)_qCH_2CH_2-$; y q es 1-10.

5 En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones correspondientes, en donde q es 1. En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones correspondientes, en donde q es 2. En
10 ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones correspondientes, en donde q es 3. En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones correspondientes, en donde q es 4. En ciertas
15 modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones correspondientes, en donde q es 5. En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones correspondientes, en donde q es 6. En ciertas
20 modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones correspondientes, en donde q es 7. En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones correspondientes, en donde q es 8. En ciertas
25 modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los

compuestos antes mencionados y definiciones correspondientes, en donde q es 9. En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones correspondientes, en donde q es 10.

- 5 En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones



En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones



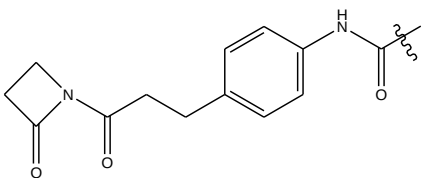
En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones



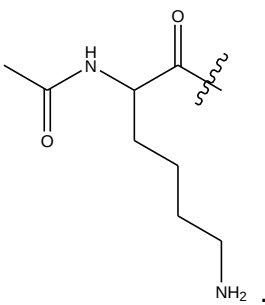
- 15 En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones



En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones

correspondientes, en donde Z es  .

En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones

correspondientes, en donde Z es  .

5 En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones correspondientes, en donde R^7 es F o Cl; y h es 4 o 5.

10 En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones correspondientes, en donde R^7 es F; y h es 3, 4 o 5.

En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones correspondientes, en donde R^7 es F; y h es 5.

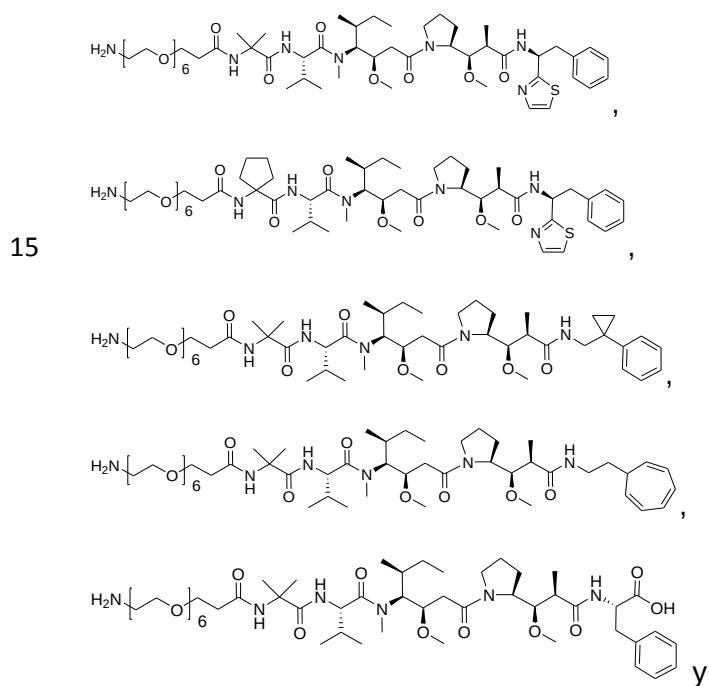
15 En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones correspondientes, en donde Z es $-NH_2$.

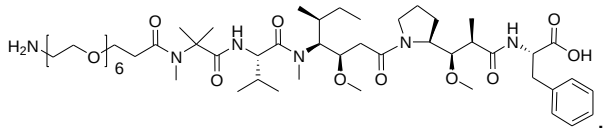
En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones correspondientes, en donde G es Cl. En ciertas modalidades, la

presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones correspondientes, en donde G es Br. En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones correspondientes, en donde G es I.

En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones correspondientes, en donde el compuesto es seleccionado a partir del grupo que consta de los compuestos del Cuadro 18B.

En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos antes mencionados y definiciones correspondientes, en donde el compuesto es seleccionado a partir del grupo que consta de:





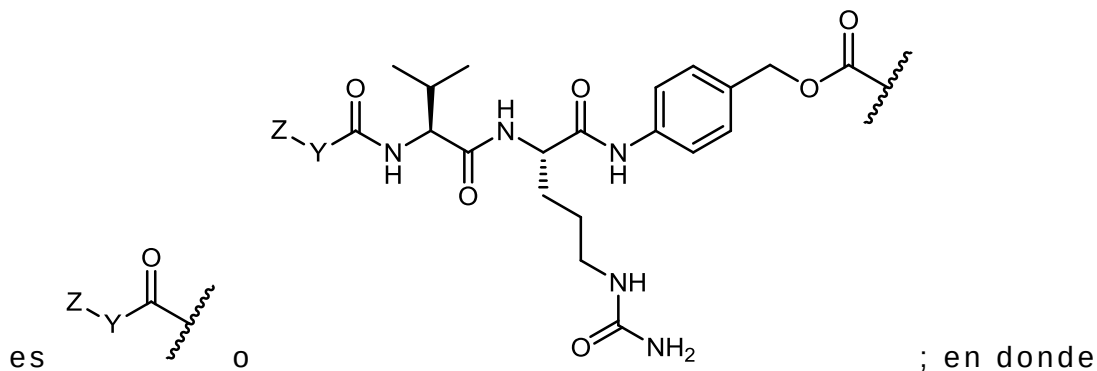
Síntesis de Compuestos y Conjugados de Anticuerpo-Fármaco de los Mismos

5 Los compuestos y conjugados de la invención se pueden elaborar usando los procedimientos sintéticos detallados a continuación en la Ejemplificación. Como se describe en mayor detalle a continuación, los compuestos y conjugados de la invención pueden ser preparados utilizando una sección de una
10 unidad ligadora que tiene un sitio reactivo para enlace a un compuesto.

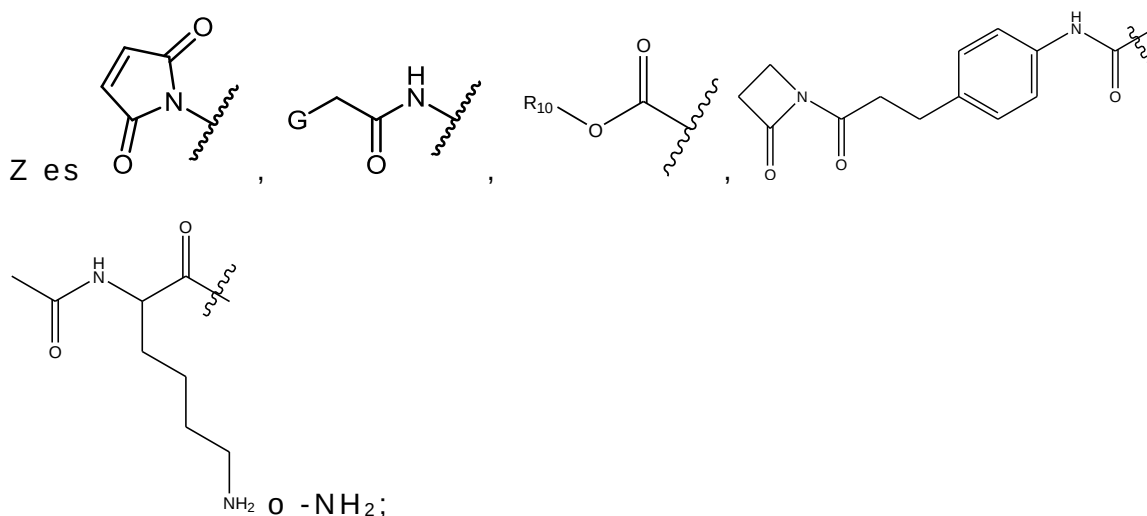
Ligador

Un ligador (referido en ocasiones como “[ligador]” en la
15 presente) es un compuesto bifuncional que puede ser utilizado para unir un fármaco y un anticuerpo para formar un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC). Tales conjugados son útiles, por ejemplo, en la formación de inmunoconjugados dirigidos contra antígenos asociados a tumor. Dichos conjugados permiten el
20 suministro selectivo de fármacos citotóxicos a las células tumorales.

En una modalidad el ligador tiene la fórmula:



Y es C_2 - C_{20} alquileo o C_2 - C_{20} heteroalquileo; C_3 - C_8 carbociclo-, -arileno-, - C_3 - C_8 heterociclo-, - C_1 - C_{10} alquileo-arileno-, -arileno- C_1 - C_{10} alquileo-, - C_1 - C_{10} alquileo-(C_3 - C_8 carbociclo)-, -(C_3 - C_8 carbociclo)- C_1 - C_{10} alquileo-, - C_1 - C_{10} alquileo-(C_3 - C_8 heterociclo)-, o -(C_3 - C_8 heterociclo)- C_1 - C_{10} alquileo-;



R^7 es seleccionado de manera independiente para cada
10 ocurrencia a partir del grupo que consta de F, Cl, I, Br, NO₂, CN y CF₃;

R^{10} es hidrógeno, - C_1 - C_{10} alquilo, - C_3 - C_8 carbociclo, arilo, - C_1 - C_{10} heteroalquilo, - C_3 - C_8 heterociclo, - C_1 - C_{10} alquileo-arilo, -arileno- C_1 - C_{10} alquilo, - C_1 - C_{10} alquileo-(C_3 - C_8 carbociclo), -(C_3 - C_8 carbociclo)-

C_1-C_{10} alquilo, $-C_1-C_{10}$ alquilenno- $(C_3-C_8$ heterociclo), and $-(C_3-C_8$ heterociclo-)- C_1-C_{10} alquilo, en donde el arilo en R_{10} que comprende arilo es opcionalmente sustituido con $[R_7]_h$; y

h es 1, 2, 3, 4 o 5.

- 5 En un ADC el ligador sirve para unir la carga útil al anticuerpo.

En un aspecto, se introduce una segunda sección de la unidad ligadora la cual tiene un segundo sitio reactivo por ejemplo, un grupo electrofílico que es reactivo para un grupo nucleofílico presente en una unidad de anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo). Los grupos nucleofílicos útiles en un anticuerpo incluyen aunque no se limitan a, grupos sulfhidrilo, hidroxilo y amino. El heteroátomo del grupo nucleofílico de un anticuerpo es reactivo para un grupo electrofílico en una unidad ligadora y forma un enlace covalente para una unidad ligadora. Los grupos electrofílicos útiles incluyen, aunque sin limitarse a, grupos maleimida y haloacetamida. El grupo electrofílico proporciona un sitio conveniente para la unión del anticuerpo.

En otra modalidad, una unidad ligadora tiene un sitio reactivo que tiene un grupo nucleofílico que es reactivo para el grupo electrofílico presente en un anticuerpo. Los grupos electrofílicos útiles en un anticuerpo incluyen, aunque no se limitan a, grupos carbonil aldehído y cetona. El heteroátomo de un grupo nucleofílico de una unidad ligadora puede reaccionar con el grupo electrofílico en un anticuerpo y formar un enlace

covalente para el anticuerpo. Los grupos nucleofílicos en una unidad ligadora incluyen, aunque no se limitan a, hidrazida, oxima, amino, hidrazina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidrazina y arilhidrazida. El grupo electrofílico en un anticuerpo proporciona un sitio
5 conveniente para fijación a una unidad ligadora.

Los grupos funcionales amino también son sitios reactivos útiles para una unidad ligadora debido a que pueden reaccionar con ácido carboxílico, o ésteres activados de un compuesto para formar un enlace amida. De manera común, los compuestos de la invención
10 en base a péptido pueden ser preparados mediante la formación de un enlace péptido entre dos o más aminoácidos y/o fragmentos de péptido. Dichos enlaces de péptido se pueden preparar, por ejemplo, de acuerdo con el método de síntesis de fase líquida (véase, por ejemplo, Schroder y Lubke, "The Peptides", volumen 1, pp 76-136,
15 1965, Academic Press) que es bien conocido en el campo de la química de péptido.

Como se describe en mayor detalle a continuación, los conjugados se pueden preparar utilizando una sección de un ligador que tiene un sitio reactivo para enlace a un compuesto de la
20 invención e introduciendo otra sección de la unidad ligadora que tiene un sitio reactivo para un anticuerpo. En un aspecto, una unidad ligadora tiene un sitio reactivo que tiene el grupo electrofílico que es reactivo con un grupo nucleofílico presente en una unidad de anticuerpo, tal como un anticuerpo. El grupo electrofílico proporciona
25 un sitio conveniente para fijación de anticuerpo. Los grupos

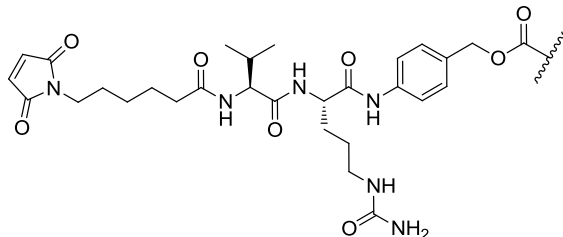
nucleofílicos útiles en un anticuerpo incluyen aunque no se limitan a, grupos sulfhidrilo, hidroxilo y amino. El heteroátomo del grupo nucleofílico de un anticuerpo es reactivo para el grupo electrofílico en una unidad ligadora y forma un enlace covalente para una unidad ligadora. Los grupos electrofílicos útiles incluyen, aunque no se limitan a, grupos maleimida y haloacetamida.

En otra modalidad, una unidad ligadora tiene un sitio reactivo el cual tiene un grupo nucleofílico que es reactivo con el grupo electrofílico presente en una unidad de anticuerpo. El grupo electrofílico en un anticuerpo proporciona un sitio conveniente para la fijación a una unidad ligadora. Los grupos electrofílicos útiles en un anticuerpo incluyen, aunque no se limitan a, grupos carbonil aldehído y cetona. El heteroátomo de un grupo nucleofílico de una unidad ligadora puede reaccionar con el grupo electrofílico en un anticuerpo y formar un enlace covalente para el anticuerpo. Los grupos nucleofílicos útiles en una unidad ligadora incluyen, aunque no se limitan a, hidrazida, oxima, amino, hidrazina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidrazina, y arilhidrazida.

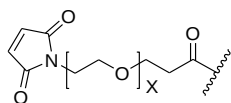
Como se usa en la presente, “mc-” previamente conocido



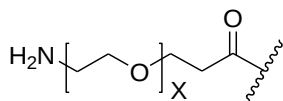
Como se utiliza en la presente, “mcValCitPABC-” previamente conocido como “MalCValCitPABC-” se refiere a



Como se usa en la presente, “MalPegXC2-” se refiere a

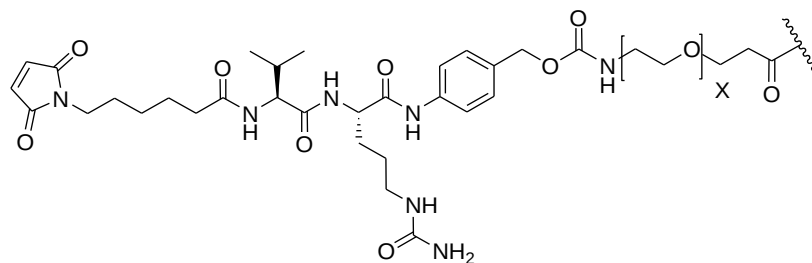


Como se usa en la presente, “AmPegXC2-” se refiere a



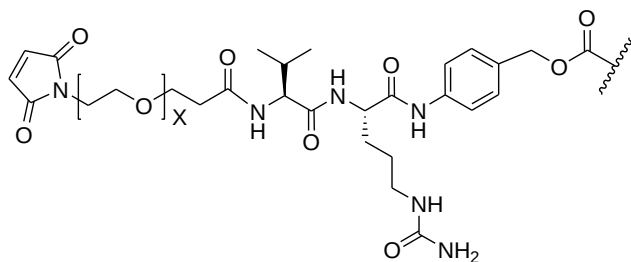
5

Como se usa en la presente, “mcValCitPABCAmPegXC2-” se



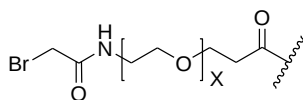
refiere a

Como se usa en la presente, “MalPegXC2ValCitPABC-” se refiere a

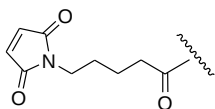


10

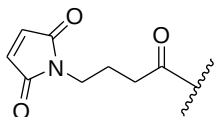
Como se usa en la presente, “2BrAcPegXC2” se refiere a



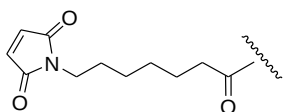
Como se usa en la presente, “mv-” se refiere a



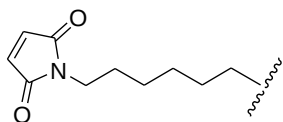
Como se usa en la presente, “mb-” se refiere a



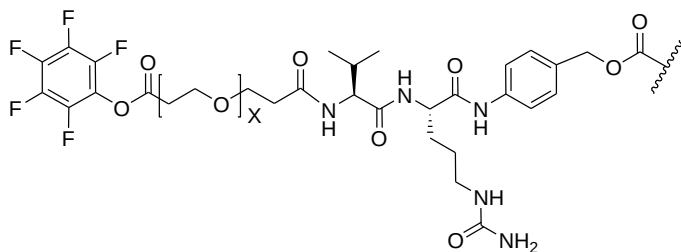
5 Como se usa en la presente, “me-” se refiere a



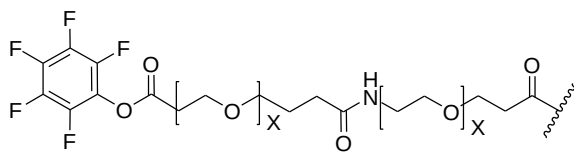
Como se usa en la presente, “MalC6-” se refiere a



10 Como se usa en la presente, “PFPCOPegXC2ValCitPABC-” se refiere a

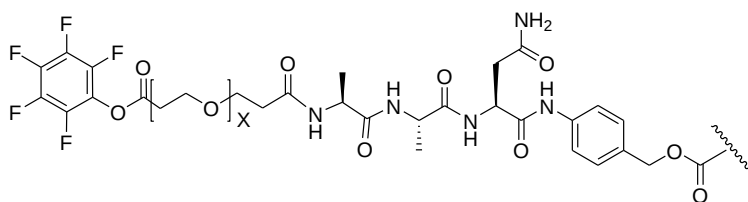


Como se usa en la presente, “PFPCOPegXC2AmPegYC2-” se refiere a

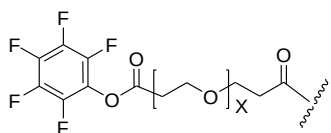


15 Como se usa en la presente,

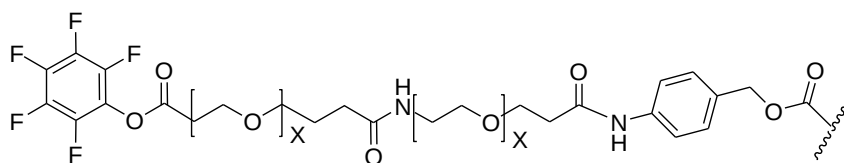
“PFPCOPegXC2AlaAlaAsnPABC-” se refiere a



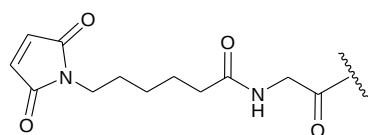
Como se usa en la presente, “PFPCOPegXC2-” se refiere a



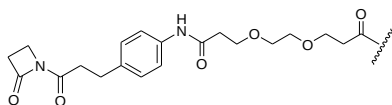
- 5 Como se usa en la presente, “PFPCOPegXC2AmPegYC2PABC-” se refiere a



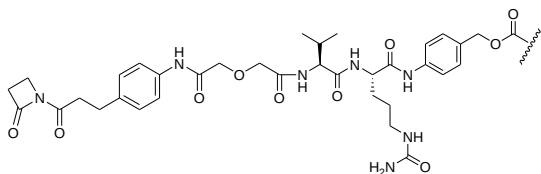
Como se usa en la presente, “mcGly-” se refiere a



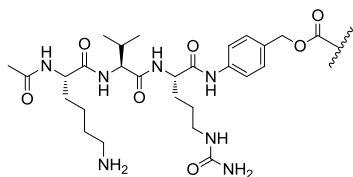
- 10 Como se usa en la presente, “AzCOC2Ph4AmCOPeg2C2-” se refiere a



Como se usa en la presente, “AzCOC2Ph4AmPeg1C1-” se refiere a



Como se usa en la presente, "AcLysValCitPABC-" se refiere a



5 Conjugación con Transglutaminasa

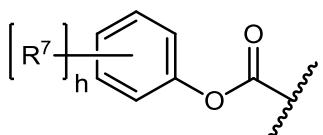
En ciertas modalidades, un compuesto de la invención puede ser entrelazado de manera covalente a un polipéptidos que contiene Fc o que contiene Fab modificado genéticamente con una marca que contiene glutamina donadora de acilo (por
 10 ejemplo, marcas de péptido que contienen Gln o Q-marcas) o una glutamina endógena hecha reactiva (es decir, la habilidad para formar un enlace covalente con un donador acilo en presencia de una amina y una transglutaminasa) mediante
 15 modificación genética de polipéptido (por ejemplo, a través de eliminación, inserción, sustitución o mutación de aminoácido o cualquier combinación de las mismas en el polipéptido), en presencia de transglutaminasa, a condición de que el compuesto de la invención comprenda un agente donador de
 20 amina (por ejemplo, molécula pequeña que comprende o es fijada a una amina reactiva), formando de esta manera una población estable y homogénea de un conjugado de polipéptido que contiene Fc genéticamente modificado con el agente

donador de amina que está específicamente conjugado en el sitio para el polipéptido que contiene Fc o que contiene Fab a través de la marca que contiene glutamina donadora de acilo o la glutamina endógena expuesta/accesible/reactiva. Por ejemplo, los compuestos de la invención pueden ser conjugados como se describió en la
5 Solicitudo de Patente Internacional No. de Serie PCT/IB2011/054899, cuyo contenido completo está incorporado a la presente mediante referencia. En ciertas modalidades, para facilitar la conjugación del compuesto de la invención a un polipéptido que contiene Fc o que
10 contiene Fab modificado genéticamente con una marca que contiene glutamina donadora de acilo o una glutamina endógena hecha reactiva por medio de una modificación genética de polipéptido en presencia de transglutaminasa, Z es NH₂.

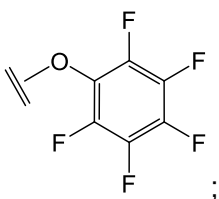
15 **Conjugación para la Región Constante de Dominio Kappa de Cadena Ligera Humana**

En ciertas modalidades, un compuesto de la invención puede ser fijado de manera covalente a la cadena lateral de K¹⁸⁸ de la
20 región constante de dominio kappa de cadena ligera humana (CLK) (numeración de cadena ligera completa de acuerdo con Kabat). K188 puede ser nombrado también CLK K80, cuando contiene sólo la región constante kappa humana, por ejemplo, de NOs ID SEC: 1, 2, 3 and 4). Por ejemplo, los compuestos de la invención pueden ser
25 conjugados como se describe en la Solicitudo de Patente de los

Estados Unidos Número de Serie 13/180,204, o WO2012/007896 cuyos contenidos completos están incorporados en la presente mediante referencia. En ciertas modalidades, para facilitar la conjugación para K188 CLk (CLk-

5 K80), Z es ; R⁷ es seleccionado de manera independiente para cada ocurrencia a partir del grupo que consta de F, Cl, I, Br, NO₂, CN and CF₃; y h es 1, 2, 3, 4 o 5.

En ciertas modalidades, para facilitar la conjugación para K¹⁸⁸ CLk (CLk-K80), Z es

10 ;

La presente invención proporciona además conjugados anticuerpo-fármaco que comprenden un anticuerpo, o porciones de enlace de antígeno del mismo, que comprenden un dominio kappa constante conjugado de manera covalente para una
15 toxina de la invención, caracterizado porque al menos una toxina de la invención es conjugada de manera covalente para K80 de NO ID SEC:1, NO ID SEC:2, NO ID SEC:3 o NO ID SEC:4 (Cuadro 1). En ciertos aspectos, el número de toxinas de la invención conjugadas de forma covalente para K80 puede estar
20 en un rango cuyo límite inferior es seleccionado a partir del grupo que consta de aproximadamente 1.5, aproximadamente

1.6, aproximadamente 1.7, aproximadamente 1.8, aproximadamente 1.9, y aproximadamente 2.0, y cuyo límite superior es seleccionado a partir del grupo que consta de aproximadamente 2.0, aproximadamente 2.1, aproximadamente 2.2, aproximadamente 2.3, 5 aproximadamente 2.4, aproximadamente 2.5. En ciertos aspectos, p es aproximadamente 2.

La conjugación de la toxina con el dominio de cadena ligera constante de un anticuerpo es particularmente deseable para reducir al mínimo, o prevenir, cualquier interferencia con el enlace de la 10 porción Fc del anticuerpo a receptores Fc (tales como FcγR y FcRn) o el enlace del anticuerpo a su objetivo respectivo. De modo inverso, la conjugación de la toxina respectiva a la porción Fc de un anticuerpo puede reducir la vida media del anticuerpo *in vivo* y/o su capacidad para interactuar con el sistema inmune (función efectora).

15 La conjugación de la toxina en la región de cadena pesada variable (VH) o cadena ligera variable (VL) del anticuerpo conlleva el riesgo de disminuir el enlace del anticuerpo a su cognado.

Además, en tanto que la conjugación para CLk-K80 es confiable y robusta, la conjugación para otras lisinas de superficie de 20 anticuerpo, cada una de reactividad ligeramente distinta y pI puede resultar en una muestra heterogénea de anticuerpos conjugados que pueden liberar moléculas conjugadas en momentos inoportunos o irregulares, por ejemplo durante la circulación y antes del suministro de la Porción Efectora al objetivo mediante reconocimiento de 25 anticuerpo.

Además, la presente invención proporciona polimorfismos conocidos de la cadena kappa V/A en la posición 45 y A/L en la posición 83 (proporcionando los 3 polimorfismos kappa constantes humanos identificados Km(1):V45/L83 (NO ID SEC:2), Km(1,2):

5 A45/L83 (NO ID SEC:3), y Km(3) A45/V83 (NO ID SEC:4)). La variabilidad de los residuos en las posiciones 45 y 83 en NO ID SEC:1 se puede seleccionar a fin de proporcionar sólo uno, dos o los tres de Km(1), Km(1,2), y Km(3) polimorfismos.

10 Cuadro 1

NO ID SEC	DESCRIPCIÓN	SECUENCIA
1	hLC región constante GENUS	TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDN ^x LQSGN SQESVTEQDS KDSTYSLSST LTLSKADYEK HK ^x YACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
2	h LC región constante Km(1) polimorfismo (V45/L83)	TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNVLQSGN SQESVTEQDS KDSTYSLSST LTLSKADYEK HKLYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
3	h LC región constante Km(1,2) polimorfismo A45/L83	TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYSLSST LTLSKADYEK HKLYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
4	h LC región constante Km(3) polimorfismo A45/V83	TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYSLSST LTLSKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC

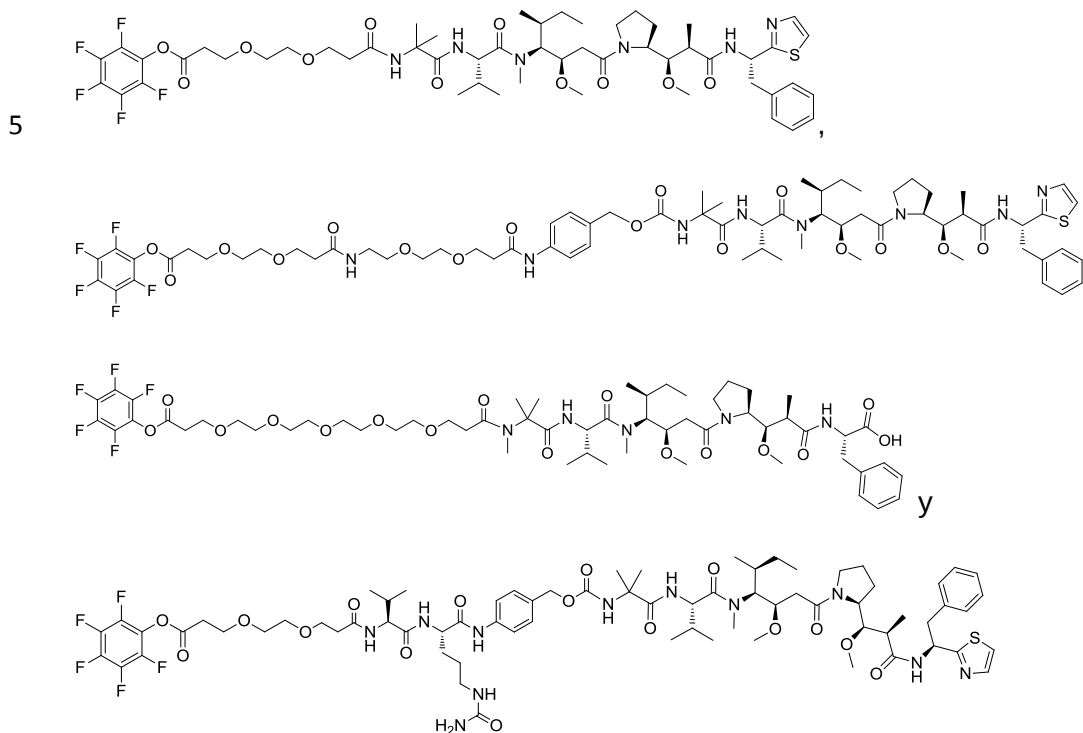
En donde x en la posición 45 es A o V, y x en la posición 83 es L o V.

En ciertas modalidades, la invención proporciona una composición que comprende un compuesto de la invención

15 conjugado de manera covalente para un anticuerpo (o porción de enlace de antígeno del mismo), en donde por lo menos aproximadamente 50%, o por lo menos aproximadamente 60%, o por lo menos aproximadamente 70%, o por lo menos

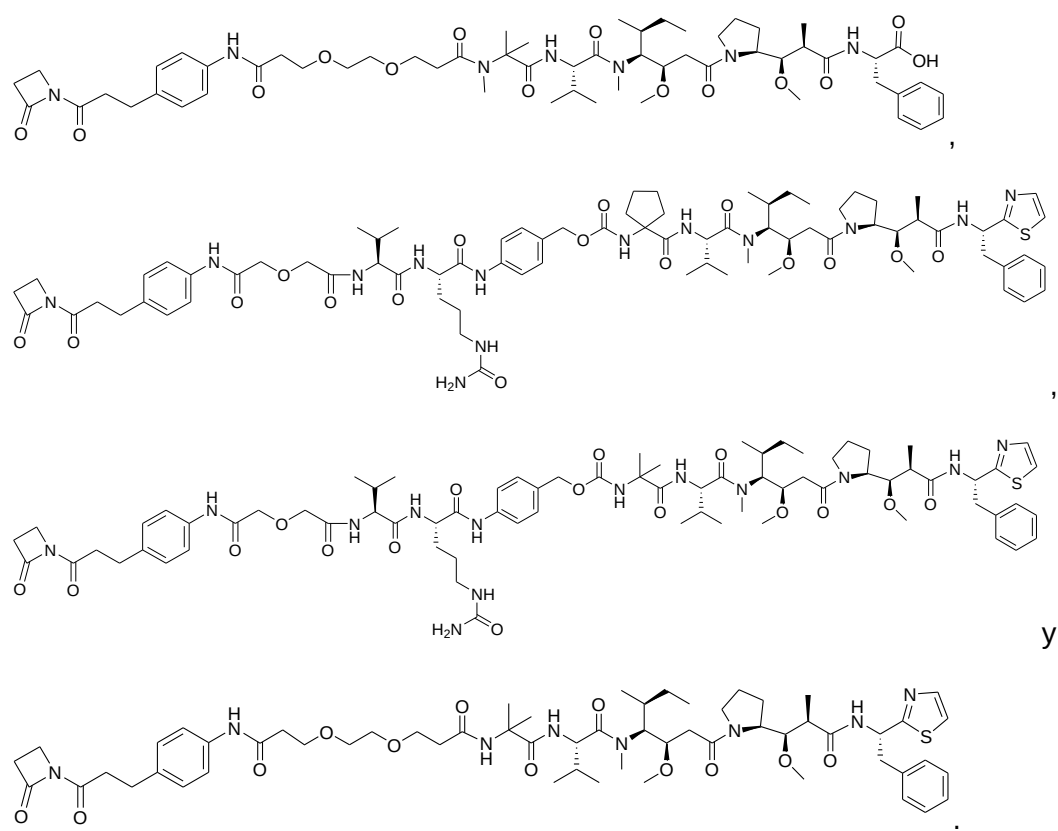
aproximadamente 80%, o por lo menos aproximadamente 90% del compuesto de la invención en la composición es conjugado para el anticuerpo o porción de enlace de antígeno del mismo en K¹⁸⁸ CLk.

En ciertas modalidades, los compuestos de la invención



pueden ser conjugados para el sitio de combinación de un anticuerpo catalítico, tales como los anticuerpos de aldolasa, o porción de enlace de antígeno de los mismos. Los anticuerpos de aldolasa contienen porciones de sitio de combinación que, cuando son armoniosas (por ejemplo mediante conjugación), catalizan una reacción de adición de aldol entre un donador de cetona alifática y un aceptor de aldehído. Los contenidos de la Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. US 2006/205670 están incorporados en la presente mediante referencia, en particular en las páginas 78-118 que describen enlazadores, y los párrafos

[0153]-[0233] que describen anticuerpos, fragmentos útiles, variantes y modificaciones de los mismos, h38C2, sitios de combinación y regiones de determinación complementarias (CDRs), y tecnología de anticuerpo relacionada (Cuadro 2, y los compuestos ilustrativos siguientes):



El término "sitio de combinación" incluye las CDRs y los residuos de estructura adyacentes que están involucrados en el enlace de antígeno.

Cuadro 2

NO ID SEC	DESCRIPCIÓN	SECUENCIA
-----------	-------------	-----------

5	<u>h38C2 VL</u>	ELQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRSSQSLL HTYGSPYLNW YLQKPGQSPK LLIYKVSNR SGVPSRFSGS GSGTDFTLTI SSLQPEDFAV YFCSQGTHLP YTFGGGTKVE IK
6	<u>h38C2 VH</u>	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS NYWMSWVRQS PEKGLEWVSE IRLRSDNYAT HYAESVKGRF TISRDN SKNT LYLQMNSLRA EDTGIYYCKT YFYFSYWGQ GTLVTVSS
7	<u>h38C2 LC</u>	ELQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRSSQSLL HTYGSPYLNW YLQKPGQSPK LLIYKVSNR SGVPSRFSGS GSGTDFTLTI SSLQPEDFAV YFCSQGTHLP YTFGGGTKVE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDSTYSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE VTHQGLSSPV TKSFNRGEC
8	<u>h38C2 HC</u>	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS NYWMSWVRQS PEKGLEWVSE IRLRSDNYAT HYAESVKGRF TISRDN SKNT LYLQMNSLRA EDTGIYYCKT YFYFSYWGQ GTLVTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS CDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK

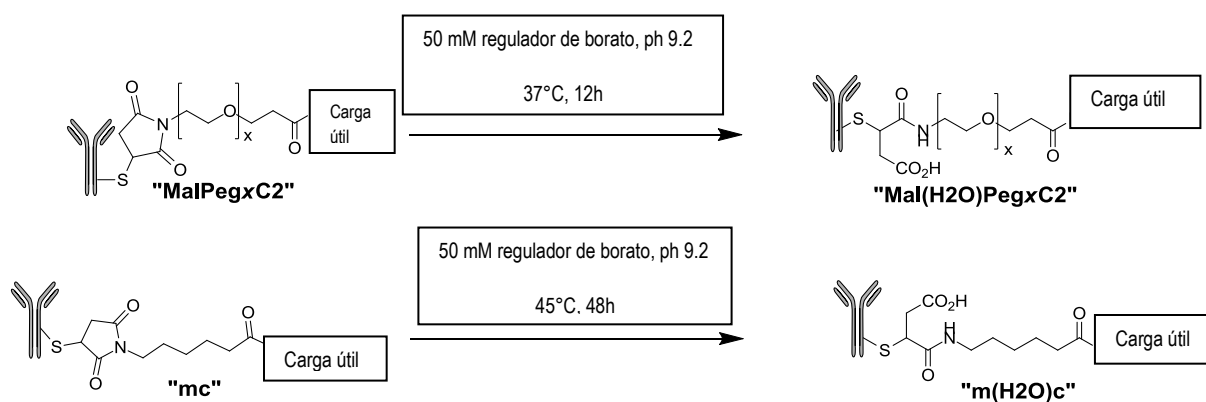
Conjugación con ligadores que comprenden succinimidas, que incluyen versiones de anillo-abierto

En ciertas modalidades, la presente invención incluye un compuesto de la invención conjugado a través de un ligador en base a succinimida o un ligador en base a succinimida de anillo abierto. La estabilidad del enlace succinimida-cisteina se convertido en un área de creciente interés. Las succinimidas pueden ser transferidas tanto *in vitro* como *in vivo* a tiol nucleófilos exógenos, presumiblemente a través de una reacción retro-Michael que resulta en una maleimida que es subsecuentemente atacada por un tiol. Se considera que la hidrólisis del anillo resulta en una especie que es resistente a la reacción retro-Michael. Esto hace al conjugado

resultante más estable y potencialmente más eficaz. Las condiciones pueden ser optimizadas para abrir de manera forzada el anillo succinimida en el conjugado. Las condiciones básicas dieron como resultado una hidrólisis sencilla del anillo.

5 Por ejemplo, los ligadores que contienen una cadena polietilen glicol (PEG) pueden ser hidrolizados a pH 9.2 a 37°C en aproximadamente 12h, y los ligadores que contienen una cadena alquilo, tal como "mc" pueden requerir de una mayor temperatura y mayor tiempo de reacción a fin de activar la

10 apertura del anillo para complementación.



Ejemplo de hidrólisis forzada de conjugados en base a maleimida

15 A fin de evaluar la estabilidad de estos conjugados y asignar prioridades a las muestras para evaluación *in vivo*, se desarrolló un ensayo que involucra el tratamiento de los conjugados maleimida-enlazados con glutatión acuoso en exceso (GSH) o plasma. Las alícuotas de la mezcla de reacción

20 fueron analizadas en varios intervalos de tiempo preestablecidos para determinar la carga del conjugado, utilizando la

metodología antes descrita. Los resultados (Cuadro 24) indican que el enlace fármaco-anticuerpo es escindido lentamente de una manera GSH-dependiente. Como se esperaba, la velocidad de escisión es altamente dependiente de la hidrólisis del anillo de succinimida. De manera importante, estos resultados parecen traducirse para mejorar la exposición PK, como se midió a través de un incremento en el área-bajo-la-curva (AUC, por sus siglas en inglés) del conjugado y a través de un incremento en la relación de exposición conjugado/Ab.

10 **Método para determinar la estabilidad de ADCs**

La muestra de ADC (30 µg) en PBS es mezclada con solución de glutatión (GSH) para producir la concentración final de GSH de 0.5 mM y 3 mg/mL de concentración de proteína. De igual manera se prepare una muestra de control (sin GSH) a partir de 30 µg ADC diluidos para 3 mg/mL en PBS. La muestra ADC GSH-tratada y la muestra ADC de control fueron incubadas a 37°C y fueron muestreadas a 0, 3, y 6 días. Las alícuotas fueron reducidas con TCEP en exceso, acidificadas mediante la adición de solución de ácido fórmico al 0.1% con 10% acetonitrilo y analizadas para carga por medio de LC/MS como se describe más adelante.

Análisis de muestra: El análisis se realizó utilizando una HPLC capilar Aglient 1100 acoplada con espectrómetro de masa Waters Xevo G2 Q-TOF. Los analitos fueron cargados en una columna Zorbax Poroshell 300SB C8 (0.5 mm X 75 mm, mantenida a 80°C) con ácido fórmico al 0.1%, y eluida utilizando un gradiente de 20–40%

solución reguladora B (80% acetonitrilo, 18% 1-propanol, 2% agua con ácido fórmico al 0.1%) a una velocidad de flujo de 20 µl/min durante 5.5 minutos. La detección espectrométrica de masa se llevo a cabo en modo de sensibilidad positive con
5 voltaje capilar fijado a 3.3 kV. El análisis de datos se realizó con la función MaxEnt 1 en MassLynx y se utilizaron intensidades para cálculo de carga en base a la fórmula descrita previamente.

10 Composiciones y Métodos de Administración

En otras modalidades, otro aspecto de la invención se refiere a composiciones farmacéuticas que incluyen una cantidad efectiva de un compuesto de la invención y/o
15 conjugado anticuerpo-fármaco del mismo y un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable. En ciertas modalidades, las composiciones son adecuadas para administración veterinaria o humana.

Las actuales composiciones farmacéuticas pueden estar
20 en cualquier forma que permite que la composición sea administrada a un paciente. Por ejemplo, la composición puede estar en la forma de un sólido o un líquido. Las rutas de administración comunes incluyen, sin limitación, parenteral, ocular e intra-tumor. La administración parenteral incluye
25 inyecciones subcutáneas, intravenosas, intramusculares o

técnicas de inyección o infusión intraesternal. En un aspecto, las composiciones son administradas parenteralmente. En una modalidad específica, las composiciones son administradas por vía intravenosa.

Las composiciones farmacéuticas pueden ser formuladas a fin
5 de permitir que un compuesto de la invención y/o conjugado anticuerpo-fármaco del mismo estén biodisponibles al momento de la administración de la composición al paciente. Las composiciones pueden tomar la forma de una o más unidades de dosis, en donde por ejemplo, una tableta puede ser una unidad de dosis individual, y
10 un recipiente de un compuesto de la invención y/o conjugado anticuerpo-fármaco del mismo en forma líquida puede contener una pluralidad de unidades de dosis.

Los materiales usados en la preparación de las composiciones farmacéuticas pueden ser no tóxicos en las cantidades utilizadas.
15 Será evidente para aquellos con experiencia en la técnica que la dosificación óptima de él o los ingredientes activos en la composición farmacéutica dependerá de una variedad de factores. Los factores relevantes incluyen, sin limitación, el tipo de animal (por ejemplo, humano), la forma particular del compuesto de la
20 invención y/o conjugado anticuerpo-fármaco del mismo, la forma de administración y la composición empleada.

El excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser sólido o en partículas, de modo que las composiciones están, por ejemplo, en forma de tableta o de polvo. El(Los) excipiente(s)
25 puede(n) ser líquido(s). Además, el (los) excipiente(s) pueden estar

en partículas.

La composición puede estar en la forma de un líquido, por ejemplo, una solución, emulsión o suspensión. En una composición para administración mediante inyección, pueden
5 incluirse también uno o más agentes tensioactivos, conservadores, agentes de humectación, agente dispersantes, agentes de suspensión, reguladores de pH, estabilizadores y agentes isotónicos.

Las composiciones líquidas, ya sean soluciones,
10 suspensiones u otra forma similar, pueden incluir también uno o más de los siguientes: diluyentes estériles tales como agua para inyección, solución de salina, de preferencia solución salina fisiológica, solución de Ringer, cloruro de sodio isotónico, aceites fijados tales como mono o diglicéridos
15 sintéticos que pueden servir como el solvente o medio de suspensión, polietilén glicoles, glicerina, ciclodextrina, propilén glicol u otros solventes; agentes antibacteriales tales como alcohol bencílico o metil parabeno; antioxidantes como el ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes como el ácido
20 etilendiamintetraacético; soluciones amortiguadoras tales como acetatos, citratos, fosfatos o amino ácidos y agentes para el ajuste de la tonicidad como el cloruro o dextrosa de sodio. Una composición parenteral puede ser encerrada en una ampolleta, una jeringa desechable o un envase de dosis múltiple de vidrio,
25 plástico u otro material. La solución salina fisiológica es un

auxiliar ilustrativo. Una composición inyectable es preferiblemente estéril.

La cantidad de un compuesto de la invención y/o conjugado anticuerpo-fármaco del mismo que es efectiva para el tratamiento de un padecimiento o condición particular dependerá de la naturaleza del padecimiento o condición, y se puede determinar a través de técnicas clínicas estándar. Además, las pruebas in vitro o in vivo se pueden emplear de manera opcional para ayudar a identificar los rangos de dosificación óptimos. La dosis precisa que se utilizará en las composiciones dependerá también de la ruta de administración y la seriedad de la enfermedad o padecimiento, y se decidirá de acuerdo con el criterio del practicante y las circunstancias de cada paciente.

Las composiciones comprenden una cantidad efectiva de un compuesto de la invención y/o conjugado anticuerpo-fármaco del mismo de modo que se obtendrá una dosificación adecuada. De modo común, esta cantidad es de por lo menos aproximadamente 0.01% de un compuesto de la invención y/o conjugado anticuerpo-fármaco del mismo en peso de la composición. En una modalidad ilustrativa, las composiciones farmacéuticas son preparadas de manera que una unidad de dosificación parenteral contiene desde aproximadamente 0.01% hasta aproximadamente 2% en peso de la cantidad de un compuesto de la invención y/o conjugado anticuerpo-fármaco del mismo.

Para administración intravenosa, la composición puede

comprender desde aproximadamente 0.01 hasta aproximadamente 100 mg de un compuesto de la invención y/o conjugado anticuerpo-fármaco del mismo por kg del peso corporal del paciente. En un aspecto, la composición can
5 incluye desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 100 mg de un compuesto de la invención y/o conjugado anticuerpo-fármaco del mismo por kg del peso corporal del paciente. En otro aspecto, la cantidad administrada estará en el rango desde aproximadamente 0.1 hasta aproximadamente 25 mg/kg de peso
10 corporal de un compuesto de la invención y/o conjugado anticuerpo-fármaco del mismo.

En general, la dosificación de un compuesto de la invención y/o conjugado anticuerpo-fármaco del mismo administrado a un paciente es, de manera común, de
15 aproximadamente 0.01 mg/kg hasta aproximadamente 20 mg/kg del peso corporal del paciente. En un aspecto, la dosificación administrada a un paciente es de entre aproximadamente 0.01 mg/kg hasta aproximadamente 10 mg/kg del peso corporal del paciente. En otro aspecto, la dosificación administrada a un
20 paciente es de entre aproximadamente 0.1 mg/kg y aproximadamente 10 mg/kg del peso corporal del paciente. En otro aspecto más, la dosificación administrada a un paciente es de entre aproximadamente 0.1 mg/kg y aproximadamente 5 mg/kg del peso corporal del paciente. En otro aspecto más la
25 dosificación administrada es de entre aproximadamente 0.1

mg/kg hasta aproximadamente 3 mg/kg del peso corporal del paciente. En un aspecto más, la dosificación administrada es de entre aproximadamente 1 mg/kg hasta aproximadamente 3 mg/kg del peso corporal del paciente.

5 Un compuesto de la invención y/o conjugado de anticuerpo-fármaco del mismo puede ser administrado a través de cualquier ruta conveniente, por ejemplo mediante infusión o inyección de bolo. La administración puede ser sistémica o local. Se conocen varios sistemas de suministro, por ejemplo, encapsulado en liposomas,
10 micropartículas, microcápsulas, cápsulas, etcétera, y se pueden utilizar para administrar un compuesto de la invención y/o conjugado anticuerpo-fármaco del mismo. En ciertas modalidades, más de un compuesto de la invención y/o conjugado anticuerpo-fármaco del mismo es administrado a un paciente.

15 En modalidades específicas, puede ser deseable administrar uno o más compuestos de la invención y/o conjugados de anticuerpo-fármaco de los mismos de manera local al área que necesita del tratamiento. Esto se puede lograr, por ejemplo, y no a manera de limitación, mediante infusión local durante la cirugía; aplicación
20 tópica, por ejemplo, en conjunción con un apósito para herida después de la cirugía; mediante inyección a través de un catéter; o por medio de un implante, el implante que es e un material poroso, no-poroso, o gelatinoso, que incluye membranas, tales como membranas silásticas o fibras. En una modalidad, la administración
25 puede ser mediante inyección directa en el sitio (o sitio anterior) de

un cáncer, tumor o tejido neoplásico o pre-neoplásico. En otra modalidad, la administración puede ser mediante inyección directa en el sitio (o sitio anterior) de una manifestación de una enfermedad autoinmune.

5 En otra modalidad más, el compuesto de la invención y/o conjugado anticuerpo-fármaco del mismo puede ser suministrado en un sistema de liberación controlada, tal como, aunque sin limitarse a, una bomba o se pueden utilizar varios materiales poliméricos. En otra modalidad más, un sistema de liberación controlada puede ser colocado en proximidad al
10 objetivo del compuesto de la invención y/o conjugado anticuerpo-fármaco del mismo, por ejemplo, el hígado, requiriendo por tanto sólo de una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, in Medical Applications of
15 Controlled Release, supra, vol. 2, pp. 115-138 (1984)). Se pueden utilizar otros sistemas de liberación controlada descritos en la revisión de Langer (Science 249:1527-1533 (1990)).

 El término "vehículo" se refiere a un diluyente, auxiliar o
20 excipiente, con el cual se administra un compuesto o conjugado anticuerpo-fármaco del mismo. Dichos vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos, tales como agua y aceites, que incluyen aquellos del petróleo, animales, vegetales o de origen sintético. Los vehículos pueden ser solución salina, y similares.
25 Además, se pueden usar agentes auxiliares, estabilizadores y

otros. En una modalidad, cuando se administra a un paciente, el compuesto o conjugado y los vehículos farmacéuticamente aceptables son estériles. El agua es un vehículo ilustrativo cuando el compuesto o conjugado son administrados por vía intravenosa. Las
5 soluciones salinas y las soluciones de dextrosa y glicerol acuosas también pueden ser utilizadas como vehículos líquidos, en particular para soluciones inyectables. Las composiciones de la presente, si se desea, pueden contener también cantidades menores de agentes de humectación y emulsificación, o agentes reguladores de pH.

10 Las composiciones de la presente pueden tomar la forma de soluciones, gránulos, polvos, formulaciones de liberación sostenida, o cualquier otra forma adecuada para el uso. Otros ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" by E. W. Martin.

15 En una modalidad, el compuesto de la invención y/o conjugado anticuerpo-fármaco del mismo son formulados de acuerdo con procedimientos de rutina como una composición farmacéutica adaptada para administración intravenosa a animales, en particular seres humanos. De manera común, los portadores o vehículos para
20 administración intravenosa son soluciones amortiguadoras acuosas isotónicas estériles. Cuando es necesario, las composiciones pueden incluir también un agente de solubilización. Las composiciones para administración intravenosa pueden comprender de manera opcional un anestésico local como la lignocaina en caso de dolor en el sitio
25 de la inyección. En general, los ingredientes son suministrados ya

sea por separado o mezclados juntos en forma de unidad de dosificación unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado deshidratado o concentrado libre de agua en un recipiente herméticamente sellado tal como una ampolleta o sobrecito que indica la cantidad de agente activo. Cuando un compuesto de la invención y/o conjugado anticuerpo-fármaco del mismo va a ser administrado mediante infusión, puede ser suministrado, por ejemplo, con una botella de infusión que contiene agua o solución salina de grado farmacéutico estéril. Cuando el compuesto de la invención y/o conjugado anticuerpo-fármaco del mismo es administrado mediante inyección, se puede proporcionar una ampolleta de agua estéril para inyección o solución salina de manera que los ingredientes pueden ser mezclados antes de la administración.

La composición puede incluir varios materiales que modifican la forma física de una unidad de dosis sólida o líquida. Por ejemplo, la composición puede incluir materiales que forman una capa de recubrimiento alrededor de los ingredientes activos. Los materiales que forman la capa de recubrimiento comúnmente son inertes, y pueden ser seleccionados a partir de, por ejemplo, azúcar, goma-laca y otros agentes de recubrimiento entérico. De manera alternativa, los ingredientes activos pueden ser encerrados en una cápsula de gelatina.

Ya sea en forma sólida o líquida, las composiciones de la

presente pueden incluir un agente farmacológico usado en el tratamiento del cáncer.

Usos Terapéuticos de los Compuestos y Conjugados de

5 Anticuerpo-Fármaco de los Mismos

Otro aspecto de la invención se refiere a un método para usar los compuestos de la invención y los conjugados de anticuerpo-fármaco de los mismos para tratar el cáncer.

10 Los compuestos de la invención y/o conjugados de anticuerpo-fármaco de los mismos son útiles para inhibir la multiplicación de una célula tumoral o célula cancerosa, ocasionando apoptosis en una célula tumoral o cancerosa, o para tratar el cáncer en un paciente. Los compuestos de la invención y/o conjugados de anticuerpo-
15 fármaco de los mismos pueden ser utilizados consecuentemente en una variedad de entornos para el tratamiento de cánceres de animales. Dichos conjugados pueden ser usados para suministrar un compuesto de la invención a una célula tumoral o célula cancerosa. Sin enlazarse a teoría, en una modalidad, el anticuerpo del
20 conjugado se enlaza a o se asocia con un antígeno de célula cancerosa o de célula tumoral, y el conjugado puede ser absorbido (internalizado) dentro de una célula tumoral o célula cancerosa a través de la endocitosis receptor-mediada u otro mecanismo de internalización. El antígeno puede ser fijado a una célula tumoral o
25 célula cancerosa o puede ser una proteína de matriz extracelular

asociada con la célula tumoral o célula cancerosa. En ciertas modalidades, una vez dentro de la célula, una o más de las secuencias de péptido específico son eliminadas enzimática o hidrolíticamente a través de una o más proteasas asociadas a célula tumoral o célula cancerosa, resultando en la liberación de un compuesto de la invención desde el conjugado. El compuesto liberado de la invención está en libertad entonces de migrar dentro de la célula e inducir actividades citotóxicas o citostáticas. El conjugado puede ser separado también por medio de una proteasa intracelular para liberar un compuesto de la invención. En una modalidad alternativa, el compuesto de la invención es separado desde el conjugado fuera de la célula tumoral o célula cancerosa, y el compuesto de la invención penetra de manera subsecuente la célula.

En ciertas modalidades, los conjugados proporcionan marcación de fármaco de tumor o cáncer de conjugación específica, reduciendo por tanto la toxicidad general de los compuestos de la invención.

En otra modalidad, la unidad de anticuerpo se enlaza a la célula tumoral o célula cancerosa.

En otra modalidad, la unidad de anticuerpo se enlaza a un antígeno de célula tumoral o de célula cancerígena que está en la superficie de la célula tumoral o célula cancerosa.

En otra modalidad, la unidad de anticuerpo se enlaza a un antígeno de célula tumoral o de célula cancerígena que es una

proteína de matriz extracelular asociada con la célula tumoral o célula cancerosa.

La especificidad de la unidad de anticuerpo para una célula tumoral o célula cancerosa particular puede ser importante para
5 determinar aquellos tumores o cánceres que son tratados de manera más efectiva.

Los tipos particulares de cánceres que pueden ser tratados con un compuesto de la invención y/o conjugado anticuerpo-fármaco del mismo, incluyen aunque no se limitan a, carcinomas de la vejiga,
10 mama, cervix, colon, endometrio, riñón, pulmón, esófago, ovarios, próstata, páncreas, piel, estómago, y testículos; y cánceres hematógenos que incluyen, aunque no se limitan a leucemias y linfomas.

Terapia Multi-Modal para el Cáncer. Los cánceres, que
15 incluyen, aunque no se limitan a, un tumor, metastasis, u otra enfermedad o padecimiento caracterizado por crecimiento celular descontrolado, pueden ser tratados o inhibidos mediante la administración de un compuesto de la invención y/o conjugado anticuerpo-fármaco del mismo.

20 En otras modalidades, se proporcionan métodos para tratar el cáncer, que incluyen administrar a un paciente que necesita del tratamiento, una cantidad efectiva de un compuesto de la invención y/o conjugado anticuerpo-fármaco del mismo y un agente quimioterapéutico. En una modalidad el agente quimioterapéutico es
25 aquel con el cual no se ha encontrado que el tratamiento del cáncer

sea refractario. En otra modalidad, el agente quimioterapéutico es aquel con el cual se ha encontrado que el tratamiento del cáncer es refractario. Un compuesto de la invención y/o conjugado anticuerpo-fármaco del mismo puede ser
5 administrado a un paciente ha experimentado también cirugía como tratamiento para el cáncer.

En ciertas modalidades, el paciente recibe también un tratamiento adicional, tal como terapia de radiación. En una modalidad específica, el compuesto de la invención y/o
10 conjugado anticuerpo-fármaco del mismo es administrado de manera concurrente con el agente quimioterapéutico o con terapia de radiación. En otra modalidad específica, el agente quimioterapéutico o terapia de radiación es administrado antes de o subsecuente a la administración de un compuesto de la
15 invención y/o conjugado anticuerpo-fármaco del mismo.

Un agente quimioterapéutico puede ser administrado en una serie de sesiones. Se puede administrar cualquiera o una combinación de agentes quimioterapéuticos, tales como uno estándar de agente(s) quimioterapéutico(s) de cuidado.

20 De manera adicional, los métodos de tratamiento de cáncer con un compuesto de la invención y/o conjugado anticuerpo-fármaco del mismo se proporcionan como una alternativa a la quimioterapia o terapia de radiación cuando la quimioterapia o la terapia de radiación han demostrado ser
25 demasiado tóxicas, por ejemplo, resultan en efectos colaterales

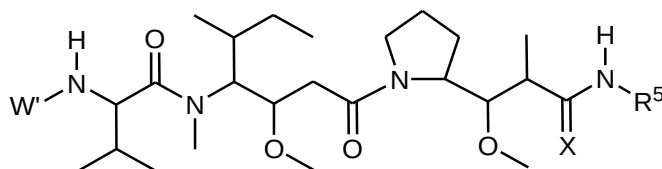
inaceptables o insoportables, para el paciente que está siendo tratado. El paciente que es tratado puede, de manera opcional, ser tratado con otro tratamiento del cáncer tal como cirugía, terapia de radiación o quimioterapia, dependiendo de que tratamiento se encuentre aceptable o soportable.

Los compuestos de la invención y/o conjugados de anticuerpo-fármaco de los mismos también pueden ser utilizados de una manera in vitro o ex vivo, tal como para el tratamiento de ciertos cánceres, que incluyen aunque no se limitan a leucemias y linfomas, el tratamiento que involucra trasplantes de célula madre autóloga. Esto puede involucrar un proceso multi-etapa en el cual las células madre hematopoyéticas autólogas del animal son cultivadas y purgadas de todas las células cancerosas, la población celular de la médula ósea restante del animal que es erradicada después a través de una elevada dosis de un compuesto de la invención y/o conjugado anticuerpo-fármaco del mismo con o sin terapia de radiación de dosis elevada acompañante, y el injerto de célula madre se infunde de regreso al animal. Se proporciona entonces cuidado paliativo mientras se restaura la función de la médula ósea y se recupera el paciente.

Especies Liberadas

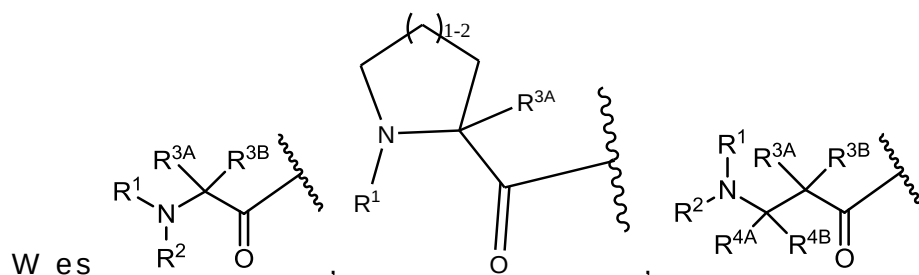
Modalidades adicionales de la invención incluyen las especies químicas liberadas, dentro o en la cercanía de la célula cancerosa o célula tumoral por lo que se considera que hay separación

enzimática y/o hidrolítica de una o más proteasas asociadas a célula cancerosa o célula tumoral. Dichos compuestos incluyen las especies descritas en la presente, e incluyen también compuestos tales como aquellos descritos en la estructura:

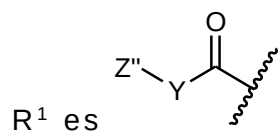
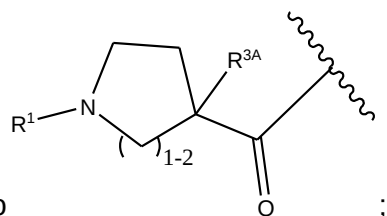


IV

o una sal farmacéuticamente aceptable o solvato de los mismos, en donde, de modo independiente para cada ocurrencia,

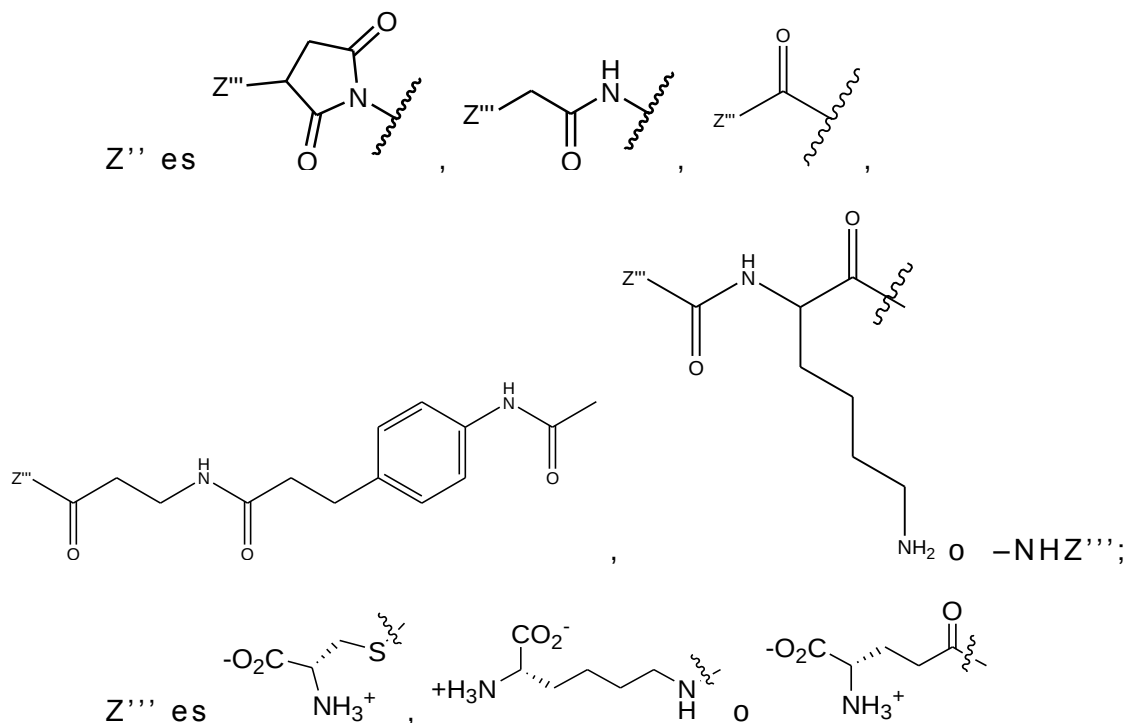


10 o



15

Y es C₂-C₂₀ alquileo o C₂-C₂₀ heteroalquileo; C₃-C₈ carbociclo-, -arileno-, -C₃-C₈heterociclo-, -C₁-C₁₀alquileo-arileno-, -arileno-C₁-C₁₀alquileo-, -C₁-C₁₀alquileo-(C₃-C₈carbociclo)-, -(C₃-C₈carbociclo)-C₁-C₁₀alquileo-, -C₁-C₁₀alquileo-(C₃-C₈heterociclo)-, o -(C₃-C₈ heterociclo)-C₁-C₁₀alquileo-;



R² es hidrógeno, C₁-C₈ alquilo o C₁-C₈ haloalquilo;

R^{3A} y R^{3B} están definidos como cualquiera de los siguientes:

(i) R^{3A} es hidrógeno, C₁-C₈ alquilo, C₁-C₈ haloalquilo, C₃-C₈ carbociclilo, C₁-C₁₀ heterociclilo, arilo, heteroaralquilo, aralquilo o halógeno; y

10 R^{3B} es C₁-C₈ alquilo, C₁-C₈ haloalquilo, C₃-C₈ carbociclilo, C₁-C₁₀ heterociclilo, arilo, heteroaralquilo, halógeno o aralquilo; o

(ii) R^{3A} y R^{3B} tomados en conjunto son C_2 - C_8 alquilenos o C_1 - C_8 heteroalquilenos;

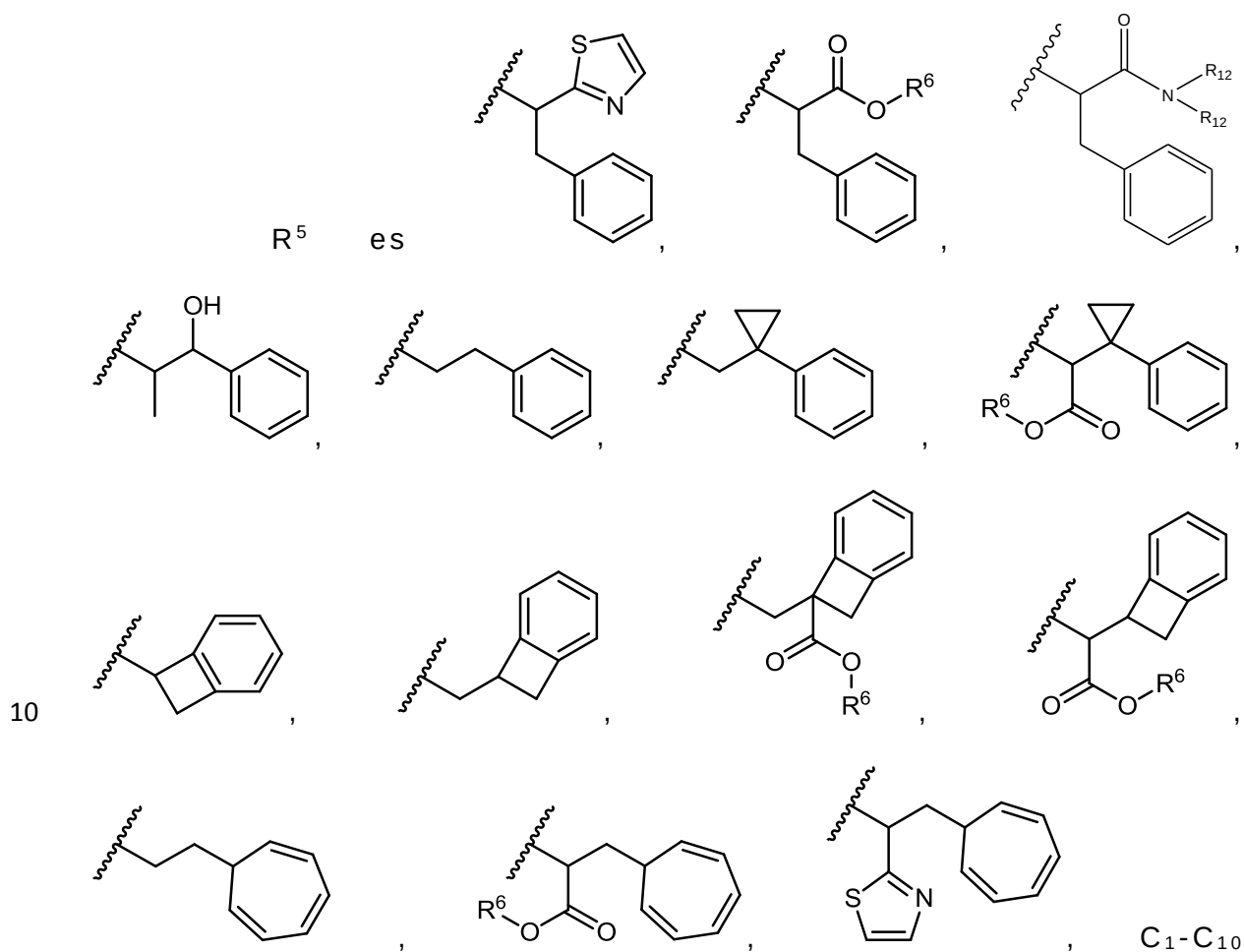
15 R^{4A} y R^{4B} están definidos como cualquiera de los siguientes:

(i) R^{4A} es hidrógeno, C₁-C₈ alquilo, C₁-C₈ haloalquilo, C₃-C₈ carbociclilo, C₁-C₁₀ heterociclilo, arilo, heteroaralquilo o

aralquilo; y

R^{4B} es hidrógeno, C_1-C_8 alquilo, C_1-C_8 haloalquilo, C_3-C_8 carbociclilo, C_1-C_{10} heterociclilo, arilo, heteroaralquilo o aralquilo; o

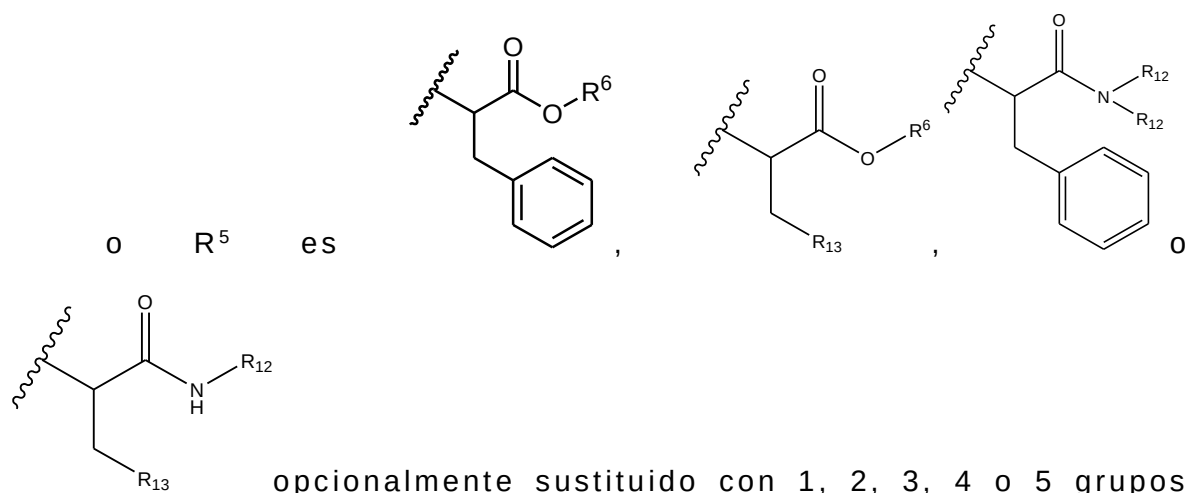
- 5 (ii) R^{4A} y R^{4B} tomados en conjunto son C_2-C_8 alquileo o C_1-C_8 heteroalquileo;



heterociclilo, C_3-C_8 carbociclilo y C_6-C_{14} arilo opcionalmente sustituido con 1, 2, 3, 4 o 5 grupos seleccionados de manera independiente a partir del grupo que consta de $-C_1-C_8$ alquilo, $-C_1-C_8$ alquil- $N(R')_2$, $-C_1-C_8$ alquil- $C(O)R'$, $-C_1-C_8$ alquil- $C(O)OR'$

15

-O-(C₁-C₈ alquilo), -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)N(R')₂,
 -NHC(O)R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, halógeno, -N₃, -N(R')₂, -CN,
 -NHC(=NH)NH₂, -NHCONH₂, -S(=O)₂R' y -SR', en donde cada R' es
 5 de hidrógeno, C₁-C₈ alquilo y arilo no sustituido, o dos R' pueden,
 junto con el nitrógeno al cual se unen, formar un C₁-C₁₀ heterociclilo;



seleccionados de manera independiente a partir del grupo que consta
 10 de C₁-C₈ alquilo, -C₁-C₈ alquil-N(R')₂, -C₁-C₈ alquil-C(O)R', -C₁-C₈
 alquil-C(O)OR', -O-(C₁-C₈ alquilo), -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR',
 -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, halógeno, -N₃,
 -N(R')₂, -CN, -NHC(=NH)NH₂, -NHCONH₂, -S(=O)₂R', -SR' y arileno-
 R', en donde cada R' es seleccionado de manera independiente a
 15 partir del grupo que consta de hidrógeno, C₁-C₈ alquilo, C₁-
 C₈heterociclilo, C₁-C₁₀alquileno-C₃-C₈heterociclilo and arilo, o dos R'
 pueden, junto con el nitrógeno al cual se unen, formar un C₁-C₁₀
 heterociclilo;

R⁶ es hidrógeno, -C₁-C₈ alquilo, -C₂-C₈ alquenilo, -C₂-C₈
 20 alquinilo o -C₁-C₈ haloalquilo;

R^{12} es hidrógeno, C_1 - C_4 alquilo, C_1 - C_{10} heterociclilo o C_6 - C_{14} arilo;

R^{13} es C_1 - C_{10} heterociclilo; y

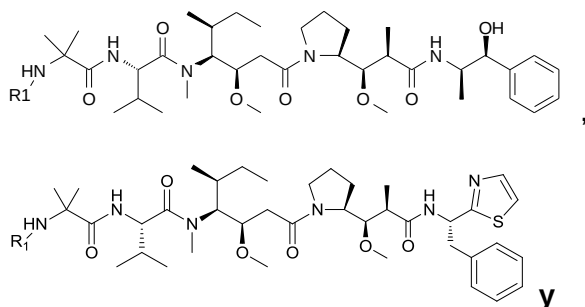
R^7 es seleccionado de manera independiente para cada
5 ocurrencia a partir del grupo que consta de F, Cl, I, Br, NO_2 , CN and CF_3 ;

R^{10} es hidrógeno, $-C_1$ - C_{10} alquilo, $-C_3$ - C_8 carbociclo, arilo, $-C_1$ - C_{10} heteroalquilo, $-C_3$ - C_8 heterociclo, $-C_1$ - C_{10} alquileno-arilo, -arileno- C_1 - C_{10} alquilo, $-C_1$ - C_{10} alquileno- $(C_3$ - C_8 carbociclo), $-(C_3$ - C_8 carbociclo)-
10 C_1 - C_{10} alquilo, $-C_1$ - C_{10} alquileno- $(C_3$ - C_8 heterociclo), and $-(C_3$ - C_8 heterociclo)- C_1 - C_{10} alquilo, en donde el arilo en R_{10} que comprende arilo es opcionalmente sustituido con $[R_7]_h$;

h es 1, 2, 3, 4 o 5; y

15 X es O o S.

Son de particular interés los compuestos de la fórmula IV que tienen las estructuras:



5

Los experimentos se llevaron a cabo de manera general bajo atmósfera inerte (nitrógeno o argón), en particular en casos en donde se emplearon reactivos o intermediarios sensibles al oxígeno o la humedad. Los solventes y reactivos comerciales fueron utilizados en general sin purificación adicional, incluyendo solventes anhidro cuando es apropiado (generalmente productos Sure-Sea1TM de Aldrich Chemical Company, Milwaukee, Wisconsin). En general los productos fueron deshidratados al vacío secados antes de ser llevados a reacciones adicionales o sometidos a prueba biológica. Los datos de espectrometría de masa se reportaron a partir de cromatografía de líquido-espectrometría de masas (LCMS), ionización química a presión atmosférica (APCI) o instrumentación de cromatografía de gas-espectrometría de masa (GCMS). Los desplazamientos químicos para los datos de resonancia magnética nuclear (NMR) son expresados en partes por millón (ppm, δ)

referenciados para picos residuales a partir de los solventes deuterizados utilizados.

Para los procedimientos de referencia de síntesis en otros Ejemplos o Métodos, puede variar el Protocolo de reacción (duración de la reacción y temperatura). En general, se siguieron las reacciones mediante cromatografía de capa fina o espectrometría de masa, y sometidas a análisis cuando es apropiado. Las purificaciones pueden variar entre los experimentos: en general, los solventes y las relaciones de solvente usadas para eluyentes/gradientes se seleccionaron para proporcionar Rfs o tiempos de retención apropiados.

Las rotaciones ópticas se efectuaron en un polarímetro Perkin-Elmer 343 (Número de serie 9506).

Se realizó HRMS en un aparato Agilent 6220 TOF LC/MS.

Los nombres de compuesto se generaron con software ACD Labs.

20 **Condiciones HPLC y LC-MS Usadas para Análisis**

Protocolo A: Columna: Phenomenex Luna C18 (2), 150 x 3.0 mm, 5 µm; Fase móvil A: 0.1% ácido fórmico en agua (v/v); Fase móvil B: 0.1% ácido fórmico en acetonitrilo (v/v); Gradiente: 5% B durante 1.5 minutos, 5% hasta 100% B durante

8.5 minutos, después 100% B durante 1 minuto; Velocidad de flujo: 0.75 mL/minuto. Temperatura: 25 °C; Detección: DAD 215 nm, 254 nm; MS (+) rango 150-2000 daltons; Volumen de inyección: 10 µL; Instrumento: Agilent 1200 LCMS.

5 *Protocolo B:* Columna: Phenomenex Luna C18 (2), 150 x 3.0 mm, 5 µm; Fase móvil A: 0.1% ácido fórmico en agua (v/v); Fase móvil B: 0.1% ácido fórmico en acetonitrilo (v/v); Gradiente: 50% B durante 1.5 minutos, 50% hasta 100% B durante 6.5 minutos, después 100% B durante 3 minutos; Velocidad de flujo: 0.75
10 mL/minuto. Temperatura: 25 °C; Detección: DAD 215 nm; MS (+) rango 150-2000 daltons; Volumen de inyección: 10 µL; Instrumento: Agilent 1200 LCMS.

Protocolo C: Columna: Phenomenex Luna C18 (2), 150 x 3.0 mm, 5 µm; Fase móvil A: 0.02% ácido trifluoroacético en agua (v/v);
15 Fase móvil B: 0.02% ácido trifluoroacético en metanol (v/v); Gradiente: 50% hasta 100% B durante 10 minutos; Velocidad de flujo: 0.75 mL/minuto. Temperatura: no controlada; Detección: DAD 215 nm, 254 nm; Volumen de inyección: 10 µL; Instrumento: Agilent 1100 HPLC.

20 *Protocolo D:* Columna: Phenomenex Luna C18 (2), 150 x 3.0 mm, 5 µm; Fase móvil A: 0.02% ácido trifluoroacético en agua (v/v); Fase móvil B: 0.02% ácido trifluoroacético en metanol (v/v); Gradiente: 5% hasta 100% B durante 8 minutos; Velocidad de flujo: 0.75 mL/minuto. Temperatura: no controlada; Detección: DAD 215
25 nm, 254 nm; Volumen de inyección: 10 µL; Instrumento: Agilent 1100

HPLC.

Protocolo E: Columna: Phenomenex Lux Amylose-2, 250 x 4.6 mm, 5 μ m; Fase móvil A: heptano; Fase móvil B: etanol (desnaturalizado); Gradiente: 5% hasta 100% B durante 10 minutos; 5 Velocidad de flujo: 1.5 mL/minuto. Temperatura: no controlada; Detección: DAD 215 nm, 254 nm; MS (+) rango 150-1500 daltons; Volumen de inyección: 10 μ L; Instrumento: Agilent 1100 LCMS.

Protocolo F: Columna: Waters Acquity UPLC BEH, 2.1 mm x 50 mm, C18, 1.7 μ m; Fase móvil A: 0.1% ácido fórmico en agua (v/v); Fase móvil B: 0.1% ácido fórmico en acetonitrilo (v/v); Gradiente: 5% B durante 0.1 minuto, 5% hasta 95% B durante 0.7 minuto, 95% B durante 0.1 minuto; Velocidad de flujo: 1.25 mL/minuto. Temperatura: 60°C; Detección: 200-15 450nm; MS (+) rango 100-1200 daltons; Volumen de inyección: 5 μ L; Instrumento: Waters Acquity.

Protocolo G: Columna: Phenomenex Luna C18 (2), 150 x 3.0 mm, 5 μ m; Fase móvil A: 0.02% ácido trifluoroacético en agua (v/v); Fase móvil B: 0.02% ácido trifluoroacético en 20 acetonitrilo (v/v); Gradiente: 0% hasta 100% B durante 8.5 minutos; Velocidad de flujo: 1.5 mL/minuto. Temperatura: no controlada; Detección: DAD 210 nm; Volumen de inyección: 10 μ L; Instrumento: Agilent 1100 HPLC.

Protocolo H: Columna: Phenomenex Gemini-NX, 4.6mm x 25 50mm, C18, 3 μ m, 110 Å; Fase móvil A: 0.1% ácido fórmico en

agua (v/v); Fase móvil B: 0.1% ácido fórmico en acetonitrilo (v/v);
 Gradiente: 0% hasta 100% B durante 4.10 minutos, lineal después
 100% B durante 0.4 minuto; Velocidad de flujo: 1.5 mL/minuto.
 Temperatura: 60°C; Detección: DAD 200-450 nm; MS (+) rango 100-
 5 2000 daltons; Volumen de inyección: 5 µL; Instrumento: Agilent.

Protocolo I: Columna: Atlantis T3, 75 x 3.0 mm, 3 µm; Fase
 móvil A: 0.05% ácido trifluoroacético en agua (v/v); Fase móvil B:
 acetonitrilo; Gradiente: 5% hasta 95% B durante 5.75 minutos;
 Velocidad de flujo: 1.2 mL/minuto. Temperatura: 45 °C; Detección:
 10 DAD 215 nm, 230 nm, 254 nm; MS (+) rango: 150-1200 daltons;
 Volumen de inyección: 5 µL; Instrumento: Agilent 1100 LCMS.

Protocolo I: Columna: Atlantis T3, 75 x 3.0 mm, 3 µm; Fase
 móvil A: ácido trifluoroacético al 0.05% en agua (v/v); Fase móvil B:
 acetonitrilo; Gradiente: 5% hasta 95% B durante 5.75 minutos;
 15 Velocidad de flujo: 1.2 mL/minuto. Temperatura: 45 °C; Detección:
 DAD 215 nm, 230 nm, 254 nm; MS (+) rango: 150-1200 daltons;
 Volumen de inyección: 5 µL; Instrumento: Agilent 1100 LCMS.

Protocolo J: Columna: Phenomenex Luna Fenil-Hexyl, 150 x 3.0
 mm, 5 µm; Fase móvil A: 0.1% ácido fórmico en agua (v/v); Fase
 20 móvil B: 0.1% ácido fórmico en acetonitrilo (v/v); Gradiente: 5% B
 durante 1.5 minutos, 5% hasta 100% B durante 8.5 minutos, después
 100% B durante 1 minuto; Velocidad de flujo: 0.75 mL/minuto.
 Temperatura: 25 °C; Detección: DAD 215 nm, 254 nm; MS (+) rango
 150-2000 daltons; Volumen de inyección: 10 µL; Instrumento: Agilent
 25 1200 LCMS.

Protocolo K: Columna: Symmetry-C18, 50 x 2.1 mm, 3.5 μm ; Fase móvil A: 0.1% ácido fórmico en agua (v/v); Fase móvil B: 0.1% ácido fórmico en metanol (v/v); Gradiente: 10% hasta 90% B durante 6.5 minutos; Velocidad de flujo: 0.7 mL/minuto. Temperatura: temperatura ambiente; Detección: DAD 215 nm; MS (+) rango 100-1500 daltons; Volumen de inyección: 3 μL ; Instrumento: Waters 996 PDA.

Protocolo L: Columna: XBridge C-18, 150 x 4.6 mm, 3.5 μm ; Fase móvil A: 5 mM solución de acetato de amonio acuosa; Fase móvil B: acetonitrilo; Gradiente: 10% B durante 3 minutos después 10% hasta 80% B durante 14 minutos; Velocidad de flujo: 0.7 mL/minuto. Temperatura: temperatura ambiente; Detección: DAD 215 nm; MS (+) rango 100-1500 daltons; Volumen de inyección: 3 μL ; Instrumento: Waters 996 PDA.

Protocolo M: Columna: Phenomenex Luna, 150 x 3.0 mm, 5 μm ; Fase móvil A: 0.1% ácido fórmico en agua (v/v); Fase móvil B: 0.1% ácido fórmico en metanol (v/v); Gradiente: 50% B durante 1.5 minutos, 50% hasta 80% B durante 8.5 minutos, después 80% B durante 10 minutos; Velocidad de flujo: 0.75 mL/minuto. Temperatura: 45 °C; Detección: DAD 215 nm, 254 nm; MS (+) rango 90-2000 daltons; Volumen de inyección: 10 μL ; Instrumento: Agilent 1200 LCMS.

Protocolo N: Columna: Phenomenex Luna C18 (2) 150 x 3.0 mm 5 μm ; Fase móvil A: 0.02% ácido trifluoroacético en agua (v/v); Fase móvil B: 0.02% ácido trifluoroacético en

acetonitrilo (v/v); Gradiente: 0% hasta 100% B durante 23.5 minutos; Velocidad de flujo: 1.5 mL/minuto. Temperatura: no controlada; Detección: DAD 210 nm; Volumen de Inyección: 10 µL; Instrumento: Agilent 1100 HPLC

5 *Protocolo O:* Columna: Agilent Poroshell 300SB-C8, 75 x 2.1 mm, 2.6 µm; Fase móvil A: 0.1% ácido fórmico en agua (v/v); Fase móvil B: 0.1% ácido fórmico en acetonitrilo (v/v); Gradiente: 20% B hasta 45% B durante 4 minutos; Velocidad de flujo: 1.0 mL/minuto. Temperatura: 60°C; Detección: 220 nm; MS (+) rango 400-2000Da; 10 Volumen de inyección: 10 µL; Instrumento: Agilent 1100 LC, Waters MicromassZQ MS. Se realizó la deconvolución utilizando MaxEnt1.

Protocolo P: Columna: TSK-gel G3000SWx1, 300 x 7.8 mm 10 µm; Fase móvil: Solución salina amortiguadora de fosfato (PBS, 1X), pH 7.4 con 2% acetonitrilo; Isocrático; Velocidad de flujo: 1 15 mL/minuto. Temperatura: temperatura ambiente; Volumen de Inyección: 5 µL; Instrumento: Agilent 1100 HPLC.

Protocolo Q: Columna: Waters Acquity UPLC HSS T3, 2.1 mm x 50 mm, C18, 1.7 µm; Fase móvil A: 0.1% ácido fórmico en agua (v/v); Fase móvil B: 0.1% ácido fórmico en acetonitrilo (v/v); Gradiente: 5% 20 B durante 0.1 minuto, 5% hasta 95% B durante 2.5 minutos, 95% B durante 0.35 minuto; Velocidad de flujo: 1.25 mL/minuto. Temperatura: 60°C; Detección: 200-450nm; MS (+) rango 100-2000 daltons; Volumen de inyección: 5 µL; Instrumento: Waters Acquity.

Protocolo Q1: Columna: Waters Acquity UPLC HSS T3, C18, 25 2.1 x 50 mm, 1.7µm; Fase móvil A: ácido fórmico al 0.1% en agua

(v/v); Fase móvil B: ácido fórmico al 0.1% en acetonitrilo (v/v);
 Gradiente: 5% B durante 0.1 minuto, 5% hasta 95% B durante
 1.5 minuto, 95% B durante 0.35 minuto; Velocidad de flujo: 1.25
 mL/minuto. Temperatura: 60 °C; Detección: 200-450nm; MS (+)
 5 rango 100-2000 daltons; Volumen de inyección: 5 µL;
 Instrumento: Waters Acquity.

Protocolo Q2: Columna: Xtimate C18, 2.1 x 30 mm, 3 µm;
 Fase móvil A: ácido trifluoroacético al 0.1% en agua (v/v); Fase
 móvil B: ácido trifluoroacético al 0.1% en acetonitrilo (v/v);
 10 Gradiente: 10% hasta 80% B durante 0.9 minutos, 80% B
 durante 0.6 minutos; 100 % B durante 0.5 minutos; Velocidad
 de flujo: 1.2 mL/minuto. Detección: DAD 220 nM; Temperatura:
 25°C; Volumen de inyección: 1 µL; Instrumento: Agilent.

Protocolo Q3: Columna: Xtimate C18, 2.1 x 30 mm, 3 µm;
 15 Fase móvil A: ácido trifluoroacético al 0.1% en agua (v/v);
 Fase móvil B: ácido trifluoroacético al 0.1% en acetonitrilo
 (v/v); Gradiente 0% hasta 60% B durante 0.9 minutos, 60% B
 durante 0.6 minutos; 100% B durante 0.5 minutos; Velocidad
 de flujo: 1.2mL/minuto. Detección: DAD 220 nM; Temperatura:
 20 25°C; Volumen de inyección: 1 µL; Instrumento: Agilent.

Protocolo R: Columna: Phenomenex Luna, 150 x 3.0 mm,
 5 µm; Fase móvil A: 0.1% ácido fórmico en agua (v/v); Fase
 móvil B: 0.1% ácido fórmico en metanol (v/v); Gradiente: 5% B
 durante 1.5 minutos, 5% hasta 100% B durante 8.5 minutos,
 25 después 100% B durante 1 minuto; Velocidad de flujo: 0.75

mL/minuto. Temperatura: 45 °C; Detección: DAD 215 nm, 254 nm; MS (+) rango 150-2000 daltons; Volumen de inyección: 10 µL; Instrumento: 305 RP Agilent 1200 LCMS.

Protocolo S: Columna: Phenomenex Luna, 150 x 3.0 mm, 5 µm; Fase móvil A: ácido trifluoroacético al 0.1% en agua (v/v); Fase móvil B: ácido trifluoroacético al 0.1% en acetonitrilo (v/v); Gradiente: 5% B durante 1.5 minutos, 5% hasta 95% B durante 8.5 minutos, después 100% B durante 1 minuto; Velocidad de flujo: 1.0 mL/minuto. Temperatura: no controlada; Detección: DAD 210 nm; MS (+) rango 150-2000 daltons; Volumen de inyección: 10 µL; Instrumento: 305 RP Agilent 1100 HPLC.

Protocolo T: Columna: Atlantis dC18, 50 x 4.6 mm, 5 µm; Fase móvil A: ácido trifluoroacético al 0.05% en agua (v/v); Fase móvil B: ácido trifluoroacético al 0.05% en acetonitrilo (v/v); Gradiente: 5% hasta 95% B durante 4.0 minutos; sostenida después a 95% B durante 1 minuto; Velocidad de flujo: 2 mL/minuto. Temperatura: temperatura ambiente; Detección: DAD 215 nm; MS (+) rango 160 - 1000 daltons; Volumen de inyección: 3 µL; Instrumento: Waters 996 PDA.

Protocolo U: Columna: Phenomenex Luna C18 (2), 150 x 3.0 mm, 5 µm; Fase móvil A: ácido fórmico al 0.1% en agua (v/v); Fase móvil B: ácido fórmico al 0.1% en acetonitrilo (v/v); Gradiente: 5% B durante 1.5 minutos, 5% hasta 100% B durante 8.5 minutos, después 100% B durante 1 minuto; Velocidad de flujo: 0.75 mL/minuto. Temperatura: 45 °C; Detección: DAD 215 nm, 254 nm; MS (+) rango

150-2000 daltons; Volumen de inyección: 10 µL; Instrumento: Agilent 1200 LCMS.

Protocolo V: Columna: HPLC-V Ultimate XB- C18, 50 x 3.0 mm, 3 µm; Fase móvil A: ácido trifluoroacético al 0.225% en
5 agua (v/v); Fase móvil B: ácido trifluoroacético al 0.225% en acetonitrilo (v/v); Gradiente: 30% hasta 90% B durante 6 minutos; Velocidad de flujo: 1.2 mL/minuto. Temperatura: 40°C; Detección: DAD 220 nm; Volumen de inyección: 1 µL; Instrumento: SHIMADZU.

10 *Protocolo W:* Columna: HPLC-V Ultimate XB- C18, 50 x 3.0 mm, 3 µm; Fase móvil A: ácido trifluoroacético al 0.1% en agua (v/v); Fase móvil B: ácido trifluoroacético al 0.1% en acetonitrilo (v/v); Gradiente: 10% hasta 80% B durante 6 minutos; Velocidad de flujo: 1.2 mL/minuto. Temperatura: 40°C;
15 Detección: DAD 220 nm; Volumen de inyección: 3 µL; Instrumento: SHIMADZU.

Protocolo X: Columna: YMC-pack ODS-A, 150 x 4.6 mm, 5 µm; Fase móvil A: ácido trifluoroacético al 0.1% en agua (v/v); Fase móvil B: ácido trifluoroacético al 0.1% en acetonitrilo
20 (v/v); Gradiente: 10% hasta 80% B durante 6 minutos; Velocidad de flujo: 1.2 mL/minuto. Detección: DAD 220 nm. Temperatura: 40 °C; Volumen de inyección: 3 µL; Instrumento: SHIMADZU.

Protocolo Y: Columna: YMC-pack ODS-A, 150 x 4.6 mm, 5
25 µm; Fase móvil A: ácido trifluoroacético al 0.1% en agua (v/v);

Fase móvil B: ácido trifluoroacético al 0.1% en acetonitrilo (v/v);
Gradiente: 0% hasta 95% B durante 10 minutos, después 95% B
durante 5 minutos; Velocidad de flujo: 1.5 mL/minute; Detección:
DAD 220 nm; Instrumento: Agilent 1100.

5 *Protocolo Z:* Columna: Xtimate C18, 2.1 x 30 µm, 3 µm; Fase
móvil A: ácido trifluoroacético al 0.1% en agua (v/v); Fase móvil B:
ácido trifluoroacético al 0.1% en acetonitrilo (v/v); Gradiente: 0%
hasta 60% B durante 2 minutos; Velocidad de flujo: 1.2 ml/min.
Temperatura: 50°C; Detección: 220 nm, MS (+) rango 100 -1000
10 daltons; Volumen de inyección: 1 µL; Instrumento: SHIMADZU.

Protocolo AB: Columna: Phenomenex Luna C18 (2), 150 x 2.0
mm, 5 µm; Fase móvil A: ácido fórmico al 0.1% en agua (v/v); Fase
móvil B: ácido fórmico al 0.1% en acetonitrilo (v/v); Gradiente: 5%
hasta 100% B durante 10 minutos, después 100% B durante 2
15 minutos; Velocidad de flujo: 0.5 mL/minuto. Temperatura: 25 °C;
Detección: DAD 210 nm, 254 nm; MS (+) rango 150-2000 daltons;
Volumen de inyección: 5 µL; Instrumento: Agilent 1100 LCMS.

Protocolo BB: Columna: Phenomenex Luna C18 (2), 150 x 2.0
mm, 5 µm; Fase móvil A: ácido fórmico al 0.1% en agua (v/v); Fase
20 móvil B: ácido fórmico al 0.1% en acetonitrilo (v/v); Gradiente: 5% B
durante 2.0 minutos, 5% hasta 100% B durante 12 minutos, y 100% B
durante 2 minuto, después 100% hasta 5% B durante 1.5 min;
Velocidad de flujo: 0.75 mL/minuto. Temperatura: 25°C; Detección:
DAD 215 nm, 254 nm; MS (+) rango 150-2000 daltons; Volumen de
25 inyección: 5 µL; Instrumento: Agilent.

Protocolo CB: Columna: Waters XBridge C18, 4.6 x 50 mm, 5µm; Fase móvil A: hidróxido de amonio al 0.03% en agua (v/v); Fase móvil B: hidróxido de amonio al 0.03% en acetonitrilo (v/v); Gradiente: 5% hasta 95% B durante 4.0 minutos, después 95% B durante 1 minuto; Velocidad de flujo: 2 mL/minuto. Temperatura: 25°C; Detección: DAD 215 nm, MS (+) rango 160-1000 daltons; Volumen de inyección: 4 µL; Instrumento: Waters ZQ/Alliance 2795 HPLC.

Protocolo DB: Columna: Waters Atlantis dC18, 4.6 x 50 mm, 5µm; Fase móvil A: ácido trifluoroacético al 0.05% en agua (v/v); Fase móvil B: ácido trifluoroacético al 0.05% en acetonitrilo (v/v); Gradiente: 5.0% hasta 95% B durante 4.0 minutos, después 95% B durante 1 minuto. Velocidad de flujo: 2 mL/minuto. Temperatura: 25°C; Detección: DAD 215 nm, MS (+) rango 160-1000 daltons; Volumen de inyección: 4 µL; Instrumento: Waters ZQ/Alliance 2795 HPLC.

Protocolo EB: Columna: XBridge RP18, 2.1 x 50 mm, 5 µm; Fase móvil A: hidróxido de amonio al 0.02% en agua (v/v); Fase móvil B: hidróxido de amonio al 0.02% en acetonitrilo (v/v); Gradiente 10% hasta 80% B% durante 6 minutos, después 80% durante 2 minutos; Velocidad de flujo: 1.2 mL/minuto. Detección: DAD 220 nm.; Temperatura: 50°C.

Protocolo FB: Columna: Phenomenex Luna C18 (2), 150 x 2.0 mm, 5 µm; Fase móvil A: ácido fórmico al 0.1% en agua (v/v); Fase móvil B: ácido fórmico al 0.1% en acetonitrilo (v/v);

Gradiente: 5% B durante 2.0 minutos, 5% hasta 100% B durante 10 minutos, y 100% B durante 2 minutos; Velocidad de flujo: 0.50 mL/minuto. Temperatura: 25°C; Detección: DAD 215 nm, 254 nm; MS (+) rango 150-2000 daltons; Volumen de inyección: 5 µL;

5 Instrumento: Agilent 1200 LCMS.

En ciertos casos, se hicieron ciertas alteraciones menores a las condiciones LC-MS y HPLC de análisis tal como aunque sin limitarse a un cambio en gradiente o velocidad de flujo lo cual está indicado por el símbolo *.

10

Condiciones HPLC Usadas para Purificación

Método A: Columna: Phenomenex Lux Amylose-2, 250 x 21.2 mm, 5 µm; Fase móvil A: Heptano; Fase móvil B: Etanol (desnaturalizado); Gradiente: 5% hasta 100% B durante 6 minutos;

15 Velocidad de Flujo: 27 mL/minuto; Detección: DAD 210-360 nm; MS (+) rango 150-2000 daltons; Instrumento: Waters FractionLynx.

Método B: Columna: Phenomenex Luna C18(2), 150 x 21.2 mm, 5 µm; Fase móvil A: 0.02% ácido acético en agua; Fase móvil B: 0.02% ácido acético en acetonitrilo; Gradiente: 5% B durante 1.5 minutos, 5% hasta 45% B durante 8.5 minutos; Velocidad de flujo: 27 mL/minuto; Detección: DAD 215 nm, 254 nm; MS (+) rango 150-2000 daltons; Instrumento: Waters FractionLynx.

20

Método C: Columna: Phenomenex Luna C18, 100 x 30 mm, 10 µm; Fase móvil A: 0.02% ácido trifluoroacético en agua (v/v); Fase

25

móvil B: 0.02% ácido trifluoroacético en metanol (v/v);
 Gradiente: 10% hasta 90% B durante 20 minutos; Velocidad de
 flujo: 20 mL/minuto. Temperatura: no controlada; Detección:
 DAD 210 nm, 254 nm; Volumen de Inyección: variable;

5 Instrumento: Gilson.

Método D: Columna: Phenomenex Synergi Max-RP, 150 x
 21.2 mm, 4 µm; Fase móvil A: 0.1% ácido fórmico en agua;
 Fase móvil B: 0.1% ácido fórmico en acetonitrilo; Gradiente:
 30% B durante 1.5 minutos, 30% hasta 60% B durante 8.5
 10 minutos, 60 hasta 100% B durante 0.5 minutos después 100% B
 durante 2 minutos; Velocidad de flujo: 27 mL/ minuto;
 Detección: DAD 210-360 nm; MS (+) rango 150-2000 daltons;
 Instrumento: Waters FractionLynx.

Método E1: Columna: Phenomenex Luna C18(2), 150 x
 15 21.2 mm, 5 µm; Fase móvil A: 0.1% ácido fórmico en agua;
 Fase móvil B: 0.1% ácido fórmico en acetonitrilo; Gradiente:
 40% B durante 1.5 minutos, 40% hasta 80% B durante 8.5
 minutos, 80 hasta 100% B durante 0.5 minuto después 100% B
 durante 2 minutos; Velocidad de flujo: 27 mL/ minuto;
 20 Detección: Detección: DAD 210-360 nm; MS (+) rango 150-2000
 daltons; Instrumento: Waters FractionLynx LCMS.

Método E2: Columna: Phenomenex Luna Fenil-hexyl, 150
 x 21.2 mm, 5 µm. El resto de los Protocolos son idénticos a
 aquellos descritos para el Método E1.

25 *Método F:* Columna: Phenomenex Synergi Max-RP, 150 x

21.2 mm, 4 μ m; Fase móvil A: 0.1% ácido fórmico en agua; Fase móvil B: 0.1% ácido fórmico en metanol; Gradiente: 44% B durante 1.5 minutos, 44% hasta 77% B durante 8.5 minutos, después 77% B durante 10 minutos; Velocidad de flujo: 27 mL/minuto; Detección: DAD 210-360 nm; MS (+) rango 150-2000 daltons; Instrumento: Waters FractionLynx LCMS.

Método G: Columna: PrincetonSFC 2-etilpiridina, 250 x 21.2 mm, 5 μ m; Fase móvil A: heptano; Fase móvil B: etanol (desnaturalizado); Gradiente: 1% B durante 1.5 minutos, 1% hasta 50% B durante 8.5 minutos; Velocidad de flujo: 27 mL/minuto; Detección: DAD 210-360 nm; MS (+) rango 150-2000 daltons; Instrumento: Waters FractionLynx LCMS.

Método H: Columna: Phenomenex Luna C18(2), 150 x 21.2 mm, 5 μ m; Fase móvil A: 0.02% ácido acético en agua; Fase móvil B: 0.02% ácido acético en acetonitrilo; Gradiente: 20% B durante 1.5 minutos, 20% hasta 60% B durante 10.5 minutos; Velocidad de flujo: 27 mL/minuto; Detección: DAD 210-360 nm; MS (+) rango 150-2000 daltons; Instrumento: Waters FractionLynx LCMS.

Método I: Columna: Phenomenex Luna C18(2), 150 x 21.2 mm, 5 μ m; Fase móvil A: 0.1% ácido fórmico en agua; Fase móvil B: 0.1% ácido fórmico en metanol; Gradiente: 40% B durante 1.5 minutos, 40% hasta 70% B durante 8.5 minutos después 70% B durante 10 minutos; Velocidad de flujo: 27 mL/minuto; Detección: DAD 210-360 nm; MS (+) rango 150-2000 daltons; Instrumento: Waters FractionLynx LCMS.

Método J: Columna: Phenomenex Luna C18, 100 x 30 mm, 5 µm; Fase móvil A: 0.02% ácido trifluoroacético en agua (v/v); Fase móvil B: 0.02% ácido trifluoroacético en acetonitrilo (v/v); Gradiente: 10% hasta 90% B durante 20 minutos; Velocidad de flujo: 20 mL/minuto. Temperatura: no controlada; Detección: DAD 210 nm, 254 nm; Volumen de Inyección: variable; Instrumento: Gilson.

Método K: Columna: Phenomenex Luna C18(2), 150 x 21.2 mm, 5 µm; Fase móvil A: 0.1% ácido fórmico en agua; Fase móvil B: 0.1% ácido fórmico en acetonitrilo; Gradiente: 20% B durante 1.5 minutos, 20% hasta 50% B durante 8.5 minutos, 50 hasta 100% B durante 0.5 minuto después 100% B durante 2 minutos; Velocidad de flujo: 27 mL/ minuto; Detección: Detección: DAD 210-360 nm; MS (+) rango 150-2000 daltons; Instrumento: Waters Fraction Lynx LCMS.

Método L: Columna: Phenomenex Luna C18(2), 150 x 21.2 mm, 5 µm; Fase móvil A: 0.1% ácido fórmico en agua; Fase móvil B: 0.1% ácido fórmico en acetonitrilo; Gradiente: 30% B durante 1.5 minutos, 30% hasta 50% B durante 8.5 minutos, 50 hasta 100% B durante 0.5 minuto después 100% B durante 2 minutos; Velocidad de flujo: 27 mL/ minuto; Detección: Detección: DAD 210-360 nm; MS (+) rango 150-2000 daltons; Instrumento: Waters Fraction Lynx LCMS.

Método M: Columna: Waters Sunfire, C18, 19x100 mm, 5 µm; Fase móvil A: ácido trifluoroacético al 0.05% en agua (v/v);

Fase móvil B: ácido trifluoroacético al 0.05% en acetonitrilo (v/v);
 Gradiente: 0 hasta 100% durante 8.5 minutos. Velocidad de flujo 25
 mL/minuto. Detección: DAD 215 nm MS (+) rango 160-1000 daltons;
 Instrumento: Waters FractionLynx.

5 *Método N:* Columna: Waters Sunfire, C18, 19x100 mm, 5 µm;
 Fase móvil A: ácido fórmico al 0.05% en agua (v/v); Fase móvil B:
 ácido fórmico al 0.05% en acetonitrilo (v/v); Gradiente: 0 hasta 100%
 durante 8.5 minutos. Velocidad de flujo 25 mL/minuto. Detección:
 DAD 215 nm MS (+) rango 160-1000 daltons; Instrumento: Waters
 10 FractionLynx.

Método O: Columna: Phenomenex Luna C18, 21.2 x150 mm, 5
 µm; Fase móvil A: ácido fórmico al 0.1% en agua (v/v) ácido en agua
 (v/v); Fase móvil B: ácido fórmico al 0.1% en acetonitrilo (v/v);
 Gradiente (v/v); Gradiente 20% B durante 1.5 minutos, 20% hasta
 15 40% B durante 8.5 minutos, 40 hasta 100% B durante 0.5 minutos,
 sostenido después 100% B durante 1.5 minutos. Velocidad de flujo:
 27 mL/minuto. Detección: DAD 210-360 nm; MS (+) rango 150-2000
 daltons; Instrumento: Waters FractionLynx.

Método P: Columna: Phenomenex Gemini C18, 21.2x250mm, 5
 20 µm; Fase móvil A: hidróxido de amonio 0.225% en agua (pH 10) (v/v);
 Fase móvil B: hidróxido de amonio al 0.225% en acetonitrilo (v/v);
 Gradiente: 45% hasta 85% B durante 10 minutos. Velocidad de flujo
 35 mL/minuto. Detección: DAD 220 nm MS (+) rango 100-1200
 daltons; Instrumento: Shimadzu MS Trigger.

25 *Método Q:* Columna: Columna: Phenomenex Synergi C18,

50x250 mm, 10 μ m; Fase móvil A: ácido trifluoroacético al 0.1% en agua (v/v) Fase móvil B: acetonitrilo; Gradiente 10% hasta 40% B durante 25 minutos. Velocidad de flujo 100 mL/minuto. Detección: UV/Vis 220 nm; Instrumento: Shimadzu LC-8A.

Método R: Columna: Phenomenex Luna C18 (2), 250 x 21.2 mm, 5 μ m; Fase móvil A: TFA al 0.1% en agua (v/v); Fase móvil B: 0.1% TFA en acetonitrilo (v/v); Gradiente: 10% hasta 100% durante 30 minutos; Velocidad de flujo variable. Temperatura: 25°C; Detección: DAD 215 nm, 254 nm; MS (+) rango 150–2000 daltons; Volumen de inyección: 1.8 mL; Instrumento: Agilent 1100 Prep HPLC.

En ciertos casos se realizaron ciertas alteraciones menores a las condiciones de purificación tales como aunque sin limitarse a un cambio en gradiente o velocidad de flujo lo que está indicado por el símbolo *.

Procedimientos Generales

20

Procedimiento General A: Remoción de Fmoc utilizando dietilamina. A una solución del compuesto que contiene Fmoc en diclorometano *N,N*-dimetilformamida (referida también como DMF), se agregó un volumen igual de dietilamina o piperidina. Se monitoreó el avance de la reacción por medio de LC-MS (o

HPLC o TLC). Los solventes fueron removidos *in vacuo*, y el residuo fue formado como azeotropo una a cuatro veces con heptano. El residuo fue diluido usualmente con diclorometano y una pequeña cantidad de metanol antes de ser reducido sobre sílice y purificado por medio de cromatografía sobre gel de sílice, eluyendo con metanol en diclorometano (u otra mezcla de solventes apropiada) para obtener el material deseado (o se utilizó el material crudo como está).

Procedimiento General B: Remoción de Boc o separación de éster *t*-Bu usando ácido trifluoroacético. A una solución del compuesto que contiene Boc o compuesto que contiene éster de *ter*-butilo en diclorometano a 0°C (o a temperatura ambiente) se agregó ácido trifluoroacético, para obtener una relación de 1:4 ácido trifluoroacético:diclorometano. Se monitoreó el avance de la reacción mediante LC-MS (o HPLC o TLC); Los solventes fueron removidos *in vacuo*. El residuo fue formado como azeotropo tres veces con heptano para obtener el material deseado.

Procedimiento General C: Remoción de Boc o separación de éster de *ter*-butilo (también referido como un éster *t*-Bu) usando ácido clorhídrico en dioxano. A cualquiera de una solución de compuesto que contiene Boc o compuesto que contiene éster de *ter*-butilo en dioxano (o en ciertos casos sin solución, u otro solvente relevante) se agregó una solución 4 M de ácido clorhídrico en dioxano. Se monitoreó el avance de la reacción por medio de LC-MS (o HPLC o TLC) La reacción fue concentrada *in vacuo* y en ciertos

casos formada como azeotropo una a cuatro veces con heptanos.

Procedimiento General D: Acoplamiento con hexafluorofosfato de *O*-(7-azabenzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio (HATU). A una solución sometida a agitación de la amina (1 eq.) y ácido (1.0-2.0 eq.) en diclorometano, *N,N*-dimetilformamida (también referida como DMF), o una mezcla de ambos, se agregó HATU (1.0-2.0 eq.) seguido por trietilamina (2.0-4.0 eq.) o diisopropiletilamina (2.0-4.0 eq., también referida como base de Hunig). Se monitoreó el avance de la reacción por medio de LC-MS (o HPLC o TLC); usualmente la reacción se completó en un lapso de tres horas. Los solventes fueron removidos *in vacuo*. El residuo fue purificado por medio de cromatografía en gel de sílice o de fase inversa o, en ciertos casos, formado como azeotropo tres veces con heptanos, diluido con una pequeña cantidad de acetato de etilo antes de ser reducido sobre sílice o sílice enlazado C18 y purificado mediante cromatografía en gel de sílice o de fase inversa.

Procedimiento General E: Acoplamiento con *N*-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]-*L*-valil-*N*⁵-carbamoil-*N*-[4-({[(4-nitrofenoxi)carbonil]oxi}metil)fenil-*L*-ornitinamida (MalcValCitPABC-PNP). A una mezcla de la amina de carga útil (1 eq.) y *N*-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]-*L*-valil-*N*⁵-carbamoil-*N*-[4-({[(4-nitrofenoxi)carbonil]oxi}metil)fenil-

L-ornitinamida (MalcValCitPABC-PNP, Eur. Pat. Appl. (1994), EP624377, 1.0-2.0 eq.) en *N,N*-dimetilformamida o se agregó dimetilacetamida (referida también como DMA), piridina (0.0-4.0 eq.), diisopropiletilamina (0.0-4.0 eq.), 2,6-dimetilpiridina (0.0-4.0 eq., referida también como 2,6-Luditina) e hidrato de 1-hidroxibenzotriazol (0.01-1.1 eq. referido también como HOBT) o 3H-[1,2,3]triazolo[4,5-b]piridin-3-ol (0.01-1.1 eq., referido también como HOAT). Después de someter a agitación a 40°C-50°C durante 1-48 horas, la mezcla de reacción fue concentrada *in vacuo* y formada como azeotropo tres veces con heptano. El material crudo fue purificado mediante cromatografía de fase inversa de acuerdo con el método especificado para obtener el material deseado.

Procedimiento General F: Conjugación del anticuerpo HERCEPTIN comercial con enlazador-carga útil a través de disulfuros internos. El anticuerpo HERCEPTIN® comercialmente disponible (Genentech Inc) fue dializado en Solución Salina Regulada con Fosfato de Dulbecco (DPBS, Lonza). El anticuerpo dializado fue reducido con la adición de x equivalentes de clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP, 5mM en agua destilada) y diluido hasta una concentración de anticuerpo final de 15 mg/mL usando DPBS, 5mM ácido 2,2',2'',2'''-(Etan-1,2-diildinitril)tetraacético (EDTA), pH 7.0-7.4 (Solución Amortiguadora A). La reacción fue incubada a 37°C durante 1-2 h y después enfriada a temperatura ambiente. La conjugación se realizó mediante la adición de equivalentes y de enlazador-carga útil (5-10mM en dimetilacetamida

(DMA)). Se agregó DMA para lograr 10-20% (v/v) componente de solvente orgánico en la mezcla de reacción final, y se agregó Solución Amortiguadora A para lograr una concentración de anticuerpo final de 10 mg/mL. La reacción fue incubada durante 1-2 h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se intercambió después con regulador de pH en DPBS (pH7.4) usando columnas de intercambio de regulador de pH de GE Healthcare Sephadex G-25 M según las instrucciones del fabricante. El material crudo fue purificado mediante cromatografía de exclusión molecular (SEC) utilizando el sistema GE AKTA Explorer con columna GE Superdex y eluyente PBS (pH7.4).

Procedimiento general G: Las reacciones de conjugación se ejecutaron en la Proción superior de un dispositivo de ultrafiltración centrífuga tal como filtros Amicon Ultra 50k Ultracel (*parte #UFC805096*, GE). Se preparó una solución concentrada 132 mM de L-cisteína en PBS que contiene 50 mM EDTA. Esta solución (50 μ L) fue agregada a una mezcla del anticuerpo mutante respectivo (5 mg) en 950 μ L de PBS que contiene 50 mM EDTA. La concentración final de cisteína en la mezcla de reacción fue de 6.6 mM. Después de permitir que la reacción repose a temperatura ambiente (aproximadamente 23°C) durante 1.5 horas el tubo de reacción fue centrifugado para concentrar el material hasta aproximadamente 100 μ L. La mezcla fue diluida hasta 1 mL con PBS que contiene 50 mM

EDTA. Este proceso se repitió 4 veces a fin de remover el reductor de cisteína. El material resultante fue diluido hasta 1 mL en PBS que contiene 50 mM EDTA y tratado con 16 μ L de una solución 5 mM del ligador maleimida-carga útil (a partir del Cuadro 18A en dimetil acetamida (DMA) (aproximadamente 5 equivalentes). Después de 5 dejar reposar la reacción a temperatura ambiente (aproximadamente 23°C) durante 1.5 horas el tubo de reacción fue centrifugado para concentrar el material hasta aproximadamente 100 μ L. La mezcla fue diluida hasta 1 mL con PBS. Este proceso se repitió 2 veces a fin 10 de remover el reactivo de maleimida en exceso. Los conjugados de anticuerpo generalmente fueron purificados por medio de cromatografía de exclusión molecular (SEC) utilizando el sistema GE AKTA Explorer con una columna GE Superdex200 y eluyente PBS (pH7.4). La carga del fármaco sobre el sitio pretendido de 15 conjugación se determinó utilizando una variedad de métodos que incluyen espectrometría de masa (MS), HPLC de fase inversa, y cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC), como se ha descrito en otra parte. El valor reportado (en Cuadros 19A y 19B) se obtiene de modo general mediante LC-MS bajo condiciones de reducción.

20 *Procedimiento general H:* Una solución 20 mM TCEP (generalmente 50 hasta 100 equivalentes molares) fue agregada al anticuerpo (de modo común 5 mg) de manera que la concentración de anticuerpo final fue de 5 mg/mL en PBS que contiene 50 mM EDTA. Después de permitir que la reacción repose a 37°C durante 1.5 25 horas, el anticuerpo fue intercambiado con solución reguladora en

PBS que contiene 50 mM EDTA usando un dispositivo de concentración por giro de recorte 50 kD MW (3 x 3 mL lavado, 10x concentración por ciclo). Los métodos alternativos tales como TFF o diálisis también son útiles en circunstancias
5 particulares. El anticuerpo resultante fue suspendido de nuevo en 1 mL de PBS que contiene 50 mM EDTA y tratado con una solución recién preparada 50 mM de DHA (deshidroascorbato) en 1:1 PBS/EtOH (concentración DHA final comúnmente es de 1 mM) y se permite reposar a 4°C durante la noche. La mezcla
10 anticuerpo/DHA fue intercambiada con solución reguladora en PBS que contiene 50 mM EDTA usando un dispositivo de concentración por giro de recorte 50 kD MW (3 x 3 mL lavado, 10x concentración por ciclo). El anticuerpo resultante fue suspendido de nuevo en 1 mL de PBS que contiene 50 mM
15 EDTA y tratado con 10 mM ligador maleimida-carga útil en DMA (de modo común 5-10 equivalentes). Después de reposo durante 1.5 horas, el material fue intercambiado con solución reguladora (como se hizo antes) en 1 mL de PBS (3 x 3 mL lavados, 10x concentración por ciclo). La purificación por
20 medio de SEC (como se describió de manera previa) se realizó según fue necesario para remover cualquier material agregado.

Procedimiento general I: La conjugación inicial del ligador-carga útil se realizó utilizando el método antes descrito (Procedimiento General F). El conjugado anticuerpo-fármaco
25 resultante fue intercambiado con solución reguladora en un

regulador de borato 50 mM (pH 9.2) usando un dispositivo de ultrafiltración (50 kd MW recorte). La solución resultante fue calentada hasta 37°C durante 24 horas (para ligadores maleimida-Peg) o hasta 45°C durante 48 horas (para ligadores maleimida-caproilo). La solución resultante fue enfriada, intercambiada con solución reguladora en PBS, y purificada mediante SEC (como se describió de manera previa) a fin de remover cualquier material agregado. El análisis LCMS del material indicó que el anillo succinimida había abierto por completo (90% o más). Obsérvese que en los ejemplos donde está presente un éster de metilo en la carga útil, el éster es hidrolizado para el ácido carboxílico bajo las condiciones descritas.

Procedimiento general J: Los ésteres de pentafluorofenilo fueron conjugados para el anticuerpo mostrado siguiendo el procedimiento detallado de modo previo en WO2012007896 A1.

Procedimiento general K: La conjugación de los ligadores amino-alquilo se logró a través de ligadura mediada por enzima como se describe en WO2012059882 A2.

Procedimiento general L. N-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-2-Metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-2-carboxi-1-metoxipropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida (preparada de la misma manera que en #136) fue acoplada a la porción aminoácido o amina relevante usando HATU (1.0-2.0 eq.) en presencia de base de Hunig (1.-5.0 eq.) en una solución de DMF, diclorometano, o en ciertos casos una solución de

ambos (o una solución de uno o más solventes). La reacción fue monitoreada a través de LC-MS (o TLC o HPLC). La reacción fue concentrada *in vacuo* y purificada usualmente mediante cromatografía en gel de sílice o mediante HPLC preparatoria. La protección Fmoc fue removida después como se describió en el procedimiento general A seguida por la concentración *in vacuo* y purificada mediante cromatografía en gel de sílice o mediante HPLC preparatoria.

Procedimiento general M. #151 fue acoplado a la amina relevante usando HATU (1.0-2.0 eq., u otro reactive de acoplamiento apropiado) en presencia de base de Hunig (1.0-5.0 eq.) en una solución de DMF, diclorometano, o en ciertos casos una solución de ambos (o una solución de uno o más solventes). La reacción fue monitoreada a través de LC-MS (o TLC o HPLC). La reacción fue concentrada *in vacuo*. Se realizó después la desprotección Boc como se describió en el procedimiento general B, concentrada *in vacuo* y purificada mediante cromatografía en gel de sílice o mediante HPLC preparatoria.

Procedimiento general N. ácido 1-(9H-fluoren-9-il)-3-oxo-2,7,10,13,16,19,22-heptaoxa-4-azapentacosan-25-oico (u otro Fmoc-AmPegXC2-COOH apropiado) fue acoplado al pentapéptido citotóxico relevante (o el pentapéptido citotóxico que contiene un grupo protector en una porción reactiva diferente al extremo-N) usando HATU (1.0-2.0 eq., u otro

reactivo de acoplamiento apropiado) en presencia de base de Hunig (1.0-5.0 eq. U otra base apropiada) en una solución de DMF, diclorometano, o en ciertos casos una solución de ambos (o una solución de uno o más solventes). La reacción fue monitoreada a través de LC-MS (o TLC o HPLC). La reacción fue concentrada *in vacuo*. La desprotección Fmoc se realizó de acuerdo con el procedimiento general A. En ciertos casos se efectuó una segunda desprotección a fin de remover un grupo protector en una porción reactiva en el pentapéptido citotóxico usando el procedimiento general B (u otro procedimiento relevante conocido en la literatura en base al grupo protector). La reacción fue concentrada *in vacuo* y purificada mediante cromatografía en gel de sílice o mediante HPLC preparatoria.

Procedimiento general O. El Fmoc-AmPegXC2-COOH apropiado es acoplado al pentapéptido citotóxico relevante (o el pentapéptido citotóxico que contiene un grupo protector en una porción reactiva distinta al extremo-N) y la desprotección Fmoc se realizó de acuerdo con el procedimiento general N. La reacción es concentrada *in vacuo* y después purificada mediante cromatografía en gel de sílice o HPLC preparatoria (o el material crudo puede ser usado como está). La secuencia PABC apropiada (tal como mcValCitPABC, o derivativo de) es instalada después según el procedimiento general E. En ciertos casos si un grupo protector está presente en la porción de pentapéptido citotóxico de la molécula se efectúa entonces la desprotección utilizando el procedimiento general A o el

procedimiento general B (u otro procedimiento relevante conocido en la literatura en base al grupo protector). La reacción es concentrada *in vacuo* y purificada mediante cromatografía en gel de sílice o mediante HPLC preparatoria.

5 *Procedimiento general P.* Siguiendo el procedimiento E remplazando mcValCitPABC-PNP, con MalPeg3C2ValCitPABC-PNP (preparado de una manera similar a mcValCitPABC-PNP).

Procedimiento general Q. El Fmoc-AmPegXC2-COOH apropiado es acoplado al pentapéptido citotóxico relevante (o
10 el pentapéptido citotóxico que contiene un grupo protector en una porción reactiva distinta al extremo-N) y se efectuó la desprotección Fmoc como se describió en el procedimiento general N. La reacción es concentrada *in vacuo* y después purificada mediante cromatografía en gel de sílice o mediante
15 HPLC preparatoria (o el material crudo puede utilizarse como está). A una solución sometida a agitación de este residuo en DMF a 0°C (o una temperatura ligeramente mayor en ciertos casos) se agregó ácido bromoacético (1.0-2.0 eq.) seguido por base de Hunig (1.0-5.0 eq.) y HATU (1.0-2.0 eq.). Se permitió
20 el calentamiento de la reacción hasta temperatura ambiente y se sometió a agitación a temperatura ambiente en tanto que se monitoreó a través de LC-MS (o TLC o HPLC). La reacción fue concentrada *in vacuo* y purificada mediante HPLC preparatoria.

Procedimiento general R. Siguiendo el procedimiento E
25 remplazando mcValCitPABC-PNP, con N-(6-[(9H-fluoren-9-

ilmetoxi)carbonil]amino}hexanoil)-L-valil-N~5~-carbamoil-N-[4-({[(4-nitrofenoxi)carbonil]oxi}metil)fenil]-L-ornithinamida (preparada de una manera similar a mcValCitPABC-PNP). Se realizó después la desprotección Fmoc (procedimiento general B) seguida por
 5 purificación con HPLC preparatoria.

Procedimiento general S. A una solución sometida a agitación 6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanal (1.0-3.0 eq.) en metanol se agregó el pentapéptido citotóxico relevante (1.0 eq) seguido por ácido fórmico. Se permitió la agitación de la reacción a
 10 temperatura ambiente durante 1-40 minutos seguida por la adición de (ciano-kappa C)(trihidro)borato sódico (1-)(3.0-6.0 eq., referido también como cianoborohidruro sódico). La reacción fue monitoreada a través de LC-MS (o TLC o HPLC). En ciertos casos se agregó 6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanal adicional (1.0-3.0 eq.).
 15 La reacción fue concentrada *in vacuo* seguida por purificación utilizando HPLC preparatoria.

Procedimiento general T. Se preparó 4-[3-oxo-3-(2-oxoazetidin-1-il)propil]anilinio como se describe en la literatura (*Bioorganic and Medicinal by the addition of Chemistry Letters*. **2012**, vol. 22, #13,
 20 4249– 4253) el cual es acoplado después a bis(pentafluorofenil)3,3'-[etan-1,2-diilbis(oxi)]dipropanoato usando HATU en diclorometano seguido por acoplamiento al pentapéptido citotóxico deseado. El material es purificado después mediante HPLC preparatoria.

Procedimiento general U. Fmoc-ValCitPABC-PNP es acoplado
 25 al pentapéptido citotóxico deseado siguiendo el procedimiento

general E y después se remueve Fmoc siguiendo el procedimiento general A. Este residuo es acoplado después a ácido [2-oxo-2-({4-[3-oxo-3-(2-oxoazetidin-1-il)propil]fenil}amino)etoxi]acético (el cual es preparado mediante acoplamiento de 4-[3-oxo-3-(2-oxoazetidin-1-il)propil]anilinio con 1,4-dioxan-2,6-diona siguiendo el procedimiento general D). El material es purificado después mediante HPLC preparatoria.

Procedimiento general V. Se acopla Bis(pentafluorofenil)3,3'-[etan-1,2-diilbis(oxi)]dipropanoato o bis(pentafluorofenil) 4,7,10,13,16-pentaoxanonadecan-1,19-dioato es acoplado al pentapéptido citotóxico deseado (o en ciertos casos acoplado al pentapéptido citotóxico deseado que contiene un grupo protector en una porción reactiva distinta al extremo-N) siguiendo el procedimiento general D. Si un grupo protector está presente, el grupo protector es removido después (usando los procedimientos relevantes descritos en la literatura). El material es purificado después mediante HPLC preparatoria.

Procedimiento general W. 4-({[(4-nitrofenoxi)carbonil]oxi}metil)fenil 1-(9H-fluoren-9-il)-3-oxo-2,7,10-trioxa-4-azatridecan-13-oato es acoplado al pentapéptido citotóxico deseado siguiendo el procedimiento general E. Fmoc es removido siguiendo el procedimiento general A. Bis(pentafluorofenil)3,3'-[etan-1,2-

diilbis(oxi)]dipropanoato es acoplado a este residuo siguiendo el procedimiento general D. El material es purificado después mediante HPLC preparatoria.

Procedimiento general X1. N-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-
 5 L-alanil-L-alanil-N~1~- [4-({[(4-nitrofenoxi)carbonil]oxi}metil)fenil]-
 N~4~-tritol-L-aspartamida es acoplada al pentapéptido citotóxico
 deseado siguiendo el procedimiento general E. Fmoc es removido
 siguiendo el procedimiento general A y el grupo protector tritilo es
 removido siguiendo el procedimiento general B. Bis(pentafluorofenil)
 10 3,3'-[etan-1,2-diilbis(oxi)]dipropanoato es acoplado a este residuo
 siguiendo el procedimiento general D. El material es purificado
 mediante HPLC preparatoria.

Procedimiento general X2. N-{3-[2-(3-etoxi-3-
 oxopropoxi)etoxi]propanoil}-L-valil-N~5~-carbamoil-N-[4-({[(4-
 15 nitrofenoxi)carbonil]oxi}metil)fenil]-L-ornithinamida es acoplada al
 pentapéptido citotóxico deseado siguiendo el procedimiento general
 E. El éster etílico es removido usando hidróxido de litio en THF y
 agua. Se forma entonces éster NHS mediante acoplamiento del
 residuo con 1-hidroxipirrolidin-2,5-diona usando N,N'-
 20 diciclohexilcarbodiimida en THF. El material es purificado mediante
 HPLC preparatoria.

Procedimiento general X3. N-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-
 D-valil-N~5~-carbamoil-N-[4-({[(2-carboxipropan-2-
 il)carbamoil]oxi}metil)fenil]-L-ornithinamida es acoplada a #50
 25 siguiendo el procedimiento general D en DMSO y acetonitrilo. Fmoc

es removido siguiendo el procedimiento general A seguido por el acoplamiento con bis(pentafluorofenil)3,3'-[etan-1,2-diilbis(oxi)]dipropanoato usando base de Hunig en acetonitrilo. El material es purificado mediante HPLC preparatoria.

5 *Procedimiento general X4.* N-[1-(9H-fluoren-9-il)-3,5,12-trioxa-2,7,10-trioxa-4-azadodecan-12-il]-2-metilalanina es acoplado a #250 siguiendo el procedimiento general D en acetonitrilo. Fmoc es removido siguiendo el procedimiento general A seguido por el acoplamiento con
10 bis(pentafluorofenil)3,3'-[etan-1,2-diilbis(oxi)]dipropanoato usando base de Hunig en acetonitrilo. El material es purificado mediante HPLC preparatoria.

Procedimiento general X5. L-valil-N~5~-carbamoil-N-[4-(hidroximetil)fenil]-L-ornitinamida es acoplada a N~2~-acetil-
15 N~6~-(ter-butoxicarbonil)-L-lisina siguiendo el procedimiento general D. Este residuo resultante es acoplado con bis(4-nitrofenil)carbonato con base de Hunig en DMF, seguido por el acoplamiento con el pentapéptido citotóxico deseado siguiendo el procedimiento general E. Se ejecuta después la
20 desprotección Boc siguiendo el procedimiento general B en acetonitrilo. El residuo es purificado mediante HPLC preparatoria.

 En ciertos casos se efectuaron alteraciones menores a las condiciones de reacción tales como aunque sin limitarse al
25 orden de adición del reactivo y reactante y/o la cantidad de

reactivo o reactante lo que está indicado por el símbolo *. Además, estos procedimientos generales se proporcionan solamente como ilustrativos y no son limitantes.

Además de los Procedimientos Generales proporcionados con anterioridad, las referencias a dolastatina y auristatina relevantes incluyen las siguientes: Petit *et al.* *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 5463; Petit *et al.* *Anti-Cancer Drug Design* **1998**, *13*, 243 y las referencias citadas en ellas; Petit *et al.* *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 962; WO 96/33212; WO 95/09864; EP 0695758; WO 07/8848; WO 01/18032; WO 09/48967; WO 09/48967; WO 09/117531; WO 08/8603; US 7,750,116; US 5,985,837; y US 2005/9751; todas las cuales están incorporadas a la presente mediante referencia en su totalidad.

Análisis MS y Preparación de Muestra

15

Las muestras fueron preparadas para análisis LC-MS mediante la combinación de aproximadamente 20 µL de muestra (aproximadamente 1 mg/mL de ADC en PBS) con 20 µL de 20 mM ditioneitol (DTT). Después de permitir que la mezcla se mantenga a temperatura ambiente durante 5 minutos, las muestras fueron analizadas de acuerdo con el protocolo O.

Se efectuó el siguiente cálculo a fin de establecer la carga total (DAR) del conjugado:

$$\text{Carga} = 2*[\text{LC1}/(\text{LC1}+\text{LC0})]+2*[\text{HC1}/(\text{HC0}+\text{HC1}+\text{HC2}+\text{HC3})]+$$

$$4*[\text{HC2}/(\text{HC0}+\text{HC1}+\text{HC2}+\text{HC3})]+6*[\text{HC3}/(\text{HC0}+\text{HC1}+\text{HC2}+\text{HC3})]$$

25

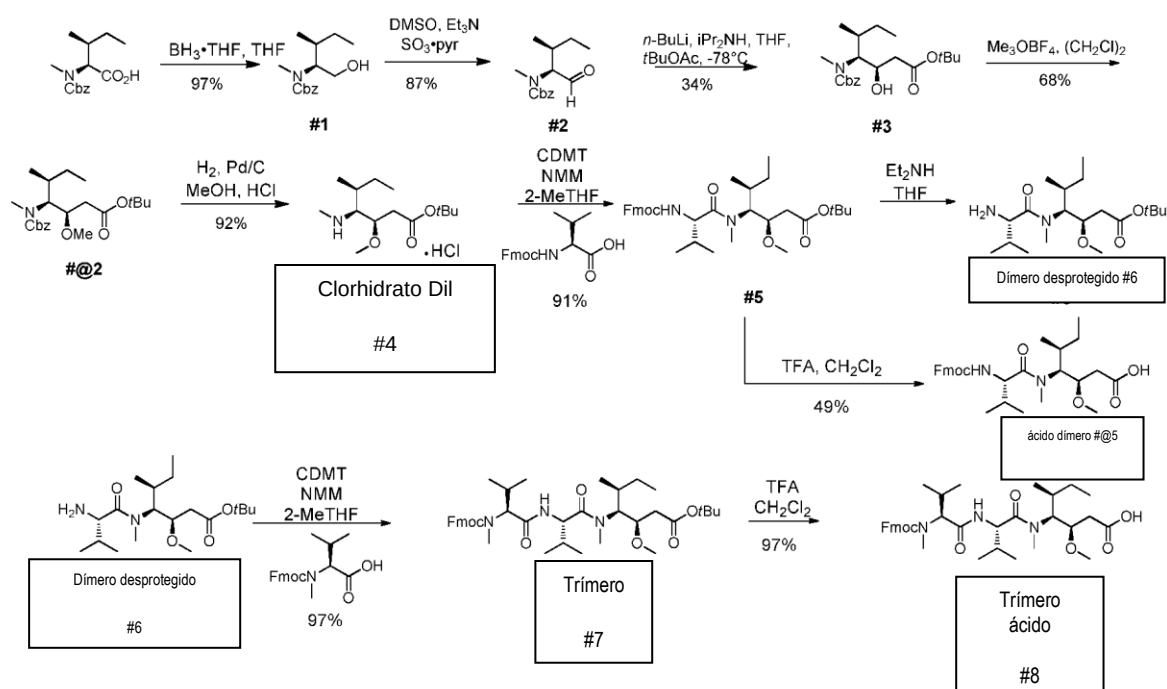
Cuando las variables indicadas son la abundancia relativa de: LC0 = cadena ligera descargada, LC1 = cadena ligera cargada individual, HC0 = cadena pesada descargada, HC1 = cadena pesada cargada individual, HC2 = cadena pesada cargada doble, y HC3 = cadena pesada cargada triple.

Las condiciones LC-MS utilizadas son las Condiciones F para el tiempo de retención por debajo de un minuto y las Condiciones H para los experimentos restantes a menos de que se indique lo contrario.

10

Preparación de N-[(9H-Fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-N-Metil-L-valil-N-[(2R,3S,4S)-1-carboxi-2-metoxi-4-metilhexan-3-il]-N-metil-L-valinamida (#8)

15



Etapa 1. Síntesis de bencil [(2S,3S)-1-hidroxi-3-

metilpentan-2-il]metilcarbamato (#1). A una solución de *N*-
 [(benciloxi)carbonil]-*N*-metil-*L*-isoleucina (52.37 g, 187.5 mmol, 1
 eq.) en tetrahidrofurano (524 mL, 0.35 M) se agregó complejo de
 borano-tetrahidrofurano (1 M en tetrahidrofurano, 375 mL, 375 mmol,
 5 2 eq.) lentamente durante 1 hora y se permitió la agitación de la
 reacción durante 18 horas a temperatura ambiente. La reacción fue
 enfriada hasta 0°C y se agregó agua (30 mL) durante 30 minutos. La
 mezcla de reacción fue diluida con solución de carbonato de sodio
 acuosa 1 M (100 mL) y ter-butil metil éter (250 mL). La capa acuosa
 10 fue re-extraída con ter-butil metil éter (100 mL). Las capas orgánicas
 combinadas fueron lavadas con solución de carbonato de sodio
 acuosa 1 M (100 mL), lavadas con salmuera (200 mL), secadas sobre
 sulfato de magnesio, filtradas, y concentradas *in vacuo* a fin de
 proporcionar #1 (48.44 g, 97% rendimiento) como un aceite de color
 15 amarillo pálido, el cual fue usado en la siguiente etapa sin
 purificación adicional. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), suponiendo que
 es una mezcla de rotámeros: δ 7.26-7.41 (m, 5H), [5.06 (AB cuarteto,
 $J_{AB}=12.9$ Hz, $\Delta\nu_{AB}=22.8$ Hz) y 5.06 (AB cuarteto, $J_{AB}=9.0$ Hz,
 $\Delta\nu_{AB}=9.0$ Hz), total 2H], [4.65 (t, $J=5.3$ Hz) y 4.59 (t, $J=5.4$ Hz), total
 20 1H], 3.67-3.80 (m, 1H), 3.51-3.60 (m, 1H), 3.41-3.51 (m, 1H), 2.75 y
 2.71 (2 s, total 3H), 1.49-1.64 (br m, 1H), 1.24-1.37 (br m, 1H), 0.90-
 1.02 (br m, 1H), 0.74-0.87 (m, 6H).

Etapa 2. Síntesis de bencil metil[(2*S*,3*S*)-3-metil-1-oxopentan-
 2-il]carbamato (#2). A una solución de #1 (8.27 g, 31.2 mmol, 1 eq.)
 25 en dimetil sulfóxido (41.35 mL, 0.75 M), se agregó trietilamina (8.70

mL, 64.0 mmol, 2.05 eq.) y la mezcla fue enfriada hasta 0°C. El complejo de trióxido de azufre piridina (10.18 g, 63.96 mmol, 2.05 eq.) fue agregado después en porciones, en tanto que se mantiene la temperatura interna por debajo de los 8°C. Se permitió que la reacción alcanzara la temperatura ambiente y fue sometida a agitación durante 18 horas. La reacción fue vertida en agua (100 mL) y *ter-butil metil éter* (100 mL). La capa acuosa fue re-extraída con *ter-butil metil éter* (50 mL) y las capas orgánicas combinadas fueron lavadas con salmuera (100 mL), secadas sobre sulfato de magnesio, filtradas, concentradas *in vacuo* y purificadas mediante cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 10% hasta 60% acetato de etilo en heptano) a fin de proporcionar #2 (7.14 g, 87%) como un aceite incoloro. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆), suponiendo que es una mezcla de rotámeros, señales características: δ 9.61 (s, 1H), 7.26-7.42 (m, 5H), 5.01-5.13 (m, 2H), 4.04-4.12 (m, 1H), 2.86 y 2.82 (2 s, total 3H), 1.94-2.11 (br m, 1H), 1.26-1.42 (br m, 1H).

Etapas 3. Síntesis de *ter-butil* (3R,4S,5S)-4-[[{(benciloxi)carbonil(metil)amino}-3-hidroxi-5-metilheptanoato (#3)]. Se preparó diisopropilamina de litio mediante la adición de *n*-butil-litio (2.5 M solución en tetrahidrofurano, 35.9 mL, 89.8 mmol, 1.4 eq.) a una solución de diisopropilamina (13.8 mL, 96.3 mmol, 1.5 eq.) en tetrahidrofurano (50 mL, 1.3 M) a -78°C. Después de 1 hora, se agregó *ter-butil* acetato (15.7 mL, 116 mmol, 1.8 eq.) mediante goteo y la mezcla de reacción fue

sometida a agitación durante 1.5 horas adicionales en tanto que se permite calentar lentamente hasta -20°C. La mezcla de reacción fue enfriada de nuevo hasta -78°C y se agregó una solución de aldehído #2 (16.9 g, 64.2 mmol, 1 eq.) en tetrahidrofurano (10 mL). La mezcla de reacción fue sometida a agitación durante 1.5 horas y después apagada mediante la adición de agua (100 mL). Después de la extracción con éter dietílico (2 x 100 mL), las capas orgánicas combinadas fueron secadas sobre sulfato de sodio, filtradas, concentradas *in vacuo* y purificadas mediante cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 0% hasta 20% acetona en heptano) a fin de proporcionar #3 (8.4 g, 34%) como un aceite incoloro. LC-MS: *m/z* 402.4 [M+Na⁺], tiempo de retención = 3.91 minutos; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆), suponiendo que es una mezcla de rotámeros: δ 7.27-7.39 (m, 5H), 5.01-5.12 (m, 2H), [4.93 (d, J=7.2 Hz) y 4.98 (br d, J=7.2 Hz), total 1H], 4.03-4.15 (br m, 1H), 3.68-3.85 (br m, 1H), 2.65 y 2.72 (2 br s, total 3H), 2.28-2.37 (m, 1H), 2.09-2.17 (m, 1H), 1.74-1.90 (br m, 1H), 1.41-1.51 (m, 1H), 1.39 (s, 9H), 0.92-1.01 (m, 1H), 0.77-0.92 (m, 6H).

Etapa 4. Síntesis de ter-butil (3R,4S,5S)-4-[[[(benciloxi)carbonil(metil)amino]-3-metoxi-5-metilheptanoato (#@2). A una solución de #3 (8.4 g, 22 mmol, 1 eq.) en 1,2-dicloroetano (25 mL, 0.88 M) se agregaron tamices moleculares (4 Å, 0.7 g) y esponja de protón (1,8-bis(dimetilamino)naftaleno) (13.4 g, 59.2 mmol, 2.7 eq.), seguidos por trimetiloxonio tetrafluoroborato (9.10 g, 61.6 mmol, 2.8 eq.). Después de someter a agitación durante la noche, la

mezcla de reacción fue filtrada a través de Celite. El filtrado fue concentrado *in vacuo* y el residuo fue purificado mediante cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 0% hasta 40% 1:1 acetona:acetato de etilo en heptano) para dar #@2 (8.7 g, 68%)
 5 como un aceite incoloro. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6), suponiendo que es una mezcla de rotámeros: δ 7.28-7.40 (m, 5H), 5.01-5.13 (m, 2H), 3.89-4.08 (br m, 1H), 3.70-3.82 (m, 1H), 3.18 y 3.26 (2 s, total 3H), 2.66 y 2.71 (2 br s, total 3H), 2.44-2.53 (m, 1H, asumido; parcialmente oscurecido por pico de
 10 solvente), 2.17-2.24 (m, 1H), 1.71-1.86 (br m, 1H), 1.39 y 1.39 (2 s, total 9H), 1.31-1.40 (m, 1H), 0.94-1.08 (m, 1H), 0.76-0.91 (m, 6H).

Etapas 5. Síntesis de ter-butil (3R,4S,5S)-3-metoxi-5-metil-4-(metilamino)heptanoato, sal de clorhidrato (#4). A una
 15 solución de #@2 (13.37 g, 33.98 mmol, 1 eq.) en metanol (134 mL, 0.1 M) y ácido clorhídrico concentrado (3.1 mL, 37.4 mmol, 1.1 eq.) se agregó 10% paladio sobre carbono (50% humedad) (0.1 % en peso; 1.34 g, 3.40 mmol). La mezcla fue hidrogenada a 45 psi durante 3 horas, purgada después con nitrógeno,
 20 filtrada a través de Celite y concentrada *in vacuo* a fin de proporcionar #4 (9.20 g, 92%) como un sólido de color blanco. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 9.65 (br s, 1H), 8.97 (br s, 1H), 3.98-4.04 (m, 1H), 3.40 (s, 3H), 3.06-3.13 (br m, 1H), 2.82 (br dd, $J=6, 5$ Hz, 3H), 2.74-2.80 (m, 1H), 2.68 (dd, mitad del
 25 patrón ABX, $J=16.3, 4.2$ Hz, 1H), 2.00- 2.10 (br m, 1H), 1.73-

1.84 (m, 1H), 1.46 (s, 9H), 1.38-1.45 (m, 1H), 1.13 (d, J=7.0 Hz, 3H), 0.99 (t, J=7.4 Hz, 3H).

Etapa 6. Síntesis de ter-butil (3R,4S,5S)-4-[[N-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-L-valil](metil)amino]-3-metoxi-5-metilheptanoato

5 (#5). A una mezcla de N-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-L-valina (18.53 g, 54.60 mmol, 1.3 eq.) y 2-cloro-4,6-dimetoxi-1,3,5-triazina (CDMT) (9.58 g, 54.6 mmol, 1.3 eq.) en 2-metiltetrahidrofurano (118.00 mL, 0.34 M) se agregó N-metilmorfolina (6.52 mL, 59.1 mmol, 1.5 eq.) seguida por #4 (11.80 g, 39.9 mmol, 1 eq.). Después de 3
10 horas, la reacción fue apagada con agua (50 mL) y sometida a agitación durante 15 minutos. La capa acuosa fue separada y re-extraída con 2-metiltetrahidrofurano (50 mL). Las capas orgánicas combinadas fueron lavadas con solución de bicarbonato de sodio acuosa saturada (50 mL), secadas sobre sulfato de magnesio,
15 filtradas, y concentradas *in vacuo* para dar un aceite incoloro, el cual fue purificado mediante cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 5% hasta 40% acetato de etilo en heptano) para dar #5 (26.2 g, 91%) como una espuma incolora. LC-MS (Protocolo I) *m/z* 581.3 [M+H⁺] 604.3 [M+Na⁺], tiempo de retención = 4.993 minutos; ¹H NMR (400
20 MHz, DMSO-d₆), posiblemente una mezcla de rotámeros, señales principales características: δ 7.88 (d, J=7.4 Hz, 2H), 7.71 (d, J=7.4 Hz, 2H), 7.62 (d, J=8.6 Hz, 1H), 7.41 (dd, J=7.4, 7.4 Hz, 2H), 7.27-7.34 (m, 2H), 4.13-4.32 (m, 4H), 3.70-3.82 (br m, 1H), 3.24 (s, 3H), 2.92 (br s, 3H), 2.54 (dd, J=15.7, 2.4 Hz, 1H), 2.17 (dd, J=15.4, 9.4
25 Hz, 1H), 1.95-2.07 (m, 1H), 1.70-1.83 (br m, 1H), 1.40 (s, 9H), 0.83-

0.94 (m, 9H), 0.69 (t, J=7.2 Hz, 3H).

Etapa 7A. Síntesis de ter-butil (3R,4S,5S)-3-metoxi-5-metil-4-[metil(L-valil)amino]heptanoato (#6). A una solución de #5 (26 g, 42 mmol, 1 eq.) en tetrahidrofurano (260 mL, 0.16 M) se agregó dietilamina (22 mL) durante 30 minutos. La reacción fue sometida a agitación durante aproximadamente 6 horas y la suspensión fue filtrada después a través de Celite y lavada con tetrahidrofurano adicional (25 mL). El filtrado fue concentrado *in vacuo* a fin de proporcionar un aceite de color amarillo pálido, el cual fue redisoluelto en 2-metiltetrahidrofurano (50 mL) y concentrado de nuevo para asegurar la remoción completa de dietilamina. El aceite crudo de #6 (>15.25 g) fue llevado a la siguiente etapa sin purificación adicional.

Etapa 7B. Síntesis de ácido (3R,4S,5S)-4-[(N-(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil-L-valyl)(metil)amino]-3-metoxi-5-metilheptanóico (#@5). De acuerdo con el procedimiento general B, a partir de #5 (1.62 g, 2.79 mmol, 1 eq.), diclorometano (10 mL, 0.3 M) y ácido trifluoroacético (3 mL) se sintetizó #@5 (1.42 g, 97%) como un sólido que fue utilizado sin purificación adicional sin purificación adicional. LC-MS *m/z* 525.3 [M+H⁺] 547.3 [M+Na⁺] tiempo de retención = 0.95 minuto; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆), señales características: δ 7.89 (d, J=7.6 Hz, 2H), 7.71 (d, J=7.4 Hz, 2H), 7.59 (d, J=8.8 Hz, 1H), 7.41 (dd, J=7.6, 7.4 Hz, 2H), 7.28-7.34 (m, 2H), 4.14-4.32 (m, 4H), 3.24 (s, 3H), 2.92 (br s, 3H), 2.51-2.57 (m, 1H,

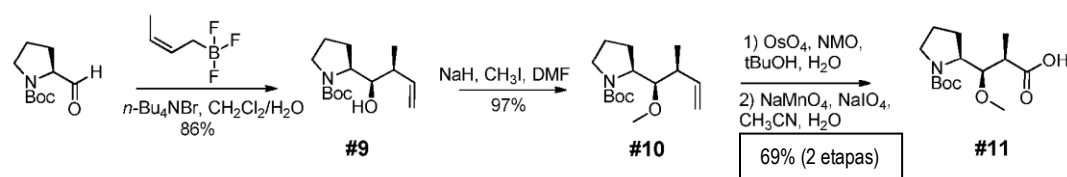
asumido; parcialmente oscurecido por solvente pico), 2.20 (dd, J =15.9, 9.5 Hz, 1H), 1.95-2.06 (m, 1H), 1.70-1.83 (br m, 1H), 1.221.36 (br m, 1H), 0.84-0.93 (m, 9H), 0.70 (t, J =7.3 Hz, 3H).

Etapa 8. Síntesis de N-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-N-
 5 *metil-L-valil-N-[(3R,4S,5S)-1-ter-butoxi-3-metoxi-5-metil-1-*
oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida (#7). A una mezcla de N-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-N-metil-L-valina (19.54 g, 55.29 mmol, 1.3 eq.) y #6 (15.25 g, 42.54 mmol, 1 eq.) en 2-metiltetrahidrofurano (152 mL, 0.28 M) se agregó 2-cloro-4,6-dimetoxi-1,3,5-triazina
 10 (CDMT) (9.71 g, 55.3 mmol, 1.3 eq.). Después de 10 minutos, se agregó lentamente N-metilmorfolina (6.6 mL, 60 mmol, 1.4 eq.), en tanto que se mantuvo la temperatura interna por debajo de 25 °C. La reacción fue sometida a agitación durante 4 horas y fue extinguida después mediante la adición de agua (50 mL). Después de someter a
 15 agitación durante 15 minutos, la capa acuosa fue separada y re-extraída con 2-metiltetrahidrofurano (50 mL). Las capas orgánicas combinadas fueron lavadas con solución de bicarbonato de sodio acuosa saturada (100 mL), después fueron secadas sobre sulfato de magnesio, filtradas, y concentradas *in vacuo*. La espuma de color
 20 amarillo resultante fue purificada mediante cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 5% hasta 35% acetato de etilo en heptano) para dar #7 (32 g, 97%). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆), suponiendo que es una mezcla de rotámeros, señales características: δ 7.89 (d, J =7.4 Hz, 2H), 7.62 (d, J =7.4 Hz, 2H), 7.41 (br dd, J =7.4, 7.4 Hz, 2H),
 25 7.29-7.34 (m, 2H), 4.52-4.69 (br m, 1H), 3.70-3.82 (br m, 1H), 3.22 y

3.25 (2 br s, total 3H), 2.94 y 2.96 (2 br s, total 3H), 2.78 y 2.81 (2 br s, total 3H), 2.11-2.23 (m, 1H), 1.90-2.10 (m, 2H), 1.68-1.83 (br m, 1H), 1.40 (s, 9H), 1.21-1.33 (br m, 1H).

Etapas 9. Síntesis de *N*-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil-*N*-metil-*L*-valil-*N*-[(2*R*,3*S*,4*S*)-1-carboxi-2-metoxi-4-metilhexan-3-il]-*N*-metil-*L*-valinamida (#8). A #7 (32 g, 46 mmol, 1 eq.) en diclorometano (160 mL, 0.29 M) se agregó mediante goteo durante 10 minutos ácido trifluoroacético (17.4 mL, 231 mmol, 5 eq.). Después de 6 horas, se agregó la misma cantidad de ácido trifluoroacético y se continuó la reacción durante 18 horas. La mezcla de reacción fue diluida con tolueno (320 mL) y concentrada *in vacuo* a fin de proporcionar #8 (35.8 g, 97%) como un aceite de color rosáceo, el cual fue utilizado en la siguiente etapa sin purificación adicional. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), suponiendo que es una mezcla de rotámeros, señales características: δ 7.90 (d, *J*=7.0 Hz, 2H), 7.62 (d, *J*=7.4 Hz, 2H), 7.41 (br dd, *J*=7.4, 7.0 Hz, 2H), 7.29-7.35 (m, 2H), 4.54-4.68 (br m, 1H), [4.09 (d, *J*=11 Hz) y 4.22 (d, *J*=10.9 Hz), total 1H], 3.74-3.84 (br m, 1H), 3.22 y 3.24 (2 br s, total 3H), 2.94 y 2.96 br s, total 3H), 2.78 y 2.80 (2 br s, total 3H), 2.13-2.24 (m, 1H), 1.89-2.10 (br m, 2H), 1.70-1.81 (br m, 1H).

Preparación de ácido (2*R*,3*R*)-3-[(2*S*)-1-(ter-Butoxicarbonil)pirrolidin-2-il]-3-metoxi-2-metilpropanóico (#11; "ácido Boc-Dap-")



Etapa 1. Síntesis de ter-butil (2S)-2-[(1R,2S)-1-hidroxi-2-metilbut-3-en-1-il]pirrolidin-1-carboxilato (**#9**). A una solución de ter-

5 butil (2S)-2-formilpirrolidin-1-carboxilato (10 g, 50 mmol, 1 eq.) en diclorometano (120 mL, 0.42 M) se agregó potasio (2Z)-2-buten-1-iltrifluoroborato (9.76 g, 60.2 mmol, 1.2 eq.) seguido por bromuro de tetra-n-butilamonio (3.24 g, 5.02 mmol, 0.1 eq.) y agua (60 mL). Después de 13 horas, la reacción fue diluida con diclorometano (150

10 mL) y agua (150 mL). La capa acuosa fue separada y re-extraída con diclorometano (100 mL). Las capas orgánicas combinadas fueron lavadas con solución de cloruro de sodio acuosa (5 % en peso, 200 mL), lavadas con agua (200 mL), y concentradas *in vacuo* para obtener **#9** (~13 g) como un aceite de color anaranjado, el cual fue

15 utilizado sin purificación adicional. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 5.61-5.86 (br m, 1H), 4.97-5.09 (m, 2H), 3.80-3.98 (br m, 2H), 3.45-3.67 (br m, 1H), 3.21-3.29 (m, 1H), 2.14-2.26 (m, 1H), 1.80-2.04 (m, 3H), 1.65-1.76 (m, 1H), 1.47 (s, 9H), 1.12 (d, $J=6.6$ Hz, 3H).

Etapa 2. Síntesis de ter-butil (2S)-2-[(1R, 2S)-1-metoxi-2-metilbut-3-en-1-il]pirrolidin-1-carboxilato (**#10**). Se combinó hidruro de sodio (60% en aceite mineral, 3.38 g, 84.4 mmol, 1.1 eq.) con hexano (40 mL), y la mezcla fue sometida a agitación mecánica rápida durante 5 minutos. Se permitió la sedimentación de los

20

sólidos y se removi6 el hexano. Este procedimiento se repiti6 dos veces para remover el aceite mineral. Se agreg6 N,N-Dimetilformamida (59 mL, 1.3 M) y la mezcla fue enfriada hasta 0°C; se agreg6 despu6s yoduro de metilo (5 mL; 81 mmol, 1.05 eq.) mediante goteo, seguido por la adici6n a trav6s de goteo de una soluci6n de #9 (19.6 g, 76.8 mmol, 1 eq.) en N,N-dimetilformamida (59 mL) durante 5 minutos, en tanto que se mantiene la temperatura entre 0°C y 5°C. La reacci6n fue sometida a agitaci6n a 0°C durante 2 horas. La reacci6n fue apagada con soluci6n de cloruro de amonio acuosa saturada (150 mL), vertida en soluci6n de cloruro de sodio acuosa (5% en peso, 300 mL), y la mezcla fue extraída con acetato de etilo (3 x 50 mL). Las capas org6nicas combinadas fueron lavadas con 10% soluci6n de cloruro de sodio acuosa (2 x 300 mL), ladas con agua (200 mL), y concentradas *in vacuo*. El agua-aceite h6medo resultante fue reconcentrado a partir de acetato de etilo (150 mL) y purificado mediante cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 2% hasta 10% acetato de etilo en heptano) para obtener #10 (15.0 g, 73%) como un aceite incoloro. ¹H NMR (400 MHz, CDC13), suponiendo que es una mezcla de rot6meros: δ 5.60-5.83 (m, 1H), 4.91-5.06 (m, 2H), 3.81-3.95 (br m, 1H), 3.43 (s, 3H), 3.36-3.61 (m, 2H), 3.19-3.31 (m, 1H), 2.09-2.21 (m, 1H), 1.86-2.02 (br m, 2H), 1.62-1.85 (br m, 2H), 1.47 y 1.49 (2 s, total 9H), 1.09 (d, J=6.6 Hz, 3H).

25 *Etap*a 3. Síntesis de 6cido (2R,3R)-3-[(2S)-1-(ter-

butoxicarbonil)pirrolidin-2-il]-3-metoxi-2-metilpropanóico (#11). A #10 (25.0 g, 92.8 mmol, 1 eq.) en ter-butanol (100 mL, 0.93 M) se agregó inmediatamente agua (30.00 mL) seguida por N-metilmorfolin-N-óxido (25.97 g, 192.1 mmol, 2.07 eq.) y tetróxido de osmio (235.93 mg, 928.04 μ mol, 0.01 eq.). Después de 12 horas, la mezcla fue concentrada *in vacuo* utilizando agua (20 mL) para remover azeotrópicamente el ter-butanol residual. El residuo fue particionado entre acetato de etilo (500 mL) y agua (500 mL) más salmuera (150 mL). La capa acuosa fue re-extraída con acetato de etilo (250 mL). Las capas orgánicas combinadas fueron lavadas con solución de cloruro de sodio acuosa (10 % en peso, 200 mL), lavadas con agua (150 mL), y concentradas *in vacuo* para obtener un aceite de color café claro acuoso-húmedo que fue re-concentrado a partir de acetato de etilo (100 mL) para remover cualquier agua remanente. Este diol crudo (34.76 g) fue utilizado sin purificación adicional.

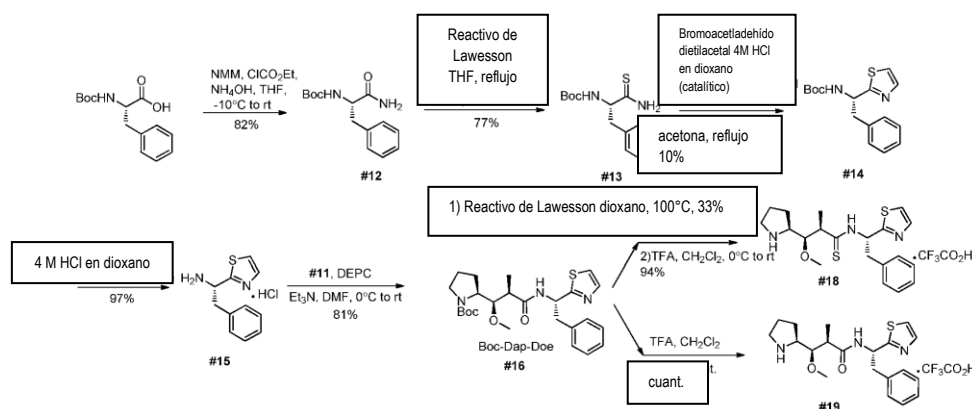
Al diol crudo (34.76 g, $\leq$ 92.8 mmol, 1 eq.) en acetonitrilo (347 mL, 0.1 M) y agua (174 mL) se agregó permanganato de sodio (2.03 g, 5.73 mmol, 0.05 eq.). La mezcla fue enfriada hasta 0°C y se agregó periodato de sodio (51.46 g, 240.6 mmol, 2.1 eq.) en porciones durante 30 minutos, mientras que se mantuvo la temperatura interna por debajo de 5°C. La reacción fue sometida a agitación a 0°C durante 4 horas y después fue vertida en una solución de pentahidrato de tiosulfato sódico (65.40 g, 263.5 mmol, 2.3 eq.) en agua (100 mL). La mezcla fue filtrada a través de Celite y el filtrado fue concentrado *in vacuo*. El residuo fue particionado entre

acetato de etilo (200 mL) y agua (200 mL). La capa acuosa fue re-extraída con acetato de etilo (250 mL), y las capas orgánicas combinadas fueron lavadas con una solución de ácido cítrico acuoso al 10%. Ya que el producto deseado es muy soluble en agua, todas las capas acuosas fueron combinadas, tratadas con Celite (100 g) y concentradas *in vacuo* para producir una pasta blanquecina. Se agregó acetato de etilo (150 mL) y la mezcla fue re-concentrada para remover cualquier agua residual; esta operación se repitió una vez más.

La pasta fue tratada con acetato de etilo (150 mL) y colocada *in vacuo* a 50°C durante 10 minutos y filtrada (repetido en dos ocasiones). Estos filtrados fueron combinados con la capa orgánica previa (a partir del lavado con ácido cítrico), concentrados, diluidos con acetato de etilo (200 mL) y filtrados a través de Celite para remover los sólidos. Finalmente este filtrado fue concentrado para producir **#11** (22.9 g, 69% durante dos etapas) como una espuma de color amarillento/café. LCMS (Protocolo I): m/z 310.1 $[M+Na^+]$, 232.1 $[(M-2\text{-metilprop-1-en})+H^+]$, 188.1 $[(M-\text{Boc})+H^+]$, tiempo de retención = 3.268 minutos; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6), señales características: δ 3.61-3.85 (br m, 2H), 3.20-3.45 (br m, 4H), 3.03-3.17 (br m, 1H), 1.59-1.93 (br m, 4H), 1.40 (br s, 9H), 1.02-1.18 (br m, 3H).

Preparación de (2R,3R)-3-metoxi-2-metil-N-[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]-3-[(2S)-pirrolidin-2-il]propanamida, sal de ácido

trifluoroacético (#19) y (2R,3R)-3-metoxi-2-metil-N-[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]-3-[(2S)-pirrolidin-2-il]propantioamida, sal de ácido trifluoroacético (#18)



5

Etapa 1. Síntesis de N α -(ten-butoxicarbonil)-L-fenilalaninamida (#12). A una solución de Boc-Phe-OH (30.1 g, 113 mmol, 1 eq.) en tetrahidrofurano (378 mL, 0.3 M) enfriada hasta -10°C se agregó N-metilmorfolina (13.6 mL, 124 mmol, 1.09 eq.), y cloroformato de etilo (11.8 mL, 124 mmol, 1.09 eq.). Después de 20 minutos, se agregó una solución de hidróxido de amonio acuosa al 30% (45 mL, 350 mmol, 3.1 eq.). La mezcla fue sometida a agitación a temperatura ambiente durante 18 horas antes de ser concentrada *in vacuo*. El residuo fue diluido con acetato de etilo y lavado de manera secuencial con 1 N solución de bisulfato de potasio acuosa, agua y salmuera. La capa orgánica fue secada después sobre sulfato de sodio, filtrada, y concentrada *in vacuo*. El sólido de color blanco fue disuelto (esto requirió de calentamiento con agitación) en acetato de etilo (aproximadamente 400 mL); se permitió entonces el enfriamiento de la solución hasta temperatura ambiente antes de

20

agregar hexano (~1000 mL). Después de unos minutos, inició la precipitación de un material de color blanco desde la mezcla de reacción. El sólido fue recolectado mediante filtración, lavado con heptano (2 x ~150 mL), y secado bajo vacío durante 18 horas para dar #12 (24.50 g, 82%) como un sólido. LC-MS: m/z 263.2 [M-H⁺], 309.2 [M+HCO₂⁻], tiempo de retención = 1.85 minutos; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆), suponiendo que es una mezcla de rotámeros, rotámero principal: δ 7.35 (br s, 1H), 7.22-7.30 (m, 5H), 7.00 (br s, 1H), 6.78 (d, J=8.6 Hz, 1H), 4.09 (ddd, J=10, 9, 4.5 Hz, 1H), 2.95 (dd, J=13.8, 4.4 Hz, 1H), 2.72 (dd, J=13.7, 10.1 Hz, 1H), 1.30 (s, 9H).

Etapa 2. Síntesis de ter-butil [(2S)-1-amino-3-fenil-1-tioxopropan-2-il]carbamato (#13). A una solución de #12 (14.060 g, 53.192 mmol, 1 eq.) en tetrahidrofurano (180 mL, 0.296M), se agregó 2,4-bis(4-metoxifenil)-1,3,2,4-ditiadifosfetan-2,4-ditiona (reactivo de Lawesson) (12.70 g, 31.40 mmol, 0.59 eq.) y la reacción fue calentada a reflujo durante 90 minutos. La reacción fue enfriada hasta temperatura ambiente y apagada mediante la adición de solución de bicarbonato de sodio acuosa saturada. La mezcla fue extraída dos veces con acetato de etilo y las capas orgánicas combinadas fueron secadas sobre sulfato de sodio, filtradas, y concentradas *in vacuo*. El residuo fue disuelto en acetato de etilo, concentrado *in vacuo* sobre sílice y purificado mediante cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 0% hasta 100%

acetato de etilo en heptano), obteniendo #13 (11.50 g, 77%) como un sólido de color blanco. LC-MS: m/z 279.4 $[M-H^+]$, 225.2 $[(M-2\text{-metilprop-1-en})+H^+]$, 181.2 $[(M\text{-Boc})+H^+]$; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6), suponiendo que es una mezcla de rotámeros, rotámero principal:

5 δ 9.60 (br s, 1H), 9.19 (br s, 1H), 7.23-7.32 (m, 5H), 6.82 (d, $J=8.8$ Hz, 1H), 4.44 (ddd, $J=9.4, 9.1, 4.4$ Hz, 1H), 3.00 (dd, $J=13.7, 4.5$ Hz, 1H), 2.79 (dd, $J=13.6, 9.9$ Hz, 1H), 1.29 (s, 9H).

Etapas 3. Síntesis de ter-butil [(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]carbamato (#14). A una mezcla de #13 (5.65 g, 20.2 mmol, 1 eq.) en acetona (101 mL, 0.2 M) se agregó bromoacetaldehído dietil

10 acetal (8.76 mL, 58.2 mmol, 2.89 eq.) y 2 gotas de 4 M ácido clorhídrico en dioxano. La mezcla fue desgasificada con nitrógeno tres veces antes de ser calentada a reflujo. Después de 2 horas, la reacción fue enfriada hasta temperatura ambiente y concentrada *in vacuo*.

15 El residuo fue disuelto en acetato de etilo, lavado con solución de bicarbonato de sodio acuosa saturada y lavado con salmuera. La capa orgánica fue secada sobre sulfato de sodio, filtrada, y concentrada *in vacuo*. El aceite de color anaranjado crudo resultante fue diluido con acetato de etilo antes de ser concentrado

20 *in vacuo* sobre sílice y purificado mediante cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 0% hasta 35% acetato de etilo en heptano) y después mediante cromatografía de fase inversa (Método A) para dar #14 (625 mg, 10%); HPLC (Protocolo E): m/z 304.5 $[M+H^+]$, 248.9 $[(M-2\text{-metilprop-1-eno})+H^+]$, tiempo de retención = 7.416 minutos; ^1H

25 NMR (400 MHz, DMSO- d_6), suponiendo que es una mezcla de

rotámeros, rotámero principal: δ 7.75 (d, $J=3.3$ Hz, 1H), 7.75 (br d, $J=8.6$ Hz, 1H), 7.61 (br d, $J=3.1$ Hz, 1H), 7.25-7.30 (m, 5H), 4.99 (ddd, $J=10.5, 8.9, 4.5$ Hz, 1H), 3.29- 3.36 (m, 1H, asumido; oscurecido parcialmente por señal de agua), 2.98 (dd, $J=13.8, 10.6$ Hz, 1H), 1.31 (s, 9H).

Etapas 4. Síntesis de (1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etanamina, sal de clorhidrato (#15). De acuerdo con el procedimiento general C, a partir de #14 (1.010 g, 3.318 mmol, 1 eq.), dioxano (10 mL, 0.33 M) y una 4 M solución de ácido clorhídrico en dioxano (20 mL, 80 mmol, 20 eq.) se sintetizó #15 (775 mg, 97%). ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.95-9.07 (br m, 3H), 7.86 (d, $J=3.2$ Hz, 1H), 7.73 (d, $J=3.2$ Hz, 1H), 7.18-7.28 (m, 3H), 7.10-7.15 (m, 2H), 4.98-5.07 (m, 1H), 3.49 (dd, $J=13.3, 4.9$ Hz, 1H), 3.18 (dd, $J=13.4, 10.2$ Hz, 1H).

Etapas 5. Síntesis de *ter-butil* (2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}propil]pirrolidin-1-carboxilato (#16). A una solución de #11 (280 mg, 0.974 mmol, 1 eq.) y #15 (460 mg, 1.44 mmol, 1.48 eq.) en *N,N*-dimetilformamida (3 mL, 0.32 M) a 0°C se agregó dietilfosforil cianida (DEPC) (93% de pureza, 212 μL , 1.30 mmol, 1.34 eq.), seguida por trietilamina (367 μL , 2.63 mmol, 2.7 eq.). Después de 2 horas a 0°C, la mezcla de reacción fue calentada hasta temperatura ambiente durante 18 horas. La mezcla de reacción fue diluida después con acetato de etilo:tolueno (2:1, 30 mL) y fue lavada de manera sucesiva

con 1 M solución de bisulfato de sodio acuosa (35 mL) y 50% solución de bicarbonato de sodio acuosa saturada (4 x 25 mL). La capa orgánica fue secada sobre sulfato de sodio, filtrada, concentrada *in vacuo*, y purificada mediante cromatografía en gel de sílice (12% hasta 100% acetato de etilo en heptano) para dar #16 como un aceite de color ámbar claro (374 mg, 81%). LC-MS: m/z 474.4 $[M+H^+]$, 374.4 $[(M-2\text{-metilprop-1-eno})+H^+]$ tiempo de retención = 3.63 minutos; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6), señales características: δ 8.66 (d, $J=8.5$ Hz, 1H), 7.78 (d, $J=3.3$ Hz, 1H), 7.64 (d, $J=3.3$ Hz, 1H), 7.21-7.31 (m, 4H), 7.14-7.20 (m, 1H), 5.40 (ddd, $J=11.4, 8.5, 4.0$ Hz, 1H), 3.23 (br s, 3H), 2.18 (dq, $J=9.7, 6.7$ Hz, 1H), 1.06 (d, $J=6.6$ Hz, 3H).

Etapas 6A. Síntesis de ter-butil (2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-[[[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}-3-tioxopropil]pirrolidin-1-carboxilato (#17). Una mezcla de #16 (350 mg, 0.739 mmol, 1 eq.) y 2,4-bis(4-metoxifenil)-1,3,2,4-ditiadifosfetan-2,4-ditiona (reactivo de Lawesson) (324 mg, 0.776 mmol, 1.05 eq.) en tolueno (6 mL, 0.1 M) fue calentada hasta 100°C. Después de 10 minutos, la mezcla fue enfriada hasta temperatura ambiente. El material insoluble fue removido mediante filtración y el filtrado fue concentrado *in vacuo*. El residuo fue purificado mediante cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 12% hasta 80% acetato de etilo en heptano) y después mediante cromatografía de fase inversa (Método E2) para dar #17 (120 mg, 33%); HPLC (Protocolo J): m/z 490.2 $[M+H^+]$, tiempo de retención = 10.069 minutos; $[\alpha]^{20}_D$ — 110 (c

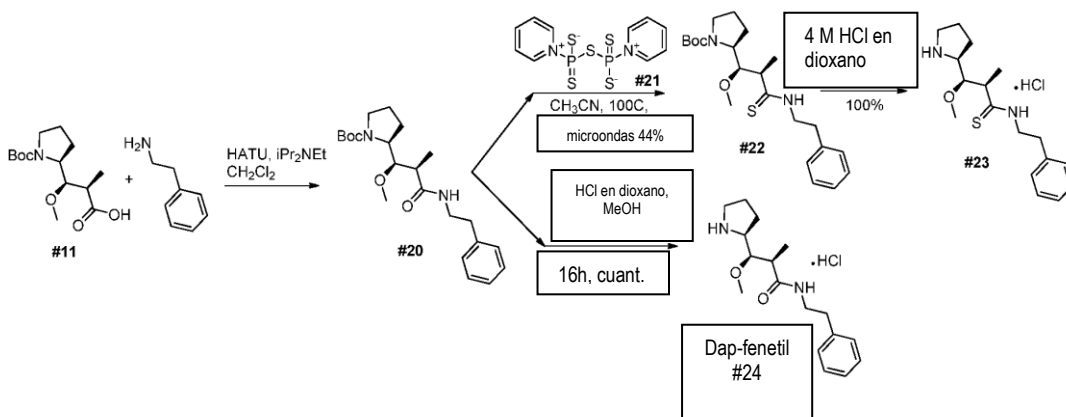
0.24, MeOH); ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD), señales características: δ 7.78 (d, $J=3.3$ Hz, 1H), 7.51 (d, $J=3.3$ Hz, 1H), 7.32-7.37 (m, 2H), 7.24-7.30 (m, 2H), 7.17-7.23 (m, 1H), 6.52-6.61 (br m, 1H), 3.62 (br dd, $J=15$, 4 Hz, 1H), 3.37 (s, 3H),
 5 2.98-3.09 (br m, 1H), 2.53-2.64 (br m, 1H), 1.60-1.78 (m, 2H), 1.49 (s, 9H), 1.27 (d, $J=6.5$ Hz, 3H).

Etapas 6B. Síntesis de (2R,3R)-3-metoxi-2-metil-N-[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]-3-[(2S)-pirrolidin-2-il]propanamida, sal de ácido trifluoroacético (#18). De
 10 acuerdo con el procedimiento general B, a partir de #17 (198 mg, 0.404 mmol, 1 eq.), diclorometano (6 mL, 0.07 M) y ácido trifluoroacético (2 mL) se sintetizó #18 (185 mg, 91%), el cual fue utilizado sin purificación adicional. LC-MS: m/z 390.1 $[\text{M}+\text{H}^+]$, tiempo de retención = 0.57 minutos; ^1H NMR (400 MHz,
 15 $\text{DMSO}-d_6$) δ 10.91 (d, $J=8.2$ Hz, 1H), 9.07-9.20 (br m, 1H), 7.86-8.00 (br m, 1H), 7.83 (d, $J=3.2$ Hz, 1H), 7.69 (d, $J=3.3$ Hz, 1H), 7.27-7.36 (m, 4H), 7.21-7.26 (m, 1H), 6.33 (ddd, $J=11.3$, 8.3, 4.4 Hz, 1H), 3.76-3.82 (m, 1H), 3.56 (dd, $J=14.6$, 4.3 Hz, 1H), 3.45 (s, 3H), 3.28 (dd, $J=14.6$, 11.3 Hz, 1H), 3.02-3.12 (br
 20 m, 1H), 2.89-3.00 (br m, 1H), 2.72-2.89 (m, 2H), 1.69-1.83 (br m, 1H), 1.43-1.58 (m, 2H), 1.20-1.33 (m, 1H), 1.22 (d, $J=6.6$ Hz, 3H).

Etapas 7. Síntesis de (2R,3R)-3-metoxi-2-metil-N-[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]-3-[(2S)-pirrolidin-2-il]propanamida,
 25 sal de ácido trifluoroacético (#19). De acuerdo con el

procedimiento general B, a partir de #16 (607 mg, 1.28 mmol, 1 eq.), diclorometano (10 mL, 0.13 M) y ácido trifluoroacético (2 mL) se sintetizó #19 (640 mg, cuantitativo), el cual fue utilizado en la siguiente etapa sin purificación adicional. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-
 5 d₆) δ 8.96-9.07 (br m, 1H), 8.89 (d, J=8.8 Hz, 1H), 7.87-8.00 (br m, 1H), 7.80 (d, J=3.2 Hz, 1H), 7.66 (d, J=3.3 Hz, 1H), 7.28-7.34 (m, 4H), 7.20-7.27 (m, 1H), 5.43 (ddd, J=11.3, 8.6, 4.2 Hz, 1H), 3.42-3.50 (m, 2H), 3.36 (s, 3H), 3.04-3.14 (br m, 1H), 2.99 (dd, J=14.2, 11.5 Hz, 1H), 2.92-3.02 (m, 1H), 2.78-2.88 (br m, 1H), 2.34-2.42 (m,
 10 1H), 1.73-1.84 (br m, 1H), 1.55-1.68 (m, 1H), 1.38-1.53 (m, 2H), 1.15 (d, J=6.9 Hz, 3H).

**Preparación de (2R,3R)-3-metoxi-2-metil-N-(2-feniletil)-3-[(2S)-pirrolidin-2-il]propantioamida, sal de clorhidrato (#23) y (2R,3R)-
 15 3-metoxi-2-metil-N-(2-feniletil)-3-[(2S)-pirrolidin-2-il]propanmida, sal de clorhidrato (#24)**



Etapa 1A. Síntesis de ter-butil (2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[(2-feniletil)amino]propil]pirrolidin-1-carboxilato (#20).
 20

A #11 (22 g, 77 mmol, 1 eq.) en diclorometano (383 mL, 0.2 M) y N,N-dimetilformamida (30 mL) se agregó diisopropiletilamina (26.9 mL, 153 mmol, 2 eq.), 2-feniletilamina (11.6 mL, 91.9 mmol, 1.2 eq.) y HATU (39.0 g, 99.5 mmol, 1.3 eq.). La
 5 reacción fue sometida a agitación durante 18 horas y después fue concentrada *in vacuo*. El residuo fue absorbido en acetato de etilo (700 mL) y lavado de manera secuencial con 1 M solución de ácido clorhídrico acuosa (2 x 200 mL) y salmuera. La capa orgánica fue secada sobre sulfato de sodio, filtrada y
 10 evaporada *in vacuo*. El material crudo fue absorbido en diclorometano y filtrado. El filtrado fue purificado mediante cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 0% hasta 100% acetato de etilo en heptano) para dar #20 (24 g, 80%) como un sólido blanquecino. LC-MS: *m/z* 392.2 [M+2H⁺], 291.1 [(M-
 15 Boc)+H⁺], tiempo de retención = 0.88 minutos; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆), suponiendo que es una mezcla de rotámeros: δ 7.80-7.89 (br m, 1H), 7.23-7.29 (m, 2H), 7.15-7.23 (m, 3H), 3.72-3.82 y 3.55-3.62 (2 br m, total 1H), 3.45-3.55 (br m, 1H), 3.31-3.44 (br m, 2H), 3.29 (s, 3H), 3.12-3.25 (br m, 1H), 2.98-
 20 3.12 (br m, 1H), 2.71 (t, J=7.1 Hz, 2H), 2.09-2.19 (m, 1H), 1.71-1.83 (br m, 2H), 1.60-1.70 (br m, 1H), 1.49-1.60 (br m, 1H), 1.41 (s, 9H), 1.03 (d, J=6.8 Hz, 3H).

Etapas 1B. Síntesis de dipiridinio-1-ilpentatiodifosfonato (#21). Se agregó pentasulfuro de fósforo (4.45 g, 2.19 mL, 20
 25 mmol, 1 eq.) a piridina (56 mL, 0.36 M) at 80 °C y la mezcla fue

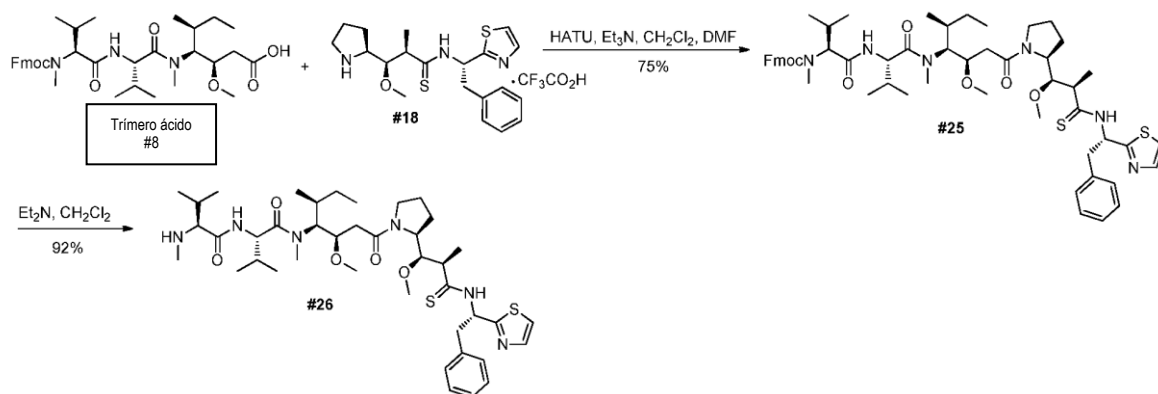
calentada a reflujo (115°C) durante 1 hora. La mezcla fue enfriada hasta temperatura ambiente y el producto fue recolectado mediante filtración para dar #21 como un sólido de color amarillo (4.57 g, 60%); mp: 165-167°C (descomposición); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-
 5 d₆) δ 8.78-8.84 (m, 4H), 8.22-8.30 (m, 2H), 7.76-7.83 (m, 4H).

Etapa 2A. Síntesis de ter-butil (2S)-2-((1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-[(2-feniletil)amino]-3-tioxopropil}pirrolidin-1-carboxilato
 (#22). Una mezcla de #20 (1.200 g, 3.073 mmol, 1 eq.) y #21 (1.40 g, 3.69 mmol, 1.2 eq.) en acetonitrilo (15 mL, 0.20 M) fue sometida a
 10 radiación de microondas a 100°C durante 30 minutos. La mezcla de reacción fue enfriada después hasta temperatura ambiente, diluida con acetato de etilo (150 mL), y lavada de manera secuencial con 0.5 M solución de ácido clorhídrico acuosa (100 mL) y salmuera (2 x 50 mL). La capa orgánica fue secada sobre sulfato de magnesio,
 15 filtrada, y concentrada *in vacuo*. El residuo fue purificado mediante cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 20% hasta 80% acetato de etilo en heptano) para dar #22 (670 mg, 54%) como un sólido similar a cera de color blanco; mp: 107-109°C; LC-MS: *m/z* 407.4 [M+H⁺], 351.3 [(M-2-metilprop-1-eno)+H⁺], 307.3 [(M-Boc)+H⁺], tiempo de
 20 retención = 0.99 minutos; ¹H NMR (400 MHz, CD₃CN), suponiendo que es una mezcla de rotámeros: δ 8.28 (br s, 1H), 7.19-7.33 (m, 5H), 3.81-4.05 (br m, 2H), 3.60-3.81 (br m, 2H), 3.38-3.51 (br m, 1H), 3.36 (s, 3H), 3.02-3.17 (br m, 1H), 2.89-3.02 (m, 2H), 2.50-2.62 (br m, 1H), 1.71-1.85 (br m, 2H), 1.53-1.66 (br m, 2H), 1.45 (br s, 9H),
 25 1.23 (d, J=6.7 Hz, 3H).

Etapas 3. Síntesis de (2R,3R)-3-metoxi-2-metil-N-(2-feniletil)-3-[(2S)-pirrolidin-2-il]propanamida, sal de clorhidrato (#23). De acuerdo con el procedimiento C, a partir de #22 (325 mg, 0.799 mmol, 1 eq.), dioxano (5 mL, 0.2 M) y una 4 M solución de ácido clorhídrico en dioxano (4 mL, 16 mmol, 20 eq.) se sintetizó #23 (274 mg, cuantitativo) como una espuma de color blanco; LC-MS: 308.2 [M+H⁺], tiempo de retención = 0.55 minutos.

Etapas 2B. Síntesis de (2R,3R)-3-metoxi-2-metil-N-(2-feniletil)-3-[(2S)-pirrolidin-2-il]propanamida, sal de clorhidrato (#24). A #20 (7.00 g, 17.9 mmol, 1 eq.) en dioxano (50 mL, 0.36 M) y metanol (2 mL) se agregó una 4 M solución de ácido clorhídrico en dioxano (20 mL, 80 mmol, 4.4 eq.). Después de ser sometida a agitación durante 18 horas, la mezcla fue concentrada para obtener #24 (5.86 g, cuantitativo) como una goma, la cual fue utilizada sin purificación adicional; LC-MS: 292.2 [M+H⁺], tiempo de retención = 0.47 minutos.

Preparación de N-Metil-L-valil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-{[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}-3-tioxopropil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida (#26)



Etapa 1. Síntesis de N-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil-N-metil-L-valil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-
5 {[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}-3-tioxopropil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida (#25)

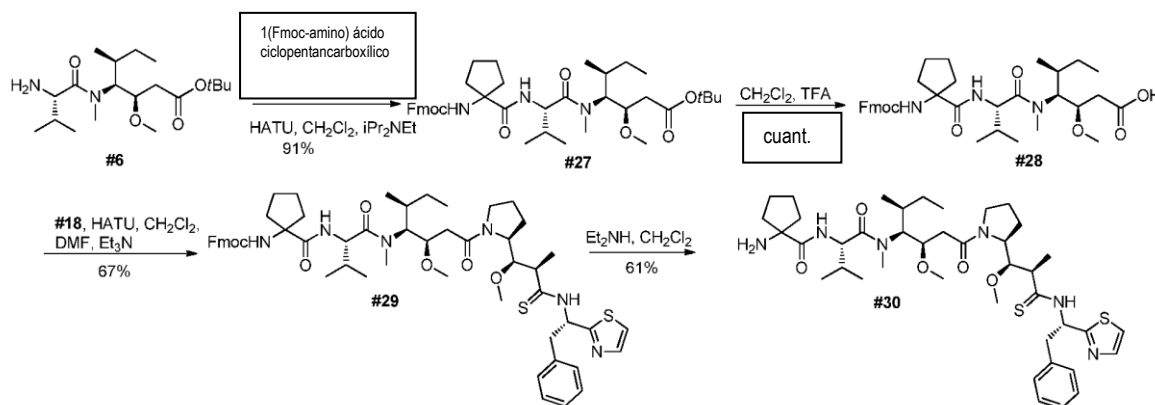
De acuerdo con el procedimiento general **D**, a partir de #8 (480 mg, 0.753 mmol, 1 eq.), diclorometano (10 mL, 0.07 M), N,N-dimetilformamida (2 mL), la amina **#18** (401 mg, 0.941 mmol, 1.25
10 eq.), HATU (372 mg, 0.979 mmol, 1.3 eq.) y trietilamina (367 μ L, 2.64 mmol, 3.5 eq.) se sintetizó el material deseado crudo, el cual fue purificado mediante cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 0% hasta 30% acetona en heptano) para obtener **#25** (711 mg, 75%) como un sólido. LC-MS: m/z 1009.7 $[M+H^+]$, tiempo de retención =
15 1.15 minutos; HPLC (Protocolo B): m/z 505.3 $[M+2^+]/2$, tiempo de retención = 10.138 minutos; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6), suponiendo que es una mezcla de rotámeros, señales características: δ [10.54 (br d, $J=8$ Hz) y 10.81 (br d, $J=8$ Hz), total 1H], 7.89 (br d, $J=7$ Hz, 2H), [7.80 (d, $J=3.3$ Hz) y 7.83 (d, $J=3.2$ Hz), total 1H], [7.64 (d, $J=3.2$ Hz) y 7.69 (d, $J=3.2$ Hz), total 1H], 7.62 (br d, $J=7$ Hz, 2H),
20 (d, $J=3.2$ Hz) y 7.69 (d, $J=3.2$ Hz), total 1H], 7.62 (br d, $J=7$ Hz, 2H),

7.37-7.44 (m, 2H), 7.28-7.35 (m, 4H), 7.20-7.27 (m, 2H), 7.12-7.18 (m, 1H), 6.27-6.35 y 6.40-6.48 (2 m, total 1H), [1.14 (d, J=6.4 Hz) y 1.17 (d, J=6.3 Hz), total 3H].

Etapas 2. Síntesis de N-metil-L-valil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}-3-tioxopropil]pirrolidin-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida (**#26**). De acuerdo con el procedimiento general A, a partir de **#25** (701 mg, 0.694 mmol) en diclorometano (10 mL, 0.07 M) y dietilamina (10 mL) se sintetizó el material deseado crudo, el cual fue purificado mediante cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 0% hasta 10% metanol en diclorometano) para dar un sólido similar a vidrio. Se agregaron éter dietílico y heptano y la mezcla fue concentrada *in vacuo*, produciendo **#26** (501 mg, 92%) como un sólido de color blanco. HPLC (Protocolo A): *m/z* 787.4 [M+H⁺], tiempo de retención = 7.229 minutos, (pureza > 97%); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆), suponiendo que es una mezcla de rotámeros, señales características: δ [10.54 (br d, J=8 Hz) y 10.81 (br d, J=8. Hz), total 1H], [7.99 (br d, J=9 Hz) y 8.00 (br d, J=9 Hz), total 1H], [7.80 (d, J=3.3 Hz) y 7.83 (d, J=3.3 Hz), total 1H], [7.65 (d, J=3.2 Hz) y 7.69 (d, J=3.3 Hz), total 1H], 7.29-7.34 (m, 2H), 7.19-7.28 (m, 2H), 7.13-7.19 (m, 1H), [6.31 (ddd, J=11, 8, 4.5 Hz) y 6.45 (ddd, J=11.5, 8, 4.5 Hz), total 1H], [4.57 (dd, J=8.9, 8.7 Hz) y 4.63 (dd, J=8.7, 8.7 Hz), total 1H], 3.16, 3.21, 3.24 y 3.25 (4 s, total 6H), 2.96 y 3.03 (2 br s,

total 3H), [1.14 (d, J=6.6 Hz) y 1.17 (d, J=6.4 Hz), total 3H].

Preparación de N²-[(1-Aminociclopentil)carbonil]-N-[3R,4S,5S]-3-metoxi-1-1(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-1[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}-3-tioxopropil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida (#30)



Etapas 1. Síntesis de ter-butil (3R,4S,5S)-4-[[N-[(1-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]amino}ciclopentil)carbonil-L-valil](metil)amino]-3-metoxi-5-metilheptanoato (#27). A #6 (287 mg, 0.801 mmol, 1 eq.) en diclorometano (4 mL, 0.2 M) se agregó ácido 1-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]amino}ciclopentancarboxílico (309 mg, 0.879 mmol, 1.1 eq.), diisopropiletilamina (281 µL, 1.60 mmol, 2 eq.) y HATU (376 mg, 0.960 mmol, 1.2 eq.). La mezcla fue sometida a agitación durante 18 horas y diluida con acetato de etilo (15 mL). La mezcla de reacción fue lavada con 1 M solución de ácido clorhídrico acuosa (2 x 5 mL) y con salmuera (5 mL). La capa orgánica fue secada sobre sulfato de sodio, filtrada, y concentrada *in vacuo*. El material crudo fue purificado mediante cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 0% hasta 60% acetato de etilo en heptano)

a fin de proporcionar #27 (502 mg, 91%) como una espuma de color blanco. LC-MS: m/z 692.3 $[M+H^+]$, 714.3 $[M+Na^+]$, 636.3 $[(M-2\text{-metilprop-1-eno})+H^+]$, tiempo de retención = 1.13 minutos; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6), señales características:

5 δ 7.89 (br d, $J=7.4$ Hz, 2H), 7.67-7.75 (m, 2H), 7.60 (br s, 1H), 7.38-7.44 (m, 2H), 7.30-7.36 (m, 2H), 7.21 (br d, $J=8.8$ Hz, 1H), 4.44-4.59 (m, 2H), 4.17-4.27 (m, 3H), 3.68-3.78 (br m, 1H), 3.21 (s, 3H), 2.88 (br s, 3H), 2.09-2.20 (m, 2H), 1.39 (s, 9H)

Etapa 2. Síntesis de ácido (3R,4S,5S)-4- $\{[N-[1-[(9H\text{-}$
 10 fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]amino}ciclopentil)carbonil-L-valil}(metil)amino]-3-metoxi-5-metilheptanóico (#28). A una solución de #27 (500 mg, 0.723 mmol) En diclorometano (7 mL, 0.1 M) se agregó ácido trifluoroacético (3 mL). Inicialmente la mezcla de reacción se tornó de color anaranjado,
 15 oscureciéndose después al paso del tiempo. Después de ser sometida a agitación durante 18 horas, se removió el solvente *in vacuo* para dar #28 (460 mg, cuantitativo) como un cristal de color café oscuro, el cual fue utilizado sin purificación adicional. LC-MS: m/z 636.3 $[M+H^+]$.

20 *Etapa 3.* Síntesis de N^2 - $\{[1-[(9H\text{-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]amino}ciclopentil)carbonil]-N-[(3R,4S,5S)\text{-}3\text{-metoxi-1-}\{(2S)\text{-}2[(1R,2R)\text{-}1\text{-metoxi-2-metil-3-}\{(1S)\text{-}2\text{-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}\text{-}3\text{-tioxopropil]pirrolidin-1-il}\text{-}5\text{-metil-1-oxoheptan-4-il}\text{-}N\text{-metil-L-valinamida (#29). De acuerdo con el$

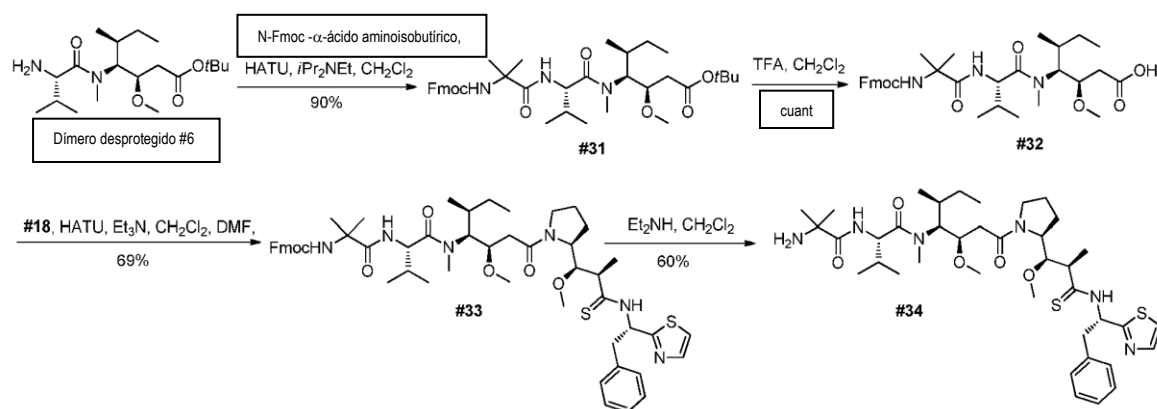
25 procedimiento general D, a partir de #28 (50 mg, 0.079 mmol, 1

eq.) diclorometano (3 mL, 0.03 M), N,N-dimetilformamida (0.5 mL), amina #18 (44 mg, 0.087 mmol, 1.1 eq.), trietilamina (33.0 μ L, 0.237 mmol, 3 eq.) y HATU (36 mg, 0.95 mmol, 1.2 eq.) se sintetizó el material deseado crudo, el cual fue purificado mediante cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 0% hasta 30% acetona en heptano) para dar #29 (59 mg, 67%) como un sólido. LC-MS: m/z 1007.5 $[M+H^+]$, tiempo de retención = 1.11 minutos; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6), suponiendo que es una mezcla de rotámeros, señales características: δ [10.54 (br d, $J=8$ Hz) y 10.80 (br d, $J=8$ Hz), total 1H], 7.89 (br d, $J=7$ Hz, 2H), [7.80 (d, $J=3.3$ Hz) y 7.82 (d, $J=3.1$ Hz), total 1H], 7.68-7.75 (m, 2H), [7.64 (d, $J=3.2$ Hz) y 7.68 (d, $J=3.2$ Hz), total 1H], 7.38-7.44 (m, 2H), 7.27-7.36 (m, 4H), 7.12-7.25 (m, 4H), [6.30 (ddd, $J=11, 8, 4.5$ Hz) y 6.39-6.48 (m), total 1H], [4.50 (br dd, $J=8, 8$ Hz) y 4.54-4.59 (m), total 1H], 4.17-4.29 (m, 3H), 2.89 y 2.96 (2 br s, total 3H), [1.13 (d, $J=6.5$ Hz) y 1.16 (d, $J=6.4$ Hz), total 3H].

Etapas 4. Síntesis de N^2 -[(1-aminociclopentil)carbonil]-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-{[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}-3-tioxopropil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida (#30). De acuerdo con el procedimiento general A, a partir de #29 (54 mg, 0.054 mmol) en diclorometano (6 mL, 5 0.9 mM) y dietilamina (4 mL) se sintetizó el material deseado crudo, el cual fue purificado mediante cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 0% hasta 10% metanol en diclorometano) para dar el ejemplo #30 (26 mg, 61%) como un sólido.

HPLC (Protocolo A): tiempo de retención = 7.233 minutos, m/z 785.4 $[M+H^+]$, (pureza > 72%). ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6), suponiendo que es una mezcla de rotámeros, señales características: δ [10.54 (br d, $J=8$ Hz) y 10.82 (br d, $J=8$ Hz), total 1H], 8.19-8.27 (m, 1H), [7.80 (d, $J=3.2$ Hz) y 7.83 (d, $J=3.2$ Hz), total 1H], [7.65 (d, $J=3.3$ Hz) y 7.69 (d, $J=3.3$ Hz), total 1H], 7.28-7.33 (m, 2H), 7.20-7.27 (m, 2H), 7.14-7.19 (m, 1H), [6.31 (ddd, $J=11, 8, 4.5$ Hz) y 6.44 (ddd, $J=11, 8, 4$ Hz), total 1H], [4.53 (dd, $J=9, 8$ Hz) y 4.60 (dd, $J=9, 7.5$ Hz), total 1H], 3.24 y 3.25 (2 s, total 3H), 3.17 y 3.21 (2 s, total 3H), 2.93 y 3.00 (2 br s, total 3H), [1.14 (d, $J=6.5$ Hz) y 1.17 (d, $J=6.5$ Hz), total 3H].

Preparación de 2-Metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-{[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil)amino}-3-tioxopropil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida (#34)



metilalanil-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-ter-butoxi-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-*N*-metil-L-valinamida (#31). A una solución de #6 (70% pura, 3.13 g, 6.1 mmol, 1 eq.) en diclorometano (40 mL, 0.15 M) se agregó *N*-[(9*H*-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-2-metilalanina (1.99 g, 6.12 mmol, 1 eq.), diisopropiletilamina (2.67 mL, 15.3 mmol, 2.5 eq.) y HATU (2.79 g, 7.35 mmol, 1.2 eq.). La mezcla de reacción fue sometida a agitación durante 18 horas, diluida con acetato de etilo, lavada con solución de ácido clorhídrico acuosa 1 M y lavada dos veces con salmuera. La capa orgánica fue secada sobre sulfato de sodio, filtrada, y concentrada *in vacuo* sobre sílice. El material fue purificado después mediante cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 0% hasta 45% acetato de etilo en heptano) a fin de proporcionar #31 (3.65 g, 90%) como un sólido. LC-MS: *m/z* 665.5 [M+H⁺], 688.5 [M+Na⁺], 610.5 [(M-2-metilprop-1-eno)+H⁺]; HPLC (Protocolo C): tiempo de retención = 9.455 (pureza > 94%); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), señales características: δ 7.89 (d, *J*=7.4 Hz, 2H), 7.67-7.74 (m, 2H), 7.39-7.48 (m, 3H), 7.31-7.36 (m, 2H), 7.29 (br d, *J*=8.8 Hz, 1H), 4.47-4.60 (br m, 1H), 4.47 (dd, *J*=8.6, 8.0 Hz, 1H), 4.18-4.28 (m, 3H), 3.69-3.79 (br m, 1H), 3.21 (s, 3H), 2.88 (br s, 3H), 2.15 (dd, *J*=15.5, 10.9 Hz, 1H), 1.91-2.01 (m, 1H), 1.67-1.81 (br m, 1H), 1.39 (s, 9H), 1.36 (br s, 3H), 1.30 (s, 3H), 0.75 (d, *J*=6.6 Hz, 3H), 0.66-0.73 (br m, 3H).

Etapas 2. Síntesis de *N*-[(9*H*-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-2-metilalanil-*N*-[(2*R*,3*S*,4*S*)-1-carboxi-2-metoxi-4-metilhexan-3-il]-*N*-metil-L-valinamida (#32). De acuerdo con el procedimiento general B,

a partir de #31 (500 mg, 0.751 mmol) en diclorometano (7 mL, 0.1 M) y ácido trifluoroacético (3 mL) se sintetizó #32 como un cristal (458 mg, cuantitativo), el cual fue utilizado en la siguiente etapa sin purificación adicional. LC-MS: m/z 611.4 [M+2H⁺], 632.2 [M+Na⁺], tiempo de retención = 0.94 minuto.

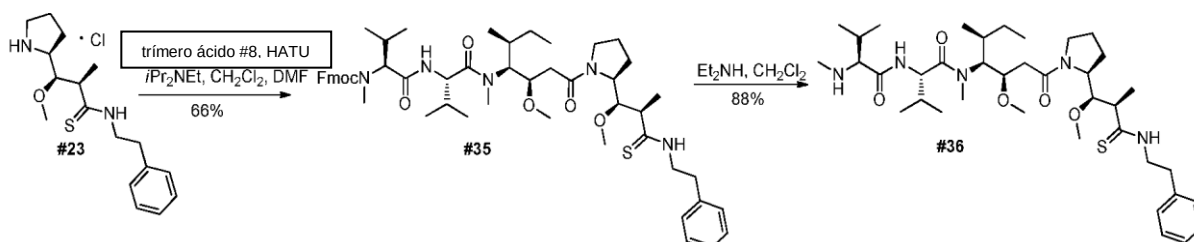
Etapas 3. Síntesis de N-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-2-metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}-3-tioxopropil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida (#33). De acuerdo con el procedimiento general D, a partir de #32 (53.0 mg, ≤ 0.083 mmol, 1 eq.), diclorometano (4 mL, 0.02 M), N,N-dimetilformamida (1 mL), amina #18 (43.8 mg, 0.0870 mmol, 1 eq.), trietilamina (36 μ L, 0.26 mmol, 3 eq.) y HATU (39.5 mg, 0.104 mmol, 1.2 eq.) se sintetizó el material crudo deseado, el cual fue purificado mediante cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 0% hasta 30% acetona en heptano) para dar #33 (60 mg, 69% durante dos etapas). LC-MS: m/z 981.4 [M+H⁺], tiempo de retención = 1.090 minutos; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆), suponiendo que es una mezcla de rotámeros, señales características: δ [10.54 (br d, J=8 Hz) y 10.80 (br d, J=8 Hz), total 1H], 7.86-7.91 (m, 2H), [7.80 (d, J=3.3 Hz) y 7.82 (d, J=3.3 Hz), total 1H], 7.68-7.74 (m, 2H), [7.64 (d, J=3.2 Hz) y 7.68 (d, J=3.3 Hz), total 1H], 7.38-7.44 (m, 2H), 7.20-7.36 (m, 6H), 7.12-7.17 (m, 1H), 6.27-6.34 y 6.40-6.47 (2 m, total 1H), 3.22 and 3.24 (2 s, total 3H), 3.14 y

3.18 (2 s, total 3H), 2.90 y 2.97 (2 br s, total 3H), 1.37 (br s, 3H), 1.31 (2 br s, total 3H), [1.13 (d, J=6.6 Hz) y 1.16 (d, J=6.5 Hz), total 3H].

*Etapa 4. Síntesis de 2-metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-
5 {(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}-3-tioxopropil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida (#34).* De acuerdo con el procedimiento general A, a partir de **#33** (55 mg, 0.055 mmol, 1 eq.) en diclorometano (6 mL, 0.009 M) y dietilamina (4 mL) se sintetizó el material crudo deseado, el cual fue purificado mediante cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 0% hasta 5% metanol en diclorometano) para dar **#34** (25
10 mg, 60%) como un sólido. HPLC (Protocolo A): *m/z* 759.4 [M+H⁺], tiempo de retención = 7.088 minutos, (pureza > 75%). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆), suponiendo que es una mezcla de rotámeros, señales características: δ [10.54 (br d, J=8 Hz) y 10.81 (br d, J=8
15 Hz), total 1H], 8.01-8.08 (m, 1H), [7.80 (d, J=3.1 Hz) y 7.83 (d, J=3.3 Hz), total 1H], [7.65 (d, J=3.2 Hz) y 7.69 (d, J=3.2 Hz), total 1H], 7.29-7.33 (m, 2H), 7.20-7.27 (m, 2H), 7.13-7.19 (m, 1H), 6.27-6.35 and 6.40-6.48 (2 m, total 1H), [4.49 (dd, J=9, 8 Hz) y 4.56 (dd, J=9, 8
20 Hz), total 1H], 3.24 y 3.25 (2 s, total 3H), 3.17 y 3.21 (2 s, total 3H), 2.92 and 2.99 (2 br s, total 3H), 1.20 y 1.21 (2 s, total 3H), 1.12 y 1.13 (2 s, total 3H), 0.75-0.81 (m, 3H).

**Preparación de N-metil-L-valil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-[(2S)-2-
25 {(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-[(2-feniletil)amino]-3-**

tioxopropil}pirrolidin-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il}-N-metil-L-valinamida (#36)



- 5 *Etapla 1.* Síntesis de N-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-N-metil-L-valil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-[(2-feniletil)amino]-3-tioxopropil}pirrolidin-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il}-N-metil-L-valinamida (#35). A una
- mezcla de **#23** (337 mg, 0.983 mmol, 1 eq.) en diclorometano (8
- 10 mL, 0.1 M) y *N,N*-dimetilformamida (1 mL) se agregó **#8** (564 mg, 0.885 mmol, 0.9 eq.), diisopropiletilamina (383 mg, 2.95 mmol, 3 eq.) y HATU (472 mg, 1.18 mmol, 1.2 eq.). Después de
- 2 horas, la mezcla fue diluida con diclorometano, lavada de manera secuencial con 0.1 M ácido clorhídrico acuoso y con
- 15 salmuera, secada sobre sulfato de magnesio, filtrada, y concentrada *in vacuo*. El residuo fue purificado mediante cromatografía de fase inversa (Método G) para dar **#35** (600 mg, 66%); LC-MS: *m/z* 926.6 [*M*+*H*⁺], tiempo de retención =
- 1.16 minutos; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), suponiendo que es
- 20 una mezcla de rotámeros, señales características: δ [9.94 (br t, *J*=5 Hz) y 10.16-10.23 (br m), total 1H], 7.90 (d, *J*=7.2 Hz, 2H), [7.71 (br d, *J*=7 Hz) y 8.06 (br d, *J*=8 Hz), total 1H], 7.60-7.65

(m, 2H), 7.41 (br dd, $J=7$, 7 Hz, 2H), 7.15-7.36 (m, 7H), 3.29 (s, 3H), 1.16-1.22 (m, 3H).

Etapas 2. Síntesis de N-metil-L-valil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3[(2-feniletil)aminol-3-tioxopropil]pirrolidin-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida (**#36**). De acuerdo con el procedimiento general A, a partir de #35 (465 mg, 0.502 mmol, 1 eq.) en diclorometano (5 mL, 0.1 M) y dietilamina (5 mL) se sintetizó el material crudo deseado, el cual fue purificado mediante cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 0% hasta 10% metanol en diclorometano) para dar #36 (310 mg, 88%) como un sólido. LC-MS: m/z 704.6 $[M+H^+]$, tiempo de retención = 0.74 minutos; HRMS: m/z calculado para $C_{38}H_{66}N_5O_5S$: 704.4779, encontrado: 704.477 $[M+H^+]$; ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD), suponiendo que es una mezcla de rotámeros, señales características:

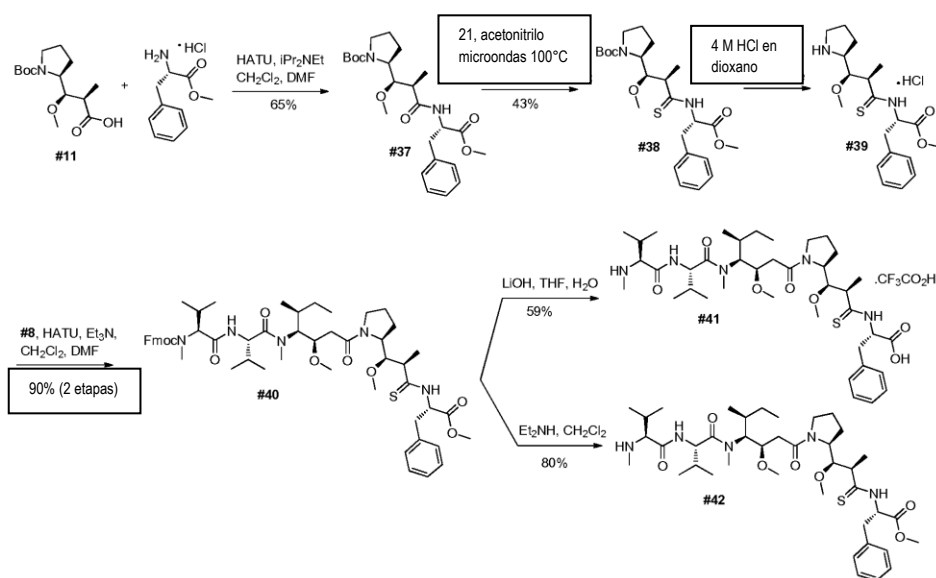
15 δ 7.23-7.30 (m, 4H), 7.15-7.22 (m, 1H), [4.68 (d, $J=8.6$ Hz) y 4.74 (d, $J=8.0$ Hz), total 1H], 3.39 y 3.40 (2 s, total 3H), 3.12 y 3.22 (2 br s, total 3H), [2.82 (d, $J=6.0$ Hz) y 2.84 (d, $J=6.0$ Hz), total 1H], 2.29 y 2.30 (2 s, total 3H), [1.27 (d, $J=6.8$ Hz) y 1.29 (d, $J=6.6$ Hz), total 3H], [0.84 (t, $J=7.4$ Hz) y 0.87 (t, $J=7.4$ Hz), total 3H].

20

Preparación de N-metil-L-valil-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[[[(1S)-1-carboxi-2-feniletil]amino]-1-metoxi-2-metil-3-tioxopropil]pirrolidin-1-il]-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinarnide, sal de ácido trifluoroacético (#41) y N-Metil-

25 **L-valil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-3-**

{[(2S)-1-metoxi-1-oxo-3-fenilpropan-2-il]amino}-2-metil-3-thioxopropil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il}-N-metil-L-valinamida (#42)



5

Etapa 1. Síntesis de metil N-{(2R,3R)-3-[(2S)-1-(ter-butoxicarbonil)pirrolidin-2-il]-3-metoxi-2-metilpropanoil}-L-fenilalaninato (#37). A una mezcla de #11 (2.7 g, 9.4 mmol, 1 eq.) en diclorometano (30 mL, 0.3 M) y N,N-dimetilformamida (3 mL) se agregó diisopropiletilamina (3.30 mL, 18.8 mmol, 2 eq.), clorhidrato de L-fenilalanina metil éster (2.03 g, 9.40 mmol, 1.2 eq.) y HATU (4.79 g, 12.2 mmol, 1.3 eq.). La reacción fue sometida a agitación durante 18 horas y después concentrada *in vacuo*. El residuo fue absorbido en acetato de etilo (100 mL) y lavado de manera secuencial con 1 M ácido clorhídrico (2 x 50 mL) y salmuera. La capa orgánica fue secada sobre sulfato de sodio, filtrada y evaporada *in vacuo*. El material crudo fue absorbido en diclorometano y filtrado. El filtrado fue purificado

mediante cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 0% hasta 100% acetato de etilo en heptano) para dar #37 (2.76 g, 65%) como un sólido blanquecino. LC-MS: m/z 449.3 [M+H⁺], 349.2 [(M-Boc)+H⁺] tiempo de retención = 0.88 minutos; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆), suponiendo que es una mezcla de rotámeros, señales características:

5 δ 8.28 (d, J=8.2 Hz, 1H), 7.14-7.29 (m, 5H), 4.50 (ddd, J=10.9, 8.1, 4.4 Hz, 1H), 3.64 (s, 3H), 3.23 (s, 3H), 2.15-2.24 (m, 1H), 1.56-1.76 (m, 2H), 1.31-1.55 (m, 11H), 1.02 (d, J=6.6 Hz, 3H).

Etapas 2. Síntesis de metil N-{(2R,3R)-3-[(2S)-1-(ter-
10 butoxicarbonil)pirrolidin-2-il]-3-metoxi-2-metilpropanetioil}-L-
fenilalaninato (#38). Una mezcla de #37 (1.52 g, 3.39 mmol, 1 eq.) y #21 (1.68 g, 4.41 mmol, 1.3 eq.) en acetonitrilo (12 mL, 0.28 M) fue sometida a radiación de microondas a 100°C durante 1 hora. La mezcla fue particionada agua y acetato de etilo. La capa acuosa fue
15 re-extraída con acetato de etilo. Las capas orgánicas combinadas fueron lavadas con solución de ácido cítrico acuoso al 10% y con salmuera, secada sobre sulfato de sodio, filtrada, y concentrada *in vacuo*. El material fue disuelto en una pequeña cantidad de acetato de etilo y concentrado sobre sílice *in vacuo*. La purificación mediante
20 cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 0% hasta 30% acetato de etilo en heptano) produjo #38 (680 mg, 43%); LC-MS: m/z 465.2 [M+H⁺], 487.3 [M+Na⁺], 365.2 [(M-Boc)+H⁺], tiempo de retención = 0.97 minutos; HPLC (Protocolo B): 465.2 [M+H⁺], 487.2 [M+Na⁺], 365.2 [(M-Boc)+H⁺], tiempo de retención = 7.444 minutos (pureza >
25 98%); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆), suponiendo que es una mezcla

de rotámeros, señales características: δ 10.23 (br d, $J=7.5$ Hz, 1H), 7.17-7.28 (m, 5H), 5.24 (ddd, $J=11, 7.5, 4.5$ Hz, 1H), 3.66 (s, 3H), 3.28 (s, 3H), 3.21 (dd, $J=14.3, 4.4$ Hz, 1H), 3.07 (dd, $J=14.2, 11.2$ Hz, 1H), 2.65-2.74 (m, 1H), 1.54-1.71 (m, 2H),
 5 1.37 (s, 9H), 1.17 (d, $J=6.4$ Hz, 3H).

Etapa 3. Síntesis de metil N-[(2R,3R)-3-metoxi-2-metil-3-[(2S)-pirrolidin-2-il]propanetiol]-L-fenilalaninato, sal de clorhidrato (#39). De acuerdo con el procedimiento general C, a 0°C a partir de #38 (660 mg, 1.42 mmol, 1 eq.), dioxano (10 mL,
 10 0.14 M) y solución de 4 M ácido clorhídrico en dioxano (20 mL, 80 mmol, 60 eq.) se sintetizó #39 (590 mg) como un sólido blanquecino, el cual fue utilizado en la siguiente etapa sin purificación adicional. LC-MS: m/z 365.2 $[M+H^+]$, tiempo de retención = 0.58 minutos; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.67
 15 (d, $J=7.7$ Hz, 1H), 9.429.54 (br m, 1H), 8.21-8.33 (br m, 1H), 7.20-7.35 (m, 5H), 5.25 (ddd, $J=11.1, 7.6, 4.4$ Hz, 1H), 3.76 (dd, $J=8.9, 3.0$ Hz, 1H), 3.68 (s, 3H), 3.39 (s, 3H), 3.24 (dd, $J=14.2, 4.5$ Hz, 1H), 3.13 (dd, $J=14.3, 11.0$ Hz, 1H), 2.93-3.09 (m, 3H), 2.85-2.93 (m, 1H), 1.72-1.84 (m, 1H), 1.36-1.60 (m,
 20 3H), 1.22 (d, $J=6.6$ Hz, 3H).

Etapa 4. Síntesis de N-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-N-metil-L-valil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-3-[(2S)-1-metoxi-1-oxo-3-fenilpropan-2-il]amino}-2-metil-3-tioxopropil]pirrolidin-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-
 25 metil-L-valinamida (#40). De acuerdo con el procedimiento

general D, a partir de #8 (247 mg, 0.387 mmol, 1 eq.), #39 (186 mg, <0.450 mmol, 1.2 eq.), diclorometano (10 mL, 0.04 M), N,N-dimetilformamida (2 mL), HATU (176 mg, 0.464 mmol, 1.2 eq.) y trietilamina (189 uL, 1.35 mmol, 3.5 eq.) se sintetizó el material
 5 deseado crudo, el cual fue purificado mediante cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 0% hasta 25% acetona en heptano) para dar #40 (410 mg, 90% durante 2 etapas) como un sólido blanquecino. LC-MS: m/z 984.7 [M+H⁺], 1006.7 [M+Na⁺], tiempo de retención = 1.15 minutos; HPLC (Protocolo C): tiempo de retención = 9.683 minutos
 10 (pureza > 99%); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆), suponiendo que es una mezcla de rotámeros, señales características: δ [10.19 (br d, J=7 Hz) y 10.49 (br d, J=8 Hz), total 1H], 7.90 (d, J=7.5 Hz, 2H), 7.60-7.65 (m, 2H), 7.38-7.45 (m, 2H), 7.29-7.35 (m, 2H), 7.14-7.28 (m, 5H), [5.20 (ddd, J=11, 7, 4 Hz) y 5.35-5.43 (m), total 1H], 3.65 y 3.69
 15 (2 s, total 3H), [1.15 (d, J=6.5 Hz) y 1.18 (d, J=6.4 Hz), total 3H].

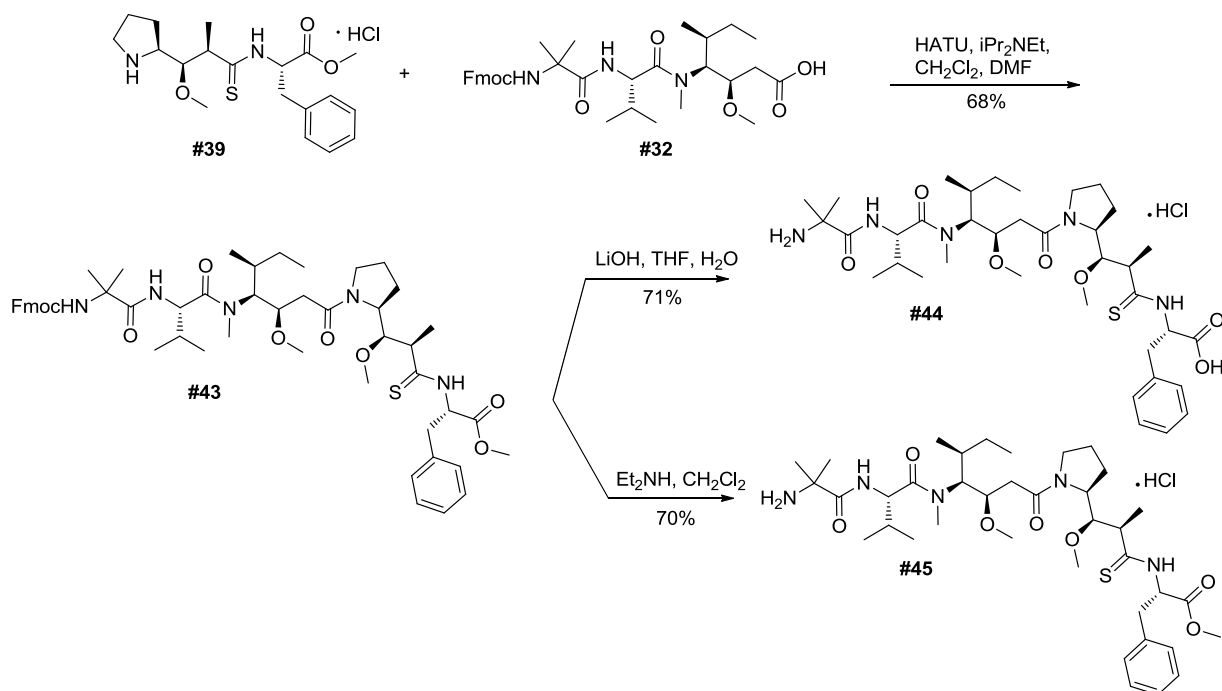
Etapas 5A. Síntesis de N-metil-L-valil-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1S)-1-carboxi-2-feniletil]amino]-1-metoxi-2-metil-3-tioxopropil]pirrolidin-1-il]-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida, sal de ácido trifluoroacético (#41). A una solución de
 20 #40 (401 mg, 0.407 mmol, 1 eq.) en tetrahidrofurano (10 mL, 0.03 M) se agregó una solución de hidróxido de litio (24.4 mg, 1.02 mmol, 2.5 eq.) en agua (5 mL). Después de 4 horas, la reacción fue concentrada *in vacuo* y después formada en azeotropo tres veces con heptano. El material crudo fue disuelto en sulfóxido de dimetilo (7
 25 mL) y purificado mediante cromatografía de fase inversa (Método C,

7 inyecciones de 1 mL). Las fracciones apropiadas fueron concentradas (Genevac) antes de ser diluidas con una pequeña cantidad de metanol en diclorometano. La mezcla fue concentrada *in vacuo* hasta un sólido similar a vidrio. Se
 5 agregó después éter de dietilo, seguido por heptano, y la mezcla fue concentrada *in vacuo* para obtener #41 (180 mg, 59%) como un sólido de color blanco. LC-MS: m/z 748.6 [M+H], tiempo de retención = 0.68 minutos; HPLC (Protocolo A): 748.4 [M+H⁺], tiempo de retención = 6.922 minutos; ¹H NMR (400
 10 MHz, DMSO-d₆), suponiendo que es una mezcla de rotámeros, señales características: δ 12.9 y 13.1 (2 v br s, total 1H), [10.12 (br d, J=8 Hz) y 10.45 (br d, J=8 Hz), total 1H], 8.75-8.90 (m, 2H), 8.62-8.73 (br m, 1H), 7.13-7.29 (m, 5H), [5.20 (ddd, J=11, 7.5, 4 Hz) y 5.40 (ddd, J=11.5, 8, 4 Hz), total 1H],
 15 4.55-4.73 (m, 2H), 3.23 y 3.25 (2 s, total 3H), 3.16 y 3.18 (2 s, total 3H), 2.97 y 3.01 (2 br s, total 3H), 1.13-1.20 (m, 3H), 0.73-0.81 (m, 3H).

Etapa 5B. Síntesis de N-metil-L-valil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-3-[(2S)-1-metoxi-1-oxo-3-
 20 fenilpropan-2-il]amino}-2-metil-3-tioxopropil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida (#42). De acuerdo con el procedimiento general A, a partir de #40 (561 mg, 0.570 mmol, 1 eq.), diclorometano (30 mL, 0.057 M) y dietilamina (10 mL) se sintetizó #42 (348 mg, 80%) como un sólido de color
 25 blanco después de cromatografía en gel de sílice (Gradiente:

0% hasta 10% metanol en diclorometano). LC-MS: m/z 762.7 [M+H⁺], tiempo de retención = 0.74 minutos; HPLC (Protocolo A): 762.4 [M+H⁺], tiempo de retención = 7.315 minutos (pureza > 95%); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆), suponiendo que es una mezcla de rotámeros, 5 señales características: δ [10.20 (br d, J=7.5 Hz) y 10.50 (br d, J=8 Hz), total 1H], 7.95-8.03 (m, 1H), 7.15-7.29 (m, 5H), [5.20 (ddd, J=11, 7.5, 5 Hz) y 5.39 (ddd, J=11, 7.5, 4 Hz, total 1H], [4.57 (dd, J=8.8, 8.7 Hz) y 4.61 (dd, J=8.7, 8.6 Hz), total 1H], 3.65 y 3.69 (2 s, total 3H), 3.24 y 3.25 (2 s, total 3H), 3.16 y 3.17 (2 s, total 3H), 2.96 10 y 2.99 (2 br s, total 3H), 2.69-2.79 (m, 1H), 2.62-2.68 (m, 1H), 2.14 y 2.15 (2 br s, total 3H), [1.15 (d, J=6.6 Hz) y 1.18 (d, J=6.5 Hz), total 3H], [0.75 (t, J=7.4 Hz) y 0.76 (t, J=7.3 Hz), total 3H].

**Preparación de 2-Metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-1-(2S)-2-[(1R,2R)-3-
15 {[(1S)-1-carboxi-2-feniletil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-
tiooxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-
metil-L-valinamida, sal de clorhidrato (#44) y 2-metilalanil-N-
[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-3-{[(2S)-1-
metoxi-1-oxo-3-fenilpropan-2-il]amino}-2-metil-3-thiooxopropil]
20 pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida, sal
de clorhidrato (#45)**



Etapas 1. Síntesis de N-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-2-metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-3-[[{(2S)-1-metoxi-1-oxo-3-fenilpropan-2-il]amino}-2-metil-3-tioxopropil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida (#43). A una solución de #32 (321 mg, 0.881 mmol, 1 eq.) en diclorometano (5 mL, 0.1 M) y N,N-dimetilformamida (1 mL) se agregó #39 (484 mg, <0.769 mmol, 0.9 eq.), HATU (353 mg, 0.881 mmol, 1 eq.) y diisopropiletilamina (463 μL , 2.64 mmol, 3 eq.). Después de ser sometida a agitación durante 18 horas, la mezcla fue diluida con diclorometano, lavada con agua y con salmuera, secada sobre sulfato de magnesio, filtrada, y concentrada sobre sílice *in vacuo*. El residuo fue purificado mediante cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 0% hasta 30% acetona en heptano) para dar #43 (574 mg, 68% durante dos etapas) como un sólido de color blanco. LC-MS:

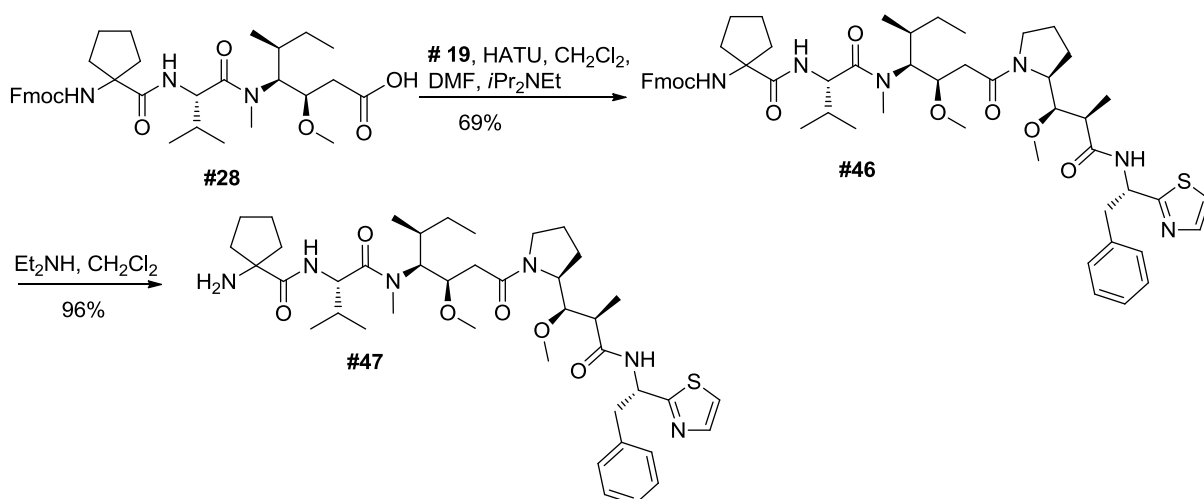
m/z 956.6 $[M+H^+]$, tiempo de retención = 4.49 minutos; ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD), suponiendo que es una mezcla de rotámeros, señales características: δ 7.80 (d, $J=7.5$ Hz, 2H), 7.64-7.72 (m, 2H), 7.16-7.35 (m, 7H), [5.43 (dd, $J=11$, 4.5 Hz) y 5.58 (dd, $J=11.5$, 4 Hz), total 1H], 3.72 y 3.75 (2 s, total 3H), 3.34 y 3.35 (2 s, total 3H), 3.26 y 3.29 (2 s, total 3H), 3.05 y 3.11 (2 br s, total 3H), 1.39 y 1.40 (2 s, total 3H), [1.24 (d, $J=6.7$ Hz) y 1.29 (d, $J=6.4$ Hz), total 3H].

Etapas 2A. Síntesis de 2-metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1S)-1-carboxi-2-feniletil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-tioxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida, sal de clorhidrato (#44). A una solución de #43 (100 mg, 0.105 mmol, 1 eq.) en tetrahidrofurano (5 mL, 0.02 M) se agregó una solución de hidróxido de litio (10 mg, 0.417 mmol, 3 eq.) en agua (3 mL). Después de 3 horas, la reacción fue concentrada *in vacuo* y purificada mediante cromatografía de fase inversa (Método C) para dar una sal de ácido trifluoroacético, la cual fue disuelta en metanol, tratada con una solución de 4 M ácido clorhídrico en dioxano, y concentrada *in vacuo* para dar #44 (56 mg, 71%) como un sólido de color blanco. LC-MS: m/z 720.6 $[M+H^+]$, tiempo de retención = 0.67 minutos; HPLC (Protocolo D): tiempo de retención = 8.851 minutos; ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD), suponiendo que es una mezcla de rotámeros, señales características: δ 7.17-7.31 (m, 5H), 3.34 y 3.35 (2 s, total 3H), 3.10 y 3.16 (2 br s, total 3H), 1.62 y 1.64 (2 s, total 3H), 1.53 y 1.55 (2 s, total 3H), [1.26 (d, $J=6.5$ Hz) y 1.30 (d, $J=6.5$ Hz), total 3H], 0.84-0.91 (m, 3H).

Etapas 2B. Síntesis de 2-metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-3-[(2S)-1-metoxi-1-oxo-3-fenilpropan-2-il]amino}-2-metil-3-tioxopropil]pirrolidin-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida, sal de clorhidrato (#45). De acuerdo con el procedimiento general A, a partir de #43 (176 mg, 0.184 mmol, 1 eq.), diclorometano (4 mL, 0.05 M) y dietilamina (4 mL) se sintetizó el material deseado crudo, el cual fue purificado mediante cromatografía de fase inversa (Método C). La sal de ácido trifluoroacético resultante fue disuelta en metanol, tratada con una solución 4 M de ácido clorhídrico en dioxano, y concentrada *in vacuo* para dar **#45** (100 mg, 70%) como un sólido de color blanco. LC-MS: *m/z* 734.6 [M+H⁺], tiempo de retención = 0.72 minutos; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD), suponiendo que es una mezcla de rotámeros, señales características: δ 7.18-7.31 (m, 5H), 5.41-5.47 y 5.55-5.62 (2 m, total 1H), 3.73 y 3.76 (2 s, total 3H), 3.35 y 3.36 (2 s, total 3H), 3.10 y 3.15 (2 br s, total 3H), 1.62 y 1.64 (2 s, total 3H), 1.53 y 1.55 (2 s, total 3H), [1.25 (d, J=6.6 Hz) y 1.29 (d, J=6.5 Hz), total 3H], 0.84-0.91 (m, 3H).

20

Preparación de N²-[(1-Aminociclopentil)carbonil]-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}propil]pirrolidin-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida (#47)



Etapa 1. Síntesis de N²-[(1-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]amino}cyclopentil)-carbonil]-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-{[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}propil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida (#46).

A una solución de **#19** (353 mg, 0.944 mmol, 1 eq.) en diclorometano (10 mL, 0.094 M) se agregó **#28** (600 mg, 0.944 mmol, 0.9 eq.), diisopropiletilamina (498 uL, 2.83 mmol, 3 eq.) y HATU (444 mg, 1.13 mmol, 1.2 eq.). Después de ser sometida a agitación durante dos días, la mezcla fue concentrada *in vacuo* y el residuo fue diluido con acetato de etilo (60 mL), lavada con 1 M solución de ácido clorhídrico acuosa y con salmuera, secada sobre sulfato de sodio, filtrada, y concentrada *in vacuo*. El residuo fue diluido con diclorometano y filtrado. El filtrado fue concentrado bajo presión reducida sobre sílice y purificado mediante cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 40% hasta 100% acetato de etilo en heptano) para dar **#46** (644 mg, 69%) como un sólido de color blanco. LC-MS: *m/z* 991.8 [M+HI, tiempo de retención = 1.07 minutos; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆), suponiendo que es una mezcla de

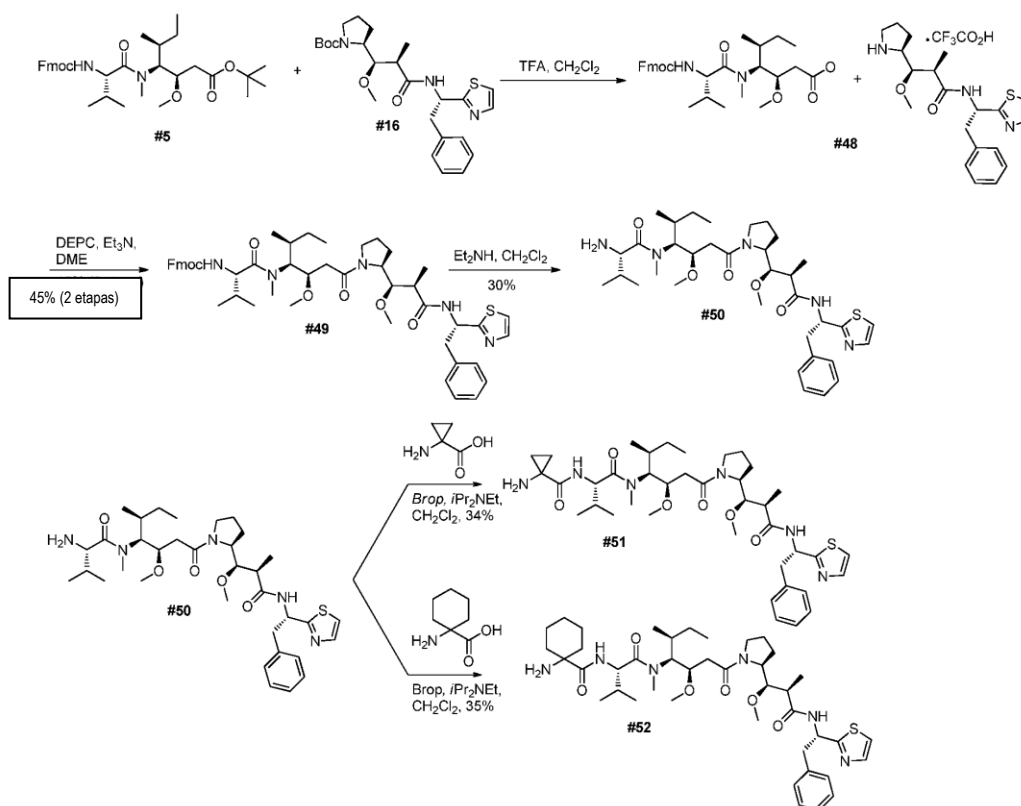
rotámeros, señales características: δ 7.89 (br d, $J=7.4$ Hz, 2H), [7.77 (d, $J=3.3$ Hz) y 7.79 (d, $J=3.3$ Hz), total 1H], 7.66-7.76 (m, 2H), [7.62 (d, $J=3.3$ Hz) y 7.65 (d, $J=3.3$ Hz), total 1H], 7.37-7.44 (m, 2H), 7.11-7.36 (m, 7H), [5.38 (ddd, $J=11, 8, 4$ Hz) y 5.48-5.57 (m), total 1H], 3.13, 3.17, 3.18 y 3.24 (4 s, total 6H), 2.90 y 3.00 (2 br s, total 3H), [1.05 (d, $J=6.6$ Hz) y 1.09 (d, $J=6.8$ Hz), total 3H].

Etapas 2. Síntesis de N^2 -[(1-aminociclopentil)carbonil]-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[[[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}propil]pirrolidin-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida (#47). A una mezcla de #46 (500 mg, 0.504 mmol, 1 eq.) en tetrahidrofurano (8 mL, 0.06 M) se agregó dietilamina (4 mL). Después de ser sometida a agitación durante 18 horas, la mezcla de reacción fue concentrada *in vacuo* y el residuo fue purificado mediante cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 0% hasta 10% metanol en diclorometano) para dar #47 (374 mg, 96%) como un sólido de color blanco. LC-MS: m/z 769.6 $[M+H^+]$, tiempo de retención = 0.70 minutos; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6), suponiendo que es una mezcla de rotámeros, señales características: δ [8.64 (br d, $J=8.4$ Hz) y 8.87 (br d, $J=8.6$ Hz), total 1H], [8.22 (br d, $J=9.4$ Hz) y 8.26 (br d, $J=9.4$ Hz), total 1H], [7.77 (d, $J=3.3$ Hz) y 7.80 (d, $J=3.3$ Hz), total 1H], [7.63 (d, $J=3.1$ Hz) y 7.66 (d, $J=3.3$ Hz), total 1H], 7.13-7.31 (m, 5H), [5.39 (ddd, $J=11.1, 8.5, 4.2$ Hz) y 5.54 (ddd, $J=11.7, 8.8, 4.1$

Hz), total 1H], [4.53 (dd, J=9.2, 7.6 Hz) y 4.64 (dd, J=9.2, 6.6 Hz), total 1H], 3.16, 3.20, 3.21 y 3.25 (4 s, total 6H), 2.93 y 3.03 (2 br s, total 3H), [1.05 (d, J=6.8 Hz) y 1.10 (d, J=6.6 Hz), total 3H], 0.73-0.80 (m, 3H).

5

Preparación de N²-[(1-Aminociclopropil)carbonil]-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-{[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}propil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida (#51) y 1-amino-N-[(2S)-1-{[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-{[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}propil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il](metil)amino}-3-metil-1-oxobutan-2-il]ciclohexancarboxamida (#52)



Etapas 1. Síntesis de (2R,3R)-3-metoxi-2-metil-N-[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]-3-[(2S)-pirrolidin-2-il]propanamida, sal de ácido trifluoroacético y ácido (3R,4S,5S)-4-[(N-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-L-valil](metil)amino)-3-metoxi-5-metilheptanóico (#48). A una solución de #16 (1.0 g, 2.11 mmol, 1 eq.) y #5 (1.22 g, 2.11 mmol, 1 eq.) en diclorometano (20 mL, 0.1 M) a 0°C se agregó ácido trifluoroacético (6 mL). Después de 3 horas, la mezcla fue concentrada *in vacuo* para dar la mezcla #48 (1.8 g), la cual fue utilizada en la siguiente etapa sin purificación adicional; LC-MS (Protocolo K): *m/z* 374.2 [M+H⁺], tiempo de retención = 2.093 minutos, 525.2 [M+H⁺], tiempo de retención = 4.875 minutos.

Etapas 2. Síntesis de N²-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino]propil]pirrolidin-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida (#49). A una solución de #48 (1.8 g, ≤2.1 mmol, 1 eq.) y dietil cianofosfonato (DEPC) (0.51 g, 3.2 mmol, 1.5 eq.) en 1,2-dimetoxietano (30 mL, 0.07 M) a 0°C se agregó trietilamina (1.47 mL, 10.6 mmol, 5 eq.). Después de ser sometida a temperatura ambiente durante 2 horas, la mezcla fue concentrada *in vacuo* y el residuo fue purificado mediante cromatografía en gel de sílice (10% hasta 50% acetato de etilo en éter de petróleo) para dar #49 (0.8 g, 45%). R_f 0.6 (10% metanol en diclorometano); LC-MS (Protocolo K): *m/z* 881.3

[M+H⁺], 903.3 [M+Na⁺], tiempo de retención = 4.837 minutos.

Etapa 3. Síntesis de *N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-metoxi-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-{[(1*S*)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}propil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-*N*-metil-*L*-valinamida (#50). De acuerdo con el procedimiento general A, a partir de #49 (0.70 g, 0.79 mmol, 1 eq.), diclorometano (15 mL, 0.05 M) y dietilamina (10 mL) se sintetizó #50 (160 mg, 30%) después de la purificación mediante cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 0% hasta 5% metanol en diclorometano). *R*_f 0.4 (10% metanol en diclorometano); LC-MS (Protocolo K): *m/z* 658.3 [M+H⁺], 680.3 [M+Na⁺], tiempo de retención = 2.760 minutos.

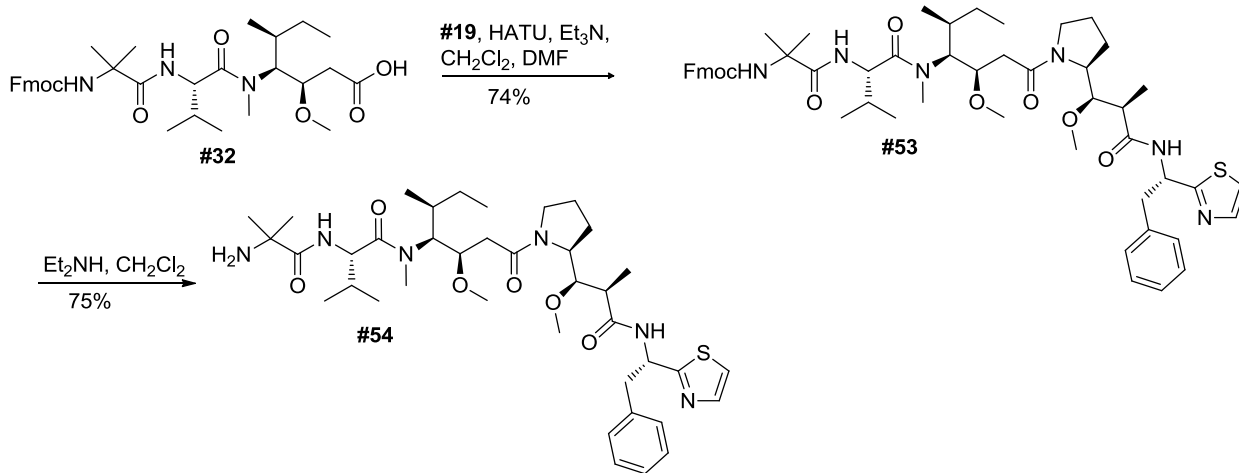
Etapa 4A. Síntesis de *N*²-[(1-aminociclopropil)carbonil]-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-metoxi-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-{[(1*S*)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}propil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-*N*-metil-*L*-valinamida (#51). A una solución de #50 (100 mg, 0.15 mmol, 1 eq.), hexafluorofosfato de bromotris(dimetilamino)fosfonio (Brop, 70 mg, 0.18 mmol, 1.2 eq.) y diisopropiletilamina (0.08 mL, 0.45 mmol, 3 eq.) en diclorometano (15 mL, 0.01 M) a 0°C se agregó ácido 1-aminociclopropancarboxílico (18 mg, 0.18 mmol, 1.2 eq.). Después de 2 horas, la mezcla fue apagada con agua y extraída dos veces con acetato de etilo. Las capas orgánicas combinadas fueron secadas sobre sulfato de sodio, filtradas, y concentradas *in vacuo*. El residuo fue purificado mediante cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 0% hasta 5% metanol en diclorometano) para dar #51 (45 mg, 34%). *R*_f 0.5 (10%

metanol en diclorometano). LC-MS (Protocolo L): m/z 741.44 [M+H⁺]; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆), suponiendo que es una mezcla de rotámeros, señales características: δ [8.64 (br d, J=8 Hz) y 8.88 (br d, J=8 Hz), total 1H], [8.16 (br d, J=9 Hz) y 8.22 (br d, J=10 Hz), total 1H], [7.77 (d, J=3.5 Hz) y 7.79 (d, J=3.5 Hz), total 1H], [7.63 (d, J=3.5 Hz) y 7.65 (d, J=3 Hz), total 1H], 7.10-7.32 (m, 5H), 5.33-5.60 (m, 1H), 3.16, 3.20, 3.21 y 3.26 (4 s, total 6H), 2.93 y 3.02 (2 br s, total 3H), [1.05 (d, J=6.3 Hz) y 1.10 (d, J=6.3 Hz), total 3H].

10 *Etapas 4B.* Síntesis de 1-amino-N-[(2S)-1-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}propil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il](metil)amino}-3-metil-1-oxobutan-2-il]ciclohexancarboxamida (#52). A una solución de #50 (120 mg, 0.18 mmol, 1 eq.), Brop (84 mg, 0.21 mmol, 1.2 eq.) y diisopropiletilamina (0.1 mL, 0.54 mmol, 3 eq.) en diclorometano (15 mL, 0.009 M) a 0°C se agregó ácido 1-aminociclohexancarboxílico (31 mg, 0.21 mmol, 1.2 eq.). Después de 2 horas, la mezcla fue apagada con agua y extraída dos veces con acetato de etilo. Las capas orgánicas combinadas fueron secadas sobre sulfato de sodio, filtradas, y concentradas *in vacuo*. El residuo fue purificado mediante cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 0% hasta 5% metanol en diclorometano) para dar #52 (50 mg, 35%). R_f 0.6 (10% metanol en diclorometano). LC-MS (Protocolo K): m/z 783.79

[M+H⁺]; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆), suponiendo que es una mezcla de rotámeros, señales características: δ [8.64 (br d, J=8 Hz) y 8.87 (br d, J=9 Hz), total 1H], 8.18-8.28 (m, 1H), [7.77 (d, J=3.5 Hz) y 7.80 (d, J=3.3 Hz), total 1H], [7.63 (d, J=3.3 Hz) y 7.66 (d, J=3.3 Hz), total 1H], 7.12-7.31 (m, 5H), 5.35-5.43 y 5.49- 5.57 (2 m, total 1H), 3.16, 3.19, 3.21 y 3.25 (4 s, total 6H), 2.93 y 3.02 (2 br s, total 3H), [1.05 (d, J=6.8 Hz) y 1.10 (d, J=6.8 Hz), total 3H].

10 **Preparación de 2-Metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-{[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}propil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-vanilamida (#54)**



15 **Etapas 1. Síntesis de N-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-2-metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-{[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}propil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida (#53). De acuerdo con el procedimiento general D, a**

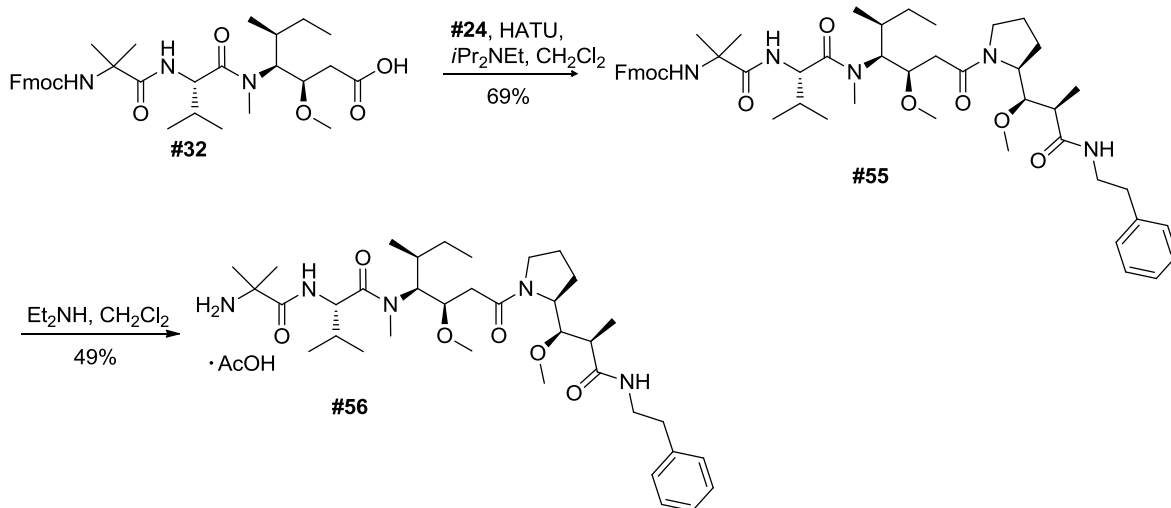
partir de #32 (2.05 g, 2.83 mmol, 1 eq.) en diclorometano (20 mL, 0.1 M) y N,N-dimetilformamida (3 mL), la amina #19 (2.5 g, 3.4 mmol, 1.2 eq.), HATU (1.29 g, 3.38 mmol, 1.2 eq.) y trietilamina (1.57 mL, 11.3 mmol, 4 eq.) se sintetizó el material
 5 deseado crudo, el cual fue purificado mediante cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 0% hasta 55% acetona en heptano), produciendo #53 (2.42 g, 74%) como un sólido. LC-MS: m/z 965.7 $[M+H^+]$, 987.6 $[M+Na^+]$, tiempo de retención = 1.04 minutos; HPLC (Protocolo A): m/z 965.4 $[M+H^+]$, tiempo de
 10 retención = 11.344 minutos (pureza > 97%); ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6), suponiendo que es una mezcla de rotámeros, señales características: δ 7.86-7.91 (m, 2H), [7.77 (d, $J=3.3$ Hz) y 7.79 (d, $J=3.2$ Hz), total 1H], 7.67-7.74 (m, 2H), [7.63 (d, $J=3.2$ Hz) y 7.65 (d, $J=3.2$ Hz), total 1H], 7.38-7.44 (m, 2H),
 15 7.30-7.36 (m, 2H), 7.11-7.30 (m, 5H), [5.39 (ddd, $J=11.4$, 8.4, 4.1 Hz) y 5.52 (ddd, $J=11.7$, 8.8, 4.2 Hz), total 1H], [4.49 (dd, $J=8.6$, 7.6 Hz) y 4.59 (dd, $J=8.6$, 6.8 Hz), total 1H], 3.13, 3.17, 3.18 y 3.24 (4 s, total 6H), 2.90 y 3.00 (2 br s, total 3H), 1.31 y 1.36 (2 br s, total 6H), [1.05 (d, $J=6.7$ Hz) y 1.09 (d, $J=6.7$ Hz),
 20 total 3H].

Etapas 2. Síntesis de 2-metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}propil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida (#54)

25 De acuerdo con el procedimiento general A, a partir de

#53 (701 mg, 0.726 mmol) en diclorometano (10 mL, 0.07 M) se sintetizó el material deseado crudo, el cual fue purificado mediante cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 0% hasta 10% metanol en diclorometano). El residuo fue diluido con éter dietílico y heptano y
 5 fue concentrado *in vacuo* para obtener #54 (406 mg, 75%) como un sólido de color blanco. LC-MS: m/z 743.6 $[M+H^+]$, tiempo de retención = 0.70 minutos; HPLC (Protocolo A): m/z 25 743.4 $[M+H^+]$, tiempo de retención = 6.903 minutos, (pureza > 97%); ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6), suponiendo que es una mezcla de rotámeros,
 10 señales características: δ [8.64 (br d, $J=8.5$ Hz) y 8.86 (br d, $J=8.7$ Hz), total 1H], [8.04 (br d, $J=9.3$ Hz) y 8.08 (br d, $J=9.3$ Hz), total 1H], [7.77 (d, $J=3.3$ Hz) y 7.80 (d, $J=3.2$ Hz), total 1H], [7.63 (d, $J=3.3$ Hz) y 7.66 (d, $J=3.2$ Hz), total 1H], 7.13-7.31 (m, 5H), [5.39 (ddd, $J=11, 8.5, 4$ Hz) y 5.53 (ddd, $J=12, 9, 4$ Hz), total 1H], [4.49
 15 (dd, $J=9, 8$ Hz) y 4.60 (dd, $J=9, 7$ Hz), total 1H], 3.16, 3.20, 3.21 y 3.25 (4 s, total 6H), 2.93 y 3.02 (2 br s, total 3H), 1.21 (s, 3H), 1.13 y 1.13 (2 s, total 3H), [1.05 (d, $J=6.7$ Hz) y 1.10 (d, $J=6.7$ Hz), total 3H], 0.73-0.80 (m, 3H).

20 **Preparación de 2-Metilalanil-N-1(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-[(2S)-2-1(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[(2-feniletil)amino]propil}pirrolidin-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il}-N-metil-L-valinamida, sal de ácido acético (#56)**

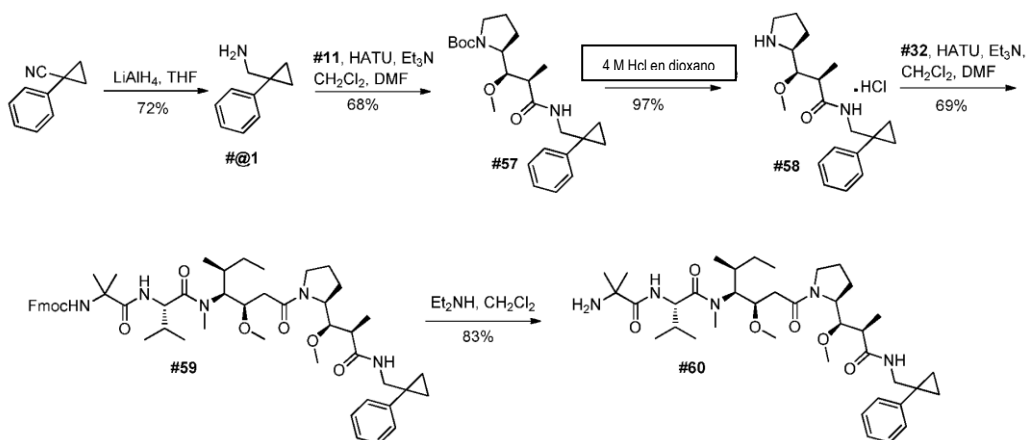


Etapa 1. Síntesis de *N*-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-2-metilalanil-*N*-{(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[(2-feniletil)amino]propil]pirrolidin-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il}-*N*-metil-L-valinamida (**#55**). A una solución de **#24** (104 mg, 0.256 mmol, 1 eq.) en diclorometano (10 mL, 0.094 M) se agregó **#32** (156 mg, 0.256 mmol, 0.9 eq.), diisopropiletilamina (135 μ L, 0.768 mmol, 3 eq.) y HATU (120 mg, 0.307 mmol, 1.2 eq.). Después de ser sometida a agitación durante 18 horas, la mezcla fue concentrada *in vacuo* y el residuo fue diluido con acetato de etilo (10 mL), lavado con solución 1 M de ácido clorhídrico acuosa (2 x 5 mL) y con salmuera, secado sobre sulfato de sodio, filtrado, y concentrado *in vacuo*. El residuo fue diluido con diclorometano y filtrado. El filtrado fue concentrado bajo presión reducida sobre sílice y purificado mediante cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 0% hasta 100% acetato de etilo en heptano) para dar **#55** (44 mg, 19%) como un sólido de color blanco. LC-

MS: m/z 884.5 $[M+2H^+]$, tiempo de retención = 1.04 minutos.

Etapa 2. Síntesis de 2-metilalanil-N-{(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[(2-feniletil)amino]propil]pirrolidin-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il}-N-metil-L-valinamida, sal de ácido acético (**#56**). A una mezcla de **#55** (44 mg, 0.050 mmol, 1 eq.) en tetrahidrofurano (1 mL, 0.05 M) se agregó dietilamina (0.5 mL). Después de ser sometida a agitación durante 18 horas, la mezcla de reacción fue concentrada *in vacuo* y el residuo fue purificado mediante cromatografía de fase inversa (Método B) para dar **#56** (16.2 mg, 49%) como un sólido. LC-MS: m/z 660.8 $[M+H^+]$, tiempo de retención = 2.23 minutos; HPLC (Protocolo A): m/z 660.5 $[M+H^+]$, 682.4 $[M+Na^+]$, tiempo de retención = 6.865 minutos.

Preparación de 2-Metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[(1-fenilciclopropil)metil]amino}propil]pirrolidin-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-vanilamida (#60**)**



Etapa 1. Síntesis de 1-(1-fenilciclopropil)metanamina #@1. A

una solución de 1-fenilciclopropancarbonitrilo (50 g, 0.34 mol, 1 eq.) en tetrahidrofurano (500 mL, 0.7 M) a 0°C se agregó hidruro de litio-aluminio (23 g, 0.35 mol, 1.03 eq.). La mezcla de reacción fue sometida a agitación a 0°C durante una hora y después a reflujo durante una hora. La mezcla de reacción fue enfriada después y apagada con agua (23 mL) y una solución de hidróxido de sodio acuosa al 15% (69 mL).

La mezcla fue filtrada y concentrada *in vacuo* para obtener #@1 (36 g, 72%). LC-MS: m/z 148.1 $[M+H^+]$, tiempo de retención = 0.86 minutos; ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.2-7.4 (m, 5H), 2.78 (s, 2H), 1.19 (br s, 2H), 0.72-0.84 (m, 4H).

Etapas 2. Síntesis de ter-butil (2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[(1-fenilciclopropil)metil]amino}propil]pirrolidin-1-carboxilato (#57). De acuerdo con el procedimiento general **D**, a partir de #11 (2.15 g, 7.48 mmol, 1.1 eq.) en diclorometano (20 mL, 0.3 M) y *N,N*-dimetilformamida (4 mL), 1-(1-fenilciclopropil)metanamina #@1 (1.001 g, 6.799 mmol, 1 eq.), HATU (3.10 g, 8.16 mmol, 1.2 eq.) y trietilamina (2.84 mL, 20.4 mmol, 3 eq.) se sintetizó el material deseado crudo, el cual fue purificado mediante cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 0% hasta 100% acetato de etilo en heptano), produciendo #57 (1.93 g, 68%) como un sólido. HPLC (Protocolo A a 45°C): m/z 417.3 $[M+H^+]$, tiempo de retención = 10.575 minutos; ^1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$), suponiendo que es una mezcla de rotámeros: δ 7.75-7.81 (m, 1H), 7.20-7.27 (m,

4H), 7.12- 7.19 (m, 1H), 3.33-3.62 y 3.71-3.80 (br multipletos, total 4H), 3.28 (s, 3H), 2.97-3.17 (br m, 2H), 2.14-2.24 (m, 1H), 1.67-1.80 (br m, 2H), 1.45-1.65 (m, 2H), 1.41 (s, 9H), 1.00 (d, J=6.6 Hz, 3H), 0.67-0.93 (m, 4H).

5 *Etap*a 3. Síntesis de (2R,3R)-3-metoxi-2-metil-N-[(1-fenilciclopropil)metil]-3-[(2S)-pirrolidin-2-il]propanamida, sal de clorhidrato (#58). De acuerdo con el procedimiento general C, a partir de #57 (566 mg, 1.36 mmol, 1 eq.) en dioxano (4 mL, 0.3 M) y solución de 4 M ácido clorhídrico en dioxano (4 mL, 16 mmol, 11.7
10 eq.) se sintetizó #58 (466 mg, 97%); LC-MS: *m/z* 318.2 [M+H⁺], 339.2 [M+Na⁺], tiempo de retención = 0.56 minuto; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9.53 (br s, 1H), 8.48 (br s, 1H), 8.11 (br dd, J=5.7, 5.6 Hz, 1H), 7.23-7.30 (m, 4H), 7.14-7.21 (m, 1H), 3.58 (dd, J=7.5, 3.9 Hz, 1H), 3.50 (dd, J=13.7, 6.3 Hz, 1H), 3.34 (s, 3H), 3.21-3.29 (br m, 1H), 3.18 (dd, J=13.8, 5.0 Hz, 1H), 3.04-3.13 (br m, 2H), 2.42-2.50
15 (m, 1H), 1.56-1.89 (m, 4H), 1.04 (d, J=6.9 Hz, 3H), 0.71-0.91 (m, 4H).

*Etap*a 4. Síntesis de N-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-2-metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-
20 metil-3-oxo-3-[(1-fenilciclopropil)metil]amino}propil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida (#59). De acuerdo con el procedimiento general D, a partir de #32 (550 mg, 0.902 mmol, 1 eq.), #58 (350 mg, 0.992 mmol, 1.1 eq.) diclorometano (10 mL, 0.08 M) y *N,N*-dimetilformamida (2 mL), HATU (446 mg, 1.17 mmol, 1.3
25 eq.) y trietilamina (0.503 mL, 3.61 mmol, 4 eq.) se sintetizó el

material deseado crudo, el cual fue purificado mediante cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 0% hasta 30% acetona en heptano), produciendo #59 (618 mg, 69%) como un sólido blanquecino. LC-MS: m/z 908.7 $[M+H^+]$, 930.7 $[M+Na^+]$, tiempo de retención = 1.07 minutos; HPLC (Protocolo B a 45°C): m/z 908.5 $[M+H^+]$, tiempo de retención = 8.721 minutos (pureza > 97%); ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6), suponiendo que es una mezcla de rotámeros, señales características: δ 7.89 (d, $J=7.5$ Hz, 2H), 7.38-7.44 (m, 2H), 7.30-7.36 (m, 2H), [4.49 (dd, $J=8.5$, 7.8 Hz) y 4.59 (dd, $J=8.7$, 6.9 Hz), total 1H], 4.18-4.26 (m, 3H), 3.93-4.01 (br m, 1H), 3.23 y 3.26 (2 s, total 3H), 3.16 y 3.16 (2 s, total 3H), 2.91 y 3.05 (2 br s, total 3H), 1.36 y 1.37 (2 br s, total 3H), 1.30 y 1.32 (2 br s, total 3H), [1.00 (d, $J=6.7$ Hz) y 1.02 (d, $J=6.6$ Hz), total 3H], 0.67-0.78 (m, 7H).

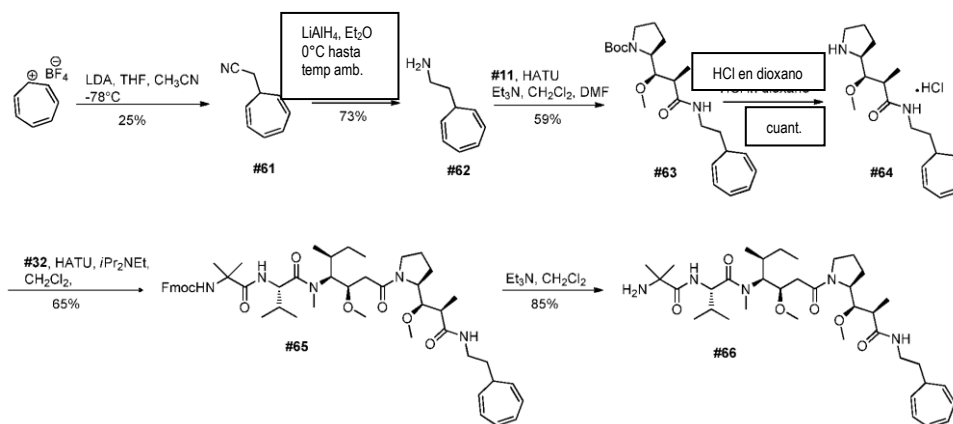
15 *Etapas 5. Síntesis de 2-metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-((2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[(1-fenilciclopropil)metil]amino}propil]pirrolidin-1-il)-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida (#60).* De acuerdo con el procedimiento general A, a partir de #59 (605 mg, 0.666 mmol, 1 eq.) diclorometano (10 mL, 0.067 M) y dietilamina (10 mL) se sintetizó #60 (379 mg, 83%); HPLC (Protocolo A a 45°C) m/z 685.5 $[M+H^+]$, tiempo de retención = 7.072 minutos; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6), suponiendo que es una mezcla de rotámeros, señales características: δ [8.03 (br d, $J=9.6$ Hz) y 8.07 (br d, $J=9.4$ Hz), total 1H], [7.74 (br dd, $J=7$, 4 Hz) y 7.99

20

25

(br dd, $J=5.9, 5.7$ Hz), total 1H], 7.20-7.27 (m, 4H), 7.11-7.17 (m, 1H), [4.49 (dd, $J=9, 7$ Hz) y 4.58 (dd, $J=9, 7.5$ Hz), total 1H], 3.96-4.04 (br m, 1H), 3.24 y 3.27 (2 s, total 3H), 3.18 y 3.19 (2 s, total 3H), 2.93 y 3.07 (2 br s, total 3H), 1.20 y 1.21 (2 s, total 3H), 1.12 y 1.14 (2 s, total 3H), [1.00 (d, $J=6.7$ Hz) y 1.03 (d, $J=6.7$ Hz), total 3H].

Preparación de 2-Metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[2-(ciclohepta-2,4,6-trien-1-il)etil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-vanilamida (#66)



Etapas 1. Síntesis de ciclohepta-2,4,6-trien-1-ilacetronitrilo (#61). A una solución de acetonitrilo anhidro (3.12 mL, 56.2 mmol, 1 eq.) en tetrahidrofurano (281 mL, 0.2 M) se agregó litio diisopropilamina (1.8 M en heptano/etilbenceno/tetrahidrofurano, 31.2 mL, 56.2 mmol, 1 eq.) a -78°C. Después de 20 minutos a -78°C, se agregó tetrafluoroborato de tropilio (10 g, 56 mmol, 1 eq.). Después de 10 minutos, la reacción fue concentrada *in vacuo* y el residuo fue diluido con acetato de etilo y lavado con agua. La capa

orgánica fue secada sobre sulfato de sodio, filtrada, y concentrada *in vacuo* a fin de proporcionar un aceite de color café, el cual fue purificado mediante cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 0% hasta 10% acetato de etilo en heptano) a fin de proporcionar #61 (1.88 g, 25%) como un aceite de color amarillo. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 6.69-6.71 (m, 2H), 6.27-6.32 (m, 2H), 5.28-5.33 (m, 2H), 2.61 (d, $J=7.2$ Hz, 2H), 2.26-2.34 (m, 1H).

Etapas 2. Síntesis de 2-(ciclohepta-2,4,6-trien-1-il)etanamina (#62). A una suspensión de hidruro de litio-aluminio (911 mg, 24.0 mmol, 1.4 eq.) en éter dietílico anhidro (75 mL, 0.23 M) a 0°C se agregó lentamente a través de goteo durante 15 minutos, una solución de #61 (2.25 g, 17.2 mmol, 1 eq.) en éter dietílico (15 mL). La reacción fue calentada hasta temperatura ambiente. Después de 5 horas, la reacción fue enfriada hasta 0°C y apagada mediante la adición de agua (1 mL), después filtrada a través de una pequeña almohadilla de Celite y lavada con metanol. El filtrado fue secado sobre sulfato de sodio, filtrado y concentrado *in vacuo* a fin de proporcionar #62 (1.683 g, 73%) como un aceite de color dorado. LC-MS: m/z 136.1 $[\text{M}+\text{H}^+]$, tiempo de retención = 0.23 minutos; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 6.64-6.67 (m, 2H), 6.16-6.21 (m, 2H), 5.16-5.21 (m, 2H), 2.84-2.89 (m, 2H), 1.86-1.92 (m, 2H), 1.62-1.70 (m, 1H).

Etapas 3. Síntesis de ter-butil (2S)-2-[(1R,2R)-3-[[2-

(ciclohepta-2,4,6-trien-1-il)etil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-carboxilato (#63). A una solución de #11 (3.57 g, 12.4 mmol, 1 eq.) en diclorometano (100 mL, 0.1 M) y *N,N*-dimetilformamida (4 mL) se agregó HATU (5.36 g, 13.7 mmol, 1.1 eq.). Después de 20 minutos, se agregó trietilamina (5.20 mL, 37.3 mmol, 3 eq.), seguida por #62 (1.68 g, 12.4 mmol, 1 eq.), y la mezcla fue sometida a agitación durante 18 horas. La reacción fue concentrada *in vacuo* y el residuo fue absorbido en acetato de etilo y lavado con agua (50 mL). La capa acuosa fue re-extraída con acetato de etilo (3 veces) y las capas orgánicas combinadas fueron secadas, filtradas, y concentradas *in vacuo* a fin de proporcionar un aceite de color café, el cual fue purificado mediante cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 0% hasta 100% acetato de etilo en heptano) a fin de proporcionar #63 (2.95 g, 59% de rendimiento) como un aceite viscoso. LC-MS: *m/z* 405.4 [*M*+*H*⁺], 427.4 [*M*+*Na*⁺], tiempo de retención = 0.75 minutos; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), suponiendo que es una mezcla de rotámeros: δ 6.63-6.68 (m, 2H), 6.16-6.23 (m, 2H), 5.19 (br dd, *J*=9.0, 5.8 Hz, 2H), 3.51-3.63 y 3.71-3.90 (2 br multipletos, total 3H), 3.42 (s, 3H), 3.18-3.29 y 3.34-3.47 (2 br multipletos, total 3H), 2.27-2.45 (br m, 1H), 1.6-2.00 (m, 7H), 1.47 y 1.50 (2 br s, total 9H), 1.16-1.29 (br m, 3H).

Etapas 4. Síntesis de (2R,3R)-N-[2-(ciclohepta-2,4,6-trien-1-il)etil]-3-metoxi-2-metil-3-[(2*S*)-pirrolidin-2-il]propanamida, sal de clorhidrato (#64)

El intermediario #63 (400 mg, 0.989 mmol, 1 eq.) fue tratado

con una 4 M solución de ácido clorhídrico en dioxano (10 mL, 40 mmol, 40 eq.). Después de 1 hora, la mezcla de reacción fue concentrada *in vacuo* y el residuo fue absorbido en diclorometano y lavado con 1 M solución de hidróxido de sodio.

5 La capa acuosa fue re-extraída con diclorometano y las capas orgánicas combinadas fueron secadas sobre sulfato de sodio, filtradas, y concentradas *in vacuo* a fin de proporcionar #64 (301 mg, cuantitativo) como un aceite de color café, el cual empezó a solidificarse lentamente en reposo. LC-MS: *m/z* 305.3

10 $[M+H^+]$, tiempo de retención = 0.54 minutos; HPLC (Protocolo G): tiempo de retención = 4.848 minutos; ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$), señales características: δ 6.64-6.67 (m, 2H), 6.16-6.22 (m, 2H), 6.08-6.14 (br m, 1H), 5.16-5.22 (m, 2H), 3.44 (s, 3H), 3.31 (dd, $J=6.3, 4.5$ Hz, 1H), 2.98-3.04 (m, 1H), 2.94 (ddd,

15 $J=10.5, 7.2, 5.6$ Hz, 1H), 2.81 (ddd, $J=10.5, 7.7, 6.7$ Hz, 1H), 2.57 (qd, $J=7.1, 4.5$ Hz, 1H), 1.90-1.97 (m, 2H), 1.49-1.55 (m, 1H), 1.18 (d, $J=7.1$ Hz, 3H).

Etapas 5. Síntesis de N-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-2-metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[[2-(ciclohepta-

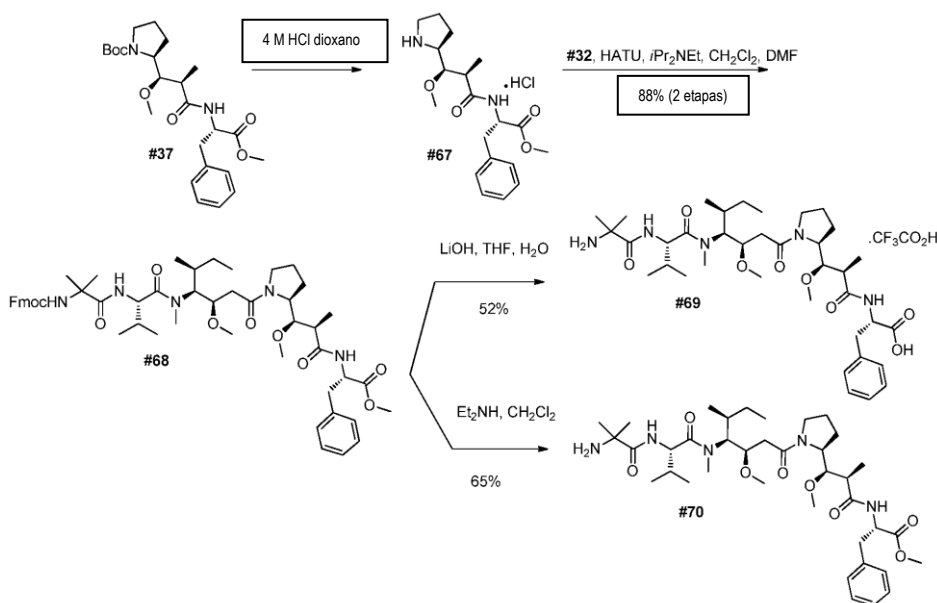
20 *2,4,6-trien-1-il)etil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il]-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida (#65).* De acuerdo con el procedimiento general D, a partir de #32 (678 mg, 0.937 mmol, 1 eq.) en diclorometano (9.37 mL, 0.1 M), la amina #64 (300 mg, 0.985

25 mmol, 1.1 eq.), HATU (427 mg, 1.12 mmol, 1.2 eq.) y

diisopropiletilamina (494 μ L, 2.81 mmol, 3 eq.) se sintetizó el material deseado crudo, el cual fue purificado mediante cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 0% hasta 50% acetona en heptano), produciendo #65 (546 mg, 65%) como un sólido. LC-MS:
 5 m/z 896.7 [M+H]⁺, 918.7 [M+Na]⁺, tiempo de retención = 1.06 minutos.

Etapa 6. Síntesis de 2-metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[[2-(ciclohepta-2,4,6-trien-1-il)etil]amino]-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il]-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-
 10 metil-L-valinamida (#66). A una solución de #65 (540 mg, 0.603 mmol, 1 eq.) en diclorometano (10 mL, 0.06 M) se agregó trietilamina (10 mL) y la mezcla de reacción fue sometida a agitación durante 2 horas. La mezcla fue concentrada *in vacuo* y el residuo fue purificado mediante cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 0% hasta 10%
 15 metanol en diclorometano) para dar #66 (347 mg, 85%) como un sólido incoloro. HPLC (Protocolo A a 45°C): m/z 674.5 [M+H]⁺, tiempo de retención = 7.015 minutos. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆), suponiendo que es una mezcla de rotámeros, señales características: δ [8.03 (br d, J=9 Hz) y 8.05 (br d, J=9 Hz), total 1H], [7.77 (br dd, J=5.5, 5.5 Hz) y 7.98 (br dd, J=5.5, 5.5 Hz), total 1H], 6.54-6.65 (m, 2H), 6.10-6.19 (m, 2H), 5.11-5.19 (m, 2H), [4.48 (dd, J=9, 8 Hz) y 4.54 (dd, J=9, 7.5 Hz), total 1H], 3.94-4.04 (br m, 1H), 3.26 y 3.29 (2 s, total 3H), 3.17 y 3.19 (2 s, total 3H), 2.93 y 3.06 (2 br s, total 3H), 1.20 y 1.21 (2 s, total 3H), 1.12 y 1.13 (2 s, total 3H), [1.04 (d, J=6.8
 20 Hz) y 1.07 (d, J=6.7 Hz), total 3H].

Preparación de 2-Metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-
 {[(1S)-1-carboxi-2-feniletil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-
 oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-
 5 metil-L-valinamida (#69) y 2-metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-
 {(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-3-{[(2S)-1-metoxi-1-oxo-3-fenilpropan-2-
 il]amino}-2-metil-3-oxopropil] pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-
 4-il]-N-metil-L-valinamida (#70)



10 *Etapa 1.* Síntesis de metil N-{(2R,3R)-3-metoxi-2-metil-3-
 [(2S)-pirrolidin-2-il]propanoil}-L-fenilalaninato, sal de
 clorhidrato (#67). De acuerdo con el procedimiento general C, a
 partir de #37 (2.39 g, 5.33 mmol, 1 eq.), dioxano (10 mL, 0.53
 M) y una solución de 4 M ácido clorhídrico en dioxano (10 mL,
 15 40 mmol, 7.5 eq.) se sintetizó #67 (2.21 g) como un sólido de
 color blanco, el cual fue utilizado en la siguiente etapa sin
 purificación adicional. LC-MS: m/z 349.2 [M+H⁺], tiempo de

retención = 0.53 minutos; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.45-9.58 (br m, 1H), 8.63 (d, $J=8.1$ Hz, 1H), 8.51-8.62 (br m, 1H), 7.25-7.33 (m, 4H), 7.18-7.25 (m, 1H), 4.50 (ddd, $J=10.8, 8.1, 4.5$ Hz, 1H), 3.65 (s, 3H), 3.54 (dd, $J=6.8, 4.5$ Hz, 1H), 3.20 (s, 3H), 3.11 (dd, $J=13.8, 4.5$ Hz, 1H), 2.99-3.14 (br m, 3H), 2.89 (dd, $J=13.8, 10.9$ Hz, 1H), 2.44-2.50 (m, 1H, asumido; parcialmente oscurecido por solvente pico), 1.77-1.89 (m, 1H), 1.60-1.73 (m, 2H), 1.46-1.57 (m, 1H), 1.05 (d, $J=6.8$ Hz, 3H).

Etapas 2. Síntesis de N-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-2-metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-3-[[2S)-1-metoxi-1-oxo-3-fenilpropan-2-il]amino]-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida (#68). De acuerdo con el procedimiento general D, a partir de #32 (353 mg, 0.488 mmol, 1 eq.) en diclorometano (10 mL, 0.04 M), amina #67 (271 mg, ≤ 0.588 mmol, 1.3 eq.), HATU (223 mg, 0.586 mmol, 1.2 eq.) y diisopropiletilamina (238 μL , 1.71 mmol, 3.5 eq.) se sintetizó el material deseado crudo, el cual fue purificado mediante cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 0% hasta 40% acetona en heptano), obteniendo #68 (404 mg, 88% en dos etapas) como un sólido. LC-MS: m/z 940.7 $[\text{M}+\text{H}^+]$, 962.7 $[\text{M}+\text{Na}^+]$, tiempo de retención = 1.04 minutos; HPLC (Protocolo C): tiempo de retención = 9.022 minutos; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6), suponiendo que es una mezcla de rotámeros, señales características: δ [8.25 (br d, $J=8$ Hz) y 8.48 (br d, $J=8$ Hz), total 1H], 7.89 (d, $J=7.4$ Hz, 2H), 7.67-7.75 (m, 2H), 7.38-7.44 (m, 2H), 7.31-7.36 (m, 2H), 7.14-7.24 (m, 5H), 4.43-

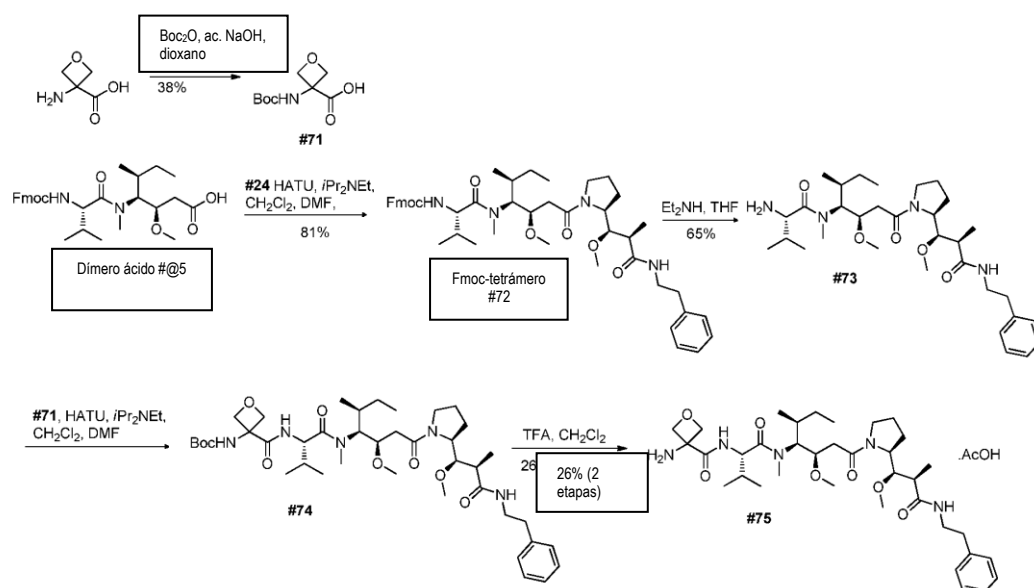
4.69 (m, 3H), 4.17-4.26 (m, 3H), 3.91-3.99 (br m, 1H), 3.63 y 3.65 (2 s, total 3H), 3.19 y 3.24 (2 s, total 3H), 3.14 y 3.15 (2 s, total 3H), 2.90 y 2.99 (2 br s, total 3H), 1.36 y 1.37 (2 br s, total 3H), 1.30 y 1.32 (2 s, total 3H), [1.02 (d, J=6.8 Hz) y 1.06 (d, J=6.6 Hz), total 3H].

Etapa 3A. Síntesis de 2-metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1S)-1-carboxi-2-feniletil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida, sal de ácido trifluoroacético (#69). A una solución de #68 (143 mg, 0.152 mmol, 1 eq.) en tetrahidrofurano (5 mL, 0.02 M) se agregó una solución de hidróxido de litio (9.10 mg, 0.378 mmol, 2.5 eq.) en agua (3 mL). Después de 5 horas, la reacción fue concentrada in vacuo, formada como azeotropo tres veces con heptano, disuelta en dimetil sulfóxido (2.2 mL) y purificada mediante cromatografía de fase inversa (Método C) para dar #69 (56 mg, 52%). HPLC (Protocolo A a 45°C): 704.4 [M+H⁺], tiempo de retención = 6.623 minutos; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆), suponiendo que es una mezcla de rotámeros, señales características: δ 8.08-8.22 y 8.37-8.49 (2 m, total 5H), 7.12-7.28 (m, 5H), 3.18, 3.20 y 3.24 (3 s, total 6H), 2.95 y 3.04 (2 br s, total 3H), 1.52 y 1.53 (2 s, total 3H), 1.39 y 1.41 (2 s, total 3H), [1.02 (d, J=6.8 Hz) y 1.05 (d, J=6.6 Hz), total 3H], 0.74-0.81 (m, 3H).

Etapa 3B. Síntesis de 2-metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-3-[(2S)-1-metoxi-1-oxo-3-

fenilpropan-2-il]amino}-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida (#70). De acuerdo con el procedimiento general A, a partir de #68 (240 mg, 0.255 mmol, 1 eq.), diclorometano (10 mL, 0.026 M) y dietilamina (10 mL) se sintetizó #70 (120 mg, 65%) como una mezcla de sólido/cristal de color blanco después de la cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 0% hasta 10% metanol en diclorometano). HPLC (Protocolo A a 45°C): m/z 762.7 [M+H⁺], 740.4 [M+Na⁺], tiempo de retención = 6.903 minutos; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆), suponiendo que es una mezcla de rotámeros, señales características: δ [8.26 (d, J=8.1 Hz) y 8.49 (d, J=8.3 Hz), total 1H], [8.03 (d, J=9.5 Hz) y 8.07 (d, J=9.5 Hz), total 1H], 7.14-7.27 (m, 5H), 3.63 y 3.67 (2 s, total 3H), 3.16, 3.18, 3.20 y 3.25 (4 s, total 6H), 2.92 y 3.01 (2 br s, total 3H), 1.20 y 1.22 (2 s, total 3H), 1.12 y 1.13 (2 s, total 3H), [1.02 (d, J=6.8 Hz) y 1.06 (d, J=6.7 Hz), total 3H], 0.74-0.80 (m, 3H).

Preparación de N²-[(3-Aminooxetan-3-il)carbonil]-N-{(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-[(2S)-2-{(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[(2-feniletil)amino]propil}pirrolidin-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida, sal de ácido acético (#75)



Etapa 1. Síntesis de ácido 3-[(ter-butoxicarbonil)amino]oxetan-3-carboxílico (#71). Al ácido 1-amino]oxetan-3-carboxílico (1.00 g, 8.54 mmol, 1 eq.) en

5 dioxano (15 mL, 0.5 M) se agregó una solución de hidróxido de sodio (1.55 g, 38.7 mmol, 4.5 eq.) en agua (15 mL) seguida por di-ter-butyl dicarbonato (2.09 g, 9.29 mmol, 1.1 eq.). Se formó una espuma de color blanco. La reacción fue sometida a agitación durante 18 horas y después concentrada *in vacuo*. El

10 residuo fue absorbido en acetato de etilo y lavado con solución 1 M de ácido clorhídrico acuosa y con salmuera. La capa orgánica fue secada sobre sulfato de sodio, filtrada, y concentrada *in vacuo* para dar #71 (633 mg, 38%) como un sólido de color blanco. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆),

15 suponiendo que es una mezcla de rotámeros: δ 12.93 (br s, 1H), 7.59 y 7.93 (2 br s, total 1H), 4.71-4.78 (m, 2H), 4.47 (d, J=6.4 Hz, 2H), 1.30 y 1.38 (2 s, total 9H).

Etapa 2. Síntesis de N^2 -[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]- N -{(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[(2-feniletil)amino]propil]pirrolidin-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il}- N -metil-L-valinamida (#72). A #24 (9.47 g, 18.0 mmol, 1 eq.) y #24 (5.90 g, 18.0 mmol, 1 eq.) en diclorometano (250 mL, 0.072 M) se agregó diisopropiletilamina (9.52 mL, 54.2 mmol, 3 eq.) y HATU (8.49 g, 21.7 mmol, 1.2 eq.). La reacción fue sometida a agitación durante 18 horas y después concentrada *in vacuo*. El residuo fue absorbido en acetato de etilo (300 mL) y fue lavado con solución de 1 M ácido clorhídrico acuosa (2 x 100 mL) y con salmuera. La capa orgánica fue secada sobre sulfato de sodio, filtrada, y concentrada *in vacuo*. El residuo fue absorbido en diclorometano (250 mL) y filtrado. El filtrado fue concentrado *in vacuo* sobre sílice y purificado mediante cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 0% hasta 50% acetona en heptano) a fin de proporcionar #72 (11.61 g, 81%) como un sólido de color amarillo claro. LC-MS: m/z 797.6 [$M+H^+$], 819.6 [$M+Na^+$], tiempo de retención = 1.06 minutos; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6), suponiendo que es una mezcla de rotámeros, señales características: δ 3.26 y 3.28 (2 s, total 3H), 3.18 y 3.20 (2 s, total 3H), 2.95 y 3.10 (2 br s, total 3H), 1.01-1.09 (m, 3H), 0.67-0.78 (m, 3H).

Etapa 3. Síntesis de N -{(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[(2-feniletil)amino]propil]pirrolidin-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il}- N -metil-L-valinamida (#73). A #72 (5.16 g, 6.47 mmol, 1 eq.) en tetrahidrofurano (10 mL, 0.65 M) se agregó dietilamina (10 mL). Después de 2 horas, la reacción fue

concentrada *in vacuo* y el residuo fue purificado mediante cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 0% hasta 10% metanol en diclorometano) para dar #73 (2414 mg, 65%). LC-MS: m/z 576.5 $[M+H^+]$, tiempo de retención = 0.64 minutos; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6), suponiendo que es una mezcla de rotámeros, señales características: δ 7.80-7.88 y 7.99-8.10 (2 m, total 1H), 7.14-7.31 (m, 5H), 3.17 y 3.18 (2 s, total 3H), 2.87 y 3.03 (2 br s, total 3H), 1.02-1.08 (m, 3H).

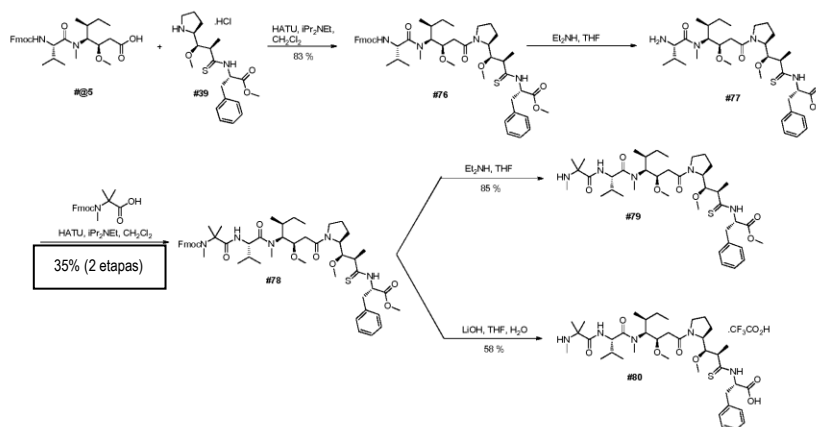
Etap 4. Síntesis de N^2 -({3-[(ter-
10 butoxycarbonil)amino]oxetan-3-yl}carbonil)-N-{(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-[(2S)-2-{(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[(2-feniletil)amino]propil}pirrolidin-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il}-N-metil-L-valinamida (#74). A #73 (100 mg, 0.174 mmol, 1 eq.) en diclorometano (4 mL, 0.04) y N,N-dimetilformamida (0.5 mL) se
15 agregó #71 (45.2 mg, 0.208 mmol, 1.2 eq.), seguido por diisopropiletilamina (92 μ L, 0.521 mmol, 3 eq.) y HATU (102 mg, 0.260 mmol, 1.5 eq.). Después de 16 horas, la reacción fue concentrada *in vacuo* y el residuo fue absorbido en acetato de etilo (6 mL) y lavado con solución de 1 M ácido clorhídrico
20 acuosa (2 x 2 mL) y con salmuera. La capa orgánica fue secada sobre sulfato de sodio, filtrada, y concentrada *in vacuo*. El material crudo fue purificado mediante cromatografía de fase inversa (Método C) para dar #74 (140 mg), el cual fue utilizado en la siguiente etapa sin purificación adicional. LC-MS: m/z
25 774.7 $[M+H^+]$, 796.6 $[M+Na^+]$, tiempo de retención = 0.91

minuto.

Etapas 5. Síntesis de N^2 -[(3-aminooxetan-3-il)carbonil]- N -
 {(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-
 [(2-feniletil)amino]propil]pirrolidin-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il}- N -
 5 metil-L-valinamida, sal de ácido acético (#75). A #74 (140 mg,
 ≤ 0.181 mmol, 1 eq.) en diclorometano (3 mL, 0.06 M) se agregó ácido
 trifluoroacético (1 mL). Después de 1 hora, la reacción fue
 concentrada *in vacuo* y el residuo fue absorbido en acetato de etilo
 (6 mL) y lavado con solución de bicarbonato de sodio acuosa
 10 saturada (2 mL) y con salmuera. La capa orgánica fue secada sobre
 sulfato de sodio, filtrada, y concentrada *in vacuo*. La mitad del
 material crudo fue purificada mediante cromatografía de fase inversa
 (Método B) para dar #75 (16 mg, 26%, en dos etapas). LC-MS: m/z
 674.6 $[M+H^+]$, tiempo de retención = 0.68 minutos; HPLC (Protocolo
 15 A a 45°C): m/z 674.5 $[M+H^+]$, tiempo de retención = 7.128 minutos; ^1H
 NMR (400 MHz, DMSO- d_6), suponiendo que es una mezcla de
 rotámeros, señales características: δ 7.80-7.87 y 8.02-8.07 (2 m,
 total 2H), 7.23-7.30 (m, 2H), 7.14-7.22 (m, 3H), 4.28-4.33 (m, 2H),
 3.96-4.04 (br m, 1H), 3.17 y 3.19 (2 s, total 3H), 2.96 y 3.10 (2 br s,
 20 total 3H), [1.04 (d, $J=7.0$ Hz) y 1.07 (d, $J=6.6$ Hz), total 3H].

**Preparación de $N,2$ -Dimetilalanil- N -[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-[(2S)-
 2-[(1R,2R)-1-metoxi-3-[(2S)-1-metoxi-1-oxo-3-fenilpropan-2-
 il]amino}-2-metil-3-tioxopropil]pirrolidin-1-il]-5-metil-1-
 25 oxoheptan-4-il]- N -metil-L-valinamida (#79) y $N,2$ -dimetilalanil- N -**

[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(1S)-1-carboxi-2-feniletil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-tioxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida, sal de ácido trifluoroacético (#80)



5

Etapa 1. Síntesis de metil *N*-{(2R,3R)-3-[(2S)-1-{(3R,4S,5S)-4-[(*N*-R9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil-L-valil}(metil)amino]-3-metoxi-5-metilheptanoil}pirrolidin-2-il]-3-metoxi-2-metilpropantioil}-L-fenilalaninato (#76). De acuerdo con el procedimiento general D, a partir de #5 (260 mg, 0.648 mmol, 1 eq.), #39 (340 mg, ≤0.629 mmol, 1 eq.), diclorometano (10 mL, 0.065 M), HATU (296 mg, 0.778 mmol, 1.2 eq.) y diisopropiletilamina (339 µL, 1.94 mmol, 3 eq.) se sintetizó el material deseado crudo, el cual fue purificado mediante cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 0% hasta 40% acetona en heptano) para dar #76 (466 mg, 83% en dos etapas) como un sólido. LC-MS: *m/z* 871.5 [*M*+*H*⁺], 893.5 [*M*+*Na*⁺], tiempo de retención = 1.10 minutos; HPLC (Protocolo C): tiempo de retención = 9.249 minutos (pureza > 99%); ¹H NMR

(400 MHz, DMSO- d_6), suponiendo que es una mezcla de rotámeros, señales características: δ [10.19 (br d, $J=7.4$ Hz) y 10.49 (br d, $J=7.8$ Hz), total 1H], 7.89 (br d, $J=7.4$ Hz, 2H), 7.68-7.75 (m, 2H), 7.54-7.60 (m, 1H), 7.41 (br dd, $J=7.4$, 7.4 Hz, 2H), 7.28-7.36 (m, 2H),
 5 7.15-7.28 (m, 5H), [5.20 (ddd, $J=10.9$, 7.3, 4.4 Hz) y 5.34-5.43 (m), total 1H], 3.65 y 3.69 (2 s, total 3H), 3.24 y 3.25 (2 s, total 3H), 3.17 (br s, 3H), 2.93 y 2.98 (2 br s, total 3H), [1.15 (d, $J=6.6$ Hz) y 1.18 (d, $J=6.6$ Hz), total 3H].

Etapas 2. Síntesis de metil *N*-{(2R,3R)-3-metoxi-3-[(2S)-1-
 10 {(3R,4S,5S)-3-metoxi-5-metil-4-[metil(L-valil)amino]heptanoil}pirrolidin-2-il]-2-metilpropantioil)-L-fenilalaninato (#77). De acuerdo con el procedimiento general A, a partir de #76 (460 mg, 0.528 mmol, 1 eq.) tetrahidrofurano (8 mL, 0.07 M) y dietilamina (8 mL) se sintetizó #77 (399 mg), el cual fue
 15 utilizado en la siguiente etapa sin purificación adicional; LC-MS m/z 649.5 $[M+H^+]$, tiempo de retención = 0.73 minutos; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6), suponiendo que es una mezcla de rotámeros, señales de producto características: δ [10.20 (d, $J=7.4$ Hz) y 10.49 (d, $J=7.4$ Hz), total 1H], 7.15-7.28 (m, 5H), [5.20 (ddd, $J=10.9$, 7.2, 4.5 Hz) y
 20 5.34-5.42 (m), total 1H], 3.65 y 3.68 (2 s, total 3H), 3.24 y 3.25 (2 s, total 3H), 3.15 y 3.15 (2 s, total 3H), 2.83 y 2.88 (2 br s, total 3H), [1.15 (d, $J=6.6$ Hz) y 1.18 (d, $J=6.6$ Hz), total 3H].

Etapas 3. Síntesis de *N*-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil-*N*,2-dimetilalanil-*N*-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-3-
 25 {[(2S)-1-metoxi-1-oxo-3-fenilpropan-2-il]amino}-2-metil-3-

tioxopropil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida (#78). De acuerdo con el procedimiento general D, a partir de #77 (399 mg, ≤ 0.52 mmol, 1 eq.), N-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil-N,2-dimetilalanina (213 mg, 0.628 mmol, 1.2 eq.), diclorometano (5 mL, 0.1 M), HATU (239 mg, 0.628 mmol, 1.2 eq.) y diisopropiletilamina (282 μ L, 1.62 mmol, 3.1 eq.) se sintetizó el material deseado crudo, el cual fue purificado mediante cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 0% hasta 50% acetona en heptano), proporcionando #78 (231 mg, 46% en dos etapas). LC-MS: m/z 970.7 $[M+H^+]$, 992.6 $[M+Na^+]$, tiempo de retención = 1.11 minutos; HPLC (Protocolo C): tiempo de retención = 9.260 minutos; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6), suponiendo que es una mezcla de rotámeros, señales características: δ [10.19 (d, $J=7.4$ Hz) y 10.47 (d, $J=7.8$ Hz), total 1H], 7.89 (d, $J=7.4$ Hz, 2H), 7.61-7.67 (m, 2H), 7.41 (br dd, $J=7.4$, 7.4 Hz, 2H), 7.14-7.36 (m, 8H), [5.20 (ddd, $J=11, 7$, 5 Hz) y 5.38 (ddd, $J=11$, 8, 4 Hz), total 1H], [4.41 (dd, $J=8.6$, 8.4 Hz) y 4.46 (dd, $J=8.2$, 8.2 Hz), total 1H], 3.65 y 3.68 (2 s, total 3H), 3.23 y 3.24 (2 s, total 3H), 3.13 (br s, 3H), 2.88 y 2.93 (2 br s, total 3H), 2.84 y 2.85 (2 s, total 3H), 1.31 y 1.32 (2 s, total 3H), [1.15 (d, $J=6.6$ Hz) y 1.18 (d, $J=6.4$ Hz), total 3H].

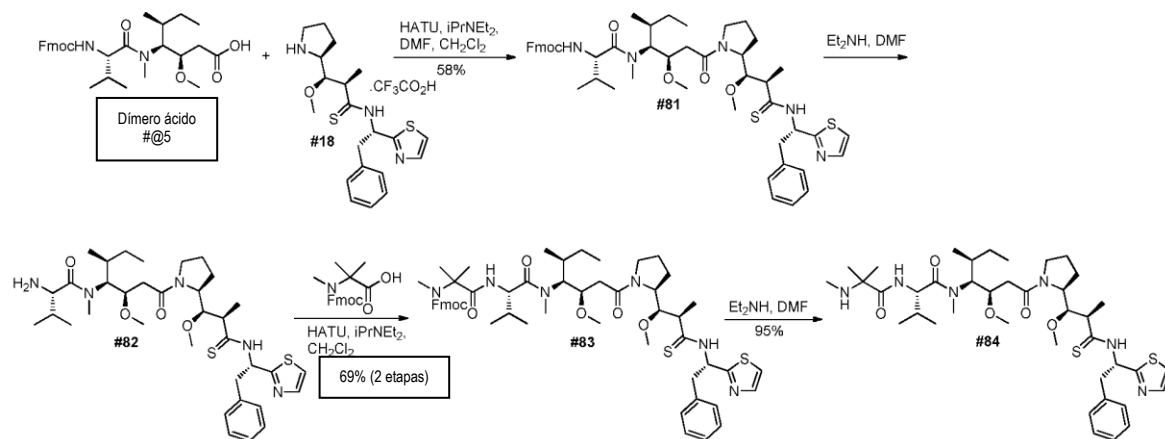
Etapas 4A. Síntesis de N,2-dimetilalanil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-3-[(2S)-1-metoxi-1-oxo-3-fenilpropan-2-il]amino}-2-metil-3-tioxopropil]pirrolidin-1-il]-5-

metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida (#79). De acuerdo con el procedimiento general A, a partir de #78 (223 mg, 0.230 mmol, 1 eq.), diclorometano (6 mL, 0.04 M) y dietilamina (6 mL) se sintetizó #79 (146 mg, 85%) como un sólido de color blanco después de la cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 0% hasta 5% metanol en heptano después 0% hasta 10% metanol en diclorometano). HPLC (Protocolo A a 45°C): 749.4 [M+H⁺], tiempo de retención = 7.315 minutos; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆), suponiendo que es una mezcla de rotámeros, señales características: δ [10.20 (d, J=7.6 Hz) y 10.50 (d, J=8.0 Hz), total 1H], 7.79-7.88 (m, 1H), 7.15-7.29 (m, 5H), [5.20 (ddd, J=11, 7, 4 Hz) y 5.38 (ddd, J=11, 8, 4 Hz), total 1H], [4.50 (dd, J=8.8, 8.6 Hz) y 4.56 (dd, J=9, 8 Hz), total 1H], 3.65 y 3.69 (2 s, total 3H), 3.24 y 3.25 (2 s, total 3H), 3.16 (br s, 3H), 2.93 y 2.97 (2 br s, total 3H), 2.10 y 2.11 (2 s, total 3H).

15 *Etapas 4B.* Síntesis de N,2-dimetilalanil-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1S)-1-carboxi-2-feniletil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-tioxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida, sal de ácido trifluoroacético (#80). A una solución de #78 (170 mg, 0.175 mmol, 1 eq.) en tetrahidrofurano (3 mL, 0.04 M) se agregó una solución de hidróxido de litio (12.6 mg, 0.525 mmol, 3 eq.) en agua (1.5 mL). Después de someter la mezcla a agitación durante la noche, se removi6 el solvente *in vacuo*. El residuo fue formado como azeotropo tres veces con heptano. El residuo fue diluido después con sulf6xido de dimetilo (2.2 mL) y purificado mediante cromatografía de fase inversa (Método C) para obtener #80

(74 mg, 58%) como un sólido. LC-MS: m/z 734.6 $[M+H^+]$, tiempo de retención = 0.69 minutos; HPLC (Protocolo A a 45°C): 734.4 $[M+H^+]$, tiempo de retención = 6.903 minutos (pureza > 96%); ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6), suponiendo que es una mezcla de rotámeros, señales características: δ 12.9 y 13.1 (2 v br s, total 1H), [10.12 (d, $J=7.4$ Hz) y 10.46 (d, $J=7.8$ Hz), total 1H], 8.77-8.89 (br m, 2H), [8.47 (d, $J=8.6$ Hz) y 8.51 (d, $J=8.6$ Hz), total 1H], 7.21-7.29 (m, 4H), 7.14-7.21 (m, 1H), [5.16-5.23 (m) y 5.38 (ddd, $J=11.3, 8.2, 3.9$ Hz), total 1H], [4.51 (dd, $J=9.0, 9.0$ Hz) y 4.57 (dd, $J=9.4, 8.6$ Hz), total 1H], 3.24 y 3.24 (2 s, total 3H), 3.18 y 3.19 (2 s, total 3H), 2.96 y 3.00 (2 br s, total 3H), 1.51 y 1.53 (2 s, total 3H), 1.40 y 1.42 (2 s, total 3H), 1.14-1.19 (m, 3H), 0.74-0.81 (m, 3H).

15 Preparación de N,2-Dimetilalanil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}-3-tioxopropil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-vanilamida (#84)



Etapas 1. Síntesis de N²-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-N-
 [(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-{[(1S)-2-
 fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}-3-tioxopropil]pirrolidin-1-il}-5-metil-
 1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida (**#81**). De acuerdo con el
 5 procedimiento general **D**, a partir de **#5** (620 mg, 1.18 mmol, 1 eq.)
 diclorometano (10 mL, 0.1 M), amina **#18** (604 mg, 1.42 mmol, 1.2
 eq.), diisopropiletilamina (618 uL, 3.54 mmol, 3 eq.) y HATU (539
 mg, 1.42 mmol, 1.2 eq.) se sintetizó el material deseado crudo, el
 cual fue purificado mediante cromatografía en gel de sílice
 10 (Gradiente: 0% hasta 30% acetona en heptano) para dar **#81** (737
 mg, 58%). HPLC (Protocolo C): tiempo de retención = 9.235 minutos;
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆), suponiendo que es una mezcla de
 rotámeros, señales características: δ [10.54 (br d, J=8 Hz) y 10.81
 (br d, J=8 Hz), total 1H], 7.89 (d, J=7.6 Hz, 2H), [7.80 (d, J=3.3 Hz) y
 15 7.83 (d, J=3.1 Hz), total 1H], 7.70-7.75 (m, 2H), [7.64 (d, J=3.1 Hz) y
 7.68 (d, J=3.3 Hz), total 1H], 7.55-7.60 (m, 1H), 7.38-7.44 (m, 2H),
 7.13-7.35 (m, 7H), [6.31 (ddd, J=11, 8, 4.5 Hz) y 6.40-6.48 (m), total
 1H], 3.23 y 3.24 (2 s, total 3H), 3.17 y 3.22 (2 s, total 3H), 2.94 y
 3.01 (2 br s, total 3H), [1.14 (d, J=6.4 Hz) y 1.17 (d, J=6.2 Hz), total
 20 3H].

Etapas 2. Síntesis de N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{(2S)-2-
 [(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-{[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-
 il)etil]amino}-3-tioxopropil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-
 metil-L-valinamida (**#82**). De acuerdo con el procedimiento general A,
 25 a partir de **#81** (733 mg, 0.818 mmol, 1 eq.) en diclorometano (7 mL,

0.1 M) y dietilamina (7 mL) se sintetizó #82 (670 mg), el cual fue utilizado en la siguiente etapa sin purificación adicional. LC-MS: m/z 674.5 $[M+H^+]$, tiempo de retención = 1.29 minutos; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6), suponiendo que es una mezcla
 5 de rotámeros, señales de producto características: δ [10.55 (br d, $J=8$ Hz) y 10.84 (br d, $J=8$ Hz), total 1H], [7.64 (d, $J=3.1$ Hz) y 7.69 (d, $J=3.3$ Hz), total 1H], 7.13-7.33 (m, 5H), 6.27-6.35 y 6.38-6.47 (2 m, total 1H), 3.23 y 3.25 (2 s, total 3H), 3.15 y 3.19 (2 s, total 3H), 2.84 y 2.91 (2 br s, total 3H).

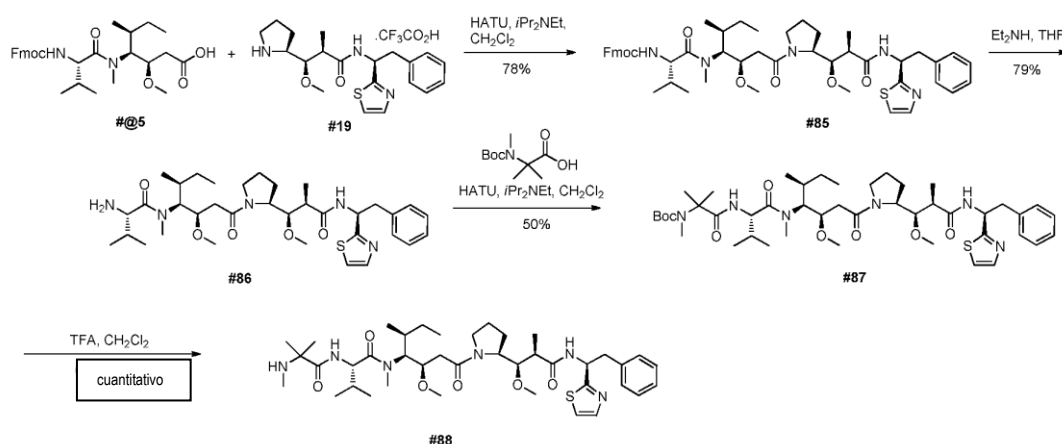
10 *Etapa 3.* Síntesis de N-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-N,2-dimetilalanil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}-3-tioxopropil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida (#83). De acuerdo con el procedimiento general D, a
 15 partir de #82 (670 mg, ≤ 0.818 mmol, 1 eq.), diclorometano (5 mL, 0.16 M), N-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-N,2-dimetilalanina (304 mg, 0.896 mmol, 1.1 eq.), HATU (372 mg, 0.978 mmol, 1.2 eq.) y diisopropiletilamina (440 μ L, 2.53 mmol, 3.1 eq.) se sintetizó el material deseado crudo, el cual fue
 20 purificado mediante cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 0% hasta 30% acetona en heptano) para dar #83 (556 mg, 69% en dos etapas). LC-MS: m/z 994.7 $[M+H^+]$, tiempo de retención = 0.69 minutos; HPLC (Protocolo C): tiempo de retención = 9.333 minutos (pureza > 98%); ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6),
 25 suponiendo que es una mezcla de rotámeros, señales

características: δ [10.53 (br d, $J=8$ Hz) y 10.80 (br d, $J=8$ Hz), total 1H], 7.86-7.91 (m, 2H), [7.80 (d, $J=3.3$ Hz) y 7.82 (d, $J=3.2$ Hz), total 1H], [7.64 (d, $J=3.2$ Hz) y 7.68 (d, $J=3.2$ Hz), total 1H], 7.62-7.66 (m, 2H), 7.38-7.44 (m, 2H), 7.28-7.36 (m, 5H), 7.19-7.26 (m, 2H), 7.12-
 5 7.17 (m, 1H), [6.31 (ddd, $J=11, 8, 4.5$ Hz) y 6.44 (ddd, $J=11, 8.5, 4.5$ Hz), total 1H], [4.42 (dd, $J=9, 8$ Hz) y 4.48 (dd, $J=8, 8$ Hz), total 1H], 3.22 y 3.24 (2 s, total 3H), 3.13 y 3.17 (2 s, total 3H), 2.89 y 2.97 (2 br s, total 3H), 2.84 y 2.85 (2 s, total 3H), [1.13 (d, $J=6.4$ Hz) y 1.16 (d, $J=6.4$ Hz), total 3H].

10 *Etapla 4.* Síntesis de N,2-dimetilalanil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}-3-tioxopropil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida (**#84**). De acuerdo con el procedimiento general A, a partir de **#83** (552 mg, 0.555 mmol, 1 eq.) en diclorometano (10
 15 mL, 0.05 M) y dietilamina (10 mL) se sintetizó el material crudo deseado, el cual fue diluido con metanol, concentrado *in vacuo* sobre sílice y purificado mediante cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 0% hasta 10% metanol en diclorometano) para dar **#84** (406 mg, 95%) como un sólido de color blanco. LC-MS: m/z 772.8
 20 $[M+H^+]$, tiempo de retención = 1.35 minutos; HPLC (Protocolo A): 774.4 $[M+H^+]$, tiempo de retención = 7.390 minutos; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6), suponiendo que es una mezcla de rotámeros, señales características: δ [10.54 (br d, $J=8$ Hz) y 10.81 (br d, $J=8$ Hz), total 1H], 7.78-7.84 (m, 2H), [7.65 (d, $J=3.1$ Hz) y 7.69 (d, $J=3.3$ Hz), total 1H], 7.29-7.34 (m, 2H), 7.20-7.28 (m, 2H), 7.14-7.19 (m,
 25 Hz), total 1H], 7.29-7.34 (m, 2H), 7.20-7.28 (m, 2H), 7.14-7.19 (m,

1H), 6.27-6.35 y 6.40-6.48 (2 m, total 1H), [4.51 (dd, J=9, 8 Hz) y 4.57 (dd, J=9, 8 Hz), total 1H], 3.24 y 3.25 (2 s, total 3H), 3.16 y 3.21 (2 s, total 3H), 2.94 y 3.00 (2 br s, total 3H), 2.09 y 2.10 (2 s, total 3H), 1.08 y 1.09 (2 s, total 3H), 0.73-0.80 (m, 5 3H).

N,2-Dimetilalanil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}propil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida (#88)



Etapas 1. Síntesis de N^2 -[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}propil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida (#85). A una mezcla de #5 (5.48 g, 10.4 mmol, 1 eq.) y #19 (3.90 g, 10.4 mmol, 1 eq.) en diclorometano (50 mL, 0.2M) se agregó diisopropiletilamina (5.51 mL, 31.3 mmol, 3 eq.) seguida por HATU (4.91 g, 12.5 mmol, 1.2 eq.). Después de ser sometida a

agitación durante la noche, la mezcla de reacción fue concentrada *in vacuo*. El residuo fue absorbido en acetato de etilo (100 mL) y lavado con solución de 1 M ácido clorhídrico acuosa (2 x 30 mL) y con salmuera (30 mL). La capa orgánica fue secada sobre sulfato de sodio, filtrada, y concentrada *in vacuo*. El residuo fue absorbido en diclorometano y filtrado; el filtrado fue purificado mediante cromatografía en gel de sílice (Gradiente; 0% hasta 50% acetona en heptano) para obtener #85 (7.20 g, 78%) como un sólido. LC-MS: m/z 880.6 $[M+H^+]$, tiempo de retención = 1.07 minutos.

10 *Etapa 2.* Síntesis de N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}propil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida (#86). De acuerdo con el procedimiento general A, a partir de #85 (5.00 g, 5.68 mmol, 1 eq.) en tetrahidrofurano (10 mL, 0.56 M) y dietilamina (3 mL) se sintetizó el material deseado crudo, el cual fue purificado mediante cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 0% hasta 10% metanol en diclorometano) para dar #86 (2.952 g, 79%) como un sólido. LC-MS: m/z 658.5 $[M+H^+]$, 680.5 $[M+Na^+]$ tiempo de retención = 0.66 minuto; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6), suponiendo que es una mezcla de rotámeros, señales características: δ [8.64 (br d, $J=8.4$ Hz) y 8.90 (br d, $J=8.8$ Hz), total 1H], [7.77 (d, $J=3.3$ Hz) y 7.80 (d, $J=3.3$ Hz), total 1H], [7.63 (d, $J=3.3$ Hz) y 7.66 (d, $J=3.3$ Hz), total 1H], 7.12-7.31 (m, 5H), [5.39 (ddd, $J=11.2, 8.4, 4.2$ Hz) y 5.54 (ddd, $J=11.9, 8.9, 4.0$ Hz), total 1H], 3.15, 3.19, 3.20 y 3.26 (4 s, total 6H), 2.86 y 2.98 (2 br s, total

15

20

25

3H), [1.06 (d, J=6.6 Hz) y 1.11 (d, J=6.6 Hz), total 3H].

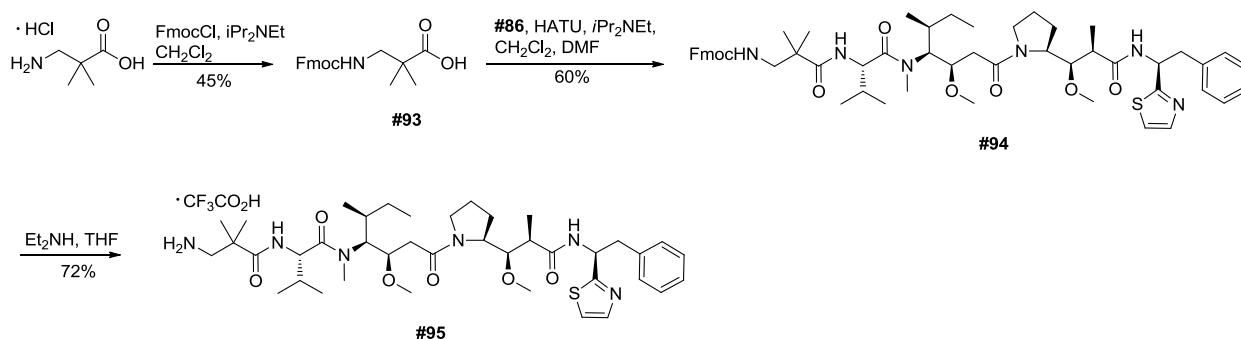
Etapa 3. Síntesis de N-(ter-butoxicarbonil)-N,2-dimetilalanil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}propil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida (#87). A una mezcla de #86 (80.3 mg, 0.122 mmol, 1 eq.) en diclorometano (4 mL, 0.03 M) se agregó N-(ter-butoxicarbonil)-N,2-dimetilalanina (29.1 mg, 0.134 mmol, 1.1 eq.) seguida por diisopropiletilamina (64 μ L, 0.365 mmol, 3 eq.) y HATU (71.7 mg, 0.183 mmol, 1.5 eq.). Después de ser sometida a agitación durante la noche, la mezcla de reacción fue concentrada *in vacuo*. El residuo fue absorbido en acetato de etilo (6 mL) y lavado con solución de 1 M ácido clorhídrico acuosa (2 x 2 mL) y con salmuera. El solvente orgánico fue secado sobre sulfato de sodio, filtrado, y concentrado *in vacuo*. El residuo fue absorbido en diclorometano y filtrado; el filtrado fue concentrado *in vacuo* sobre sílice y purificado mediante cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 0% hasta 50% acetona en heptano) para obtener #87 (58 mg, 50%) como un sólido de color blanco. LC-MS: *m/z* 857.7 [M+H⁺], 879.7 [M+Na⁺], tiempo de retención = 0.99 minuto; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆), suponiendo que es una mezcla de rotámeros, señales características: δ [8.64 (br d, J=8 Hz) y 8.87 (br d, J=9 Hz), total 1H], [7.77 (d, J=3.3 Hz) y 7.80 (d, J=3.3 Hz), total 1H], [7.63 (d, J=3.2 Hz) y 7.66 (d, J=3.2 Hz), total 1H], 7.13-

7.31 (m, 5H), [6.95 (br d, J=8 Hz) y 7.06 (br d, J=8 Hz), total 1H], 5.35-5.42 y 5.51-5.58 (2 m, total 1H), 3.15, 3.19, 3.20 y 3.26 (4 s, total 6H), 2.94 y 3.03 (2 br s, total 3H), 2.83 y 2.84 (2 s, total 3H), [1.05 (d, J=6.7 Hz) y 1.11 (d, J=6.7 Hz), total 3H].

5 *Etapas 4.* Síntesis de N,2-dimetilalanil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{(2S)-2[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}propil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il)-N-metil-L-valinamida (#88). A una mezcla de #87 (58 mg, 0.068 mmol, 1 eq.) en diclorometano (8 mL) se agregó ácido
10 trifluoroacético (2 mL). Después de ser sometida a agitación durante la noche, la mezcla de reacción fue concentrada *in vacuo*. El residuo fue absorbido en acetato de etilo (10 mL), lavado con solución de bicarbonato de sodio acuosa saturada, secado sobre sulfato de sodio, filtrado, y concentrado *in vacuo* para dar #88 (52 mg,
15 cuantitativo). LC-MS 757.6 [M+H⁺], tiempo de retención = 0.69 minuto; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆), suponiendo que es una mezcla de rotámeros, señales características: δ [8.64 (br d, J=8.6 Hz) y 8.87 (br d, J=8.6 Hz), total 1H], 7.80-7.85 (m, 1H), [7.77 (d, J=3.3 Hz) y 7.80 (d, J=3.1 Hz), total 1H], [7.63 (d, J=3.1 Hz) y 7.66 (d, J=3.3
20 Hz), total 1H], 7.20-7.31 (m, 4H), 7.13-7.19 (m, 1H), [5.39 (ddd, J=11, 8.5, 4 Hz) y 5.49-5.56 (m), total 1H], [4.51 (dd, J=9, 8 Hz) y 4.61 (dd, J=9, 8 Hz), total 1H], 3.16, 3.20, 3.21 y 3.25 (4 s, total 6H), 2.94 y 3.03 (2 br s, total 3H), 2.10 y 2.10 (2 s, total 3H), 1.16 (br s, 3H), 1.04-1.12 (m, 6H), 0.72-0.80 (m, 3H).

Preparación de N²-(3-Amino-2,2-dimetilpropanoil)-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-{[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}propil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida, sal de ácido

5 trifluoroacético (#95)



Etapa 1. Síntesis de ácido 3-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]amino}-2,2-dimetilpropanóico (#93). A un ácido 3-amino-2,2-dimetilpropanóico, sal de clorhidrato (250 mg, 1.63 mmol, 1 eq.) en diclorometano (4 mL, 0.4 M) se agregó diisopropiletilamina (859 µL, 4.88 mmol, 3 eq.) seguido por cloruro de (9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonilo (473 mg, 1.79 mmol, 1.1 eq.) La reacción fue sometida a agitación durante 18 horas y concentrada después *in vacuo*. El residuo fue absorbido en acetato de etilo (3 mL) y lavado con solución de 1 M ácido clorhídrico acuoso (2 x 1 mL) y con salmuera. La capa orgánica fue secada sobre sulfato de sodio, filtrada, y purificada mediante cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 0% hasta 100% acetato de etilo en heptano) para dar #93 (250 mg, 45%) como un aceite. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 12.22 (s, 1H), 7.89 (d, J=7.4 Hz, 2H), 7.72 (d, J=7.4 Hz, 2H), 7.38-7.44 (m,

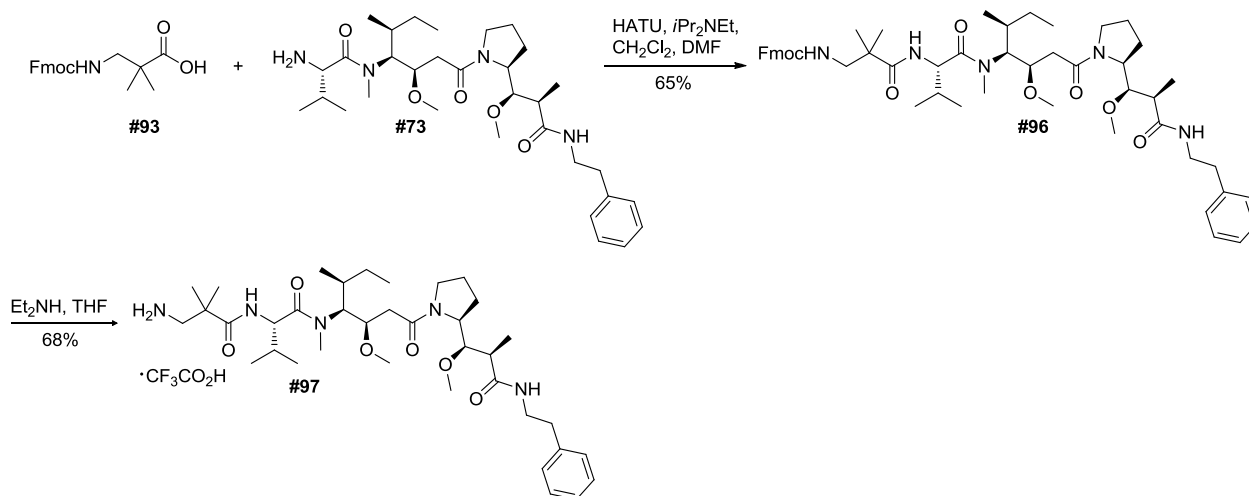
2H), 7.27-7.35 (m, 3H), 4.18-4.30 (m, 3H), 3.16 (d, J=6.2 Hz, 2H), 1.05 (s, 6H).

Etapa 2. Síntesis de N²-(3-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]amino}-2,2-dimetilpropanoil)-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-((2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}propil]pirrolidin-1-il)-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida (#94). A #86 (100 mg, 0.152 mmol, 1 eq.) en diclorometano (4 mL, 0.038 M) y N,N-dimetilformamida (0.5 mL) se agregó #93 (51.6 mg, 0.152 mmol, 1 eq.) seguido por diisopropiletilamina (80.0 µL, 0.457 mmol, 3 eq.) y HATU (89.8 mg, 0.229 mmol, 1.5 eq.). La reacción fue sometida a agitación durante 18 horas y después concentrada *in vacuo*. El residuo fue absorbido en acetato de etilo (6 mL) y fue lavado con solución de 1 M ácido clorhídrico acuosa (2 x 2 mL) y con salmuera. La capa orgánica fue secada sobre sulfato de sodio, filtrada, y concentrada *in vacuo*. El residuo fue absorbido en diclorometano (250 mL) y filtrado; el filtrado fue concentrado *in vacuo* sobre sílice y purificado mediante cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 0% hasta 50% acetona en heptano) a fin de proporcionar #94 (90 mg, 60%) como un sólido de color blanco. LC-MS: *m/z* 979.8 [M+H⁺], 1002.7 [M+Na⁺], tiempo de retención = 1.15 minutos; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆), suponiendo que es una mezcla de rotámeros, señales de producto características: δ [8.64 (br d, J=8.6 Hz) y 8.86 (br d, J=8.6 Hz), total 1H], 7.86-7.91 (m, 2H), [7.77 (d, J=3.3 Hz) y 7.79 (d, J=3.3 Hz), total 1H], 7.67-7.73 (m, 2H), [7.63 (d, J=3.3 Hz) y 7.65 (d, J=3.3 Hz), total

1H], 6.87-6.95 (m, 1H), [5.39 (ddd, $J=11$, 8, 4 Hz) y 5.52 (ddd, $J=11.5$, 9, 4 Hz), total 1H], [4.44 (dd, $J=8.4$, 8.4 Hz) y 4.55 (dd, $J=8.4$, 8.4 Hz), total 1H], 3.16, 3.20, 3.21 y 3.25 (4 s, total 6H), 2.96 y 3.06 (2 br s, total 3H), 0.69-0.77 (m, 3H).

5 *Etapa 3. Síntesis de N²-(3-amino-2,2-dimetilpropanoil)-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[[1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}propil]pirrolidin-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida, sal de ácido trifluoroacético (#95).* A #94 (86 mg, 0.088 mmol, 1 eq.) en
 10 tetrahidrofurano (2 mL, 0.04 M) se agregó dietilamina (10 mL). Después de ser sometida a agitación durante la noche, la reacción fue concentrada *in vacuo* y el residuo fue purificado mediante cromatografía de fase inversa (Método C) para dar
 15 #95 (55 mg, 72%). LC-MS: m/z 757.5 $[M+H^+]$, tiempo de retención = 0.74 minutos; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6), suponiendo que es una mezcla de rotámeros, señales características: δ [8.66 (br d, $J=8$ Hz) y 8.92 (br d, $J=9$ Hz), total 1H], [7.91 (br d, $J=8$ Hz) y 7.97 (br d, $J=9$ Hz), total 1H], [7.78 (d, $J=3.3$ Hz) y 7.81 (d, $J=3.1$ Hz), total 1H], 7.65-7.74 (br
 20 m, 3H), [7.63 (d, $J=3.3$ Hz) y 7.67 (d, $J=3.3$ Hz), total 1H], 7.12-7.31 (m, 5H), [5.35-5.42 (m) y 5.45-5.52 (m), total 1H], [4.44 (dd, $J=9$, 9 Hz) y 4.55 (dd, $J=9$, 9 Hz), total 1H], 3.17, 3.20, 3.22 y 3.25 (4 s, total 6H), 2.96 y 3.05 (2 br s, total 3H), 1.25 y 1.25 (2 s, total 3H), 1.14 y 1.15 (2 s, total 3H), [1.06 (d, $J=6.6$ Hz) y 1.10 (d, $J=6.4$ Hz), total 3H], 0.72-0.80 (m, 3H).
 25

Preparación de N²-(3-Amino-2,2-dimetilpropanoil)-N-{(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-[(2S)-2-{(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[(2-feniletíl)amino]propil}pirrolidin-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il}-N-metil-L-valinamida, sal de ácido trifluoroacético (#97)



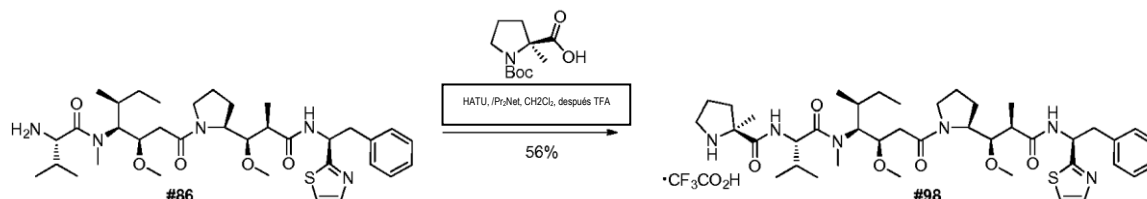
Etapa 1. Síntesis de N²-(3-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]amino}-2,2-dimetilpropanoil)-N-{(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-[(2S)-2-{(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[(2-feniletíl)amino]propil}pirrolidin-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il}-N-metil-L-valinamida (#96). A #73 (100 mg, 0.174 mmol, 1 eq.) en diclorometano (4 mL, 0.04 M) y N,N-dimetilformamida (0.5 mL) se agregó #93 (59.1 mg, 0.174 mmol, 1 eq.), seguido por diisopropiletilamina (92 µL, 0.52 mmol, 3 eq.) y HATU (102 mg, 0.260 mmol, 1.5 eq.). La reacción fue sometida a agitación durante 18 horas y después concentrada *in vacuo*. El residuo fue absorbido en acetato de etilo (6 mL) y fue lavado con solución de 1 M ácido clorhídrico acuoso (2 x 2 mL) y con salmuera. La capa orgánica fue

secada sobre sulfato de sodio, filtrada, y concentrada *in vacuo*. La purificación mediante cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 0% hasta 50% acetona en heptano) proporcionó #96 (102 mg, 65%) como un sólido de color blanco. LC-MS: *m/z* 896.7 [M+H⁺], 918.8 [M+Na⁺], tiempo de retención = 1.14 minutos; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆), suponiendo que es una mezcla de rotámeros, señales de producto características: δ 7.88 (d, J=7.4 Hz, 2H), [7.83 (br dd, J=6, 5 Hz) y 8.03 (br dd, J=6, 5 Hz), total 1H], 7.67-7.73 (m, 2H), 7.36-7.48 (m, 3H), 7.22-7.35 (m, 4H), 7.13-7.21 (m, 3H), 6.86-6.96 (m, 1H), [4.44 (dd, J=8.6, 8.6 Hz) y 4.50 (dd, J=8.6, 8.6 Hz), total 1H], 3.18, 3.19, 3.26 y 3.29 (4 s, total 6H), 2.96 y 3.11 (2 br s, total 3H), 0.70-0.77 (m, 3H).

Etapas 2. Síntesis de N²-(3-amino-2,2-dimetilpropanoil)-N-((3R,4S,5S)-3-metoxi-1-[(2S)-2-((1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[(2-feniletil)amino]propil}pirrolidin-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il)-N-metil-L-valinamida, sal de ácido trifluoroacético (#97). A #96 (98 mg, 0.11 mmol, 1 eq.) en tetrahidrofurano (2 mL, 0.04 M) se agregó dietilamina (0.5 mL). Después de ser sometida a agitación durante la noche, la reacción fue concentrada *in vacuo* y el residuo fue purificado mediante cromatografía de fase inversa (Método C) para dar #97 (58 mg, 68%). LC-MS: *m/z* 674.4 [M+H⁺], 696.4 [M+Na⁺], tiempo de retención = 0.74 minutos; HPLC (Protocolo A): 674.5 [M+H⁺], tiempo de retención = 7.072 minutos; ¹H NMR (400

MHz, DMSO-d₆), suponiendo que es una mezcla de rotámeros, señales características: δ [7.92 (br d, J=8 Hz) y 7.97 (br d, J=8 Hz), total 1H], [7.86 (br dd, J=6, 5 Hz) y 8.07 (br dd, J=6, 5 Hz), total 1H], 7.64-7.74 (br m, 3H), 7.15-7.29 (m, 5H), [4.44 (dd, J=9, 9 Hz) y 4.50 (dd, J=9, 9 Hz), total 1H], 3.26 y 3.29 (2 s, total 3H), 3.18 y 3.20 (2 s, total 3H), 2.96 y 3.10 (2 br s, total 3H), 1.24 y 1.25 (2 s, total 3H), 1.14 y 1.16 (2 s, total 3H), 1.02-1.07 (m, 3H), 0.73-0.80 (m, 3H).

**Preparación de 2-metil-L-prolil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{(2S)-2-
10 [(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-{[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}propil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida, sal de ácido trifluoroacético (#98)**



A una mezcla de 1-(ter-butoxicarbonil)-2-metil-L-prolina (65.1 mg, 0.284 mmol, 1.1 eq.) y #86 (170 mg, 0.258 mmol, 1 eq.) en diclorometano (5 mL, 0.03 M) se agregó HATU (0.108 mg, 0.284 mmol, 1.1 eq.) seguido por diisopropiletilamina (139 μ L, 0.800 mmol, 3.1 eq.). Después de ser sometida a agitación durante toda la noche, la mezcla de reacción fue enfriada hasta 0°C, se agregó diclorometano (3 mL) seguido por la adición lenta de ácido trifluoroacético (2 mL). La mezcla de reacción fue sometida a agitación a 0°C durante 5 minutos, permitiendo que se caliente hasta temperatura ambiente y siendo sometida después a agitación a

temperatura ambiente durante 30 minutos antes de ser concentrada *in vacuo*. El residuo fue formado en azeotropo dos veces con heptano, diluido con una pequeña cantidad de diclorometano y metanol antes de ser concentrado *in vacuo*

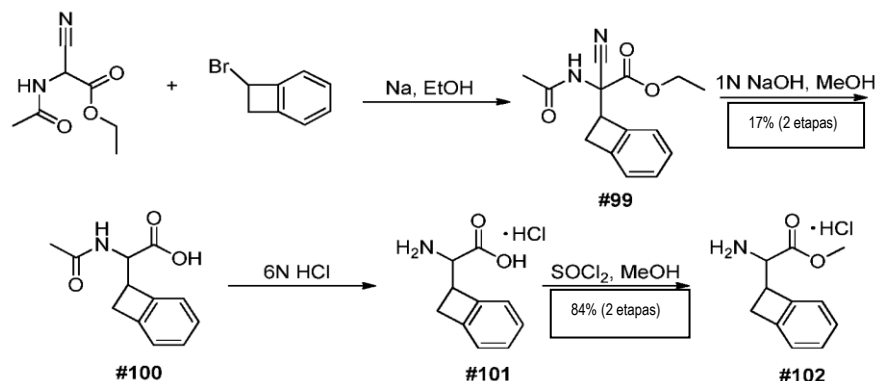
5 sobre sílice El residuo fue purificado mediante cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 0% hasta 10% metanol en diclorometano) y después mediante cromatografía de fase inversa (Método C) para obtener **#98** (128 mg, 56%) como un sólido de color blanco. LC-MS: m/z 769.4 $[M+H^+]$, tiempo de

10 retención = 1.28 minutos; HPLC (Protocolo A a 45°C) m/z 769.4 $[M+H^+]$, tiempo de retención = 7.146 minutos (pureza > 98%); ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6), suponiendo que es una mezcla de rotámeros, señales características: δ 9.03-9.15 (br m, 1H), 8.77-8.86 (br m, 1H), 8.69-8.76 (m, 1H), [8.66 (d, $J=8.2$ Hz) y

15 8.92 (d, $J=8.6$ Hz), total 1H], [7.78 (d, $J=3.1$ Hz) y 7.80 (d, $J=3.5$ Hz), total 1H], [7.63 (d, $J=3.1$ Hz) y 7.67 (d, $J=3.1$ Hz), total 1H], 7.12-7.31 (m, 5H), [5.38 (ddd, $J=11, 8, 4$ Hz) y 5.47 (ddd, $J=11, 9, 4$ Hz), total 1H], [4.46 (dd, $J=9.4, 9.0$ Hz) y 4.55 (dd, $J=9.0, 8.6$ Hz), total 1H], 3.17, 3.20, 3.22 y 3.25 (4 s, total

20 6H), 2.98 y 3.04 (2 br s, total 3H), [1.06 d, $J=7.0$ Hz) y 1.09 (d, $J=6.6$ Hz), total 3H], 0.73-0.80 (m, 3H).

Preparación de metil amino(biciclo[4.2.0]octa-1,3,5-trien-7-il)acetato, sal de clorhidrato (#102)



Etapas 1. Síntesis de etil (acetilamino)(biciclo[4.2.0]octa-1,3,5-trien-7-il)cianoacetato (**#99**). Se permitió que sodio (464 mg, 20.2 mmol, 1.2 eq.) reaccionara con etanol absoluto (40 mL, 0.42 M); a la mezcla resultante se agregó etil 2-(acetilamino)-2-cianoacetato (3.44 g, 20.2 mmol, 1.2 eq.). Después de 20 minutos a 60°C, se agregó 7-bromobiciclo[4.2.0]octa-1,3,5-trieno (3.092 g, 16.89 mmol, 1 eq.) y la mezcla de reacción fue calentada a reflujo durante la noche, después filtrada y concentrada *in vacuo*. El residuo fue diluido con agua y extraído con acetato de etilo. La capa orgánica fue lavada con salmuera, secada sobre sulfato de sodio, filtrada, y concentrada *in vacuo* para dar un aceite oscuro, el cual fue purificado mediante cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 0% hasta 50% acetato de etilo en heptano) para dar **#99** (4.38 g) como una goma de color amarillo. LC-MS: m/z 273.2 $[\text{M}+\text{H}^+]$, tiempo de retención = 2.36 minutos.

Etapas 2. Síntesis de ácido (acetilamino)(biciclo[4.2.0]octa-1,3,5-trien-7-il)acético (**#100**). A una mezcla de **#99** (4.38 mg, <16.1 mmol, 1 eq.) en metanol (30 mL, 0.53 M) se agregó una solución de 1

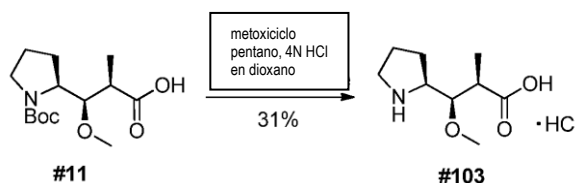
N hidróxido de sodio acuosa (38 mL, 38 mmol, 2.4 eq.). La mezcla de reacción fue calentada a reflujo durante la noche, después concentrada *in vacuo*, diluida con agua (40 mL), y acidificada con una solución de 1 N de ácido clorhídrico acuosa (40 mL). La capa acuosa fue extraída con diclorometano (3 x 30 mL). Las capas orgánicas combinadas fueron secadas sobre sulfato de sodio, filtradas y concentradas *in vacuo*. El aceite resultante fue purificado mediante cromatografía en gel de sílice (Solvente A: diclorometano; Solvente B: 20% metanol en diclorometano que contiene 0.02% ácido trifluoroacético; Gradiente: 0% hasta 40% B) después mediante cromatografía de fluido supercrítico (Columna: Chiralpak AD-H, 250 x 21 mm; Eluyente: 85:15 dióxido de carbono/metanol; Velocidad de Flujo: 65 g/min; Detección: 210 nm; Instrumento: sistema SFC preparatorio minigram Berger). El segundo pico de elución fue aislado para dar #100 (600 mg, 17% en dos etapas) como un enantiómero individual (tiempo de retención = 3.37 minutos, pureza >99%). LC-MS: m/z 220.3 [M+H⁺], tiempo de retención = 2.10 minutos; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 7.14-7.24 (m, 2H), 7.03-7.09 (m, 2H), 4.59 (d, J=8.6 Hz, 1H), 3.87 (ddd, J=8.5, 5.3, 2.4 Hz, 1H), 3.35 (dd, J=14.5, 5.4 Hz, 1H, asumido; parcialmente oscurecido por solvente pico), 3.10 (dd, J=14.4, 2.4 Hz, 1H), 2.00 (s, 3H). Rotación óptica: [α]_D²⁵ +70.9°(c 0.67, metanol)

25 *Etapas 3.* Síntesis de ácido amino(biciclo[4.2.0]octa-1,3,5-

trien-7-il)acético, sal de clorhidrato (#101). Una mezcla de #100 (200 mg, 0.912 mmol, 1 eq.) y 6 N ácido clorhídrico acuoso (12.3 mL, 73.8 mmol, 81 eq.) fue calentada a reflujo durante la noche. La mezcla de reacción fue concentrada *in vacuo* para dar el enantiómero individual #101 (195 mg) como un sólido amarillento, el cual fue utilizado en la siguiente etapa sin purificación adicional.

Etapa 4. Síntesis de metil amino(biciclo[4.2.0]octa-1,3,5-trien-7-il)acetato, sal de clorhidrato (#102). A una mezcla de #101 (195 mg, <0.913 mmol, 1 eq.) en metanol (20 mL, 0.04 M) se agregó cloruro de tionilo (0.666 mL, 9.13 mmol, 10 eq.). Después de dos horas sometida a calentamiento a reflujo, la mezcla de reacción fue concentrada *in vacuo* para dar el enantiómero individual #102 (175 mg, 84% en dos etapas) como un sólido de color claro. LC-MS: m/z 192.3 $[M+H^+]$, tiempo de retención = 0.80 minutos; GC-MS: m/z 192 $[M+H^+]$, tiempo de retención = 3.206 minutos; ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 7.24-7.33 (m, 2H), 7.11-7.18 (m, 2H), 4.40 (d, $J=6.9$ Hz, 1H), 3.99-4.05 (m, 1H), 3.78 (s, 3H), 3.46 (dd, $J=14.8, 5.4$ Hz, 1H), 3.23 (dd, $J=14.8, 2.5$ Hz, 1H).

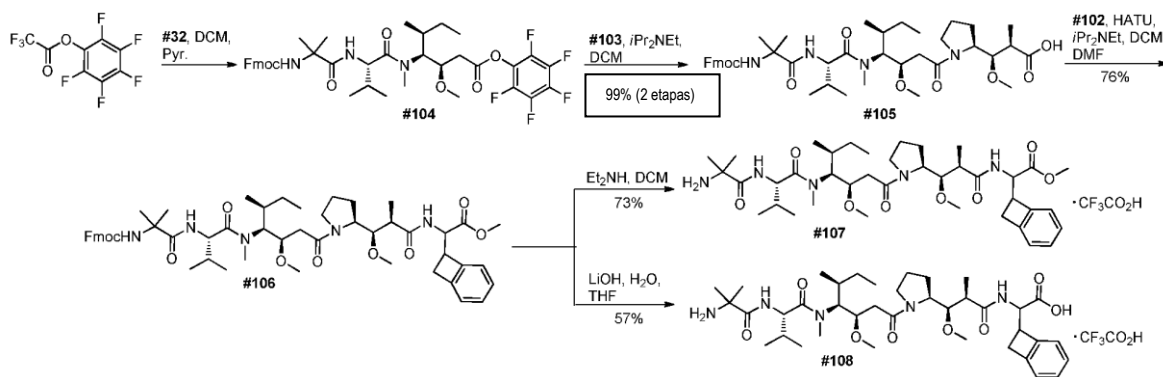
20 Preparación de ácido (2R,3R)-3-metoxi-2-metil-3-[(2S)-pirrolidin-2-il]propanóico, sal de clorhidrato (#103)



A una mezcla de #11 (4.09 g, 14.2 mmol, 1 eq.) en ciclopentil

metil éter (10 mL, 0.14 M) se agregó una solución de 4 N cloruro de hidrógeno (37 mL, 100 mmol, 7 eq.). Después de tres horas, la mezcla de reacción fue concentrada *in vacuo* y formada como azeotropo tres veces con heptano para dar **#103** (1000 mg, 31%) como una goma, la cual fue utilizada en la siguiente etapa sin purificación adicional. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9.92-10.06 (br s, 1H), 8.66-8.80 (br s, 1H), 3.89 (dd, J=5.2, 4.9 Hz, 1H), 3.43-3.53 (m, 1H), 3.39 (s, 3H), 3.06-3.17 (m, 2H), 2.66 (qd, J=7.1, 4.6 Hz, 1H), 1.71-2.03 (m, 4H), 1.11 (d, J=7.1 Hz, 3H).

Preparación de 2-Metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[1-(bicyclo[4.2.0]octa-1,3,5-trien-7-il)-2-metoxi-2-oxoetil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida, sal de ácido trifluoroacético (#107) y 2-metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[bicyclo[4.2.0]octa-1,3,5-trien-7-il(carboxi)metil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida, sal de ácido trifluoroacético (#108)



Etapa 1. Síntesis de N-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-2-metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-5-metil-1-oxo-1-(pentafluorofenoxi)heptan-4-il]-N-metil-L-valinamida (**#104**). A **#32** (4.00 g, 6.56 mmol, 1 eq.) en diclorometano (20 mL, 0.33 M) y piridina (1.06 mL, 13.1 mmol, 2 eq.) se agregó mediante goteo pentafluorofenil trifluoroacetato (2.25 mL, 13.1 mmol, 2 eq.). La mezcla de reacción fue sometida a agitación durante una hora.

A un segundo matraz que contiene **#32** (360 mg, 0.59 mmol) en diclorometano (0.6 mL, 1 M) y piridina (0.095 mL, 1.2 mmol, 2 eq.) se agregó mediante goteo pentafluorofenil trifluoroacetato (0.203 mL, 1.18 mmol). Esta mezcla de reacción fue sometida a agitación durante 15 minutos.

Las dos mezclas de reacción fueron combinadas, lavadas dos veces con 1 N ácido clorhídrico acuoso, secadas sobre sulfato de sodio, filtradas y concentradas *in vacuo*. El aceite de color amarillo resultante se disolvió en acetato de etilo, se pre-adsorbió sobre gel de sílice y fue purificado mediante cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 0% hasta 40% acetato de etilo en heptano) para dar **#104** (4.6 g, 83%) como una espuma de color blanco que contiene algunas

impurezas. LC-MS: m/z 798.3 $[M+Na^+]$, tiempo de retención = 1.23 minutos.

Etapa 2. Síntesis de N-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-2-metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-2-carboxi-1-metoxipropil]pirrolidin-1-il]-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida (**#105**). A una mezcla de **#104** (2.00 g, ≤ 2.58 mmol, 1 eq.) en diclorometano (6 mL, 0.4 M) se agregó una solución de **#103** (483 mg, 2.16 mmol, 1 eq.) en diclorometano (2 mL) seguida por diisopropiletilamina (1.35 mL, 7.73 mmol, 3 eq.). La mezcla de reacción fue sometida a agitación durante 16 horas, después adsorbida sobre sílice y purificada mediante cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 0% hasta 20% metanol en diclorometano) para dar **#105** (1.67 g, 83%) como una espuma de color blanco. Las fracciones que contienen el producto deseado con impurezas (0.571 g) se recolectaron por separado.

La reacción y purificación anteriores se repitieron de una manera similar utilizando **#104** (2.60 g, < 3.35 mmol, 1 eq.), **#103** (750 mg, 3.35 mmol, 1 eq.), diclorometano (10 mL, 0.3 M) y diisopropiletilamina (1.35 mL, 7.73 mmol, 2.3 eq.) para dar **#105** (2.4 g, 92%) como una espuma de color marrón. Las fracciones que contienen el producto impuro (1.7 g) se combinaron con las fracciones impuras previas y fueron purificadas como se describió con anterioridad para obtener **#105** adicional (1.30 g, rendimiento cuantitativo para ambas

reacciones en dos etapas). LC-MS: m/z 779.3 $[M+H^+]$, 802.3 $[M+Na^+]$, tiempo de retención = 1.05 minutos.

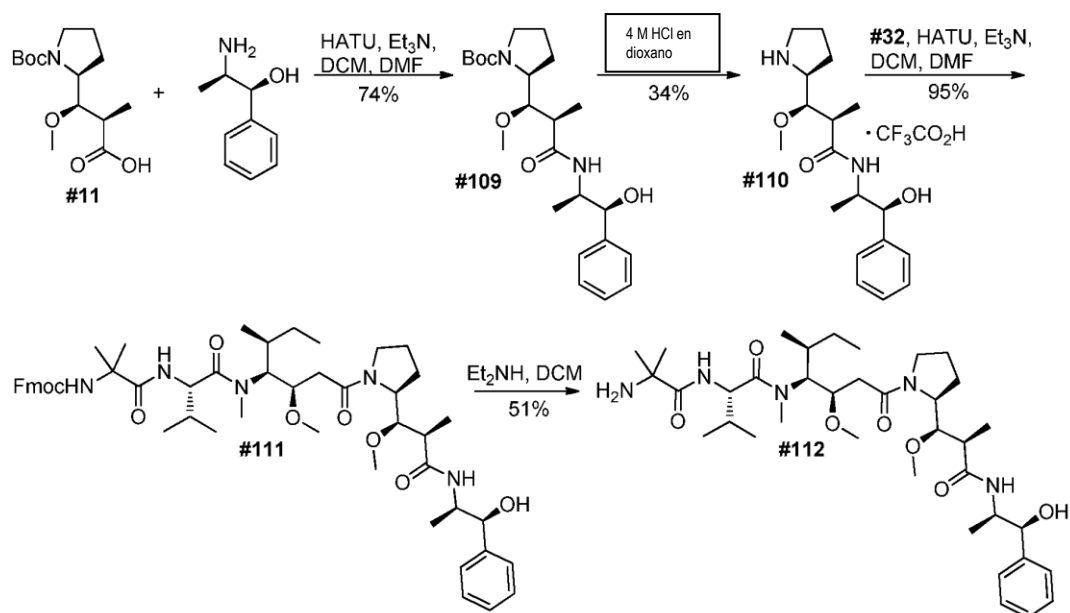
Etapas 3. Síntesis de N-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-2-metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-[[1-(biciclo[4.2.0]octa-1,3,5-trien-7-il)-2-metoxi-2-oxoetil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida (#106). A una mezcla de #105 (225 mg, 0.289 mmol, 1 eq.) en diclorometano (15 mL, 0.02 M) y N,N-dimetilformamida (1 mL) se agregó HATU (136 mg, 0.347 mmol, 1.2 eq.). Después de cinco minutos, se agregó una solución de amina #102 (72.4 mg, 0.318 mmol, 1 eq.) y se añadió diisopropilamina (203 μ L, 1.16 mmol, 3 eq.) en diclorometano (5 mL). Después de 24 horas, la mezcla de reacción fue lavada con salmuera, secada sobre sulfato de sodio, filtrada, concentrada *in vacuo* sobre gel de sílice, y purificada mediante cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 0% hasta 50% acetona en heptano) para dar el enantiómero individual #106 (210 mg, 76%) como un aceite claro. LC-MS: m/z 953.1 $[M+H^+]$, tiempo de retención = 3.99 minutos; ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$), suponiendo que es una mezcla de rotámeros, señales características: 7.76 (d, $J=7.5$ Hz, 2H), 7.57-7.64 (m, 2H), 7.40 (dd, $J=7.5$, 7.4 Hz, 2H), 7.28-7.34 (m, 2H), 4.82-4.88 (m, 1H), 3.95-4.01 (m, 1H), 3.76 y 3.82 (2 s, total 3H), 3.30, 3.31, 3.34 y 3.35 (4 s, total 6H), [1.20 (d, 10 $J=7.0$ Hz) y 1.20 (d, $J=7.0$ Hz), total 3H].

Etapas 4A. Síntesis de 2-metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-[[1-(biciclo[4.2.0]octa-1,3,5-trien-7-il)-2-metoxi-2-

oxoetil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida, sal de ácido trifluoroacético (#107). De acuerdo con el procedimiento general A, a partir de #106 (25 mg, 0.026 mmol, 1 eq.) en diclorometano (10 mL, 0.003 M) y dietilamina (4 mL) se sintetizó el material deseado crudo, el cual fue purificado mediante cromatografía de fase inversa (Método C) para dar el enantiómero individual #107 (16 mg, 73%) como un sólido. LC-MS: m/z 730.8 $[M+H^+]$, tiempo de retención = 2.13 minutos; HPLC (Protocolo N): tiempo de retención = 9.889 minutos.

Etapas 4B. Síntesis de 2-metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[[biciclo[4.2.0]octa-1,3,5-trien-7-yl(carboxi)metil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il]-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida, sal de ácido trifluoroacético (#108). El enantiómero individual #108 (94.5 mg, 57%) se sintetizó a partir de #106 (190 mg, 0.200 mmol) de acuerdo con un procedimiento similar a aquel descrito para la Síntesis de #41 a partir de #40. LC-MS: m/z 716.8 $[M+H^+]$, tiempo de retención = 2.06 minutos; HPLC (Protocolo N): tiempo de retención = 9.137 minutos.

Preparación de 2-metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il]-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-vanilamida (#112)



Etapa 1. Síntesis de ter-butil (2S)-2-[(1R,2R)-3-[[1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il]amino]-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-carboxilato (#109). A una solución de #11 (2.00 g, 6.96 mmol, 1 eq.) en diclorometano (21 mL, 0.3 M) y N,N-dimetilformamida (3 mL) se agregó HATU (3270 mg, 8.35 mmol, 1.2 eq.). Después de dos minutos, se agregaron la amina (1R,2S)-(+)-norefedrina (1.07 mg, 6.96 mmol, 1 eq.) y trietilamina (1.94 mL, 13.9 mmol, 2 eq.). Después de dos horas, la mezcla de reacción fue diluida con acetato de etilo (100 mL), lavada con una solución de 1 M ácido clorhídrico acuosa y con salmuera, secada sobre sulfato de sodio, filtrada, concentrada *in vacuo*, y purificada mediante cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 0% hasta 60% acetato de etilo en heptano) a fin de proporcionar #109 (2.18 g, 74%) como un sólido de color blanco. LC-MS: *m/z* 321.3 [(M-Boc)+H⁺], tiempo de retención = 3.14 minutos; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆), suponiendo que es una mezcla de rotámeros, señales características: δ 7.64 (d,

$J=8.6$ Hz, 1H), 7.24-7.33 (m, 4H), 7.15-7.21 (m, 1H), 5.35 (br d, $J=5$ Hz, 1H), 4.45 (br dd, $J=5, 5$ Hz, 1H), 3.91-4.00 (m, 1H), 3.30-3.39 (m, 1H), 3.26 (s, 3H), 2.94-3.07 (m, 1H), 2.04-2.14 (m, 1H), 1.46-1.78 (m, 4H), 1.40 (s, 9H), 0.97-1.04 (m, 6H).

5 *Etapa 2.* Síntesis de (2R,3R)-N-[(1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il]-3-metoxi-2-metil-3-[(2S)-pirrolidin-2-il]propanamida, sal de ácido trifluoroacético (#110). De acuerdo con el procedimiento general C, a 0°C a partir de #109 (414 mg, 0.984 mmol, 1 eq.), dioxano (5 mL, 0.2 M) y una solución
10 de 4 M cloruro de hidrógeno en dioxano (15 mL, 60 mmol, 60 eq.) se sintetizó el compuesto crudo deseado, el cual fue purificado mediante cromatografía de fase inversa (Método C) para dar #110 (120 mg, 34%) como un líquido viscoso. LC-MS: m/z 321.1 [M+H⁺], tiempo de retención = 0.55 minutos; ¹H NMR
15 (400 MHz, DMSO-d₆), señales características: δ 7.90 (d, $J=8.6$ Hz, 1H), 7.28-7.36 (m, 4H), 7.20-7.27 (m, 1H), 4.46 (d, $J=6.2$ Hz, 1H), 3.48 (dd, $J=8.6, 2.3$ Hz, 1H), 3.38 (s, 3H), 2.92-3.16 (m, 3H), 2.24-2.35 (m, 1H), 1.49-1.88 (m, 4H), 1.09 (d, $J=6.6$ Hz, 3H), 1.01 (d, $J=6.6$ Hz, 3H).

20 *Etapa 3.* Síntesis de N-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-2-metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida (#111). De acuerdo con el procedimiento
25 general D, a partir de #32 (140 mg, 0.230 mmol, 1 eq.), #110

(110 mg, 0.253 mmol, 1.1 eq.), diclorometano (3 mL, 0.08 M), N,N-dimetilformamida (0.5 mL), HATU (96.2 mg, 0.253 mmol, 1.1 eq) y trietilamina (96 μ L, 0.69 mmol, 3 eq.) se sintetizó el producto crudo deseado, el cual fue purificado mediante cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 0% hasta 40% acetona en heptano) para dar #111 (220 mg, 95%). LC-MS: m/z 912.4 [$M+H^+$], 935.4 [$M+Na^+$], tiempo de retención = 2.15 minutos; HPLC (Protocolo B): m/z 912.5 [$M+H^+$], 934.5 [$M+Na^+$], tiempo de retención = 10.138 minutos (pureza >94%); ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6), suponiendo que es una mezcla de rotámeros, señales características: δ 7.89 (d, $J=7.8$ Hz, 2H), 7.66-7.75 (m, 2H), 7.41 (dd, $J=7.4$, 7.4 Hz, 2H), 7.12-7.20 (m, 1H), [5.33 (d, $J=4.7$ Hz) y 5.38 (d, $J=4.7$ Hz), total 1H], 3.15, 3.18, 3.22 y 3.23 (4 s, total 6H), 1.30, 1.33, 1.36 y 1.39 (4 s, total 6H), 0.95-1.06 (m, 6H).

Etapa 4. Síntesis de 2-metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida (#112). De acuerdo con el procedimiento general A, a partir de #111 (210 mg, 0.230 mmol) en diclorometano (5 mL, 0.05 M) y dietilamina (5 mL) se sintetizó el material deseado crudo, el cual fue purificado mediante cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 0% hasta 10% metanol en diclorometano) para dar una mezcla de un aceite y un sólido. Se agregaron éter dietílico y heptano y la mezcla fue concentrada *in vacuo*, produciendo #112 (81 mg, 51%) como un sólido de color blanco. LC-MS: m/z 690.4 [$M+H^+$],

tiempo de retención = 1.10 30 minutos; HPLC (Protocolo A):
m/z 690.5 [M+H⁺], 712.4 [M+Na⁺], tiempo de retención = 7.229
 minutos (pureza > 90%); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆),
 suponiendo que es una mezcla de rotámeros, señales
 5 características: δ [7.62 (br d, J=8 Hz), 7.88 (br d, J=8 Hz), 8.07
 (br d, J=9 Hz) y 8.11 (br d, J=9 Hz), total 2H], 7.15-7.34 (m,
 5H), [5.34 (d, J=4 Hz) y 5.41 (d, J=5 Hz), total 1H], 3.18, 3.21,
 3.23 y 3.25 (4 s, total 6H), 2.93 y 3.08 (2 br s, total 3H), 1.15,
 1.18, 1.21 y 1.25 (4 s, total 6H).

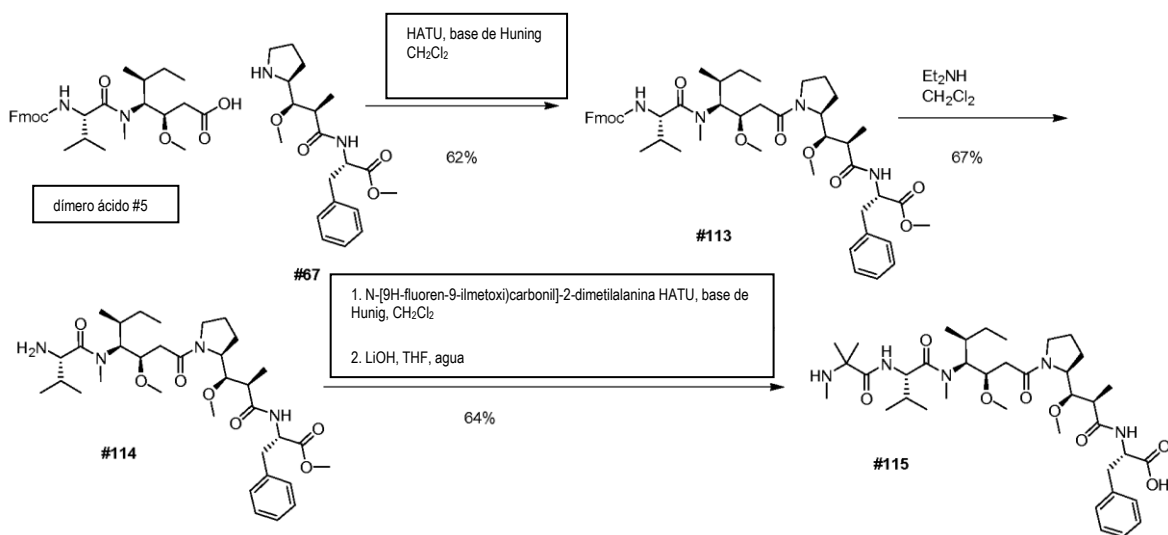
10

**Preparación de N,2-dimetilalanil-N-{(1S,2R)-4-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-
 {[(1S)-1-carboxi-2-feniletil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]
 pirrolidin-1-il}-2-metoxi-1-[(1S)-1-metilpropi1]-4-oxobutill-N-
 metil-L-valinamida, sal de ácido trifluoroacético (115).**

15

20

25



Etapa 1. Síntesis de metil N-[(2R,3R)-3-[(2S)-1-[(3R,4S,5S)-4-
 5 [[N-R9H-fluoren-9-ilmetoxi]carbonil-L-valil](metil)amino]-3-metoxi-5-
 metilheptanoil]pirrolidin-2-il]-3-metoxi-2-metilpropanoil]-L-
 fenilalaninato (**#113**). A una mezcla sometida a agitación de dímero
 ácido **#5** (12.1 g, 23.0 mM) y **#67** (11.5 g, 23.0 mM) en 75 mL de
 diclorometano bajo nitrógeno, se agregó HATU (10.8 g, 27.6 mM)
 10 seguido por base de Hunig (12.1 mL, 69.0 mM). Se permitió la
 agitación de la reacción a temperatura ambiente durante 15 horas.
 La reacción fue concentrada a un menor volumen, absorbida con
 acetato de etilo y lavada con 1 N HCl dos veces. La capa orgánica
 fue lavada después con salmuera, secada sobre sulfato de sodio,
 15 filtrada, y concentrada *in vacuo*. El residuo fue purificado después
 mediante cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 0% hasta 70%
 acetona en heptanos), produciendo **#113** (12.3 g, 62%) como un
 sólido de color blanco. LC-MS (Protocolo Q): m/z 855.3 $[\text{M}+\text{H}^+]$,

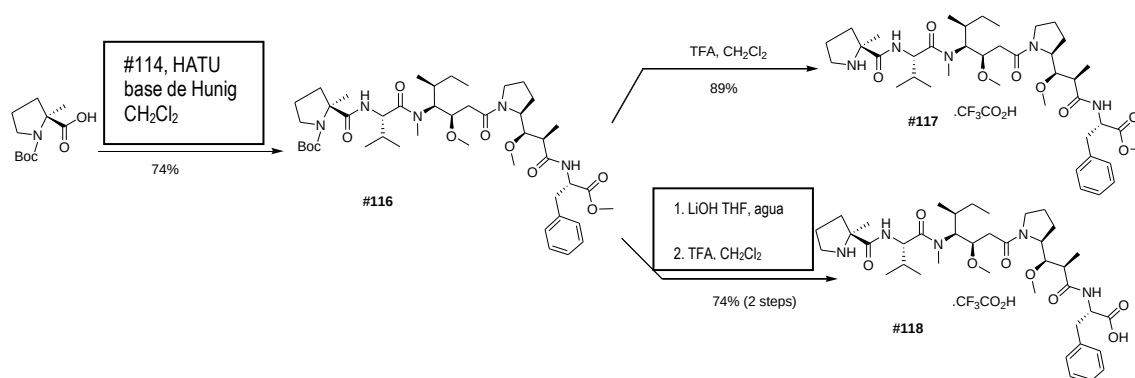
877.2 [M+Na⁺], tiempo de retención = 2.32 minutos; HPLC (Protocolo R): /z 855.5 [M+H⁺], tiempo de retención = 9.596 minutos (pureza > 97%).

Etapas 2. Síntesis de metil N-{(2R,3R)-3-metoxi-3-[(2S)-1-
5 {(3R,4S,5S)-3-metoxi-5-metil-4-[metil(L-valil)amino]heptanoil}pirrolidin-2-il]-2-metilpropanoil}-L-fenilalaninato (**#114**). De acuerdo con el procedimiento general A, a partir de **#113** (12 g, 14 mmol, 1 eq.), diclorometano (60 mL, 0.24 M) y dietilamina (40 mL, 390 mM) se sintetizó **#114**
10 (5.9 g, 67%) como un sólido de color blanco/amarillo claro después de la purificación mediante cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 0% hasta 25% metanol en diclorometano). LC-MS (Protocolo Q): *m/z* 633.0 [M+H⁺], tiempo de retención = 1.19 minutos. HPLC (Protocolo A): /z 633.5 [M+H⁺], tiempo de
15 retención = 7.142 minutos (pureza > 98%).

Etapas 3. Síntesis de N,2-dimetilalanil-N-{(1S,2R)-4-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1S)-1-carboxi-2-feniletil]amino]-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-yl}-2-metoxi-1-[(1S)-1-metilpropil]-4-oxobutil}-N-metil-L-valinamida-sal de ácido trifluoroacético
20 (**#115**). A una mezcla sometida a agitación de N-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil-N,2-dimetilalanina (167 mg, 0.493 mM), **#114** (260 mg, 0.411 mM), y HATU (188 mg, 0.493 mM) en 10 mL de diclorometano, se agregó base de Hunig (0.14 mL, 0.82 mM). Se permitió la agitación de la reacción a temperatura ambiente
25 durante 1 hora y 20 minutos. Se redujo la reacción. Se agregó

THF (9 mL) al material crudo y a esta mezcla sometida a agitación se añadió hidróxido de litio (49.2 mg, 2.06 mM) disuelto en 3 mL de agua. Se permitió la agitación de la reacción a temperatura ambiente durante 4 horas. La reacción fue concentrada seguida por la
 5 purificación a través de cromatografía C18 de fase inversa y presión media (Gradiente: 5% hasta 45% agua en acetonitrilo con 0.02% TFA en cada fase) #115 (218 mg, 64%) sólido de color blanco. LC-MS (Protocolo Q): m/z 718.7 $[M+H^+]$, 740.6 $[M+Na^+]$, tiempo de retención = 1.21 minutos. HPLC (Protocolo A a 45°C): m/z 718.4 $[M+H^+]$,
 10 tiempo de retención = 6.903 minutos. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6), δ 8.81-8.95 (m), 8.44-8.50 (m), 8.42 (d), 8.15 (d), 7.14-7.28 (m), 4.71-4.78 (m), 4.57-4.66 (m), 4.49-4.56 (m), 4.41-4.48 (m), 3.94-4.05 (m), 3.72-3.79 (m), 3.39-3.60 (m), 2.95-3.33 (m), 2.78-2.89 (m), 2.69 (s), 2.43-2.50 (m), 2.08-2.42 (m), 1.60-1.92 (m), 1.20-1.57 (m), 0.84-1.11
 15 (m), 0.74-0.83 (m).

**Preparación de 2-metil-L-prolil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-3-{(2S)-1-metoxi-1-oxo-3-fenilpropan-2-il]amino}-2-metil-3 oxopropil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-
 20 4-il]-N-metil-L-valinamida, sal de ácido trifluoroacético (#117) y 2-metil-L-prolil-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1S)-1-carboxi-2-feniletil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida, sal de ácido trifluoroacético (#118).**



Etapas 1. Síntesis de 1-(ter-butoxicarbonil)-2-metil-L-prolil-N-{(1S,2R)-4-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{(1S)-1-bencil-2-metoxi-2-oxoetil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-2-metoxi-1-[(1S)-1-metilpropil]4-oxobutil}-N-metil-L-valinamida (#116). A una solución sometida a agitación #114 (1.02 g, 1.61 mmol, 1.0 eq.) y 1-(ter-butoxicarbonil)-2-metil-L-prolina (443 mg, 1.93 mmol, 1.2 eq.) en 12 mL de diclorometano, se agregó HATU (735 mg, 1.93 mmol, 1.2 eq.) seguido por base de Hunig (1.12 mL, 6.45 mmol, 4.0 eq.). Se permitió la agitación de la reacción a temperatura ambiente durante 2 horas. La reacción fue reducida, diluida con acetato de etilo antes de ser lavada con 0.5 N HCl y salmuera. Los elementos orgánicos fueron secados sobre sulfato de sodio, reducidos a un volumen menor, y después reducidos sobre sílice. Se efectuó después la cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 0%-45% acetona en heptanos) produciendo #116 (1.02 g, 74%) como un sólido de color blanco. LC-MS (Protocolo Q): m/z 844.3 $[\text{M}+\text{H}^+]$, 867.2 $[\text{M}+\text{Na}^+]$, tiempo de retención = 2.15 minutos.

20 *Etapas* 2A. Síntesis de 2-metil-L-prolil-N-{(1S,2R)-4-{(2S)-

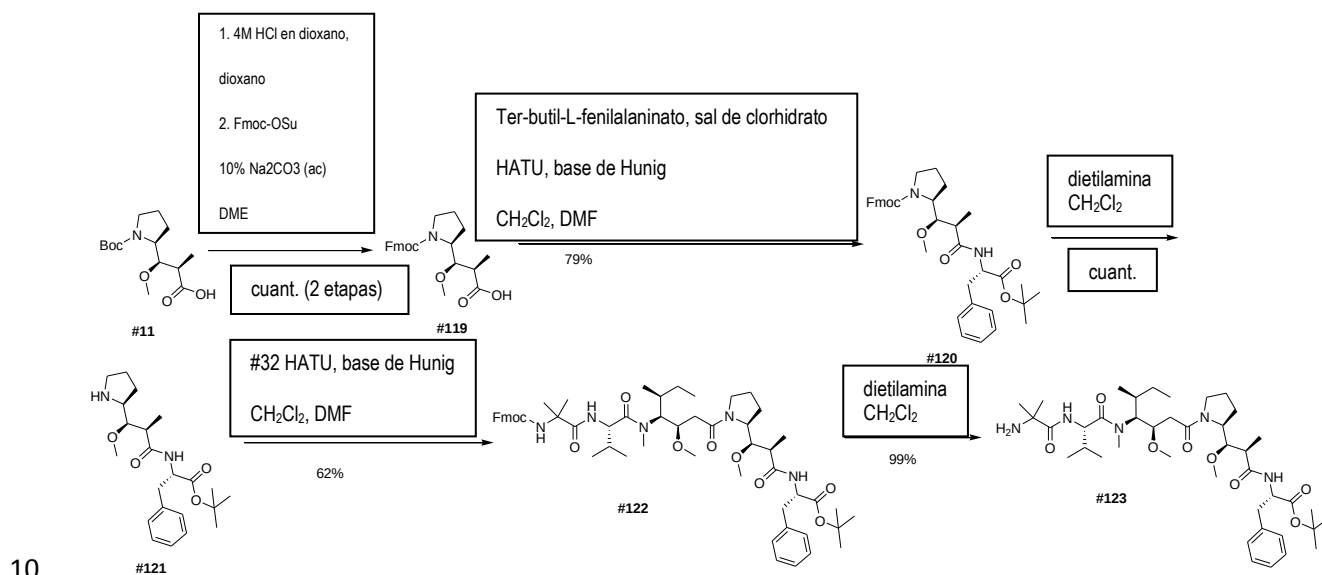
2-[(1R,2R)-3-[[[(1S)-1-bencil-2-metoxi-2-oxoetil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il]-2-metoxi-1-[(1S)-1-metilpropil]-4-oxobutil}-N-metil-L-valinamida, sal de ácido trifluoroacético (#117). A una solución sometida a agitación #116 (450 mg, 0.533 mmol, 1.0 eq.) en 7 mL de diclorometano a 0°C, se agregó TFA (3 mL, 40 mmol, 70 eq.). Se permitió la agitación de la reacción a 0°C durante 5 minutos y después se permitió el calentamiento hasta temperatura ambiente mientras se sometió a agitación durante 20 minutos. La reacción fue reducida, diluida con diclorometano y una pequeña cantidad de metanol antes de ser reducida sobre sílice. Se efectuó después la cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 0%-20% metanol en acetato de etilo) produciendo #117 (396 mg, 89%) como un sólido de color blanco. LC-MS (Protocolo Q): *m/z* 744.5 [M+H⁺], 767.2 [M+Na⁺], tiempo de retención = 1.40 minutos; HPLC (Protocolo A at 45 °C): *m/z* 744.5 [M+H⁺], tiempo de retención = 7.149 minutos (pureza > 91%). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ 8.73-9.14 (m), 8.66 (br d), 8.50 (d), 8.22 (d), 7.12-7.25 (m), 4.67-4.74 (m), 4.41-4.63 (m), 3.93-4.00 (m), 3.73 (dd), 3.63 (d), 3.46-3.57 (m), 3.38-3.45 (m), 3.26-3.23 (m), 3.22-3.25 (m), 3.06-3.22 (m), 2.99- 3.05 (m), 2.93-2.97 (m), 2.80-2.89 (m), 2.75-2.78 (m), 2.64- 2.67 (m), 2.46-2.50 (m), 2.27- 2.43 (m), 2.00-2.26 (m), 1.85- 1.99 (m), 1.70-1.83 (m), 1.52-1.69 (m), 1.33- 1.51(m), 1.18-1.31 (m), 0.98-1.07 (m), 0.93-0.97 (m), 0.82-0.92 (m), 0.71-0.78 (m).

Step2B. Síntesis de 2-metil-L-prolil-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[[[(1S)-1-carboxi-2-feniletil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-

oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida, sal de ácido trifluoroacético (**#118**). A una solución sometida a agitación **#116** (435 mg, 0.515 mmol), en 4 mL de THF bajo nitrógeno, se agregó LiOH (24.7 mg, 1.03 mmol, 2.0 eq.) disuelto en 2 mL de agua. Se permitió la agitación de la reacción a temperatura ambiente hasta que LC-MS indicó saponificación del éster de metilo. La reacción fue concentrada *in vacuo* y después colocada bajo vacío. La reacción fue diluida con diclorometano y colocada bajo nitrógeno. A esta mezcla sometida a agitación se agregó TFA (3mL, 40.5 mmol, 80 eq.). Se permitió la agitación de la reacción a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se redujo la reacción. La reacción fue purificada mediante cromatografía C18 de fase inversa y presión media (Gradiente: 5% hasta 60% acetonitrilo en agua con 0.02% TFA en cada fase) **#118** (396 mg, 89%) como un sólido de color blanco. LC-MS (Protocolo Q): *m/z* 730.2 [M+H⁺], tiempo de retención = 1.18 minutos; HPLC (Protocolo A at 45 °C): *m/z* 730.5 [M+H⁺], tiempo de retención = 7.088 minutos (pureza > 98%). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ 9.04-9.13 (m), 8.75-8.87 (m), 8.70 (d), 8.38 (d), 8.11(d), 7.10-7.24 (m), 4.66-4.74 (m), 4.48-4.64 (m), 4.37-4.47 (m), 3.91-3.99 (m), 3.77 (m), 3.47-3.56 (m), 3.33-3.47 (m), 3.08-3.30 (m), 2.93-3.07 (m), 2.75-2.86 (m), 2.63-2.69 (m), 2.45-2.50 (m), 2.28-2.44 (m), 2.03-2.27 (m), 1.88-2.02 (m), 1.68-1.86 (m), 1.55-1.67 (m), 1.30-1.47 (m), 1.17-1.29 (m),

0.98-1.05 (m), 0.93-0.97 (m), 0.83-0.92 (m), 0.71-0.79 (m).

**Preparación de 2-Metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-
 5 [[(2S)-1-ter-butoxi-1-oxo-3-fenilpropan-2-il]amino}-1-metoxi-2-
 metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-
 il]-N-metil-L-valinamida (#123).**



Etapa 1. Síntesis de ácido (2R,3R)-3-{(2S)-1-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]pirrolidin-2-il}-3-metoxi-2-metilpropanóico (#119). A una solución sometida a agitación #11 (2.4 g, 8.4 mmol, 1.0 eq.) en
 15 10 mL de dioxano bajo nitrógeno, se agregó 4M HCl en dioxano (20 mL, 80 mM, 10 eq.). Se permitió la agitación de la reacción a temperatura ambiente durante 3 horas antes de ser concentrada *in vacuo* y colocada bajo alto vacío. El material crudo fue disuelto después con 30 mL de 10% Na₂CO₃. Esta solución fue agregada
 20 después a una solución sometida a agitación de 1-[(9H-fluoren-9-

ilmetoxi)carbonil]oxi}pirrolidin-2,5-diona (2.96 g, 8.77 mmol, 1.05 eq.) en 30 mL de DME. Se permitió la agitación de la reacción a temperatura ambiente hasta que TLC (20% metanol/40% acetato de etilo/40% heptanos) indicó el consumo
 5 del material de partida Boc desprotegido. La reacción fue concentrada *in vacuo* a un volumen menor, lavada dos veces con éter, acidificada hasta pH 2 utilizando HCl concentrado y después extraída tres veces con una solución de 90% diclorometano 10%metanol. Los elementos orgánicos fueron
 10 lavados con bicarbonato de sodio saturado y salmuera antes de ser secados sobre sulfato de sodio, filtrados, y concentrados *in vacuo* para dar un sólido de color café **#119** (3.4 g, cuant.). LC-MS (Protocolo Q): *m/z* 410.0 [M+H⁺], tiempo de retención = 1.81 minutos.

15 *Etapas 2.* Síntesis de ter-butil N-[(2R,3R)-3-{(2S)-1-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]pirrolidin-2-il}-3-metoxi-2-metilpropanoil]-L-fenilalaninato (**#120**). A una solución sometida a agitación de ter-butil L-fenilalaninato, sal de clorhidrato (1.67 g, 6.5 mmol, 1.0 eq.) y **#119** (5.9 g, 6.5 mmol,
 20 1.0 eq.) en 50 mL de diclorometano y 5 mL de DMF, se agregó HATU (2.9g, 7.9 mmol, 1.2 eq.) seguido por base de Hunig (5.6 mL, 32 mmol, 5.0 eq.). Se permitió la agitación de la reacción a temperatura ambiente durante 45 minutos. La reacción fue reducida, diluida con acetato de etilo, lavada con 0.5 N HCl y
 25 salmuera antes de ser concentrada sobre sílice. Se efectuó

después la cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 0%-25% acetona en heptano) produciendo **#120** (3.14 g, 79%) como un sólido de color blanco-amarillo. LC-MS (Protocolo Q): m/z 613.1 $[M+H^+]$ tiempo de retención = 2.37 minutos.

5 *Etapas 3.* Síntesis de ter-butil N-[(2R,3R)-3-metoxi-2-metil-3-[(2S)-pirrolidin-2-il]propanoil]-L-fenilalaninato (**#121**). A una solución sometida a agitación **#120** (2.87 g, 4.68 mmol, 1.00 eq.) en 20 mL de diclorometano, se agregó dietilamina (10 mL, 95 mM, 20.5 eq.). Se permitió la agitación de la reacción a temperatura ambiente durante
10 2 horas. Se agregaron (10 mL, 95 mmol, 20.5 eq.) de dietilamina y se permitió la agitación de la reacción a temperatura ambiente durante 3 horas más. La reacción fue concentrada *in vacuo* y colocada bajo alto vacío produciendo **#121** (1.8 g, cuant.) mezcla sólido aceite de color amarillo-blanco. LC-MS (Protocolo Q): m/z 391.1 $[M+H^+]$ tiempo
15 de retención = 1.05 minutos.

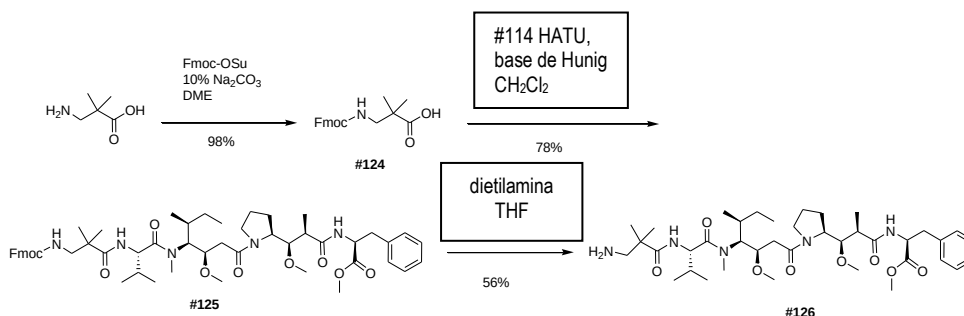
Etapas 4. Síntesis de N-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-2-Metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(2S)-1-ter-butoxi-1-oxo-3-fenilpropan-2-il]amino]-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il]-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida (**#122**).
20 A una solución sometida a agitación **#121** (0.55 g, 1.0 mmol, 1.0 eq.) en 10 mL de diclorometano y 1 mL de DMF, se agregó **#32** (0.62 g, 1.0 mmol, 1.0 eq.) seguido por HATU (0.42 g, 1.1 mmol, 1.1 eq.) y base de Hunig (0.72 mL, 4.1 mmol, 4.0 eq.). Se permitió la agitación de la reacción a temperatura ambiente durante aproximadamente 21
25 horas. La reacción fue reducida, diluida con acetato de etilo, y

después lavada con 0.5 N HCl y salmuera. La capa orgánica fue secada sobre sulfato de sodio, filtrada y concentrada a un volumen menor antes de ser concentrada sobre sílice. Se efectuó después la cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 0%-40% acetona en heptano) produciendo **#122** (0.62 g, 62%) como un sólido de color blanco. LC-MS (Protocolo Q): m/z 982.3 $[M+H^+]$ tiempo de retención = 2.44 minutos.

Etapla 5. Síntesis de 2-Metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(2S)-1-ter-butoxi-1-oxo-3-fenilpropan-2-il]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida (**#123**). A una mezcla sometida a agitación de **#122** (600 mg, 0.611 mmol, 1.00 eq.) en 15 mL de diclorometano, se agregó dietilamina (5 mL, 50 mmol, 80 eq.). Se permitió la agitación de la reacción a temperatura ambiente durante 3 horas. La reacción fue concentrada *in vacuo* y la mezcla fue purificada mediante cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 0%-40% metanol en diclorometano) produciendo **#123** (0.46 g, 99%) como un sólido. LC-MS (Protocolo Q1): m/z 760.3 $[M+H^+]$ tiempo de retención = 0.83 minutos. ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD), δ 7.14-7.30 (m), 4.70-4.78 (m), 4.56-4.64 (m), 4.05-4.19 (m), 3.87 (dd), 3.79-3.84 (m), 3.72-3.77 (m), 3.62-3.70 (m), 3.46-3.56 (m), 3.37-3.45 (m), 3.33-3.36 (m), 3.16-3.24 (m), 3.09-3.11 (m), 2.98-3.05 (m), 2.95 (d), 2.91 (d), 2.87 (d), 2.83 (d), 2.73-2.79 (m), 2.40-2.51 (m), 2.29-2.39 (m), 2.16-2.28 (m), 2.04-2.15 (m), 2.01

(s), 1.73-1.96 (m), 1.50-1.68 (m), 1.47-1.49 (m), 1.46 (s), 1.43 (s), 1.38 (s), 1.35 (d), 1.23-1.32 (m), 1.17-1.22 (m), 1.15 (d), 1.04-1.11 (m), 0.94- 1.03 (m), 0.82-0.91 (m).

5 **Preparación de metil N-[(2R,3R)-3-[(2S)-1-[(3R,4S,5S)-4-[[N-(3-amino-2,2-dimetilpropanoíl)-L-valil](metil)amino}-3-metoxi-5-metilheptanoíl]pirrolidin-2-il}-3-metoxi-2-metilpropanoíl]-L-fenilalaninato (#126).**



10

Etap 1. Síntesis de ácido 3-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]amino}-2,2-dimetilpropanóico (#124). Una solución de clorhidrato de ácido 3-amino-2,2-dimetilpropanóico (1.0 g, 6.5 mmol, 1.0eq.) en 10 mL de 10% Na₂CO₃ fue agregada a una solución de 1-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]oxi}pirrolidin-2,5-diona (2.3 g, 6.5 mmol, 1.0 eq.) en 10 mL de DME. Se permitió la agitación de la reacción a temperatura ambiente durante la noche. La reacción fue concentrada a un volumen menor y después lavada dos veces con éter. La capa acuosa fue acidificada hasta pH <2 con HCl concentrado y después extraída tres veces con una solución de 10% metanol 90% diclorometano. Los elementos orgánicos fueron combinados antes de ser lavados con 1M HCl y salmuera. La capa

15

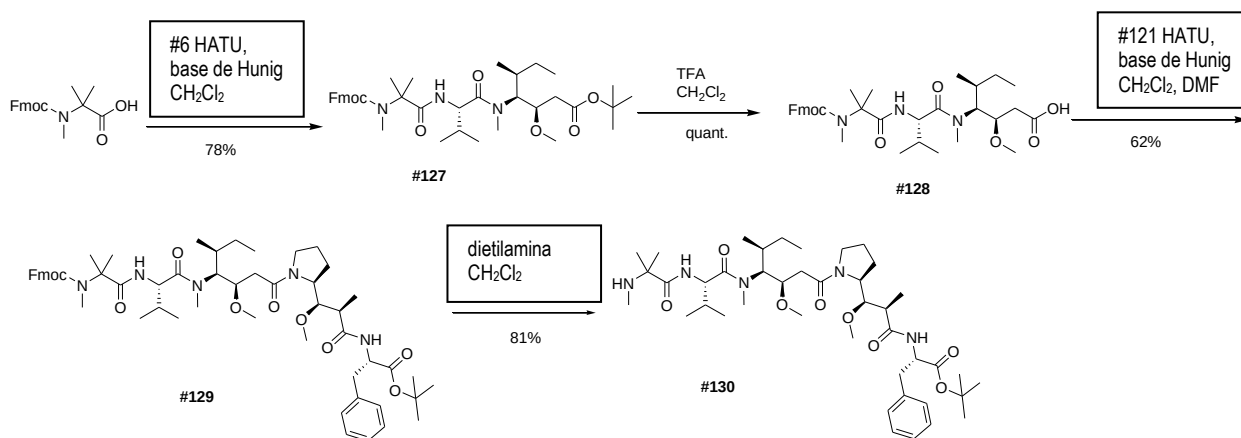
20

orgánica fue secada sobre sulfato de sodio y concentrada *in vacuo* produciendo **#124** (2.2 g, 98%) como un sólido de color blanco. LC-MS (Protocolo Q1): *m/z* 362.0 [M+Na⁺] tiempo de retención = 0.89 minutos.

5 *Etapa 2.* Síntesis de metil N-[(2R,3R)-3-[(2S)-1-
 [(3R,4S,5S)-4-[[N-(3-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]amino}-
 2,2-dimetilpropanoil)-L-valil](metil)amino}-3-metoxi-5-
 metilheptanoil]pirrolidin-2-il}-3-metoxi-2-metilpropanoil]-L-
 fenilalaninato (**#125**). A una solución sometida a agitación **#114**
 10 (200 mg, 0.316 mmol, 1.00 eq.) en 2 mL de diclorometano, se
 agregó **#124** (107 mg, 0.316 mmol, 1.00 eq.) seguido por base
 de Hunig (0.167 mL, 0.948 mmol, 3.00 eq.) y HATU (149 mg,
 0.379 mmol, 1.20 eq.). Se permitió la agitación de la reacción a
 temperatura ambiente durante ~12 horas. La reacción fue
 15 concentrada a un volumen menor, absorbida en 10 mL de
 acetato de etilo, y lavada dos veces con 5 mL de 1M HCl, y una
 vez con 5 mL de salmuera. La capa orgánica fue secada sobre
 sulfato de sodio y decantada. Los elementos orgánicos fueron
 concentrados *in vacuo* y el material crudo fue absorbido en
 20 diclorometano. El precipitado fue filtrado. La capa orgánica fue
 concentrada *in vacuo* y el residuo fue purificado mediante
 cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 0%-50% acetona en
 heptano) produciendo **#125** (235 mg, 78%) como un sólido de
 color blanco. LC-MS (Protocolo Q): *m/z* 954.2 [M+H⁺] tiempo de
 25 retención = 2.28 minutos.

*Etapa 3. Síntesis de metil N-[(2R,3R)-3-[(2S)-1-[(3R,4S,5S)-4-
 {[N-(3-amino-2,2-dimetilpropanoil)-L-valil](metil)amino}-3-metoxi-5-
 metilheptanoil]pirrolidin-2-il}-3-metoxi-2-metilpropanoil]-L-
 fenilalaninato (#126).* A una solución sometida a agitación **#125** (235
 5 mg, 0.246 mmol, 1.00 eq.) en 2 mL de THF, se agregó (1 mL, 10 mM,
 40.6 eq.) de dietilamina. Se permitió la agitación de la reacción a
 temperatura ambiente durante 3 horas. La reacción fue concentrada
in vacuo y el residuo fue purificado mediante cromatografía en gel de
 sílice (Gradiente: 0%-30% metanol en acetato de etilo) produciendo
 10 **#126** (101 mg, 56%) como un sólido de color blanco. LC-MS
 (Protocolo Q): *m/z* 732.2 [M+H⁺] tiempo de retención = 1.32 minutos.
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ 8.51 (dd), 8.28 (d), 7.15-7.29 (m),
 5.77 (s), 4.55-4.77 (m), 4.44-4.54 (m), 3.94-4.10 (m), 3.73-3.79 (m),
 3.66 (d), 3.49-3.60 (m), 3.40-3.48 (m), 3.10-3.36 (m), 3.00-3.09 (m),
 15 2.83-2.98 (m), 2.57-2.77 (m), 2.19- 2.46 (m), 1.87- 2.14 (m), 1.61-
 1.86 (m), 1.36-1.55 (m), 1.23-1.36 (m), 1.12-1.22 (m), 0.97-1.11 (m),
 0.82-0.96 (m), 0.73-0.81 (m).

**Preparación de N,2-Dimetilalanil-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-
 20 3-[(2S)-1-ter-butoxi-1-oxo-3-fenilpropan-2-il]amino}-1-metoxi-2-
 metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-
 il]-N-metil-L-valinamida (#130).**



Etapa 1. Síntesis de N-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-N,2-Dimetilalanil-N-[(3R,4S,5S)-1-ter-butoxi-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida (**#127**). A un matraz de fondo redondo que contiene **#6** (4.7 g, 7.9 mmol, 1.0 eq.) y N-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-N,2-dimetilalanina (3.2 g, 9.4 mmol, 1.2 eq.) y una barra de agitación bajo nitrógeno, se agregaron 50 mL de diclorometano seguidos por HATU (3.6 g, 9.4 mmol, 1.2 eq.) y base de Hunig (5.5 mL, 32 mmol, 4.0 eq.). Se permitió la agitación de la reacción a temperatura ambiente durante ~12 horas. La reacción fue reducida a un volumen menor, absorbida en acetato de etilo, antes de ser lavada con 1 N HCl, y salmuera. Los elementos orgánicos fueron secados sobre sulfato de sodio, filtrados y después reducidos sobre sílice. El residuo fue purificado mediante cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 0%-30% acetona en heptano) produciendo **#127** (4.2 g, 78%) como un sólido de color blanco. LC-MS (Protocolo Q): m/z 680.2 $[\text{M}+\text{H}^+]$ tiempo de retención = 2.52 minutos.

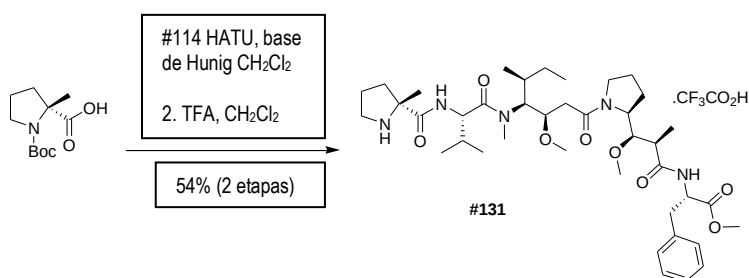
Etapa 2. Síntesis de N-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-

N,2-Dimetilalanil-N-[(2R,3S,4S)-1-carboxi-2-metoxi-4-metilhexan-3-il]-N-metil-L-valinamida, (**#128**). A una solución sometida a agitación **#127** (4.2 g, 6.1 mmol, 1.0 eq.) en 21 mL de diclorometano bajo nitrógeno, se agregaron (7 mL, 90 mmol, 10 eq.) de TFA. Se permitió la agitación de la reacción a temperatura ambiente durante ~4 horas. La reacción fue concentrada *in vacuo*, formada como azeotropo una vez con heptano, y después colocada bajo alto vacío produciendo **#128** como un sólido blanco-amarillo claro (3.8 g, cuant.). LC-MS (Protocolo Q): *m/z* 624.2 [M+H⁺] tiempo de retención = 2.01 minutos.

10 *Etapas 3.* Síntesis de N-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-N,2-Dimetilalanil-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(2S)-1-ter-butoxi-1-oxo-3-fenilpropan-2-il]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il]-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida (**#129**). A una solución sometida a agitación **#128** (1.67 g, 3.1 mmol, 1.0 eq.) en 20 de diclorometano y 2 mL de DMF, se agregó **#121** (2.4 g, 3.1 mmol, 1.0 eq.) seguido por HATU (1.29 g, 3.39 mmol, 1.1 eq.) y después base de Hunig (2.2 mL, 12.3 mmol, 4.0 eq.). Se permitió la agitación de la reacción a temperatura ambiente durante ~2 horas. La reacción fue reducida, diluida con acetato de etilo antes de ser lavada con 0.5 N HCl y salmuera. Los elementos orgánicos fueron secados sobre sulfato de sodio y después reducidos sobre sílice. El residuo fue purificado mediante cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 0%-50% acetona en heptanos) produciendo **#129** (1.9 g, 62%) como un sólido de color blanco. LC-MS (Protocolo Q): *m/z* 996.3 [M+H⁺] tiempo de retención = 2.53 minutos.

Etapa 4. Síntesis de N,2-Dimetilalanil-N-[(3R,4S,5S)-1-
 {(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(2S)-1-ter-butoxi-1-oxo-3-fenilpropan-2-
 il]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-
 5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida (**#130**). A una
 5 solución sometida a agitación **#129** (823 mg, 0.826 mmol, 1.00
 eq.) en 15 mL de diclorometano, se agregó dietilamina (4 mL,
 40 mmol, 50 eq.). Se permitió la agitación de la reacción a
 temperatura ambiente durante ~14 ½ horas. La reacción fue
 concentrada *in vacuo* y formada como azeotropo una vez con
 10 heptanos. El residuo fue diluido con diclorometano y una
 pequeña cantidad de metanol antes de ser reducido sobre
 sílice. El residuo fue purificado mediante cromatografía en gel
 de sílice (Gradiente: 0%-20% metanol en acetato de etilo)
 produciendo **#130** (518 mg, 81%) como un sólido de color
 15 blanco. LC-MS (Protocolo Q): *m/z* 774.3 [M+H⁺] tiempo de
 retención =1.48 minutos. HPLC (Protocolo A a 25°C): *m/z* 774.5
 [M+H⁺], tiempo de retención = 7.733 minutos (pureza > 98%).
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ 8.36 (d). 8.14(d), 7.81 (t),
 7.14-7.25 (m), 7.01-7.07 (m), 4.87-4.94 (m), 4.78-4.85 (m),
 20 4.67-4.76 (m), 4.46-4.65 (m), 4.29-4.40 (m), 3.93-4.03 (m),
 3.70- 3.81(m), 3.49- 3.60 (m), 3.38-3.47 (m), 3.29- 3.36 (m),
 3.15-3.28 (m), 2.98-3.13 (m), 2.94 (br s), 2.74-2.89 (m), 2.64-
 2.69 (m), 2.18-2.45 (m), 2.02-2.14 (m), 1.90-2.01 (m), 1.62-
 1.87 (m), 1.40-1.55 (m), 1.37 (d), 1.20-1.33 (m), 1.16(d), 1.01-
 25 1.10(m), 0.90-0.98 (m), 0.82 -0.89 (m), 0.69-0.79 (m).

**Preparación de 2-metil-D-prolil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{(2S)-2-
 5 [(1R,2R)-1-metoxi-3-{[(2S)-1-metoxi-1-oxo-3-fenilpropan-2-
 il]amino}-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-
 4-il]-N-metil-L-valinamida, sal de ácido trifluoroacético (#131).**



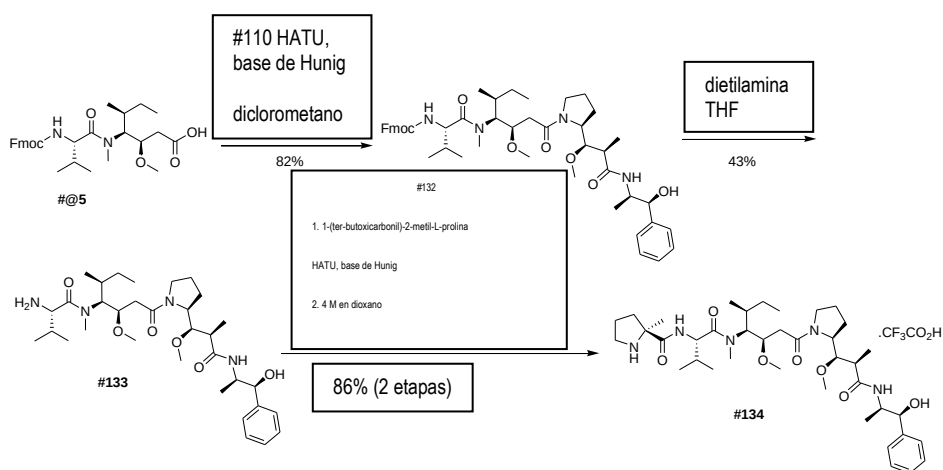
Etapa 1. Síntesis de 2-metil-D-prolil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-
 {(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-3-{[(2S)-1-metoxi-1-oxo-3-fenilpropan-2-
 10 il]amino}-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-
 N-metil-L-valinamida, sal de ácido trifluoroacético (**#131**). A una
 solución sometida a agitación **#114** (164 mg, 0.259 mmol, 1.0 eq.) y
 1-(ter-butoxycarbonyl)-2-metil-D-prolina (71.3 mg, 0.311 mmol, 1.2
 15 mmol, 1.2 eq.) seguido por base de Hunig (0.180 mL, 1.04 mmol, 4
 eq.). Se permitió la agitación de la reacción a temperatura ambiente
 durante ~30 minutos. La reacción fue reducida. La reacción fue
 absorbida en 3.5 mL de diclorometano y placed bajo nitrógeno. A
 esta solución sometida a agitación, se agregó TFA (1.5 mL, 20 mmol,
 20 76 eq.). Se permitió la agitación de la reacción a temperatura
 ambiente durante ~1 hora. La reacción fue reducida y colocada bajo
 alto vacío. La purificación a través de (Método J*) proporciona **#131**
 (119 mg, 54%) como un sólido de color blanco. HPLC (Protocolo A at

45 °C): m/z 744.5 $[M+H^+]$, tiempo de retención = 7.342 minutos (pureza > 98%). ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6), δ 9.08-9.18 (m), 8.79-8.89 (m), 8.76 (t), 8.54 (d), 8.29 (d), 7.14-7.31 (m), 4.70-4.79 (m), 4.57- 4.66 (m), 4.45-4.55 (m), 3.96- 4.04 (m), 3.74-3.80, 3.66 (d), 3.48-3.61 (m), 3.40-3.48 (m), 3.09- 3.34 (m), 3.00-3.09 (m), 2.95-3.00 (m), 2.83- 2.93 (m), 2.36- 2.53 (m), 2.21-2.35 (m), 2.10-2.19 (m), 1.99-2.10 (m), 1.61-1.09 (m), 1.36-1.53(m), 1.21-1.35 (m), 1.02- 1.10 (m), 0.94- 1.0 (m), 0.86- 0.93 (m), 0.73- 0.82 (m).

10

Preparación de 2-metil-L-prolil-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il]amino]-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il]-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida, sal de ácido trifluoroacético (#134).

15



Etapa 1. Síntesis de N~2~-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il]amino]-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il]-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-

20

metil-L-valinamida (**#132**). A un matraz que contiene **#5** (1.14 g, 2.17 mmol, 1.0 eq.), se agregaron 10 mL de diclorometano seguidos por base de Hunig (1.15 mL, 6.52 mmol, 3.0 eq.), HATU (1.02 g, 2.61 mmol, 1.2 eq.), and **#110** (0.776 g, 2.17 mmol, 1.0 eq.). Se permitió la agitación de la reacción a temperatura ambiente durante 30 minutos y después fue concentrada *in vacuo*. El material crudo fue absorbido en 50 mL de acetato de etilo, lavado dos veces con 25 mL de 1 M HCl, y una vez con 25 mL de salmuera. Los elementos orgánicos fueron secados sobre sulfato de sodio y decantados. Los elementos orgánicos fueron concentrados *in vacuo*, absorbidos en 30 mL de diclorometano, y se filtró el precipitado resultante. Los elementos orgánicos fueron concentrados *in vacuo* y el residuo fue purificado mediante cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 0%-50% acetona en heptanos) produciendo **#132** (1.33 g, 81%) como un sólido. LC-MS (Protocolo Q): *m/z* 849.2 [M+Na⁺] tiempo de retención =2.19 minutos.

Etapas 2. Síntesis de N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-[[[(1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il]amino]-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida (**#133**). A una solución sometida a agitación se agregó **#132** (1.33 g, 1.60 mmol, 1.0 eq) en 10 mL de THF dietilamina (5 mL, 50 mM, 31.3 eq). Se permitió la agitación de la reacción a temperatura ambiente durante 4 horas. La reacción fue concentrada *in vacuo* y el residuo fue purificado mediante cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 0%-30% metanol en acetato de etilo) produciendo

#133 (418 mg, 43%) como un sólido de color blanco. LC-MS (Protocolo Q1): m/z 605.2 $[M+H^+]$ tiempo de retención = 1.48 minutos.

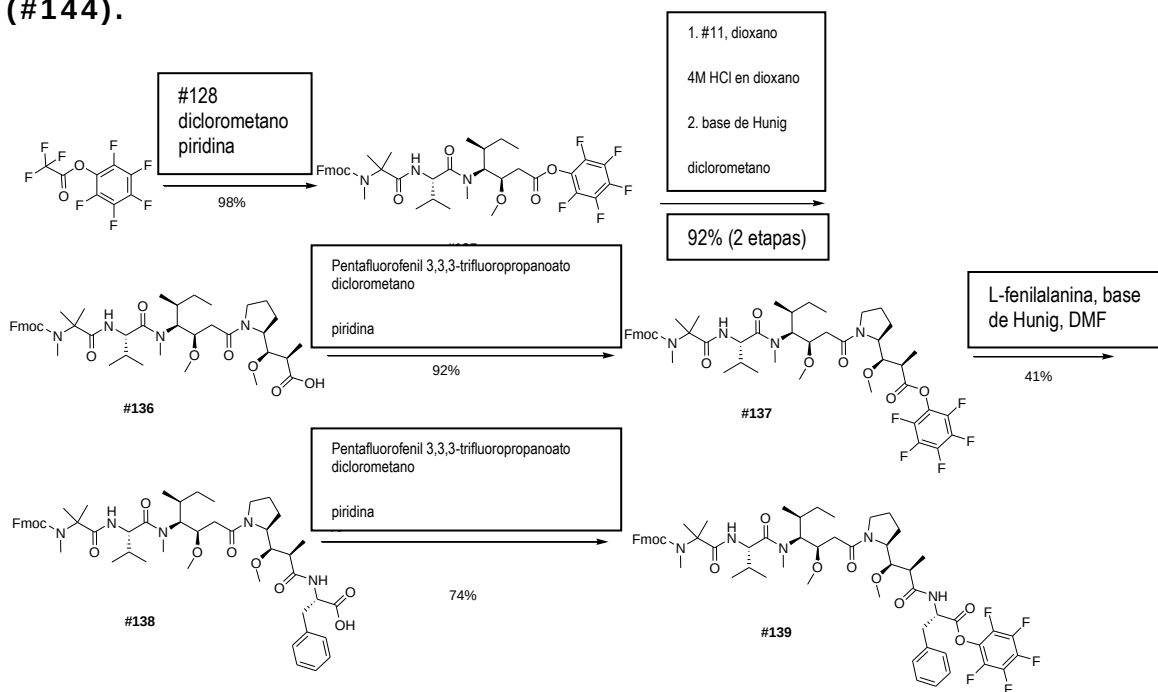
Etapa 3. Síntesis de 2-metil-L-prolil-N-[(3R,4S,5S)-1-
 5 {(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-
 5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida, sal de ácido trifluoroacético (**#134**). HATU (151 mg, 0.398 mmol, 1.2 eq), **#133** (201 mg, 0.332 mmol, 1.0 eq.) y 1-(ter-butoxicarbonil)-2-
 10 metil-L-prolina (91.3 mg, 0.398 mM, 1.2 eq.) fueron combinados en un matraz de fondo redondo que contiene una barra de agitación bajo nitrógeno. Se agregaron 5 mL de diclorometano seguidos por base de Hunig (0.231 mL, 1.33 mmol, 4.0 eq.). Se permitió la agitación de la reacción a temperatura ambiente
 15 durante ~15 horas. La reacción fue concentrada después *in vacuo* y colocada bajo alto vacío. Se agregaron después 4 mL de dioxano al residuo seguidos por 4M HCl en dioxano (4 mL, 20 mmol, 50 eq.). Se permitió la agitación de la reacción a temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción fue
 20 concentrada después *in vacuo* y la reacción fue purificada mediante cromatografía C18 de fase inversa y presión media (Gradiente: 5% hasta 90% acetonitrilo en agua con 0.02% TFA en cada fase) **#134** (237 mg, 86%) como un sólido de color blanco. LC-MS (Protocolo Q): m/z 716.3 $[M+H^+]$, tiempo de
 25 retención = 1.16 minutos; HPLC (Protocolo A a 45°C): m/z 716.5

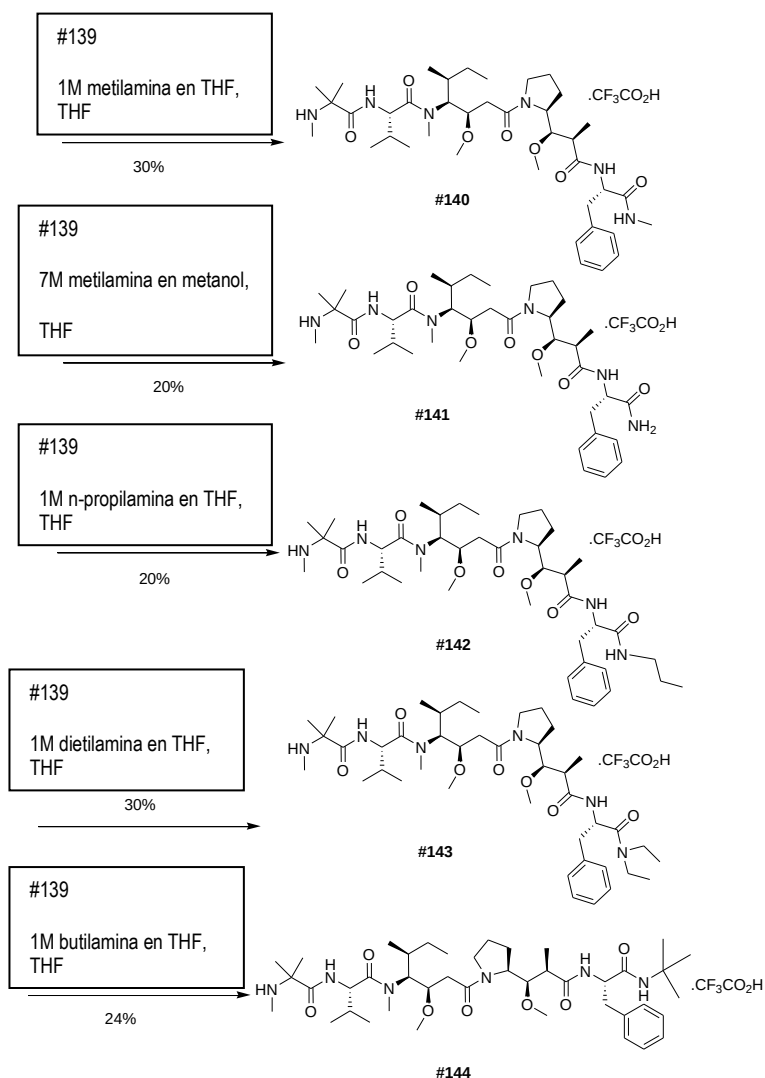
[M+H⁺], tiempo de retención = 6.930 minutos (pureza > 98%). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), 9.12-9.21(m), 8.79-8.90 (m), 8.70-8.78 (m), 7.95 (d), 7.64 (d), 7.25-7.36 (m), 7.16- 7.23 (m), 4.74- 4.80 (m), 4.61- 4.69 (m), 4.41- 4.59 (m), 3.91- 4.06 (m), 3.78 (dd), 3.54- 3.64 (m), 3.45- 3.51 (m), 3.17- 3.36 (m), 3.02- 3.15 (m), 3.00 (br s), 2.40- 2.48 (m), 2.24- 2.35 (m), 1.91- 2.21 (m), 1.68- 1.90 (m), 1.61-1.68 (m), 1.48- 1.59 (m), 1.22- 1.35 (m), 0.97- 1.09 (m), 0.84- 0.97 (m), 0.74-0.83 (m).

- 10 **Preparación de N,2-Dimetilalanil-N-{(1S,2R)-4-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-
 {[(1S)-1-bencil-2-(metilamino)-2-oxoetil]amino}-1-metoxi-2-metil-
 3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-2-metoxi-1-[(1S)-1-metilpropil]-4-
 oxobutil}-N-metil-L-valinamida, sal de ácido trifluoroacético
 (#140), N,2-Dimetilalanil-N-{(1S,2R)-4-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-
 15 amino-1-bencil-2-oxoetil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-
 oxopropil]pirrolidin-1-il}-2-metoxi-1-[(1S)-1-metilpropil]-4-
 oxobutil}-N-metil-L-valinamida, sal de ácido trifluoroacético
 (#141), N,2-Dimetilalanil-N-{(1S,2R)-4-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-
 {[(1S)-1-
 20 bencil-2-oxo-2-(propilamino)etil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-
 oxopropil]pirrolidin-1-il}-2-metoxi-1-[(1S)-1-metilpropil]-4-
 oxobutil}-N-metil-L-valinamida, sal de ácido trifluoroacético
 (#142), N,2-Dimetilalanil-N-{(1S,2R)-4-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-
 {[(1S)-1-
 bencil-2-(diethylamino)-2-oxoetil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-
 oxopropil]pirrolidin-1-il}-2-metoxi-1-[(1S)-1-metilpropil]-4-
 25 oxobutil}-N-metil-L-valinamida, sal de ácido trifluoroacético**

(#143), y N,2-Dimetilalanil-N-{(1S,2R)-4-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(1S)-1-bencil-2-(ter-butilamino)-2-oxoetil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-2-metoxi-1-[(1S)-1-metilpropil]-4-oxobutil}-N-metil-L-valinamida, sal de ácido trifluoroacético

5 (#144).





- Etapas* 1. Síntesis de N-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-N,2-Dimetilalanil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-5-metil-1-oxo-1-(pentafluorofenoxi)heptan-4-il]-N-metil-L-valinamida (**#135**).
- 5 Pentafluorofenil 3,3,3-trifluoropropanoato (2.44 mL, 13.4 mmol, 2.0 eq.) fue agregado a una solución de **#128** (4.18 g, 6.70 mmol, 1.0 eq.) en 50 mL de diclorometano seguido por piridina (1.61 mL, 20.1 mmol, 3.0 eq.). Se permitió la agitación de la reacción a temperatura ambiente durante ~12 horas. La reacción fue concentrada *in vacuo* y
- 10 el residuo fue purificado mediante cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 0%-70% acetona en heptanos) produciendo **#135** (5.2 g,

98%) como una espuma de color blanco. LC-MS (Protocolo Q1): m/z 812.1 [M+Na⁺] tiempo de retención =1.24 minutos.

Etapa 2. Síntesis de N-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-N,2-Dimetilalanil-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-2-carboxi-1-metoxipropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)-N-metil-L-valinamida (**#136**). A una solución sometida a agitación 4M HCl en dioxano (10 mL, 25 mmol, 3.7 eq.) en 10 mL de dioxano se agregó **#11** (2.31 g, 8.05 mmol, 1.2 eq.). Se permitió la agitación de la reacción a temperatura ambiente durante 6 horas. La reacción fue concentrada *in vacuo* produciendo una goma de color amarillo. Una solución de **#135** (5.3 g, 6.7 mmol, 1.0 eq.) en 30 mL de diclorometano fue agregada al residuo previo seguida por base de Hunig (3.5 mL, 20 mmol, 3 eq.). Se permitió la agitación de la reacción a temperatura ambiente durante 4 horas. La reacción fue diluida con diclorometano antes de ser lavada con una solución acuosa de HCl al 1% HCl y después salmuera. La capa de elementos orgánicos fue secada sobre sulfato de sodio, concentrada *in vacuo*, y el residuo fue purificado mediante cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 20%-50% acetato de etilo en heptanos seguido por 93% acetato de etilo 6.6% metanol y 0.4% ácido acético) produciendo **#136** (4.87 g, 92%) como un sólido blanquecino. LC-MS (Protocolo Q1): m/z 793.3 [M+H⁺] tiempo de retención =1.07 minutos.

Etapa 3. Síntesis de N-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-

N,2-Dimetilalanil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-(pentafluorofenoxi)propil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida (**#137**). Pentafluorofenil 3,3,3-trifluoropropanoato (1.3 mL, 7.1 mmol, 2.0 eq.) fue agregado a una solución de **#136** (2.8 g, 3.5 mmol, 1.0 eq.) en 30 mL de diclorometano seguido por la adición de piridina (0.85 mL, 10.6 mM). Se permitió la agitación de la reacción a temperatura ambiente durante 2 horas. La reacción fue concentrada *in vacuo*, y el residuo fue purificado mediante cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 0%-70% acetona en heptano) produciendo **#137** (3.1 g, 92%) como un polvo de color blanco. LC-MS (Protocolo Q1): *m/z* 959.2 [M+H⁺] tiempo de retención =1.28 minutos.

Etapas 4. Síntesis de N-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-N,2-Dimetilalanil-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(1S)-1-carboxi-2-feniletil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida(**#138**). A una solución sometida a agitación **#137** (493 mg, 0.514 mmol, 1.0 eq.) en 4 mL of DMF, se agregó L-fenilalanina (84.9 mg, 0.514 mmol, 1.0 eq) seguida por base de Hunig (0.27 mL, 1.54 mmol, 3.0 eq.). Se permitió la agitación de la reacción a temperatura ambiente durante ~12 horas. La reacción fue concentrada *in vacuo* y el residuo fue purificado mediante cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 0%-100% acetato de etilo en heptano) produciendo **#138** (200 mg, 41%) como una espuma de color blanco. LC-MS (Protocolo Q1): *m/z* 940.3 [M+H⁺] tiempo de retención =1.08 minutos.

Etapa 5. Síntesis de N-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-N,2-Dimetilalanil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[[{(2S)-1-oxo-1-(pentafluorofenoxi)-3-fenilpropan-2-il]amino}propil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida (**#139**). A una solución sometida a agitación **#138** (200 mg, 0.213 mmol, 1.0 eq.) en 5 mL de diclorometano, se agregó pentafluorofenil 3,3,3-trifluoropropanoato (126 mg, 0.426 mM, 2.0 eq.) seguido por piridina (0.051 mL, 0.64 mmol, 3.0 eq.). Se permitió la agitación de la reacción a temperatura ambiente durante ~12 horas. La reacción fue concentrada *in vacuo* y el residuo fue purificado mediante cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 0%-100% acetato de etilo en heptanos) produciendo **#139** (174 mg, 74%) como un aceite de color amarillo. LC-MS (Protocolo Q1): *m/z* 1128 [M+Na⁺] tiempo de retención =1.23 minutos.

Etapa 6A. Síntesis de N,2-Dimetilalanil-N-[(1S,2R)-4-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-[[{(1S)-1-bencil-2-(metilamino)-2-oxoetil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-2-metoxi-1-[(1S)-1-metilpropil]-4-oxobutil}-N-metil-L-valinamida, sal de ácido trifluoroacético (**#140**). A una solución sometida a agitación de **#139** (20 mg, 0.018 mmol, 1.0 eq.) en 1mL de THF se agregó metilamina (1M en THF, 0.18 mL, 0.18 mmol, 10 eq.), y la mezcla fue sometida a agitación a temperatura ambiente durante 3 horas. La reacción fue reducida, y diluida con dmsó, y sometida a purificación (Método J*). Las fracciones fueron

recolectadas y concentradas *in vacuo* para dar **#140** (4.0 mg, 30%) como un sólido de color blanco. LC-MS (Protocolo Q1): m/z 731.2 $[M+H^+]$, tiempo de retención = 0.70 minutos. ^1H NMR (400 MHz, metanol- d_4), 7.30-7.41 (m), 4.71-4.78 (m), 4.58-4.69 (m), 4.04-4.15 (m), 3.86-3.98 (m), 3.73-3.78 (m), 3.61-3.70 (m), 3.50-3.58 (m), 3.32-3.47 (m), 3.23-3.26 (m), 3.17-3.22 (m), 3.07-3.15 (m), 2.95-2.98 (m), 2.76-2.91 (m), 2.68-2.75 (m), 2.63-2.66 (m), 2.43-2.51 (m), 2.22-2.28 (m), 1.99-2.11 (m), 1.74-1.96 (m), 1.21-1.31 (m), 1.17-1.20 (m), 0.92-1.10 (m), 0.79-0.89 (m).

Etapa 6B. Síntesis de N,2-Dimetilalanil-N-{(1S,2R)-4-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{(1S)-2-amino-1-bencil-2-oxoetil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-2-metoxi-1-[(1S)-1-metilpropil]-4-oxobutil}-N-metil-L-valinamida, sal de ácido trifluoroacético (**#141**). Siguiendo el mismo procedimiento que en **#140** usando **#139** (20 mg, 0.018 mmol, 1.0 eq.), solución de amoniaco (7M en metanol, 0.026 mL, 0.18 mmol, 10eq.) y purificación (Método J*), se obtuvo **#141** (3.0 mg, 20%) como un sólido de color blanco. LC-MS (Protocolo Q): m/z 717.2 $[M+H^+]$, tiempo de retención = 0.79 minutos. ^1H NMR (400 MHz, metanol- d_4), 7.22-7.30 (m), 7.14-7.21 (m), 4.57-4.4.80 (m), 4.02-4.17 (m), 3.92-3.98 (m), 3.84-3.91 (m), 3.32-3.74 (m), 3.17-3.27 (m), 3.06-3.14 (m), 2.77-3.05 (m), 2.65 (s), 2.43-2.51 (m), 2.21-2.26 (m), 1.98-2.13 (m), 1.70-1.94 (m), 1.32-1.69 (m), 1.16-1.31 (m), 0.89-1.13 (m), 0.80-0.88 (m).

Etapa 6C. Síntesis de N,2-Dimetilalanil-N-{(1S,2R)-4-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{(1S)-1-bencil-2-oxo-2-(propilamino)etil]amino}-1-metoxi-

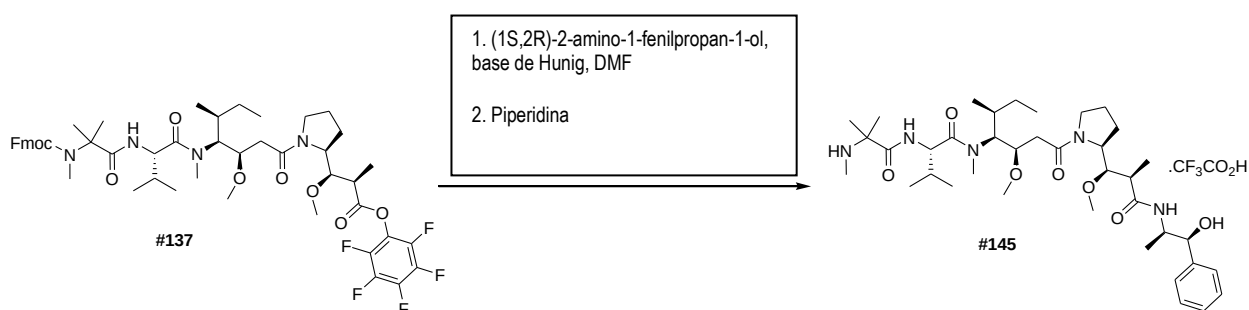
2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-2-metoxi-1-[(1S)-1-metilpropil]-4-oxobutil}-N-metil-L-valinamida, sal de ácido trifluoroacético (**#142**). Siguiendo el mismo procedimiento que en **#140** usando **#139** (20 mg, 0.018 mmol, 1.0 eq.) n-propilamina (1M en THF, 0.18 mL, 0.18 mmol, 10. eq) y purificación (Método J*), se obtuvo **#142** (3.0 mg, 20%) como un sólido de color blanco. LC-MS (Protocolo Q): *m/z* 759.2 [M+H⁺], tiempo de retención = 0.74 minutos. ¹H NMR (400 MHz, metanol-*d*₄), 7.15-7.29 (m), 4.71-4.79 (m), 4.52-4.68 (m), 4.04-4.17 (m), 3.87-3.99 (m), 3.73-3.99 (m), 3.73-3.79 (m), 3.50-3.70 (m), 3.34-3.49 (m), 3.06-3.23 (m), 2.79-2.99 (m), 2.44-2.50 (m), 2.28-2.43 (m), 2.22-2.27 (m), 1.75-2.10 (m), 1.34-1.61 (m), 1.16-1.29 (m), 0.92-1.10 (m), 0.77-0.89 (m).

Etapas 6D. Síntesis de N,2-Dimetilalanil-N-{(1S,2R)-4-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1S)-1-bencil-2-(diethylamino)-2-oxoetil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-2-metoxi-1-[(1S)-1-metilpropil]-4-oxobutil}-N-metil-L-valinamida, sal de ácido trifluoroacético (**#143**). Siguiendo el mismo procedimiento que en **#140** usando **#139** (20 mg, 0.018 mmol, 1.0 eq.) dietilamina (1M en THF, 0.18 mL, 0.18 mmol, 10 eq.) y purificación (Método J*), se obtuvo **#143** (4.0 mg, 30%) como un sólido de color blanco. LC-MS (Protocolo Q): *m/z* 773.3 [M+H⁺], tiempo de retención = 0.77 minutos. ¹H NMR (400 MHz, metanol-*d*₄), 7.16-7.33 (m), 5.10-5.17 (m), 4.96-5.07 (m), 4.68-4.75 (m), 4.60-4.65 (m), 3.61-4.23 (m), 3.35-3.67 (m), 3.16-

3.26 (m), 2.99-3.15 (m), 2.78-2.94 (m), 2.30-2.52 (m), 2.19-2.28 (m), 1.73-2.13 (m), 1.83-1.45 (m), 1.19-1.31 (m), 0.92-1.18 (m), 0.80-0.89 (m).

Etapa 6E. Síntesis de N,2-Dimetilalanil-N-{(1S,2R)-4-{(2S)-2-
 5 [(1R,2R)-3-{(1S)-1-bencil-2-(ter-butilamino)-2-oxoetil]amino}-1-
 metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-2-metoxi-1-[(1S)-1-
 metilpropil]-4-oxobutil}-N-metil-L-valinamida, sal de ácido
 trifluoroacético **#144**. Siguiendo el mismo procedimiento que en **#140**
 usando **#139** (20 mg, 0.018 mmol, 1.0 eq.) ter-butilamina (1M en
 10 THF, 0.18 mL, 0.18 mmol, 10 eq.) y purificación (Método J*), se
 obtuvo **#144** (3.4 mg, 24%) como un sólido de color blanco. LC-MS
 (Protocolo Q1): *m/z* 773.3 [M+H⁺], tiempo de retención = 0.74
 minutos. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ 8.21 (d), 8.03-7.98 (m),
 7.92 (d), 7.81-7.62 (m), 7.46-7.16 (m), 4.83-4.69 (m), 4.68-4.56 (m),
 15 4.21-4.07 (m), 3.92-3.86 (m), 3.83-3.80 (m), 3.74-3.65 (m), 3.60-3.48
 (m), 3.47-3.36 (m), 3.28-3.13 (m), 3.11-3.01 (m), 2.96-2.82 (m), 2.69-
 2.62 (m), 2.54-2.43 (m), 2.38-2.12 (m), 2.00-1.76 (m), 1.69-1.161
 (m), 1.60-1.53 (m), 1.52-0.98 (m), 0.94-0.86 (m).

20 **Preparación de N,2-Dimetilalanil-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-
 3-{(1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il]amino}-1-metoxi-2-metil-3-
 oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-
 metil-L-valinamida, sal de ácido trifluoroacético (#145).**



5 *Etapas 1.* Síntesis de N,2-Dimetilalanil-N-{(1S,2R)-4-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1R,2S)-2-hidroxi-1-metil-2-feniletil]amino]-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-2-metoxi-1-[(1S)-1-metilpropil]-4-oxobutil}-N-metil-L-valinamida, sal de ácido trifluoroacético (**#145**). A una solución sometida a agitación

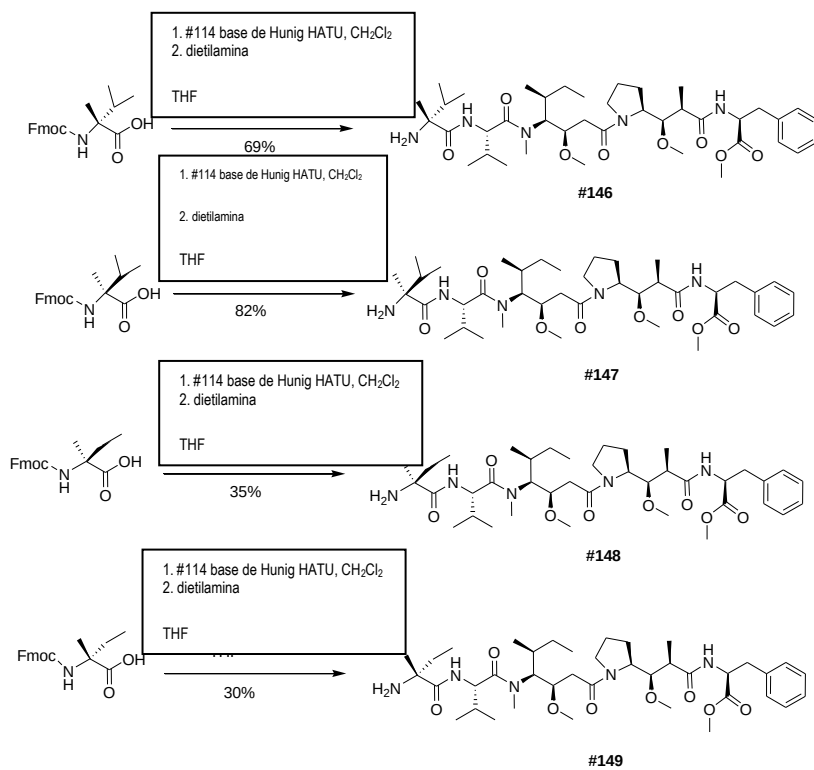
10 **#137** (300 mg, 0.313 mmol, 1.0 eq.) en 3 mL de DMF, se agregó (1S,2R)-2-amino-1-phenylpropan-1-ol (54.8 mg, 0.344 mmol, 1.1 eq.) seguido por base de Hunig (0.164 mL, 0.939 mmol, 3.0 eq.). Se permitió la agitación de la reacción a temperatura ambiente durante ~12 horas. Se agregó después solución de

15 piperidina al 20% en DMF (1 mL, 2.2 mmol, 7.0 eq.) y se permitió la agitación de la reacción a temperatura ambiente durante 2 horas. La purificación (Método J*) seguida por concentración de los tubos de ensayo apropiados produjo **#145** (190 mg, 74%) como un polvo de color blanco. LC-MS

20 (Protocolo Q): m/z 704.3 $[M+H^+]$, tiempo de retención = 0.67 minutos. ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD), δ 7.97 (d), 7.73 (d), 7.37-7.41 (m), 7.27-7.36 (m), 7.19-7.25 (m), 4.70-4.75 (m), 4.58-4.63 (m), 4.49-4.54 (m), 4.14-4.30 (m), 4.04-4.11 (m), 3.87

(dd), 3.63-3.77 (m), 3.51-3.58 (m), 3.46-3.49 (m), 3.38- 3.43 (m), 3.25-3.37 (m), 3.15- 3.23 (m), 3.11- 3.14 (m), 3.01- 3.02 (m), 2.59-2.64 (m), 2.52-2.55 (m), 2.44-2.52 (m), 2.41-2.43 (m), 2.07-2.26 (m), 1.73-2.0 (m), 1.65- 1.73 (m), 1.59- 1.65 (m), 1.51-1.59 (m), 1.32-
 5 1.46 (m), 1.23- 1.26 (m), 1.08-1.21 (m), 0.94- 1.07 (m), 0.83-0.92 (m).

**Preparación de 3-metil-D-isovalil-N-{(1S,2R)-4-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-
 {[(1S)-1-bencil-2-metoxi-2-oxoetil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-
 10 oxopropil]pirrolidin-1-il}-2-metoxi-1-[(1S)-1-metilpropil]-4-
 oxobutil}-N-metil-L-valinamida (#146), 3-metil-L-isovalil-N-
 {(1S,2R)-4-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(1S)-1-bencil-2-metoxi-2-
 oxoetil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-2-
 metoxi-1-[(1S)-1-metilpropil]-4-oxobutil}-N-metil-L-valinamida
 15 (#147), L-isovalil-N-{(1S,2R)-4-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(1S)-1-bencil-2-
 metoxi-2-oxoetil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-
 il}-2-metoxi-1-[(1S)-1-metilpropil]-4-oxobutil}-N-metil-L-
 valinamida (#148), y D-isovalil-N-{(1S,2R)-4-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-
 {[(1S)-1-bencil-2-metoxi-2-oxoetil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-
 20 oxopropil]pirrolidin-1-il}-2-metoxi-1-[(1S)-1-metilpropil]-4-
 oxobutil}-N-metil-L-valinamida (#149).**



*Etapa 1A. Síntesis de 3-metil-D-isovalil-N-((1S,2R)-4-((2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1S)-1-bencil-2-metoxi-2-oxoetil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il)-2-metoxi-1-[(1S)-1-metilpropil]-4-oxobutil}-N-metil-L-valinamida (**#146**).*

Una solución de **#114** (225 mg, 0.356 mmol, 1.0 eq.) en 2 mL de diclorometano fue agregada a una solución de N-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-3-metil-D-isovalina (126 mg, 0.356 mmol, 1.0eq.) en 4 mL de diclorometano. Se agregó base de Hunig (0.188 mL, 1.07 mmol, 3.0 eq.) seguida por HATU (167 mg, 0.427 mmol, 1.2 eq). Se permitió la agitación de la reacción a temperatura ambiente durante 12 horas. La reacción fue concentrada *in vacuo* y después absorbida en acetato de etilo antes de ser lavada dos veces con 1M HCl y una vez con

salmuera. La capa orgánica fue secada sobre sulfato de sodio y decantada. El solvente orgánico fue removido en un dispositivo Genevac. Se agregó THF (4 mL) seguido por dietilamina (2 mL, 19 mmol, 53.4 eq.). Se permitió la agitación de la reacción durante ~12
 5 horas. La reacción fue concentrada utilizando un dispositivo Genevac seguida por cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 0%-30% metanol en acetato de etilo) produciendo **#146** (183 mg, 69%) como un sólido. LC-MS (Protocolo Q): m/z 746.4 $[M+H^+]$ tiempo de retención =1.37 minutos. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6), δ 8.55 (d),
 10 8.26- 8.36 (m), 7.88-8.03 (m), 7.81 (d), 7.41-7.53 (m), 7.13-7.30 (m), 7.01 (s), 4.71-4.79 (m), 4.44-4.70 (m), 3.96-4.04 (m), 3.70-3.80 (m), 3.62-3.69 (m), 3.40-3.61 (m), 2.76-3.35 (m), 2.67-2.71 (m), 2.56-2.58 (m), 2.06-2.46 (m), 1.61-1.90 (m), 1.14-1.54 (m), 0.72-1.12 (m).

Etapas 1B. Síntesis de 3-metil-L-isovalil-N-((1S,2R)-4-((2S)-2-
 15 [(1R,2R)-3-((1S)-1-bencil-2-metoxi-2-oxoetil)amino]-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-2-metoxi-1-((1S)-1-metilpropil)-4-oxobutil)-N-metil-L-valinamida (**#147**). Una solución de **#114** (224 mg, 0.354 mmol, 1.0 eq.) en 2 mL de diclorometano fue agregada a una solución de N-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-3-metil-L-
 20 isovalina (125 mg, 0.354 mmol, 1.0 eq.) en 4 mL de diclorometano. Se agregó base de Hunig (0.187 mL, 1.06 mmol, 3.0 eq.) seguida por HATU (167 mg, 0.425 mmol, 1.2 eq.). Se permitió la agitación de la reacción a temperatura ambiente durante 12 horas. La reacción fue concentrada *in vacuo* y después absorbida en acetato de etilo antes
 25 de ser lavada dos veces con 1M HCl y una vez con salmuera. La

capa orgánica fue secada sobre sulfato de sodio and decantada. El solvente orgánico fue removido en un dispositivo Genevac. Se agregó THF (4 mL) seguido por dietilamina (2 mL, 19 mmol, 53.7 eq.). Se permitió la agitación de la reacción
 5 durante ~12 horas. La reacción fue concentrada utilizando un dispositivo Genevac seguida por cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 0%-30% metanol en acetato de etilo) produciendo **#147** (216 mg, 82%) como un sólido. LC-MS (Protocolo Q): m/z 746.6 $[M+H^+]$ tiempo de retención =1.29 minutos. ^1H NMR (400
 10 MHz, DMSO- d_6), δ 8.56 (m), 8.31-8.39 (m), 8.50 (d), 8.30 (br d), 7.87-8.01 (m), 7.80 (d), 7.40-7.53 (m), 7.14-7.30 (m), 4.45-4.78 (m), 3.94-4.04 (m), 3.70-3.79 (m), 3.61-3.69 (m), 3.42-3.59 (m), 2.97-3.37 (m), 2.80-2.92 (m), 2.32-2.49 (m), 2.05-2.30 (m), 1.61-1.89 (m), 1.37-1.56 (m), 1.14-1.135 (m), 0.70-
 15 1.11 (m).

Etapa 1C. Síntesis de L-isovalil-N-{(1S,2R)-4-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{(1S)-1-bencil-2-metoxi-2-oxoetil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-2-metoxi-1-[(1S)-1-metilpropil]-4-oxobutil}-N-metil-L-valinamida (**#148**). Una
 20 solución de **#114** (447 mg, 0.707 mmol, 1.0 eq.) en 2 mL de diclorometano fue agregada a una solución de N-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-L-isovalina (240 mg, 0.707 mmol, 1.0eq.) en 4 mL de diclorometano. Se agregó base de Hunig (0.373 mL, 2.12 mmol, 3.0 eq.) seguida por HATU (332 mg, 0.425 mmol, 25 1.2 eq.). Se permitió la agitación de la reacción a temperatura

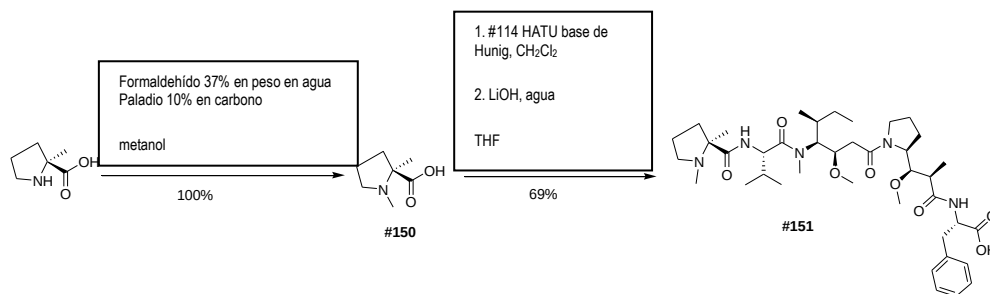
ambiente durante 12 horas. La reacción fue concentrada *in vacuo* y después absorbida en acetato de etilo antes de ser lavada dos veces con 1M HCl y una vez con salmuera. La capa orgánica fue secada sobre sulfato de sodio y decantada. El solvente orgánico fue removido en a genevac. Se agregó THF (4 mL) seguido por dietilamina (2 mL, 19 mmol, 26.9 eq.). Se permitió la agitación de la reacción durante ~12 horas. La reacción fue concentrada utilizando un dispositivo Genevac seguida por cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 0%-30% metanol en acetato de etilo) produciendo **#148** (182 mg, 35%) como un sólido. LC-MS (Protocolo Q1): *m/z* 732.3 [M+H⁺] tiempo de retención =0.71 minutos. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ 8.56 (d), 8.46-8.52 (m), 8.30 (d), 8.02-8.15 (m), 7.98 (d), 7.80 (d), 7.40-7.53 (m), 7.15-7.30 (m), 4.70-4.80 (m), 4.44-4.69 (m), 3.96-4.05 (m), 3.70-3.79 (m), 3.62-3.69 (m), 3.41-3.59 (m), 2.99-3.35 (m), 2.31-2.95 (m), 2.67-2.71 (m), 2.55-2.59 (m), 2.32-2.48 (m), 2.20-2.31 (m), 1.97-2.19 (m), 1.61-1.88 (m), 1.37-1.56 (m), 1.20-1.34 (m), 1.14-1.19 (m), 1.02-1.11 (m), 0.97-1.01 (m), 0.86-0.96 (m), 0.71-0.83 (m).

Etapas 1D. Síntesis de D-isovalil-N-{(1S,2R)-4-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(1S)-1-bencil-2-metoxi-2-oxoetil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-2-metoxi-1-[(1S)-1-metilpropil]-4-oxobutil}-N-metil-L-valinamida (**#149**). Una solución de **#114** (447 mg, 0.707 mmol, 1.0 eq.) en 2 mL de diclorometano fue agregada a una solución de N-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-D-isovalina (240 mg, 0.707 mmol, 1.0 eq.) en 4 mL de diclorometano. Se agregó base de Hunig (0.373 mL, 2.12 mmol, 3 eq.) seguida por HATU (332 mg,

0.425 mmol, 1.2 eq.). Se permitió la agitación de la reacción a temperatura ambiente durante 12 horas. La reacción fue concentrada *in vacuo* y después absorbida en acetato de etilo antes de ser lavada dos veces con 1M HCl y una vez con salmuera. La capa orgánica fue secada sobre sulfato de sodio y decantada. El solvente orgánico fue removido en un dispositivo Genevac. Se agregó THF (4 mL) seguido por dietilamina (2 mL, 19 mmol, 26.9 eq.). Se permitió la agitación de la reacción durante ~12 horas. La reacción fue concentrada utilizando un dispositivo Genevac seguido por cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 0%-30% metanol en acetato de etilo) produciendo **#149** (154 mg, 30%) como un sólido. LC-MS (Protocolo Q): *m/z* 732.0 [M+H⁺] tiempo de retención =1.24 minutos. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ 8.55 (d), 8.38-8.46 (m), 8.29 (d), 8.03-8.14 (m), 7.97 (d), 7.81 (d), 7.40-7.53 (m), 7.14-7.28 (m), 7.02 (s), 4.71-4.79 (m), 4.43-4.69 (m), 3.96-4.05 (m), 3.71-3.80 (m), 3.62-3.70 (m), 3.49-3.60 (m), 3.40-3.48 (m), 3.15-3.34 (m), 3.10-3.14 (m), 3.01-3.09 (m), 2.94-3.00 (m), 2.83-2.93 (m), 2.65-2.71 (m), 2.55-2.59 (m), 2.32-2.48 (m), 2.04-2.31 (m), 1.61-1.89 (m), 1.37-1.52 (m), 1.21-1.35 (m), 1.15-1.20 (m), 1.02-1.10 (m), 0.75-1.01 (m).

Preparación de 1,2-dimetil-L-prolil-N-{(1S,2R)-4-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1S)-1-carboxi-2-feniletil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-2-metoxi-1-[(1S)-1-metilpropil]-4-

oxobutil}-N-metil-L-valinamida (#151).

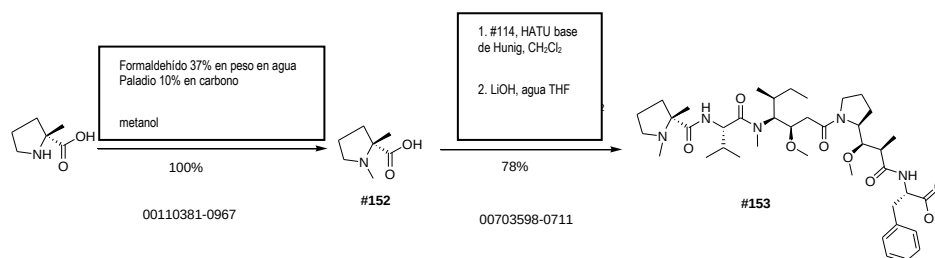


5 *Etapas 1.* Síntesis de 1,2-dimetil-L-prolina (**#150**). Un matraz Parr que contiene 2-metil-L-prolina (1.0 g, 7.7 mmol, 1.0 eq.), 40 mL de metanol, Formaldehído 37% en peso en agua (2.1 mL, 77 mmol, 10 eq.), y Paladio 10% en peso en Carbono (313 mg, 2.94 mmol, 0.38 eq.) fue colocado en un agitador Parr y se permitió la agitación bajo
10 40 psi de hidrógeno durante ~12 horas. El hidrógeno fue removido y la reacción fue filtrada a través de una almohadilla de celita la cual fue enjuagada con una solución de 50% metanol 50% diclorometano. El residuo fue concentrado *in vacuo* produciendo **#150** (1.1 g, 100%) como un sólido de color blanco-negro claro. LC-MS (Protocolo Q):
15 *m/z* 144.0 [M+H⁺] tiempo de retención =0.17 minutos.

Etapas 2. Síntesis de 1,2-dimetil-L-prolil-N-{(1S,2R)-4-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{(1S)-1-carboxi-2-feniletil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-2-metoxi-1-[(1S)-1-metilpropil]-4-oxobutil}-N-metil-L-valinamida (**#151**). A una mezcla sometida a agitación de
20 **#114** (125 mg, 0.198 mmol, 1.0 eq), **#150** (37 mg, 0.26 mmol, 1.3 eq.), y HATU (98 mg, 0.26 mmol, 1.3 eq.) en 5 mL de diclorometano, se agregó base de Hunig (0.14 mL, 0.80 mmol, 4.1 eq.). Se permitió la agitación de la reacción a temperatura ambiente durante 1 hora.

La reacción fue concentrada *in vacuo*. Se agregó THF (6 mL) al material crudo. A esta mezcla sometida a agitación se agregó LiOH (14 mg, 0.59 mmol, 3.0 eq) disuelto en 2 mL de agua. Se permitió la agitación de la reacción a temperatura ambiente
 5 durante 90 minutos. La reacción fue concentrada *in vacuo* y la reacción fue purificada mediante cromatografía C18 de fase inversa y presión media (Gradiente: 5% hasta 40% acetonitrilo en agua con 0.02% TFA en cada fase) **#151** (147 mg, 69%) como un sólido de color blanco. LC-MS (Protocolo Q): *m/z*
 10 744.3 [M+H⁺], tiempo de retención = 1.19 minutos; HPLC (Protocolo A at 45 °C): *m/z* 744.4 [M+H⁺], tiempo de retención = 6.631 minutos (pureza > 98%). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ 9.57-9.71 (m), 8.75 (d), 8.42 (d), 8.15 (d), 7.14-7.29 (m), 4.70-4.79 (m), 4.40-4.68 (m), 3.95-4.03 (m), 3.73-3.80 (m), 3.37-
 15 3.61 (m), 2.97-3.31 (m), 2.79-2.88 (m), 2.66-2.76 (m), 2.54-2.58 (m), 2.31-2.43 (m), 1.94-2.29 (m), 1.57-1.91 (m), 1.21-1.52 (m), 0.85-1.10 (m), 0.74-0.82 (m)

**Preparación de 1,2-dimetil-D-prolil-N-{(1S,2R)-4-{(2S)-2-[(1R,2R)-
 20 3-{[(1S)-1-carboxi-2-feniletil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-2-metoxi-1-[(1S)-1-metilpropil]-4-oxobutil}-N-metil-L-valinamida (#153).**



Etapa 1. Síntesis de 1,2-dimetil-D-prolina (#152). A un matraz Parr que contiene 2-metil-D-prolina (432 mg, 3.34 mmol, 1.0 eq.),

5 Formaldehído 37 % en peso en agua (1.0 mL, 37 mM, 11 eq.), 3.5 mL de metanol y 1 mL de agua, se agregó Palladium 10 % en peso sobre Carbono (108 mg, 0.304 mmol, 0.304 eq.). El matraz fue colocado en un agitador Parr y se permitió la agitación bajo 30 psi de hidrógeno durante ~48 horas. Se removió el hidrógeno y la reacción fue lavada

10 a través de una almohadilla de celita, la cual fue lavada subsecuentemente con metanol. Los elementos orgánicos fueron concentrados *in vacuo* y después formados como azeotropo con tolueno produciendo #152 (517 mg, 100%) como un sólido. ¹H NMR (400 MHz, metanol-*d*₄): δ [3.61-3.56 (m, 1H), 3.07-2.96 (m, 1H), 2.68 (br s, 3H), 2.34-2.22 (m, 1H), 2.01-1.88 (m, 1H), 1.87-1.73 (m, 1H), 1.40 (br s, 3H)].

Etapa 2. Síntesis de 1,2-dimetil-D-prolil-N-{(1S,2R)-4-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{(1S)-1-carboxi-2-feniletíl]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-2-metoxi-1-[(1S)-1-metilpropil]-4-oxobutil}-N-

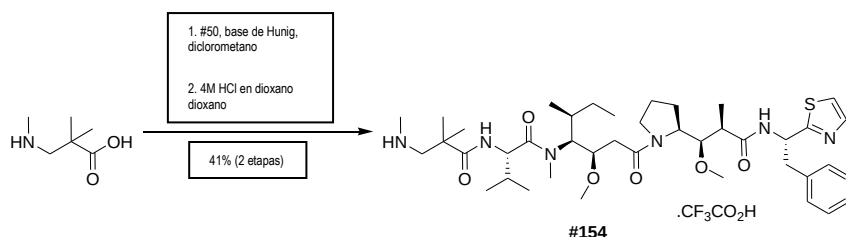
20 **metil-L-valinamida (#153).** A una mezcla sometida a agitación de #114 (240 mg, 0.379 mmol, 1.0 eq.), #152 (71 mg, 0.49 mmol, 1.3 eq.), y HATU (188 mg, 0.49 mmol, 1.3 eq.) en 10 mL de diclorometano, se agregó base de Hunig (0.27 mL, 4.1 mM, 4.1 eq.).

Se permitió la agitación de la reacción a temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción fue concentrada *in vacuo*. Se agregó THF (6 mL) al material crudo. A esta mezcla sometida a agitación se agregó LiOH (36 mg, 1.5 mmol, 4 eq.) disuelto en 2 mL de agua. Se permitió la agitación de la reacción a temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción fue concentrada *in vacuo* y la reacción fue purificada mediante cromatografía C18 de fase inversa y presión media (Gradiente: 5% hasta 40% acetonitrilo en agua con 0.02% TFA en cada fase) **#153** (220 mg, 78%) como un sólido de color blanco. LC-MS (Protocolo Q): *m/z* 744.8 [M+H⁺], tiempo de retención = 1.16 minutos; HPLC (Protocolo A at 45°C): *m/z* 744.4 [M+H⁺], tiempo de retención = 6.713 minutos (pureza > 98%). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ 9.72-9.85 (m), 8.65 (t), 8.41 (d), 8.14 (d), 7.14-7.28 (m), 4.69-4.79 (m), 4.38-4.53 (m), 3.95-4.04 (m), 3.73-3.79 (m), 3.37-3.62 (m), 3.13-3.33 (m), 2.95-3.10 (m), 2.79-2.89 (m), 2.67-2.75 (m), 2.00-2.46 (m), 1.61-1.90 (m), 1.22-1.54 (m), 1.02-1.09 (m), 0.95-1.01 (m), 0.85-0.94 (m), 0.75-0.83 (m)

20

**Preparación de N~2~-[2,2-dimetil-3-(metilamino)propanoil]-N-
 {(1S,2R)-2-metoxi-4-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-
 {[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}propil]pirrolidin-1-il}-1-
 [(1S)-1-metilpropil]-4-oxobutil}-N-metil-L-valinamida, sal de ácido
 trifluoroacético (#154).**

25

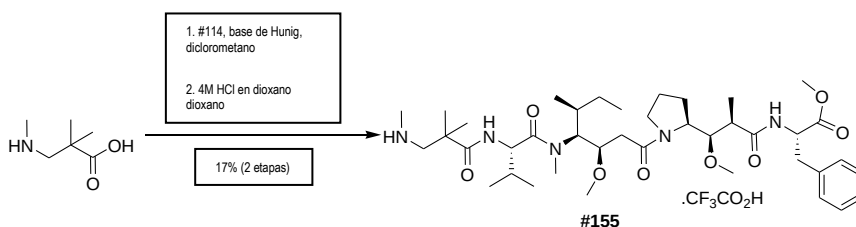


Etapa 1. Síntesis de N~2~-[2,2-dimetil-3-

(metilamino)propanoil]-N-[(1S,2R)-2-metoxi-4-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}propil]pirrolidin-1-il]-1-[(1S)-1-metilpropil]-4-oxobutil]-N-metil-L-valinamida, sal de ácido trifluoroacético (**#154**). A un envase que contiene **#50** (100 mg, 0.152 mmol, 1.0 eq.) y 1 mL de diclorometano, se agregó ácido 2,2-dimetil-3-(metilamino)propanóico (36 mg, 0.152 mmol, 1.0 eq.) seguido por base de Hunig (0.080 mL, 0.456 mmol, 3.0 eq.) y HATU (66 mg, 0.17 mmol, 1.1 eq.). Se permitió la agitación de la reacción a temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción fue concentrada *in vacuo* y después absorbida en acetato de etilo antes de ser lavada dos veces con 1M HCl y una vez con salmuera. La capa orgánica fue secada sobre sulfato de sodio y decantada. La reacción fue concentrada *in vacuo*. Se agregó dioxano (1 ml) seguido por 4M HCl en dioxano (1.0 mL, 4.0 mmol, 26 eq.). Se permitió la agitación de la reacción a temperatura ambiente durante ~12 horas. La reacción fue concentrada *in vacuo*. El material crudo fue purificado por medio de cromatografía C18 de fase inversa y presión media (Gradiente: 10% hasta 100% acetonitrilo en agua con 0.02% TFA en cada fase) produciendo **#154** (55.8 mg, 41%) como un sólido. LC-MS (Protocolo Q): *m/z* 771.8 [M+H⁺]. ¹H NMR (400 MHz,

DMSO- d_6), δ 8.70 (d), 8.45 (d), 7.90-8.15 (m), 7.82 (d), 7.75 (d), 7.55 (dd), 7.40 (dd), 6.90-7.10 (m), 5.10-5.30 (m), 4.45-4.55 (b), 4.30-4.45 (m), 4.20-4.30 (m), 3.75-3.90 (m), 3.50-3.60 (m), 3.15-3.40 (m), 3.05-3.15 (m), 2.85-3.05 (m), 2.60-2.85 (m), 2.25-2.40 (m), 1.80-2.25 (m), 1.70-1.80 (m), 1.20-1.60 (m), 0.80-1.10 (m), 0.05-0.80 (m).

Preparación de metil N-((2R,3R)-3-((2S)-1-((3R,4S,5S)-4-([N-[2,2-dimetil-3-(metilamino)propanoil]-L-valil](metil)amino)-3-metoxi-5-metilheptanoil]pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanoil)-L-fenilalaninato, sal de ácido trifluoroacético (#155).



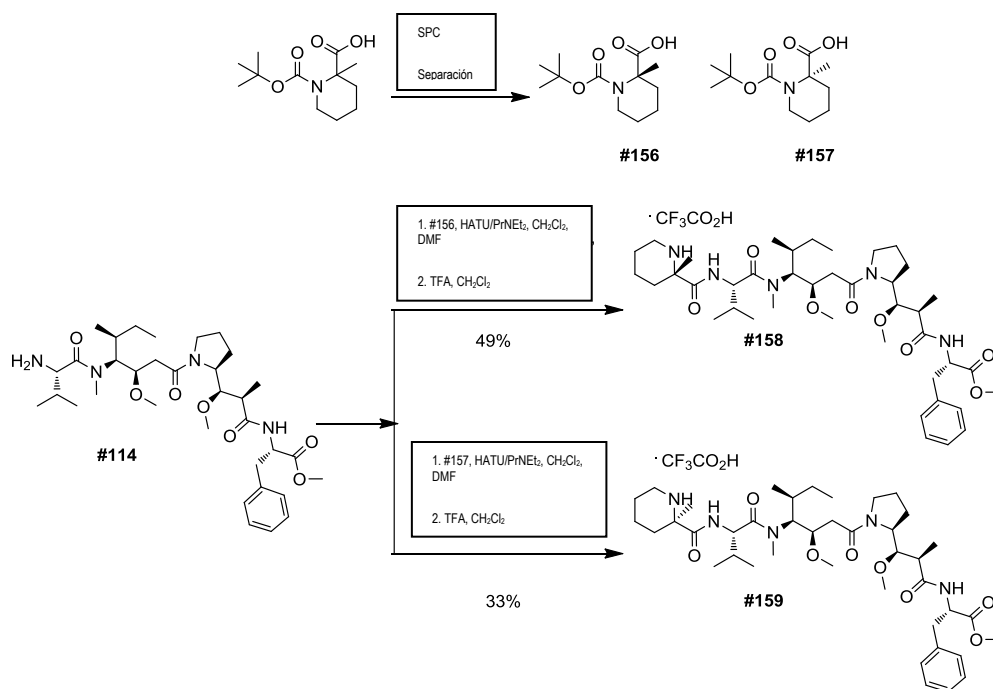
Etapa 1. Síntesis de metil N-((2R,3R)-3-((2S)-1-((3R,4S,5S)-4-([N-[2,2-dimetil-3-(metilamino)propanoil]-L-valil](metil)amino)-3-metoxi-5-metilheptanoil]pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanoil)-L-fenilalaninato, sal de ácido trifluoroacético (#155). A un envase que contiene #114 (96.2 mg, 0.152 mmol, 1.0 eq.) y 1 mL de diclorometano, se agregó 2,2-dimetil-3-(metilamino)propanóico (36.1 mg, 0.152 mmol, 1.0 eq.) seguido por base de Hunig (0.080 mL, 0.456 mmol, 3.0 eq.) y HATU (66 mg, 0.17 mmol, 1.1 eq.). Se permitió la agitación de la reacción a temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción fue concentrada *in vacuo* y después

absorbida en acetato de etilo antes de ser lavada dos veces con 1M HCl y una vez con salmuera. La capa orgánica fue secada sobre sulfato de sodio y decantada. La reacción fue concentrada *in vacuo*. Se agregó dioxano (1 ml) seguido por 4M HCl en dioxano (1.0 mL, 4.0 mmol, 26 eq.). Se permitió la agitación de la reacción a temperatura ambiente durante ~12 horas. La reacción fue concentrada *in vacuo*. El material crudo fue purificado por medio de cromatografía C18 de fase inversa y presión media (Gradiente: 10% hasta 100% acetonitrilo en agua con 0.02% TFA en cada fase) produciendo **#155** (22.2 mg, 17%). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ 8.55 (d), 8.22 (d), 8.15-8.35 (m), 7.90-8.05 (m) 7.10-7.25 (m) 4.70-4.80 (m), 4.55-4.65 (m), 4.45-4.52 (m), 3.93-4.00 (m), 3.72-3.78 (m), 3.60-3.70 (m), 3.50-3.60 (m), 3.40-3.50 (m), 2.80-3.30 (m), 2.45-2.60 (m), 2.00-2.45 (m), 1.60-1.80 (m), 1.35-1.50 (m), 1.10-1.35 (m).

15

Preparación de metil N-{(2R,3R)-3-metoxi-3-[(2S)-1-{(3R,4S,5S)-3-metoxi-5-metil-4-[metil(N-[(2S)-2-metilpiperidin-2-il]carbonil)-L-valil)amino]heptanoil}pirrolidin-2-il]-2-metilpropanoil}-L-fenilalaninato, sal de ácido trifluoroacético (#158) and metil N-{(2R,3R)-3-metoxi-3-[(2S)-1-{(3R,4S,5S)-3-metoxi-5-metil-4-[metil(N-[(2R)-2-metilpiperidin-2-il]carbonil)-L-valil)amino]heptanoil}pirrolidin-2-il]-2-metilpropanoil}-L-fenilalaninato, sal de ácido trifluoroacético (#159)

20



Etapas 1. (Síntesis de ácido (2S)-1-(ter-butoxicarbonil)-2-metilpiperidin-2-carboxílico (**#156**) y ácido (2R)-1-(ter-butoxicarbonil)-2-metilpiperidin-2-carboxílico (**#157**). Se separó ácido

5 1-(ter-butoxicarbonil)-2-metilpiperidin-2-carboxílico (500 mg, 2.06 mmol, 1 eq.) por medio de cromatografía de fluido supercrítica (Columna: Chiralcel OJ-H, 250 x 21 mm; Eluyente: 90:10 dióxido de carbono/etanol; Velocidad de flujo: 65 g/min; para dar los enantiómeros correspondientes. El primer pico de elución (tiempo de

10 retención = 1.57 minutos) fue aislado para dar **#156** como una goma (140 mg, 28%) (estereoquímica asignada de manera arbitraria como el enantiómero S). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 3.83-3.90 (m, 1H), 2.93-3.01 (m, 1H), 1.87-1.97 (m, 1H), 1.67-1.77 (m, 3H), 1.48-1.66 (m, 2H), 1.46 (s, 3H), 1.44 (s, 9H). Rotación óptica: [α]_D25 -21.7° (c

15 0.40, cloroformo). El Segundo pico de elución (tiempo de retención = 2.22 minutos) fue aislado para dar **#157** como un aceite (255 mg,

51%) (estereoquímica asignada de manera arbitraria como el enantiómero *R*). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 3.83-3.90 (m, 1H), 2.93-3.01 (m, 1H), 1.87-1.97 (m, 1H), 1.67-1.77 (m, 3H), 1.48-1.66 (m, 2H), 1.46 (s, 3H), 1.44 (s, 9H). Rotación óptica: $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ +30.2°(cloroformo).

Etapa 2A. Síntesis de metil N-{(2R,3R)-3-metoxi-3-[(2S)-1-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-5-metil-4-[metil(N-[(2S)-2-metilpiperidin-2-il]carbonil)-L-valil)amino]heptanoil]pirrolidin-2-il]-2-metilpropanoil}-L-fenilalaninato, sal de ácido trifluoroacético (**#158**). A una solución de **#156** (8.3 mg, 0.034 mmol, 1 eq.) en diclorometano (0.3 mL) y *N,N*-dimetilformamida (0.05 mL), se agregó *N,N*-diisopropiletilamina (0.018 mL, 0.102 mmol, 3 eq.), seguida por HATU (16.1 mg, 0.041 mmol, 1.2 eq.). La reacción fue sometida a agitación durante 15 minutos y se agregó **#114** (23.4 mg, 0.037 mmol, 1.1 eq.) y fue sometida a agitación a temperatura ambiente durante 18 horas. La reacción fue diluida con diclorometano (2.5 mL) y se agregó ácido cítrico al 10% (1.5 mL). Las capas fueron separadas utilizando un cartucho separador de fase y la capa acuosa extraída con diclorometano (2 X 2.5 mL) y las capas orgánicas combinadas fueron concentradas *in vacuo*. El residuo fue disuelto en diclorometano (4 mL) y se agregó ácido trifluoroacético (0.5 mL). La reacción fue sometida a agitación a temperatura ambiente durante 2 horas, concentrada después *in vacuo*. La purificación por medio de cromatografía de fase inversa (método M*) produjo **#158** (10.6 mg, 49%). HPLC (Protocolo T): *m/z* 758.4 $[\text{M}+\text{H}^+]$, tiempo de retención =

2.53 minutos (pureza >99%). ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6), δ 8.74-8.90 (m), 8.49-8.55(m), 8.24 (d), 8.08-8.12 (m), 7.94-8.01 (m), 7.14-7.26 (m), 4.71-4.77 (m), 4.57-4.68 (m), 4.44-4.55(m), 3.94-4.0 (m), 3.73-3.78 (m), 3.40-3.72 (m), 3.16-3.32 (m), 2.98-3.16 (m), 2.82-2.92 (m), 2.47-2.56 (m), 2.38-2.44 (m), 2.20-2.37 (m), 2.08-2.19 (m) 1.74-1.88 (m), 1.61-1.73 (m), 1.52-1.59 (m), 1.22-1.52 (m), 1.05 (dd), 0.94-1.00 (m), 0.85-0.93 (m), 0.74-0.79 (m).

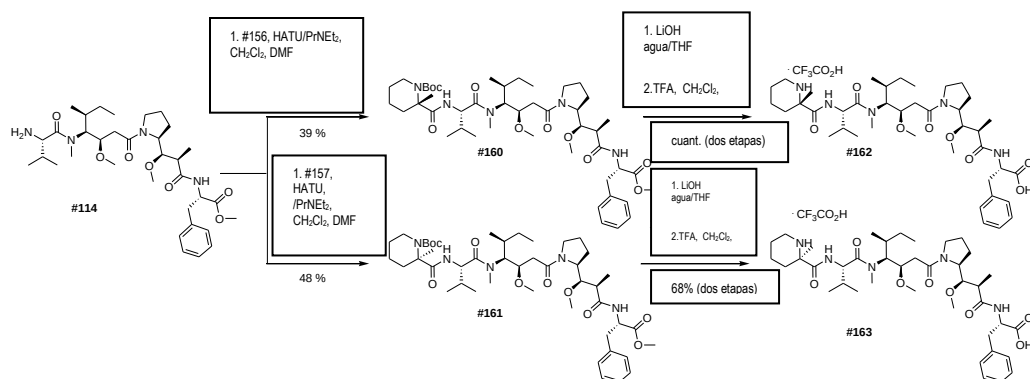
Etapas 2B. Síntesis de metil N-{(2R,3R)-3-metoxi-3-[(2S)-1-{(3R,4S,5S)-3-metoxi-5-metil-4-[metil(N-{(2R)-2-metilpiperidin-2-il]carbonil}-L-valil)amino]heptanoil}pirrolidin-2-il]-2-metilpropanoil}-L-fenilalaninato, sal de ácido trifluoroacético (**#159**). A una solución de **#157** (7.8 mg, 0.032 mmol, 1 eq.) en diclorometano (0.3 mL) y *N,N*-dimetilformamida (0.05 mL), se agregó *N,N*-diisopropiletilamina (0.017 mL, 0.096 mmol, 3 eq.) seguida por HATU (14.9 mg, 0.038 mmol, 1.2 eq.). La reacción fue sometida a agitación durante 15 minutos y se agregó **#114** (22.1 mg, 0.035 mmol, 1.1 eq.) y fue sometida a agitación a temperatura ambiente durante 3 horas y después concentrada *in vacuo*. La purificación del residuo a través de cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 0 hasta 80% acetona en heptano) produjo un sólido de color blanco el cual fue disuelto en dioxano (0.2 mL) y se agregó 4N HCl en dioxano (0.2 mL). La reacción fue sometida a agitación a temperatura ambiente durante 2 horas y se agregó 4N HCl en dioxano (0.1

mL) adicional. La reacción fue sometida a agitación durante 2 horas a temperatura ambiente, concentrada *in vacuo*. La purificación por medio de cromatografía de fase inversa (Método M*) produjo **#159** (6.6 mg, 33 %). HPLC (Protocolo T): *m/z* 758.4 [M+H⁺], tiempo de retención = 2.46 minutos (pureza = 89%). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆), δ 8.86-8.95 (m), 8.75-8.84(m), 8.48-8.54 (m), 8.33-8.45 (m), 8.22-8.27 (m), 8.17-8.19 (m), 7.99-8.12 (m), 7.83-7.91 (m), 7.13-7.29 (m), 7.04-7.08 (m), 4.69-4.76 (m), 4.55-4.66 (m), 4.45-4.53 (m), 3.96-4.01 (m), 3.41-3.78 (m), 3.28-3.33 (m), 3.24-3.27 (m), 3.16-3.23 (m), 3.11-3.15 (m), 3.02-3.10 (m), 2.93-3.02 (m), 2.91-2.93 (m), 2.84-2.91 (m), 2.76-2.82 (m), 2.69-2.71(m), 2.60-2.63 (m), 2.53-2.55 (m), 2.47-2.53 (m), 2.40-2.46 (m), 2.30-2.38 (m), 2.20-2.30 (m), 2.06-2.17 (m), 1.75-1.87 (m), 1.52-1.74 (m), 1.35-1.51 (m), 1.14-1.34 (m), 1.01-1.08 (m), 0.92-1.0 (m), 0.85-0.94 (m), 0.74-0.82 (m).

15

Preparación de N-{(2R,3R)-3-metoxi-3-[(2S)-1-{(3R,4S,5S)-3-metoxi-5-metil-4-[metil(N-[(2S)-2-metilpiperidin-2-il]carbonil)-L-valil)amino]heptanoil}pirrolidin-2-il]-2-metilpropanoil}-L-fenilalanina, sal de ácido trifluoroacético (#162) and N-{(2R,3R)-3-metoxi-3-[(2S)-1-{(3R,4S,5S)-3-metoxi-5-metil-4-[metil(N-[(2R)-2-metilpiperidin-2-il]carbonil)-L-valil)amino]heptanoil}pirrolidin-2-il]-2-metilpropanoil}-L-fenilalanina, sal de ácido trifluoroacético. (#163).

20



**Etapa 1A. Síntesis de metil N-{(2R,3R)-3-[(2S)-1-
{(3R,4S,5S)-4-[(N-[(2S)-1-(ter-butoxicarbonil)-2-metilpiperidin-
2-il]carbonil}-L-valil)(metil)amino]-3-metoxi-5-
5 metilheptanoil}pirrolidin-2-il]-3-metoxi-2-metilpropanoil}-L-
fenilalaninato (**#160**). A una solución de **#156** (106 mg, 0.436
mmol, 1 eq.) en diclorometano (3 mL) y *N,N*-dimetilformamida
(0.5 mL) se agregó diisopropiletilamina (0.228 mL, 1.31 mmol,
3 eq.) seguida por HATU (205 mg, 0.523 mmol, 1.2 eq.). La
10 reacción fue sometida a agitación durante 15 minutos y se
agregó **#114** (276 mg, 0.436 mmol, 1 eq.) y fue sometida a
agitación a temperatura ambiente durante 2 horas. La reacción
fue diluida con diclorometano (10 mL) y lavada con ácido
cítrico al 10% (3 X 5 mL). La capa orgánica fue secada sobre
15 sulfato de sodio, filtrada y el filtrado concentrado *in vacuo*. La
purificación por medio de cromatografía en gel de sílice
(Gradiente: 0 hasta 80% acetona en heptano) produjo **#160**
(145 mg, 39%). LC-MS (Protocolo Q1): *m/z* 858.8 [M+H⁺],
tiempo de retención = 1.12 minutos.**

20 **Etapa 1B. Síntesis de metil N-{(2R,3R)-3-[(2S)-1-
{(3R,4S,5S)-4-[(N-[(2R)-1-(ter-butoxicarbonil)-2-metilpiperidin-**

2-il]carbonil}-L-valil)(metil)amino]-3-metoxi-5-metilheptanoil}pirrolidin-2-il]-3-metoxi-2-metilpropanoil}-L-fenilalaninato (**#161**). A una solución de **#157** (109 mg, 0.448 mmol, 1 eq.) en diclorometano (3 mL) y *N,N*-dimetilformamida (0.5 mL), se
 5 agregó diisopropiletilamina (0.234 mL, 1.34 mmol, 3 eq.) seguida por HATU (205 mg, 0.538 mmol, 1.2 eq.). La reacción fue sometida a agitación durante 15 minutos y se agregó **#114** (284 mg, 0.448 mmol, 1 eq.). Después de ser sometida a agitación a temperatura ambiente durante 2 horas, la mezcla fue diluida con diclorometano (10 mL),
 10 lavada con ácido cítrico al 10% (3 X 5 mL). La capa orgánica fue secada sobre sulfato de sodio, filtrada y concentrada *in vacuo*. La purificación por medio de cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 0 hasta 100% acetona en heptano) produjo **#161** (185 mg, 48%). LC-MS (Protocolo Q): *m/z* 858.3 [*M*+*H*⁺], tiempo de retención = 2.25
 15 minutos.

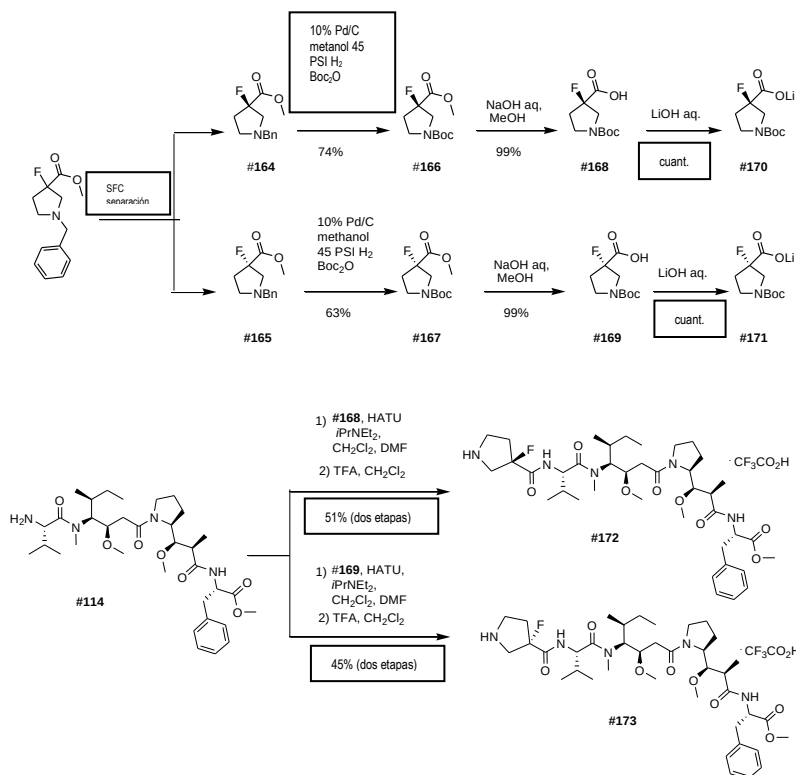
*Etapas 2A. Síntesis de N-}{(2R,3R)-3-metoxi-3-[(2S)-1-}{(3R,4S,5S)-3-metoxi-5-metil-4-[metil(N-}{[(2S)-2-metilpiperidin-2-il]carbonil}-L-valil)amino]heptanoil}pirrolidin-2-il]-2-metilpropanoil}-L-fenilalanina, sal de ácido trifluoroacético (**#162**).* A una solución de
 20 **#160** (145 mg, 0.169 mmol, 1 eq.) en tetrahidrofurano (1.25 mL) se agregó hidróxido de litio (8 mg, 0.338 mmol, 2 eq.) disuelto en agua (0.75 mL). La reacción fue sometida a agitación a temperatura ambiente durante 2 horas y evaporada hasta deshidratación *in vacuo*. El residuo fue disuelto en diclorometano (2.5 mL) y se agregó ácido
 25 trifluoroacético (1 mL). La reacción fue sometida a agitación durante

30 minutos, concentrada *in vacuo* y purificada por medio de cromatografía C18 de fase inversa y presión media (Gradiente: 0% hasta 100% acetonitrilo en agua con 0.02% TFA en cada fase) para obtener el compuesto de título **#162** (145 mg, 5 cuantitativo) como un sólido de color blanco. HPLC (Protocolo U): *m/z* 744.5 [M+H⁺], tiempo de retención = 7.121 minutos (pureza = 98%). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆). δ 8.76-8.96 (m), 8.52-8.58 (m), 8.38-8.43 (m), 8.11- 8.16 (m), 7.27-7.30 (m), 7.12-7.27 (m), 7.01-7.05 (m), 4.71-4.79 (m), 4.48-4.67 (m), 10 4.39-4.47 (m), 3.79-4.22 (m), 3.71-3.78 (m), 3.38-3.57 (m), 3.22-3.30 (m), 3.14-3.23 (m), 3.07-3.13 (m), 2.96-3.06 (m), 2.76-2.87 (m), 2.66-2.68 (m), 2.47-2.57 (m), 2.42-2.44 (m), 2.06-2.40 (m), 1.73-1.89 (m), 1.51-1.72 (m), 1.36-1.49 (m), 1.20-1.35 (m), 1.00-1.09 (m), 0.95-0.99 (m), 0.83-0.94 (m), 15 0.73-0.80 (m).

Etapas 2B. Síntesis de N-{(2R,3R)-3-metoxi-3-[(2S)-1-
 {(3R,4S,5S)-3-metoxi-5-metil-4-[metil(N-[(2R)-2-metilpiperidin-
 2-il]carbonil)-L-valil)amino]heptanoil}pirrolidin-2-il]-2-
 metilpropanoil}-L-fenilalanina, sal de ácido trifluoroacético
 20 (**#163**). El compuesto **#161** (185 mg, 0.216 mmol, 1 eq.) fue
 convertido al compuesto de título crudo **#163**, usando el
 procedimiento descrito para la Preparación de **#162**. El material
 crudo fue purificado por medio de cromatografía C18 de fase
 inversa y presión media (Gradiente: 0% hasta 85% acetonitrilo
 25 en agua con 0.02% TFA en cada fase) a fin de producir **#163**

(127 mg, 68%) como un sólido de color blanco. HPLC (Protocolo U): m/z 744.5 [M+H⁺], tiempo de retención = 7.077 minutos (pureza = 98%). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆). δ 8.79-8.99 (m), 8.36-8.49 (m), 8.12-8.17 (m), 7.31-7.34 (m), 7.11-7.27 (m), 7.05-7.09 (m), 4.71-4.77 (m), 4.54-4.68 (m), 4.40-4.53 (m), 3.88-4.39 (m), 3.71-3.77 (m), 3.39-3.58 (m), 3.22-3.32 (m), 3.10-3.22 (m), 3.04-3.09 (m), 2.92-3.03 (m), 2.77-2.88 (m), 2.68-2.71 (m), 2.47-2.57 (m), 2.43-2.45 (m), 2.30-2.42 (m), 2.03-2.29 (m), 1.74-1.88 (m), 1.52-1.73 (m), 1.37-1.51 (m), 1.17-1.37 (m), 1.00-1.07 (m), 0.95-0.99 (m), 0.84-0.93 (m), 0.73-0.81 (m).

Preparación de metil N-{(2R,3R)-3-[(2S)-1-{(3R,4S,5S)-4-[(N-{(3R)-3-fluoropirrolidin-3-il]carbonil}-L-valil)(metil)amino]-3-metoxi-5-metilheptanoil}pirrolidin-2-il]-3-metoxi-2-metilpropanoil}-L-fenilalaninato, sal de ácido trifluoroacético (#172) and metil N-{(2R,3R)-3-[(2S)-1-{(3R,4S,5S)-4-[(N-{(3R)-3-fluoropirrolidin-3-il]carbonil}-L-valil)(metil)amino]-3-metoxi-5-metilheptanoil}pirrolidin-2-il]-3-metoxi-2-metilpropanoil}-L-fenilalaninato, sal de ácido trifluoroacético (#173).



Etapa 1. Síntesis de metil (3R)-1-bencil-3-fluoropirrolidin-3-carboxilato (**#164**) and metil (3S)-1-bencil-3-fluoropirrolidin-3-carboxilato (**#165**). El (metil 1-bencil-3-fluoropirrolidin-3-carboxilato (3900 mg, 16.4 mmol, 1 eq.) fue separado por medio de cromatografía de fluido supercrítica (Columna: Chiralpak IC, 250 x 21 mm; Eluyente: 95:5 dióxido de carbono/propanol; Velocidad de flujo: 65 g/min; a fin de proporcionar los enantiómeros correspondientes. El primer pico de elución (tiempo de retención = 3.37 minutos) fue aislado para obtener **#164** (1720 mg, 36%) como un enantiómero individual (estereoquímica asignada de manera arbitraria como enantiómero *R*). ¹H NMR (400 MHz, TMS-CDCl₃; δ 7.17–7.30 (m, 5H), 3.74 (s, 3H), 3.65 (d, *J* = 12.9 Hz, 1H), 3.63 (d, *J* = 12.9 Hz, 1H), 2.86–3.03 (m, 3H), 2.61 (q, *J* = 8.0 Hz, 1H), 2.34–2.46 (m, 1H), 2.13–2.26 (m, 1H). Rotación óptica: [α]_D25 +24.7° (cloroformo). El

Segundo pico de elución (tiempo de retención = 3.91 minutos) fue aislado para producir **#165** (1600 mg, 33%) como un enantiómero individual (estereoquímica asignada de manera arbitraria como enantiómero S). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃; (CH₃)₄Si), δ 7.17–7.30 (m, 5H), 3.74 (s, 3H), 3.65 (d, *J* = 12.9 Hz, 1H), 3.63 (d, *J* = 12.9 Hz, 1H), 2.86–3.03 (m, 3H), 2.61 (q, *J* = 8.0 Hz, 1H), 2.34–2.46 (m, 1H), 2.13–2.26 (m, 1H). Rotación óptica: [α]_D25 - 23.3° (cloroformo).

Etapas 2A. Síntesis de 1-ter-butil 3-metil (3R)-3-fluoropirrolidin-1,3-dicarboxilato (**#166**). A una solución que contiene **#164** (355mg, 1.50 mmol, 1 eq.) y Di-ter-butil carbonato (400mg, 1.8 mmol, 1.2 eq.) en metanol (15.5 mL) se agregó 10% Pd/C (70 mg). La reacción fue hidrogenada a 45 psi en un agitador Parr durante 22 horas, filtrada sobre celita, y el filtrado concentrado *in vacuo* y purificada por medio de cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 0 hasta 30% acetato de etilo en heptano) para obtener **#166** como un aceite transparente. (272 mg, 74%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ 3.87 (s, 3H), 3.85–3.66 (m, 3H), 3.56 (m, 1H), 2.53–2.28 (m, 2H), 1.51 (s, 9H).

Etapas 2B. Síntesis de 1-ter-butil 3-metil (3S)-3-fluoropirrolidin-1,3-dicarboxilato (**#167**). El compuesto **#165** (362mg, 1.53 mmol, 1 eq.) fue convertido a **#167** con un rendimiento de 63% utilizando el método descrito con anterioridad para **#164**. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ 3.87 (s, 3H), 3.85–3.66 (m, 3H), 3.56 (m, 1H), 2.53–2.28 (m, 2H), 1.51 (s, 9H).

Etapas 3A. Síntesis de ácido (3R)-1-(ter-butoxicarbonil)-3-fluoropirrolidin-3-carboxílico (**#168**). A una solución de **#166** (272mg,

1.10 mmol, 1 eq.) disuelto en metanol (2.96 mL) se agregó una solución acuosa de hidróxido de sodio (2.5 M, 0.88 mL) y la reacción fue sometida a agitación a temperatura ambiente durante 3.5 horas. La reacción fue apagada con ácido cítrico acuoso al 10% (5 mL), se agregó acetato de etilo (100 mL) y las capas fueron separadas. La capa orgánica fue lavada con ácido cítrico al 10%, agua y salmuera, secada sobre sulfato de sodio, filtrada y concentrada *in vacuo* para generar **#168** como un sólido de color blanco. (253mg, 99%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ 3.96-3.69 (m, 3H), 3.59 (m, 1H), 2.59-2.33 (m, 2H), 1.51 (s, 9H). LC-MS (Protocolo Q1): *m/z* 232.1 [M-H⁺], tiempo de retención = 0.67 minutos. HPLC Quiral, tiempo de retención: 3.39 min (pureza = 99%). (Columna: Chiralpak AD-H, 4.6mm x 25cm, Fase móvil 5-60% CO₂/Metanol, velocidad de flujo 3.0 mL/min); Rotación óptica: [α]_D25 4.8 (c= 0.52, MeOH)

Etapa 3B. Síntesis de ácido (3S)-1-(ter-butoxicarbonil)-3-fluoropirrolidin-3-carboxílico (**#169**). A una solución de **#167** (238 mg, 0.963 mmol, 1 eq.) disuelta en metanol (2.6 mL) se agregó una solución acuosa de hidróxido de sodio (2.5 M, 0.88 mL) y la reacción fue sometida a agitación a temperatura ambiente durante 3 horas. La reacción fue apagada después con ácido cítrico acuoso al 10% (5 mL) y se agregó acetato de etilo (100 mL), y se separaron las capas. La capa orgánica fue lavada con ácido cítrico al 10%, agua y salmuera, secada después sobre sulfato de sodio, filtrada y concentrada *in vacuo*

para producir **#169** como un sólido de color blanco (221 mg, 99%). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3), δ 3.96-3.69 (m, 3H), 3.59 (m, 1H), 2.59-2.33 (m, 2H), 1.51 (s, 9H). LC-MS (Protocolo Q1): m/z 232.1 [$\text{M}-\text{H}^+$], tiempo de retención = 0.67 minutos. HPLC Quiral, tiempo de retención: 3.95 min (pureza = 98%) (Columna: Chiralpak AD-H, 4.6mm x 25cm, Fase móvil 5-60% CO_2 /Metanol, velocidad de flujo 3.0 mL/min); Rotación óptica: $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ -3.6 (c = 0.55, MeOH)

Etapas 4A. Síntesis de litio (3R)-1-(ter-butoxicarbonil)-3-fluoropirrolidin-3-carboxilato (**#170**). A una solución de **#168** (50 mg, 0.21 mmol, 1 eq.) en metanol (0.2 mL) se agregó una solución de hidróxido de litio (9.2 mg, 0.38 mmol, 1.8 eq.) disuelto en agua (0.1 mL). A continuación, se agregó tetrahidrofurano (0.3 mL) y la reacción fue sometida a agitación a 45°C durante 18 horas. La reacción fue concentrada *in vacuo* y el material fue formado como azeotropo (3X) con tolueno (2 mL) para obtener **#170** (51mg, 100%) como un sólido de color blanco el cual fue utilizado en la siguiente etapa sin purificación adicional.

Etapas 4B. Síntesis de litio (3S)-1-(ter-butoxicarbonil)-3-fluoropirrolidin-3-carboxilato (**#171**). A una solución de **#169** (75 mg, 0.32 mmol, 1 eq.) en metanol (0.3 mL) se agregó una solución de hidróxido de litio (13.8 mg, 0.572 mmol, 1.8 eq.) en agua (0.4 mL). A continuación, se agregó tetrahidrofurano (0.45 mL) y la reacción fue sometida a agitación a 45°C durante 18 horas. La reacción fue concentrada *in vacuo* y el material fue formado como azeotropo (3X) con tolueno (4 mL) para obtener **#171** (77 mg, 100%) como un sólido

de color blanco, el cual fue utilizado en la siguiente etapa sin purificación adicional.

Etapa 5A. Síntesis de metil N-{(2R,3R)-3-[(2S)-1-
 {(3R,4S,5S)-4-[(N-[(3R)-3-fluoropirrolidin-3-il]carbonil)-L-
 5 valil)(metil)amino]-3-metoxi-5-metilheptanoil}pirrolidin-2-il]-3-
 metoxi-2-metilpropanoil}-L-fenilalaninato, sal de ácido
 trifluoroacético (**#172**). A una suspensión de **#168** (36.9 mg,
 0.158 mmol, 1 eq.) y **#114** (100 mg, 0.158 mmol, 1.0 eq.) en
N,N-dimetilformamida (0.8 mL) y diclorometano (3.6 mL) se
 10 agregó *N,N*-diisopropiletilamina (0.083 mL, 0.474 mmol, 3 eq.)
 seguida por HATU (60.7 mg, 0.158 mmol, 1.0 eq.) y la reacción
 fue sometida a agitación a temperatura ambiente durante 18
 horas. La reacción fue diluida con acetato de etilo y lavada
 sucesivamente con agua, ácido cítrico acuoso al 10% (P/V), y
 15 salmuera. La capa orgánica fue secada sobre sulfato de sodio y
 concentrada *in vacuo* para dar 220 mg (164% de nivel teórico)
 de un crudo intermedio. Una porción de este crudo intermedio
 (50 mg, 23%) fue disuelta en diclorometano (1.5 mL) y se
 agregó ácido trifluoroacético (0.4 mL). La mezcla fue sometida a
 20 agitación a temperatura ambiente durante 2 horas y evaporada
 hasta deshidratación *in vacuo*. La purificación por medio de
 cromatografía de fase inversa (*Método M**) produjo **#172** (15.8
 mg, 51%) LC-MS (Protocolo Q): *m/z* 748.9 [M+H⁺] tiempo de
 retención = 1.29 minutos. ¹H NMR (DMSO-*d*₆), 9.16-9.43 (m),
 25 8.48-8.53 (m), 8.40-8.44 (m), 8.34-8.39 (m), 8.22-8.30 (m),

8.09-8.16 (m), 7.87-7.91 (m), 7.77-7.83 (m), 7.12-7.24 (m), 4.56-4.72 (m), 4.41-4.54 (m), 3.92-4.00 (m), 3.70-3.75 (m), 3.39-3.66 (m), 3.20-3.25 (m), 3.12-3.20 (m), 2.97-3.11 (m), 2.94 (br s), 2.75-2.89 (m), 2.63- 2.69 (m), 2.47-2.54 (m), 2.29- 2.45 (m), 2.15- 2.27 (m), 2.02- 2.15 (m), 1.57-1.87 (m), 1.33- 1.51 (m), 1.19-1.30 (m), 1.02 (dd), 0.82-0.97 (m), 0.70-0.79 (m).

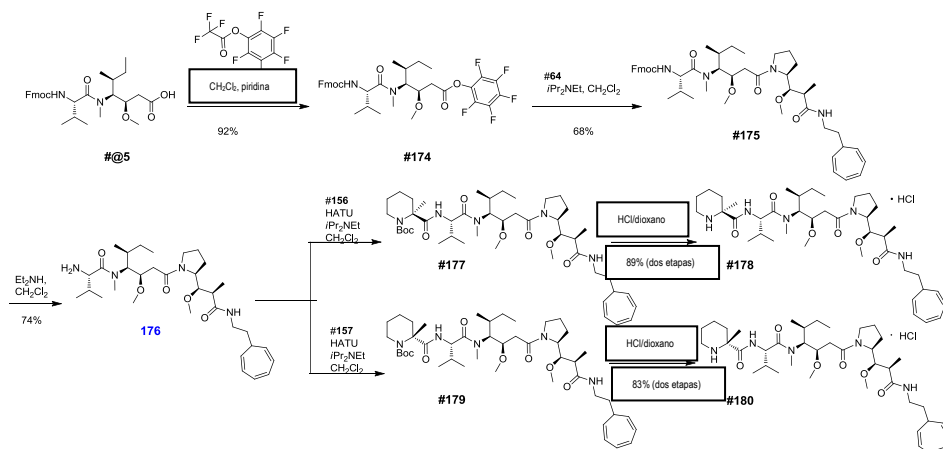
Etapas 5B. Síntesis de metil N-{(2R,3R)-3-[(2S)-1-[(3R,4S,5S)-4-[(N-[(3R)-3-fluoropirrolidin-3-il]carbonil]-L-valil)(metil)amino]-3-metoxi-5-metilheptanoil]pirrolidin-2-il]-3-metoxi-2-metilpropanoil}-L-fenilalaninato, sal de ácido trifluoroacético (**#173**). A una suspensión de **#169** (36.9 mg, 0.158 mmol, 1eq.) y **#114** (100.0 mg, 0.158 mmol, 1 eq.) en *N,N*-dimetilformamida (0.8 mL) y diclorometano (3.6 mL) se agregó *N,N*-diisopropiletilamina (0.083 mL, 0.474 mmol, 3 eq.), seguida por HATU (60.7 mg, 0.158 mmol, 1 eq.). La reacción fue sometida a agitación a temperatura ambiente durante 14 horas, diluida con acetato de etilo, y lavado de manera sucesiva con agua, ácido cítrico acuoso al 10% (P/V), y salmuera. La capa orgánica fue secada sobre sulfato de sodio y concentrado *in vacuo* para dar 180 mg (134% de nivel teórico) de un crudo intermedio. Una porción de este crudo intermedio (50 mg, 27%) fue disuelta en diclorometano (1.5 mL) y se agregó ácido trifluoroacético (0.4 mL) y la mezcla fue sometida a agitación a temperatura ambiente durante 2 horas y evaporada hasta deshidratación *in vacuo*. La purificación por medio de cromatografía de fase inversa (*Método M**) produjo **#173** (17.6 mg, 45%). LC-MS (Protocolo Q): *m/z* 748.9 [M+H⁺] tiempo de retención

=1.29 minutos. ^1H NMR (DMSO- d_6) 9.35-9.50 (m), 9.22-9.34 (m), 8.47-8.52 (m), 8.39-8.45 (m), 8.30-8.37 (m), 8.22-8.24 (m), 8.09-8.13 (m), 7.80-7.85 (m), 7.67-7.72 (m), 7.09-7.24 (m), 6.97-6.98 (m), 4.65-4.72 (m), 4.55-4.64 (m), 4.41-4.50 (m), 3.92-3.99 (m), 3.42-3.75 (m), 3.32-3.39 (m), 3.25-3.31(m), 3.21-3.24 (m), 3.11-3.20 (m), 3.06-3.11 (M), 2.97-3.05 (m), 2.95 (br s), 2.83-2.88 (m), 2.76-2.82 (m), 2.65-2.70 (m), 2.44-2.54 (m), 2.15-2.42 (m), 2.02-2.14 (m), 1.57-1.84 (m), 1.33-1.48 (m), 1.19-1.30 (m), 1.02 (dd), 0.92-0.97(m), 0.82-0.91 (m), 0.70-0.77 (m).

10

Preparación de (2S)-N-[(2S)-1-{[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[2-(ciclohepta-2,4,6-trien-1-il)etil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il](metil)amino}-3-metil-1-oxobutan-2-il]-2-metilpiperidin-2-carboxamida, sal de clorhidrato (#178) y (2R)-N-[(2S)-1-{[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[2-(ciclohepta-2,4,6-trien-1-il)etil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il](metil)amino}-3-metil-1-oxobutan-2-il]-2-metilpiperidin-2-carboxamida, sal de clorhidrato (#180).

15



Etapa 1. Síntesis de pentafluorofenil (3R,4S,5S)-4-[{N-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-L-valil}(metil)amino]-3-metoxi-5-metilheptanoato (#174). A una solución de #@5 (19.43 g, 37.03 mmol, 1 eq.) en diclorometano (100 mL) y piridina (5.86 g, 74.1 mmol, 2 eq.) se agregó pentafluorofenil trifluoroacetato (20.7 g, 74.1 mmol, 2 eq.) y la reacción fue sometida a agitación a temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción fue concentrada *in vacuo* y purificada por medio de cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 0 hasta 52% acetato de etilo en heptano) a fin de producir #174 (23.58 g, 92%) como un aceite de color amarillo. LC-MS (Protocolo Q1): *m/z* 691.2 [M+H⁺], tiempo de retención = 1.23 minutos.

Etapa 2. Síntesis de N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[2-(ciclohepta-2,4,6-trien-1-il)etil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N~2~-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-N-metil-L-valinamida (#175). A una solución de #174 (706 mg, 1.02 mmol, 1 eq.) y #64 (311mg, 1.02 mmol, 1 eq.) en diclorometano (3 mL) se agregó *N,N*-diisopropiletilamina (400 mg, 3.07 mmol, 3 eq.). Después de 18 horas

de agitación a temperatura ambiente, la reacción fue concentrada *in vacuo* y purificada por medio de cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 0 hasta 100% acetato de etilo en heptano) para obtener **#175** (560 mg, 68%) como un sólido de color blanco. LC-MS (Protocolo Q1): m/z 611.8 [M+H⁺], tiempo de retención = 1.15 minutos.

Etapa 3. Síntesis de N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[2-(ciclohepta-2,4,6-trien-1-il)etil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida (**#176**). De acuerdo con el procedimiento general A, a partir de **#175** (560 mg, 0.690 mmol, 1 eq.) en diclorometano (9 mL), y *N,N*-dietilamina (6.0 mL), se sintetizó el compuesto crudo deseado, el cual fue purificado por medio de cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 0 hasta 50% metanol en diclorometano) para obtener **#176** (351 mg, 87%) como un aceite de color amarillo. LC-MS (Protocolo Q1): m/z 589.5 [M+H⁺], tiempo de retención = 0.72 minutos.

Etapa 4A. Síntesis de ter-butil (2S)-2-{[(2S)-1-{[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[2-(ciclohepta-2,4,6-trien-1-il)etil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il](metil)amino}-3-metil-1-oxobutan-2-il]carbamoil}-2-metilpiperidin-1-carboxilato (**#177**). De acuerdo con el procedimiento general D, a partir de **#176** (100 mg, 0.170 mmol, 1 eq.), **#156** (53.8 mg, 0.221 mmol, 1.3 eq.), diclorometano (4.5 mL), HATU (84.9 mg, 0.221 mmol, 1.3 eq.) y *N,N*-diisopropiletilamina (0.123 mL, 0.697

mmol, 4.1 eq.), se sintetizó el material crudo deseado, el cual fue purificado por medio de cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 0 hasta 100% acetato de etilo en heptano) a fin de producir **#177** (145 mg, se asume rendimiento cuantitativo) como un sólido de color blanco. LC-MS (Protocolo Q1): m/z 814.7 $[M+H^+]$, tiempo de retención = 1.14 minutos.

Etapas 4B. Síntesis de ter-butil (2R)-2-{[(2S)-1-{[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[2-(ciclohepta-2,4,6-trien-1-il)etil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il](metil)amino}-3-metil-1-oxobutan-2-il]carbamoil}-2-metilpiperidin-1-carboxilato (**#179**). De acuerdo con el procedimiento general D, a partir de **#176** (100 mg, 0.170 mmol, 1 eq.), **#157** (53.8 mg, 0.221 mmol, 1.3 eq.), diclorometano (4.5 mL), HATU (84.9 mg, 0.221 mmol, 1.3 eq.) y *N,N*-diisopropiletilamina (0.123 mL, 0.697 mmol, 4.1 eq.), se sintetizó el material crudo deseado, el cual fue purificado por medio de cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 0 hasta 100% acetato de etilo en heptano) a fin de producir **#179** (155 mg, se asume rendimiento cuantitativo) como un sólido de color blanco. LC-MS (Protocolo Q1): m/z 814.7 $[M+H^+]$, tiempo de retención = 1.14 minutos.

Etapas 5A. Síntesis de (2S)-N-[(2S)-1-{[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[2-(ciclohepta-2,4,6-trien-1-il)etil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il](metil)amino}-3-metil-1-oxobutan-2-il]-2-metilpiperidin-2-carboxamida, sal de clorhidrato (**#178**). De acuerdo con el

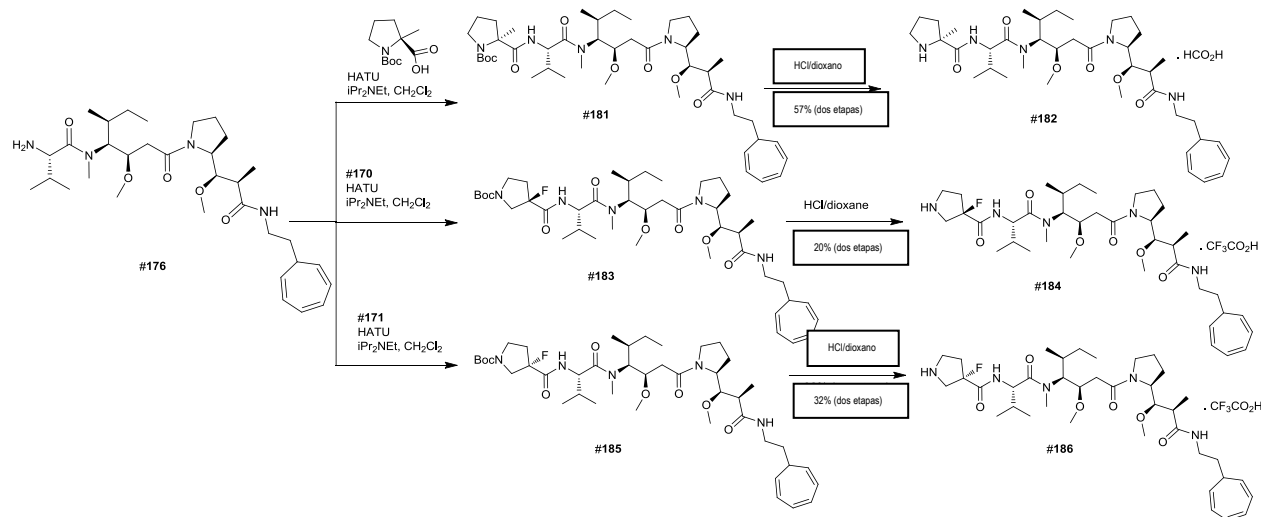
procedimiento general C, a partir de **#177** (143 mg, 0.176 mmol, 1 eq.) y 4M solución de ácido clorhídrico en dioxano (2.0 mL) se sintetizó el material deseado como una goma (145 mg). Una porción de este residuo crudo (25 mg) fue formada como azeotropo con una
 5 mezcla de metanol/acetonitrilo a fin de producir **#178** (20 mg, rendimiento 89%) como un sólido de color blanco. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6), δ 8.96-9.07 (m), 8.79-8.96 (m), 8.58 (d), 8.02- 8.08 (m), 7.77-7.83 (m), 7.25-7.31 (m), 7.19-7.24 (m), 6.56-6.67 (m), 6.12-6.21(m), 5.13-5.22 (m), 4.72-4.81 (m), 4.63-4.70 (m), 4.50-4.59 (m),
 10 4.07-4.16 (m), 3.98-4.05 (m), 3.80-3.86 (m), 3.55-3.76 (m), 3.46-3.54 (m), 3.38 -3.44 (m), 3.26-3.35 (m), 3.18-3.24 (m), 3.05-3.18 (m), 2.98-3.04 (m), 2.40-2.55 (m), 2.27-2.35 (m), 2.08-2.27 (m), 1.74-1.98 (m), 1.50-1.74 (m), 1.20-1.46 (m), 0.73-1.16 (m). LC-MS (Protocolo Q1): m/z 714.6 $[\text{M}+\text{H}^+]$, tiempo de retención = 0.76 minutos. HPLC
 15 (Protocolo U): m/z 714.5 $[\text{M}+\text{H}^+]$ tiempo de retención = 7.124 minutos (pureza =91%).

Etapas 5B. Síntesis de (2R)-N-[(2S)-1-{[(3R,4S,5S)-1-
 {(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[2-(ciclohepta-2,4,6-trien-1-il)etil]amino}-1-
 metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-
 20 oxoheptan-4-il](metil)amino}-3-metil-1-oxobutan-2-il]-2-
 metilpiperidin-2-carboxamida, sal de clorhidrato (**#180**). De acuerdo con el procedimiento general C, a partir de **#179** (162 mg, 0.199 mmol, 1 eq.) y 4M solución de ácido clorhídrico en dioxano (2.0 mL) se sintetizó el material deseado como una
 25 goma (155 mg). Una de esta goma (25 mg) fue formada como

azeotropo con una mezcla 1/1 de metanol/acetonitrilo a fin de producir **#180** (20 mg, 83%) como un sólido. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6), δ 9.02-9.13 (m), 8.83-8.93 (m), 8.39-8.46 (m), 8.00-8.06 (m), 7.78 (t), 7.24-7.30 (m), 7.16-7.21 (m), 6.54-6.65 (m), 6.09-6.19 (m), 5.11-5.18 (m), 4.69-4.78 (m), 4.59-4.68 (m), 4.46-4.56 (m), 4.08-4.13 (m), 3.95-4.03 (m), 3.77-3.85 (m), 3.54-3.73 (m), 3.43-3.53 (m), 3.37-3.42 (m), 3.24-3.33 (m), 3.16-3.22 (m), 3.03- 3.15 (m), 2.99-3.02 (m), 2.89-2.98 (m), 2.65-2.76 (m), 2.41-2.54 (m), 2.15-2.39 (m), 2.07-2.15 (m), 1.51-1.94 (m), 1.49 (d), 1.38 (t), 1.20-1.32 (m), 1.02-1.09 (m), 0.84-0.97 (m), 0.73-0.81 (m). LC-MS (Protocolo Q1): m/z 714.6 $[\text{M}+\text{H}^+]$, tiempo de retención = 0.76 HPLC (Protocolo U): m/z 714.4 $[\text{M}+\text{H}^+]$, tiempo de retención = 7.409 minutos (pureza = 90%).

Preparación de 2-metil-L-prolil-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[2-(ciclohepta-2,4,6-trien-1-il)etil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida, sal de ácido fórmico (#182) y N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[2-(ciclohepta-2,4,6-trien-1-il)etil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N~2~-{[(3R)-3-fluoropirrolidin-3-il]carbonil}-N-metil-L-valinamida, sal de ácido trifluoroacético (#184) y N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[2-(ciclohepta-2,4,6-trien-1-il)etil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N~2~-{[(3S)-3-fluoropirrolidin-3-il]carbonil}-N-metil-L-valinamida, sal de ácido trifluoroacético

(#186).



Etapa 1A. Síntesis de 1-(ter-butoxicarbonil)-2-metil-L-prolil-N-

5 [(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[2-(ciclohepta-2,4,6-trien-1-il)etil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida (**#181**). De acuerdo con el procedimiento general D, a partir de **#176** (100 mg, 0.170 mmol, 1 eq.), (S)-1-(ter-butoxicarbonil)-2-metil-L-prolina (50.7 mg, 0.221 mmol, 1.3 eq.), diclorometano (4.3 mL), HATU (84.9 mg, 0.221 mmol, 1.3 eq.) y N,N-diisopropiletilamina (0.123 mL, 0.697 mmol, 4.1 eq.), se sintetizó el material crudo deseado, el cual fue purificado por medio de cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 0 hasta 100% acetato de etilo en heptano) a fin de producir **#181** (142 mg, se asume rendimiento cuantitativo). LC-MS (Protocolo Q1): *m/z* 800.6 [M+H⁺], tiempo de retención = 1.11 minutos.

15

Etapa 1B. Síntesis de ter-butil (3R)-3-{[(2S)-1-{[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[2-(ciclohepta-2,4,6-trien-1-il)etil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-

metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il](metil)amino}-3-metil-1-oxobutan-2-il]carbamoil}-3-fluoropirrolidin-1-carboxilato (**#183**). A una solución de **#170** (18.2 mg, 0.076 mmol, 1 eq.) en diclorometano (1.8 mL) y *N,N*-dimetilformamida (0.3 mL) se agregó *N,N*-diisopropiletilamina (0.040 mL, 0.228 mmol, 3 eq.) seguida por HATU (29.2 mg, 0.076 mmol, 1 eq.). Después de someter a agitación durante 10 minutos a temperatura ambiente, se agregó **#176** (45 mg, 0.076 mmol, 1 eq.). La reacción fue sometida a agitación a temperatura ambiente durante 18 horas y se agregó HATU adicional (29 mg, 0.076 mmol, 1 eq.). Después de 8 horas the la reacción fue concentrada *in vacuo* a fin de proporcionar **#183** (61.0 mg, cuantitativo) el cual fue llevado a la siguiente etapa sin purificación adicional. LC-MS (Protocolo Q1): *m/z* 826.6 [M+Na⁺], tiempo de retención = 1.05 minutos.

Etapas 1C. Síntesis de ter-butil (3*S*)-3-{[(2*S*)-1-{[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[2-(ciclohepta-2,4,6-trien-1-il)etil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il](metil)amino}-3-metil-1-oxobutan-2-il]carbamoil}-3-fluorociclopentanecarboxilato (**#185**). A una solución de **#171** (24 mg, 0.1 mmol, 1 eq.) en diclorometano (2.35 mL) y *N,N*-dimetilformamida (0.33 mL) se agregó *N,N*-diisopropiletilamina (0.053 mL, 0.300 mmol, 3 eq.) seguida por HATU (38.4 mg, 0.100 mmol, 1 eq.). Después de someter a agitación a temperatura ambiente durante 10 minutos, se agregó **#176** (58.9 mg, 0.1 mmol, 1 eq.). La reacción fue sometida a agitación a temperatura ambiente durante 18 horas y se agregó una cantidad adicional de HATU (38.4 mg, 0.100 mmol, 1 eq.)

y *N,N*-dimetilformamida (0.2 mL) y se sometió a agitación durante 9 horas adicionales. La reacción fue concentrada *in vacuo* para dar **#185** (80 mg, cuantitativo), el cual fue llevado a la siguiente etapa sin purificación adicional. LC-MS (Protocolo Q1): *m/z* 804.6 [M+H⁺], tiempo de retención = 1.05 minutos.

Etapa 2A. Síntesis de 2-metil-L-prolil-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[2-(ciclohepta-2,4,6-trien-1-il)etil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida, sal de ácido fórmico (**#182**). De acuerdo con el procedimiento general C, a partir de **#181** (136 mg, 0.170 mmol, 1 eq.) y 4M solución de ácido clorhídrico en dioxano (2 mL) se sintetizó el material deseado como una goma (142 mg). Una porción de este residuo crudo (20 mg, 14%) fue formada como azeotropo con una mezcla 1/1 de metanol/acetonitrilo y después purificada por medio de cromatografía de fase inversa (*Método O*) para obtener **#182** (10 mg, 57% durante dos etapas) como un sólido. HPLC (Protocolo U): *m/z* 700.4 [M+H⁺], tiempo de retención = 7.106 minutos (pureza > 90%). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ 8.25-8.39 (m), 8.20-8.25 (m), 7.96-7.99 (m), 7.74-7.77 (m), 6.55-6.63 (m), 6.10-6.18 (m), 5.11- 5.18 (m), 4.66-4.72 (m), 4.51-4.61 (m), 4.46-4.50 (m), 3.96-4.01 (m), 3.37-3.86 (m), 3.20-3.36 (m), 3.11-3.19 (m), 3.03-3.11 (m), 2.98-3.03 (m), 2.90-2.96 (m), 2.77-2.79 (m), 2.65-2.73 (m), 2.57-2.63 (m), 2.47-2.56 (m), 2.36-2.46 (m), 2.26-2.32 (m), 2.14-2.25 (m), 2.03-

2.10 (m), 1.92-2.03 (m), 1.72-1.92 (m), 1.64-1.72 (m), 1.60-1.64 (m),
1.50-1.59 (m), 1.39-1.48 (m), 1.23-1.32 (m), 1.18-1.22 (m), 1.12-1.14
(m), 1.01-1.09 (m), 0.83-1.00 (m), 0.74-0.83 (m), 0.70- 0.74 (m).

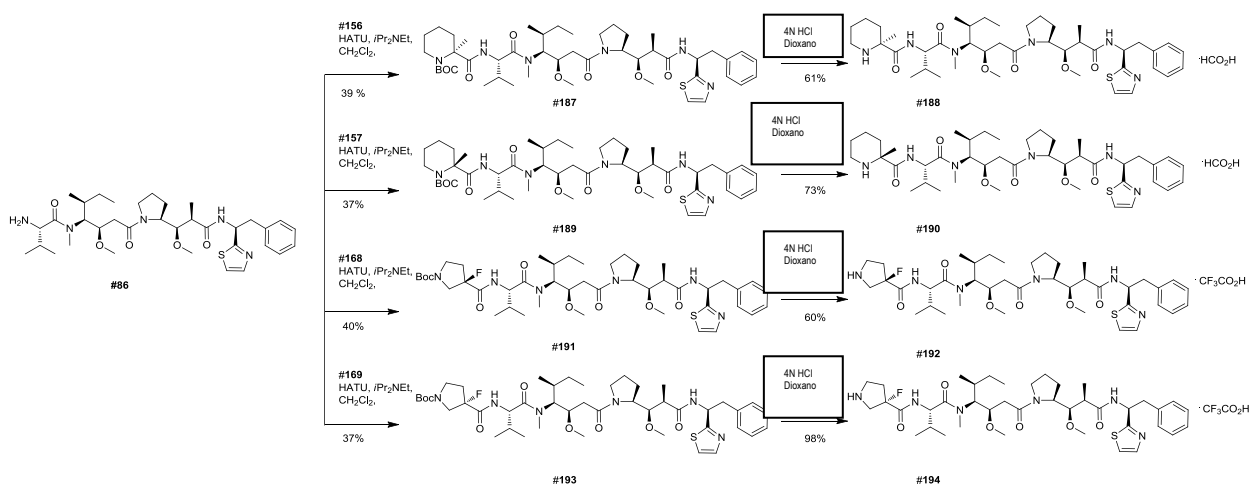
Etapas 2B. Síntesis de N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[[2-
5 (ciclohepta-2,4,6-trien-1-il)etil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-
oxopropil]pirrolidin-1-il]-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N~2~-
{[(3R)-3-fluoropirrolidin-3-il]carbonil}-N-metil-L-valinamida sal de
ácido trifluoroacético (**#184**). De acuerdo con el procedimiento
general C, a partir de **#183** (61.1 mg, 0.076 mmol, 1 eq.),
10 diclorometano (0.3 mL), y 4M solución de ácido clorhídrico en
dioxano (0.9 mL) se sintetizó el material crudo deseado (140 mg).
Una porción del material crudo (98 mg, 69 %) fue purificada por
medio de cromatografía de fase inversa (*Método M**) para dar **#184**
(7.6 mg, 20% durante dos etapas). HPLC (Protocolo T): *m/z* 704.5
15 [M+H⁺], tiempo de retención = 2.50 minutos (pureza = 84%). ¹H NMR
(400 MHz, DMSO-*d*₆), δ 8.67-8.71 (m), 8.44-8.48 (m), 8.27-8.33 (m),
8.22-8.27 (m), 7.97-8.03 (m), 7.84-7.89 (m), 7.74-7.81 (m), 7.43-7.48
(m), 7.23-7.29 (m), 7.17-7.21 (m), 6.55-6.66 (m), 6.10-6.19 (m), 5.10-
5.19 (m), 4.66-4.75 (m), 4.51-4.63 (m), 3.96-4.04 (m), 3.78-3.85 (m),
20 3.65-3.73 (m), 3.46-3.62 (m), 3.37-3.45 (m), 3.24-3.37 (m), 3.21-3.24
(m), 3.13-3.21 (m), 3.02-3.13 (m), 2.95-3.00 (m), 2.80-2.82 (m), 2.66-
2.71 (m), 2.47-2.57 (m), 2.24-2.46 (m), 2.09-2.24 (m), 1.95-2.05 (m),
1.49-1.93 (m), 1.22-1.34 (m), 1.02-1.09 (m), 0.83-1.01 (m), 0.74-0.82
(m).

25 *Etapas 2C.* Síntesis de N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[[2-

(ciclohepta-2,4,6-trien-1-il)etil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N~2~-{[(3S)-3-fluoropirrolidin-3-il]carbonil}-N-metil-L-valinamida, sal de ácido trifluoroacético (**#186**). De acuerdo con el procedimiento general C, a partir de **#185** (80.3 mg, 0.1mmol, 1 eq.), diclorometano (0.4 mL), y una 4M solución de ácido clorhídrico en dioxano (1.2 mL) se sintetizó el material crudo deseado, en el cual una porción (94 mg, 53%) fue purificada por medio de cromatografía de fase inversa (*Método* 10 *M**) para dar **#186** (11.8 mg, 32% durante dos etapas). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆), δ 8.85-9.07 (m), 8.29-8.41(m), 7.99-8.04 (m), 7.76-7.84 (m), 6.56-6.68 (m), 6.12-6.21 (m), 5.12-5.21 (m), 4.87-4.99 (m), 4.69-4.79 (m), 4.49-4.67 (m), 3.98-4.06 (m), 3.80-3.87 (m), 3.64-3.76 (m), 3.55-3.64 (m), 3.47-3.54 (m), 15 3.39-3.46 (m), 3.26-3.39 (m), 3.22-3.25 (m), 3.18- 3.22 (m), 3.06-3.14 (m), 2.98-3.01 (m), 2.55- 2.57 (m), 2.42-2.49 (m), 2.11-2.38 (m), 2.09 (s), 1.78-1.97 (m), 1.72-1.77 (m), 1.51-1.71 (m), 1.24-1.36 (m), 1.07 (dd), 0.83-1.03 (m), 0.75- 0.82 (m). HPLC (Protocolo T): m/z 704.5 [M+H⁺], tiempo de retención = 20 2.48 minutos (pureza = 100%).

Preparación de (2S)-N-[(2S)-1-{[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-{[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}propil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il](metil)amino}-3-metil-1-oxobutan-2-il]-2-metilpiperidin-2-

- carboxamide, sal de formato (#188) y (2R)-N-[(2S)-1-{[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-{[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}propil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il](metil)amino}-3-metil-1-oxobutan-2-il]-2-metilpiperidin-2-carboxamide, sal de formato (#190) y N~2~-{[(3R)-3-fluoropirrolidin-3-il]carbonil}-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-{[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}propil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida , sal de ácido trifluoroacético (#192) y
- 10 N~2~-{[(3S)-3-fluoropirrolidin-3-il]carbonil}-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-{[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}propil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida, sal de ácido trifluoroacético (#194).



15

Etap a 1A. Síntesis de ter-butil (2S)-2-{[(2S)-1-{[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-{[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}propil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-

il](metil)amino}-3-metil-1-oxobutan-2-il]carbamoil}-2-metilpiperidin-1-carboxilato (**#187**). De acuerdo con el procedimiento general D, a partir de **#86** (280 mg, 0.4 mmol, 1 eq.), **#156** (100 mg, 0.4 mmol, 1 eq.), diclorometano (5mL),
 5 HATU (182 mg, 0.48 mmol, 1.2 eq.) y *N,N*-diisopropiletilamina (100 mg, 0.8 mmol, 2 eq.) se sintetizó el material crudo deseado, el cual fue purificado por medio de cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 0.01 hasta 0.05% metanol en diclorometano) a fin de producir **#187** (220 mg, 62%) como un
 10 sólido de color blanco. HPLC (Protocolo V): *m/z* 883.57 [M+H⁺], tiempo de retención = 3.23 minutos (pureza = 95%).

Etapa 1B. Síntesis de ter-butil (2R)-2-{[(2S)-1-{[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-{[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}propil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-
 15 il](metil)amino}-3-metil-1-oxobutan-2-il]carbamoil}-2-metilpiperidin-1-carboxilato (**#189**). De acuerdo con el procedimiento general D, a partir de **#86** (400 mg, 0.6 mmol, 1 eq.), **#157** (146 mg, 0.6 mmol, 1 eq.), diclorometano (10 mL), HATU (259 mg, 0.72 mmol, 1.2 eq.) and *N,N*-diisopropiletilamina (158 mg, 1.2 mmol, 2 eq.) se sintetizó el
 20 material crudo deseado, el cual fue purificado por medio de cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 0.01 hasta 0.05% metanol en diclorometano) a fin de producir **#189** (220 mg, 37%) como un sólido de color blanco. HPLC (Protocolo W): *m/z* 883.7 [M+H⁺], tiempo de retención = 4.12 minutos (pureza = 95%).

25 *Etapa 1C.* Síntesis de ter-butil (3R)-3-fluoro-3-{[(2S)-1-

Etapa 1D. Síntesis de ter-butil (3S)-3-fluoro-3-[[[(2S)-1-
[[[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-
15 [[[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}propil]pirrolidin-1-il]-5-
metil-1-oxoheptan-4-il](metil)amino}-3-metil-1-oxobutan-2-
il]carbamoil}pirrolidin-1-carboxilato (**#193**). De acuerdo con el
procedimiento general D, a partir de **#86** (300 mg, 0.45 mmol, 1 eq.),
#169 (106 mg, 0.45 mmol, 1 eq.), diclorometano (10 mL), HATU (194
20 mg, 0.54 mmol, 1.2 eq.) y diisopropiletilamina (117 mg, 0.9 mmol, 2
eq.) se sintetizó el material crudo deseado, el cual fue purificado por
medio de cromatografía de fase inversa (*Método P*) a fin de producir
#193 (149 mg, 37%) como un sólido de color blanco. HPLC
(Protocolo X): *m/z* 873.4 [M+H⁺], tiempo de retención = 3.34 minutos
25 (pureza = 98%).

Etapas 2A. Síntesis de (2S)-N-[(2S)-1-[[[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}propil]pirrolidin-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il](metil)amino}-3-metil-1-oxobutan-2-il]-2-metilpiperidin-2-carboxamida, sal de ácido fórmico (**#188**). De acuerdo con el procedimiento general C, a partir de **#187** (20 mg, 0.023 mmol, 1 eq.), diclorometano (0.1 mL), acetonitrilo (0.1 mL) y 4M solución de ácido clorhídrico en dioxano (0.26 mL) se sintetizó el material crudo deseado, el cual fue purificado por medio de cromatografía de fase inversa (*Método N**) para obtener **#188** (11.6 mg, 61%,); HPLC (Protocolo T): m/z 783.8[M+H⁺], tiempo de retención = 2.53 minutos (pureza= 96%). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ 8.82-8.87 (m), 8.60-8.63 (m), 8.26-8.29 (m), 7.84-7.90 (m), 7.75-7.81 (m), 7.60-7.67 (m), 7.21-7.31 (m), 7.14-7.19 (m), 5.49-5.55 (m), 5.37-5.42 (m), 4.69-4.75 (m), 4.59-4.65 (m), 4.50-4.56 (m), 3.95-4.01 (m), 3.77-3.82 (m), 3.54-3.61 (m), 3.47-3.53 (m), 3.24-3.45 (m), 3.14-3.23 (m), 3.03-3.08 (m), 2.96-3.03 (m), 2.78-2.80 (m), 2.64-2.73 (m), 2.60-2.62 (m), 2.47-2.56 (m), 2.31-2.45 (m), 2.13-2.28 (m), 2.00-2.07 (m), 1.92-1.99 (m), 1.71-1.86 (m), 1.58-1.70 (m), 1.50-1.56 (m), 1.38-1.49 (m), 1.15-1.36 (m), 1.08-1.14 (m), 1.03-1.07 (m), 0.90-1.02 (m), 0.83-0.90 (m), 0.73-0.80 (m), 0.70-0.73 (m).

Etapas 2B. Síntesis de (2R)-N-[(2S)-1-[[[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[(1S)-2-

fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}propil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il](metil)amino}-3-metil-1-oxobutan-2-il]-2-metilpiperidin-2-carboxamida, sal de ácido fórmico. (**#190**). De acuerdo con el procedimiento general C, a partir de **#189** (20 mg, 0.022 mmol, 1 eq.), diclorometano (0.1 mL), acetonitrilo (0.1 mL) y 4M solución de ácido clorhídrico en dioxano (0.26 mL) se sintetizó el material crudo deseado, el cual fue purificado por medio de cromatografía de fase inversa (*Método N**) para obtener **#190** (13.2 mg, 73%,) HPLC (Protocolo T): m/z 783.7[M+H⁺], tiempo de retención = 2.5 minutos (pureza= 100%). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ 8.83-8.86 (m), 8.60-8.62 (m), 8.24-8.27 (m), 7.83-7.89 (m), 7.78-7.80 (m), 7.75-7.77 (m), 7.64-7.66 (m), 7.60-7.63 (m), 7.20-7.31 (m), 7.13-7.19 (m), 5.49- 5.55 (m), 5.36-5.42 (m), 4.65-4.74 (m), 4.60-4.65 (m), 4.50-4.56 (m), 3.95-4.01 (m), 3.76-3.81 (m), 3.53-3.62 (m), 3.47-3.52 (m), 3.22-3.45 (m), 3.14-3.21 (m), 2.97-3.05 (m), 2.93-2.96 (m), 2.79-2.86 (m), 2.76-2.78 (m), 2.65-2.68 (m), 2.48-2.56 (m), 2.37-2.43 (m), 2.29-2.35 (m), 2.17-2.27 (m), 2.04-2.11 (m), 1.93-2.00 (m), 1.70-1.85 (m), 1.53-1.69 (m), 1.36-1.48 (m), 1.28-1.36 (m), 1.13-1.26 (m), 1.08-1.12 (m), 0.98-1.07 (m), 0.91-0.97 (m), 0.84-0.91 (m), 0.73-0.78 (m).

Etapas 2C. Síntesis de N-2~-{[(3R)-3-fluoropirrolidin-3-il]carbonil}-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-{[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}propil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida, sal de ácido trifluoroacético. (**#192**). De acuerdo con el

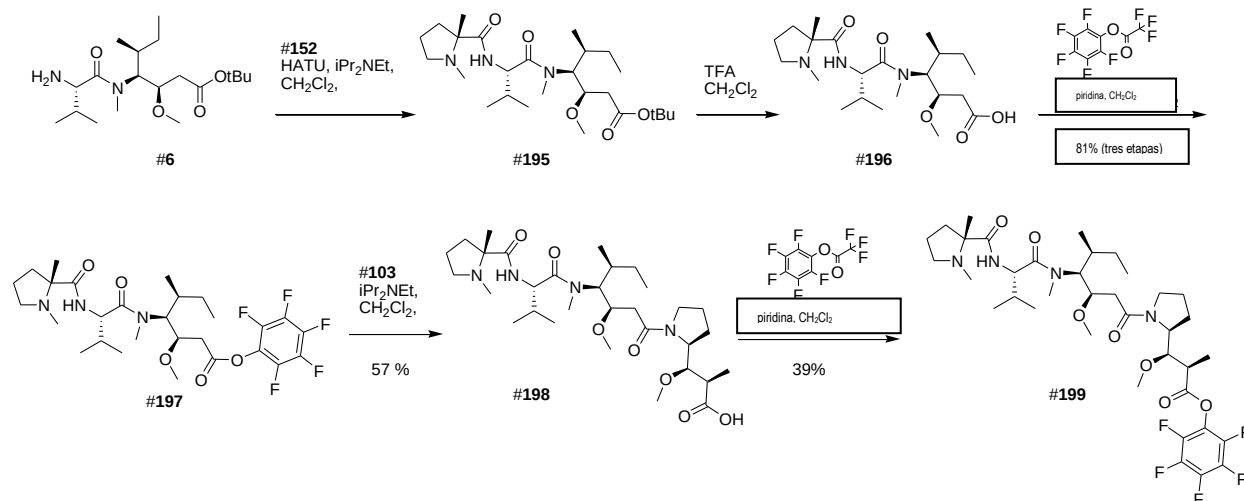
procedimiento general C, a partir de **#191** (10 mg, 0.011 mmol, 1 eq.), diclorometano (0.1 mL), acetonitrilo (0.1 mL) y 4M solución de ácido clorhídrico en dioxano (0.13 mL) se sintetizó el material crudo deseado, el cual fue purificado por medio de cromatografía de fase inversa (*Método M**) para obtener **#192** (5.1mg, 60 %) HPLC (Protocolo T): m/z 773.5[M+H⁺], tiempo de retención = 2.43 minutos (pureza = 100%). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) 9.32-9.44 (m), 9.17-9.21 (m), 8.91 (d), 8.63-8.69 (m), 8.38-8.43 (m), 8.22-8.27 (m), 7.80 (dd), 7.66 (dd), 7.14-7.33 (m), 5.49-5.57 (m), 5.37-5.45 (m), 4.10-4.78 (m), 3.97-4.06 (m), 3.77-3.83 (m), 3.33-3.65 (m), 3.15-3.29 (m), 2.95-3.09 (m), 2.82-2.83 (m), 2.67-2.71 (m), 2.55-2.57 (m), 2.32-2.54 (m), 2.10-2.31 (m), 2.09 (s), 1.72-1.90(m), 1.57-1.72 (m). 1.38-1.50 (m), 1.15-1.38 (m), 1.09 (dd), 0.85-1.0 (m), 0.75-0.83 (m).

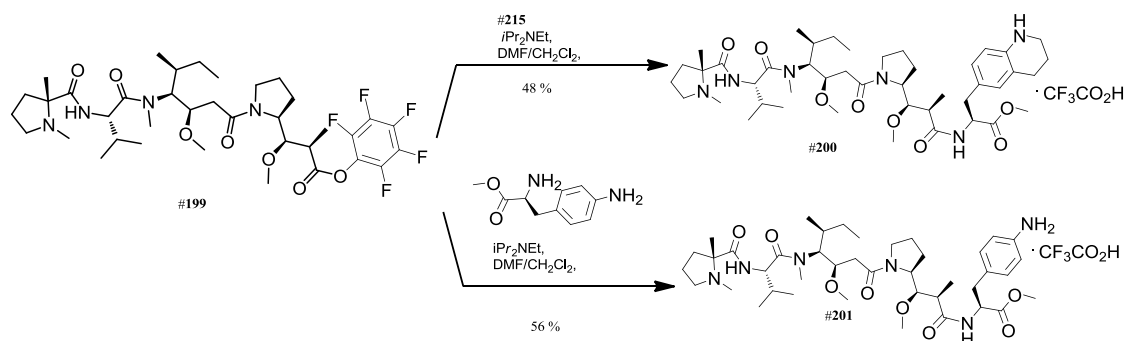
Etapas 2D. Síntesis de N~2~-{[(3S)-3-fluoropirrolidin-3-il]carbonil}-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-{[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}propil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida, sal de ácido trifluoroacético. (**#194**). De acuerdo con el procedimiento general C, a partir de **#193** (10 mg, 0.011 mmol, 1 eq.), diclorometano (0.1 mL), acetonitrilo (0.1 mL) y 4M solución de ácido clorhídrico en dioxano (0.13 mL) se sintetizó el material crudo deseado, el cual fue purificado por medio de cromatografía de fase inversa (*Método M**) para obtener **#194** (9 mg, 93%) HPLC (Protocolo T): m/z

773.8 [M+H⁺], tiempo de retención = 2.42 minutos (pureza = 100%).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) 9.39-9.52 (m), 9.21-9.35 (m), 8.90 (d), 8.63-8.69 (m), 8.42-8.48 (m), 8.29 -8.34 (m), 7.80 (dd), 7.66 (dd), 7.22-7.33 (m), 7.13-7.21 (m), 5.47-5.57 (m), 5.36-5.44 (m), 4.43-4.93 (m), 3.97-4.05 (m), 3.64-3.83 (m), 3.32-3.61 (m), 3.15-3.29 (m), 3.06-3.09 (m), 2.95-3.05 (m), 2.89-2.95 (m), 2.82-2.84 (m), 2.67-2.72 (m), 2.54-2.56 (m), 2.48-2.53 (m), 2.28-2.48 (m), 2.11-2.28 (m), 2.09 (s), 1.57-1.72 (m), 1.38-1.47 (m), 1.15-1.37 (m), 1.09 (dd), 0.85-0.99 (m), 0.78 (t).

10 **Preparación de 1,2-dimetil-D-prolil-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2S)-3-(4-aminofenil)-1-metoxi-1-oxopropan-2-il]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida, sal de formato (#200) y 1,2-dimetil-D-prolil-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2S)-3-(4-aminofenil)-1-metoxi-1-oxopropan-2-il]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida, sal de formato (#201).**





Etapas 1. Síntesis de 1,2-dimetil-D-prolil-N-[(3R,4S,5S)-1-ter-butoxi-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida (#195). De acuerdo con el procedimiento general D, a partir de #6 (7.75 g, 21.6 mmol, 1 eq.), #152 (3.88 g, 21.6 mmol, 1 eq.), diclorometano (100 mL), HATU (9.8 g, 25.9 mmol, 1.2 eq.), y diisopropiletilamina (11.1 g, 86.4 mmol, 4 eq.) se sintetizó el material crudo deseado, el cual fue purificado por medio de cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 20 hasta 55% acetato de etilo en éter de petróleo) a fin de producir #195 (11.1 g, rendimiento cuantitativo) como un aceite de color amarillo.

Etapas 2. Síntesis de 1,2-dimetil-D-prolil-N-[(2R,3S,4S)-1-carboxi-2-metoxi-4-metilhexan-3-il]-N-metil-L-valinamida (#196). De acuerdo con el procedimiento general B, a partir de #195 (11.1 g, 21.6 mmol, 1 eq.), diclorometano (100 mL) y ácido trifluoroacético (40 mL) se sintetizó el material crudo deseado, para obtener #196 (10.1 g, rendimiento cuantitativo) que fue utilizado en la siguiente etapa sin purificación adicional. LC-MS (Protocolo Z): m/z 428.5 $[M+H^+]$, tiempo de retención = 0.9 minutos.

Etapas 3. Síntesis de 1,2-dimetil-D-prolil-N-[(3R,4S,5S)-3-

metoxi-5-metil-1-oxo-1-(pentafluorofenoxi)heptan-4-il]-N-metil-L-valinamida (**#197**). A una solución enfriada (0°C) de **#196** (4.0 g, 9.4 mmol, 1 eq.) en diclorometano (40 mL) se agregó mediante goteo piridina (2.95 g, 37.6 mmol, 4eq.) seguida por una solución de
 5 pentafluorofenil trifluoroacetato (3.9 g, 13.6 mmol, 1.4 eq.) en diclorometano (5 mL). La mezcla fue sometida a agitación a temperatura ambiente durante una hora, y el solvente fue concentrado *in vacuo*. La reacción fue purificada mediante cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 1 hasta 10% metanol en
 10 diclorometano) a fin de producir el compuesto **#197** (4.5 g, 81.2% (durante tres etapas) como un sólido de color blanco.

Etapas 4. Síntesis de 1,2-dimetil-D-prolil-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-2-carboxi-1-metoxipropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida, sal de ácido trifluoroacético
 15 (**#198**). A una solución enfriada (0°C) de **#197** (4.0 g, 7.4 mmol, 1 eq.) en diclorometano (25 mL) se agregó mediante goteo diisopropiletilamina (3.4 g, 26.3 mmol, 3.5 eq.) seguida por una solución **#103** (2.3 g, 7.6 mmol, 1.02 eq.) en diclorometano (15 mL). Después de la adición, la mezcla fue sometida a agitación a
 20 temperatura ambiente durante 16 horas y se removi6 el solvente *in vacuo*. La reacción fue purificada mediante cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 1 hasta 10% metanol en diclorometano) seguida por una segunda purificación por medio de cromatografía de fase inversa (*Método Q*) para dar **#198** (1.57 g, 57.5%) como un sólido de
 25 color blanco HPLC (Protocolo X): *m/z* 597.49 [M+H⁺] tiempo de

retención = 8.879 minutos (pureza = 98%). HPLC Quiral, tiempo de retención: 3.328 min (pureza = 98%) Columna: Columna: Chiralcel OJ-H, 250 x 4.6 mm, 5 μ m; Fase móvil: metanol (0.05% dietilamina) en CO₂ a partir de 5% hasta 40% durante 5 15 minutos; Velocidad de flujo: 2.35 mL/minuto.

Etapa 5. Síntesis de 1,2-dimetil-D-prolil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-(pentafluorofenoxi)propil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida (**#199**). A una solución de **#198** (280 10 mg, 0.394 mmol, 1 eq.) en diclorometano (2 mL) se agregó piridina (75 mg, 0.94 mmol, 2.4 eq.) seguida por una solución de pentafluorofenil trifluoroacetato (268 mg, 0.94 mmol, 2.4 eq.) en diclorometano (1.5 mL). La mezcla fue sometida a 15 agitación a temperatura ambiente durante 2.5 horas, y el solvente fue concentrado *in vacuo*. La reacción fue purificada mediante cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 1 hasta 10% metanol en diclorometano) a fin de producir el compuesto **#199** (279 mg, 39%) como un sólido de color blanco. LC-MS (Protocolo Q1): *m/z* 763.5 [M+H⁺], tiempo de retención = 0.93 20 minutos.

Etapa 6A. Síntesis de 1,2-dimetil-D-prolil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-3-{(2S)-1-metoxi-1-oxo-3-(1,2,3,4-tetrahydroquinolin-6-il)propan-2-il]amino}-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L- 25 valinamida, sal de ácido trifluoroacético (**#200**). A una mezcla

de **#199** (25 mg, 0.033 mmol, 1 eq) y **#215** ((7.7 mg, 0.033 mmol, 1 eq.) en diclorometano (1.5 mL), se agregó *N,N*-diisopropiletilamina (30.2 mg, 2.31 mmol, 7 eq.). La reacción fue sometida a agitación durante 5 minutos y se agregó *N,N*-dimetilformamida (0.5 mL).

5 Después de someter a agitación durante 2 ½ horas, se agregó *N,N*-diisopropiletilamina (30.2 mg, 2.31 mmol, 7 eq.) adicional. Después de 3 ½ horas, se agregó más *N,N*-dimetilformamida (0.75 mL) y la mezcla fue sometida a agitación durante 18 horas. Se agregaron *N,N*-diisopropiletilamina (15.1 mg, 1.15 mmol, 3.6 eq.) y *N,N*-

10 dimetilformamida (0.25 mL) adicionales y la reacción fue sometida a agitación a temperatura ambiente durante 48 horas. La mezcla de reacción fue concentrada *in vacuo* y el producto crudo fue purificado por medio de cromatografía de fase inversa (Método M*) para dar **#200** (12.9 mg, 48 %). HPLC (Protocolo T): *m/z* HPLC (*Protocolo T*):

15 *m/z* 407.7, cambio doble [2+], tiempo de retención = 1.69 minutos (pureza = 100 %). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) 9.72-9.82 (m), 8.61-8.67 (m), 8.42-8.48 (m), 8.19-8.24 (m), 7.25-7.27 (m), 7.12-7.14 (m), 6.94-7.01 (m), 6.88- 6.94 (m), 6.78- 6.84 (m), 6.67- 6.74 (m), 6.57-6.64 (m), 4.69-4.77 (m), 4.60-4.68 (m), 4.53-4.60 (m), 4.46-4.53 (m),

20 4.37-4.45 (m), 3.97-4.05 (m), 3.76-3.81 (m), 3.62-3.67 (m), 3.53-3.62 (m), 3.44-3.52 (m), 3.32-3.38 (m), 3.27-3.32 (m), 3.22-3.27 (m), 3.15-3.22 (m), 3.06-3.14 (m), 2.97-3.01 (m), 2.92-2.96 (m), 2.74-2.83 (m), 2.61-2.74 (m), 2.57-2.61 (m), 2.48-2.56 (m), 2.37-2.46 (m), 2.25-2.36 (m), 2.00-2.20 (m), 1.67-1.91 (m), 1.47-1.60 (m), 1.37-1.47 (m),

25 1.24-1.35 (m), 1.03-1.10 (m), 0.95-1.00 (m), 0.88-0.94 (m), 0.76-0.83

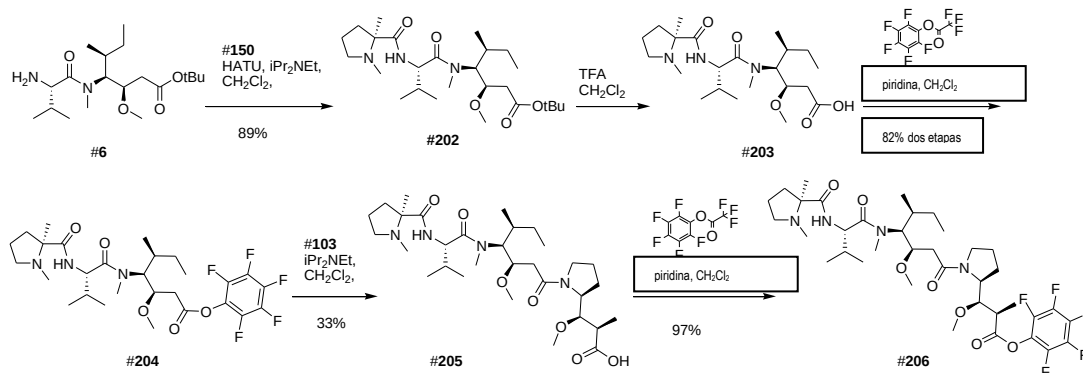
(m).

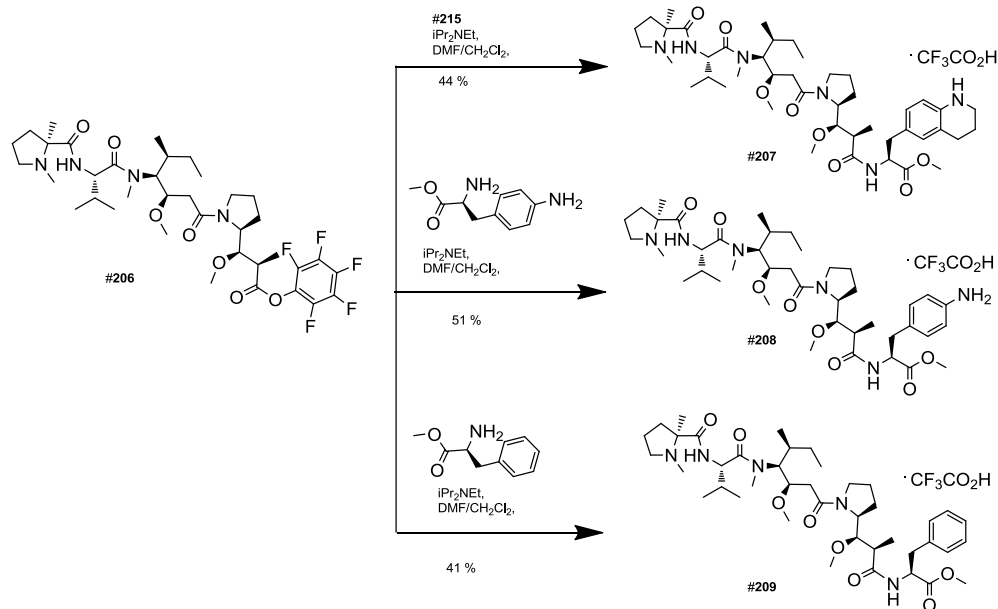
Etapla 6B. Síntesis de 1,2-dimetil-D-prolil-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(2S)-3-(4-aminofenil)-1-metoxi-1-oxopropan-2-il]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida, sal de ácido trifluoroacético (**#201**). A una mezcla de **#199** (25 mg, 0.033 mmol, 1eq) y el metil 4-amino-L-fenilalaninato comercialmente disponible (8.8 mg, 0.033 mmol, 1 eq.) en diclorometano (1.5 mL), se agregó *N,N*-diisopropiletilamina (30.2 mg, 2.31 mmol, 7 eq.). La reacción fue sometida a agitación durante 5 minutos y se agregó *N,N*-dimetilformamida (0.5 mL). Después de 4 horas, se agregó *N,N*-diisopropiletilamina adicional (37.75 mg, 2.88 mmol, 8.25 eq.) y la mezcla fue sometida a agitación durante 50 minutos. Se agregó *N,N*-dimetilformamida (0.75 mL) adicional y la reacción fue sometida a agitación durante 66 horas, concentrada *in vacuo* y el producto crudo fue purificado por medio de cromatografía de fase inversa (Método M*) para dar **#201** (14.3 mg, 56 %); HPLC (Protocolo T): *m/z* 387.2, carga doble [2+], tiempo de retención = 1.50 minutos (pureza= 100%).; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) 9.68-9.84 (m), 8.57-8.66 (m), 8.46-8.51 (m), 8.23-8.29 (m), 7.18-7.28 (m), 7.11-7.16 (m), 7.03-7.08 (m), 6.97-7.02 (m), 4.67-4.75 (m), 4.58-4.66 (m), 4.34-4.57 (m), 3.95-4.03 (m), 3.85-3.90 (m), 3.73-3.81 (m), 3.66-3.72 (m), 3.57-3.66 (m), 3.50-3.57 (m), 3.42-3.49 (m), 3.32-3.38 (m),

3.14-3.30 (m), 2.95-3.11 (m), 2.84-2.94 (m), 2.78-2.81 (m), 2.63-2.74 (m), 2.46-2.57 (m), 2.34-2.45 (m), 2.19-2.34 (m), 1.97-2.19 (m), 1.67-1.90 (m), 1.45-1.62 (m), 1.34-1.41 (m), 1.21-1.34 (m), 1.01-1.10 (m), 0.82-0.99 (m), 0.72-0.81 (m).

5

**Preparación de 1,2-dimetil-L-prolil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-
{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-3-[(2S)-1-metoxi-1-oxo-3-(1,2,3,4-
tetrahydroquinolin-6-il)propan-2-il]amino}-2-metil-3-
oxopropil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-
valinamida, sal de formato. (#207) y 1,2-dimetil-L-prolil-N-
[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(2S)-3-(4-aminofenil)-1-metoxi-
1-oxopropan-2-il]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-
il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida sal de
formato (#208) y 1,2-dimetil-L-prolil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-
{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-3-[(2S)-1-metoxi-1-oxo-3-fenilpropan-2-
il]amino}-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-
4-il]-N-metil-L-valinamida, sal de ácido trifluoroacético (#209)**





Etapa 1. Síntesis de 1,2-dimetil-L-prolil-N-[(3R,4S,5S)-1-ter-butoxi-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida (**#202**). De acuerdo con el procedimiento general D, a partir de **#6** (4.3 g, 12 mmol, 1 eq.), **#150** (2.15 g, 12 mmol, 1 eq.), diclorometano (50 mL), HATU (5.46 g, 14 mmol, 1.2 eq.), y diisopropiletilamina (8.17 mL) se sintetizó el material crudo deseado, el cual fue purificado por medio de cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 20 hasta 55% acetato de etilo en éter de petróleo) a fin de producir **#202** (5.2 g, 89 %) como un aceite de color amarillo.

Etapa 2. Síntesis de 1,2-dimetil-L-prolil-N-[(2R,3S,4S)-1-carboxi-2-metoxi-4-metilhexan-3-il]-N-metil-L-valinamida (**#203**). De acuerdo con el procedimiento general B, a partir de **#202** (5.2 g, 10.77 mmol, 1 eq.), diclorometano (45 mL), y ácido trifluoroacético (20 mL) se sintetizó el material crudo deseado, para obtener **#203** (7 g, rendimiento cuantitativo) el cual fue

utilizado en la siguiente etapa sin purificación adicional.

Etapa 3. Síntesis de 1,2-dimetil-L-prolil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-5-metil-1-oxo-1-(pentafluorofenoxi)heptan-4-il]-N-metil-L-valinamida (**#204**). A una solución enfriada (0°C) de **#203** (7.0 g, 10.77 mmol, 1 eq.) en diclorometano (15 mL) se agregó mediante goteo piridina (3.41 g 43.08 mmol, 4eq.) seguida por una solución de pentafluorofenil trifluoroacetato (6.03 g, 21.54 mmol, 2 eq.) en diclorometano (7 mL). La mezcla fue sometida a agitación a temperatura ambiente durante una hora, y el solvente fue concentrado *in vacuo*. La reacción fue purificada mediante cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 1 hasta 10% metanol en diclorometano) a fin de producir el compuesto **#204** (8 g, 82% durante dos etapas) como un sólido de color amarillo.

Etapa 4. Síntesis de 1,2-dimetil-L-prolil-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-2-carboxi-1-metoxipropil]pirrolidin-1-il]-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida (**#205**). A una solución enfriada (0°C) de **#204** (8.0 g, 10.77 mmol, 1 eq.) en diclorometano (25 mL) se agregó mediante goteo diisopropiletilamina (5.6 g, 43.08 mmol, 4 eq.) seguida por una solución de **#103** (3.22 g, 10.77 mmol, 1 eq.) en diclorometano (15 mL). Después de la adición, la mezcla fue sometida a agitación a temperatura ambiente durante 16 horas y se removió el solvente *in vacuo*. La reacción fue purificada mediante cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 1 hasta 10% metanol en diclorometano) para dar **#205** (2.2 g, 33 %) como un sólido de color amarillo HPLC (Protocolo X): *m/z* 597.42 [M+H⁺], tiempo de

retención = 8.729 minutos (pureza > 97%), HPLC Quiral, tiempo de retención: 2.87 min (pureza = 89%) Columna: Chiralcel OD-3, 150 x 4.6 mm, 3 μ m; Fase móvil: etanol (0.05% dietilamina) en CO₂ desde 5% hasta 40% durante 12 minutos; Velocidad de flujo: 2.5 mL/minuto.

Etapa 5. Síntesis de 1,2-dimetil-L-prolil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-(pentafluorofenoxi)propil]pirrolidin-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida (**#206**). A una solución de **#198** (0.28 g, 0.47 mmol, 1 eq.) en diclorometano (2 mL) se agregó piridina (75 mg, 0.94 mmol, 2 eq.) seguida por una solución de pentafluorofenil trifluoroacetato (268 mg, 0.94 mmol, 2 eq.) en diclorometano (1.5 mL). La mezcla fue sometida a agitación a temperatura ambiente durante 2.5 horas, y el solvente fue concentrado *in vacuo*. La reacción fue purificada mediante cromatografía en gel de sílice (Gradiente: 1 hasta 10% metanol en diclorometano) a fin de producir el compuesto **#206** (348 mg, 97%) como un sólido de color blanco. LC-MS (protocolo Q1): *m/z* 763.5 [M+H⁺], tiempo de retención = 0.9 minutos.

Etapa 6A. Síntesis de 1,2-dimetil-L-prolil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-3-[(2S)-1-metoxi-1-oxo-3-(1,2,3,4-tetrahydroquinolin-6-il)propan-2-il]amino}-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida, sal de ácido trifluoroacético. (**#207**). Se preparó el compuesto de título a partir de **#206** (25 mg, 0.033 mmol, 1eq.)

y **#215** (7.7 mg, 0.033 mmol, 1 eq) utilizando el método descrito con anterioridad para Preparación de **#200**. El producto crudo fue purificado por medio de cromatografía de fase inversa (Método M*) para dar **#207** (11.7 mg, 44%). HPLC (Protocolo T): m/z 407.6, carga
 5 doble [2+], tiempo de retención = 1.59 minutos (pureza = 100%). ^1H NMR (DMSO- d_6) 9.57-9.69 (m), 8.68-8.76 (m), 8.42-8.47 (m), 8.23-8.29 (m), 8.18-8.23 (m), 7.24-7.27 (m), 6.95-7.01 (m), 6.89-6.94 (m), 6.80-6.86 (m), 6.70-6.78 (m), 6.60-6.67 (m), 4.69-4.77 (m), 4.60-4.68 (m), 4.46-4.60 (m), 4.34-4.46 (m), 3.95-4.03 (m), 3.87-3.91 (m), 3.79-
 10 3.85 (m), 3.74-3.79 (m), 3.60-3.66 (m), 3.49-3.60 (m), 3.41-3.49 (m), 3.12-3.35 (m), 3.04-3.12 (m), 2.89-3.04 (m), 2.68-2.83 (m), 2.61-2.67 (m), 2.45-2.55 (m), 2.34-2.44 (m), 2.08-2.33 (m), 2.05-2.08 (m), 1.92-2.05 (m), 1.75-1.91 (m), 1.65-1.75 (m), 1.59-1.64 (m), 1.34-1.58 (m), 1.20-1.31 (m), 1.01-1.09 (m), 0.94-0.99 (m), 0.84-0.93 (m), 0.80-0.83
 15 (m), 0.72-0.80 (m).

Etapas 6B. Síntesis de 1,2-dimetil-L-prolil-N-[(3R,4S,5S)-1-
 {(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(2S)-3-(4-aminofenil)-1-metoxi-1-oxopropan-2-
 il]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-
 metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida sal de ácido
 20 trifluoroacético (**#208**). A una mezcla de **#206** (25.0 mg, 0.033 mmol, 1 eq.), y el metil 4-amino-L-fenilalaninato comercialmente disponible (8.8 mg, 0.033 mmol, 1 eq.) en diclorometano (1.5 mL), se agregó *N,N*-diisopropiletilamina (30.2 mg, 2.31 mmol, 7 eq.). La reacción fue sometida a agitación durante 5 minutos y se agregó *N,N*-
 25 dimetilformamida (0.5 mL). Después de 2 ½ horas, se agregó *N,N*-

diisopropiletilamina (30.2 mg, 2.31 mmol, 7 eq.) adicional. Después de someter a agitación durante 3 1/2 horas, se agregó *N,N*-dimetilformamida (0.75 mL) adicional y la reacción fue sometida a agitación durante 66 horas, concentrada *in vacuo* y el producto crudo fue purificado por medio de cromatografía de fase inversa (Método M*) para dar **#208** (13 mg, 51 %); HPLC (Protocolo T): *m/z* 387.2, carga doble [2+], tiempo de retención = 1.58 minutos (pureza= 100%).; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) 9.54-9.69 (m), 8.68-8.75 (m), 8.46-8.50 (m), 8.33-8.37 (m), 8.22-8.31 (m), 8.09-8.14 (m), 7.17-7.27 (m), 7.07-7.16 (m), 6.99-7.05 (m), 6.92-6.99 (m), 4.69-4.75 (m), 4.60-4.68 (m), 4.42-4.59 (m), 4.34-4.42 (m), 3.95-4.03 (m), 3.85-3.90 (m), 3.74-3.80 (m), 3.65-3.72 (m), 3.62-3.65 (m), 3.42-3.62 (m), 3.31-3.36 (m), 3.24-3.30 (m), 3.11-3.24 (m), 3.03-3.11 (m), 2.96-3.03 (m), 2.81-2.92 (m), 2.65-2.76 (m), 2.43-2.55 (m), 2.34-2.43 (m), 2.06-2.33 (m), 1.93-2.05 (m), 1.75-1.89 (m), 1.66-1.74 (m), 1.58-1.65 (m), 1.47-1.57 (m), 1.34-1.43 (m), 1.20-1.32 (m), 1.10-1.14 (m), 1.00-1.09 (m), 0.83-0.99 (m), 0.72-0.81 (m).

Etapa 6C. Síntesis de 1,2-dimetil-L-prolil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-3-[(2S)-1-metoxi-1-oxo-3-fenilpropan-2-il]amino}-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida, sal de ácido trifluoroacético (#209). Se preparó el compuesto de título a partir de **#206** (25.0 mg, 0.033 mmol, 1 eq.) y clorhidrato de

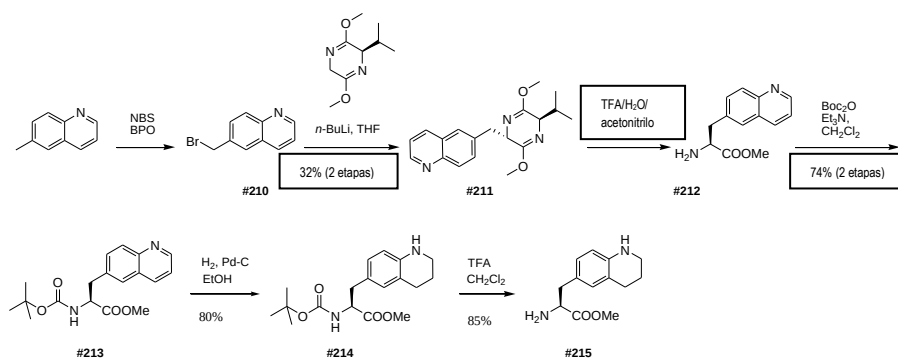
metil-L-fenilalaninato (7.1 mg, 0.033 mmol, 1 eq.) utilizando el método descrito con anterioridad para Preparación de #200. El producto crudo fue purificado por medio de cromatografía de fase inversa (Método M*) para dar #209 (10.3 mg, 41%). HPLC (Protocolo

5 T): m/z 758.7 $[M+H^+]$, tiempo de retención = 1.787 minutos (pureza= 100%). ^1H NMR (DMSO- d_6) 9.57-9.70 (m), 8.70-8.75 (m), 8.50-8.56 (m), 8.32-8.42 (m), 8.24-8.26 (m), 8.10-8.15 (m), 7.14-7.27 (m), 7.12-7.13 (m), 6.98-7.00 (m), 4.69-4.77 (m), 4.55-4.67 (m), 4.43-4.53 (m), 3.94-4.02 (m), 3.73-3.78 (m), 3.62-3.68 (m), 3.48-3.60 (m), 3.39-3.48

10 (m), 3.23-3.33 (m), 3.13-3.22 (m), 3.08-3.13 (m), 3.02-3.08 (m), 2.96-3.01 (m), 2.81-2.94 (m), 2.76-2.80 (m), 2.66-2.75 (m), 2.62-2.66 (m), 2.46-2.55 (m), 2.31-2.45 (m), 2.09-2.29 (m), 2.05-2.09 (m), 1.93-2.04 (m), 1.74-1.88 (m), 1.65-1.74 (m), 1.59-1.65 (m), 1.36-1.52 (m), 1.21-1.35 (m), 1.01-1.08 (m), 0.94-1.00 (m), 0.83-0.94 (m), 0.73-0.81 (m).

15

Preparación de metil (2S)-2-amino-3-(1,2,3,4-tetrahidroquinolin-6-il)propanoato



Etapas 1. Síntesis de 6-(bromometil)quinolina (#210). Una

20 solución de 6-metilquinolina (5 g, 35 mmol, 1 eq.), N-Bromosuccinimida (8.1 g, 45.5 mmol, 1.3 eq.) y peróxido de benzoilo

(840 mg, 3.5mmol, 0.1 eq.) en tetracloruro de carbono (100 mL) fue sometida a agitación a reflujo durante 3 horas y después enfriada hasta temperatura ambiente. La mezcla de reacción fue filtrada y el filtrado fue concentrado *in vacuo*. El residuo
5 fue disuelto en tetrahidrofurano (100 mL) y filtrado. El filtrado fue utilizado de manera directa en la siguiente etapa sin purificación adicional

Etapas 2. Síntesis de 6-[[[(2S,5R)-3,6-dimetoxi-5-(propan-2-il)-2,5-dihidropirazin-2-il]metil]quinolina (#211). A una
10 solución enfriada (-70°C) de (2R)-3,6-dimetoxi-2-(propan-2-il)-2,5-dihidropirazina (25.8 g, 140 mmol, 2 eq.) en tetrahidrofurano (200 mL) se agregó mediante goteo *n*-butillitio (2.5 M, 64.4 mL, 161 mmol, 2.3eq.) y después fue sometida a agitación durante 30 minutos. Una solución de #210 (15.4 g, 70
15 mmol, 1 eq.) en tetrahidrofurano (150 mL) se agregó mediante goteo a -65°C y después la solución fue sometida a agitación durante 2 horas a esta temperatura. La reacción fue apagada por medio de cloruro de amonio acuoso saturado (100 mL) y extraída con acetato de etilo (100 mL). La fase orgánica fue
20 secada sobre sulfato de sodio y concentrada *in vacuo*. La reacción fue purificada mediante cromatografía de columna en gel de sílice (Gradiente: 10 hasta 16% acetato de etilo en éter de petróleo) a fin de producir #211 (7.3g, 32%, durante dos etapas) como un sólido de color amarillo. LC-MS (Protocolo Z):
25 *m/z* 326.2[M+H⁺], tiempo de retención = 0.88 minutos.

Etapas 3. Síntesis de metil (2S)-2-amino-3-(quinolin-6-il)propanoato (**#212**). A una solución de **#211** (7.3 g, 22.5 mmol, 1 eq.) en agua (25 mL) y acetonitrilo (80 mL) se agregó ácido trifluoroacético (9 mL) a 0°C y la solución fue sometida a agitación a 10°C durante la noche. La capa orgánica fue removida *in vacuo* y la capa acuosa remanente fue basificada hasta pH 9 con carbonato de sodio, que fue utilizado de manera directa en la siguiente etapa.

Etapas 4. Síntesis de metil (2S)-2-[(ter-butoxicarbonil)amino]-3-(quinolin-6-il)propanoato (**#213**). A una solución de **#212** (5.2 g, 22.5 mmol, 1 eq.) y trietilamina (9.1 g, 90 mmol, 4eq.) en solvente mezclado de metanol (30 mL) y agua (50 mL) se agregó di-ter-butil dicarbonato (17.5 g, 78.75 mmol, 3.5 eq.) a 0°C y después la solución fue sometida a agitación a 10°C durante la noche. La mezcla de reacción fue filtrada y la torta de filtro fue lavada con metanol (20 mL X 2). El filtrado fue extraído con acetato de etilo (50 mL X 2) y la fase orgánica fue concentrada *in vacuo*. La reacción fue purificada mediante cromatografía de columna en gel de sílice (Gradiente: 25 hasta 50% acetato de etilo en éter de petróleo) a fin de producir **#213** (5.5 g, 74% durante dos etapas) como un aceite de color amarillo. LC-MS (Protocolo Z): m/z 331.2[M+H⁺], tiempo de retención = 0.76 minutos.

Etapas 5. Síntesis de metil (2S)-2-[(ter-butoxicarbonil)amino]-3-(1,2,3,4-tetrahydroquinolin-6-il)propanoato (**#214**). Una suspensión de **#213** (1.5 g, 4.55 mmol, 1 eq.) y paladio en carbono (150 mg) en etanol (20 mL) fue sometida a agitación a 50°C bajo 30 psi de

hidrógeno durante la noche. La mezcla de reacción fue filtrada a través de una almohadilla de celita y el filtrado fue concentrado *in vacuo*. La reacción fue purificada mediante cromatografía de columna en gel de sílice (Gradiente: 40% acetato de etilo en éter de petróleo) a fin de producir **#214** (1.2 g, 80%) como un aceite. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 6.70 (d, 2H), 6.40 (m, 1H), 4.95 (m, 1H), 4.49 (m, 1H), 3.77 (s, 3H), 3.28 (m, 2H), 2.97 (m, 2H), 2.71 (m, 2H), 1.95 (m, 2H), 1.26 (s, 9H), HPLC (Protocolo Y): m/z 357.0 $[\text{M}+\text{Na}^+]$ tiempo de retención = 5.304 minutos (pureza >98%). HPLC Quiral, tiempo de retención: 4.64 min (pureza = 98%) (Columna: Chiralcel OJ-H, 150 x 4.6 mm, 5 μm ; Fase móvil: etanol (0.05% dietilamina) en CO_2 desde 5% hasta 40% durante 15 minutos; Velocidad de flujo: 2.5 mL/minuto.

Etapa 6. Síntesis de metil (2S)-2-amino-3-(1,2,3,4-tetrahydroquinolin-6-il)propanoato (**#215**). A una solución de **#214** (750 mg, 2.25 mmol, 1 eq.) en diclorometano (20 mL) se agregó mediante goteo ácido trifluoracético (2 mL) a 0°C y después la solución fue sometida a agitación a 20°C durante la noche. La mezcla de reacción fue concentrada *in vacuo* y el residuo fue disuelto en agua (20 mL). La solución fue basificada con carbonato de sodio y extraída con acetato de etilo/tetrahidrofurano (30 mL X 3). La fase orgánica fue secada sobre sulfato de sodio y concentrada *in vacuo* a fin de producir **#215** (450 mg, 85%) como un aceite de color amarillo. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 6.70 (d, 2H), 6.40 (m, 1H),

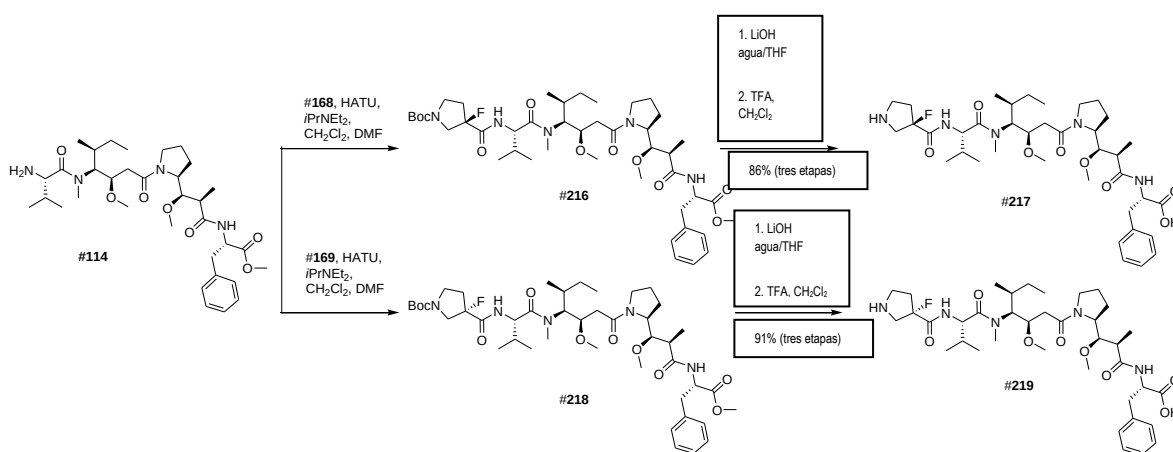
3.73 (s, 3H), 3.67 (m, 1H), 3.30 (m, 2H), 2.96 (m, 1H), 2.75 (m, 3H), 1.96 (m, 2H), 1.50 (br, 2H), 1.26 (br, 1H)., HPLC (Protocolo Y): m/z 235.14 [M+H⁺] tiempo de retención = 4.35 minutos (pureza > 96%). HPLC Quiral, tiempo de retención: 5.71 min (pureza = 98%).

5 (Columna: Chiralcel OJ-H, 150 x 4.6 mm, 5 µm; Fase móvil: etanol (0.05% dietilamina) en CO₂ desde 5% hasta 40% durante 15 minutos; Velocidad de flujo: 2.5 mL/minuto.

Preparación de N-{(2R,3R)-3-[(2S)-1-{(3R,4S,5S)-4-[(N-{(3R)-3-fluoropirrolidin-3-il]carbonil}-L-valil)(metil)amino]-3-metoxi-5-metilheptanoil}pirrolidin-2-il]-3-metoxi-2-metilpropanoil}-L-fenilalanina, sal de ácido trifluoroacético (#217) y N-{(2R,3R)-3-[(2S)-1-{(3R,4S,5S)-4-[(N-{(3S)-3-fluoropirrolidin-3-il]carbonil}-L-valil)(metil)amino]-3-metoxi-5-metilheptanoil}pirrolidin-2-il]-3-metoxi-2-metilpropanoil}-L-fenilalanina, sal de ácido trifluoroacético (#219).

10

15



Etapa 1A. Síntesis de metil N-{(2R,3R)-3-[(2S)-1-{(3R,4S,5S)-4-[(N-{(3R)-1-(ter-butoxicarbonil)-3-fluoropirrolidin-3-il]carbonil}-L-

20

valil)(metil)amino]-3-metoxi-5-metilheptanoil}pirrolidin-2-il]-3-metoxi-2-metilpropanoil}-L-fenilalaninato (**#216**). A una solución de **#168** (36.9 mg, 0.158 mmol, 1 eq.) y **#114** (100 mg, 0.158 mmol, 1 eq.) en diclorometano (3.6 mL) y *N,N*-dimetilformamida (0.8 mL), se agregó diisopropiletilamina (0.083 mL, 0.474 mmol, 3 eq.) seguida por HATU (60.7 mg, 0.158 mmol, 1eq.). Se permitió la agitación de la reacción a temperatura ambiente durante 18 horas, diluida con acetato de etilo (25 mL), lavada con agua (1X), ácido cítrico al 10% (1X) y salmuera (1X). La capa orgánica fue secada sobre sulfato de sodio, filtrada, y el filtrado concentrado *in vacuo* para dar el producto crudo **#216** (220 mg, 164% de nivel teórico) que fue usado en la siguiente etapa sin purificación adicional. HPLC (protocolo Q): *m/z* 848.6 [M+H⁺], tiempo de retención = 2.10 minutos.

Etapa 1B. Síntesis de metil N-{(2R,3R)-3-[(2S)-1-[(3R,4S,5S)-4-[(N-[(3S)-1-(ter-butoxicarbonil)-3-fluoropirrolidin-3-il]carbonil}-L-valil)(metil)amino]-3-metoxi-5-metilheptanoil}pirrolidin-2-il]-3-metoxi-2-metilpropanoil}-L-fenilalaninato (**#218**). A una solución de **#169** (36.9 mg, 0.158 mmol, 1 eq.) y **#114** (100 mg, 0.158 mmol, 1 eq.) en diclorometano (3.6 mL) y *N,N*-dimetilformamida (0.8 mL), se agregó diisopropiletilamina (0.083 mL, 0.474 mmol, 3 eq.) seguida por HATU (60.7 mg, 0.158 mmol, 1eq.). Se permitió la agitación de la reacción a temperatura ambiente durante 18 horas, diluida con acetato de etilo (25 mL), lavada con agua (1

X), ácido cítrico al 10% (1X) y salmuera (1X). La capa orgánica fue secada sobre sulfato de sodio, filtrada, y el filtrado concentrado *in vacuo* a fin de proporcionar el producto crudo **#218** (180 mg, 134% de nivel teórico) el cual fue usado en la siguiente etapa sin
 5 purificación adicional. HPLC (protocolo Q): m/z 848.6 [M+H⁺], tiempo de retención = 2.10 minutos.

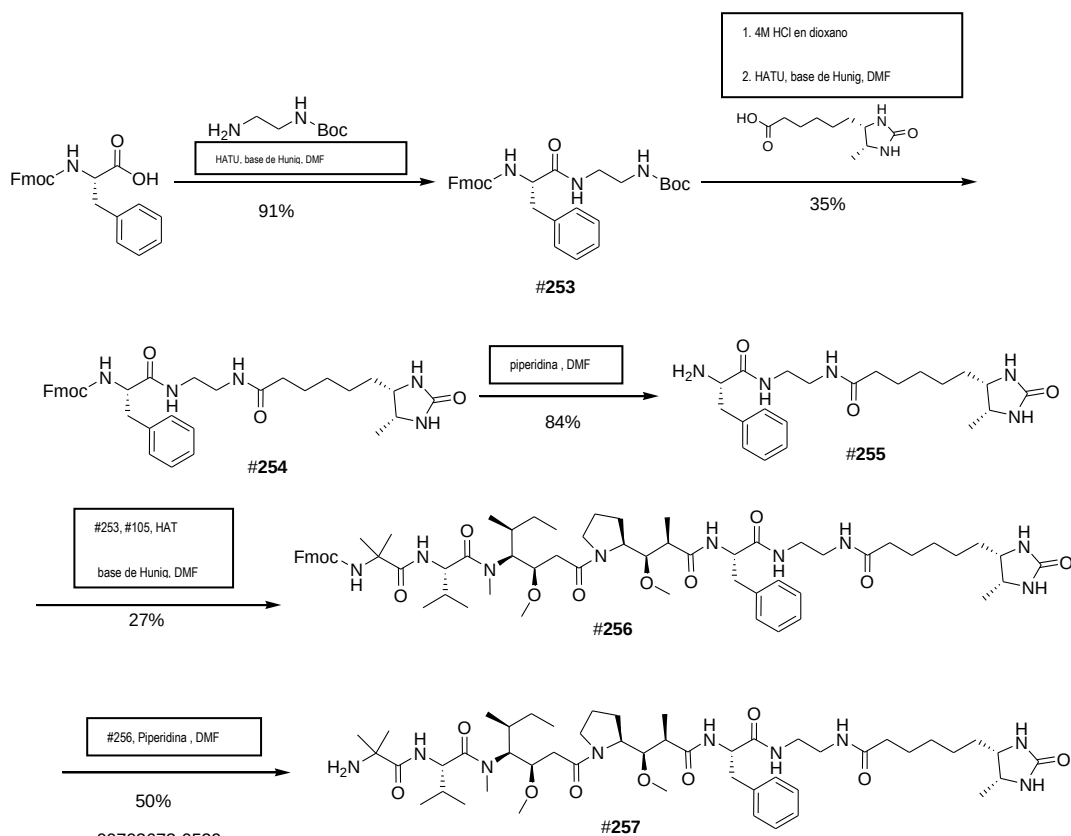
Etapas 2A. Síntesis de N-{(2R,3R)-3-[(2S)-1-[(3R,4S,5S)-4-[(N-
 {[(3R)-3-fluoropirrolidin-3-il]carbonil}-L-valil)(metil)amino]-3-metoxi-
 5-metilheptanoil}pirrolidin-2-il]-3-metoxi-2-metilpropanoil}-L-
 10 fenilalanina, sal de ácido trifluoroacético (**#217**). A una solución de
 crudo **#216** (134 mg) en tetrahidrofurano (4 mL) se agregó hidróxido
 de litio (1M, 0.5 mL). La reacción fue sometida a agitación a
 temperatura ambiente durante 18 horas y concentrada *in vacuo*. El
 residuo fue disuelto en diclorometano (2 mL) y se agregó ácido
 15 trifluoroacético (2 mL). La reacción fue sometida a agitación durante
 4 horas y concentrada *in vacuo*. El material crudo fue purificado por
 medio de cromatografía de fase inversa (Método M*) para obtener
#217 (60 mg, 86% durante dos etapas) como una goma. LC-MS
 (protocolo Q): m/z 734.93 [M+H⁺], tiempo de retención = 1.19
 20 minutos. ¹H NMR (DMSO-d₆) δ 12.62-12.83 (m), 9.30-9.43 (m), 9.17-
 9.28 (m), 8.34-8.41 (m), 8.22-8.31 (m), 8.08-8.15 (m), 7.87-7.93 (m),
 7.76-7.81 (m), 7.11-7.23 (m), 4.93-4.99 (m), 4.81-4.88 (m), 4.55-4.71
 (m), 4.48-4.54 (m), 4.37-4.45 (m), 3.92-3.99 (m), 3.69-3.75 (m), 3.31-
 3.65 (m), 3.25-3.30 (m), 3.20-3.24 (m), 3.12-3.19 (m), 3.08-3.10 (m),
 25 2.97-3.07 (m), 2.92-2.97 (m), 2.75-2.84 (m), 2.64-2.70 (m), 2.43-2.57

(m), 2.28-2.43 (m), 2.15-2.26 (m), 2.02-2.15 (m), 1.56-1.87 (m), 1.31-1.48 (m), 1.05-1.30 (m), 0.97-1.06 (m), 0.82-0.97 (m), 0.71-0.79 (m).

Etapas 2B. Síntesis de N-{(2R,3R)-3-[(2S)-1-[(3R,4S,5S)-4-[(N-[(3S)-3-fluoropirrolidin-3-il]carbonil]-L-valil)(metil)amino]-3-metoxi-5-metilheptanoil]pirrolidin-2-il]-3-metoxi-2-metilpropanoil}-L-fenilalanina, sal de ácido trifluoroacético (**#219**). A una solución de producto crudo **#218** (100 mg) en tetrahidrofurano (4 mL) se agregó 1.0 M hidróxido de litio en agua (0.5 mL). La reacción fue sometida a agitación a temperatura ambiente durante 18 horas y después fue concentrada *in vacuo*. El material crudo fue disuelto en diclorometano (2 mL) y se agregó ácido trifluoroacético (2 mL). La reacción fue sometida a agitación durante 4 horas y después concentrada *in vacuo*. El material crudo fue purificado por medio de cromatografía de fase inversa (Método M*) para obtener **#219** como una goma (60 mg, 91% durante dos etapas). LC-MS (protocolo Q): *m/z* 734.97 [M+H⁺], tiempo de retención = 1.14 minutos. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆), δ 12.62-12.85 (m), 9.32-9.43 (m), 9.13-9.26 (m), 8.39-8.46 (m), 8.30-8.39 (m), 8.25-8.29 (m), 8.08-8.13 (m), 7.79-7.85 (m), 7.67-7.72 (m), 7.10-7.23 (m), 4.94-5.01 (m), 4.83-4.89 (m), 4.64-4.73 (m), 4.56-4.63 (m), 4.44-4.50 (m), 4.37-4.44 (m), 3.92-3.99 (m), 3.60-3.74 (m), 3.24-3.55 (m), 3.11-3.24 (m), 3.07-3.10 (m), 3.02-3.06 (m), 2.98-3.02 (m), 2.93-2.97 (m), 2.75-2.85 (m),

2.68-2.69 (m), 2.63-2.67 (m), 2.45-2.55 (m), 2.26 -2.44 (m), 2.15-2.25 (m), 2.03-2.14 (m), 1.55-1.87 (m), 1.31-1.47 (m), 1.15-1.31 (m), 0.98-1.05 (m), 0.91-0.98 (m), 0.82-0.91 (m), 0.71-0.78 (m).

5 Preparación de 2-Metilalanil-N-{(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-{(3R,4R,7S)-7-bencil-4-metil-18-[(4S,5R)-5-metil-2-oxoimidazolidin-4-il]-5,8,13-trioxo-2-oxa-6,9,12-triazaoctadecan-3-il}pirrolidin-1-il]-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il}-N-metil-L-valinamida (#257).



10

00703673-0529

Etapa 1. Síntesis de 9H-fluoren-9-ilmetil[(2S)-1-({2-[(terbutoxicarbonil)amino]etil}amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il]carbamato (#253). Siguiendo el procedimiento general D usando N-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-L-fenilalanina (500 mg, 1.29 mmol, 1.0 eq), ter-

butil (2-aminoetil)carbamato (207 mg, 1.29 mmol, 1.0 eq.), HATU (620 mg, 1.55 mmol, 1.2 eq.) y base de Hunig (0.452 mL, 2.58 mmol, 2.0 eq) en 6 mL de DMF se produjo **#253** como un sólido de color blanco (620 mg, 91%) siguiendo con la
 5 concentración de solvente y la re-cristalización utilizando acetato de etilo. LC-MS (Protocolo Q1): m/z 552.3 $[M+Na^+]$, tiempo de retención = 1.01 minutos.

*Etap*a 2. Síntesis de N- α -[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-N-[2-({6-[(4S,5R)-5-metil-2-oxoimidazolidin-4-il]hexanoil}amino)etil]-L-fenilalaninamida (**#254**). Se eliminó la
 10 protección Boc usando el procedimiento general C usando **#251** (88 mg, 0.17 mmol, 1.0 eq.) and 4M HCl (2.0 mL, 8.0 mmol, 48 eq.) seguida por la concentración *in vacuo*. Se efectuó después la reacción de acoplamiento siguiendo el procedimiento general
 15 D utilizando el residuo crudo, ácido 6-[(4S,5R)-5-metil-2-oxoimidazolidin-4-il]hexanóico (35.6 mg, 0.166 mmol, 1.0 eq.), HATU (73.2 mg, 0.18 mmol, 1.1 eq.), y base de Hunig (0.087 mL, 0.50 mmol, 3.0 eq.) en 2 mL de DMF seguido por purificación (Método J) produciendo **#254** (35 mg, 34%) como
 20 un sólido de color blanco. LC-MS (Protocolo Q1): m/z 626.3 $[M+H^+]$, tiempo de retención = 0.86 minutos.

*Etap*a 3. Síntesis de N-[2-({6-[(4S,5R)-5-metil-2-oxoimidazolidin-4-il]hexanoil}amino)etil]-L-fenilalaninamida (**#255**). Siguiendo el procedimiento general A usando **#254** (35
 25 mg, 0.056 mmol, 1.0 eq.), piperidina (0.10 mL, 1.0 mmol, 20

eq.) en 0.5 mL de DMF seguido por purificación utilizando cromatografía en gel de sílice (0-30% metanol en diclorometano) produce **#253** (19 mg, 84%). LC-MS (Protocolo Q1): m/z 404.2 $[M+H^+]$, tiempo de retención = 0.48 minutos.

5 *Etapas 4.* Síntesis de N-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-2-Metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(3R,4R,7S)-7-bencil-4-metil-18-[(4S,5R)-5-metil-2-oxoimidazolidin-4-il]-5,8,13-trioxo-2-oxa-6,9,12-triazaoctadecan-3-il]pirrolidin-1-il]-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida (**#256**). Siguiendo el procedimiento general D
10 usando **#105** (36.6 mg, 0.047 mmol, 1.0 eq.), **#255** (19 mg, 0.047 mmol, 1.0 eq.), HATU (22.4 mg, 0.056 mmol, 1.2 eq.) y base de Hunig (0.025 mL, 0.141 mmol) en 1.5 mL de DMF seguido por purificación (Método J) produjo **#256** (15 mg, 27%) como un sólido de color blanco. LC-MS (Protocolo Q1): m/z 1164.8 $[M+H^+]$, tiempo de
15 retención = 0.99 minutos.

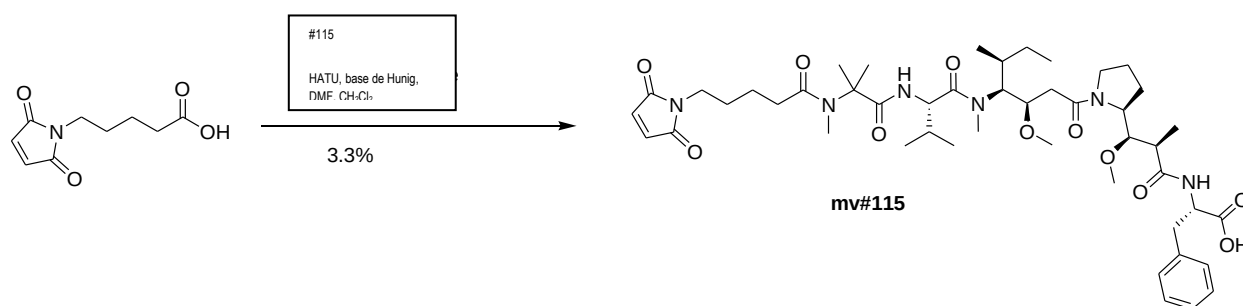
Etapas 5. Síntesis de 2-Metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(3R,4R,7S)-7-bencil-4-metil-18-[(4S,5R)-5-metil-2-oxoimidazolidin-4-il]-5,8,13-trioxo-2-oxa-6,9,12-triazaoctadecan-3-il]pirrolidin-1-il]-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida (**#257**).
20 Siguiendo el procedimiento general A utilizando **#256** (5mg, 0.004 mmol, 1.0 eq.) y piperidina (0.02 mL, 0.2 mmol, 50 eq.) en 0.7 mL de DMF seguido por purificación (Método J) produjo **#257** (2 mg, 50%) como un cristal incoloro. LC-MS (Protocolo Q1): m/z 1164.8 $[M+H^+]$, tiempo de retención = 0.99 minutos. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6), δ
25 8.44-8.52 (m), 8.06-8.20 (m), 7.96-8.01 (m), 7.69-7.83 (m), 7.20-7.28

(m), 7.11-7.19 (m), 3.38-3.83 (m), 3.19-3.26 (m), 3.03-3.12 (m), 2.98 (s), 2.91 (s), 2.75 (s), 2.65-2.70 (m), 2.01-2.36 (m), 1.65-1.87 (m), 1.39-1.57 (m), 1.13-1.37 (m), 1.04-1.08 (m), 0.74-1.01 (m).

5

Preparación de N-[5-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)pentanoyl]-N,2-Dimetilalanil-N-{(1S,2R)-4-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-[[[(1S)-1-carboxi-2-feniletil]amino]-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-2-metoxi-1-[(1S)-1-metilpropil]-4-oxobutil}-N-metil-L-valinamida (mv#115).

10

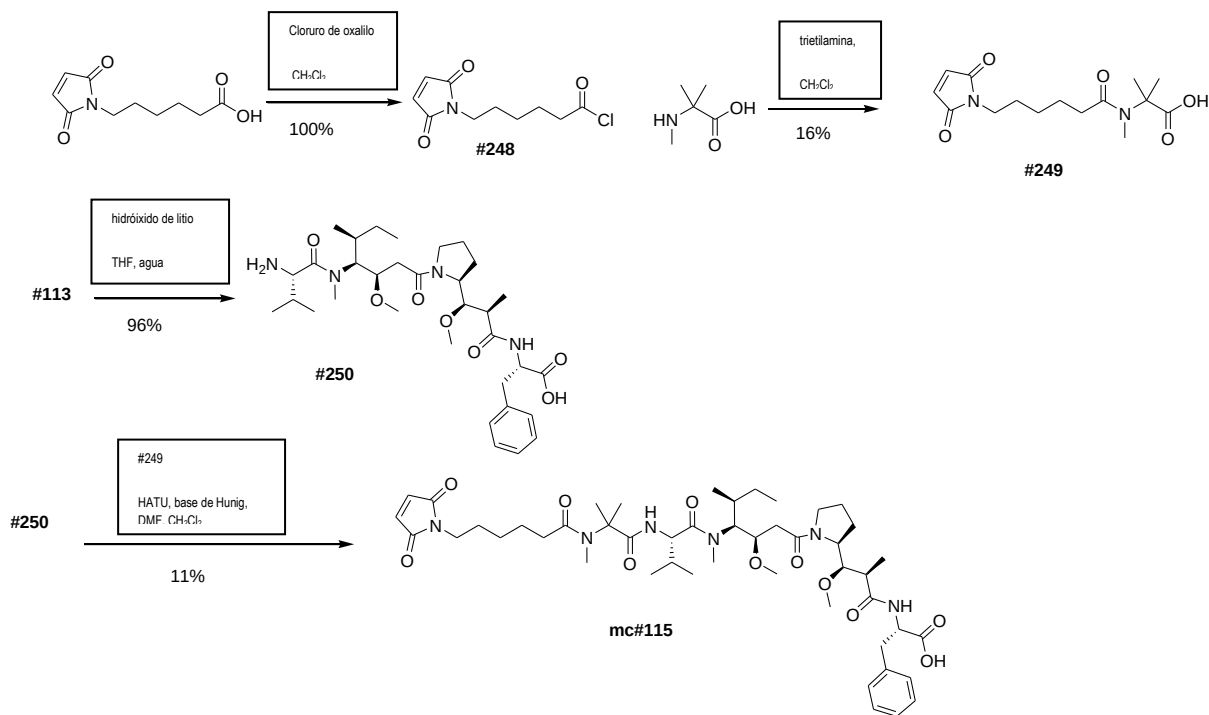


Etapas 1. Preparación de N-[5-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)pentanoyl]-N,2-Dimetilalanil-N-{(1S,2R)-4-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-[[[(1S)-1-carboxi-2-feniletil]amino]-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-2-metoxi-1-[(1S)-1-metilpropil]-4-oxobutil}-N-metil-L-valinamida (**mv#115**). A una solución sometida a agitación ácido 5-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)pentanóico (12 mg, 0.061 mM) in 0.4 mL de diclorometano, y 0.1 mL de DMF, se agregó HATU (23.2 mg, 0.061 mM) seguido por base de Hunig (0.033 mL, 0.188 mM). Se permitió la agitación de la reacción durante 5 minutos antes

20

de que se agregara **#115** (39 mg, 0.047 mM) a una solución en 0.4 mL de diclorometano, y 0.1 mL de DMF. Se permitió la agitación de la reacción a temperatura ambiente durante 3 horas y 15 minutos antes de ser apagada a través de la adición de agua que contiene una pequeña cantidad de TFA. Se redujo la reacción. El material
 5 crudo fue disuelto con DMSO y purificado por medio de cromatografía de fase inversa (Método J). Las fracciones apropiadas fueron concentradas después (Genevac). El material fue purificado después por medio de cromatografía de fase inversa (Método K) con la
 10 fracciones apropiadas que son concentradas (Genevac). El material fue transferido después hacia un pequeño envase utilizando diclorometano y metanol antes de ser reducido (Genevac) a fin de producir **mv#115** (1.4 mg, 3.3%) mezcla aceite/sólido. HPLC (Protocolo A a 45°C): *m/z* 897.5 [M+H⁺], tiempo de retención = 9.149
 15 minutos (pureza > 97%).

**Preparación de N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]-N,2-Dimetilalanil-N-{(1S,2R)-4-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-
 20 {[(1S)-1-carboxi-2-feniletíl]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-2-metoxi-1-[(1S)-1-metilpropil]-4-oxobutil}-N-metil-L-valinamida (mc#115)**



Etapas 1. Síntesis de cloruro de 6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoilo (**#248**). A una solución sometida a agitación de ácido 6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoico (3.15 g, 14.9 mM) en 15 mL de diclorometano, se agregó cloruro de oxalilo (1.61 mL, 17.9 mM) seguido por una gota de DMF. Se permitió la agitación de la reacción a temperatura ambiente durante tres horas. La reacción fue concentrada *in vacuo*. El residuo fue disuelto en una solución uno a uno de heptano y diclorometano y después concentrado *in vacuo*. Este proceso se repitió dos veces más produciendo un sólido **#248** (3.43 g, 100%). ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ [7.02 (s, 2H), 3.43 (m, 2H), 2.53 (m, 1H), CH₂ 1.8 (m, 1H), 1.54 (m, 4H), 1.26 (m, 2H).]

Etapa 2. Síntesis de N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]-N,2-dimetilalanina (**#249**). A una solución sometida a agitación **#248** (600 mg, 2.61 mM) en 10 mL de diclorometano, se agregó N,2-dimetilalanina (306 mg, 2.61 mM) seguida por trietilamina (1.09 mL, 7.84 mM). Se permitió la agitación de la reacción a temperatura ambiente durante tres horas. Se agregó diclorometano a la reacción y la capa orgánica fue lavada tres veces con agua y dos veces con salmuera. La capa orgánica fue separada y después secada sobre sulfato de sodio antes de ser concentrada *in vacuo*. El residuo fue purificado mediante cromatografía en gel de sílice (0-30% metanol en diclorometano) sobre sílice que había sido previamente neutralizado con trietilamina produciendo un sólido de color blanco **#249** (127 mg, 16%). LC-MS (Protocolo Q): *m/z* 309.0 [M-H⁺], tiempo de retención = 0.96 minutos.

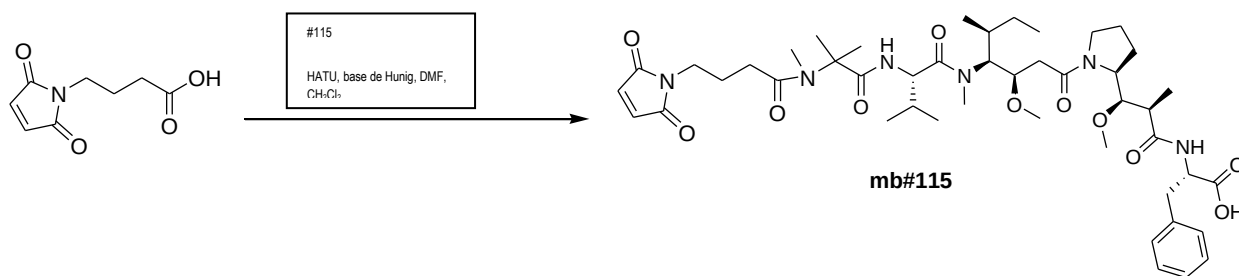
Etapa 3. Síntesis de N-[(2R,3R)-3-metoxi-3-[(2S)-1-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-5-metil-4-[metil(L-valil)amino]heptanoil}]pirrolidin-2-il]-2-metilpropanoil}-L-fenilalanina (**#250**). A una solución sometida a agitación **#113** (2.10 g, 2.46 mM) en 10 mL de THF, se agregó hidróxido de litio (228 mg, 5.16 mM) seguido por 3 mL de agua. Se permitió la agitación de la reacción a temperatura ambiente durante 2 horas. La reacción fue acidificada a través de la adición de 1 M HCl y después concentrada *in vacuo*. El sólido de color blanco resultante fue absorbido en 20 mL de acetonitrilo y 5 mL de agua. La capa acuosa removida y la capa orgánica fue lavada una vez con agua. La capa orgánica fue secada

sobre sulfato de sodio, filtrada y concentrada *in vacuo*. Se agregó después acetato de etilo (20 mL) y se permitió la agitación del sólido crudo durante 30 minutos, antes de ser filtrada para producir un sólido de color blanco **#250** (1.42 g, 94%). LC-MS (Protocolo Q): *m/z* 619.5 [M+H⁺], tiempo de retención = 1.10 minutos. HPLC (Protocolo A a 45°C) *m/z* 619.4 [M+H⁺], tiempo de retención = 6.732 minutos.

Etapas 4. Síntesis de N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]-N,2-Dimetilalanil-N-{(1S,2R)-4-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1S)-1-carboxi-2-feniletil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-2-metoxi-1-[(1S)-1-metilpropil]-4-oxobutil}-N-metil-L-valinamida (**mc#115**). A una solución sometida a agitación **#249** (382 mg, 1.23 mM) in 5 mL de diclorometano, se agregó HATU (482 mg, 1.23 mM) seguido por trietilamina (0.52 mL, 1.23 mM). Se permitió la agitación de la reacción durante 1 hora a temperatura ambiente seguida por la adición de **#250** (762 mg, 1.23 mM). Se permitió la agitación de la reacción durante 3 horas. La reacción fue concentrada *in vacuo*. La purificación de fase inversa (Método L) seguida por liofilización produjo un sólido de color blanco **mc#120** (124 mg, 11%). HPLC (Protocolo A a 45°C;) *m/z* 911.5 [M+H⁺], tiempo de retención = 9.676 minutos.

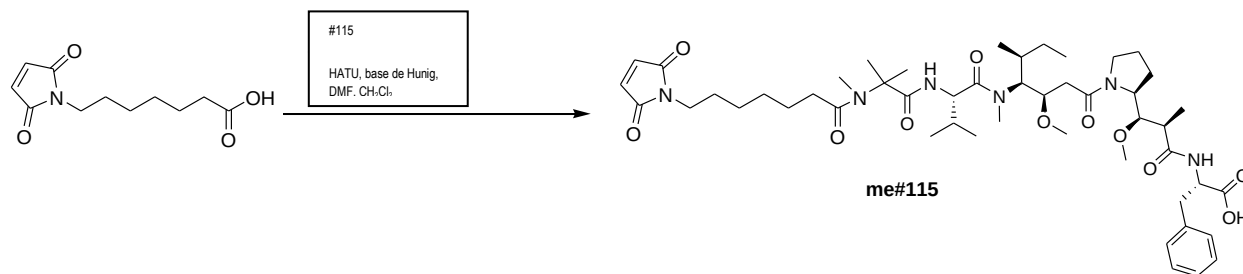
Preparación de N-[4-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)butanoyl]-N,2-Dimetilalanil-N-{(1S,2R)-4-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1S)-1-carboxi-2-feniletil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-2-metoxi-1-[(1S)-1-metilpropil]-4-

oxobutil}-N-metil-L-valinamida (mb#115).



Etapa 1. Síntesis de N-[4-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)butanoyl]-N,2-Dimetilalanil-N-{(1S,2R)-4-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1S)-1-carboxi-2-feniletíl]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-2-metoxi-1-[(1S)-1-metilpropil]-4-oxobutil}-N-metil-L-valinamida (**mb#115**). Se permite la agitación de una solución sometida a agitación de ácido 4-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)butanóico (1.2 equivalentes), HATU (1.2 equivalentes), y base de Hunig (3 equivalentes) en DMF y diclorometano durante 30 minutos. El compuesto **#115** (1 equivalente) es agregado después como una solución en diclorometano y DMF. La reacción es monitoreada por medio de LC-MS. La reacción es concentrada y la purificación se completa por medio de cromatografía de fase inversa a presión media Isco (Gradiente: 5%-100% agua en acetonitrilo).

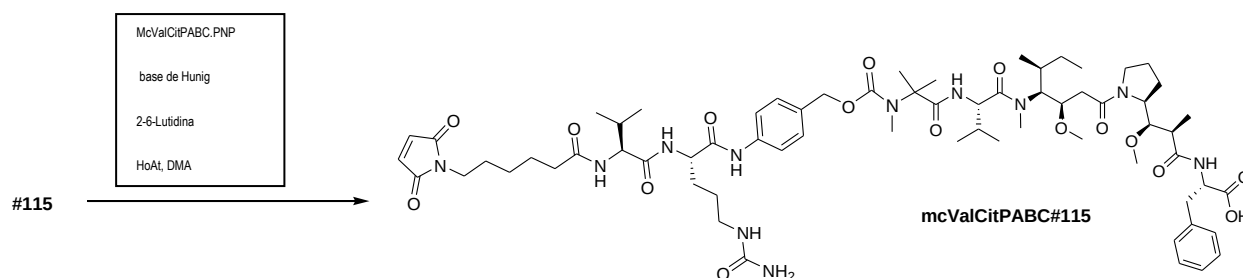
Preparación de N-[7-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)heptanoil]-N,2-Dimetilalanil-N-{(1S,2R)-4-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1S)-1-carboxi-2-feniletíl]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-2-metoxi-1-[(1S)-1-metilpropil]-4-oxobutil}-N-metil-L-valinamida (me#115).



Etapa 1. Síntesis de N-[7-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)heptanoil]-N,2-Dimetilalanil-N-{(1S,2R)-4-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-[[{(1S)-1-carboxi-2-feniletil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-2-metoxi-1-[(1S)-1-metilpropil]-4-oxobutil]-N-metil-L-valinamida (**me#115**). Se permitió la agitación de una solución sometida a agitación de ácido 7-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)heptanóico (1.2 equivalentes), HATU (1.2 equivalentes), y base de Hunig (3 equivalentes) en DMF y diclorometano durante 30 minutos. El compuesto **#115** (1 equivalente) es agregado después como una solución en diclorometano y DMF. La reacción es monitoreada a través de LC-MS. La reacción es concentrada y la purificación se completa por medio de cromatografía de fase inversa a presión media Isco (Gradiente: 5%-100% agua en acetonitrilo).

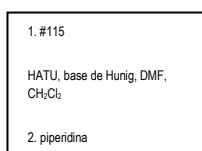
Preparación de N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]-L-valil-N~5~-carbamoil-N-(4-{(8S,11S,12R)-12-(2-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-[[{(1S)-1-carboxi-2-feniletil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-2-oxoetil)-8-isopropil-4,5,5,10-tetrametil-11-[(1S)-1-metilpropil]-3,6,9-trioxo-2,13-dioxa-4,7,10-

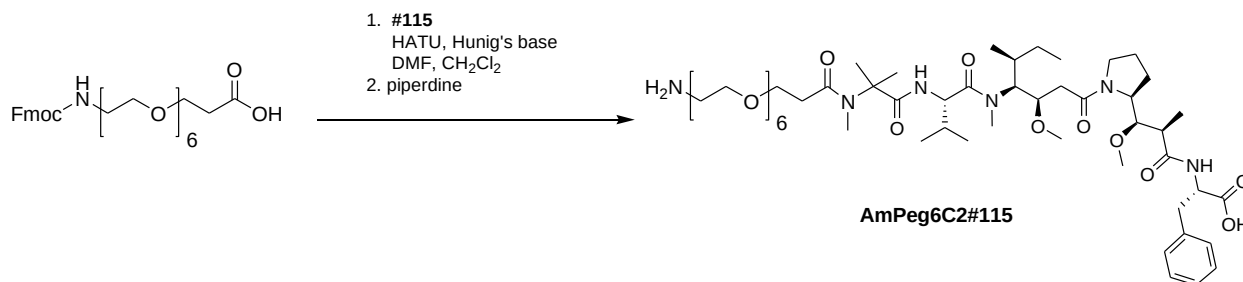
triazatetradec-1-il}fenil)-L-ornithinamida (mcValCitPABC#115).



5 *Etapa 1.* Síntesis de N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]-L-valil-N~5~-carbamoil-N-(4-{(8S,11S,12R)-12-(2-{(2S)-2-
 10 [(1R,2R)-3-{(1S)-1-carboxi-2-feniletil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-2-oxoetil)-8-isopropil-4,5,5,10-tetrametil-11-
 15 [(1S)-1-metilpropil]-3,6,9-trioxo-2,13-dioxa-4,7,10-triazatetradec-1-il}fenil)-L-ornithinamida (**mcValCitPABC#115**). Se preparó una
 solución de mcCValCitPABC (Ligador # D, 1 equivalente) y **#115** (1
 equivalente) en DMF. Se agregaron base de Hunig (4 equivalentes),
 2,6-Luditina (4 equivalentes), y HOAT (0.2 equivalentes). La reacción
 es monitoreada a través de LC-MS. La reacción es concentrada y la
 purificación se completa por medio de cromatografía de fase inversa
 a presión media Isco (Gradiente: 5%-100% agua en acetonitrilo).

**Preparación de N-(21-amino-4,7,10,13,16,19-hexaoxahenicosan-1-oyl)-N,2-Dimetilalanil-N-{(1S,2R)-4-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{(1S)-1-
 20 carboxi-2-feniletil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-2-metoxi-1-[(1S)-1-metilpropil]-4-oxobutil}-N-metil-L-
 valinamida (AmPeg6C2#115).**

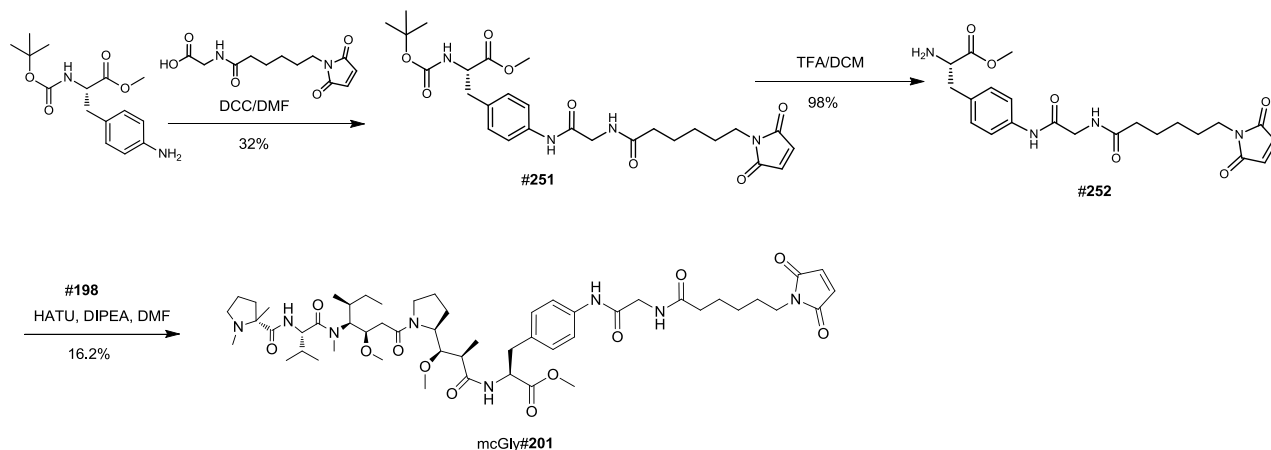




Etapa 1. Síntesis de N-(21-amino-4,7,10,13,16,19-hexaoxahenicosan-1-ol)-N,2-Dimetilalanil-N-((1S,2R)-4-((2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1S)-1-carboxi-2-feniletil]amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il)-2-metoxi-1-[(1S)-1-metilpropil]-4-oxobutil)-N-metil-L-valinamida (AmPeg6C2#115). Se permitió la agitación de una solución de ácido 1-(9H-fluoren-9-il)-3-oxo-2,7,10,13,16,19,22-heptaoxa-4-azapentacosan-25-oico (1 equivalente), HATU (1 equivalente), y base de Hunig (3 equivalentes) durante 30 minutos. El compuesto #115 es agregado como una solución en DMF. La reacción es monitoreada a través de LC-MS. Cuando la reacción de acoplamiento está cerca de completarse, se agregó piperidina (5 equivalentes). Se monitoreó la desprotección Fmoc a través de LC-MS. La reacción es concentrada y la purificación se completa por medio de cromatografía de fase inversa a presión media Isco (Gradiente: 5%-100% agua en acetonitrilo).

Preparación de 1,2-dimetil-D-prolil-N-[(3R,4S,5S)-1-((2S)-2-[(1R,2R)-3-((2S)-3-[4-({N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)]hexanoil]glycil}amino)fenil]-1-metoxi-1-oxopropan-2-il)amino)-

1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida mcGly#201.



Step1: Síntesis de metil N-(ter-butoxicarbonil)-4-({N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H pirrol-1-il)hexanoil]glicil}amino)-L-fenilalaninato (**#251**): A una solución de metil 4-amino-N-(ter-butoxicarbonil)-L-fenilalaninato (4.1 g, 15.3 mmol, 1eq.) en *N,N*-dimetilformamida deshidratada (70 mL) se agregó *N,N'*-Diciclohexilcarbodiimida (2.9 g, 15.3 mmol, 1eq.) a 0°C. La mezcla fue sometida a agitación a 0°C durante 30 minutos. Una solución de ácido 2-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanamido)acético (3 g, 10.2 mmol, 0.66 eq.) en *N,N*-dimetilformamida deshidratada (20 mL) se agregó a 0°C. La mezcla fue sometida a agitación a temperatura ambiente durante 3 días. La mezcla fue filtrada. El filtrado fue vertido en agua con hielo (200 mL) y extraído con EtOAc (200 mLX3). El extracto fue lavado con salmuera (200 mL), secado sobre Na₂SO₄ y concentrado *in vacuo* a fin de producir **#251** (1.8 g, 32.3% de rendimiento) como un sólido de color amarillo claro. HPLC (Protocolo Q2) [M+Na⁺] 567.3, tiempo de retención = 1.02 min.

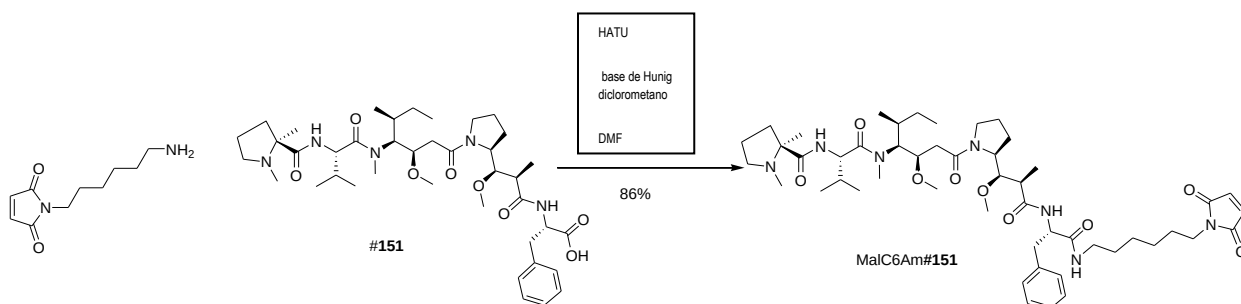
Etapla 2: Síntesis de metil 4-({N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-

pirrol-1-il)hexanoil]glycil}amino)-L-fenilalaninato (**#252**): A una solución de **#251** (800 mg, 1.47 mmol, 1 eq.) en diclorometano (16 mL) se agregó TFA (4.8 mL) a 0°C. La mezcla fue sometida a agitación a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla
 5 fue concentrada *in vacuo*. El residuo fue disuelto en agua y filtrado. El filtrado fue liofilizado a fin de producir **#252** (800 mg, 97.5%) como un sólido de color blanco. HPLC (Protocolo Q3) [M+H⁺] 445.4, tiempo de retención = 0.90 min.

Etapas 3: Síntesis de 1,2-dimetil-D-prolil-N-[(3R,4S,5S)-1-
 10 {(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(2S)-3-[4-({N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]glycil}amino)fenil]-1-metoxi-1-oxopropan-2-il}amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida (**mcGly#201**). A una solución de **#198** (94 mg, 0.13mmol, 1 eq.) y **#252** (60.3
 15 mg, 0.18 mmol, 1.4 eq.) en *N,N*-dimetilformamida (2 mL) se agregó HATU (64.2 mg, 0.13 mmol, 1 eq.) seguido por *N,N*-diisopropiletilamina (66 mg, 0.52 mmol). La solución fue sometida a agitación a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla de reacción fue neutralizada con ácido cítrico
 20 acuoso y concentrado para dar el producto crudo, el cual fue purificado por medio de cromatografía en gel de sílice (eluido con MeOH/DCM a partir de 1% hasta 7%), purificado después nuevamente a través de TLC preparatoria (Metanol:diclorometano: =1:10) para dar **mcGly#201** (25 mg,
 25 16.2%) como un sólido de color blanco ESI-MS: *m/z* 1023.59

[M+H⁺], HPLC (Protocolo EB) tiempo de retención = 4.0 minutos (Pureza = 96%). ¹H NMR (DMSO-d₆) δ 9.88 (d, 1H), 8.48 (d, 0.5H), 8.24 (d, 0.5H), 8.11 (m, 1H), 7.82 (m, 1H), 7.47 (d, 2H), 7.15 (m, 2H), 7.01 (s, 2H), 4.67 (m, 3H), 3.96 (m, 4H), 3.65 (m, 4H), 3.40 (m, 4H), 3.27 (m, 7H), 3.16 (m, 5H), 2.24 (m, 8H), 1.50 (m, 11H), 1.19 (m, 21H).

Preparación de 1,2-dimetil-L-prolil-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2S)-1-{[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexyl]amino}-1-oxo-3-fenilpropan-2-il]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida (MalC6Am#151).



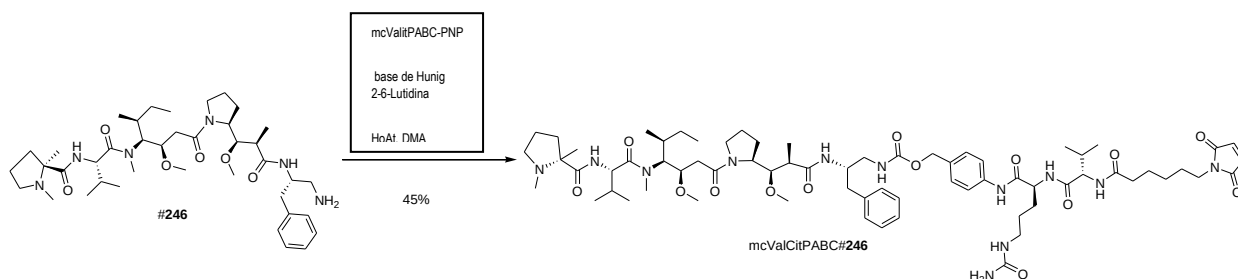
15

Etap 1. Síntesis de 1,2-dimetil-L-prolil-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2S)-1-{[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexyl]amino}-1-oxo-3-fenilpropan-2-il]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida (MalC6Am#151). Siguiendo el procedimiento general D usando #151 (20 mg, 0.023 mmol, 1.0 eq.), 1-(6-aminohexil)-1H-pirrol-2,5-diona (7.0 mg, 0.030 mmol, 1.3 eq.), HATU (11.4 mg, 0.030 mmol, 1.3 eq.), y base de Hunig (0.016 mL, 0.092 mmol, 1.3 eq.) en

20

2 mL de diclorometano, y 0.2 mL de DMF seguido por purificación utilizando cromatografía C18 de fase inversa y presión media (Gradiente: 5% hasta 80% acetonitrilo en agua con 0.02% TFA en cada fase) produjo MalC6Am#**151** (18.4 mg, 86%) como una mezcla de aceite transparente/sólido. LC-MS (Protocolo Q): m/z 922.3 $[M+H^+]$, tiempo de retención = 1.43 minutos; HPLC (Protocolo A a 45°C): m/z 922.4 $[M+H^+]$, tiempo de retención = 7.203 minutos.

10 **Preparación de N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]-L-valil-N-(4-{(6S,9R,10R)-6-bencil-10-[(2S)-1-
11 {(3R,4S,5S)-4-[(1,2-dimetil-L-prolil-L-valil)(metil)amino]-3-metoxi-
12 5-metilheptanoil}pirrolidin-2-il]-9-metil-3,8-dioxo-2,11-dioxa-4,7-
13 diazadodec-1-il}fenil)-N~5~-carbamoil-L-ornithinamida
14 (mcValCitPABC#246)**



Etapa 1. Síntesis de N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-
1-il)hexanoil]-L-valil-N-(4-{(6S,9R,10R)-6-bencil-10-[(2S)-1-
{(3R,4S,5S)-4-[(1,2-dimetil-L-prolil-L-valil)(metil)amino]-3-
metoxi-5-metilheptanoil}pirrolidin-2-il]-9-metil-3,8-dioxo-2,11-
dioxa-4,7-diazadodec-1-il}fenil)-N~5~-carbamoil-L-ornithinamida
(mcValCitPABC#**246**). Siguiendo el procedimiento general E

usando #246 (29.2 mg, 0.035 mmol, 1.0 eq.), mcValCitPABC-PNP (28.8 mg, 0.039 mmol, 1.1 eq.), 2,6-Luditina (0.016 mL, 0.14 mmol, 4.0 eq.), base de Hunig (0.025 mL, 0.14 mmol, 4.0 eq.), y HOAT (4.8 mg, 0.035 mmol, 1.0 eq.) en 2.0 mL de DMA seguida por purificación
 5 utilizando cromatografía C18 de fase inversa y presión media (Gradiente: 5% hasta 50% acetonitrilo en agua con 0.02% TFA en cada fase) se produjo mcValCitPABC #246 (21 mg, 45%) como una mezcla aceite transparente/sólido. LC-MS (Protocolo Q): m/z 1327.9 [M+H⁺], tiempo de retención = 1.36 minutos.

10

Estudios *in vitro* e *in vivo* de HERCEPTIN®

Se observa que para los siguientes estudios HERCEPTIN en ausencia de agentes citotóxicos conjugados no muestra significativa
 15 potencia *in vitro* o eficacia *in vivo* en concentraciones de anticuerpo equivalentes.

Procedimiento de Prueba Celular *In vitro*

Células de expresión (BT474 (cáncer de mama), N87 (cáncer
 20 gástrico), HCC1954 (cáncer de mama), MDA-MB-361-DYT2 (cáncer de mama)) o sin expresión (MDA-MB-468) fueron cultivadas en placas de cultivo celular de 96 pozos durante 24 horas antes del tratamiento. Las células fueron tratadas con conjugados anticuerpo-fármaco diluidos seriamente 3-veces o compuestos libres (es decir,
 25 sin anticuerpo conjugado para el fármaco) por duplicado en 10

concentraciones. La viabilidad celular fue determinada a través de CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation MTS Assay (Promega, Madison WI) 96 horas después del tratamiento. La viabilidad celular relativa fue determinada como porcentaje de control no tratado. Los valores IC₅₀ fueron calculados utilizando un modelo logístico de cuatro parámetros #203 con XLfit v4.2 (IDBS, Guildford, Surry, UK). Los resultados se muestran en los Cuadros 20, 21A y 21B.

Los estudios de eficacia *in vivo* de conjugados anticuerpo-fármaco se realizaron con la línea celular Her2+ MDAMB-361 DYT2. Para estudios de eficacia, 10 millones de células tumorales en 50% matrigel fueron implantadas subcutáneamente en ratones sin pelo de 6-8 semanas de edad. Cuando los tamaños de tumor alcanzaron entre 250-350 mm³ los fármacos o vehículo fueron administrados a través de inyección de bolo en la vena de la cola. Los ratones fueron inyectados con 1 mg/kg de conjugados de anticuerpo-fármaco tratados cuatro veces cada cuatro días (Q4dx4). El volumen del tumor es medido dos veces a la semana durante los primeros 50 días y una vez a la semana posteriormente a través de un dispositivo Caliper y calculado con la siguiente fórmula: Volumen de tumor = (longitud x anchura)/2. Los resultados fueron comparados a través de los estudios mediante normalización de la regresión de tumor de los ratones tratados con fármaco al dividir los volúmenes de tumor entre el volumen

de tumor tratado con vehículo (T/C).

Se probaron seis compuestos en tres diferentes estudios de xenoinjerto MDA-MB-361-DYT2 para determinar su actividad anti-tumoral. Los resultados de un estudio representativo con cuatro de los compuestos demuestran una significativa regresión de tumor a partir de los ratones tratados con vehículo durante el período de observación de 50 días (Figura 1). Para comparar los resultados de los compuestos en los tres estudios, la actividad anti-tumoral fue normalizada al dividir el volumen de tumor tratado con fármaco entre el volumen de tumor tratado con vehículo (T/C). Una gráfica de los seis valores T/C (Figura 2) demuestra que cada uno de los seis compuestos ocasiona la regresión de tumor completa (o casi completa) durante el período de observación que fue de hasta 107 días para uno de los estudios.

Los resultados de la prueba de H(C)-#D54, H(C)-vcMMAE, H(C)-mcMMAF y H(K)-MCC-DM1 en los estudios de xenoinjerto MDA-MB-361-DYT2 se muestran en la Figura 4. La gráfica de volumen de tumor en el grupo de tratamiento sobre el grupo de control (T/C) permite la comparación entre conjugados (véase la Figura 5C). Estos resultados demuestran que H(C)-#D54 exhibe eficacia equivalente para los conjugados HERCEPTIN® con H(C)-vcMMAE, H(C)-mcMMAF y es superior a H(K)-MCC-DM1 en este modelo.

Modelo de Xenoinjerto de Tumor N87 *In vivo* (HERCEPTIN®)

Los estudios de eficacia *in vivo* de conjugados de anticuerpo-

fármaco se realizaron con modelos de xenoinjerto de expresión de objetivo utilizando las líneas celulares N87. Para el estudio de eficacia, 7.5 millones de células tumorales en 50% matrigel son implantadas subcutáneamente en ratones sin pelo de 6-8

5 semanas de edad hasta que los tamaños de tumor alcanzan entre 250 y 350 mm³. La dosificación se efectúa a través de inyección de bolo en la vena de la cola. Dependiendo de la respuesta del tumor al tratamiento, los animales son inyectados con 1-10 mg/kg de conjugados de anticuerpo-fármaco tratados

10 cuatro veces cada cuatro días. Todos los animales experimentales son monitoreados semanalmente en cuanto a cambios de peso corporal. El volumen de tumor es medido dos veces por semana durante los primeros 50 días y una vez a la semana posteriormente por medio de un dispositivo Caliper y

15 calculado con la siguiente fórmula: Volumen de tumor = (longitud x anchura)/2. Los animales fueron sacrificados antes de que sus volúmenes de tumor alcanzaran 2500 mm³. Se observa que el tamaño de tumor decrece después de la primera semana de tratamiento. Los animales pueden ser monitoreados

20 de forma continua para Nuevo crecimiento del tumor después de que se ha detenido el tratamiento.

Los resultados de la prueba de H(C)-#D54, H(C)-vcMMAE, H(C)-mcMMAF y H(K)-MCC-DM1 en el modelo de tamizado *in vivo* de xenoinjerto de ratón N87 se muestran en las Figuras 3

25 y 5. Estos resultados demuestran que H(C)-#D54 es

superior/similar al conjugado H(C)-vcMMAE y es más potente que los conjugados H(C)-mcMMAF y H(K)-MCC-DM1 en este modelo.

Farmacocinética y Toxicocinética

5

La farmacocinética de ratón y toxicocinética de rata fueron determinadas a partir de estudios de farmacocinética de ratón y toxicocinética de rata de dosis individual (véanse los Cuadros 22 y 23). La farmacocinética de ratón se determinó a partir de muestras recolectadas a partir de ratones sin pelo a los que se administró una
10 dosis individual de 3 mg/kg. Las muestras fueron recolectadas hasta por 336 h. La toxicocinética de rata se determinó en ratas (Sprague-Dawley (Crl:CD (SD))) a las que se administró una administración individual de H(C)-vc-MMAE o H(C)-#D54 en dosis de 3, 10, y 30
15 mg/kg, o administrada H(C)-mc-MMAD o H(C)-mc-MMAF a 10, 30, y 100 mg/kg. Las muestras fueron recolectadas hasta por 336 horas. Las concentraciones circulantes de anticuerpo total y ADC se midieron utilizando ensayos ELISA. El área bajo la curva (AUC) se calculó para el anticuerpo total y ADC para cada ADC. Se calcularon
20 también las relaciones ADC a anticuerpo AUC.

La exposición de anticuerpo total H(C)-#D54 y ADC fueron mayores que aquellas observadas para H(C)-vc-MMAE en ratones en 3 mg/kg y todas las dosis evaluadas en ratas. La relación ADC a Ab AUC para H(C)-#D54 también fue mayor que aquella observada para
25 H(C)-vc-MMAE. Estos resultados sugieren que H(C)-#D54 tuvo mayor

exposición y que ADC y/o carga útil de ligador son potencialmente más estables que H(C)-vc-MMAE.

Toxicidad

5

La toxicidad independiente de objetivo de #D54 y cargas útiles de ligador de comparación (mcValCitPABC-MMAD y mcValCitPABC-MMAE) conjugado para un anticuerpo monoclonal sin reactividad cruzada (IgG1) se determinaron en un estudio de toxicidad de rata de dosis individual con un período de observación de dos semanas. Las dosis de los conjugados de anticuerpo-fármaco (ADCs) fueron 0, 3, 10 y 30 mg/kg con una n que es 5 machos/grupo y la carga de ligador-carga útil fue similar entre los conjugados (3.8, 3.2 y 4, respectivamente). Estos estudios incluyeron al menos observaciones clínicas diarias, pesos corporales semanales, patología clínica (final de la vida) y necropsia (Día 15-17) con examinación microscópica de 9 o más tejidos y cualesquiera lesiones graves.

20 La mortalidad con los cambios de peso corporal relacionados y señales de morbilidad se observaron en la dosis de 30 mg/kg para todos los conjugados y en la dosis de 10 mg/kg para el conjugado MMAD. No hay observaciones clínicas o cambios de peso corporal en los grupos sobrevivientes.

25 Los órganos de objetivo de los conjugados identificados a

través de examinación microscópica en los grupos sobrevivientes fueron como sigue. El conjugado a 10 mg/kg tuvo residuos en el lumen del epidídimo (5/5, mínimo a moderado), inflamación en la base del corazón (1/5 ratas, mínimo) y mitosis incrementada en la cornea (1/5 ratas, mínimo). No hubo hallazgos histológicos para el conjugado a 3 m/kg. Para el conjugado MMAD en el grupo de dosis sobreviviente a 3 mg/kg, hubo cambios en y relacionados con la médula ósea y en los testículos y el epidídimo. Para el conjugado MMAE a 10 mg/kg, hubo cambios en la médula ósea, riñón, hígado y epidídimo. En la dosis de 3 mg/kg para este conjugado, hubo cambios en el riñón y mitosis incrementada en el hígado. Por tanto, en los estudios de diseño similar y en los grupos sobrevivientes, el conjugado no tuvo los hallazgos de médula ósea observados con los conjugados de comparación y tampoco tuvo los hallazgos en hígado o riñón observados con uno de los comparadores.

En resumen, la dosis tolerada máxima (MTD) del conjugado y el conjugado MMAE fue de 10 mg/kg y la MTD del conjugado MMAD fue de 3 mg/kg. El nivel de efecto adverso no observado (NOAEL) del conjugado fue de 3 mg/kg en tanto que el NOAEL de los conjugados ligador-carga útil de comparación fue menor a 3 mg/kg. Este estudio demuestra como el perfil toxicológico para #D54 se compara a ciertos compuestos descritos en la técnica.

Estudios *In Vitro* e *In Vivo* de ADC Anti-IL-13R α 2

25 Anticuerpos Anti-IL-13R α 2 y ADCs

El anticuerpo humanizado hu08 se enlaza de manera específica al receptor IL-13R α 2. Las secuencias de aminoácido y nucleótido para hu08 se muestran en el Cuadro 3. Están subrayados los CDRs de Kabat.

5 **Cuadro 3.** Secuencias de aminoácido y nucleótido de anticuerpo hu08 humanizado.

NO ID SEC	DESCRIPCIÓN	SECUENCIA
9	hu08 secuencia de aminoácido de región variable de cadena pesada (CDRs subrayados).	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRNGMSW VRQAPGKGLEWVATVSSGGSYIYYADSVKGRFTISR NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQGTALATRFFD VWGQGTTLVTVSS
10	hu08 secuencia de aminoácido de región variable de cadena ligera (CDRs subrayados).	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVGTAVAWYQ QKPGKAPKLLIYSASYRSTGVPSRFSGSGSGTDFTLT SSLQPEDFATYYCQHHYSAPWTFGGGGTKVEIK
11	hu08 secuencia de aminoácido de cadena pesada (CDRs subrayados).	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRNGMSW VRQAPGKGLEWVATVSSGGSYIYYADSVKGRFTISR NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQGTALATRFFD VWGQGTTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE PKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFVMSHEALHNH YTQKSLSCSPGK
12	hu08 secuencia de aminoácido de cadena ligera (CDRs subrayados).	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVGTAVAWYQ QKPGKAPKLLIYSASYRSTGVPSRFSGSGSGTDFTLT SSLQPEDFATYYCQHHYSAPWTFGGGGTKVEIK TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

13	hu08-secuencia de nucleótido de cadena pesada	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGCGGCGGACTGGT GCAGCCTGGCGGCTCTCTGAGACTGTCTTGTGCCG CCTCCGGCTTCACCTTCAGTAGGAATGGCATGTCTT GGGTGAGGCAGGCCCCCTGGCAAGGGCCTGGAGTG GGTGGCCACCGTTAGTAGTGGTGGTAGTTACATCTA CTATGCAGACAGTGTGAAGGGGCGGTTTACCATTCT CCAGGGACAACGCCAAGAAGTCCCTGTACCTCCAG ATGAACTCCCTGAGGGCCGAGGATACCGCCGTGTA CTACTGTGCCAGACAAGGGACTACGGCACTAGCTA CGAGGTTCTTCGATGTCTGGGGCCAGGGCACCTG GTGACCGTGTCTCTGCGTCGACCAAGGGCCCATC GGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCT CTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCCTGGTCAAG GACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAA CTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCC CGGCTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCA GCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGC ACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAGCCC AGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAA ATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGGCC AGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCC TCTTCCCCCAAAAACCCCAAGGACACCCCTCATGACT CCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGAC GTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTG GTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGA CAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGAGTAC CGTGTGGTCAAGCTCCTCACCGTCTGCAACAGGA CTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCT CCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACC ATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACACAA GGTGACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGA CCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAA GGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGA GAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGATCA CGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCTTCTTCT CTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTG GCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGC ATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGC CTCTCCCTGTCCCCGGGTAAA
14	hu08- secuencia de nucleótido de cadena ligera	GACATCCAGATGACCCAGTCCCCCTCTTCTCTGTCT GCCTCTGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTAA GGCCAGTCAGGATGTAGGTACTGCTGTAGCCTGGT ATCAGCAGAAGCCTGGCAAGGCTCCCAAGCTGCTG ATCTACTCGGCATCCTACCGGTCCACTGGCGTGCCT TCCAGATTCTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCGATTTC ACCCTGACCATCTCCTCCCTCCAGCCTGAGGATTTC GCCACCTACTACTGCCAGCACCATATAGTGCTCCG TGGACGTTTGGCGGCGGAACAAAGGTGGAGATCAA GACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCC ATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGT TGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGC CAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATC GGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACACAGAGCAGGACA GCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTG ACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGT CTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCT CGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

El anticuerpo hu08 anti-IL-13R α 2 humanizado fue conjugado para varias combinaciones de ligador-carga útil de la presente invención, según se proporciona en el Cuadro 4. Los conjugados anticuerpo-fármaco fueron preparados de acuerdo con los métodos

de la presente invención.

Cuadro 4 ADCs anti-IL-13R α 2.

ADC Carga Útil-Carga Útil #	Nomenclatura ADC Correspondiente
IL13Ra2-AB08-v1010-hG1-(C)_mcValCitPABC-#54	hu08-vc-0101
IL13Ra2-AB08-v1010-hG1-(C)_mc-#115	hu08-mc-3377
IL13Ra2-AB08-v1010-hG1-(C)_mc-0#118	hu08-mc-0131
IL13Ra2-AB08-v1010-hG1-(C)_MalPeg6C2-#117	hu08-Malpeg-6121
IL13Ra2-AB08-v1010-hG1-(C)_Mal(H ₂ O)Peg6C2-0#118	hu08-Malpeg-0131
IL13Ra2-AB08-v1010-hG1-(C)_mc-#117	hu08-mc-6121
IL13Ra2-AB08-v1010-hG1-(C)_mcValCitPABC-#226	hu08-vc-3906
IL13Ra2-AB08-v1010-hG1-(C)_mcValCitPABC-#112	hu08-vc-6780
IL13Ra2-AB08-v1010-hG1-(C)_mc-#69	hu08-mc-8261
IL13Ra2-AB08-v1010-hG1-(C)_mc-#226	hu08-mc-3906
IL13Ra2-AB08-v1010-hG1-(C)_MalPeg6C2-#69	hu08-MalPeg-8261
hulG8.84-mcValCitPABC-#54	hulG8.84-vc0101
hulG8.84-mc-#115	hulG8.84-mc3377

Ensayo de Citotoxicidad *In Vitro* con ADCs anti-IL-13R α 2

5 Las líneas celulares que expresan el antígeno IL-13R α 2 y una línea celular de control negativo, fueron cultivadas con concentraciones crecientes de ADCs anti-IL-13R α 2 que comprende el anticuerpo hu08 conjugado para varias cargas útiles de ligador de la presente invención. Después de cuatro
10 días, se determine la viabilidad de cada cultivo. Se calcularon los valores IC₅₀ por medio de regresión no lineal logística y son presentados como ng Ab/mL.

Los datos demuestran que el anticuerpo hu08v1.0/1.0 anti-IL-13R α 2 conjugado para seis diferentes cargas útiles de
15 auristatina es efectivo contra las líneas celulares positivas IL-

13R α 2 probadas (PC3MM2), que tienen un IC₅₀ que varía desde 1.1 hasta 4.9 ng Ab/mL o 7.3-32.7 pM (Cuadro 5). Los ADCs no fueron activos contra la línea celular negativa IL-13R α 2, H460, y los ADCs de control, que no se unen a IL-13R α 2, hulG8.84-vc0101 y hulG8.84-mc3377, no fueron activos contra ninguna de las líneas celulares probadas.

Cuadro 5. Valores IC₅₀ (ng Ab/mL) de ADCs anti-IL-13R α 2 humanizados.

ADC	DAR	IC ₅₀ (ng Ab/mL)		
		PC3MM2	A375	H460
hu08-vc0101	3.2	2.5	3.8	>400000
hu08-mc3377	4.3	1.2	2.2	>400000
hu08-mc-0131	3.2	1.3	2.1	>400000
hu08-Malpeg-6121	3.3	3.5	3.4	>400000
hu08-Malpeg-0131	2.9	2.9	4.9	>400000
hu08-mc-6121	3.3	1.1	2.4	>400000
hu08-vc-3906	3	1.5	2.9	>400000
hu08 vc-6780	4	1.2	2.2	>400000
hulG8.84-vc0101	3.7	>400000	>400000	>400000
hulG8.84-mc3377	4.3	>400000	>400000	>400000

10

Modelos de Xenoinjerto Subcutáneo *In Vivo* con ADCs anti-IL13R α 2

El anticuerpo hu08 humanizado se enlaza de manera específica al receptor IL-13R α 2. Los ADCs hu08 con once diferentes combinaciones ligador-carga útil fueron probadas en un modelo de xenoinjerto *in vivo*. Ratones atímicos, hembra (sin pelo) recibieron inyección subcutánea con PC3MM2. Ratones con tumores implantados, aproximadamente 0.1 hasta 0.3 g (n = 8 hasta 10 ratones/grupo de tratamiento), recibieron por vía intravenosa q4d x 4 con solución salina normal (vehículo), hu08v1.0/1.0 ADCs con

20

ligador-cargas útiles vc-0101, vc-6780, vc-3906, mc-8261, mc-0131, mc-6121, mc-3377, MalPeg-8261, MalPeg-0131, MalPeg-6121, o MalPeg-3906, y un Ab (hulgG8.84), que no se enlaza, conjugado con vc-0101 o mc-3377, a una dosis de 2 o 3 mg
 5 Ab/kg. Los ADCs fueron dosificados en base al contenido Ab. Se midieron los tumores al menos una vez por semana y se calcularon sus tamaños como $\text{mm}^3 = 0.5 \times (\text{anchura de tumor}^2) \times (\text{longitud de tumor})$.

Los resultados de eficacia in vivo listados en el Cuadro 6
 10 muestra un rango de actividad anti-tumoral con los diversos ADCs probados. El orden relativo de potencia es hu08-vc-0101 > hu08-vc-6780 > hu08-mc-0131 > hu08-mc-6121 > hu08-mc-3906 > hu08-MalPeg-0131 > hu08-MalPeg-6121 > hu08-MalPeg-3906 > > hu08-mc-8261. En el nivel de dosis de 3 mg/kg, tanto
 15 hu08-vc-0101 como hu08-mc-3377 demostraron actividad antitumoral, en tanto que Ab (hulgG8.84), que no se enlaza conjugado con vc-0101 o mc-3377 no tuvo actividad y fue similar al control de vehículo.

20

25

Cuadro 6. Eficacia de ADCs anti-IL-13R α 2 en xenoinjertos PC3MM2.

ADC	Dosis (mg/kg) Q4dx4	Xenoinjerto PC3MM2, volumen de tumor (mm ³ +/- SEM)							
		Día -1	Día 3	Día 8	Día 16	Día 20	Día 30	Día 42	Día 52
Vehicle	0	638 ± 27	1149 ± 82	1707 ± 133	GT	GT	GT	GT	GT
hu08-MalPeg-3906	2	642 ± 36	1036 ± 60	1176 ± 51	GT	GT	GT	GT	GT
hu08-mc-8261	2	642 ± 51	1088 ± 121	1429 ± 158	GT	GT	GT	GT	GT
hu08-mc-0131	2	637 ± 44	1004 ± 73	778 ± 83	GT	GT	GT	GT	GT
hu08-MalPeg-6121	2	638 ± 36	947 ± 85	1000 ± 126	GT	GT	GT	GT	GT
hu08-MalPeg-0131	2	649 ± 39	1085 ± 54	1040 ± 88	GT	GT	GT	GT	GT
hu08-vc-0101	2	646 ± 36	899 ± 54	557 ± 49	243 ± 28	201 ± 20	113 ± 17	207 ± 49	532 ± 151
hu08-vc-6780	2	641 ± 28	850 ± 100	652 ± 54	279 ± 55	217 ± 45	230 ± 133	GT	GT
hu08-mc-6121	2	636 ± 37	909 ± 63	821 ± 93	GT	GT	GT	GT	GT
hu08-mc-3906	2	637 ± 26	875 ± 48	806 ± 70	GT	GT	GT	GT	GT
hu08-MalPeg-8261	2	645 ± 34	991 ± 71	1220 ± 115	GT	GT	GT	GT	GT
hu08-vc0101	3	339 ± 18	433 ± 45	38 ± 14	6 ± 6	110 ± 110	230 ± 230	GT	GT
hu08-mc3377	3	337 ± 21	385 ± 36	41 ± 12	0 ± 0	78 ± 36	346 ± 147	616 ± 243	902 ± 364
huIgG8.84-vc0101	3	365 ± 22	581 ± 47	1017 ± 168	GT	GT	GT	GT	GT
huIgG8.84-mc3377	10	328 ± 27	459 ± 63	295 ± 121	544 ± 258	GT	GT	GT	GT

GT= grupo terminado debido a gran tamaño de tumor

Estudios *In Vitro* e *In Vivo* de ADC Anti-Notch**Anticuerpos Anti-Notch y ADCs**

Los anticuerpos humanizados, hu28 y hu75, y los anticuerpos químericos rata-humano, ch28 y ch75, se enlazan de manera específica al receptor Notch. Las secuencias de aminoácido y de nucleótido para hu28 y hu75 se proporcionan en el Cuadro 7. Los

5 CDRs de Kabat están subrayados.

Cuadro 7. Secuencias de aminoácido y nucleótido de anticuerpos anti-Notch humanizados.

NO ID SEC.	DESCRIPCIÓN	SECUENCIAS
15	hu28 secuencia de aminoácido de Región Variable de Cadena Pesada (CDRs subrayados).	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRDYGMTWVRQAP GKGLEWVAYISSGSNYIYYAEAVKGRFTISRDNKNSLYLQM NSLRAEDTAVYYCARRGPFVLD ~~AWGQGT~~ LVTVSS
16	hu28 Secuencia de aminoácido de cadena pesada (CDRs subrayados). Región Constante IgG1 Humano	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRDYGMTWVRQAP GKGLEWVAYISSGSNYIYYAEAVKGRFTISRDNKNSLYLQM NSLRAEDTAVYYCARRGPFVLD ~~AWGQGT~~ LVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

17	hu28 Secuencia de nucleótido de cadena pesada	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAG CCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAT TCACTTTCAGGGGACTATGGAATGACCTGGGTCCGCCAGGC TCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCTATATTAGTAGT GGTAGCAATTACATCTATTATGCAGAAGCGGTGAAGGGCC GATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACTGTAT CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGT ATTACTGTGCGAGACGAGGCCCCGTTTGTGGATGCCTG GGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCGTCGACC AAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGA GCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCA AGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACTC AGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGCTGTCTC CTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGA CCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTG CAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAG AAAGTTGAGCCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCC ACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGGACCGTCAGTC TTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTC CCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGC CACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACG GCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGAGGA GCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTACGCGTCCCTACC GTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGT GCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAA AACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGACACAG GTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGA ACCAGGTACAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCC CAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCC GGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGTCTGGACTCC GACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCCTGGACAA GAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTG ATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCC TCTCCCTGTCCCCGGGT
18	hu28 secuencia de aminoácido de Región Variable de Cadena Ligera (CDRs subrayados).	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQSINRYLHWYQQKPGK APKLLIYN <u>ANGLQ</u> TGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAT YYC <u>LQHNTWPD</u> TFGGGTKVEIK
19	hu28 Secuencia de aminoácido de cadena ligera (CDRs subrayados). Región Constante kappa Humana	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQSINRYLHWYQQKPGK APKLLIYN <u>ANGLQ</u> TGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAT YYC <u>LQHNTWPD</u> TFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEN
20	hu28 Secuencia de nucleótido de cadena ligera	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATC TGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCAAAGCAAGTCAGA GTATTAACAGGTACTTACACTGGTATCAGCAGAAACGAGG AAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATAATGCAAACGGTTTGCA AACGGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGG ACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGA TTTTGCAACTTACTACTGTTTGCAGCATAATACGTGGCCGG ACACGTTTGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGGAC CGTGGCCGCTCCTTCCGTGTTTCATCTTCCCCCCTTCCGAC GAGCAGCTGAAGTCTGGCACCGCCTCTGTGGTGTGTCTGC TGAACAACCTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAA GGTGGACAACGCTCTGCAGTCCGGCAACTCCAGGAGTCT GTGACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGT CCTCTACCCTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCA CAAGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCC TCTCCTGTGACCAAGTCTTCAACCGGGGCGAGTGC

21	hu75 secuencia de aminoácido de Región Variable de Cadena pesada(CDRs subrayados).	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYAFTD <u>Y</u> WMTWVRQA PGKGLEWVVAEISPNSGGTNFNEKFKGRFTISVDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARG <u>EIRYNWFAYWGQ</u> GLTVTVSS
22	hu75 Secuencia de aminoácido de cadena pesada (CDRs subrayados). Región Constante IgG1 Humana	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYAFTD <u>Y</u> WMTWVRQA PGKGLEWVVAEISPNSGGTNFNEKFKGRFTISVDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARG <u>EIRYNWFAYWGQ</u> GLTVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVHLQDNLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
23	hu75 Secuencia de nucleótido de cadena pesada	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGCTCCAG CCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGTT ATGCATTCACTGACTACTGGATGACCTGGGTCCGCCAGGC TCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCGAAATTTCTCCT AACAGTGGTGGTACTAATCAATGAAAAGTTCAAGGGCCG ATTCACCATCTCCGTTGACAACGCCAAGAAGTCACTGTATC TGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTA TTACTGTGCGAGAGGGGAAATCCGTTACAATTGGTTTGCTT ACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCAACCGTCTCCTCAGCGTC GACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCC AAGAGCACCTCTGGGGGACACAGCGGCCCTGGGCTGCCTG GTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGA ACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCCGGC TGTCCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCTCAGCAGCGTG GTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACA TCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGA CAAGAAAGTTGAGCCCAATCTTGTGACAAAAGTCAACAT GCCCACCGTGCCAGCACCTGAACCTCTGGGGGGACCGTC AGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCCTCATGA TCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGT GAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTG GACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGG AGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTC CACCGTCTGCAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTAC AAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCG AGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACC ACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCCGGGAGGAGATGACC AAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCT ATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCA GCCGGAGAACAATAACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGAC TCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGA CAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCC GTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGA GCCTCTCCCTGTCCCCGGGT
24	hu75 secuencia de aminoácido de Región Variable de Cadena Ligera (CDRs subrayados).	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQNVGNNIAWYQQKPGK APKLLIYYASNRYTGVPSRFSGSGYGTDFLTISLQPEDFAT YYCQRLYNSPFTFGGGTKVEIK

25	hu75 Secuencia de aminoácido de cadena ligera(CDRs subrayados). Región Constante kappa Humana	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNVGNNAWYQQKPGKAPKLLIYYASNRYTGVPSRFSGSGYGTDFLTITSSLPEDFATYYCQRLYNPFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
26	hu75 Secuencia de nucleótido de cadena ligera	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCAACCATCACTTGCAAGGCCAGTCAG AATGTGGGTAATAATATAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGG GAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATTATGCATCTAACCGGT ACACTGGGGTCCCATCAAGGTTCACTGGCAGTGGATATGG GACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAG ATTTTGCAACTTACTACTGTCAGCGTCTTTACAATTCTCCAT TCACGTTCTGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGGAC CGTGGCCGCTCCTTCCGTGTTTCATCTTCCCCCCTTCCGAC GAGCAGCTGAAGTCTGGCACCGCCTCTGTGGTGTGTCTGC TGAACAACCTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAA GGTGGACAACGCTCTGCAGTCCGGCAACTCCCAGGAGTCT GTGACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGT CCTCTACCCTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCA CAAGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCC TCTCTGTGACCAAGTCCTTCAACCGGGGCGAGTGCT

Los anticuerpos anti-Notch humanizados, hu28 y hu75, y los anticuerpos anti-Notch quiméricos rata-humano, ch28 y ch75, fueron conjugados para varias combinaciones de ligador-carga útil de la presente invención, como se proporcionan en el Cuadro 8. Los

5 conjugados de anticuerpo-fármaco se prepararon de acuerdo con los métodos de la presente invención.

Cuadro 8. ADCs Anti-Notch.

ADC Ligador-Carga Útil #	Nomenclatura ADC Correspondiente
Notch-28-v1010-hG1-(C)_mcValCitPABC-#54	hu28-vc0101
Notch-28-v1010-hG1-(C)_mcValCitPABC-#112	hu28-vc6780
Notch-75-v1913-hG1-(C)_mcValCitPABC-#54	hu75-vc0101
Notch-75-v1913-hG1-(C)_mcValCitPABC-#112	hu75-vc6780
Notch-28-cG1-(C)_mcValCitPABC-#54	ch28-vc0101
Notch-28-cG1-(C)_mcValCitPABC-#112	ch28-vc6780
Notch-28-cG1-(C)_mc-#54	ch28-mc0101
Notch-28-cG1-(C)_mc-0#118	ch28-mc0131
Notch-28-cG1-(C)_mc-#115	ch28-mc3377
Notch-28-cG1-(C)_mc-#69	ch28-mc8261

Notch-28-cG1-(C)_MalPeg6C2-0#118	ch28-MalPeg6C2-0131
Notch-28-cG1-(C)_MalPeg6C2-#69	ch28-MalPeg6C2-8261
Notch-28-cG1-(C)_me-0#118	ch28-me0131
Notch-28-cG1-(C)_m(H ₂ O)c-0#118	ch28-m(H ₂ O)c-0131
Notch-75-cG1-(C)_mcValCitPABC-#54	ch75-vc0101
Notch-75-cG1-(C)_mcValCitPABC-#112	ch75-vc6780
Notch-75-cG1-(C)_mc-0#118	ch75-mc0131
Notch-75-cG1-(C)_mc-#115	ch75-mc3377
Notch-75-cG1-(C)_MalPeg6C2-0#118	ch75-MalPeg6C2-0131
Notch-75-cG1-(C)_MalPeg6C2-#69	ch75-MalPeg6C2-8261
Notch-75-cG1-(C)_me-0#118	ch75-me0131
Notch-75-cG1-(C)_m(H ₂ O)c-0#118	ch75-m(H ₂ O)c-0131
huNeg8.8-(C)_mcValCitPABC-#54	huNeg8.8-vc0101
huNeg8.8-(C)_mcValCitPABC-#112	huNeg8.8-vc6780
huNeg8.8-(C)_mc-0#118	huNeg8.8-mc0131
huNeg8.8-(C)_mc-#115	huNeg8.8-mc3377
huNeg8.8-(C)_me-0#118	huNeg8.8-me0131
huNeg8.8-(C)_MalPeg6C2-#69	huNeg8.8-MalPeg6C2-8261
ch2H6-(C)_mc-#69	ch2H6-mc8261

Ensayos de Citotoxicidad *In Vitro* con ADCs Anti-Notch

Se determinaron los efectos de ADCs anti-Notch en 1) líneas celulares que expresan de manera endógena la proteína: HCC2429 (cáncer pulmonar), OVCAR3 (cáncer de ovarios) y MDA-MB-468 (cáncer de mama), 2) líneas celulares modificadas genéticamente para sobre-expresar la proteína Notch: MDA-MB-468/hNotch y U2OS/hNotch, y 3) una línea celular de control negativo (SW900) utilizando un indicador de viabilidad celular MTS (Promega, Madison, WI). Estas líneas celulares fueron cultivadas con concentraciones incrementadas de ADCs anti-Notch que comprenden anticuerpos anti-Notch humanizados, hu28 y hu75, y anticuerpos anti-Notch quiméricos

rata-humano, ch28 y ch75, conjugados para varias combinaciones de ligador-carga útil de la presente invención. Como un control específico para los ADCs-anti-Notch, se probaron también los ADCs de control, no dirigidos (huNeg8.8-ADCs o ch2H6-ADCs) en las mismas líneas celulares. Después de cuatro días, se determine la viabilidad de cada cultivo. Se calcularon los valores IC_{50} por medio de regression no lineal logística y presentados como ng Ab/mL. Se proporciona también la relación fármaco anticuerpo (DAR).

El Cuadro 9 muestra valores IC_{50} (ng Ab/mL) de los tratamientos ADC anti-Notch humanizado. Las líneas celulares HCC2429 y MDA-MB-468/hNotch tuvieron dos repeticiones individuales. Los datos demuestran que los ADCs anti-Notch humanizados con varias combinaciones ligador-carga útil fueron activos e indujeron la muerte celular en las líneas celulares de cáncer que expresan y sobre-expresan Notch HCC2429, OVCAR3, MDA-MB-468, MDA-MB-468/hNotch, U2OS/hNotch, aunque no en la línea celular de control negativo SW900 que carece de expresión Notch. Los ADS de control no dirigidos carecieron ya sea de potencia (LP) y por lo tanto no se generaron valores IC_{50} como se indicó, o bien fueron mínimamente activos en las dosis más altas probadas. Los ADCs Anti-Notch que tienen valores IC_{50} iguales a o mayores que los valores IC_{50} para los ADCs de control fueron considerados como faltos de potencia *in vitro* y se indica como LP.

Cuadro 9. Valores IC₅₀ (ng Ab/mL) de ADCs anti-Notch humanizados

ADC	DAR	IC ₅₀ (ng Ab/mL) ± S.E.M.							
		HCC2429	OVCA R3	MDA-MB-468	MDA-MB-468/hNotch	U2OS/hNotch	SW900		
hu28-vc0101	3.9	473	2940	306	6545	3.2	3	1330	LP
hu75-vc0101	3.8	611	3295	515	7001	37	36	523	LP
huNeg8.8-vc0101	3.7	18417	23978	3770	LP	5122	LP	LP	23379
hu28-vc6780	3.9	148	2050	17	LP	1.3	3	LP	LP
hu75-vc6780	4.2	214	630	254	LP	26	25	LP	LP
huNeg8.8-vc6780	4.2	LP	LP	9238	LP	LP	LP	LP	LP

El Cuadro 10 muestra valores IC₅₀ (ng Ab/mL) de los tratamientos ADC anti-Notch quimérico rata-humano. Para los experimentos con 2-4 repeticiones individuales, se calcularon los valores IC₅₀ promedio junto con el error estándar de la media (S.E.M., por sus siglas en inglés). Los datos demuestran que los ADCs anti-Notch quiméricos rata-humano con varias combinaciones ligador-cargas útiles fueron activos e indujeron la muerte celular en las líneas celulares de cáncer que expresan y sobre-expresan Notch HCC2429, OVCAR3, MDA-MB-468, MDA-MB-468/hNotch, U2OS/hNotch. Los ADCs de control no dirigidos carecieron de potencia (LP) y por lo tanto no se generaron valores IC₅₀ como se indicó, o bien, fueron mínimamente activos en las dosis más altas probadas. Los ADCs Anti-Notch que tienen valores IC₅₀ iguales a o mayores que los valores IC₅₀ para los ADCs de control fueron considerados faltos de potencia *in vitro* y se indica como LP.

Cuadro 10. Valores IC₅₀ (ng Ab/mL) de ADCs anti-Notch quiméricos rata-humano (nd= no determinado).

ADC	DAR	IC ₅₀ (ng Ab/mL) ± S.E.M.				
		HCC2429	OVCAR 3	MDA-MB-468	MDA-MB-468/hNotch	U2OS/hNotch
ch28-mc8261	3.7	LP	nd	12147±4806.4	nd	nd
ch2H6-mc8261	4.1	LP	nd	LP	nd	nd
ch28-MalPeg6C2-8261	4.3	LP	nd	83±35.5	nd	nd
ch75-MalPeg6C2-8261	3.8	LP	nd	4255±2375	nd	nd
huNeg8.8-MalPeg6C2-8261	4.1	LP	nd	LP	nd	nd
ch28-mc0131	3.4	251±77.5	6±1.0	35±18.5	nd	3±0.5
ch75-mc0131	3.3	671±406.5	289	8202±2773.0	nd	19
huNeg8.8-mc0131	3.9	Nd	LP	LP	nd	LP
ch28-me0131	3.9	30	8±2.0	24±14.0	nd	3±1.15
ch75-me0131	3.5	Nd	nd	259	nd	nd
huNeg8.8-me0131	3.7	Nd	LP	LP	nd	LP
ch28-mc3377	3.7	LP	14±5.5	27±11.3	nd	3±0.5
ch75-mc3377	3.7	Nd	nd	560	nd	nd
huNeg8.8-mc3377	3.6	Nd	LP	LP	nd	LP
ch28-MalPeg6C2-0131	4.1	LP	10±2.0	10±1.0	nd	3±0.85
ch28-vc0101	3.8	3230±1116.5	635	5443±2630.9	4±0.5	95±18.2
ch75-vc0101	2.7	2112±826.0	LP	4064±1793.9	24±4.0	LP
huNeg8.8-vc0101	3.7	15341	LP	4523±2789.5	8833	LP
ch28-vc6780	4.1	324±78.9	90±48.5	4407±2128.2	3±0.5	LP
ch75-vc6780	2.8	1004±177.0	922	6873±4230.0	21±3.5	LP
huNeg8.8-vc6780	4.1	LP	LP	LP	LP	LP

Modelos de Xenoinjerto de Tumor *In vivo* con ADCs Anti-Notch

- 5 Los anticuerpos anti-Notch humanizados, hu28 and hu75, y anticuerpos anti-Notch quiméricos rata-humano, ch28 y ch75, fueron conjugados para varias combinaciones de ligador-carga útil y probados en modelos de xenoinjerto 37622A1 de cáncer pulmonar de célula no pequeña (NSCLC), de cáncer pulmonar HCC2429, de

cáncer de mama MDA-MB-468 y de cáncer gástrico N87. Para cada uno de los modelos descritos a continuación se dio la primera dosis en el Día 0. Se midieron los tumores al menos una vez por semana y se calcularon sus volúmenes con la
 5 fórmula: volumen de tumor (mm^3) = $0.5 \times (\text{anchura de tumor}^2)(\text{longitud de tumor})$. Se calcularon los volúmenes de tumor medios ($\pm$ S.E.M.) para cada grupo de tratamiento teniendo un máximo de 10 animales y un mínimo de 6 animales para ser incluidos.

10

A. Xenoinjertos 37622A1 NSCLC

Se examinaron los efectos de ADCs anti-Notch en ratones inmunodeficientes en el crecimiento *in vivo* de xenoinjertos de tumor humano que se implantaron a partir de fragmentos de
 15 tumores 37622A1 NSCLC de reciente resección obtenidos de acuerdo con procedimientos de consentimiento apropiados (Asterand). Los xenoinjertos 37622A1 NSCLC derivados de paciente fueron transferidos a nivel subcutáneo *in vivo* como fragmentos de un animal a otro en ratones hembra sin pelo
 20 (Nu/Nu). Cuando los tumores alcanzaron un volumen de 150 hasta 300 mm^3 , fueron implantados para asegurar la uniformidad del tamaño de tumor entre varios grupos de tratamiento. El modelo 37622A1 NSCLC fue dosificado por vía intravenosa cuatro veces cada cuatro días (Q4dx4) con
 25 vehículo PBS, ADCs anti-Notch humanizados, ADCs huNeg-8.8

de control y cisplatino en las dosis proporcionadas en el Cuadro 11.

El cisplatino es un agente anticancerígeno en base a platino usado en el tratamiento del cáncer y considerado como una terapia de estándar de atención. El cisplatino se entrelaza al ADN induciendo por tanto apoptosis e inhibición del crecimiento celular. Los datos demuestran que los ADCs anti-Notch hu28-vc0101, hu28-vc6780, hu75-vc0101 y hu75-vc6780 inhibieron el crecimiento de los xenoinjertos 37622A1 NSCLC. Además, los datos muestran que los ADCs anti-Notch inhibieron el crecimiento de tumor de forma más potente que los ADCs huNeg8.8- de control. Además, los datos muestran que los ADCs anti-Notch inhibieron el crecimiento de tumor de modo más potente que el cisplatino indicando una mayor potencia que un fármaco quimioterapéutico de estándar de cuidado en base a platino.

15

Cuadro 11. Eficacia de ADCs anti-Notch en xenoinjertos 37622A1 NSCLC.

	Xenoinjertos 37622A1 NSCLC, volumen de tumor (mm ³ ± SEM)							
	PBS	hu28-vc0101	hu28-vc6780	hu75-vc0101	hu75-vc6780	huNeg-8.8-vc0101	huNeg-8.8-vc6780	Cisplatino
Dosis mg/kg	0	3	10	3	10	3	10	5
DÍA -1	187 ±10	186 ±13	182 ±16	185 ±17	183 ±17	184 ±18	182 ±17	185 ±11
DÍA 4	227 ±19	202 ±16	176 ±13	200 ±16	205 ±23	225 ±17	226 ±26	226 ±15
DÍA 7	279 ±24	202 ±15	176 ±19	227 ±16	195 ±22	274 ±18	265 ±28	280 ±29
DÍA 11	371 ±42	130 ±11	122 ±10	175 ±20	147 ±23	309 ±26	246 ±30	301 ±34
DÍA 14	419 ±49	119 ±11	95 ±7	156 ±19	118 ±18	303 ±26	277 ±41	345 ±47
DÍA 18	516 ±63	71 ±6	65 ±6	112 ±16	93 ±14	298 ±28	219 ±31	309 ±37
DÍA 21	562 ±65	55 ±6	56 ±6	122 ±27	98 ±20	320 ±41	218 ±42	373 ±50
DÍA 25	610 ±78	49 ±6	51 ±6	137 ±33	93 ±24	315 ±52	264 ±52	401 ±58

DÍA 28	624 ±94	41 ±7	51 ±8	161 ±53	99 ±26	358 ±61	246 ±51	446 ±64
DÍA 32	817 ±99	42 ±13	72 ±15	175 ±52	165 ±45	398 ±64	332 ±77	482 ±62
DÍA 35	900 ±104	42 ±11	92 ±21	271 ±79	229 ±59	487 ±79	384 ±94	587 ±80
DÍA 39	960 ±117	62 ±26	120 ±31	319 ±103	294 ±78	569 ±102	431 ±114	591 ±83
DÍA 42	931 ±108	75 ±34	151 ±37	357 ±113	318 ±71	590 ±101	495 ±128	612 ±92
DÍA 46	1037 102	92 ±44	172 ±47	431 ±137	412 ±106	743 ±133	610 ±165	723 ±119
DÍA 49	1119 ±120	120 ±63	248 ±62	519 ±135	521 ±132	810 ±121	718 ±202	853 ±139
DÍA 53	1345 ±158	144 ±67	339 ±93	678 ±195	629 ±162	989 ±146	848 ±251	970 ±193
DÍA 56	1485 ±185	126 ±51	376 ±100	818 ±251	808 ±196	1149 ±191	776 ±184	1215 ±231
DÍA 60	1691 ±220	180 ±85	503 ±138	710 ±162	917 ±209	1287 ±194	964 ±232	1428 ±273
DÍA 63	1736 ±193	223 ±111	604 ±160	824 ±191	917 ±147	1503 ±227	1097 ±254	-
DÍA 67	-	296 ±152	888 ±272	938 ±202	1116 ±173	1600 ±251	1167 ±260	-
DÍA 70	-	312 ±162	773 ±235	953 ±209	1181 ±203	-	1352 ±305	-
DÍA 74	-	331 ±160	881 ±264	-	-	-	-	-
DÍA 77	-	422 ±210	1029 ±325	-	-	-	-	-
DÍA 81	-	510 ±248	-	-	-	-	-	-
DÍA 84	-	622 ±322	-	-	-	-	-	-

B. Xenoinjerto de Pulmón HCC2429

Se efectuaron experimentos *in vivo* similares con la línea celular de cáncer pulmonar HCC2429 como se describió con anterioridad. Para generar xenoinjertos, ratones hembra sin pelo (Nu/Nu) fueron implantados por vía subcutánea con 5 3.5x10⁶ células HCC2429 en 50% Matrigel (BD Biosciences). Cuando los tumores alcanzaron un volumen de 200 hasta 400 mm³, los tumores fueron implantados para asegurar la 10 uniformidad de la masa tumoral entre los diversos grupos de tratamiento. El modelo de pulmón HCC2429 fue dosificado por vía intravenosa Q4dx4 con vehículo PBS, ADCs anti-Notch humanizados y ADCs huNeg-8.8 de control en las dosis que se

proporcionan en los Cuadros 12 y 13. Los datos demuestran que los ADCs anti-Notch hu28-vc0101, hu28-vc6780, hu75-vc0101 y hu75-vc6780 inhibieron el crecimiento de los xenoinjertos de pulmón HCC2429 en una manera dependiente de dosis. Además, los datos

5 muestran que los ADCs anti-Notch inhibieron el crecimiento tumoral de modo más potente que los ADCs huNeg8.8- de control en las dosis de 1 y 3 mg/kg para ADCs anti-Notch con ligador vc0101- cargas útiles y en las dosis de 3 y 10 mg/kg para ADCs anti-Notch con ligador vc6780-cargas útiles. Además, los datos demuestran que

10 una dosis 3mg/kg de hu28-vc0101 fue más potente que una dosis de 10 mg/kg de hu28-vc6780.

Cuadro 12. Eficacia de ADCs anti-Notch-vc0101 en xenoinjertos de pulmón HCC2429.

Xenoinjertos de pulmón HCC2429, volumen de tumor (mm ³ +/- SEM)										
	PBS	hu28-vc0101			hu75-vc0101			huNeg-8.8-vc0101		
Dosis mg/kg	0	3	1	0.3	3	1	0.3	3	1	0.3
DÍA -1	245 ±24	245 ±23	246 ±26	246 ±30	245 ±28	246 ±23	247 ±29	244 ±30	245 ±33	246 ±27
DÍA 1	529 ±52	548 ±52	532 ±36	528 ±50	498 ±39	548 ±37	524 ±66	482 ±59	519 ±72	514 ±50
DÍA 3	742 ±73	606 ±78	757 ±68	733 ±78	498 ±44	753 ±93	713 ±74	695 ±91	756 ±97	724 ±73
DÍA 6	1205 ±120	723 ±101	1095 ±119	1112 ±132	469 ±70	1096 ±146	1078 ±74	1075 ±132	1144 ±100	1207 ±100
DÍA 8	1720 ±181	696 ±100	1324 ±173	1617 ±172	407 ±71	1428 ±200	1499 ±115	1404 ±183	1598 ±133	1683 ±165
DÍA 10	2312 ±197	620 ±90	1606 ±250	2027 ±233	370 ±81	1611 ±189	1830 ±120	1735 ±253	1974 ±185	2163 ±260
DÍA 13	3235 ±120	543 ±92	1717 ±223	2642 ±297	273 ±69	1803 ±208	2408 ±226	2162 ±376	2676 ±346	2589 ±287
DÍA 15	-	512 ±111	1865 ±263	-	298 ±88	1871 ±232	-	-	-	-
DÍA 17	-	442 ±114	2228 ±333	-	250 ±77	1948 ±228	-	-	-	-
DÍA 20	-	428 ±144	-	-	177 ±44	-	-	-	-	-
DÍA 23	-	405 ±149	-	-	160 ±35	-	-	-	-	-
DÍA 27	-	422 ±164	-	-	174 ±51	-	-	-	-	-
DÍA 30	-	394 ±182	-	-	196 ±72	-	-	-	-	-
DÍA 34	-	505 ±236	-	-	295 ±121	-	-	-	-	-
DÍA 37	-	606 ±283	-	-	433 ±179	-	-	-	-	-

DÍA 41	-	750 ±361	-	-	606 ±259	-	-	-	-	-
DÍA 45	-	872 ±415	-	-	836 ±359	-	-	-	-	-
DÍA 49	-	558 ±303	-	-	732 ±350	-	-	-	-	-
DÍA 52	-	571 ±310	-	-	-	-	-	-	-	-
DÍA 56	-	704 ±399	-	-	-	-	-	-	-	-

Cuadro 13. Eficacia de ADCs anti-Notch-vc6780 en xenoinjertos de pulmón HCC2429.

	Xenoinjertos de pulmón HCC2429, volumen de tumor (mm ³ ± SEM)									
	PBS	hu28-vc6780			hu75-vc6780			huNeg-8.8-vc6780		
Dosis mg/kg	0	10	3	1	10	3	1	10	3	1
DÍA -1	245 ±28	244 ±22	245 ±24	245 ±27	244 ±19	246 ±30	245 ±16	244 ±22	244 ±26	245 ±20
DÍA 1	398 ±50	369 ±31	379 ±45	400 ±66	407 ±43	403 ±51	418 ±34	429 ±56	427 ±49	402 ±53
DÍA 3	701 ±102	318 ±31	493 ±65	579 ±113	339 ±36	526 ±74	629 ±65	619 ±62	689 ±83	655 ±97
DÍA 5	949 ±140	228 ±28	609 ±82	826 ±191	251 ±33	615 ±98	916 ±97	808 ±101	965 ±114	837 ±117
DÍA 7	1345 ±200	172 ±22	638 ±86	1023 ±259	225 ±24	615 ±115	1164 ±131	1072 ±154	1380 ±136	1099 ±172
DÍA 10	2045 ±356	143 ±22	784 ±115	1439 ±398	198 ±24	717 ±129	1705 ±184	1452 ±210	2082 ±192	1722 ±363
DÍA 12	-	134 ±20	883 ±132	1442 ±487	166 ±22	807 ±130	2029 ±270	1673 ±290	2701 ±228	1586 ±337
DÍA 14	-	115 ±16	895 ±175	-	150 ±22	831 ±145	2294 ±287	1809 ±314	-	-
DÍA 17	-	127 ±18	1105 ±253	-	158 ±32	1017 ±178	-	-	-	-
DÍA 20	-	149 ±27	1219 ±311	-	164 ±48	1297 ±231	-	-	-	-
DÍA 24	-	206 ±60	1618 ±468	-	261 ±89	1813 ±343	-	-	-	-
DÍA 27	-	290 ±100	-	-	316 ±135	1970 ±462	-	-	-	-
DÍA 31	-	378 ±150	-	-	438 ±201	-	-	-	-	-
DÍA 34	-	551 ±244	-	-	423 ±177	-	-	-	-	-
DÍA 38	-	718 ±332	-	-	504 ±203	-	-	-	-	-
DÍA 42	-	1011 ±504	-	-	655 ±266	-	-	-	-	-
DÍA 46	-	-	-	-	793 ±320	-	-	-	-	-
DÍA 49	-	-	-	-	901 ±351	-	-	-	-	-
DÍA 53	-	-	-	-	1228 ±472	-	-	-	-	-

- 5 El modelo de pulmón HCC2429 también fue dosificado por vía intravenosa Q4dx4 con vehículo PBS, ADCs anti-Notch quiméricos rata-humano y ADCs huNeg-8.8 de control, a una

dosis de 5mg/kg como se proporciona en la Figura 8A. Los datos demuestran que los ADCs anti-Notch con ligadores no escindibles (mc) y escindibles (vc) y varias combinaciones de carga útil inhibieron el crecimiento de xenoinjertos de pulmón HCC2429. Además, los datos muestran que los ADCs anti-Notch quiméricos rata-humano inhibieron el crecimiento de tumor de modo más potente que los ADC huNeg8.8- de control. Además, los datos demuestran que los ADCs anti-Notch quiméricos rata-humano con ligador vc0101- cargas útiles fueron más potentes que los otros ADCs anti-Notch probados.

C. Xenoinjertos de Mama MDA-MB-468

Se efectuaron experimentos in vivo similares con la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-468 como se describió con anterioridad. Las células MDA-MB-468 son clasificadas como un subtipo similar a basal de cáncer de mama triple-negativo (TNBC) ya que carecen de expresión del receptor estrógeno, receptor progesterona y receptor de factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2) (Lehmann, BD, et al, *J Clin Invest.* 2011;121(7):2750–2767). A fin de generar xenoinjertos, ratones hembra SCID No Consanguíneos Sin Pelo (SHO) fueron implantados de manera ortotópica con 10×10^6 células MDA-MB-468 que contienen 50% Matrigel (BD Biosciences) en el pánículo adiposo mamario. Cuando los tumores alcanzaron un volumen de 250 hasta 450 mm³, los tumores fueron implantados para asegurar la uniformidad de la masa

tumoral entre varios grupos de tratamiento. El modelo de mama MDA-MB-468 fue dosificado por vía intravenosa Q4dx4 con vehículo PBS, ADCs anti-Notch humanizados y ADCs huNeg-8.8 de control en las dosis proporcionadas en los Cuadros 14 y 15.

5 Los datos demuestran que los ADCs anti-Notch hu28-vc0101, hu28-vc6780, hu75-vc0101 y hu75-vc6780 inhibieron el crecimiento de xenoinjertos de mama MDA-MB-468 de una manera dependiente de dosis. Además, los datos muestran que los ADCs anti-Notch inhibieron el crecimiento de tumor de

10 manera más potente que los ADCs huNeg8.8 de control en las dosis de 1 y 3 mg/kg para ADCs con ligador vc0101-cargas útiles y dosis de 1, 3 y 10 mg/kg para ADC con ligador vc6780-cargas útiles. Además, los datos demuestran que una dosis de 1 mg/kg de ADCs anti-Notch con ligador vc0101-cargas útiles

15 fueron más potentes que una dosis de 3 mg/kg de ADCs anti-Notch con ligador vc6780-cargas útiles.

Cuadro 14. Eficacia de ADCs anti-Notch-vc0101 en xenoinjertos de mama MDA-MB-468.

	Xenoinjertos de Mama MDA-MB-468, volumen de tumor (mm ³ ± SEM)									
	PBS	hu28-vc0101			hu75-vc0101			huNeg-8.8-vc0101		
Dosis mg/kg	0	3	1	0.3	3	1	0.3	3	1	0.3
DÍA 0	343 ±12	347 ±15	348 ±22	336 ±19	347 ±20	347 ±22	348 ±21	334 ±23	346 ±16	344 ±19
DÍA 4	441 ±24	359 ±24	439 ±21	403 ±28	444 ±28	410 ±32	439 ±31	424 ±29	447 ±32	442 ±19
DÍA 7	469 ±32	326 ±27	415 ±25	395 ±38	338 ±20	383 ±33	435 ±27	411 ±26	449 ±20	438 ±23
DÍA 11	495 ±28	227 ±27	372 ±34	412 ±42	277 ±22	373 ±33	504 ±38	439 ±36	538 ±23	496 ±37
DÍA 14	581 ±35	147 ±20	314 ±27	488 ±45	181 ±19	350 ±40	507 ±30	445 ±29	592 ±47	560 ±36
DÍA 18	639 ±43	77 ±10	261 ±33	497 ±55	90 ±12	296 ±33	587 ±44	479 ±42	619 ±42	578 ±36

DÍA 21	638 ±46	16 ±8	219 ±41	509 ±60	60 ±9	260 ±49	590 ±55	481 ±34	676 ±46	627 ±30
DÍA 26	707 ±41	0 ±0	253 ±61	590 ±66	16 ±10	267 ±59	652 ±64	548 ±41	793 ±54	671 ±56
DÍA 29	749 ±59	0 ±0	238 ±64	-	8 ±8	261 ±62	675 ±63	-	819 ±73	669 ±37
DÍA 32	812 ±80	0 ±0	266 ±67	-	7 ±7	264 ±67	738 ±70	-	913 ±72	758 ±44
DÍA 35	891 ±79	0 ±0	271 ±73	-	0 ±0	326 ±86	821 ±69	-	1023 ±96	848 ±58
DÍA 39	892 ±84	0 ±0	310 ±88	-	0 ±0	324 ±81	864 ±74	-	-	884 ±64
DÍA 42	1037 ±104	0 ±0	349 ±95	-	0 ±0	381 ±94	997 ±84	-	-	1002 ±55
DÍA 47	1173 ±134	0 ±0	394 ±123	-	0 ±0	442 ±69	-	-	-	1145 ±78
DÍA 50	-	0 ±0	377 ±118	-	0 ±0	484 ±89	-	-	-	1120 ±67
DÍA 53	-	0 ±0	414 ±127	-	0 ±0	452 ±78	-	-	-	1229 ±100
DÍA 56	-	0 ±0	470 ±128	-	0 ±0	535 ±93	-	-	-	1314 ±120
DÍA 60	-	0 ±0	532 ±140	-	0 ±0	603 ±98	-	-	-	-
DÍA 63	-	0 ±0	509 ±117	-	0 ±0	-	-	-	-	-
DÍA 67	-	0 ±0	611 ±148	-	0 ±0	-	-	-	-	-
DÍA 70	-	0 ±0	-	-	0 ±0	-	-	-	-	-

Table 15. Eficacia de ADCs anti-Notch-vc6780 en xenoinjertos de mama MDA-MB-468.

		Xenoinjertos de Mama MDA-MB-468, volumen de tumor (mm ³ ± SEM)								
	PBS	hu28-vc6780			hu75-vc6780			huNeg-8.8-vc6780		
Dosis mg/kg	0	10	3	1	10	3	1	10	3	1
DÍA 0	342 ±9	335 ±9	342 ±18	342 ±16	343 ±10	344 ±11	340 ±14	339 ±18	341 ±12	346 ±16
DÍA 4	466 ±20	395 ±19	394 ±33	462 ±22	418 ±15	406 ±22	423 ±27	432 ±45	457 ±23	466 ±29
DÍA 7	481 ±17	350 ±19	399 ±24	452 ±30	370 ±18	378 ±21	434 ±29	449 ±45	529 ±24	528 ±25
DÍA 11	611 ±44	248 ±26	380 ±25	512 ±35	302 ±21	403 ±21	471 ±39	504 ±38	599 ±23	621 ±43
DÍA 14	610 ±19	154 ±23	401 ±30	507 ±38	228 ±19	370 ±28	470 ±44	503 ±64	622 ±31	639 ±48
DÍA 19	707 ±34	65 ±17	438 ±39	538 ±47	112 ±23	339 ±19	536 ±49	437 ±54	697 ±36	713 ±48
DÍA 22	-	25 ±16	414 ±41	551 ±48	52 ±21	360 ±17	552 ±44	415 ±54	-	-
DÍA 25	-	26 ±19	491 ±37	575 ±55	63 ±25	381 ±23	597 ±48	421 ±76	-	-
DÍA 28	-	15 ±15	497 ±68	654 ±74	64 ±26	443 ±33	660 ±53	451 ±84	-	-
DÍA 32	-	0 ±0	524 ±69	653 ±82	71 ±31	437 ±28	634 ±74	456 ±94	-	-
DÍA 35	-	0 ±0	-	734 ±89	85 ±38	495 ±33	742 ±80	541 ±108	-	-
DÍA 40	-	0 ±0	-	761 ±99	125 ±44	535 ±41	794 ±87	563 ±109	-	-

DÍA 43	-	0 ±0	-	816 ±122	134 ±42	619 ±47	878 ±78	581 ±120	-	-
DÍA 46	-	0 ±0	-	859 ±126	143 ±42	636 ±38	868 ±99	617 ±116	-	-
DÍA 49	-	0 ±0	-	948 ±178	159 ±44	723 ±71	996 ±109	733 ±129	-	-
DÍA 53	-	0 ±0	-	1008 ±192	201 ±63	795 ±67	-	758 ±163	-	-
DÍA 56	-	0 ±0	-	-	211 ±63	819 ±77	-	-	-	-
DÍA 60	-	0 ±0	-	-	240 ±63	976 ±115	-	-	-	-
DÍA 63	-	0 ±0	-	-	201 ±57	-	-	-	-	-

El modelo de mama MDA-MB-468 también fue dosificado por vía intravenosa Q4dx4 con vehículo PBS, ADCs anti-Notch quiméricos rata-humano y ADCs huNeg-8.8 de control, a una

5 dosis de 5mg/kg como se proporciona en las Figuras 8B y 8C. Los datos demuestran que los ADCs anti-Notch quiméricos rata-humano con ligadores no-escindibles (mc) y escindibles (vc) y varias combinaciones de cargas útiles inhibieron el crecimiento de xenoinjertos de mama MDA-MB-468. Además, los datos

10 muestran que los ADCs anti-Notch quiméricos rata-humano inhibieron el crecimiento de tumor de modo más potente que los ADCs huNeg8.8- de control. Además, los datos demuestran que los ADCs anti-Notch quiméricos rata-humano con ligador vc0101-cargas útiles fueron más potentes que los otros ADCs

15 anti-Notch quiméricos rata-humano probados.

D. Xenoinjertos Gástricos N87

Se efectuaron experimentos in vivo similares con la línea celular de cáncer gástrico N87 como se describió con

20 anterioridad. A fin de generar xenoinjertos, ratones hembra sin

pelo (Nu/Nu) fueron implantados por vía subcutánea con 7.5×10^6 células N87 en 50% Matrigel (BD Biosciences). Cuando los tumores alcanzaron un volumen de 250 hasta 450 mm³, los tumores fueron implantados para asegurar la uniformidad de la masa tumoral entre
5 varios grupos de tratamiento. El modelo gástrico N87 fue dosificado por vía intravenosa Q4dx4 con vehículo PBS, ADCs anti-Notch humanizados, ADCs huNeg-8.8 de control y cisplatino en las dosis proporcionadas en los Cuadros 16 y 17. Los datos demuestran que los ADCs anti-Notch hu28-vc0101, hu28-vc6780, hu75-vc0101 y
10 hu75-vc6780 inhibieron el crecimiento de xenoinjertos gástricos N87 de una manera dependiente de dosis. Además, los datos demuestran que los ADCs anti-Notch inhibieron el crecimiento de tumor de modo más potente que los ADCs huNeg8.8- de control en las dosis de 1, 3, 5 mg/kg para ADCs con ligador vc0101-cargas útiles y dosis de 3 y
15 10 mg/kg dosis para ADCs con ligador vc6780-cargas útiles. Además, los datos muestran que los ADCs con ligador vc0101-cargas útiles fueron en general más potentes que la terapia estándar de cuidado con cisplatino y los ADCs con ligador vc6780-cargas útiles.

20

25

Cuadro 16. Eficacia de ADCs anti-Notch-vc0101 en xenoinjertos gástricos N87.

	Xenoinjertos Gástricos N87, volumen de tumor (mm ³ ± SEM)										
	PBS	hu28-vc0101			hu75-vc0101			huNeg-8.8-vc0101			Cisplatino
Dosis mg/kg	0	1	3	5	1	3	5	1	3	5	5
DÍA 0	327 ±11	321 ±21	326 ±13	321 ±8	321 ±9	324 ±19	320 ±11	327 ±18	324 ±11	321 ±16	328 ±20
DÍA 4	526 ±19	369 ±18	339 ±11	344 ±14	392 ±15	362 ±35	315 ±15	437 ±34	478 ±19	423 ±32	414 ±27
DÍA 7	706 ±27	429 ±43	302 ±10	272 ±7	417 ±25	303 ±21	246 ±12	584 ±54	625 ±34	512 ±34	520 ±26
DÍA 11	854 ±36	304 ±30	182 ±14	152 ±13	331 ±21	174 ±14	156 ±10	702 ±60	716 ±53	501 ±38	501 ±29
DÍA 14	887 ±45	282 ±25	191 ±5	155 ±13	305 ±17	172 ±10	151 ±7	822 ±65	823 ±42	549 ±37	637 ±31
DÍA 18	1045 ±68	263 ±24	161 ±7	138 ±11	267 ±17	151 ±10	128 ±6	823 ±73	789 ±33	491 ±51	-
DÍA 21	1072 ±76	227 ±23	123 ±15	110 ±9	218 ±23	130 ±5	115 ±7	857 ±78	785 ±35	413 ±50	-
DÍA 26	1303 ±140	205 ±32	108 ±16	69 ±16	185 ±24	92 ±14	82 ±10	895 ±126	825 ±62	343 ±63	-
DÍA 29	1276 ±139	180 ±30	99 ±14	50 ±13	211 ±37	104 ±16	75 ±12	957 ±126	879 ±72	411 ±89	-
DÍA 33	1480 ±183	211 ±43	106 ±17	43 ±14	251 ±53	91 ±18	73 ±12	988 ±180	966 ±98	411 ±89	-
DÍA 36	-	215 ±42	122 ±22	52 ±16	272 ±59	86 ±18	85 ±9	884 ±143	1023 ±106	481 ±86	-
DÍA 39	-	261 ±54	128 ±23	45 ±14	304 ±72	59 ±16	72 ±13	937 ±167	1142 ±121	535 ±128	-
DÍA 42	-	283 ±52	149 ±25	34 ±15	314 ±73	81 ±22	74 ±13	1008 ±179	1240 ±143	596 ±119	-
DÍA 47	-	262 ±64	105 ±19	25 ±14	334 ±95	80 ±25	36 ±8	1061 ±210	1380 ±153	621 ±137	-
DÍA 53	-	302 ±75	104 ±30	29 ±16	393 ±115	86 ±24	69 ±13	-	-	757 ±189	-
DÍA 62	-	415 ±111	116 ±47	33 ±18	463 ±155	106 ±35	50 ±15	-	-	690 ±122	-
DÍA 70	-	521 ±135	139 ±54	58 ±30	658 ±241	148 ±54	76 ±22	-	-	852 ±150	-

5 **Cuadro 17.** Eficacia de ADCs anti-Notch-vc6780 en xenoinjertos gástricos N87.

	Xenoinjertos Gástricos N87, volumen de tumor (mm ³ ± SEM)								
	PBS	hu28-vc6780			hu75-vc6780			huNeg8.8-vc6780	
Dosis mg/kg	0	10	3	1	10	3	1	10	3
DÍA 0	345 ±14	350 ±14	349 ±10	348 ±13	349 ±8	351 ±20	359 ±16	356 ±20	344 ±14
DÍA 4	600 ±16	434 ±24	552 ±24	560 ±26	468 ±18	545 ±37	552 ±40	581 ±60	537 ±36
DÍA 8	675 ±20	379 ±12	545 ±37	592 ±44	351 ±24	511 ±31	568 ±62	605 ±67	670 ±45
DÍA 11	763 ±54	315 ±18	511 ±25	617 ±48	316 ±25	544 ±43	591 ±63	636 ±79	706 ±38

DÍA 14	886 ±72	292 ±24	564 ±29	782 ±60	269 ±27	558 ±36	666 ±77	775 ±117	917 ±36
DÍA 18	997 ±93	199 ±18	479 ±29	797 ±88	224 ±26	494 ±41	642 ±90	665 ±112	958 ±57
DÍA 21	1041 ±107	194 ±20	499 ±34	839 ±93	192 ±19	534 ±41	710 ±117	637 ±119	1002 ±59
DÍA 25	1151 ±144	181 ±21	588 ±40	878 ±105	227 ±32	628 ±58	748 ±138	647 ±134	1075 ±82
DÍA 28	1200 ±155	204 ±16	672 ±48	904 ±123	244 ±35	645 ±57	763 ±145	674 ±146	1148 ±77
DÍA 33	1481 ±206	196 ±27	786 ±65	1043 ±152	267 ±52	730 ±66	991 ±239	733 ±195	1290 ±128
DÍA 36	-	189 ±37	827 ±69	1108 ±185	300 ±64	850 ±74	-	817 ±222	1265 ±111
DÍA 39	-	228 ±44	847 ±77	1204 ±209	323 ±69	881 ±88	-	880 ±247	1429 ±121
DÍA 42	-	257 ±60	959 ±81	-	350 ±78	1020 ±99	-	797 ±244	-
DÍA 46	-	253 ±59	1018 ±94	-	380 ±78	1097 ±129	-	874 ±267	-
DÍA 50	-	253 ±67	1111 ±95	-	415 ±77	1162 ±134	-	-	-
DÍA 56	-	298 ±85	1279 ±108	-	504 ±111	1331 ±187	-	-	-
DÍA 63	-	345 ±93	1368 ±133	-	581 ±121	-	-	-	-
DÍA 70	-	376 ±117	1483 ±154	-	726 ±163	-	-	-	-
DÍA 77	-	388 ±123	-	-	797 ±184	-	-	-	-

El modelo gástrico N87 fue dosificado también por vía intravenosa Q4dx4 con vehículo PBS, ADCs anti-Notch quiméricos rata-humano y ADCs huNeg-8.8 de control, a una dosis de 5mg/kg como se proporciona en la Figura 8D. Los datos demuestran que ADCs anti-Notch quimérico rata-humano con ligadores no escindibles (mc) y escindibles (vc) y varias combinaciones de carga útil inhibieron el crecimiento de xenoinjertos gástricos N87. Además, los datos muestran que los ADCs anti-Notch quiméricos rata-humano inhibieron el crecimiento de tumor de modo más potente que los ADCs huNeg8.8 de control. Además, los datos muestran que los ADCs anti-Notch quiméricos rata-humano con ligador vc0101-cargas útiles fueron más potentes que los otros ADCs anti-Notch ADCs probados.

El modelo gástrico N87 también fue dosificado por vía intravenosa Q4dx4 con vehículo PBS y ADCs anti-Notch quiméricos rata-humano ch28-mc0131, ch75-mc0131, ch28-m(H2O)c-0131 y ch75-m(H2O)c-0131 a una dosis de 5mg/kg como se proporciona en la Figura 8E. Los datos demuestran que los ADCs anti-Notch quiméricos rata-humano que tienen ligador mc0131 y m(H2O)c-0131-cargas útiles inhibieron el crecimiento de xenoinjertos gástricos N87. Además, los datos demuestran que los ADCs anti-Notch quiméricos rata-humano que tienen ligador m(H2O)c-0131-cargas útiles fueron más potentes que los ADCs anti-Notch quiméricos rata-humano que tienen ligador mc0131-cargas útiles.

Cuadro 18A – Compuestos seleccionados (péptidos citotóxicos con ligadores) de la invención

Ligador-Carga Útil#	Método de Preparación	Método de Purificación	Cantidad en mg (Rendimiento)
mcValCitPABC-#34	Procedimiento general E	Método D	4.7 (12%)
MalPeg3C2-#41	Procedimiento general D	Método C	36 (28%)
MalPeg6C2-#42	Procedimiento general D	Método C	125 (88%)
mc-#44	Procedimiento general D	Método C	5.9 (25%)
MalPeg3C2-#44	Procedimiento general D	Método C	10 (28%)
MalPeg6C2-#44	Procedimiento general D	Método C	1.8 (6%)
MalValCitPABC-#44	Procedimiento general E	Método F	4 (10%)
mc-#45	Procedimiento general D	Método C	12.8 (53 %)
MalPeg3C2-#45	Procedimiento general D	Método C	7.5 (28%)
MalPeg6C2-#45	Procedimiento general D	Método E1*	13.6 (45%)
mcValCitPABC-#45	Procedimiento general E	Método C & Método E1	5.8 (15%)
mcValCitPABC-#54	Procedimiento general E	Método D	33 (36%)

mc-#69	Procedimiento general D	Método C	30.2 (24%)
MalPeg6C2-#69	Procedimiento general D	Método C	3.6 (13%)
mcValCitPABC-#69	Procedimiento general E	Método I	51 (9%)
mcValCitPABC-#70	Procedimiento general E	Método D	6.9 (12%)
mcValCitPABC-#75	Procedimiento general E	Método H	5.3 (14%)
mc-#79	Procedimiento general D	Método E	5.6 (19%)
mcValCitPABC-#79	Procedimiento general E	Método D	5.5 (10%)
mcValCitPABC-#92	Procedimiento general E	Método E	9.5 (26%)
mcValCitPABC-#112	Procedimiento general E	Método C	11.8 (21%)
mv-#115	Procedimiento general D	Método J	1.4 (3.3%)
mc-#115	-	Método L	124 (11%)
mb-#115	Procedimiento general D	-	-
me-#115	Procedimiento general D	-	-
mcValCitPABC-#115	Procedimiento general E	Método K	4.9 (12%)
mc-#51	Procedimiento general D	Método E1	5.5 (42 %)
mc-#47	Procedimiento general D	Método E1	8.4 (46%)
mc-#54	Procedimiento general D	Método E1	12.9 (65%)
mcValCitPABC-#47	Procedimiento general E	Método E1	3.3 (20%)
mcValCitPABC-#26	Procedimiento general E	Método E1	2.3 (20%)
mc-#26	Procedimiento general D	Método E1	5.4 (10%)
mcValCitPABC-#42	Procedimiento general E	Método E1	10.8 (38%)
mcValCitPABC-#36	Procedimiento general E	Método E1	12.6 (32%)
mc-#42	Procedimiento general D	Método E1	7.1 (83%)
AmPeg6C2-#54	Procedimiento general N	Método J	44 (67%)
MalPeg3C2-#54	Procedimiento general D	Método J	19 (69%)
mcValCitPABCAmPeg6C2-#54	Procedimiento general O	Método J	12 (42%)
mcValCitPABCAmPeg3C2-#54	Procedimiento general O	Método J	12.4 (30%)
MalPeg3C2-#47	Procedimiento general D	Método J*	19 (62%)
AmPeg6C2-#47	Procedimiento general N	Método J	50 (77%)
mcValCitPABCAmPeg3C2-#47	Procedimiento general O	Método J	6.4 (18%)
mcValCitPABCAmPeg6C2-#47	Procedimiento general O	Método J	18 (50%)
MalPeg3C2-#42	Procedimiento general D	Método J	22 (70%)
AmPeg6C2-#42	Procedimiento general N	Método J	53 (75%)
mcValCitPABCAmPeg6C2-#42	Procedimiento general O	Método J	15.4 (43%)

mcValCitPABCAmPeg3C2-#42	Procedimiento general O	Método J*	12 (26%)
MalPeg3C2-#26	Procedimiento general D	Método J*	13.8 (51%)
mc-#41	Procedimiento general D	Método J*	9.6 (38%)
AmPeg6C2-#26	Procedimiento general N	Método J	59 (87%)
mcValCitPABCAmPeg3C2-#26	Procedimiento general O	Método J	23.4 (45%)
MalPeg3C2ValCitPABC-#26	Procedimiento general P	Método J	16 (42%)
mcValCitPABCAmPeg6C2-#26	Procedimiento general O	Método J	15 (38%)
mc-#36	Procedimiento general D	Método J*	26 (80%)
MalPeg6C2-#54	Procedimiento general D	Método J	27 (67%)
MalPeg3C2ValCitPABC-#47	Procedimiento general P	Método J	17 (49%)
MalPeg3C2-#36	Procedimiento general D	Método J*	9.2 (33%)
MalPeg6C2-#47	Procedimiento general D	Método J*	24 (78%)
MalPeg6C2-#26	Procedimiento general D	Método J*	29 (75%)
MalPeg6C2-#36	Procedimiento general D	Método J	18 (58%)
mcValCitPABCAmPeg3C2-#36	Procedimiento general O	Método J	16 (51%)
AmPeg6C2-#36	Procedimiento general N	Método J	51 (78%)
mcValCitPABC-#60	Procedimiento general E	Método J	1.9 (4.3%)
mcValCitPABCAmPeg6C2-#36	Procedimiento general O	Método J	11.6 (35%)
mcValCitPABCAmPeg3C2-#41	Procedimiento general O	Método J	5.7 (26%)
MalPeg6C2-#60	Procedimiento general D	Método J	24 (75%)
AmPeg6C2-#60	Procedimiento general N	Método J	31 (80%)
MalPeg3C2-#60	Procedimiento general D	Método J	17.3 (58%)
MalPeg6C2-#41	Procedimiento general D	Método J con AcOH como modificador	11 (28%)
AmPeg6C2-#66	Procedimiento general N	Método J	5 (10%)
mcValCitPABCAmPeg6C2-#60	Procedimiento general O	Método J	12 (34%)
mc-#70	Procedimiento general D	Método J*	11.2 (46%)
2AcAmPeg6C2-#66	Procedimiento general Q	Método J	8 (60%)
mc-#66	Procedimiento general D	Método J con AcOH como modificador	8.2 (32%)
mcValCitPABC-#88	Procedimiento general E	Método J	7.9 (45%)
mcValCitPABC-#88	Procedimiento general E	Método J	7.5 (39%)
mc-#92	Procedimiento general D	Método F	15 (66%)
mcValCitPABC-#44	Procedimiento general E	Método F	1.6 (4%)
mc-#108	Procedimiento general D	Método H sin modificador	8.8 (37%)

mcValCitPABC-#108	Procedimiento general E	Método F	6.1 (14%)
NHSCOPEG2C2ValCitPABC-#66	Procedimiento general X2	Método F*	6.8 (32%)
mcValCitPABC-#98	Procedimiento general E	Método J*	4.8 (11%)
mcValCitPABC-#95	Procedimiento general E	Método J*	13 (28%)
MalPeg3C2-#69	Procedimiento general D	Método K	12.8 (35%)
AmPeg6C2-#69	Procedimiento general N	Método J*	71 (69%)
mcValCitPABC-#84	Procedimiento general E	Método J*	4.9 (11%)
AmCapValCitPABC-#54	Procedimiento general R	Método K*	97 (53%)
mcValCitPABC-#226	Procedimiento general E	Método J*	7.1 (16%)
mcValCitPABC-#117	Procedimiento general E	Método J*	15.8 (36%)
MalPeg6C2-#98	Procedimiento general D	Método I*	7.4 (22%)
mcValCitPABC-#118	Procedimiento general E	Método J*	11.7 (29%)
mcValCitPABC-#80	Procedimiento general E	Método J*	3.8 (12%)
MalPeg6C2-#118	Procedimiento general D	Método J*	11 (4.5%)
MalPeg6C2-#230	Procedimiento general D	Método H	2.8 (8%)
mcValCitPABC-#232	Procedimiento general E	Método J*	13.6 (29%)
mc-#117	Procedimiento general D	Método J*	9.5 (40%)
MalPeg6C2-#117	Procedimiento general D	Método K*	2.3 (8%)
mv-#69	Procedimiento general D	Método J*	22 (49%)
mb-#69	Procedimiento general D	Método J*	12 (28%)
AmPeg6C2-#234	Procedimiento general N	Método J*	16 (52%)
AmPeg6C2-#235	Procedimiento general N	Método J*	16.5 (70%)
mc-#118	Procedimiento general D	Método J*	41 (38%)
MalPeg6C2-#123	Procedimiento general D	Método J*	85 (40%)
mc-#226	Procedimiento general D	cromatografía en gel de sílice	290 (40%)
me-#118	Procedimiento general D	Método J*	16.2 (42%)
mc-#131	Procedimiento general D	Método J*	16.3 (51%)
mb-#118	Procedimiento general D	Método J*	7.9 (23%)
mcValCitPABC-#134	Procedimiento general E	Método J*	17 (33%)
mc-#145	Procedimiento general D	Método K	6 (20%)
MalPeg6C2-#126	Procedimiento general D	Método J*	16.4 (26%)
mc-#126	Procedimiento general D	Método K*	16.3 (32%)
mv-#118	Procedimiento general D	Método J*	11.7 (34%)
mc-#172	Procedimiento general D	Método J*	10 (56%)

MalPeg6C2-#226	Procedimiento general D	Método K*	15 (10%)
MalPeg6C2-#145	Procedimiento general D	Método K	1.8 (3.7%)
mc-#162	Procedimiento general D	Método H* sin modificador	1.2 (3.1%)
mc-#163	Procedimiento general D	Método K*	9.9 (26%)
mcValCitPABC-#231	Procedimiento general E	Método J*	0.2 (4%)
MalPeg6C2-#238	Procedimiento general D	cromatografía en gel de sílice	240 (77%)
MalPeg6C2-#239	Procedimiento general D	Cromatografía C18 de presión media	104 (39%)
mc-#123	Procedimiento general D	cromatografía en gel de sílice	345 (quant.)
MalC6-#54	Procedimiento general S	Método J*	16.3 (30%)
mc-#231	Procedimiento general D	Método J*	10 (60%)
MalC6-#118	Procedimiento general S	Método J*	5.3 (10%)
mcValCitPABC-#123	Procedimiento general E	cromatografía en gel de sílice	179 (60%)
mc-#237	Procedimiento general D	Método J*	12.6 (47%)
mc-#158	Procedimiento general D	Método J*	7.1 (28%)
MalC6Am-#151	Procedimiento general D	Método J*	18.4 (86%)
PFPCOPeg2C2 ValCitPABC-#54	Procedimiento general X3	Método J* AcOH como modificador	70 (68%)
mcValCitPABC-#154	Procedimiento general E	cromatografía C18 de presión media	10 (19%)
MalC6Am-#153	Procedimiento general D	Método K*	18.7 (47%)
PFPCOPeg2C2AmPeg2C2-#69	Procedimiento general X4	Método R*	40 (64%)
mcValCitPABC-#246	Procedimiento general E	cromatografía C18 de presión media	21 (45%)
PFPCOPeg2C2AlaAlaAsnPABC-#54	Procedimiento general X1	Método R*	16.8 (54%)
PFPCOPeg2C2-#54	Procedimiento general V	Método R*	4.1 (56%)
PFPCOPeg2C2AmPeg2C2PABC-#54	Procedimiento general W	Método R*	1.1 (39%)
AmPeg6C2-#115	Procedimiento general N	Método J*	100 (48%)
PFPCOPeg5C2-#115	Procedimiento general V	Método J*	29 (26%)
mcGly-#201	-	cromatografía en gel de sílice	25 (16.2%)
AzCOC2Ph4AmCOPeg2C2-#54	Procedimiento general T	Método R*	3.5 (52%)
AzCOC2Ph4AmPeg1C1ValCitPABC-#54	Procedimiento general U	Método R*	93 (43%)
AzCOC2Ph4AmPeg1C1ValCitPABC-#30	Procedimiento general U	Método R*	1.7 (42%)
AzCOC2Ph4AmCOPeg2C2-#69	Procedimiento general T	Método R*	88 (62%)
AzCOC2Ph4AmCOPeg2C2-#115	Procedimiento general T	Método R*	75 (82%)
AcLysValCitPABC-#54	Procedimiento general X5	Método J*	86 (40%)

Cuadro 18B – Compuestos seleccionados (péptidos citotóxicos con ligadores) de la invención

ligador con carga útil #	Espectro de masa: LC-MS o HPLC observado m/z y tiempo de retención en minutos: ESI-MS	Nombre IUPAC
mcValCitPABC-#34	HPLC (Protocolo M): 1380.6 [M+Na ⁺], (12.899 minutos)	N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]-L-valil-N-{4-[(8S,11S,12R)-11-[(2S)-butan-2-il]-12-(2-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}-3-tioxopropil]pirrolidin-1-il}-2-oxoetil)-5,5,10-trimetil-3,6,9-trioxo-8-(propan-2-il)-2,13-dioxa-4,7,10-triazatetradec-1-il]fenil}-N ⁵ -carbamoil-L-ornitinamida
MalPeg3C2-#41	LC-MS: 1031.7 [M+H ⁺], 1054.8 [M+Na ⁺] (0.88 minutos); HPLC (Protocolo D): 10.559 minutos	N-[3-(2-{2-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi]ethoxi}ethoxi)propanoil]-N-Metil-L-valil-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1S)-1-carboxi-2-feniletil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-tioxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida
MalPeg6C2-#42	LC-MS: 1178.2 [M+H ⁺], 1197.4 [M+Na ⁺] (3.50 minutos); HPLC (Protocolo Q): 25.235 minutos	N-[1-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-21-oxo-3,6,9,12,15,18-hexaaxahenicosan-21-il]-N-Metil-L-valil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-3-[(2S)-1-metoxi-1-oxo-3-fenilpropan-2-il]amino}-2-metil-3-tioxopropil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida
mc-#44	LC-MS: 913.7 [M+H ⁺] (0.85 minutos); HRMS: Calc: 913.5103 [M+H ⁺], Obsd: 913.5103.	N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]-2-Metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1S)-1-carboxi-2-feniletil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-tioxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptaN-4-il]-N-metil-L-valinamida
MalPeg3C2-#44	LC-MS: 1003.8 [M+H ⁺](0.82 minutos); HPLC (Protocolo A): 1003.5 [M+H ⁺], 1026.4 [M+Na ⁺] (9.095 minutos)	N-[3-(2-{2-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi]ethoxi}ethoxi)propanoil]-2-Metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1S)-1-carboxi-2-feniletil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-tioxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida
MalPeg6C2-#44	LC-MS: 1135.8 [M+H ⁺] (0.83 minutos)	N-[1-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-21-oxo-3,6,9,12,15,18-hexaaxahenicosan-21-il]-2-Metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1S)-1-carboxi-2-feniletil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-tioxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida

MalValCitPABC-#44	LC-MS: 1318.9 [M+H ⁺] (0.89 minutos); HPLC (Protocolo A): 1319.6 [M+H ⁺], 1342.6 [M+Na ⁺] (9.132 minutos)	N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]-L-valil-N-{4-[(8S,11S,12R)-11-[(2S)-butan-2-il]-12-(2-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-[[[(1S)-1-carboxi-2-feniletil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-tioxopropil]pirrolidin-1-il}-2-oxoetil)-5,5,10-trimetil-3,6,9-trioxo-8-(propan-2-il)-2,13-dioxa-4,7,10-triazatetradec-1-il]fenil}-N ⁵ -carbamoil-L-ornitinamida
mc-#45	LC-MS: 927.7 [M+H ⁺] (0.92 minutos); HRMS: Calc: 927.5260 [M+H ⁺], Obsd: 927.5259.	N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]-2-Metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-3-[[[(2S)-1-metoxi-1-oxo-3-fenilpropan-2-il]amino}-2-metil-3-tioxopropil]pirrolidin-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida
MalPeg3C2-#45	LC-MS: 1017.8 [M+H ⁺] (0.90 minutos);	N-[3-(2-{2-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi]ethoxi]ethoxi)propanoil]-2-Metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-3-[[[(2S)-1-metoxi-1-oxo-3-fenilpropan-2-il]amino}-2-metil-3-tioxopropil]pirrolidin-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida
MalPeg6C2-#45	LC-MS: 1149.9 [M+H ⁺] (0.90 minutos); HPLC (Protocolo A at 45°C): 1150.5 [M+H ⁺], 1171.5[M+Na ⁺] (9.788 minutos)	N-[1-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-21-oxo-3,6,9,12,15,18-hexaoxahenicosan-21-il]-2-Metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-3-[[[(2S)-1-metoxi-1-oxo-3-fenilpropan-2-il]amino}-2-metil-3-tioxopropil]pirrolidin-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida
mcValCitPABC-#45	LC-MS: 1332.8 [M+H ⁺] (1.86 minutos); HPLC (Protocolo A at 45°C): 1333.6 [M+H ⁺] (9.737 minutos)	N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]-L-valil-N-{4-[(8S,11S,12R)-11-[(2S)-butan-2-il]-12-(2-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-3-[[[(2S)-1-metoxi-1-oxo-3-fenilpropan-2-il]amino}-2-metil-3-tioxopropil]pirrolidin-1-il]-2-oxoetil)-5,5,10-trimetil-3,6,9-trioxo-8-(propan-2-il)-2,13-dioxa-4,7,10-triazatetradec-1-il]fenil}-N ⁵ -carbamoil-L-ornitinamida
mcValCitPABC-#54	HPLC (Protocolo A at 45°C): 1342.6 [M+H ⁺] (9.114 minutos).	N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]-L-valil-N-{4-[(8S,11S,12R)-11-[(2S)-butan-2-il]-12-(2-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[[[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}propil]pirrolidin-1-il]-2-oxoetil)-5,5,10-trimetil-3,6,9-trioxo-8-(propan-2-il)-2,13-dioxa-4,7,10-triazatetradec-1-il]fenil}-N ⁵ -carbamoil-L-ornitinamida
mc-#69	LC-MS: 897.7 [M+H ⁺], 919.7 (0.81 minutos); HPLC (Protocolo A at 45°C): 897.5 [M+H ⁺] (9.058 minutos)	N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]-2-Metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-[[[(1S)-1-carboxi-2-feniletil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il]-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida

MalPeg6C2-#69	HPLC (Protocolo A at 45°C): 1120.6 [M+H ⁺], 1142.5 (9.076 minutos)	N-[1-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)- 21-oxo-3,6,9,12,15,18-hexaaxahenicosan- 21-il]-2-Metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)- 2-[(1R,2R)-3-{[(1S)-1-carboxi-2- feniletil]amino}-1-metoxi-2-metil-3- oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil- 1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida
mcValCitPABC-#69	HPLC (Protocolo M): 1326.6 [M+Na ⁺] (11.962 minutos)	N-[3-(2-{2-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H- pirrol-1-il)etoxi]ethoxi}ethoxi)propanoil]- N-Metil-L-valil-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2- [(1R,2R)-3-{[(1S)-1-carboxi-2- feniletil]amino}-1-metoxi-2-metil-3- oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil- 1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida
mcValCitPABC-#70	HPLC (Protocolo A at 45°C): 1317.6 [M+H ⁺] (9.282 minutos)	N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1- il)hexanoil]-L-valil-N-{4-[(8S,11S,12R)-11- [(2S)-butan-2-il]-12-(2-{(2S)-2-[(1R,2R)-1- metoxi-3-{[(2S)-1-metoxi-1-oxo-3- fenilpropan-2-il]amino}-2-metil-3- oxopropil]pirrolidin-1-il}-2-oxoetil)-5,5,10- trimetil-3,6,9-trioxo-8-(propan-2-il)-2,13- dioxo-4,7,10-triazatetradec-1-il]fenil}-N ⁵ - carbamoil-L-ornitinamida
mcValCitPABC-#75	LC-MS: 1273.9 [M+H ⁺] (0.82 minutos); HPLC (Protocolo A at 45°C): 1273.6 [M+H ⁺], (8.814 minutos)	N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1- il)hexanoil]-L-valil-N ⁵ -carbamoil-N-{4- [({3-({(2S)-1-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1- (2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3- (2-feniletil)amino]propil]pirrolidin-1-il}-5- metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino}-3- metil-1-oxobutan-2-il}carbamoil)oxetan-3- il]carbamoil}oxi)metil]fenil}-L-ornitinamida
mc-#79	HPLC (Protocolo A at 45°C): 941.5 [M+H ⁺], 963.4 [M+Na ⁺] (10.444 minutos)	N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1- il)hexanoil]-N,2-Dimetilalanil-N- [(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{(2S)-2-[(1R,2R)- 1-metoxi-3-{[(2S)-1-metoxi-1-oxo-3- fenilpropan-2-il]amino}-2-metil-3- tioxopropil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1- oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida
mcValCitPABC-#79	HPLC (Protocolo A): 1346.6 [M+H ⁺], (9.807 minutos)	N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1- il)hexanoil]-L-valil-N-{4-[(8S,11S,12R)-11- [(2S)-butan-2-il]-12-(2-{(2S)-2-[(1R,2R)-1- metoxi-3-{[(2S)-1-metoxi-1-oxo-3- fenilpropan-2-il]amino}-2-metil-3- tioxopropil]pirrolidin-1-il}-2-oxoetil)- 4,5,5,10-tetrametil-3,6,9-trioxo-8-(propan- 2-il)-2,13-dioxo-4,7,10-triazatetradec-1- il]fenil}-N ⁵ -carbamoil-L-ornitinamida
mcValCitPABC-#92	LC-MS: 1282.6 [M+H ⁺] (0.79 minutos); HPLC (Protocolo A at 45°C): 1282.6 [M+H ⁺] (7.953 minutos)	N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1- il)hexanoil]-L-valil-N-{4-[(8S,11S,12R)-11- [(2S)-butan-2-il]-12-(2-{(2S)-2-[(1R,2R)-1- metoxi-2-metil-3-oxo-3-(quinolin-6- ilamino)propil]pirrolidin-1-il}-2-oxoetil)- 5,5,10-trimetil-3,6,9-trioxo-8-(propan-2- il)-2,13-dioxo-4,7,10-triazatetradec-1- il]fenil}-N ⁵ -carbamoil-L-ornitinamida
mcValCitPABC-#112	HPLC (Protocolo M): 1288.6 [M+H ⁺] , 1310.6 [M+Na ⁺] (11.757 minutos)	N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1- il)hexanoil]-L-valil-N-{4-[(8S,11S,12R)-11- [(2S)-butan-2-il]-12-(2-{(2S)-2-[(1R,2R)-3- {[(1S)-1-carboxi-2-feniletil]amino}-1- metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}- 2-oxoetil)-5,5,10-trimetil-3,6,9-trioxo-8- (propan-2-il)-2,13-dioxo-4,7,10- triazatetradec-1-il]fenil}-N ⁵ -carbamoil-L- ornitinamida

mv-#115	HPLC (Protocolo A at 45°C): <i>m/z</i> 897.5 [M+H ⁺], (9.149 minutos)	N-[5-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)pentanoyl]-N,2-Dimetilalanil-N-[(1S,2R)-4-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1S)-1-carboxi-2-fenilet]amino]-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il]-2-metoxi-1-[(1S)-1-metilpropil]-4-oxobutil]-N-metil-L-valinamida
mc-#115	HPLC (Protocolo A at 45 °C;): <i>m/z</i> 911.5 [M+H ⁺], (9.676 minutos)	N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]-N,2-Dimetilalanil-N-[(1S,2R)-4-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1S)-1-carboxi-2-fenilet]amino]-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il]-2-metoxi-1-[(1S)-1-metilpropil]-4-oxobutil]-N-metil-L-valinamida
mb-#115	-	N-[4-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)butanoyl]-N,2-Dimetilalanil-N-[(1S,2R)-4-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1S)-1-carboxi-2-fenilet]amino]-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il]-2-metoxi-1-[(1S)-1-metilpropil]-4-oxobutil]-N-metil-L-valinamida
me-#115	-	N-[7-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)heptanoil]-N,2-Dimetilalanil-N-[(1S,2R)-4-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1S)-1-carboxi-2-fenilet]amino]-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il]-2-metoxi-1-[(1S)-1-metilpropil]-4-oxobutil]-N-metil-L-valinamida
mcValCitPABC-#115	HPLC (Protocolo M): <i>m/z</i> 1317.7 [M+H ⁺] (12.261 minutos)	N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]-L-valil-N-{4-[(8S,11S,12R)-11-[(2S)-butan-2-il]-12-(2-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1S)-1-carboxi-2-fenilet]amino]-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il]-2-oxoetil)-4,5,5,10-tetrametil-3,6,9-trioxo-8-(propan-2-il)-2,13-dioxa-4,7,10-triazatetradec-1-il]fenil}-N-5~-carbamoil-L-ornitinamida
mc-#51	HPLC (Protocolo M): <i>m/z</i> 934.5 [M+H ⁺] (11.94 minutos)	N-2~-[(1-[(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]amino)ciclopropil]carbonil]-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}propil]pirrolidin-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida
mc-#47	HPLC (Protocolo M): <i>m/z</i> 962.5 [M+H ⁺] (13.014 minutos)	N-2~-[(1-[(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]amino)ciclopentil]carbonil]-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}propil]pirrolidin-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida
mc-#54	HPLC (Protocolo M): <i>m/z</i> 936.5 [M+H ⁺] (9.22 minutos)	N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]-2-Metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}propil]pirrolidin-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida

mcValCitPABC-#47	HPLC (Protocolo M): <i>m/z</i> 1368.6 [M+H ⁺] (13.157 minutos)	N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]-L-valil-N~5~-carbamoil-N-[4- {[(1-{[(2S)-1-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1- {(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3- {[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}propil]pirrolidin-1-il}-5-metil- 1-oxoheptan-4-il](metil)amino}-3-metil-1- oxobutan-2-il]carbamoil}ciclopentil)carbamoil]oxi}metil)fenil]-L-ornitinamida
mcValCitPABC-#26	HPLC (Protocolo M): <i>m/z</i> 1386.6 [M+H ⁺] (16.21 minutos)	N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]-L-valil-N-{4-[(5S,8S,11S,12R)- 11-[(2S)-butan-2-il]-12-(2-{(2S)-2- [(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-[(1S)-2-fenil- 1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}-3- tioxopropil]pirrolidin-1-il)-2-oxoetil)-4,10- dimetil-3,6,9-trioxo-5,8-di(propan-2-il)- 2,13-dioxa-4,7,10-triazatetradec-1- il]fenil}-N~5~-carbamoil-L-ornitinamida
mc-#26	HPLC (Protocolo A*): <i>m/z</i> 980.5 [M+H ⁺] (10.628 minutos)	N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]-N-Metil-L-valil-N-{(3R,4S,5S)- 3-metoxi-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2- metil-3-[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}-3-tioxopropil]pirrolidin-1-il}- 5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L- valinamida
mcValCitPABC-#42	HPLC (Protocolo A*): <i>m/z</i> 1361.7 [M+H ⁺] (9.831 minutos)	N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]-L-valil-N-{4-[(5S,8S,11S,12R)- 11-[(2S)-butan-2-il]-12-(2-{(2S)-2- [(1R,2R)-1-metoxi-3-[(2S)-1-metoxi-1- oxo-3-fenilpropan-2-il]amino}-2-metil-3- tioxopropil]pirrolidin-1-il)-2-oxoetil)-4,10- dimetil-3,6,9-trioxo-5,8-di(propan-2-il)- 2,13-dioxa-4,7,10-triazatetradec-1- il]fenil}-N~5~-carbamoil-L-ornitinamida
mcValCitPABC-#36	HPLC (Protocolo A*): <i>m/z</i> 1324.6 [M+Na ⁺²³] (9.987 minutos)	N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]-L-valil-N-{4-[(5S,8S,11S,12R)- 11-[(2S)-butan-2-il]-12-{2-[(2S)-2- {(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-[(2- feniletil]amino}-3-tioxopropil]pirrolidin-1- il)-2-oxoetil)-4,10-dimetil-3,6,9-trioxo-5,8- di(propan-2-il)-2,13-dioxa-4,7,10- triazatetradec-1-il]fenil}-N~5~-carbamoil- L-ornitinamida
mc-#42	HPLC (Protocolo A*): <i>m/z</i> 955.5 [M+H ⁺] (10.679 minutos)	N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]-N-Metil-L-valil-N-{(3R,4S,5S)- 3-metoxi-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-3- {[(2S)-1-metoxi-1-oxo-3-fenilpropan-2- il]amino}-2-metil-3-tioxopropil]pirrolidin-1- il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L- valinamida
AmPeg6C2-#54	LC-MS (Protocolo H): <i>m/z</i> 1078.7 [M+H ⁺] (2.56 minutos)	N-(21-amino-4,7,10,13,16,19- hexaoxahenicosan-1-oyl)-2-Metilalanil-N- [(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-[(2S)-2-[(1R,2R)- 1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[(1S)-2-fenil-1- (1,3-tiazol-2-il)etil]amino}propil]pirrolidin- 1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L- valinamida
MalPeg3C2-#54	LC-MS (Protocolo H): <i>m/z</i> 1026.6 [M+H ⁺] (3.54 minutos)	N-[3-(2-{2-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H- pirrol-1-il)etoxi]etoxi]etoxi]propanoil)-2- Metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1- {(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3- {[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}propil]pirrolidin-1-il}-5-metil- 1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida

mcValCitPABCAmPeg6C2-#54	LC-MS (Protocolo H): m/z 1677.9 [M+H ⁺] (3.48 minutos)	N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]-L-valil-N-{4-[(30S,33S,34R)-33-[(2S)-butan-2-il]-34-(2-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-{[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}propil]pirrolidin-1-il}-2-oxoetil)-27,27,32-trimetil-3,25,28,31-tetraoxo-30-(propan-2-il)-2,7,10,13,16,19,22,35-octaoxa-4,26,29,32-tetraazaheptatriacont-1-il]fenil}-N~5~-carbamoil-L-ornitinamida
mcValCitPABCAmPeg3C2-#54	LC-MS (Protocolo H): m/z 1545.8 [M+H ⁺] (3.48 minutos)	N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]-L-valil-N-{4-[(21S,24S,25R)-24-[(2S)-butan-2-il]-25-(2-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-{[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}propil]pirrolidin-1-il}-2-oxoetil)-18,18,23-trimetil-3,16,19,22-tetraoxo-21-(propan-2-il)-2,7,10,13,26-pentaoxa-4,17,20,23-tetraazaheptacos-1-il]fenil}-N~5~-carbamoil-L-ornitinamida
MalPeg3C2-#47	LC-MS (Protocolo Q1): m/z 1052.7 [M+H ⁺] (0.88 minutos)	N~2~-[(1-{[3-(2-{2-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi]ethoxi}ethoxi)propanoil]amino}ciclopentil)carbonil]-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-{[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}propil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida
AmPeg6C2-#47	LC-MS (Protocolo H): m/z 1104.88 [M+H ⁺] (2.65 minutos)	1-amino-N-(1-{[(2S)-1-{[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-{[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}propil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il](metil)amino}-3-metil-1-oxobutan-2-il]carbamoil}ciclopentil)-3,6,9,12,15,18-hexaoxahenicosan-21-amida
mcValCitPABCAmPeg3C2-#47	LC-MS (Protocolo H): m/z 1571.8 [M+H ⁺] (3.56 minutos)	N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]-L-valil-N~5~-carbamoil-N-(4-{25-[(1-{[(2S)-1-{[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-{[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}propil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il](metil)amino}-3-metil-1-oxobutan-2-il]carbamoil}ciclopentil)amino]-3,16-dioxo-2,7,10,13-tetraoxa-4-azahexadec-1-il}fenil)-L-ornithinamida
mcValCitPABCAmPeg6C2-#47	HPLC (Protocolo H): m/z 1703.8 [M+H ⁺] (3.57 minutos)	N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]-L-valil-N~5~-carbamoil-N-(4-{25-[(1-{[(2S)-1-{[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-{[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}propil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il](metil)amino}-3-metil-1-oxobutan-2-il]carbamoil}ciclopentil)amino]-3,25-dioxo-2,7,10,13,16,19,22-heptaoxa-4-azapentacos-1-il}fenil)-L-ornitinamida
MalPeg3C2-#42	LC-MS (Protocolo H): m/z 1045.7 [M+H ⁺] (3.92 minutos)	N-[3-(2-{2-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi]ethoxi}ethoxi)propanoil]-N-Metil-L-valil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-3-{[(2S)-1-metoxi-1-oxo-3-fenilpropan-2-il]amino}-2-metil-3-tioxopropil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida

AmPeg6C2-#42	LC-MS (Protocolo H): <i>m/z</i> 1097.7 [M+H ⁺] (2.80 minutos)	N-(21-amino-4,7,10,13,16,19-hexaoxahenicosan-1-oyl)-N-Metil-L-valil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-3-[(2S)-1-metoxi-1-oxo-3-fenilpropan-2-il]amino]-2-metil-3-tioxopropil]pirrolidin-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida
mcValCitPABCAmPeg6C2-#42	LC-MS (Protocolo H): <i>m/z</i> 1696.8 [M+H ⁺] (3.73 minutos)	N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]-L-valil-N-{4-[(27S,30S,33S,34R)-33-[(2S)-butan-2-il]-34-(2-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-3-[(2S)-1-metoxi-1-oxo-3-fenilpropan-2-il]amino]-2-metil-3-tioxopropil]pirrolidin-1-il]-2-oxoetil)-26,32-dimetil-3,25,28,31-tetraoxo-27,30-di(propan-2-il)-2,7,10,13,16,19,22,35-octaoxa-4,26,29,32-tetraazahexatriacont-1-il]fenil}-N~5~-carbamoil-L-ornitinamida
mcValCitPABCAmPeg3C2-#42	LC-MS (Protocolo H): <i>m/z</i> 1564.8 [M+H ⁺] (3.70 minutos)	N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]-L-valil-N-{4-[(18S,21S,24S,25R)-24-[(2S)-butan-2-il]-25-(2-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-3-[(2S)-1-metoxi-1-oxo-3-fenilpropan-2-il]amino]-2-metil-3-tioxopropil]pirrolidin-1-il]-2-oxoetil)-17,23-dimetil-3,16,19,22-tetraoxo-18,21-di(propan-2-il)-2,7,10,13,26-pentaoxa-4,17,20,23-tetraazaheptacos-1-il]fenil}-N~5~-carbamoil-L-ornitinamida
MalPeg3C2-#26	LC-MS (Protocolo H): <i>m/z</i> 1070.6 [M+H ⁺] (3.94 minutos)	N-[3-(2-{2-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi]ethoxi]ethoxi)propanoil]-N-Metil-L-valil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino]-3-tioxopropil]pirrolidin-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida
mc-#41	HPLC (Protocolo A): <i>m/z</i> 941.5 [M+H ⁺] (9.883 minutos)	N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]-N-Metil-L-valil-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1S)-1-carboxi-2-feniletil]amino]-1-metoxi-2-metil-3-tioxopropil]pirrolidin-1-il]-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida
AmPeg6C2-#26	LC-MS (Protocolo H): <i>m/z</i> 1122.6 [M+H ⁺] (2.76 minutos)	N-(21-amino-4,7,10,13,16,19-hexaoxahenicosan-1-oyl)-N-Metil-L-valil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino]-3-tioxopropil]pirrolidin-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida
mcValCitPABCAmPeg3C2-#26	LC-MS (Protocolo H): <i>m/z</i> 1588.0 [M+H ⁺] (3.74 minutos)	N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]-L-valil-N-{4-[(18S,21S,24S,25R)-24-[(2S)-butan-2-il]-25-(2-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino]-3-tioxopropil]pirrolidin-1-il]-2-oxoetil)-17,23-dimetil-3,16,19,22-tetraoxo-18,21-di(propan-2-il)-2,7,10,13,26-pentaoxa-4,17,20,23-tetraazaheptacos-1-il]fenil}-N~5~-carbamoil-L-ornitinamida
MalPeg3C2ValCitPABC-#26	LC-MS (Protocolo H): <i>m/z</i> 1476.8 [M+H ⁺] (3.81 minutos)	N-[3-(2-{2-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi]ethoxi]ethoxi)propanoil]-L-valil-N-{4-[(5S,8S,11S,12R)-11-[(2S)-butan-2-il]-12-(2-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino]-3-tioxopropil]pirrolidin-1-il]-2-oxoetil)-4,10-dimetil-3,6,9-trioxa-5,8-di(propan-2-il)-2,13-dioxa-4,7,10-triazatetradec-1-il]fenil}-N~5~-carbamoil-L-ornitinamida

mcValCitPABCAmPeg6C2-#26	LC-MS (Protocolo H): m/z 1721.9 [M+H ⁺] (3.75 minutos)	N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]-L-valil-N-{4-[(27S,30S,33S,34R)-33-[(2S)-butan-2-il]-34-(2-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}-3-tioxopropil]pirrolidin-1-il]-2-oxoetil)-26,32-dimetil-3,25,28,31-tetraoxo-27,30-di(propan-2-il)-2,7,10,13,16,19,22,35-octaosa-4,26,29,32-tetraazahexatriacont-1-il]fenil}-N-5~-carbamoil-L-ornitinamida
mc-#36	LC-MS (Protocolo Q1): m/z 897.7 [M+H ⁺] (1.00 minutos)	N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]-N-Metil-L-valil-N-{(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-[(2-feniletil)amino]-3-tioxopropil]pirrolidin-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il}-N-metil-L-valinamida
MalPeg6C2-#54	LC-MS (Protocolo H): m/z 1158.7 [M+H ⁺] (3.55 minutos)	N-[1-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-21-oxo-3,6,9,12,15,18-hexaaxahenicosan-21-il]-2-Metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino]propil]pirrolidin-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida
MalPeg3C2ValCitPABC-#47	LC-MS (Protocolo H): m/z 1458.7 [M+H ⁺] (3.56 minutos)	N-[3-(2-{2-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi]etoxi]etoxi]propanoil]-L-valil-N-5~-carbamoil-N-[4-({[(1-[(2S)-1-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino]propil]pirrolidin-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il](metil)amino}-3-metil-1-oxobutan-2-il]carbamoil]ciclopentil]carbamoil]oxi}metil)fenil]-L-ornitinamida
MalPeg3C2-#36	LC-MS (Protocolo H): m/z 987.7 [M+H ⁺] (3.97 minutos)	N-[3-(2-{2-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi]etoxi]etoxi]propanoil]-N-Metil-L-valil-N-{(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-[(2-feniletil)amino]-3-thioxopropil]pirrolidin-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il}-N-metil-L-valinamida
MalPeg6C2-#47	LC-MS (Protocolo H): m/z 1184.7 [M+H ⁺] (3.67 minutos)	1-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-N-(1-[(2S)-1-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino]propil]pirrolidin-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il](metil)amino}-3-metil-1-oxobutan-2-il]carbamoil]ciclopentil)-3,6,9,12,15,18-hexaaxahenicosan-21-amida
MalPeg6C2-#26	LC-MS (Protocolo H): m/z 1202.7 [M+H ⁺] (3.93 minutos)	N-[1-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-21-oxo-3,6,9,12,15,18-hexaaxahenicosan-21-il]-N-Metil-L-valil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino]-3-tioxopropil]pirrolidin-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida
MalPeg6C2-#36	LC-MS (Protocolo H): m/z 1118.8 [M-H] (3.96 minutos)	N-[1-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-21-oxo-3,6,9,12,15,18-hexaaxahenicosan-21-il]-N-Metil-L-valil-N-{(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-[(2-feniletil)amino]-3-tioxopropil]pirrolidin-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il}-N-metil-L-valinamida

mcValCitPABCAmPeg3C2-#36	LC-MS (Protocolo H): <i>m/z</i> 1506.8 [M+H ⁺] (3.76 minutos)	N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]-L-valil-N-{4-[(18S,21S,24S,25R)-24-[(2S)-butan-2-il]-25-{2-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-[(2-feniletil)amino]-3-tioxopropil]pirrolidin-1-il]-2-oxoetil}-17,23-dimetil-3,16,19,22-tetraoxo-18,21-di(propan-2-il)-2,7,10,13,26-pentaoxa-4,17,20,23-tetraazaheptacos-1-il]fenil}-N~5~-carbamoil-L-ornitinamida
AmPeg6C2-#36	LC-MS (Protocolo H): <i>m/z</i> 1039.7 [M+H ⁺] (2.68 minutos)	N-(21-amino-4,7,10,13,16,19-hexaoxahenicosan-1-oyl)-N-Metil-L-valil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-[(2-feniletil)amino]-3-tioxopropil]pirrolidin-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida
mcValCitPABC-#60	HPLC (Protocolo M): <i>m/z</i> 1307.6 [M+H ⁺] (12.696 minutos)	N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]-L-valil-N-{4-[(8S,11S,12R)-11-[(2S)-butan-2-il]-12-(2-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[(1-fenilciclopropil)metil]amino}propil]pirrolidin-1-il)-2-oxoetil]-5,5,10-trimetil-3,6,9-trioxa-8-(propan-2-il)-2,13-dioxa-4,7,10-triazatetradec-1-il]fenil}-N~5~-carbamoil-L-ornitinamida
mcValCitPABCAmPeg6C2-#36	LC-MS (Protocolo H): <i>m/z</i> 1638.0 [M+H ⁺] (3.77 minutos)	N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]-L-valil-N-{4-[(27S,30S,33S,34R)-33-[(2S)-butan-2-il]-34-{2-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-[(2-feniletil)amino]-3-tioxopropil]pirrolidin-1-il]-2-oxoetil}-26,32-dimetil-3,25,28,31-tetraoxo-27,30-di(propan-2-il)-2,7,10,13,16,19,22,35-octaoxa-4,26,29,32-tetraazahexatriacont-1-il]fenil}-N~5~-carbamoil-L-ornitinamida
mcValCitPABCAmPeg3C2-#41	LC-MS (Protocolo H): <i>m/z</i> 1550.9 [M+H ⁺] (3.53 minutos)	N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]-L-valil-N-{4-[(18S,21S,24S,25R)-24-[(2S)-butan-2-il]-25-(2-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1S)-1-carboxi-2-feniletil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-tioxopropil]pirrolidin-1-il)-2-oxoetil)-17,23-dimetil-3,16,19,22-tetraoxo-18,21-di(propan-2-il)-2,7,10,13,26-pentaoxa-4,17,20,23-tetraazaheptacos-1-il]fenil}-N~5~-carbamoil-L-ornitinamida
MalPeg6C2-#60	LC-MS (Protocolo H): <i>m/z</i> 1101.8 [M+H ⁺] (3.66 minutos)	N-[1-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-21-oxo-3,6,9,12,15,18-hexaoxahenicosan-21-il]-2-Metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[(1-fenilciclopropil)metil]amino}propil]pirrolidin-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida
AmPeg6C2-#60	LC-MS (Protocolo H): <i>m/z</i> 1021.7 [M+H ⁺] (2.57 minutos)	N-(21-amino-4,7,10,13,16,19-hexaoxahenicosan-1-oyl)-2-Metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[(1-fenilciclopropil)metil]amino}propil]pirrolidin-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida
MalPeg3C2-#60	LC-MS (Protocolo H): <i>m/z</i> 969.7 [M+H ⁺] (3.65 minutos)	N-[3-(2-{2-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi]ethoxi]ethoxi)propanoil]-2-Metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[(1-fenilciclopropil)metil]amino}propil]pirrolidin-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida

MalPeg6C2-#41	LC-MS (Protocolo H): m/z 1163.0 [M-H] (3.70 minutos)	N-[1-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-21-oxo-3,6,9,12,15,18-hexaaxahenicosan-21-il]-N-Metil-L-valil-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1S)-1-carboxi-2-feniletíl]amino]-1-metoxi-2-metil-3-tioxopropil]pirrolidin-1-il]-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida
AmPeg6C2-#66	LC-MS (Protocolo Q1): m/z 1009.8 [M+H ⁺] (0.72 minutos)	N-(21-amino-4,7,10,13,16,19-hexaaxahenicosan-1-oyl)-2-Metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(2-(ciclohepta-2,4,6-trien-1-il)etil]amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il]-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida
mcValCitPABCAmPeg6C2-#60	LC-MS (Protocolo H): m/z 1621.0 [M+H ⁺] (3.55 minutos)	N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]-L-valil-N-{4-[(30S,33S,34R)-33-[(2S)-butan-2-il]-34-(2-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[(1-fenilciclopropil)metil]amino}propil]pirrolidin-1-il)-2-oxoetil]-27,27,32-trimetil-3,25,28,31-tetraoxo-30-(propan-2-il)-2,7,10,13,16,19,22,35-octaoxa-4,26,29,32-tetraazahexatriacont-1-il]fenil}-N~5~-carbamoil-L-ornitinamida
mc-#70	HPLC (Protocolo M): m/z 911.5 [M+H ⁺] (11.847 minutos)	N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]-2-Metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-3-[(2S)-1-metoxi-1-oxo-3-fenilpropan-2-il]amino]-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida
2AcAmPeg6C2-#66	LC-MS (Protocolo Q1): m/z 1129.8 [M+H ⁺] (0.85 minutos)	N-(24-bromo-23-oxo-4,7,10,13,16,19-hexaoxa-22-azatetracosan-1-oyl)-2-Metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(2-(ciclohepta-2,4,6-trien-1-il)etil]amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il]-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida
mc-#66	LC-MS (Protocolo Q1): m/z 867.7 [M+H ⁺] (0.90 minutos)	N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]-2-Metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(2-(ciclohepta-2,4,6-trien-1-il)etil]amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il]-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida
mcValCitPABC-#88	LC-MS (Protocolo Q1): m/z 1355.9 [M+H ⁺] (0.87 minutos)	N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]-L-valil-N-{4-[(8S,11S,12R)-11-[(2S)-butan-2-il]-12-(2-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}propil]pirrolidin-1-il)-2-oxoetil]-4,5,5,10-tetrametil-3,6,9-trioxo-8-(propan-2-il)-2,13-dioxa-4,7,10-triazatetradec-1-il]fenil}-N~5~-carbamoil-L-ornitinamida
mcValCitPABC-#88	LC-MS (Protocolo Q1): m/z 1314.9 [M+H ⁺] (0.91 minutos)	N-{6-[(bromoacetil)amino]hexanoil}-L-valil-N-{4-[(8S,11S,12R)-11-[(2S)-butan-2-il]-12-(2-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(2-(ciclohepta-2,4,6-trien-1-il)etil]amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il)-2-oxoetil]-5,5,10-trimetil-3,6,9-trioxo-8-(propan-2-il)-2,13-dioxa-4,7,10-triazatetradec-1-il]fenil}-N~5~-carbamoil-L-ornitinamida

mc-#92	LC-MS (Protocolo Q1): m/z 876.7 [M+H ⁺] (0.75 minutos)	N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]-2-Metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-(quinolin-6-ilamino)propil]pirrolidin-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida
mcValCitPABC-#44	HPLC (Protocolo A): m/z 1318.6 [M+H ⁺] (9.174 minutos)	N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]-L-valil-N-{4-[(8S,11S,12R)-11-[(2S)-butan-2-il]-12-(2-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1S)-1-carboxi-2-feniletil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-tioxopropil]pirrolidin-1-il}-2-oxoetil)-5,5,10-trimetil-3,6,9-trioxo-8-(propan-2-il)-2,13-dioxa-4,7,10-triazatetradec-1-il]fenil}-N-5~-carbamoil-L-ornitinamida
mc-#108	HPLC (Protocolo A): m/z 909.5 [M+H ⁺] (9.063 minutos)	N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]-2-Metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(R)-(7S)-biciclo[4.2.0]octa-1,3,5-trien-7-il(carboxi)metil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il]-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida
mcValCitPABC-#108	HPLC (Protocolo M): m/z 1315.7 [M+H ⁺] (11.89 minutos)	N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]-L-valil-N-{4-[(8S,11S,12R)-12-(2-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(R)-(7S)-biciclo[4.2.0]octa-1,3,5-trien-7-il(carboxi)metil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-2-oxoetil)-11-[(2S)-butan-2-il]-5,5,10-trimetil-3,6,9-trioxo-8-(propan-2-il)-2,13-dioxa-4,7,10-triazatetradec-1-il]fenil}-N-5~-carbamoil-L-ornitinamida
NHSCOpeg2C2ValCitPABC-#66	HPLC (Protocolo M): m/z 683.3 [M+H ⁺] (10.03 minutos)	N-[3-(2-{3-[(2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi]-3-oxopropoxi}ethoxi)propanoil]-L-valil-N-{4-[(8S,11S,12R)-11-[(2S)-butan-2-il]-12-(2-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(2-ciclohepta-2,4,6-trien-1-il)etil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-2-oxoetil)-5,5,10-trimetil-3,6,9-trioxo-8-(propan-2-il)-2,13-dioxa-4,7,10-triazatetradec-1-il]fenil}-N-5~-carbamoil-L-ornitinamida
mcValCitPABC-#98	HPLC (Protocolo M): m/z 1368.6 [M+H ⁺] (12.504 minutos)	N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]-L-valil-N-5~-carbamoil-N-{4-[(2S)-2-[(2S)-1-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}propil]pirrolidin-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il](metil)amino}-3-metil-1-oxobutan-2-il]carbamoil}-2-metilpirrolidin-1-il]carbonil}oxi)metil]fenil}-L-ornitinamida
mcValCitPABC-#95	LC-MS (Protocolo Q): m/z 1356.5 [M+H ⁺] (1.79 minutos)	N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]-L-valil-N-{4-[(9S,12S,13R)-12-[(2S)-butan-2-il]-13-(2-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}propil]pirrolidin-1-il}-2-oxoetil)-6,6,11-trimetil-3,7,10-trioxo-9-(propan-2-il)-2,14-dioxa-4,8,11-triazapentadec-1-il]fenil}-N-5~-carbamoil-L-ornitinamida
MalPeg3C2-#69	HPLC (Protocolo M): m/z 987.5 [M+H ⁺] (10.702 minutos)	N-[3-(2-{2-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi]ethoxi}ethoxi)propanoil]-2-Metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1S)-1-carboxi-2-feniletil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il]-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida

AmPeg6C2-#69	LC-MS (Protocolo H): <i>m/z</i> 1040.1 [M+H ⁺] (2.12 minutos)	N-(21-amino-4,7,10,13,16,19-hexaoxahenicosan-1-ol)-2-Metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1S)-1-carboxi-2-feniletil]amino]-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il]-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida
mcValCitPABC-#84	LC-MS (Protocolo Q): <i>m/z</i> 1371.4 [M+H ⁺] (1.89 minutos)	N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]-L-valil-N-{4-[(8S,11S,12R)-11-[(2S)-butan-2-il]-12-(2-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino]-3-tioxopropil]pirrolidin-1-il)-2-oxoetil)-4,5,5,10-tetrametil-3,6,9-trioxo-8-(propan-2-il)-2,13-dioxa-4,7,10-triazatetradec-1-il]fenil]-N~5~-carbamoil-L-ornitinamida
AmCapValCitPABC-#54	LC-MS (Protocolo H): <i>m/z</i> 1262.3 [M+H ⁺] (2.35 minutos)	N-(6-aminohexanoil)-L-valil-N-{4-[(8S,11S,12R)-11-[(2S)-butan-2-il]-12-(2-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino]propil]pirrolidin-1-il)-2-oxoetil)-5,5,10-trimetil-3,6,9-trioxo-8-(propan-2-il)-2,13-dioxa-4,7,10-triazatetradec-1-il]fenil]-N~5~-carbamoil-L-ornitinamida
mcValCitPABC-#226	LC-MS (Protocolo Q): <i>m/z</i> 1330.9 [M+H ⁺] (1.77 minutos)	N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]-L-valil-N-{4-[(8S,11S,12R)-11-[(2S)-butan-2-il]-12-(2-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-3-[(2S)-1-metoxi-1-oxo-3-fenilpropan-2-il]amino]-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il)-2-oxoetil)-4,5,5,10-tetrametil-3,6,9-trioxo-8-(propan-2-il)-2,13-dioxa-4,7,10-triazatetradec-1-il]fenil]-N~5~-carbamoil-L-ornitinamida
mcValCitPABC-#117	LC-MS (Protocolo Q): <i>m/z</i> 1342.6 [M+H ⁺] (1.80 minutos)	N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]-L-valil-N~5~-carbamoil-N-{4-[[[(2S)-2-[(2S)-1-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-3-[(2S)-1-metoxi-1-oxo-3-fenilpropan-2-il]amino]-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il](metil)amino]-3-metil-1-oxobutan-2-il]carbamoil]-2-metilpirrolidin-1-il]carbonil]oxi]metil]fenil]-L-ornitinamida
MalPeg6C2-#98	HPLC (Protocolo M): <i>m/z</i> 1185.6 [M+H ⁺] (11.985 minutos)	1-[1-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-21-oxo-3,6,9,12,15,18-hexaoxahenicosan-21-il]-2-metil-L-prolil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino]propil]pirrolidin-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida
mcValCitPABC-#118	LC-MS (Protocolo Q): <i>m/z</i> 1328.6 [M+H ⁺] (1.68 minutos)	N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]-L-valil-N~5~-carbamoil-N-{4-[[[(2S)-2-[(2S)-1-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1S)-1-carboxi-2-feniletil]amino]-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il]-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il](metil)amino]-3-metil-1-oxobutan-2-il]carbamoil]-2-metilpirrolidin-1-il]carbonil]oxi]metil]fenil]-L-ornitinamida
mcValCitPABC-#80	HPLC (Protocolo M): <i>m/z</i> 1353.6 [M+Na ⁺] (12.751 minutos)	N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]-L-valil-N-{4-[(8S,11S,12R)-11-[(2S)-butan-2-il]-12-(2-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1S)-1-carboxi-2-feniletil]amino]-1-metoxi-2-metil-3-tioxopropil]pirrolidin-1-il)-2-oxoetil)-4,5,5,10-tetrametil-3,6,9-trioxo-8-(propan-2-il)-2,13-dioxa-4,7,10-triazatetradec-1-il]fenil]-N~5~-carbamoil-L-ornitinamida

MalPeg6C2-#118	LC-MS (Protocolo Q): <i>m/z</i> 1145.6 [M+H ⁺] (1.66 minutos)	1-[1-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-21-oxo-3,6,9,12,15,18-hexaoxahenicosan-21-il]-2-metil-L-prolil-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(1S)-1-carboxi-2-feniletil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida
MalPeg6C2-#230	HPLC (Protocolo M): <i>m/z</i> 1146.6 [M+H ⁺] (12.071 minutos)	N-[1-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-21-oxo-3,6,9,12,15,18-hexaoxahenicosan-21-il]-2-Metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(R)-carboxi(1-fenilciclopropil)metil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida
mcValCitPABC-#232	LC-MS (Protocolo Q): <i>m/z</i> 1367.3 [M+H ⁺] (1.81 minutos)	N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]-L-valil-N-5~carbamoil-N-{4-[[[(2R)-2-{[(2S)-1-{[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-{[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}propil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il](metil)amino}-3-metil-1-oxobutan-2-il]carbamoil}-2-metilpirrolidin-1-il]carbonil]oxi)metil]fenil]-L-ornitinamida
mc-#117	LC-MS (Protocolo Q): <i>m/z</i> 937.4 [M+H ⁺] (1.91 minutos)	1-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]-2-metil-L-prolil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-3-{[(2S)-1-metoxi-1-oxo-3-fenilpropan-2-il]amino}-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida
MalPeg6C2-#117	HPLC (Protocolo M): <i>m/z</i> 1161.6 [M+H ⁺] (12.115 minutos)	1-[1-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-21-oxo-3,6,9,12,15,18-hexaoxahenicosan-21-il]-2-metil-L-prolil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-3-{[(2S)-1-metoxi-1-oxo-3-fenilpropan-2-il]amino}-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida
mv-#69	LC-MS (Protocolo Q): <i>m/z</i> 883.3 [M+H ⁺] (1.57 minutos)	N-[5-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)pentanoil]-2-Metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(1S)-1-carboxi-2-feniletil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida
mb-#69	HPLC (Protocolo M): <i>m/z</i> 869.5 [M+H ⁺] (10.874 minutos)	N-[4-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)butanoil]-2-Metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(1S)-1-carboxi-2-feniletil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida
AmPeg6C2-#234	LC-MS (Protocolo Q1): <i>m/z</i> 1514.3 [M+H ⁺] (0.76 minutos)	N-(21-amino-4,7,10,13,16,19-hexaoxahenicosan-1-oyl)-2-Metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-{(3R,4R,7S,12S)-7-bencil-14-[3-cloro-4-(propan-2-iloxi)fenil]-4-metil-12-[4-(8-metilimidazo[1,2-a]piridin-2-il)bencil]-5,8,14-trioxo-2,9-dioxa-6,13-diazatetradecan-3-il}pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida
AmPeg6C2-#235	LC-MS (Protocolo Q1): <i>m/z</i> 1280.2 [M+H ⁺] (0.87 minutos)	N-(21-amino-4,7,10,13,16,19-hexaoxahenicosan-1-oyl)-2-Metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2S)-1-{[4-(5-fluoro-1,3-benzotiazol-2-il)-2-metilfenil]amino}-1-oxo-3-fenilpropan-2-il]amin o}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida

mc-#118	LC-MS (Protocolo Q): m/z 923.3 [M+H ⁺] (1.73 minutos)	1-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]-2-metil-L-prolil-N-[(3R,4S,5S)-1-((2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1S)-1-carboxi-2-feniletil]amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida
MalPeg6C2-#123	LC-MS (Protocolo Q1): m/z 1175.3 [M+H ⁺] (0.99 minutos)	N-[1-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-21-oxo-3,6,9,12,15,18-hexaaxahenicosan-21-il]-2-Metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-1-((2S)-2-[(1R,2R)-3-[(2S)-1-ter-butoxi-1-oxo-3-fenilpropan-2-il]amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida
mc-#226	LC-MS (Protocolo Q): m/z 925.7 [M+H ⁺] (1.85 minutos)	N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]-N,2-Dimetilalanil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-((2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-3-[(2S)-1-metoxi-1-oxo-3-fenilpropan-2-il]amino)-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il)-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida
me-#118	LC-MS (Protocolo Q): m/z 937.7 [M+H ⁺] (1.80 minutos)	1-[7-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)heptanoil]-2-metil-L-prolil-N-[(3R,4S,5S)-1-((2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1S)-1-carboxi-2-feniletil]amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida
mc-#131	LC-MS (Protocolo Q): m/z 937.3 [M+H ⁺] (1.88 minutos)	1-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]-2-metil-D-prolil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-((2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-3-[(2S)-1-metoxi-1-oxo-3-fenilpropan-2-il]amino)-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il)-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida
mb-#118	LC-MS (Protocolo Q): m/z 895.3 [M+H ⁺] (1.63 minutos)	1-[4-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)butanoyl]-2-metil-L-prolil-N-[(3R,4S,5S)-1-((2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1S)-1-carboxi-2-feniletil]amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida
mcValCitPABC-#134	LC-MS (Protocolo Q): m/z 1314.3 [M+H ⁺] (1.67 minutos)	N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]-L-valil-N-5~-carbamoil-N-{4-[[[(2S)-2-[(2S)-1-[(3R,4S,5S)-1-((2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il]amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il](metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il]carbamoil}-2-metilpirrolidin-1-il]carbonil}oxi)metil]fenil}-L-ornitinamida
mc-#145	LC-MS (Protocolo Q1): m/z 897.34 [M+H ⁺] (0.90 minutos)	N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]-N,2-Dimetilalanil-N-[(3R,4S,5S)-1-((2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il]amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida
MalPeg6C2-#126	HPLC (Protocolo M): m/z 1169.6 [M+Na ⁺] (12.583 minutos)	metil N-[(2R,3R)-3-[(2S)-1-[(3R,4S,5S)-4-[[N-[1-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-24,24-dimetil-21,25-dioxo-3,6,9,12,15,18-hexaaxa-22-azapentacosan-25-il]-L-valil](metil)amino)-3-metoxi-5-metilheptanoil]pirrolidin-2-il]-3-metoxi-2-metilpropanoil]-L-fenilalaninato
mc-#126	HPLC (Protocolo M): m/z 925.5 [M+H ⁺] (12.994 minutos)	metil N-[(2R,3R)-3-[(2S)-1-[(3R,4S,5S)-4-[[N-(3-[[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]amino)-2,2-dimetilpropanoil]-L-valil](metil)amino)-3-metoxi-5-metilheptanoil]pirrolidin-2-il]-3-metoxi-2-metilpropanoil]-L-fenilalaninato

mv-#118	LC-MS (Protocolo Q): m/z 909.2 [M+H ⁺] (1.68 minutos)	1-[5-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)pentanoyl]-2-metil-L-prolil-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1S)-1-carboxi-2-feniletil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il]-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida
mc-#172	LC-MS (Protocolo Q1): m/z 941.3 [M+H ⁺] (0.96 minutos)	metil N-[(2R,3R)-3-[(2S)-1-[(3R,4S,5S)-4-[[N-[(3S)-1-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]-3-fluoropirrolidin-3-il]carbonil]-L-valil](metil)amino}-3-metoxi-5-metilheptanoil]pirrolidin-2-il]-3-metoxi-2-metilpropanoil]-L-fenilalaninato
MalPeg6C2-#226	LC-MS (Protocolo Q): m/z 1147.3 [M+H ⁺] (1.76 minutos)	N-[1-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-21-oxo-3,6,9,12,15,18-hexaoxahenicosan-21-il]-N,2-Dimetilalanil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-3-[(2S)-1-metoxi-1-oxo-3-fenilpropan-2-il]amino}-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida
MalPeg6C2-#145	LC-MS (Protocolo Q1): m/z 1141.3 [M+Na ⁺] (0.87 minutos)	N-[1-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-21-oxo-3,6,9,12,15,18-hexaoxahenicosan-21-il]-N,2-Dimetilalanil-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il]-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida
mc-#162	LC-MS (Protocolo Q): m/z 937.3 [M+H ⁺] (1.50 minutos)	N-[(2R,3R)-3-[(2S)-1-[(3R,4S,5S)-4-[[N-[(2S)-1-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]-2-metilpiperidin-2-il]carbonil]-L-valil](metil)amino}-3-metoxi-5-metilheptanoil]pirrolidin-2-il]-3-metoxi-2-metilpropanoil]-L-fenilalanine
mc-#163	HPLC (Protocolo A): m/z 937.5 [M+H ⁺] (7.855minutos)	N-[(2R,3R)-3-[(2S)-1-[(3R,4S,5S)-4-[[N-[(2R)-1-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]-2-metilpiperidin-2-il]carbonil]-L-valil](metil)amino}-3-metoxi-5-metilheptanoil]pirrolidin-2-il]-3-metoxi-2-metilpropanoil]-L-fenilalanine
mcValCitPABC-#231	LC-MS (Protocolo Q1): m/z 1640.4 [M+Na ⁺²³] (0.94 minutos)	(N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]-L-valil-N-{4-[(8S,11S,12R)-12-(2-[(2S)-2-[(3R,4R,7S)-7-bencil-15-{2-[(3,5-dimetil-1H-pirrol-2-il-kappaN)metiliden]-2H-pirrol-5-il-kappaN)-4-metil-5,8,13-trioxo-2-oxa-6,9,12-triazapentadecan-3-il]pirrolidin-1-il)-2-oxoetil}-11-[(2S)-butan-2-il]-5,5,10-trimetil-3,6,9-trioxo-8-(propan-2-il)-2,13-dioxa-4,7,10-triazatetradec-1-il]fenil}-N~5~-carbamoil]-L-ornithinamidato)(difluoro)boron
MalPeg6C2-#238	LC-MS (Protocolo Q1): m/z 1173.3 [M+H ⁺] (0.96 minutos)	N-[1-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-21-oxo-3,6,9,12,15,18-hexaoxahenicosan-21-il]-N,2-Dimetilalanil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[(2S)-1-oxo-3-fenil-1-(prop-2-en-1-ilo)propan-2-il]amino}propil]pirrolidin-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida
MalPeg6C2-#239	LC-MS (Protocolo Q): m/z 1201.3 [M+H ⁺] (2.02 minutos)	1-[1-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-21-oxo-3,6,9,12,15,18-hexaoxahenicosan-21-il]-2-metil-L-prolil-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(2S)-1-ter-butoxi-1-oxo-3-fenilpropan-2-il]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il]-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida

mc-#123	LC-MS (Protocolo Q1): <i>m/z</i> 953.3 [M+H ⁺] (1.04 minutos)	N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]-2-Metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-1-{{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{{(2S)-1-ter-butoxi-1-oxo-3-fenilpropan-2-il}amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida
MalC6-#54	LC-MS (Protocolo Q): <i>m/z</i> 922.3 [M+H ⁺] (1.50 minutos)	N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexyl]-2-Metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-{{(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil}amino}propil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida
mc-#231	LC-MS (Protocolo Q1): <i>m/z</i> 1213.3 [M+H ⁺] (0.98 minutos)	{N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]-2-Metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-1-{{(2S)-2-[(3R,4R,7S)-7-bencil-15-{2-[(3,5-dimetil-1H-pirrol-2-il-kappaN)metiliden]-2H-pirrol-5-il-kappaN}-4-metil-5,8,13-trioxo-2-oxa-6,9,12-triazapentadecan-3-il]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamidato}(difluoro)boro
MalC6-#118	LC-MS (Protocolo Q1): <i>m/z</i> 909.3 [M+H ⁺] (0.76 minutos)	1-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexyl]-2-metil-L-prolil-N-[(3R,4S,5S)-1-{{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{{(1S)-1-carboxi-2-feniletil}amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida
mcValCitPABC-#123	LC-MS (Protocolo Q1): <i>m/z</i> 1358.3 [M+H ⁺] (0.97 minutos)	N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]-L-valil-N-{4-[(8S,11S,12R)-11-[(2S)-butan-2-il]-12-(2-{{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{{(2S)-1-ter-butoxi-1-oxo-3-fenilpropan-2-il}amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-2-oxoetil)-5,5,10-trimetil-3,6,9-trioxo-8-(propan-2-il)-2,13-dioxa-4,7,10-triazatetradec-1-il]fenil}-N~5~-carbamoil-L-ornitinamida
mc-#237	LC-MS (Protocolo Q1): <i>m/z</i> 964.4 [M+H ⁺] (0.96 minutos)	N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]-N,2-Dimetilalanil-N-[(3R,4S,5S)-1-{{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{{(2S)-3-(1H-indol-3-il)-1-metoxi-1-oxopropan-2-il}amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida
mc-#158	HPLC (Protocolo M): <i>m/z</i> 951.4 [M+H ⁺] (12.839 minutos)	metil N-[(2R,3R)-3-{{(2S)-1-[(3R,4S,5S)-4-{{N-({(2S)-1-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]-2-metilpiperidin-2-il}carbonil)-L-valil}(metil)amino}-3-metoxi-5-metilheptanoil]pirrolidin-2-il}-3-metoxi-2-metilpropanoil]-L-fenilalaninato
MalC6Am-#151	LC-MS (Protocolo Q): <i>m/z</i> 922.3 [M+H ⁺] (1.43 minutos)	1,2-dimetil-L-prolil-N-[(3R,4S,5S)-1-{{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{{(2S)-1-{{6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexyl}amino}-1-oxo-3-fenilpropan-2-il}amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida
PFPCOPeg2C2ValCitPABC-#54	LC-MS (Protocolo Q): <i>m/z</i> 1502.8 [M+H ⁺] (1.98 minutos)	N-(3-{2-[3-oxo-3-(pentafluorofenoxi)propoxi]ethoxi}propanoil)-L-valil-N-{4-[(8S,11S,12R)-11-[(2S)-butan-2-il]-12-(2-{{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-{{(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil}amino}propil]pirrolidin-1-il}-2-oxoetil)-5,5,10-trimetil-3,6,9-trioxo-8-(propan-2-il)-2,13-dioxa-4,7,10-triazatetradec-1-il]fenil}-N~5~-carbamoil-L-ornitinamida

mcValCitPABC-#154	LC-MS (Protocolo Q1): <i>m/z</i> 1370.2 [M+H ⁺] (0.93 minutos)	N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]-L-valil-N-{4-[(9S,12S,13R)-12-[(2S)-butan-2-il]-13-(2-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}propil]pirrolidin-1-il)-2-oxoetil)-4,6,6,11-tetrametil-3,7,10-trioxo-9-(propan-2-il)-2,14-dioxa-4,8,11-triazapentadec-1-il]fenil}-N-5~-carbamoil-L-ornitinamida
MalC6Am-#153	HPLC (Protocolo A): <i>m/z</i> 922.5 [M+H ⁺] (7.352 minutos)	1,2-dimetil-D-prolil-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(2S)-1-[(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexyl]amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il]amino]-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il]-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida
PFPCOPeg2C2AmPeg2C2-#69	HPLC (Protocolo BB): <i>m/z</i> 1217.6 [M+H ⁺] (12.936 minutos)	N-[11,20-dioxo-20-(pentafluorofenoxi)-4,7,14,17-tetraoxa-10-azaicosan-1-oyl]-2-Metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1S)-1-carboxi-2-feniletil]amino]-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il]-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida
mcValCitPABC-#246	LC-MS (Protocolo Q): <i>m/z</i> 1327.9 [M+H ⁺] (1.36 minutos)	N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]-L-valil-N-(4-[(6S,9R,10R)-6-bencil-10-[(2S)-1-[(3R,4S,5S)-4-[(1,2-dimetil-L-prolil-L-valil)(metil)amino]-3-metoxi-5-metilheptanoil]pirrolidin-2-il]-9-metil-3,8-dioxo-2,11-dioxa-4,7-diazadodec-1-il]fenil)-N-5~-carbamoil-L-ornitinamida
PFPCOPeg2C2AlaAlaAsnPABC-#54	HPLC (Protocolo AB): <i>m/z</i> 1503.6 [M+H ⁺] (8.06 minutos)	N-(3-{2-[3-oxo-3-(pentafluorofenoxi)propoxi]ethoxi}propanoil)-L-alanil-L-alanil-N~1~-{4-[(8S,11S,12R)-11-[(2S)-butan-2-il]-12-(2-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}propil]pirrolidin-1-il)-2-oxoetil)-5,5,10-trimetil-3,6,9-trioxo-8-(propan-2-il)-2,13-dioxa-4,7,10-triazatetradec-1-il]fenil]-L-aspartamida
PFPCOPeg2C2-#54	HPLC (Protocolo AB): <i>m/z</i> 1098.4 [M+H ⁺] (8.44 minutos)	2-metil-N-(3-{2-[3-oxo-3-(pentafluorofenoxi)propoxi]ethoxi}propanoil)alanyl-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}propil]pirrolidin-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida
PFPCOPeg2C2AmPeg2C2PABC-#54	HPLC (Protocolo AB): <i>m/z</i> 1428.2 [M+Na ⁺] (10.32 minutos)	N-[(4-[(11,20-dioxo-20-(pentafluorofenoxi)-4,7,14,17-tetraoxa-10-azaicosan-1-oyl]amino}benzyl)oxi]carbonil)-2-Metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}propil]pirrolidin-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida
AmPeg6C2-#115	HPLC (Protocolo A): <i>m/z</i> 1053.5 [M+H ⁺] (7.35 minutos)	N-(21-amino-4,7,10,13,16,19-hexaohenicosan-1-oyl)-N,2-Dimetilalanil-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1S)-1-carboxi-2-feniletil]amino]-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il]-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida

PFPCOPeg5C2-#115	LC-MS (Protocolo Q): m/z 1205.1 [M+H ⁺] (1.99 minutos)	N,2-dimetil-N-[19-oxo-19-(pentafluorofenoxi)-4,7,10,13,16-pentaoxanonadecan-1-oi]alanil-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1S)-1-carboxi-2-feniletíl]amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il]-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida
mcGly-#201	HPLC (Protocolo EB): (4.0 minutos): ESI-MS m/z 1023.59 [M+H ⁺]	1,2-dimetil-D-prolil-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(2S)-3-[4-[(N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]glycyl)amino]fenil]-1-metoxi-1-oxopropan-2-il]amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il]-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida
AzCOC2Ph4AmCOPeg2C 2-#54	HPLC (Protocolo FB): m/z 1132.4 [M+H ⁺] (10.18 minutos)	2-metil-N-(3-{2-[3-oxo-3-[(4-[3-oxo-3-(2-oxoazetidin-1-il)propil]fenil)amino]propoxi]ethoxi}propanoil)alanil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino]propil]pirrolidin-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida
AzCOC2Ph4AmPeg1C1V alCitPABC-#54	HPLC (Protocolo FB): m/z 1465.8 [M+H ⁺] (10.97 minutos)	N-{[2-oxo-2-[(4-[3-oxo-3-(2-oxoazetidin-1-il)propil]fenil)amino]etoxi]acetil}-L-valil-N-{4-[(8S,11S,12R)-11-[(2S)-butan-2-il]-12-(2-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino]propil]pirrolidin-1-il]-2-oxoetil)-5,5,10-trimetil-3,6,9-trioxo-8-(propan-2-il)-2,13-dioxa-4,7,10-triazatetradec-1-il]fenil}-N-5--carbamoil-L-ornitinamida
AzCOC2Ph4AmPeg1C1V alCitPABC-#30	HPLC (Protocolo FB): m/z 1491.8 [M+H ⁺] (10.56 minutos)	N-{[2-oxo-2-[(4-[3-oxo-3-(2-oxoazetidin-1-il)propil]fenil)amino]etoxi]acetil}-L-valil-N-5--carbamoil-N-[4-[(1-[(2S)-1-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino]propil]pirrolidin-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il](metil)amino}-3-metil-1-oxobutan-2-il]carbamoil]ciclopentil]carbamoil]oxi}metil)fenil]-L-ornitinamida
AzCOC2Ph4AmCOPeg2C 2-#69	HPLC (Protocolo AB): m/z 1065.3 [M+H ⁺] (12.02 minutos)	2-metil-N-(3-{2-[3-oxo-3-[(4-[3-oxo-3-(2-oxoazetidin-1-il)propil]fenil)amino]propoxi]ethoxi}propanoil)alanyl-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1S)-1-carboxi-2-feniletíl]amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il]-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida
AzCOC2Ph4AmCOPeg2C 2-#115	HPLC (Protocolo AA): m/z 1078.6 [M+H ⁺] (12.02 minutos)	N,2-dimetil-N-(3-{2-[3-oxo-3-[(4-[3-oxo-3-(2-oxoazetidin-1-il)propil]fenil)amino]propoxi]ethoxi}propanoil)alanyl-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1S)-1-carboxi-2-feniletíl]amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il]-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida
AcLysValCitPABC-#54	LC-MS (Protocolo Q): m/z 1319.3 [M+H ²⁺] (1.34 minutos)	N-2~-acetil-L-lysyl-L-valil-N-[4-[(8S,11S,12R)-11-[(2S)-butan-2-il]-12-(2-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino]propil]pirrolidin-1-il]-2-oxoetil)-5,5,10-trimetil-3,6,9-trioxo-8-(propan-2-il)-2,13-dioxa-4,7,10-triazatetradec-1-il]fenil}-N-5--carbamoil-L-ornitinamida, sal de ácido trifluoroacético

Cuadro 19A – Conjugados seleccionados de la invención

ADC-Ligador-Carga Útil #	Método de Prep.	Cantidad de ácido 2,2',2"-fosfantriiltripropanóico/Ligador-Carga Útil o TCEP/ PL (x/y)	Masa Teórica Δ o carga útil/ligador peso molecular
H-(C)_MalPeg3C2-#41	Procedimiento general F	2.3/7.5	1031
H-(C)_MalPeg6C2-#42	Procedimiento general F	2.3/7.5	1177
H-(C)_mc-#44	Procedimiento general F	2.3/7.5	913
H-(C)_MalPeg3C2-#44	Procedimiento general F	2.2/7	1003
H-(C)_MalPeg6C2-#44	Procedimiento general F	2.0/7	1135
H-(C)_mcValCitPABC-#44	Procedimiento general F	2.5/7.5	1319
H-(C)_Mal-PEG3C2-#45	Procedimiento general F	2.3/7.5	1017
H-(C)_Mal-PEG6C2-#45	Procedimiento general F	2.05/10	1149
H-(C)_mcValCitPABC-#45	Procedimiento general F	2.5/10	1342
H-(C)_mc-#54	Procedimiento general F	2.2/7.5	897
H-(C)_Mal-PEG6C2-#69	Procedimiento general F	2.1/7.5	1119
H-(C)_mcValCitPABC-#69	Procedimiento general F	2.5/7.5	1303
H-(C)_mcValCitPABC-#70	Procedimiento general F	2.0/7	1317
H-(C)_mc-#79	Procedimiento general F	2.0/7	941
H-(C)_mcValCitPABC-#79	Procedimiento general F	2.3/7.5	1345
H-(C)_mc-#115	Procedimiento general F	2.2/6.5	911
H-A114C-(C114)_mc-#51	Procedimiento general G	NA	934.21
H-A114C-(C114)_mc-#47	Procedimiento general G	NA	962.27
H-A114C-(C114)_mc-#54	Procedimiento general G	NA	936.2
H-A114C-(C114)_mcValCitPABC-#47	Procedimiento general H	50/10	1367.72
H-A114C-(C114)_mcValCitPABC-#54	Procedimiento general H	100/10	1341.68
H-A114C-(C114)_mcValCitPABC-#26	Procedimiento general H	50/10	1385.8
H-A114C-(C114)_mc-#26	Procedimiento general H	50/10	980.35
H-A114C-(C114)_mcValCitPABC-#36	Procedimiento general H	50/10	1302.69
H-A114C-(C114)_mcValCitPABC-#42	Procedimiento general H	100/7	1360.73
H-A114C-(C114)_mc-#42	Procedimiento general H	50/10	955.27
H-(C)-mcValCitPABC-#54	Procedimiento general F	2.5/10	1342
H-(C)_mcValCitPABCAmPeg3C2-#54	Procedimiento general F	2.5/9	1544

H- (C)_mcValCitPABCAmPeg6C 2-#54	Procedimiento general F	2.6/10	1677
H-(C)_mc-#47	Procedimiento general F	1.9/10	962.27
H-(C)_MalPeg3C2-#54	Procedimiento general F	1.9/10	1026
H-(C)_mc-#54	Procedimiento general F	2.07/10	936.2
H- (C)_mcValCitPABCAmPeg3C 2-#47	Procedimiento general F	2.3/7.5	1569.96
H-(C)_MalPeg3C2-#47	Procedimiento general F	2.3/7.5	1052
H- (C)_mcValCitPABCAmPeg3C 2-#42	Procedimiento general F	2.5/7.5	1562.87
H-(C)_mc-#41	Procedimiento general F	2.5/10	941.24
H- (C)_mcValCitPABCAmPeg3C 2-#26	Procedimiento general F	2.5/10	1589.04
H- (C)_mcValCitPABCAmPeg6C 2-#47	Procedimiento general F	2.4/7	1701.9
H-(C)_MalPeg3C2-#42	Procedimiento general F	2.3/7	1044.58
H- (C)_mcValCitPABCAmPeg6C 2-#26	Procedimiento general F	2.5/7.5	1719.9
H- (C)_mcValCitPABCAmPeg6C 2-#42	Procedimiento general F	2.3/7.5	1696.1
H-(C)_MalPeg6C2-#54	Procedimiento general F	2.3/7.5	1158.5
H-(C)_MalPeg6C2-#47	Procedimiento general F	2.3/7.5	1184.5
H-(C)_MalPeg6C2-#26	Procedimiento general F	2.3/7.5	1202.6
H-(C)-MalPeg6C2-#42	Procedimiento general F	2.3/7.5	1177
H-(C)_mc-#36	Procedimiento general F	2.3/7.5	896
H-(C)_mcValCitPABC-#60	Procedimiento general F	3.0/7	1284.61
H-(C)_MalPeg3C2-#26	Procedimiento general F	2.5/10	1070.42
H- (C)_mcValCitPABCAmPeg3C 2-#36	Procedimiento general F	3.0/10	1505.93
H-A114C- (C114)_mcValCitPABCAmPeg 3C2-#36	Procedimiento general H	50/10	1505.93
H-A114C- (C114)_MalPeg6C2-#54	Procedimiento general H	50/10	1158.5
H-(C)_MalPeg3C2-#60	Procedimiento general F	2.3/7.5	969.23
H-(C)_MalPeg6C2-#60	Procedimiento general F	2.3/7.5	1101.4
H-(C)_MalPeg6C2-#41	Procedimiento general F	2.3/7.5	1163.5
H-(C)-mc-#69	Procedimiento general F	2.2/7.5	897
H-(C)_MalPeg3C2-#36	Procedimiento general F	2.15/10	987.31
H- (C)_mcValCitPABCAmPeg6C 2-#36	Procedimiento general F	2.25/10	1636

H-(C)_MalPeg6C2-#36	Procedimiento general F	2.15/10	1119.5
H- (C)_mcValCitPABCAmPeg3C 2-#41	Procedimiento general F	2.5/10	1549.94
H-(C)-MalPeg3C2-#41	Procedimiento general F	2.3/7.5	1031
H- (C)_mcValCitPABCAmPeg6C 2-#60	Procedimiento general F	2.5/10	1620
H-A114C-(C114)_mc-#66	Procedimiento general H	50/7	866.5
H-L398C+L443C- (C398+C443)_mcValCitPABC -#54	Procedimiento general H	50/7	1341.68
H-K392C+L443C- (C392+C443)_mcValCitPABC -#54	Procedimiento general H	100/10	1341
H-L443C- (C443)_mcValCitPABC-#54	Procedimiento general H	100/10	1341
H-L398C+V422C- (C398+C422)_mcValCitPABC -#54	Procedimiento general H	50/7	1341.68
H-(C)-mc-#44	Procedimiento general F	2.3/7.5	913
H-(C)-Mal-PEG3C2-#45	Procedimiento general F	2.3/7.5	1017
H-(C)_2AcAmPeg6C2-#66	Procedimiento general F	2.4/10	1049.6
H-(C)-Mal-PEG6C2-#45	Procedimiento general F	2.05/10	1149
H-(C)-mc-#79	Procedimiento general F	2.0/7	941
H-(C)-MalPeg3C2-#44	Procedimiento general F	2.2/7	1003
H-(C)-mcValCitPABC-#70	Procedimiento general F	2.0/7	1317
H-(C)-MalPeg6C2-#44	Procedimiento general F	2.0/7	1135
H-A114C- (C114)_mcValCitPABC-#69	Procedimiento general H	100/8.25	1302
H-(C)-mcValCitPABC-#79	Procedimiento general F	2.3/7.5	1345
H-A114C- (C114)_mcValCitPABC-#79	Procedimiento general H	100/7.5	1346
H-(C)-mcValCitPABC-#44	Procedimiento general F	2.5/7.5	1319
H-A114C- (C114)_mcValCitPABC-#88	Procedimiento general H	100/7.5	1355
H-(C)-mcValCitPABC-#69	Procedimiento general F	2.5/7.5	1303
H- (C)_2AcAmCapValCitPABC- #66	Procedimiento general F	2.2/10	1313.49
H-A114C- (C114)_mcValCitPABC-#45	Procedimiento general H	100/7.5	1331.7
H-A114C- (C114)_mcValCitPABC-#34	Procedimiento general H	100/10	1357
H-A114C-(C114)_mc-#45	Procedimiento general H	100/10	926
H-A114C-(C114)_mc-#70	Procedimiento general H	100/10	911.15
H-(C)_mcValCitPABC-#112	Procedimiento general F	2.3/7.5	1288
H-(C)-Mal-PEG6C2-#69	Procedimiento general F	2.1/7.5	1119
H-Q347C- (C347)_mcValCitPABC-#69	Procedimiento general H	100/10	1302

H-Y373C- (C373)_mcValCitPABC-#69	Procedimiento general H	100/10	1302
H-E388C- (C388)_mcValCitPABC-#69	Procedimiento general H	100/10	1302
H-N421C- (C421)_mcValCitPABC-#69	Procedimiento general H	100/10	1302
H-L443C- (C443)_mcValCitPABC-#69	Procedimiento general H	100/10	1302
H-L443C- (C443)_mcValCitPABC-#79	Procedimiento general H	100/10	1346
H-A114C- (C114)_mcValCitPABC-#95	Procedimiento general H	100/10	1354
H-A114C- (C114)_mcValCitPABC-#98	Procedimiento general H	100/10	1367
H-A114C- (C114)_MalPeg3C2-#69	Procedimiento general H	100/10	987.2
H-N297Q-(Q)_AmPeg6C2-#42	Procedimiento general K	NA	1080
H-N297Q-(Q)_AmPeg6C2-#54	Procedimiento general K	NA	1061
H-N297Q-(Q)_AmPeg6C2-#47	Procedimiento general K	NA	1087
H-N297Q-(Q)_AmPeg6C2-#36	Procedimiento general K	NA	1022
H-N297Q-(Q)_AmPeg6C2-#26	Procedimiento general K	NA	1105
H-N297Q-(Q)_AmPeg6C2-#66	Procedimiento general K	NA	992
H-L443C-(C443)_MalPeg6C2- #69	Procedimiento general H	100/10	1119
H-Q347C- (C347)_MalPeg6C2-#69	Procedimiento general H	100/10	1119
H-E388C- (C388)_MalPeg6C2-#69	Procedimiento general H	100/10	1119
H-N421C- (C421)_MalPeg6C2-#69	Procedimiento general H	100/10	1119
H-E380C- (C380)_MalPeg6C2-#69	Procedimiento general H	100/10	1119
H-L398C+L443C- (C398+C443)_MalPeg6C2- #69	Procedimiento general H	100/10	1119
H-K392C+L443C- (C392+C443)_MalPeg6C2- #69	Procedimiento general H	100/10	1119
H-kA111C- (kC111)_MalPeg6C2-#69	Procedimiento general H	100/10	1119
H-kK183C- (kC183)_MalPeg6C2-#69	Procedimiento general H	100/10	1119
H-kK207C- (kC207)_MalPeg6C2-#69	Procedimiento general H	100/10	1119
H-A114C- (C114)_mcValCitPABC-#108	Procedimiento general H	100/10	1314.59
H-A114C- (C114)_mcValCitPABC-#84	Procedimiento general H	100/10	1371
H-A114C- (C114)_mcValCitPABC-#226	Procedimiento general H	100/10	1330
H-A114C-(C114)_mc-#108	Procedimiento general H	100/10	909.12
H-A114C- (C114)_mcValCitPABC-#117	Procedimiento general H	100/10	1342
H-A114C- (C114)_mcValCitPABC-#115	Procedimiento general H	100/10	1316
H-A114C- (C114)_MalPeg6C2-#98	Procedimiento general H	100/10	1184
IL13Ra2-AB08-v1010-hG1- (C)_mcValCitPABC-#54	Procedimiento general F	2.2/7	1341.68
IL13Ra2-AB08-v1010-hG1- (C)_mc-#69	Procedimiento general F	2.3/7	897.12

IL13Ra2-AB08-v1010-hG1-(C)_MalPeg6C2-#69	Procedimiento general F	2.3/8	1119
IL13Ra2-AB08-v1010-hG1-(C)_mcValCitPABC-#69	Procedimiento general F	2.5/8	1302
H-A114C-(C114)_MalPeg6C2-0#118	Procedimiento general H	100/15	1145
H-A114C-(C114)_mcValCitPABC-0#118	Procedimiento general H	100/15	1328
H-A114C-(C114)_mcValCitPABC-#80	Procedimiento general H	100/15	1332
H-A114C-(C114)_mc-#117	Procedimiento general H	100/15	937
H-A114C-(C114)_mcValCitPABC-#232	Procedimiento general H	100/15	1366
H-A114C-(C114)_MalPeg6C2-#230	Procedimiento general H	100/15	1145
H-A114C-(C114)_MalPeg6C2-#117	Procedimiento general H	100/15	1159
H-A114C-(C114)_mc-#115	Procedimiento general H	100/10	911
H-A114C-(C114)_mv-#115	Procedimiento general H	100/10	897
H-A114C-(C114)_mb-#69	Procedimiento general H	100/15	869
H-A114C-(C114)_mv-#69	Procedimiento general H	100/15	883
H-A114C-(C114)_mc-0#118	Procedimiento general H	100/15	923
H-(C)_mc-#117	Procedimiento general F	2.0/6.5	937
H-(C)_MalPeg6C2-#117	Procedimiento general F	2.05/6.5	1159
H-(C)_mc-0#118	Procedimiento general F	2.1/7	923
H-(C)_MalPeg6C2-0#118	Procedimiento general F	2.2/7.5	1145
IL13Ra2-AB08-v1010-hG1-(C)_mc-0#118	Procedimiento general F	2.35/7	923
IL13Ra2-AB08-v1010-hG1-(C)_mc-#226	Procedimiento general F	3.0/10	925
IL13Ra2-AB08-v1010-hG1-(C)_mc-#117	Procedimiento general F	3.0/10	937
IL13Ra2-AB08-v1010-hG1-(C)_MalPeg6C2-#117	Procedimiento general F	3.0/10	1159
IL13Ra2-AB08-v1010-hG1-(C)_MalPeg6C2-0#118	Procedimiento general F	3.0/10	1145
H-A114C-(C114)_MalPeg6C2-#226	Procedimiento general H	100/10	1147
H-A114C-(C114)_mc-#172	Procedimiento general H	100/15	940.53
H-A114C-(C114)_mb-0#118	Procedimiento general H	100/15	895
H-A114C-(C114)_me-0#118	Procedimiento general H	100/15	937
H-A114C-(C114)_mcValCitPABC-#134	Procedimiento general H	100/15	1314
H-A114C-(C114)_mc-#131	Procedimiento general H	100/15	937
H-A114C-(C114)_MalPeg6C2-#126	Procedimiento general H	100/15	1147
H-A114C-(C114)_MalPeg6C2-#123	Procedimiento general H	100/15	1174
H-A114C-(C114)_mc-#126	Procedimiento general H	100/15	925
H-A114C-(C114)_mv-0#118	Procedimiento general H	100/15	909
H-(C)_MalPeg6C2-#226	Procedimiento general F	2.4/7	1147

H-(C)_mc-#226	Procedimiento general F	2.4/7	925
IL13Ra2-AB08-v1010-hG1-(C)_MalPeg6C2-#226	Procedimiento general F	3.0/10	1147
Notch-28-cG1-(C)_mc-0#118	Procedimiento general F	2.5/7	923
Notch-28-cG1-(C)_mc-#115	Procedimiento general F	2.35/7	911
Notch-28-cG1-(C)_MalPeg6C2-0#118	Procedimiento general F	2.35/7	1145
Notch-28-cG1-(C)_me-0#118	Procedimiento general F	2.4/7	937
Notch-75-cG1-(C)_mc-0#118	Procedimiento general F	2.5/7	923
IL13Ra2-19F9-cG1-(C)_mcValCitPABC-#54	Procedimiento general F	2.5/8	1341.68
IL13Ra2-19F9-cG1-(C)_mcValCitPABC-#112	Procedimiento general F	2.5/7	1288
Notch-28-cG1-(C)_mcValCitPABC-#112	Procedimiento general F	2.3/7	1288
Notch-28-cG1-(C)_MalPeg6C2-#69	Procedimiento general F	2.4/7	1119
Notch-75-cG1-(C)_MalPeg6C2-#69	Procedimiento general F	2.4/7	1119
H-(C)_m(H2O)c-0#118	Procedimiento general I	2.35/7	941
H-(C)_Mal(H2O)Peg6C2-0#118	Procedimiento general I	2.35/7	1163
H-(C)_Mal(H2O)Peg6C2-#69	Procedimiento general I	2.1/7	1137
H-(C)_m(H2O)c-#69	Procedimiento general I	2.4/7	915
H-(C)_me-0#118	Procedimiento general F	2.2/7	937
H-(C)_mv-0#118	Procedimiento general F	2.2/7	909
H-(C)_mb-0#118	Procedimiento general F	2.1/7	895
H-A114C-(C114)_MalC6-#54	Procedimiento general H	100/5	922.22
H-A114C-(C114)_mc-#231	Procedimiento general H	100/5	1213
H-A114C-(C114)_MalC6-0#118	Procedimiento general H	100/5	909.18
H-(C)_Mal(H2O)Peg6C2-#115	Procedimiento general I	2.4/7	1151
H-A114C-(C114)_mc-#158	Procedimiento general H	100/10	951
H-A114C-(C114)_mcValCitPABC-#231	Procedimiento general H	100/10	1617
H-(C)_m(H2O)c-#115	Procedimiento general I	2.4/7	929
Notch-75-cG1-(C)_mc-#115	Procedimiento general F	3.0/7.0	911.15
Notch-75-cG1-(C)_me-0#118	Procedimiento general F	3.0/7.0	937
Notch-75-cG1-(C)_MalPeg6C2-0#118	Procedimiento general F	3.0/7.0	1144
H-A114C-(C114)_mc-#237	Procedimiento general H	100/10	963
H-A114C-(C114)_mc-#145	Procedimiento general H	100/10	897
H-A114C-(C114)_MalPeg6C2-#145	Procedimiento general H	100/10	1119
H-A114C-(C114)_mc-#162	Procedimiento general H	100/10	937
H-A114C-(C114)_MalC6Am-#151	Procedimiento general H	100/10	905

Notch-28-cG1-(C)_m(H2O)c-0#118	Procedimiento general I	2.2/7	941
Notch-75-cG1-(C)_m(H2O)c-0#118	Procedimiento general I	2.2/7	941
H-(kK188)_COPEG2C2ValCitPABC-#54	Procedimiento general J	-	1318
IL13Ra2-AB08-v1010-hG1-(C)_Mal(H2O)Peg6C2-0#118	Procedimiento general F	2.3/7	1163
IL13Ra2-AB08-v1010-hG1-(C)_Mal(H2O)Peg6C2-#115	Procedimiento general F	2.3/7	1151
IL13Ra2-AB08-v1010-hG1-(C)_mc-#115	Procedimiento general F	2.35/7	911
IL13Ra2-AB08-v1010-hG1-(C)_m(H2O)c-0#118	Procedimiento general F	2.8/7	941
H-(C)_mcValCitPABC-0#118	Procedimiento general F	2.2/7	1328
IL13Ra2-AB08-v1010-hG1-(C)_m(H2O)c-#115	Procedimiento general F	2.35/7	929
H-A114C-(C114)_mcValCitPABC-#154	Procedimiento general H	100/5	1369
H-A114C-(C114)_MalC6Am-#153	Procedimiento general H	100/10	921
IL13Ra2-AB08-v1010-Q347C+kK183C-hG1-(C347+kC183)_mcValCitPABC-#54	Procedimiento general H	100/10	1341.68
IL13Ra2-AB08-v1010-Q347C-hG1-(C347)_mcValCitPABC-#54	Procedimiento general H	100/10	1341.68
IL13Ra2-AB08-v1010-hG1-(kK188)_COPEG2C2AmPeg2C2-#69	Procedimiento general J	-	1032
IL13Ra2-AB08-v1010-hG1-(kK188)_COPEG2C2ValCitPABC-#54	Procedimiento general J	-	1318
IL13Ra2-AB08-v1010-L443C-hG1-(C443)_mcValCitPABC-#54	Procedimiento general H	100/10	1341.68
IL13Ra2-AB08-v1010-K392C+L443C-hG1-(C392+C443)_mcValCitPABC-#54	Procedimiento general H	100/10	1341.68
IL13Ra2-AB08-v1010-L443C+kK183C-hG1-(C443+kC183)_mcValCitPABC-#54	Procedimiento general H	100/10	1341.68
H-(C)_mcValCitPABC-#98	Procedimiento general F	2.2/7	1367
H-A114C-(C114)_mcValCitPABC-#246	Procedimiento general H	100/10	1327
H-H435A-(C)_mcValCitPABC-#54	Procedimiento general F	2.2/8	1341.7
H-M428L+N434S-(C)_mcValCitPABC-#70	Procedimiento general F	2.2/8	1316
H-M428L+N434S-(C)_mcValCitPABC-#54	Procedimiento general F	2.2/8	1341.7
H-E388C+N421C-(C388+C421)_mcValCitPABC-#54	Procedimiento general H	100/10	1341
H-Q347C+K392C-(C347+C392)_mcValCitPABC-#54	Procedimiento general H	100/10	1341
H-L443C+kK183C-(C443+kC183)_mcValCitPABC-#54	Procedimiento general H	100/10	1341

H-Q347C+kK183C- (C347+kC183)_mcValCitPAB C-#54	Procedimiento general H	100/10	1341
H-Q347C- (C347)_mcValCitPABC-#54	Procedimiento general H	100/10	1341
H-K392C+L443C- (C392+C443)_mc-#115	Procedimiento general H	100/10	911
H-E388C+N421C- (C388+C421)_mc-#115	Procedimiento general H	100/10	911
H-Q347C+K392C- (C347+C392)_mc-#115	Procedimiento general H	100/10	911
H-L443C+kK183C- (C443+kC183)_mc-#115	Procedimiento general H	100/10	911
H-Q347C+kK183C- (C347+kC183)_mc-#115	Procedimiento general H	100/10	911
H-Q347C-(C347)_mc-#115	Procedimiento general H	100/10	911
H-kK183C- (kC183)_mcValCitPABC-#54	Procedimiento general H	100/10	1341
H-E388C- (C388)_mcValCitPABC-#54	Procedimiento general H	100/10	1341
H-kK183C-(kC183)_mc-#115	Procedimiento general H	100/10	911
H-E388C-(C388)_mc-#115	Procedimiento general H	100/10	911
H-L443C-(C443)_mc-#115	Procedimiento general H	100/10	911
H-N421C- (C421)_mcValCitPABC-#54	Procedimiento general H	100/10	1341
H-N421C-(C421)_mc-#115	Procedimiento general H	100/10	911
H-A114C-(C114)_mcGly-#201	Procedimiento general G	100/10	1023

Cuadro 19B – Conjugados seleccionados de la invención

ADC-Ligador-Carga Útil #	Espectro de masa: HPLC-SEC tiempo de retención y masa HPLC Δ para la porción de Cadena Pesada (HC) (hasta 6 Da de diferencia con masa teórica Δ)	Carga o relación Fármaco por Anticuerpo (DAR)
H-(C)_MalPeg3C2-#41	SEC (Protocolo O): 7.317 minutos; HPLC (Protocolo P): HC Δ masa = 1032	4.3
H-(C)_MalPeg6C2-#42	SEC (Protocolo O): 7.177 minutos; HPLC (Protocolo P): HC Δ masa = 1180	3.9
H-(C)_mc-#44	SEC (Protocolo O): 7.195 minutos; HPLC (Protocolo P): HC Δ masa = 915	4.4
H-(C)_MalPeg3C2-#44	SEC (Protocolo O): 7.247 minutos; HPLC (Protocolo P): HC Δ masa = 1005	3.4
H-(C)_MalPeg6C2-#44	SEC (Protocolo O): 7.237 minutos; HPLC (Protocolo P): HC Δ masa = 1135	3.4
H-(C)_mcValCitPABC-#44	SEC (Protocolo O): 7.351 minutos; HPLC (Protocolo P): HC Δ masa = 1321	4.2
H-(C)_Mal-PEG3C2-#45	SEC (Protocolo O): 7.364 minutos; HPLC (Protocolo P): HC Δ masa = 1017	4.3
H-(C)_Mal-PEG6C2-#45	SEC (Protocolo O): 7.419 minutos; HPLC (Protocolo P): HC Δ masa = 1154	3.9
H-(C)_mcValCitPABC-#45	SEC (Protocolo O): 7.159 minutos; HPLC (Protocolo P): HC Δ masa = 1343	4.1
H-(C)_mc-#54	SEC (Protocolo O): 7.192 minutos; HPLC (Protocolo P): HC Δ masa = 899	4.5
H-(C)_Mal-PEG6C2-#69	SEC (Protocolo O): 7.350 minutos; HPLC (Protocolo P): HC Δ masa = 1122	3.4
H-(C)_mcValCitPABC-#69	SEC (Protocolo O): 7.254 minutos; HPLC (Protocolo P): HC Δ masa = 1305	4.5
H-(C)_mcValCitPABC-#70	SEC (Protocolo O): 7.466 minutos; HPLC (Protocolo P): HC Δ masa = 1318	3.7
H-(C)_mc-#79	SEC (Protocolo O): 7.478 minutos; HPLC (Protocolo P): HC Δ masa = 946	4
H-(C)_mcValCitPABC-#79	SEC (Protocolo O): 7.635 minutos; HPLC (Protocolo P): HC Δ masa = 1349	3.7
H-(C)_mc-#115	SEC (Protocolo O): 7.510 minutos; HPLC (Protocolo P): HC Δ masa = 912	3.54
H-A114C-(C114)_mc-#51	-	2.4
H-A114C-(C114)_mc-#47	-	2.3
H-A114C-(C114)_mc-#54	-	2.3
H-A114C-(C114)_mcValCitPABC- #47	-	2
H-A114C-(C114)_mcValCitPABC- #54	-	1.9
H-A114C-(C114)_mcValCitPABC- #26	-	2
H-A114C-(C114)_mc-#26	-	1.9
H-A114C-(C114)_mcValCitPABC- #36	-	2

H-A114C-(C114)_mcValCitPABC- #42	SEC (Protocolo P): 7.681 minutos; HPLC (Protocolo O): HC Δ masa = 1378	1.95
H-A114C-(C114)_mc-#42	-	2
H-(C)-mcValCitPABC-#54	SEC (Protocolo P): 7.159 minutos; HPLC (Protocolo O): HC Δ masa = 1343	4.1
H-(C)_mcValCitPABCAmPeg3C2- #54	-	4.6
H-(C)_mcValCitPABCAmPeg6C2- #54	-	4.5
H-(C)_mc-#47	-	4.2
H-(C)_MalPeg3C2-#54	SEC (Protocolo P): 7.179 minutos; HPLC (Protocolo O): HC Δ masa = 1028	3.7
H-(C)_mc-#54	-	4
H-(C)_mcValCitPABCAmPeg3C2- #47	-	3.7
H-(C)_MalPeg3C2-#47	-	4.3
H-(C)_mcValCitPABCAmPeg3C2- #42	-	4.3
H-(C)_mc-#41	-	3.1
H-(C)_mcValCitPABCAmPeg3C2- #26	-	3
H-(C)_mcValCitPABCAmPeg6C2- #47	-	4.2
H-(C)_MalPeg3C2-#42	SEC (Protocolo P): 7.142 minutos; HPLC (Protocolo O): HC Δ masa = 1050	4.3
H-(C)_mcValCitPABCAmPeg6C2- #26	-	4.2
H-(C)_mcValCitPABCAmPeg6C2- #42	-	4.1
H-(C)_MalPeg6C2-#54	SEC (Protocolo P): 7.254 minutos; HPLC (Protocolo O): HC Δ masa = 1161	4.4
H-(C)_MalPeg6C2-#47	SEC (Protocolo P): 7.303 minutos; HPLC (Protocolo O): HC Δ masa = 1182	4.4
H-(C)_MalPeg6C2-#26	-	4.1
H-(C)-MalPeg6C2-#42	SEC (Protocolo P): 7.177 minutos; HPLC (Protocolo O): HC Δ masa = 1180	3.9
H-(C)_mc-#36	-	4.2
H-(C)_mcValCitPABC-#60	-	3.8
H-(C)_MalPeg3C2-#26	-	3.8
H-(C)_mcValCitPABCAmPeg3C2- #36	-	3.5
H-A114C- (C114)_mcValCitPABCAmPeg3C2- #36	-	1.9
H-A114C-(C114)_MalPeg6C2-#54	-	2
H-(C)_MalPeg3C2-#60	-	4.2
H-(C)_MalPeg6C2-#60	-	4.1
H-(C)_MalPeg6C2-#41	-	4
H-(C)-mc-#69	SEC (Protocolo P): 7.192 minutos; HPLC (Protocolo O): HC Δ masa = 899	4.5
H-(C)_MalPeg3C2-#36	-	5.2
H-(C)_mcValCitPABCAmPeg6C2- #36	-	4.2
H-(C)_MalPeg6C2-#36	-	5
H-(C)_mcValCitPABCAmPeg3C2- #41	-	4.4
H-(C)-MalPeg3C2-#41	SEC (Protocolo P): 7.317 minutos; HPLC (Protocolo O): HC Δ masa = 1032	4.3

H-(C)_mcValCitPABCAmPeg6C2- #60	-	4.1
H-A114C-(C114)_mc-#66	-	1.8
H-L398C+L443C- (C398+C443)_mcValCitPABC-#54	-	3.8
H-K392C+L443C- (C392+C443)_mcValCitPABC-#54	-	3.8
H-L443C-(C443)_mcValCitPABC- #54	SEC (Protocolo P): 8.827 minutos; HPLC (Protocolo O): HC Δ masa = 1344	2
H-L398C+V422C- (C398+C422)_mcValCitPABC-#54	-	3.4
H-(C)-mc-#44	SEC (Protocolo P): 7.195 minutos; HPLC (Protocolo O): HC Δ masa = 915	4.4
H-(C)-Mal-PEG3C2-#45	SEC (Protocolo P): 7.364 minutos; HPLC (Protocolo O): HC Δ masa = 1017	4.3
H-(C)_2AcAmPeg6C2-#66	-	4
H-(C)-Mal-PEG6C2-#45	SEC (Protocolo P): 7.419 minutos; HPLC (Protocolo O): HC Δ masa = 1154	3.9
H-(C)-mc-#79	SEC (Protocolo P): 7.478 minutos; HPLC (Protocolo O): HC Δ masa = 946	4
H-(C)-MalPeg3C2-#44	SEC (Protocolo P): 7.247 minutos; HPLC (Protocolo O): HC Δ masa = 1005	3.4
H-(C)-mcValCitPABC-#70	SEC (Protocolo P): 7.466 minutos; HPLC (Protocolo O): HC Δ masa = 1318	3.7
H-(C)-MalPeg6C2-#44	SEC (Protocolo P): 7.237 minutos; HPLC (Protocolo O): HC Δ masa = 1135	3.4
H-A114C-(C114)_mcValCitPABC- #69	-	2
H-(C)-mcValCitPABC-#79	SEC (Protocolo P): 7.635 minutos; HPLC (Protocolo O): HC Δ masa = 1349	3.7
H-A114C-(C114)_mcValCitPABC- #79	-	1.84
H-(C)-mcValCitPABC-#44	SEC (Protocolo P): 7.351 minutos; HPLC (Protocolo O): HC Δ masa = 1321	4.2
H-A114C-(C114)_mcValCitPABC- #88		1.93
H-(C)-mcValCitPABC-#69	SEC (Protocolo P): 7.254 minutos; HPLC (Protocolo O): HC Δ masa = 1305	4.5
H-(C)_2AcAmCapValCitPABC-#66	-	3.3
H-A114C-(C114)_mcValCitPABC- #45	-	1.92
H-A114C-(C114)_mcValCitPABC- #34	-	2
H-A114C-(C114)_mc-#45	-	1.95
H-A114C-(C114)_mc-#70	-	2
H-(C)_mcValCitPABC-#112	SEC (Protocolo P): 7.083 minutos; HPLC (Protocolo O): HC Δ masa = 1291	4.4
H-(C)-Mal-PEG6C2-#69	SEC (Protocolo P): 7.350 minutos; HPLC (Protocolo O): HC Δ masa = 1122	3.4
H-Q347C-(C347)_mcValCitPABC- #69	-	2
H-Y373C-(C373)_mcValCitPABC- #69	-	1.6
H-E388C-(C388)_mcValCitPABC- #69	-	2

H-N421C-(C421)_mcValCitPABC- #69	-	1.95
H-L443C-(C443)_mcValCitPABC- #69	-	2
H-L443C-(C443)_mcValCitPABC- #79	-	2
H-A114C-(C114)_mcValCitPABC- #95	-	2
H-A114C-(C114)_mcValCitPABC- #98	-	2
H-A114C-(C114)_MalPeg3C2-#69	-	2
H-N297Q-(Q)_AmPeg6C2-#42	-	3.2
H-N297Q-(Q)_AmPeg6C2-#54	-	3.04
H-N297Q-(Q)_AmPeg6C2-#47	-	3.16
H-N297Q-(Q)_AmPeg6C2-#36	-	3.36
H-N297Q-(Q)_AmPeg6C2-#26	-	3.4
H-N297Q-(Q)_AmPeg6C2-#66	-	2.8
H-L443C-(C443)_MalPeg6C2-#69	SEC (Protocolo P): 7.012 minutos; HPLC (Protocolo O): HC Δ masa = 1120	2
H-Q347C-(C347)_MalPeg6C2-#69	-	1.9
H-E388C-(C388)_MalPeg6C2-#69	-	1.8
H-N421C-(C421)_MalPeg6C2-#69	-	1.8
H-E380C-(C380)_MalPeg6C2-#69	-	1.8
H-L398C+L443C- (C398+C443)_MalPeg6C2-#69	-	3.9
H-K392C+L443C- (C392+C443)_MalPeg6C2-#69	-	3.5
H-kA111C-(kC111)_MalPeg6C2- #69	-	3.7
H-kK183C-(kC183)_MalPeg6C2- #69	-	2.1
H-kK207C-(kC207)_MalPeg6C2- #69	-	2.3
H-A114C-(C114)_mcValCitPABC- #108	-	2
H-A114C-(C114)_mcValCitPABC- #84	-	1.9
H-A114C-(C114)_mcValCitPABC- #226	-	1.8
H-A114C-(C114)_mc-#108	-	1.9
H-A114C-(C114)_mcValCitPABC- #117	-	1.8
H-A114C-(C114)_mcValCitPABC- #115	-	1.9
H-A114C-(C114)_MalPeg6C2-#98	-	1.9
IL13Ra2-AB08-v1010-hG1- (C)_mcValCitPABC-#54	-	3.9
IL13Ra2-AB08-v1010-hG1- (C)_mc-#69	-	3.5
IL13Ra2-AB08-v1010-hG1- (C)_MalPeg6C2-#69	-	3.5
IL13Ra2-AB08-v1010-hG1- (C)_mcValCitPABC-#69	-	4.4
H-A114C-(C114)_MalPeg6C2- 0#118	-	1.9
H-A114C-(C114)_mcValCitPABC- 0#118	-	1.8
H-A114C-(C114)_mcValCitPABC- #80	-	1.8
H-A114C-(C114)_mc-#117	-	1.9
H-A114C-(C114)_mcValCitPABC- #232	-	1.8
H-A114C-(C114)_MalPeg6C2- #230	-	1.9
H-A114C-(C114)_MalPeg6C2- #117	-	1.9

H-A114C-(C114)_mc-#115	-	2
H-A114C-(C114)_mv-#115	-	2
H-A114C-(C114)_mb-#69	-	2
H-A114C-(C114)_mv-#69	-	2
H-A114C-(C114)_mc-0#118	-	2
H-(C)_mc-#117	SEC (Protocolo P): 7.797 minutos; HPLC (Protocolo O): HC Δ masa = 937	3.5
H-(C)_MalPeg6C2-#117	SEC (Protocolo P): 8.005 minutos; HPLC (Protocolo O): HC Δ masa = 1163	3.56
H-(C)_mc-0#118	-	4.1
H-(C)_MalPeg6C2-0#118	SEC (Protocolo P): NA; HPLC (Protocolo O): HC Δ masa = 1148	3.9
IL13Ra2-AB08-v1010-hG1-(C)_mc-0#118	-	4
IL13Ra2-AB08-v1010-hG1-(C)_mc-#226	-	4.6
IL13Ra2-AB08-v1010-hG1-(C)_mc-#117	-	3.3
IL13Ra2-AB08-v1010-hG1-(C)_MalPeg6C2-#117	-	3.3
IL13Ra2-AB08-v1010-hG1-(C)_MalPeg6C2-0#118	-	2.9
H-A114C-(C114)_MalPeg6C2-#226	-	1.9
H-A114C-(C114)_mc-#172	-	1.9
H-A114C-(C114)_mb-0#118	-	1.9
H-A114C-(C114)_me-0#118	-	2
H-A114C-(C114)_mcValCitPABC-#134	-	1.9
H-A114C-(C114)_mc-#131	-	2
H-A114C-(C114)_MalPeg6C2-#126	-	1.9
H-A114C-(C114)_MalPeg6C2-#123	-	1.7
H-A114C-(C114)_mc-#126	-	2
H-A114C-(C114)_mv-0#118	-	2
H-(C)_MalPeg6C2-#226	SEC (Protocolo P): 7.501 minutos; HPLC (Protocolo O): HC Δ masa = 1150	4.5
H-(C)_mc-#226	SEC (Protocolo P): 7.418 minutos; HPLC (Protocolo O): HC Δ masa = 927	4.5
IL13Ra2-AB08-v1010-hG1-(C)_MalPeg6C2-#226	-	4.2
Notch-28-cG1-(C)_mc-0#118	-	4.6
Notch-28-cG1-(C)_mc-#115	SEC (Protocolo P): 7.015 minutos; HPLC (Protocolo O): HC Δ masa = 911	3.7
Notch-28-cG1-(C)_MalPeg6C2-0#118	-	4.1
Notch-28-cG1-(C)_me-0#118	SEC (Protocolo P): 7.182 minutos; HPLC (Protocolo O): HC Δ masa = 937	3.9
Notch-75-cG1-(C)_mc-0#118	-	3.3
IL13Ra2-19F9-cG1-(C)_mcValCitPABC-#54	-	4.1
IL13Ra2-19F9-cG1-(C)_mcValCitPABC-#112	-	4.2
Notch-28-cG1-(C)_mcValCitPABC-#112	-	4.1
Notch-28-cG1-(C)_MalPeg6C2-#69	-	4.3
Notch-75-cG1-(C)_MalPeg6C2-#69	-	3.8

H-(C)_m(H ₂ O)c-0#118	SEC (Protocolo P): 7.010 minutos; HPLC (Protocolo O): HC Δ masa = 942	4.1
H-(C)_Mal(H ₂ O)Peg6C2-0#118	SEC (Protocolo P): 6.964 minutos; HPLC (Protocolo O): HC Δ masa = 1166	4
H-(C)_Mal(H ₂ O)Peg6C2-#69	-	2.8
H-(C)_m(H ₂ O)c-#69	-	3.6
H-(C)_me-0#118	-	4.4
H-(C)_mv-0#118	-	4.4
H-(C)_mb-0#118	SEC (Protocolo P): 7.032 minutos; HPLC (Protocolo O): HC Δ masa = 896	4.1
H-A114C-(C114)_MalC6-#54	-	1.9
H-A114C-(C114)_mc-#231	-	1.7
H-A114C-(C114)_MalC6-0#118	-	2
H-(C)_Mal(H ₂ O)Peg6C2-#115	SEC (Protocolo P): 6.936 minutos; HPLC (Protocolo O): HC Δ masa = 1152	4.1
H-A114C-(C114)_mc-#158	-	2
H-A114C-(C114)_mcValCitPABC-#231	-	1.7
H-(C)_m(H ₂ O)c-#115	SEC (Protocolo P): 6.928 minutos; HPLC (Protocolo O): HC Δ masa = 930	3.7
Notch-75-cG1-(C)_mc-#115	-	3.7
Notch-75-cG1-(C)_me-0#118	-	3.5
Notch-75-cG1-(C)_MalPeg6C2-0#118	-	3.8
H-A114C-(C114)_mc-#237	-	2
H-A114C-(C114)_mc-#145	-	2
H-A114C-(C114)_MalPeg6C2-#145	-	2
H-A114C-(C114)_mc-#162	-	1.9
H-A114C-(C114)_MalC6Am-#151	-	1.9
Notch-28-cG1-(C)_m(H ₂ O)c-0#118	-	3.7
Notch-75-cG1-(C)_m(H ₂ O)c-0#118	-	3
H-(kK188)_COPEG2C2ValCitPABC-#54	-	2
IL13Ra2-AB08-v1010-hG1-(C)_Mal(H ₂ O)Peg6C2-0#118	SEC (Protocolo P): 7.766 minutos; HPLC (Protocolo O): HC Δ masa = 1164	3.5
IL13Ra2-AB08-v1010-hG1-(C)_Mal(H ₂ O)Peg6C2-#115	-	3.9
IL13Ra2-AB08-v1010-hG1-(C)_mc-#115	SEC (Protocolo P): 7.813 minutos; HPLC (Protocolo O): HC Δ masa = 911	4.3
IL13Ra2-AB08-v1010-hG1-(C)_m(H ₂ O)c-0#118	-	3.3
H-(C)_mcValCitPABC-0#118	-	4.5
IL13Ra2-AB08-v1010-hG1-(C)_m(H ₂ O)c-#115	SEC (Protocolo P): 7.783 minutos; HPLC (Protocolo O): HC Δ masa = 930	3.8
H-A114C-(C114)_mcValCitPABC-#154	-	1.9
H-A114C-(C114)_MalC6Am-#153	-	2
IL13Ra2-AB08-v1010-Q347C+kK183C-hG1-(C347+kC183)_mcValCitPABC-#54	-	4.3
IL13Ra2-AB08-v1010-Q347C-hG1-(C347)_mcValCitPABC-#54	-	2.1

IL13Ra2-AB08-v1010-hG1-(kK188)_COPEG2C2AmPEG2C2-#69	-	2
IL13Ra2-AB08-v1010-hG1-(kK188)_COPEG2C2ValCitPABC-#54	-	1.9
IL13Ra2-AB08-v1010-L443C-hG1-(C443)_mcValCitPABC-#54	-	2.1
IL13Ra2-AB08-v1010-K392C+L443C-hG1-(C392+C443)_mcValCitPABC-#54	-	3.7
IL13Ra2-AB08-v1010-L443C+kK183C-hG1-(C443+kC183)_mcValCitPABC-#54	-	4
H-(C)_mcValCitPABC-#98	SEC (Protocolo P): 7.232 minutos; HPLC (Protocolo O): HC Δ masa = 1371	4.2
H-A114C-(C114)_mcValCitPABC-#246	-	1.9
H-H435A-(C)_mcValCitPABC-#54	-	4
H-M428L+N434S-(C)_mcValCitPABC-#70	-	4.2
H-M428L+N434S-(C)_mcValCitPABC-#54	-	4
H-E388C+N421C-(C388+C421)_mcValCitPABC-#54	-	3.6
H-Q347C+K392C-(C347+C392)_mcValCitPABC-#54	-	3.9
H-L443C+kK183C-(C443+kC183)_mcValCitPABC-#54	-	3.7
H-Q347C+kK183C-(C347+kC183)_mcValCitPABC-#54	SEC (Protocolo P): 8.278 minutos; HPLC (Protocolo O): HC Δ masa = 1339	3.7
H-Q347C-(C347)_mcValCitPABC-#54	-	1.9
H-K392C+L443C-(C392+C443)_mc-#115	-	4
H-E388C+N421C-(C388+C421)_mc-#115	-	3.8
H-Q347C+K392C-(C347+C392)_mc-#115	-	4
H-L443C+kK183C-(C443+kC183)_mc-#115	-	3.8
H-Q347C+kK183C-(C347+kC183)_mc-#115	-	3.8
H-Q347C-(C347)_mc-#115	-	2
H-kK183C-(kC183)_mcValCitPABC-#54	-	1.9
H-E388C-(C388)_mcValCitPABC-#54	-	2
H-kK183C-(kC183)_mc-#115	-	1.8
H-E388C-(C388)_mc-#115	SEC (Protocolo P): 7.364 minutos; HPLC (Protocolo O): HC Δ masa = 914	2
H-L443C-(C443)_mc-#115	-	2
H-N421C-(C421)_mcValCitPABC-#54	-	2
H-N421C-(C421)_mc-#115	-	2
H-A114C-(C114)_mcGly-#201	-	1.9

Cuadro 20 – Valores IC₅₀ para compuestos seleccionados (péptidos citotóxicos) de la invención

Ejemplo #	BT474 GMEAN IC₅₀ (nM)	N87GMEAN IC₅₀ (nM)	MDA-MB- 361-DYT2 GMEAN IC₅₀ (nM)
#26	0.368	0.543	1.045
#30	0.682	6.709	1.853
#34	0.211	1.95	1.119
#36	0.499	1.205	1.111
#41	29.666	33.21	51.784
#42	0.125	0.327	0.195
#44	7.119	14.61	>16.401
#45	0.15	0.385	0.415
#47	<0.244	<0.256	0.317
#51	<0.599	3.658	-
#54	<0.133	<0.221	0.206
#56	0.316	1.256	0.766
#60	0.524	1.245	0.957
#66	0.244	0.463	0.334
#69	80.191	65.979	40.988
#70	0.179	0.327	0.225
#75	>100.000	>100.000	>100.000
#79	0.079	0.137	0.129
#80	20.346	28.204	32.846
#84	0.246	0.426	0.686
#115	31.493	50.302	19.870
#117	0.096	0.103	0.118
#118	100.000	100.000	100.000
#123	0.125	0.089	0.129
#126	0.315	0.375	0.454
#130	0.050	0.076	0.039
#131	0.072	0.185	0.081
#134	0.108	0.115	0.134
#140	-	-	-
#141	3.367	3.018	-
#142	0.279	0.259	-
#143	-	-	-
#144	0.172	0.182	0.174
#145	0.185	0.167	0.229

#146	0.435	0.195	0.387
#147	0.456	0.144	0.421
#148	0.429	0.219	0.502
#149	0.417	0.250	0.428
#151	84.867	61.953	84.599
#153	98.160	47.274	91.350
#154	0.193	0.572	0.198
#155	0.323	0.875	0.318
#158	0.082	0.115	0.100
#159	0.070	0.075	0.074
#162	31.448	21.610	27.824
#163	100.000	72.703	99.433
#172	0.057	0.144	0.086
#173	0.088	0.099	0.067
#178	0.968	1.262	0.911
#180	0.159	0.117	0.113
#182	0.153	0.148	0.122
#184	2.478	5.098	3.427
#186	-	-	-
#188	0.250	0.283	0.404
#190	0.134	0.066	0.095
#192	0.262	0.360	0.408
#194	0.134	0.212	0.198
#200	0.048	0.029	0.017
#201	0.144	0.150	0.121
#207	0.219	0.626	0.260
#208	0.418	0.379	0.336
#209	0.067	0.067	0.058
#217	-	-	-
#219	-	-	-
#220	35.163	100.000	100.000
#221	32.402	87.857	65.401
#222	0.158	0.352	0.272
#223	7.589	13.026	10.863
#224	0.383	1.563	0.998
#225	3.449	10.524	7.575
#226	0.118	0.478	0.106
#227	11.008	18.975	12.899
#228	0.105	0.090	0.078
#229	18.372	16.566	10.218
#230	100.000	89.133	70.236

#231	3.706	15.127	22.855
#232	0.071	0.194	0.095
#233	1.074	8.413	5.042
#234	0.684	0.756	2.004
#235	0.852	1.320	1.278
#236	0.020	0.023	0.010
#237	0.162	0.217	0.278
#238	0.139	0.077	0.084
#239	-	-	-
#240	11.710	19.930	23.480
#241	0.364	0.388	0.494
#242	32.330	41.329	34.529
#243	1.252	1.301	1.284
#244	73.123	100.000	100.000
#245	11.793	33.037	31.856
#246	3.159	10.828	5.430
#247	1.007	2.061	1.334
#257	-	-	-

Cuadro 21A – Valores IC₅₀ para conjugados seleccionados de la invención

ADC-Ligador-Carga Útil #	BT474		HCC1954		N87	
	IC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ de Anticuerpo (ng/mL)	IC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ de Anticuerpo (ng/mL)	IC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ de Anticuerpo (ng/mL)
H-(C)_MalPeg3C2-#41	0.725	25.592	0.465	16.617	4.02	175.448
H-(C)_MalPeg6C2-#42	0.502	19.855	0.604	24.783	>14.090	>6681.150
H-(C)_mc-#44	3.553	121.414	14.464	493.077	>841.360	>29495.311
H-(C)_MalPeg3C2-#44	2.603	114.847	5.113	225.594	>440.881	>26346.532
H-(C)_MalPeg6C2-#44	1.318	58.155	1.466	64.663	98.174	4873.851
H-(C)_mcValCitPABC-#44	0.188	6.717	0.155	5.329	0.781	28.146
H-(C)_Mal-PEG3C2-#45	2.886	103.762	1.513	52.791	>740.001	>27967.742
H-(C)_Mal-PEG6C2-#45	1.274	49.903	1.423	54.715	111.434	9072.131
H-(C)_mcValCitPABC-#45	0.258	9.997	0.204	7.988	0.417	16.737
H-(C)_mc-#54	0.436	19.821	0.992	45.072	2.45	138.026
H-(C)_Mal-PEG6C2-#69	1.938	5147.54	0.356	12.995	5.743	2427.639
H-(C)_mcValCitPABC-#69	0.18	7.17	0.073	2.878	<0.185	<8.946
H-(C)_mcValCitPABC-#70	0.133	4.522	0.078	2.61	0.249	8.722
H-(C)_mc-#79	0.483	18.097	0.654	24.543	7.576	297.254
H-(C)_mcValCitPABC-#79	0.152	6.634	0.127	5.682	0.469	21.134
H-(C)_mc-#115	0.272	-	0.109	-	0.841	-
H-A114C-(C114)_mc-#51	41.768	-	-	-	17.297	-
H-A114C-(C114)_mc-#47	3.269	-	-	-	8.216	-
H-A114C-(C114)_mc-#54	4.294	-	-	-	7.195	-
H-A114C-(C114)_mcValCitPABC-#47	0.493	-	0.31	-	0.696	-
H-A114C-(C114)_mcValCitPABC-#54	0.174	-	0.17	-	0.189	-
H-A114C-(C114)_mcValCitPABC-#26	2.548	-	28.2	-	4.314	-
H-A114C-(C114)_mc-#26	>60.648	-	>1000.00	-	>980.026	-
H-A114C-(C114)_mcValCitPABC-#36	2.007	-	26.18	-	13.579	-
H-A114C-(C114)_mcValCitPABC-#42	0.283	-	0.16	-	0.524	-
H-A114C-(C114)_mc-#42	0.81	-	1.54	-	44.164	-
H-(C)-mcValCitPABC-#54	0.292	-	0.27	-	0.345	-
H-(C)_mcValCitPABCAmPeg3C2-#54	15.134	-	14.33	-	41.016	-
H-(C)_mcValCitPABCAmPeg6C2-#54	1.898	-	1.4	-	11.71	-
H-(C)_mc-#47	4.429	-	3.52	-	20.007	-
H-(C)_MalPeg3C2-#54	2.181	-	1.54	-	>41.711	-
H-(C)_mc-#54	3.565	-	6.28	-	48.566	-
H-(C)_mcValCitPABCAmPeg3C2-#47	5.228	-	>1000.00	-	>543.852	-
H-(C)_MalPeg3C2-#47	1.467	-	1.29	-	16.856	-
H-(C)_mcValCitPABCAmPeg3C2-#42	1.587	-	4.95	-	>1000.000	-

H-(C)_mc-#41	0.506	-	0.68	-	7.543	-
H-(C)_mcValCitPABCAmPeg3 C2-#26	11.211	-	>1000. 00	-	>1000. 000	-
H-(C)_mcValCitPABCAmPeg6 C2-#47	0.935	-	2.46	-	14.283	-
H-(C)_MalPeg3C2-#42	0.517	-	0.51	-	5.479	-
H-(C)_mcValCitPABCAmPeg6 C2-#26	10.992	-	>1000. 00	-	>1000. 000	-
H-(C)_mcValCitPABCAmPeg6 C2-#42	1.819	-	1.97	-	75.643	-
H-(C)_MalPeg6C2-#54	2.108	-	1.02	-	>56.92 8	-
H-(C)_MalPeg6C2-#47	1.637	-	1.42	-	31.762	-
H-(C)_MalPeg6C2-#26	6.385	-	9.55	-	>817.8 59	-
H-(C)-MalPeg6C2-#42	0.518	-	0.55	-	>7.993	-
H-(C)_mc-#36	>1000.00 0	-	>1000. 00	-	>1000. 000	-
H-(C)_mcValCitPABC-#60	0.835	-	6.45	-	14.917	-
H-(C)_MalPeg3C2-#26	11.506	-	9.43	-	>1000. 000	-
H-(C)_mcValCitPABCAmPeg3 C2-#36	>1000.00 0	-	>1000. 00	-	>1000. 000	-
H-A114C-(C114)_mcValCitPABCAmP eg3C2-#36	>1000.00 0	-	>1000. 00	-	>325.7 14	-
H-A114C-(C114)_MalPeg6C2-#54	1.228	-	2.01	-	133.42 6	-
H-(C)_MalPeg3C2-#60	>1000.00 0	-	>1000. 00	-	>1000. 000	-
H-(C)_MalPeg6C2-#60	>1000.00 0	-	>1000. 00	-	>1000. 000	-
H-(C)_MalPeg6C2-#41	1.166	-	0.36	-	5.882	-
H-(C)-mc-#69	0.427	-	0.47	-	3.05	-
H-(C)_MalPeg3C2-#36	720.826	-	>1000. 00	-	>1000. 000	-
H-(C)_mcValCitPABCAmPeg6 C2-#36	>1000.00 0	-	>1000. 00	-	>1000. 000	-
H-(C)_MalPeg6C2-#36	878.903	-	159.1	-	>1000. 000	-
H-(C)_mcValCitPABCAmPeg3 C2-#41	2.363	-	2.28	-	18.728	-
H-(C)-MalPeg3C2-#41	0.725	-	0.54	-	4.004	-
H-(C)_mcValCitPABCAmPeg6 C2-#60	979.982	-	>1000. 00	-	392.90 5	-
H-A114C-(C114)_mc-#66	17.235	-	>1000. 00	-	>1000. 000	-
H-L398C+L443C-(C398+C443)_mcValCitPA BC-#54	0.249	-	0.27	-	0.678	-
H-K392C+L443C-(C392+C443)_mcValCitPA BC-#54	<0.195	-	0.42	-	<0.254	-
H-L443C-(C443)_mcValCitPABC-#54	<0.130	-	0.32	-	<0.267	-
H-L398C+V422C-(C398+C422)_mcValCitPA BC-#54	0.387	-	0.27	-	0.504	-
H-(C)-mc-#44	3.553	-	>507.2 3	-	>878.4 89	-

H-(C)-Mal-PEG3C2-#45	2.886	-	68.41	-	>834.7 17	-
H-(C)_2AcAmPeg6C2-#66	703.419	-	>1000. 00	-	>1000. 000	-
H-(C)-Mal-PEG6C2-#45	1.274	-	2.74	-	>268.0 47	-
H-(C)-mc-#79	0.483	-	0.65	-	7.576	-
H-(C)-MalPeg3C2-#44	2.603	-	5.11	-	>440.8 81	-
H-(C)-mcValCitPABC-#70	0.188	-	0.09	-	<0.179	-
H-(C)-MalPeg6C2-#44	1.318	-	1.47	-	98.174	-
H-A114C- (C114)_mcValCitPABC-#69	0.174	-	0.06	-	0.207	-
H-(C)-mcValCitPABC-#79	0.152	-	0.15	-	0.469	-
H-A114C- (C114)_mcValCitPABC-#79	0.124	-	0.12	-	0.386	-
H-(C)-mcValCitPABC-#44	0.252	-	0.18	-	0.732	-
H-A114C- (C114)_mcValCitPABC-#88	8.127	-	>1000. 00	-	62.825	-
H-(C)-mcValCitPABC-#69	0.133	-	0.1	-	0.249	-
H- (C)_2AcAmCapValCitPABC -#66	0.436	-	0.99	-	2.45	-
H-A114C- (C114)_mcValCitPABC-#45	0.217	-	0.2	-	0.496	-
H-A114C- (C114)_mcValCitPABC-#34	3.724	-	>1000. 00	-	18.422	-
H-A114C-(C114)_mc-#45	6.431	-	>1000. 00	-	148.85 2	-
H-A114C-(C114)_mc-#70	0.349	-	0.62	-	7.208	-
H-(C)_mcValCitPABC-#112	0.226	-	0.24	-	0.469	-
H-(C)-Mal-PEG6C2-#69	0.453	-	0.54	-	1.8	-
H-Q347C- (C347)_mcValCitPABC-#69	0.368	-	0.06	-	0.22	-
H-Y373C- (C373)_mcValCitPABC-#69	0.359	-	0.06	-	0.295	-
H-E388C- (C388)_mcValCitPABC-#69	0.427	-	0.06	-	0.314	-
H-N421C- (C421)_mcValCitPABC-#69	0.434	-	0.09	-	0.244	-
H-L443C- (C443)_mcValCitPABC-#69	0.239	-	0.05	-	0.272	-
H-L443C- (C443)_mcValCitPABC-#79	0.3	-	0.15	-	0.412	-
H-A114C- (C114)_mcValCitPABC-#95	0.381	-	0.36	-	0.852	-
H-A114C- (C114)_mcValCitPABC-#98	0.171	-	0.24	-	0.258	-
H-A114C- (C114)_MalPeg3C2-#69	0.221	-	0.58	-	1.589	-
H-N297Q-(Q)_AmPeg6C2- #42	0.466	-	0.36	-	5.42	-
H-N297Q-(Q)_AmPeg6C2- #54	0.557	-	0.37	-	6.899	-
H-N297Q-(Q)_AmPeg6C2- #47	0.346	-	0.43	-	4.337	-
H-N297Q-(Q)_AmPeg6C2- #36	3.003	-	>1000. 00	-	284.26 7	-
H-N297Q-(Q)_AmPeg6C2- #26	0.991	-	1.07	-	35.331	-
H-N297Q-(Q)_AmPeg6C2- #66	13.812	-	>1000. 00	-	>1000. 000	-
H-L443C- (C443)_MalPeg6C2-#69	0.251	-	0.25	-	1.989	-
H-Q347C- (C347)_MalPeg6C2-#69	0.267	-	0.3	-	0.887	-

H-E388C- (C388)_MalPeg6C2-#69	0.382	-	0.46	-	3.035	-
H-N421C- (C421)_MalPeg6C2-#69	0.35	-	0.45	-	1.329	-
H-E380C- (C380)_MalPeg6C2-#69	0.482	-	0.49	-	5.588	-
H-L398C+L443C- (C398+C443)_MalPeg6C2- #69	0.226	-	0.3	-	1.346	-
H-K392C+L443C- (C392+C443)_MalPeg6C2- #69	0.268	-	0.31	-	1.63	-
H-kA111C- (kC111)_MalPeg6C2-#69	0.297	-	0.34	-	1.635	-
H-kK183C- (kC183)_MalPeg6C2-#69	0.257	-	0.5	-	2.23	-
H-kK207C- (kC207)_MalPeg6C2-#69	0.252	-	0.41	-	1.744	-
H-A114C- (C114)_mcValCitPABC- #108	0.212	-	0.12	-	0.777	-
H-A114C- (C114)_mcValCitPABC-#84	0.627	-	12.2	-	1.733	-
H-A114C- (C114)_mcValCitPABC- #226	0.2	-	0.1	-	0.239	-
H-A114C-(C114)_mc-#108	>1000.00 0	-	>1000. 00	-	113.88 9	-
H-A114C- (C114)_mcValCitPABC- #117	0.242	-	0.17	-	0.239	-
H-A114C- (C114)_mcValCitPABC- #115	0.202	-	0.2	-	0.211	-
H-A114C- (C114)_MalPeg6C2-#98	0.576	-	0.47	-	1.46	-
H-A114C- (C114)_MalPeg6C2-0#118	0.257	-	0.17	-	0.505	-
H-A114C- (C114)_mcValCitPABC- 0#118	0.251	-	0.24	-	0.398	-
H-A114C- (C114)_mcValCitPABC-#80	0.341	-	0.31	-	0.887	-
H-A114C-(C114)_mc-#117	0.197	-	0.14	-	0.465	-
H-A114C- (C114)_mcValCitPABC- #232	0.376	-	1.31	-	1.367	-
H-A114C- (C114)_MalPeg6C2-#230	0.504	-	0.85	-	3.179	-
H-A114C- (C114)_MalPeg6C2-#117	0.335	-	0.21	-	0.792	-
H-A114C-(C114)_mc-#115	0.243	-	0.23	-	0.45	-
H-A114C-(C114)_mv-#115	0.21	-	0.15	-	0.65	-
H-A114C-(C114)_mb-#69	0.256	-	0.43	-	2.137	-
H-A114C-(C114)_mv-#69	0.215	-	0.27	-	1.043	-
H-A114C-(C114)_mc- 0#118	0.151	-	0.1	-	0.342	-
H-(C)_mc-#117	0.162	-	0.06	-	0.314	-
H-(C)_MalPeg6C2-#117	0.283	-	0.07	-	0.515	-
H-(C)_mc-0#118	0.18	-	<0.10	-	0.303	-
H-(C)_MalPeg6C2-0#118	0.269	-	0.15	-	0.499	-
H-A114C- (C114)_MalPeg6C2-#226	0.28	-	0.22	-	0.685	-
H-A114C-(C114)_mc-#172	0.296	-	0.41	-	0.694	-
H-A114C-(C114)_mb- 0#118	0.318	-	0.33	-	0.709	-
H-A114C-(C114)_me- 0#118	0.256	-	0.33	-	0.64	-

H-A114C-(C114)_mcValCitPABC-#134	0.301	-	0.34	-	0.501	-
H-A114C-(C114)_mc-#131	0.357	-	0.76	-	1.614	-
H-A114C-(C114)_MalPeg6C2-#126	0.284	-	0.36	-	1.377	-
H-A114C-(C114)_MalPeg6C2-#123	0.362	-	0.34	-	1.867	-
H-A114C-(C114)_mc-#126	0.319	-	0.49	-	3.294	-
H-A114C-(C114)_mv-0#118	0.209	-	0.25	-	0.719	-
H-(C)_MalPeg6C2-#226	0.575	-	0.22	-	1.126	-
H-(C)_mc-#226	0.359	-	0.18	-	0.69	-
H-(C)_m(H2O)c-0#118	0.26	-	0.11	-	0.448	-
H-(C)_Mal(H2O)Peg6C2-0#118	0.482	-	0.19	-	0.9	-
H-(C)_Mal(H2O)Peg6C2-#69	0.832	-	0.51	-	5.769	-
H-(C)_m(H2O)c-#69	0.418	-	0.28	-	1.529	-
H-(C)_me-0#118	0.186	-	0.11	-	0.218	-
H-(C)_mv-0#118	0.201	-	0.14	-	0.265	-
H-(C)_mb-0#118	0.222	-	0.13	-	0.267	-
H-A114C-(C114)_MalC6-#54	0.662	-	5.11	-	8.003	-
H-A114C-(C114)_mc-#231	>1000.00 0	-	>1000. 00	-	>1000	-
H-A114C-(C114)_MalC6-0#118	0.976	-	113	-	15.407	-
H-(C)_Mal(H2O)Peg6C2-#115	1.06	-	0.28	-	3.439	-
H-A114C-(C114)_mc-#158	0.247	-	0.35	-	0.739	-
H-A114C-(C114)_mcValCitPABC-#231	1.178	-	24.41	-	13.447	-
H-(C)_m(H2O)c-#115	0.393	-	0.17	-	0.498	-
H-A114C-(C114)_mc-#237	0.97	-	0.68	-	27.907	-
H-A114C-(C114)_mc-#145	4.681	-	585.59	-	643.39 1	-
H-A114C-(C114)_MalPeg6C2-#145	12.856	-	190.59	-	89.125	-
H-A114C-(C114)_mc-#162	0.377	-	0.15	-	1.144	-
H-A114C-(C114)_MalC6Am-#151	0.42	-	0.1	-	0.694	-
H-(kK188)_COPeg2C2ValCitPABC-#54		-		-		-
H-(C)_mcValCitPABC-0#118	0.227	-	0.14	-	0.182	-
H-A114C-(C114)_mcValCitPABC-#154	0.323	-	0.32	-	0.363	-
H-A114C-(C114)_MalC6Am-#153	0.377	-	0.27	-	0.34	-
H-(C)_mcValCitPABC-#98	0.211	-	0.14	-	0.162	-
H-A114C-(C114)_mcValCitPABC-#246	0.357	-	0.65	-	3.197	-
H-H435A-(C)_mcValCitPABC-#54	0.358	-	0.17	-	0.237	-
H-M428L+N434S-(C)_mcValCitPABC-#70	0.322	-	0.1	-	0.114	-
H-M428L+N434S-(C)_mcValCitPABC-#54	0.354	-		-	0.217	-
H-E388C+N421C-(C388+C421)_mcValCitPABC-#54	1.38	-	0.99	-	0.855	-

H-Q347C+K392C- (C347+C392)_mcValCitPA BC-#54	0.276	-	0.29	-	0.147	-
H-L443C+kK183C- (C443+kC183)_mcValCitPA BC-#54	<0.129	-	0.37	-	<0.111	-
H-Q347C+kK183C- (C347+kC183)_mcValCitPA BC-#54	0.146	-	0.25	-	0.08	-
H-Q347C- (C347)_mcValCitPABC-#54	0.153	-	0.33	-	0.111	-
H-K392C+L443C- (C392+C443)_mc-#115	0.323	-	0.1	-	0.304	-
H-E388C+N421C- (C388+C421)_mc-#115	1.251	-	0.42	-	0.997	-
H-Q347C+K392C- (C347+C392)_mc-#115	0.342	-	0.1	-	0.219	-
H-L443C+kK183C- (C443+kC183)_mc-#115	0.319	-	0.1	-	0.268	-
H-Q347C+kK183C- (C347+kC183)_mc-#115	0.347	-	0.1	-	0.403	-
H-Q347C-(C347)_mc-#115	0.272	-	0.18	-	0.278	-
H-kK183C- (kC183)_mcValCitPABC- #54	0.287	-	0.34	-	0.194	-
H-E388C- (C388)_mcValCitPABC-#54	0.098	-	0.38	-	0.084	-
H-kK183C-(kC183)_mc- #115	0.28	-	0.27	-	0.269	-
H-E388C-(C388)_mc-#115	0.302	-	0.15	-	0.301	-
H-L443C-(C443)_mc-#115	0.222	-	0.1	-	0.259	-
H-N421C- (C421)_mcValCitPABC-#54	<0.051	-	0.42	-	<0.051	-
H-N421C-(C421)_mc-#115	0.312	-	0.23	-	0.306	-
H-A114C-(C114)_mcGly- #201	0.321	-		-		-

Cuadro 21B – Valores IC₅₀ para conjugados seleccionados de la invención

ADC-Ligador-Carga Útil #	DYT2		MDA-MB-468	
	IC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ de Anticuerpo (ng/mL)	IC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ de Anticuerpo (ng/mL)
H-(C)_MalPeg3C2-#41	>69.685	>17528.581	-	>35714.286
H-(C)_MalPeg6C2-#42	33.396	5455.61	>629.281	>25857.971
H-(C)_mc-#44	>1000.000	>34090.909	>1000.000	>34090.909
H-(C)_MalPeg3C2-#44	>1000.000	>44117.647	>1000.000	>44117.647
H-(C)_MalPeg6C2-#44	>1000.000	>44117.647	>1000.000	>44117.647
H-(C)_mcValCitPABC-#44	0.203	7.246	>1000.000	>35714.286
H-(C)_Mal-PEG3C2-#45	>1000.000	>34883.721	>1000.000	>34883.721
H-(C)_Mal-PEG6C2-#45	>1000.000	>38461.538	>1000.000	>38461.538
H-(C)_mcValCitPABC-#45	0.371	14.304	613.294	24435.914
H-(C)_mc-#54	>1000.000	>45454.545	>1000.000	>45454.545
H-(C)_Mal-PEG6C2-#69	>467.163	>29849.279	>1000.000	>35714.286
H-(C)_mcValCitPABC-#69	0.156	7.54	547.953	21860.354
H-(C)_mcValCitPABC-#70	0.098	3.332	>1000.000	>33333.333
H-(C)_mc-#79	>1000.000	>37500.000	978.508	36694.065
H-(C)_mcValCitPABC-#79	0.212	9.528	351.392	15383.462
H-(C)_mc-#115	0.21	-	-	-
H-A114C-(C114)_mc-#51	>1000.000	-	>1000.000	-
H-A114C-(C114)_mc-#47	>1000.000	-	>1000.000	-
H-A114C-(C114)_mc-#54	>1000.000	-	>1000.000	-
H-A114C-(C114)_mcValCitPABC-#47	383.667	-	445.014	-
H-A114C-(C114)_mcValCitPABC-#54	0.372	-	362.213	-
H-A114C-(C114)_mcValCitPABC-#26	>1000.000	-	>930.555	-
H-A114C-(C114)_mc-#26	>1000.000	-	>1000.000	-
H-A114C-(C114)_mcValCitPABC-#36	>927.422	-	>1000.000	-
H-A114C-(C114)_mcValCitPABC-#42	0.436	-	530.596	-
H-A114C-(C114)_mc-#42	>727.245	-	567.735	-
H-(C)-mcValCitPABC-#54	0.275	-	471.905	-
H-(C)_mcValCitPABCAmPeg3C2-#54	>1000.000	-	>1000.000	-
H-(C)_mcValCitPABCAmPeg6C2-#54	>1000.000	-	>1000.000	-
H-(C)_mc-#47	>1000.000	-	>1000.000	-
H-(C)_MalPeg3C2-#54	>1651.007	-	>1651.007	-
H-(C)_mc-#54	>1000.000	-	>1000.000	-
H-(C)_mcValCitPABCAmPeg3C2-#47	>1000.000	-	>1000.000	-
H-(C)_MalPeg3C2-#47	>1000.000	-	>1000.000	-
H-(C)_mcValCitPABCAmPeg3C2-#42	>1000.000	-	>1000.000	-
H-(C)_mc-#41	>1000.000	-	>1000.000	-
H-(C)_mcValCitPABCAmPeg3C2-#26	>1000.000	-	>1000.000	-
H-(C)_mcValCitPABCAmPeg6C2-#47	>1000.000	-	>1000.000	-
H-(C)_MalPeg3C2-#42	9.675	-	358.435	-
H-(C)_mcValCitPABCAmPeg6C2-#26	>1000.000	-	>1000.000	-
H-(C)_mcValCitPABCAmPeg6C2-#42	>1000.000	-	>1000.000	-
H-(C)_MalPeg6C2-#54	>1731.544	-	>1731.544	-
H-(C)_MalPeg6C2-#47	>1651.007	-	>1651.007	-
H-(C)_MalPeg6C2-#26	>1000.000	-	>1000.000	-

H-(C)-MalPeg6C2-#42	5.705	-	>642.029	-
H-(C)_mc-#36	>1000.000	-	>1000.000	-
H-(C)_mcValCitPABC-#60	>699.241	-	>544.495	-
H-(C)_MalPeg3C2-#26	>1000.000	-	>1000.000	-
H-(C)_mcValCitPABCAmPeg3C2-#36	>1000.000	-	>1000.000	-
H-A114C-(C114)_mcValCitPABCAmPeg3C2-#36	>1000.000	-	>1000.000	-
H-A114C-(C114)_MalPeg6C2-#54	>1000.000	-	>1000.000	-
H-(C)_MalPeg3C2-#60	>1000.000	-	>1000.000	-
H-(C)_MalPeg6C2-#60	>1000.000	-	>1000.000	-
H-(C)_MalPeg6C2-#41	>1000.000	-	>1000.000	-
H-(C)-mc-#69	>71.831	-	>899.249	-
H-(C)_MalPeg3C2-#36	>1000.000	-	>1000.000	-
H-(C)_mcValCitPABCAmPeg6C2-#36	>1000.000	-	>1000.000	-
H-(C)_MalPeg6C2-#36	>1000.000	-	>1000.000	-
H-(C)_mcValCitPABCAmPeg3C2-#41	>1000.000	-	>1000.000	-
H-(C)-MalPeg3C2-#41	>69.685	-	>1000.000	-
H-(C)_mcValCitPABCAmPeg6C2-#60	>1000.000	-	>1000.000	-
H-A114C-(C114)_mc-#66	>1000.000	-	>1000.000	-
H-L398C+L443C-(C398+C443)_mcValCitPABC-#54	0.463	-	801.354	-
H-K392C+L443C-(C392+C443)_mcValCitPABC-#54	<0.171	-	565.01	-
H-L443C-(C443)_mcValCitPABC-#54	0.371	-	500.958	-
H-L398C+V422C-(C398+C422)_mcValCitPABC-#54	0.48	-	610.884	-
H-(C)-mc-#44	>1000.000	-	>1000.000	-
H-(C)-Mal-PEG3C2-#45	>1000.000	-	>1000.000	-
H-(C)_2AcAmPeg6C2-#66	>1000.000	-	>1000.000	-
H-(C)-Mal-PEG6C2-#45	>1000.000	-	>1000.000	-
H-(C)-mc-#79	>1000.000	-	978.508	-
H-(C)-MalPeg3C2-#44	>1000.000	-	>1000.000	-
H-(C)-mcValCitPABC-#70	0.116	-	547.953	-
H-(C)-MalPeg6C2-#44	>1000.000	-	>1000.000	-
H-A114C-(C114)_mcValCitPABC-#69	0.083	-	>1000.000	-
H-(C)-mcValCitPABC-#79	0.212	-	351.392	-
H-A114C-(C114)_mcValCitPABC-#79	0.199	-	472.593	-
H-(C)-mcValCitPABC-#44	0.248	-	>1000.000	-
H-A114C-(C114)_mcValCitPABC-#88	>1000.000	-	>1000.000	-
H-(C)-mcValCitPABC-#69	0.098	-	>1000.000	-
H-(C)_2AcAmCapValCitPABC-#66	>1000.000	-	>1000.000	-
H-A114C-(C114)_mcValCitPABC-#45	2.37	-	>968.025	-
H-A114C-(C114)_mcValCitPABC-#34	>1000.000	-	>1000.000	-
H-A114C-(C114)_mc-#45	>1000.000	-	>1000.000	-
H-A114C-(C114)_mc-#70	>1000.000	-	>1000.000	-
H-(C)_mcValCitPABC-#112	0.185	-	>563.999	-
H-(C)-Mal-PEG6C2-#69	0.963	-	748.275	-
H-Q347C-(C347)_mcValCitPABC-#69	0.094	-	>1000.000	-
H-Y373C-(C373)_mcValCitPABC-#69	0.156	-	>1000.000	-
H-E388C-(C388)_mcValCitPABC-#69	0.117	-	>1000.000	-
H-N421C-(C421)_mcValCitPABC-#69	0.162	-	>1000.000	-

H-L443C-(C443)_mcValCitPABC- #69	0.1	-	>1000.000	-
H-L443C-(C443)_mcValCitPABC- #79	0.303	-	370.53	-
H-A114C-(C114)_mcValCitPABC- #95	61.8	-	>1000.000	-
H-A114C-(C114)_mcValCitPABC- #98	0.218	-	609.904	-
H-A114C-(C114)_MalPeg6C2-#69	>1000.000	-	>1000.000	-
H-N297Q-(Q)_AmPeg6C2-#42	>1000.000	-	>1000.000	-
H-N297Q-(Q)_AmPeg6C2-#54	>1000.000	-	>1000.000	-
H-N297Q-(Q)_AmPeg6C2-#47	>1000.000	-	>1000.000	-
H-N297Q-(Q)_AmPeg6C2-#36	>1000.000	-	>1000.000	-
H-N297Q-(Q)_AmPeg6C2-#26	>1000.000	-	>1000.000	-
H-N297Q-(Q)_AmPeg6C2-#66	>1000.000	-	>1000.000	-
H-L443C-(C443)_MalPeg6C2-#69	>1000.000	-	758.157	-
H-Q347C-(C347)_MalPeg6C2-#69	1.752	-	832.08	-
H-E388C-(C388)_MalPeg6C2-#69	6.883	-	>973.529	-
H-N421C-(C421)_MalPeg6C2-#69	1.027	-	472.466	-
H-E380C-(C380)_MalPeg6C2-#69	>65.641	-	873.254	-
H-L398C+L443C- (C398+C443)_MalPeg6C2-#69	0.827	-	846.418	-
H-K392C+L443C- (C392+C443)_MalPeg6C2-#69	>32.438	-	804.407	-
H-kA111C-(kC111)_MalPeg6C2- #69	0.423	-	740.791	-
H-kK183C-(kC183)_MalPeg6C2- #69	>1000.000	-	749.154	-
H-kK207C-(kC207)_MalPeg6C2- #69	>138.618	-	586.857	-
H-A114C-(C114)_mcValCitPABC- #108	>1000.000	-	873.831	-
H-A114C-(C114)_mcValCitPABC- #84	976.796	-	>1000.000	-
H-A114C-(C114)_mcValCitPABC- #226	0.101	-	385.851	-
H-A114C-(C114)_mc-#108	>1000.000	-	>1000.000	-
H-A114C-(C114)_mcValCitPABC- #117	0.107	-	469.882	-
H-A114C-(C114)_mcValCitPABC- #115	0.142	-	989.147	-
H-A114C-(C114)_MalPeg6C2-#98	355.331	-	>1000.000	-
H-A114C-(C114)_MalPeg6C2- 0#118	0.126	-	>865.455	-
H-A114C-(C114)_mcValCitPABC- 0#118	0.215	-	>1000.000	-
H-A114C-(C114)_mcValCitPABC- #80	0.432	-	>1000.000	-
H-A114C-(C114)_mc-#117	0.107	-	>414.892	-
H-A114C-(C114)_mcValCitPABC- #232	38.422	-	959.259	-
H-A114C-(C114)_MalPeg6C2- #230	>1000.000	-	>1000.000	-
H-A114C-(C114)_MalPeg6C2- #117	0.179	-	>1000.000	-
H-A114C-(C114)_mc-#115	0.238	-	>699.755	-
H-A114C-(C114)_mv-#115	0.322	-	>668.891	-
H-A114C-(C114)_mb-#69	>1000.000	-	>1000.000	-
H-A114C-(C114)_mv-#69	>1000.000	-	>1000.000	-
H-A114C-(C114)_mc-0#118	0.098	-	432.816	-
H-(C)_mc-#117	<0.093	-	194.684	-
H-(C)_MalPeg6C2-#117	<0.080	-	361.061	-
H-(C)_mc-0#118	<0.073	-	541.542	-
H-(C)_MalPeg6C2-0#118	0.074	-	465.455	-
H-A114C-(C114)_MalPeg6C2- #226	0.513	-	574.794	-
H-A114C-(C114)_mc-#172	1.48	-	500.864	-

H-A114C-(C114)_mb-0#118	0.208	-	506.604	-
H-A114C-(C114)_me-0#118	0.236	-	903.571	-
H-A114C-(C114)_mcValCitPABC- #134	1.434	-	648.066	-
H-A114C-(C114)_mc-#131	>1000.000	-	480.901	-
H-A114C-(C114)_MalPeg6C2- #126	54.268	-	656.645	-
H-A114C-(C114)_MalPeg6C2- #123	>1000.000	-	543.693	-
H-A114C-(C114)_mc-#126	>1000.000	-	749.49	-
H-A114C-(C114)_mv-0#118	0.147	-	490.276	-
H-(C)_MalPeg6C2-#226	0.206	-	582.309	-
H-(C)_mc-#226	0.219	-	477.622	-
H-(C)_m(H2O)c-0#118	0.071	-	306.626	-
H-(C)_Mal(H2O)Peg6C2-0#118	<0.059	-	441.766	-
H-(C)_Mal(H2O)Peg6C2-#69	0.203	-	459.502	-
H-(C)_m(H2O)c-#69	0.315	-	740.334	-
H-(C)_me-0#118	<0.061	-	455.314	-
H-(C)_mv-0#118	0.084	-	531.617	-
H-(C)_mb-0#118	0.076	-	584.327	-
H-A114C-(C114)_MalC6-#54	52.056	-	65.721	-
H-A114C-(C114)_mc-#231	>1000.000	-	>1000.000	-
H-A114C-(C114)_MalC6-0#118	>1000.000	-	>1000.000	-
H-(C)_Mal(H2O)Peg6C2-#115	0.095	-	698.101	-
H-A114C-(C114)_mc-#158	0.164	-	329.554	-
H-A114C-(C114)_mcValCitPABC- #231	>1000.000	-	>1000.000	-
H-(C)_m(H2O)c-#115	<0.069	-	534.743	-
H-A114C-(C114)_mc-#237	>1000.000	-	646.464	-
H-A114C-(C114)_mc-#145	>1000.000	-	>1000.000	-
H-A114C-(C114)_MalPeg6C2- #145	>1000.000	-	>1000.000	-
H-A114C-(C114)_mc-#162	0.201	-	676.764	-
H-A114C-(C114)_MalC6Am-#151	0.469	-	75.696	-
H- (kK188)_COPeg2C2ValCitPABC- #54	-	-	-	-
H-(C)_mcValCitPABC-0#118	0.081	-	>1000.000	-
H-A114C-(C114)_mcValCitPABC- #154	1.708	-	566.056	-
H-A114C-(C114)_MalC6Am-#153	0.114	-	69.259	-
H-(C)_mcValCitPABC-#98	0.23	-	270.019	-
H-A114C-(C114)_mcValCitPABC- #246	>1000.000	-	>1000.000	-
H-H435A-(C)_mcValCitPABC-#54	0.208	-	339.77	-
H-M428L+N434S- (C)_mcValCitPABC-#70	0.069	-	380.393	-
H-M428L+N434S- (C)_mcValCitPABC-#54	0.178	-	-	-
H-E388C+N421C- (C388+C421)_mcValCitPABC-#54	1.033	-	826.243	-
H-Q347C+K392C- (C347+C392)_mcValCitPABC-#54	0.103	-	390.7	-
H-L443C+kK183C- (C443+kC183)_mcValCitPABC- #54	<0.103	-	395.707	-
H-Q347C+kK183C- (C347+kC183)_mcValCitPABC- #54	<0.051	-	384.028	-
H-Q347C-(C347)_mcValCitPABC- #54	2.89	-	393.412	-
H-K392C+L443C- (C392+C443)_mc-#115	0.07	-	542.081	-
H-E388C+N421C- (C388+C421)_mc-#115	0.227	-	>1000.000	-
H-Q347C+K392C- (C347+C392)_mc-#115	0.068	-	934.867	-

H-L443C+kK183C- (C443+kC183)_mc-#115	0.071	-	757.604	-
H-Q347C+kK183C- (C347+kC183)_mc-#115	0.073	-	741.434	-
H-Q347C-(C347)_mc-#115	0.098	-	888.128	-
H-kK183C- (kC183)_mcValCitPABC-#54	1.329	-	160.012	-
H-E388C-(C388)_mcValCitPABC- #54	0.658	-	287.88	-
H-kK183C-(kC183)_mc-#115	0.179	-	775.698	-
H-E388C-(C388)_mc-#115	0.124	-	958.96	-
H-L443C-(C443)_mc-#115	0.108	-	451.857	-
H-N421C-(C421)_mcValCitPABC- #54	0.601	-	263.107	-
H-N421C-(C421)_mc-#115	0.108	-	668.857	-
H-A114C-(C114)_mcGly-#201	0.073	-	-	-

5

10

15

Cuadro 22 – Valores farmacocinéticos seleccionados en ratas para conjugados que comprenden MMAD, MMAE o MMAF. Se calcularon AUCs un nivel mínimo-0 de 0-336 h excepto cuando se anota.

ADC	Dose	AUC (nivel mínimo-0) ($\mu\text{g}\cdot\text{Horas/mL}$)		ADC/Ab Ratio
		ADC	Ab	
H(C)-#D54	3	3390 ¹	4560 ¹	74
	10	13200 ¹	16400 ¹	80
	30	37800 ²	41700 ¹	91
H(C)-#A69	10	14140	20840	68
	30	44040	63480	69
	100	146000	212000	69
H(C)-MalPEG6C2-MMAD	10	13300	15780	84
	30	56180	60280	93
	100	134400	146800	92
H(C)-mc-MMAD	10	7650	14500	53
	30	20700	43800	47
	100	58000	121000	48
H(C)-vc-MMAE	3	1080 ³	2950 ³	37
	10	3930 ³	10600 ³	37
	30	13400 ³	18400 ³	-
H(C)-mc-MMAF	10	10700	24500	44
	30	32000	71500	45
	100	83600	176000	48
H(K)-MCC-DM1	3	3800	5200	73
	10	12800	16200	79
	30	39100	49600	79

5 ¹ denota un nivel mínimo final de 0-312 horas

² denota un nivel mínimo final de 0-168 horas

³ denota un nivel mínimo final de 0-96 horas

Cuadro 23 - Valores farmacocinéticos seleccionados en ratones para conjugados de la invención y para conjugados que comprenden MMAD, MMAE o MMAF. Se calcularon AUCs un nivel mínimo-0 de 0-336 h excepto cuando se anota.

ADC	Dose	AUC (nivel mínimo-0) ($\mu\text{g}\cdot\text{Horas/mL}$)		ADC/Ab Ratio
		ADC	Ab	
H(C)-#D44	3	1070 ¹	2720 ¹	39
H(C)-#D70	3	2240	4890	46
H(C)-#D69	3	2490	4770	52
H(C)-#A69	3	3594	5722	63
H(C)-MalPEG6C2-MMAD	3	2641	5415	49
H(C)-mc-MMAD	3	3580	4970	72
H(C)-vc-MMAE	3	1600	3290	49
H(C)-mc-MMAF	3	3080	4800	64

¹ denota un nivel mínimo final de 0-168 horas

Cuadro 24 – Los datos muestran la estabilidad de conjugados preparados utilizando ligadores en base a succinimida de anillo abierto contra anillo cerrado.

Herceptin ADC		Estabilidad GSH (6d) (% carga remanente en DÍA 6)	AUC de ADC de Ratón (ug*h/mL)	PK de Ratón ADC/Ab
mc-#118	anillo cerrado	65%	2160	55%
	anillo abierto	87%	3490	65%
MalPeg6C2-#118	anillo cerrado	82%	2010	70%
	anillo abierto	100%	3000	77%
mc-#8261	anillo cerrado	51%	3590	52%
	anillo abierto	96%	4470	73%
MalPeg6C2-#8261	anillo cerrado	61%	2950	72%
	anillo abierto	104%	-	-
mc-#115	anillo cerrado	-	1930	58%
	anillo abierto	-	2330	68%

Cuadro 25A – Cargas útiles seleccionadas y sus métodos de síntesis

Ejemplo	Preparado de la Misma Manera o Método de Preparación	Método de Purificación	Cantidad en mg (Rendimiento)
#220	ejemplo #107	Método M	10.5 mg (43%)
#221	ejemplo #107	Método M	15.2 mg (76%)
#222	Procedimiento general L	Método J*	14 mg (39%)
#223	Procedimiento general L	Método J*	16.6 mg (42%)
#224	Procedimiento general L	Método J*	18.8 mg (68%)
#225	Procedimiento general L	Método J*	17.3 mg (64%)
#226	ejemplo #146	cromatografía en gel de sílice	354 mg (78%)
#227	Procedimiento general L	Método J*	19.4 mg (77%)
#228	ejemplo #131	Método E1*	30 mg (51%)
#229	ejemplo #151	Método J*	16 mg (61%)
#230	Procedimiento general L	Método J*	69 mg (42%)
#231	Procedimiento general L*	Método J*	4.2 mg (44%)
#232	ejemplo #98	Método J*	113 mg (50%)
#233	ejemplo #146	cromatografía en gel de sílice	88 mg (82%)
#234	Procedimiento general L	Método J*	8.5 mg (78%)
#235	Procedimiento general L*	Método J*	27 mg (77%)
#236	ejemplo #131	aquiral	3.7 mg (14%)
#237	ejemplo #145	cromatografía en gel de sílice	38.6 mg (93%)
#238	ejemplo #145	cromatografía en gel de sílice	419 mg (81%)
#239	ejemplo #130	cromatografía en gel de sílice	315 mg (48%)
#240	ejemplo #142	Método E1*	6 mg (20%)

#241	ejemplo #142	Método E1*	6 mg (20%)
#242	ejemplo #145	Método J*	8 mg (10%)
#243	ejemplo #145	Método J*	12 mg (22%)
#244	ejemplo #145	Método J*	9.6 mg (20%)
#245	Procedimiento general M	C18 presión media	38 mg (55%)
#246	ejemplo #130	C18 presión media	78 mg (80%)
#247	ejemplo #178	Método M*	10.5 mg (57%)

5

10

15

Cuadro 25B – Cargas útiles seleccionadas y su nombre IUPAC y datos de caracterización

Ejemplo	NOMBRE IUPAC	Espectro de masa: LC-MS o HPLC observado m/z y tiempo de retención en minutos: ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) a menos de que se indique lo contrario
#220	2-Metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[[[(2R,4S)-4-carboxi-1-fenilpentan-2-il]amino]-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il]-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida	HPLC (Protocolo CB): m/z 746.51 [$\text{M}+\text{H}^+$] (1.57 minutos)
#221	2-Metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-(biciclo[1.1.1]pent-1-ilamino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il]-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida	HPLC (Protocolo DB): m/z 622.42 [$\text{M}+\text{H}^+$] (1.57 minutos)
#222	2-Metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-3-[(1R)-2-metoxi-2-oxo-1-(1-fenilciclopropil)etil]amino}-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida	LC-MS (Protocolo H): m/z 744.9 [$\text{M}+\text{H}^+$] (2.19 minutos). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.16-7.22 (m), 6.99-7.08 (m), 6.42-6.51 (m), 6.10-6.17 (m), 4.87-4.96 (m), 4.65-4.79 (m), 4.27-4.36 (m), 4.04-4.27 (m), 3.95-4.02 (m), 3.87-3.93 (m), 3.64-3.84 (m), 3.44-3.57 (m), 3.22-3.42 (m), 3.08-3.17 (m), 2.98-3.07 (m), 2.90-2.93 (m), 2.85-2.89 (m), 2.53-2.57 (m), 2.35-2.51 (m), 2.19-2.27 (m), 2.02-2.16 (m), 1.93-2.00 (m), 1.77-1.90 (m), 1.57-1.70 (m), 1.35-1.52 (m), 1.26-1.33 (m), 1.19-1.25 (m), 1.11-1.16 (m), 1.03-1.11 (m), 0.83-1.02 (m), 0.79-0.88 (m).
#223	2-Metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-3-[(1S)-2-metoxi-2-oxo-1-(1-fenilciclopropil)etil]amino}-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida	LC-MS (Protocolo H): m/z 744.4 [$\text{M}+\text{H}^+$] (2.17 minutos). ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 8.19-8.24 (m), 7.87-7.92 (m), 7.20-7.38 (m), 4.71-5.04 (m), 4.61-4.71 (m), 4.47-4.52 (m), 4.38-4.44 (m), 4.05-4.13 (m), 3.99-4.04 (m), 3.90-3.98 (m), 3.64-3.73 (m), 3.52-3.60 (m), 3.46-3.52 (m), 3.37-3.46 (m), 3.35-3.37 (m), 3.29-3.35 (m), 3.24-3.28 (m), 3.15-3.19 (m), 3.08-3.14 (m), 3.01-3.06 (m), 2.84-2.87 (m), 2.43-2.63 (m), 1.96-2.20 (m), 1.68-1.95 (m), 1.60-1.66 (m), 1.52-1.57 (m), 1.33-1.44 (m), 1.27-1.32 (m), 1.23-1.27 (m), 1.12-1.17 (m), 1.04-1.10 (m), 0.96-1.03 (m), 0.90-0.96 (m), 0.82-0.90 (m).
#224	2-Metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1R)-1-[(7R)-biciclo[4.2.0]octa-1,3,5-trien-7-il]-2-metoxi-2-oxoetil]amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il]-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida	LC-MS (Protocolo H): m/z 730.8 [$\text{M}+\text{H}^+$] (2.15 minutos). ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 7.09-7.18 (m), 6.95-7.08 (m), 4.88-4.93 (m), 4.75-4.85 (m), 4.72-4.74 (m), 4.62-4.70 (m), 4.50-4.59 (m), 4.09-4.16 (m), 3.96-4.06 (m), 3.82-3.90 (m), 3.67-3.76 (m), 3.58-3.67 (m), 3.58-3.67 (m), 3.45-3.54 (m), 3.33-3.44 (m), 3.33-3.44 (m), 3.28-3.33 (m), 3.10-3.27 (m), 3.00-3.10 (m), 2.93-3.00 (m), 2.75-2.78 (m), 2.56-2.65 (m), 2.36-2.45 (m), 2.17-2.35 (m), 1.94-2.16 (m), 1.67-1.94 (m), 1.48-1.67 (m), 1.27-1.33 (m), 1.23-1.27 (m), 1.17-1.26 (m), 1.08-1.17 (m), 0.98-1.07 (m), 0.86-0.98 (m), 0.77-0.84 (m).

#225	2-Metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1S)-1-[(7S)-biciclo[4.2.0]octa-1,3,5-trien-7-il]-2-metoxi-2-oxoetil}amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida	LC-MS (Protocolo H): m/z 730.9 [M+H ⁺] (2.19 minutos)
#226	N,2-Dimetilalanil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-3-[(2S)-1-metoxi-1-oxo-3-fenilpropan-2-il]amino}-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida	LC-MS (Protocolo Q): m/z 732.4 [M+H ⁺] (1.24 minutos). ¹ H NMR δ 8.47-8.53 (m), 8.24-8.29 (m), 7.81-7.91 (m), 7.14-7.27 (m), 4.54-4.75 (m), 4.44-4.54 (m), 3.94-4.02 (m), 3.72-3.78 (m), 3.61-3.69 (m), 3.28-3.36 (m), 3.14-3.28 (m), 2.99-3.08 (m), 2.81-2.97 (m), 2.29-2.57 (m), 2.16-2.29 (m), 1.91-2.16 (m), 1.60-1.87 (m), 1.35-1.53 (m), 0.99-1.33 (m), 0.80-0.99 (m), 0.71-0.80 (m).
#227	2-Metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1S)-1-[(7R)-biciclo[4.2.0]octa-1,3,5-trien-7-il]-2-metoxi-2-oxoetil}amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida	LC-MS (Protocolo Q): m/z 730.4 [M+H ⁺] (1.29 minutos)
#228	N,N,2-trimetilalanil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-3-[(2S)-1-metoxi-1-oxo-3-fenilpropan-2-il]amino}-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida	HPLC (Protocolo A*): m/z 746.5 [M+H ⁺] (7.103 minutos)
#229	N,N,2-trimetilalanil-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1S)-1-carboxi-2-feniletil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida	LC-MS (Protocolo Q1): m/z 732.3 [M+H ⁺] (0.70 minutos)
#230	2-Metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(R)-carboxi(1-fenilciclopropil)metil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida	HPLC (Protocolo G): m/z 730.4 [M+H ⁺] (1.25 minutos)
#231	difluoro{2-Metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(3R,4R,7S)-7-bencil-15-{2-[(3,5-dimetil-1H-pirrol-2-il-kappaN)metiliden]-2H-pirrol-5-il-kappaN}-4-metil-5,8,13-trioxo-2-oxa-6,9,12-triazapentadecan-3-il]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamidato}boro	LC-MS (Protocolo Q1): m/z 1020.6 [M+H ⁺] (0.83 minutos). ¹ H NMR (400 MHz, CD ₃ OD) δ 8.19-8.23 (m), 7.99-8.07 (m), 7.93-7.98 (m), 7.41-7.45 (m), 7.23-7.31 (m), 7.17-7.22 (m), 7.00-7.04 (m), 6.32-6.37 (m), 6.20-6.24 (m), 4.72-4.93 (m), 4.61-4.69 (m), 4.05-4.17 (m), 3.88-3.93 (m), 3.72-3.81 (m), 3.63-3.70 (m), 3.56-3.62 (m), 3.48-3.56 (m), 3.25-3.44 (m), 3.16-3.25 (m), 3.09-3.14 (m), 2.98-3.09 (m), 2.81-2.90 (m), 2.54-2.67 (m), 2.39-2.53 (m), 2.09-2.32 (m), 1.75-1.97 (m), 1.60-1.69 (m), 1.52-1.59 (m), 1.32-1.44 (m), 1.28-1.32 (m), 1.16-1.21 (m), 0.98-1.09 (m), 0.86-0.98 (m), 0.79-0.90 (m).

#232	2-metil-D-prolil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-((2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etilamino}propil]pirrolidin-1-il)-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida	LC-MS (Protocolo Q): m/z 769.3 [M+H ⁺] (1.34 minutos). ¹ H NMR δ 9.04-9.17 (m), 8.88-8.94 (m), 8.70-8.86 (m), 8.62-8.67 (m), 7.79-7.84 (m), 7.76-7.79 (m), 7.65-7.69 (m), 7.61-7.64 (m), 7.20-7.31 (m), 7.12-7.20 (m), 5.44-5.52 (m), 5.34-5.46 (m), 4.70-4.78 (m), 4.56-4.67 (m), 4.47-4.54 (m), 3.94-4.04 (m), 3.76-3.83 (m), 3.52-3.61 (m), 3.36-3.52 (m), 3.28-3.35 (m), 3.10-3.27 (m), 2.93-3.08 (m), 2.77-2.80 (m), 2.64-2.70 (m), 2.35-2.54 (m), 2.09-2.34 (m), 1.96-2.09 (m), 1.54-1.88 (m), 1.38-1.52 (m), 1.18-1.36 (m), 1.03-1.13 (m), 0.81-1.01 (m), 0.68-0.81 (m).
#233	metil N-((2R,3R)-3-[(2S)-1-((3R,4S,5S)-4-[[N-[(3-aminoxetan-3-il)carbonil]-L-valil](metilamino)-3-metoxi-5-metilheptanoil]pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanoil]-L-fenilalaninato	LC-MS (Protocolo Q): m/z 732.2 [M+H ⁺] (1.28 minutos). ¹ H NMR δ 8.48-8.53 (m), 8.22-8.28 (m), 7.80-7.92 (m), 7.14-7.28 (m), 4.74-4.79 (m), 4.54-4.72 (m), 4.43-4.52 (m), 4.24-4.35 (m), 4.07-4.12 (m), 3.94-4.02 (m), 3.72-3.78 (m), 3.61-3.69 (m), 3.48-3.58 (m), 3.40-3.48 (m), 3.11-3.35 (m), 2.98-3.11 (m), 2.75-2.97 (m), 2.64-2.69 (m), 2.30-2.55 (m), 2.17-2.28 (m), 2.03-2.14 (m), 1.92-2.02 (m), 1.59-1.87 (m), 1.35-1.54 (m), 1.21-1.33 (m), 1.112-1.20 (m), 1.00-1.09 (m), 0.70-0.98 (m).
#234	2-Metilalanil-N-((3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-((3R,4R,7S,12S)-7-bencil-14-[3-cloro-4-(propan-2-iloxi)fenil]-4-metil-12-[4-(8-metilimidazo[1,2-a]piridin-2-il)bencil]-5,8,14-trioxo-2,9-dioxa-6,13-diazatetradecan-3-il]pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida	LC-MS (Protocolo H): m/z 589.9 [M+H ²⁺] (2.29 minutos). ¹ H NMR (400 MHz, CD ₃ OD) δ 8.55-8.61 (m), 8.40-8.45 (m), 8.34-8.39 (m), 8.23-8.28 (m), 8.14-8.19 (m), 7.84-7.95 (m), 7.79-7.84 (m), 7.71-7.77 (m), 7.61-7.68 (m), 7.46-7.52 (m), 7.34-7.40 (m), 7.09-7.27 (m), 7.03-7.09 (m), 4.77-4.90 (m), 4.58-4.77 (m), 4.43-4.55 (m), 4.17-4.33 (m), 4.07-4.16 (m), 4.00-4.07 (m), 3.79-3.85 (m), 3.58-3.70 (m), 3.44-3.52 (m), 3.12-3.40 (m), 2.80-3.12 (m), 2.64-2.71 (m), 2.62-2.64 (m), 2.38-2.47 (m), 2.00-2.33 (m), 1.66-2.00 (m), 1.46-1.63 (m), 1.29-1.44 (m), 1.07-1.16 (m), 0.91-1.07 (m), 0.79-0.87 (m).
#235	2-Metilalanil-N-((3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(2S)-1-[[4-(5-fluoro-1,3-benzotiazol-2-il)-2-metilfenil]amino}-1-oxo-3-fenilpropan-2-il]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida	LC-MS (Protocolo Q1): m/z 944.3 [M+H ⁺] (0.84 minutos). ¹ H NMR (400 MHz, CD ₃ OD) δ 8.54-8.59 (m), 8.29-8.33 (m), 7.87-8.02 (m), 7.80-7.87 (m), 7.68-7.74 (m), 7.62-7.67 (m), 7.20-7.38 (m), 4.98-5.06 (m), 4.84-4.97 (m), 4.66-4.79 (m), 4.61-4.66 (m), 4.13-4.19 (m), 3.98-4.04 (m), 3.91-3.96 (m), 3.79-3.85 (m), 3.64-3.73 (m), 3.38-3.56 (m), 3.34-3.38 (m), 3.28-3.34 (m), 3.17-3.27 (m), 3.12-3.16 (m), 3.03-3.11 (m), 2.99-3.03 (m), 2.86-2.87 (m), 2.80-2.82 (m), 2.69-2.71 (m), 2.31-2.54 (m), 2.27-2.31 (m), 2.06-2.27 (m), 1.88-2.00 (m), 1.74-1.88 (m), 1.64-1.74 (m), 1.59-1.64 (m), 1.50-1.59 (m), 1.27-1.48 (m), 1.19-1.26 (m), 1.11-1.16 (m), 1.06-1.11 (m), 0.96-1.05 (m), 0.86-0.94 (m), 0.77-0.83 (m).
#236	1,2-dimetil-D-prolil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-((2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-3-[(2S)-1-metoxi-1-oxo-3-fenilpropan-2-il]amino}-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il)-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida	LC-MS (Protocolo Q1): m/z 758.3 [M+H ⁺] (0.74 minutos)

#237	N,2-Dimetilalanil-N- [(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2- [(1R,2R)-3-[(2S)-3-(1H- indol-3-yl)-1-metoxi-1- oxopropan-2-yl]amino]-1- metoxi-2-metil-3- oxopropil]pirrolidin-1-yl]-3- metoxi-5-metil-1-oxoheptan- 4-yl]-N-metil-L-valinamida	LC-MS (Protocolo Q1): m/z 771.2 [M+H ⁺] (0.67 minutos). ¹ H NMR (400 MHz, CD ₃ OD) δ 7.95-7.96 (m), 7.48-7.55 (m), 7.45-7.48 (m), 7.26-7.31 (m), 6.94-7.18 (m), 5.45- 5.49 (m), 5.19-5.22 (m), 5.11-5.17 (m), 4.97-5.00 (m), 4.78-4.87 (m), 4.68-4.77 (m), 4.59-4.64 (m), 4.27-4.34 (m), 3.99- 4.16 (m), 3.84-3.92 (m), 3.78-3.82 (m), 3.62-3.78 (m), 3.49-3.59 (m), 3.41-3.49 (m), 3.20-3.41 (m), 2.99-3.20 (m), 2.95- 2.98 (m), 2.82-2.86 (m), 2.77-2.79 (m), 2.62-2.68 (m), 2.28-2.49 (m), 2.19-2.27 (m), 1.98-2.16 (m), 1.56-1.91 (m), 1.31- 1.49 (m), 1.19-1.30 (m), 1.15-1.19 (m), 1.06-1.13 (m), 0.88-1.03 (m), 0.79-0.87 (m).
#238	N,2-Dimetilalanil-N- [(3R,4S,5S)-3-metoxi-1- [(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2- metil-3-oxo-3-[(2S)-1-oxo-3- fenil-1-(prop-2-en-1- iloxi)propan-2- il]amino]propil]pirrolidin-1- il]-5-metil-1-oxoheptan-4-yl]- N-metil-L-valinamida	LC-MS (Protocolo Q1): m/z 758.84 [M+H ⁺] (0.71 minutos). ¹ H NMR (400 MHz, CD ₃ OD) δ 7.15-7.32 (m), 5.86-6.00 (m), 5.28-5.40 (m), 5.17-5.27 (m), 4.97-5.04 (m), 4.69- 4.91 (m), 4.57-4.69 (m), 4.05-4.21 (m), 3.91-3.96 (m), 3.79-3.88 (m), 3.71-3.78 (m), 3.62-3.70 (m), 3.25-3.56 (m), 3.15- 3.24 (m), 3.08-3.14 (m), 2.90-3.02 (m), 2.79-2.87 (m), 2.42-2.52 (m), 2.20-2.38 (m), 2.12-2.20 (m), 2.03-2.12 (m), 2.00- 2.03 (m), 1.71-2.1.96 (m), 1.33-1.70 (m), 1.23-1.32 (m), 1.17-1.23 (m), 1.12-1.17 (m), 1.05-1.10 (m), 0.94-1.05 (m), 0.82- 0.89 (m).
#239	2-metil-L-prolil-N- [(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2- [(1R,2R)-3-[(2S)-1-ter- butoxi-1-oxo-3-fenilpropan- 2-yl]amino]-1-metoxi-2-metil- 3-oxopropil]pirrolidin-1-yl]-3- metoxi-5-metil-1-oxoheptan- 4-yl]-N-metil-L-valinamida	LC-MS (Protocolo Q): m/z 786.6 [M+H ⁺] (1.46 minutos). ¹ H NMR δ 8.35-8.42 (m), 8.21- 8.31 (m), 8.14-8.20 (m), 7.15-7.29 (m), 4.66-4.76 (m), 4.53-4.65 (m), 4.46- 4.53 (m), 4.32-4.42 (m), 4.07-4.15 (m), 3.96-4.04 (m), 3.76-3.82 (m), 3.41-3.61 (m), 3.30-3.38 (m), 3.16-3.30 (m), 3.08- 3.15 (m) 2.99-3.08 (m), 2.92-2.96 (m), 2.78-2.90 (m), 2.63-2.78 (m), 2.37-2.58 (m), 2.18-2.36 (m), 2.03-2.13 (m), 1.89- 2.01 (m), 1.64-1.88 (m), 1.35-1.62 (m), 1.31-1.35 (m), 1.17-1.31 (m), 1.03-1.14 (m), 0.70-1.01 (m).
#240	N,2-Dimetilalanil-N- [(3R,4S,5S)-3-metoxi-1- [(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2- metil-3-oxo-3-[(2S)-1-oxo-3- fenil-1-[(1H-1,2,3-triazol-4- ilmetil]amino]propan-2- il]amino]propil]pirrolidin-1- il]-5-metil-1-oxoheptan-4-yl]- N-metil-L-valinamida	LC-MS (Protocolo Q1): m/z 798.2 [M+H ⁺] (0.66 minutos). ¹ H NMR (400 MHz, CD ₃ OD) δ 8.43-8.49 (m), 7.50-7.53 (m), 7.42-7.48 (m), 7.06-7.20 (m), 4.21-4.83 (m), 3.95- 4.13 (m), 3.76-3.88 (m), 3.53-3.67 (m), 3.16-3.47 (m), 3.08-3.15 (m) 3.00-3.16 (m), 2.77-2.90 (m), 2.70-2.73 (m), 2.62-2.69 (m), 2.45-2.58 (m), 2.34-2.41 (m), 2.21- 2.29 (m), 2.12-2.21 (m), 1.55-2.09 (m), 1.39-1.54 (m), 1.16-1.36 (m), 1.04-1.14 (m), 0.85-0.99 (m), 0.73-0.80 (m), 0.00- 0.02 (m).
#241	N,2-Dimetilalanil-N- [(3R,4S,5S)-3-metoxi-1- [(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2- metil-3-oxo-3-[(2S)-1-oxo-3- fenil-1-(prop-2-yn-1- ilamino)propan-2- il]amino]propil]pirrolidin-1- il]-5-metil-1-oxoheptan-4-yl]- N-metil-L-valinamida	LC-MS (Protocolo Q1): m/z 755.1 [M+H ⁺] (0.69 minutos). ¹ H NMR (400 MHz, CD ₃ OD) δ 8.36-8.67 (m), 7.26-7.50 (m), 7.10-7.26 (m), 5.13-5.17 (m), 4.95-4.99 (m), 4.67- 4.84 (m), 4.61-4.66 (m), 4.50-4.60 (m), 3.77-4.12 (m), 3.69-3.75 (m), 3.56-3.66 (m), 3.44-3.54 (m), 3.19-3.44 (m) 3.12-3.19 (m), 3.03-3.12 (m), 2.74-2.94 (m), 2.37- 2.60 (m), 2.14-2.36 (m), 1.60-2.13 (m), 1.47-1.59 (m), 1.19-1.40 (m), 1.11-1.16 (m), 0.88-1.11 (m), 0.75-0.84 (m), 0.02- 0.06 (m).

#242	N,2-Dimetilalanil-N- [(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2- [(1R,2R)-3-{(2S)-3-(1H- imidazol-4-il)-1-metoxi-1- oxopropan-2-il]amino}-1- metoxi-2-metil-3- oxopropil]pirrolidin-1-il}-3- metoxi-5-metil-1-oxoheptan- 4-il]-N-metil-L-valinamida	LC-MS (Protocolo Q1): m/z 722.95 [M+H ⁺] (0.52 minutos) ¹ H NMR (400 MHz, CD ₃ OD) δ 8.78-8.86 (m), 8.71-8.73 (m), 7.96-8.00 (m), 7.34-7.40 (m), 4.74-4.91 (m), 4.67- 4.71 (m), 4.55-4.63 (m), 4.13-4.22 (m), 4.04-4.10 (m), 3.97-4.01 (m), 3.84-3.92 (m), 3.66-3.82 (m), 3.42-3.64 (m), 3.26- 3.42 (m) 3.11-3.21 (m), 2.90-2.92 (m), 2.83-2.84 (m), 2.59-2.64 (m), 2.48-2.56 (m), 2.32-2.41 (m), 2.09-2.24 (m), 1.99- 2.08 (m), 1.68-1.95 (m), 1.59-1.66 (m), 1.51-1.58 (m), 1.35-1.45 (m), 1.22-1.26 (m), 1.17-1.21 (m), 0.95-1.12 (m), 0.83- 0.89 (m).
#243	N,2-Dimetilalanil-N- [(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2- [(1R,2R)-3-{(2S)-3-(4- hidroxifenil)-1-metoxi-1- oxopropan-2-il]amino}-1- metoxi-2-metil-3- oxopropil]pirrolidin-1-il}-3- metoxi-5-metil-1-oxoheptan- 4-il]-N-metil-L-valinamida	LC-MS (Protocolo Q1): m/z 748.2 [M+H ⁺] (0.52 minutos) ¹ H NMR (400 MHz, CD ₃ OD), δ 8.91-8.99 (m), 8.42-8.46 (m), 8.15-8.20 (m), 7.92-8.01 (m), 7.00-7.10 (m), 6.64- 6.74 (m), 5.22-5.26 (m), 5.06-5.09 (m), 4.79-4.95 (m), 4.65-4.79 (m), 4.59-4.65 (m), 4.12-4.21 (m), 4.05-4.12 (m), 3.91- 3.99 (m), 3.84-3.90 (m), 3.67-3.79 (m), 3.60-3.66 (m), 3.39-3.57 (m), 3.34-3.39 (m) 3.29-3.34 (m), 3.12-3.27 (m), 2.98-3.00 (m), 2.78-2.88 (m), 2.61-2.65 (m), 2.55- 2.57 (m), 2.46-2.53 (m), 2.10-2.36 (m), 1.68-1.96 (m), 1.61-1.68 (m), 1.55-1.60 (m), 1.35-1.53 (m), 1.19-1.24 (m), 1.14- 1.18 (m), 1.08-1.13 (m), 0.98-1.08 (m), 0.84-0.92 (m).
#244	N,2-Dimetilalanil-N- [(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2- [(1R,2R)-3-{(1R)-1-carboxi- 2-feniletil]amino}-1-metoxi- 2-metil-3- oxopropil]pirrolidin-1-il}-3- metoxi-5-metil-1-oxoheptan- 4-il]-N-metil-L-valinamida	LC-MS (Protocolo Q1): m/z 718.4 [M+H ⁺] (0.66 minutos) ¹ H NMR (400 MHz, CD ₃ OD), δ 7.87-7.92 (m), 7.71-7.76 (m), 7.46-7.53 (m), 7.40-7.46 (m), 7.19-7.33 (m), 4.81- 4.96 (m), 4.68-4.77 (m), 4.60-4.65 (m), 4.47-4.53 (m), 4.01-4.17 (m), 3.94-3.98 (m), 3.81-3.86 (m), 3.68-3.76 (m), 3.56- 3.64 (m), 3.40-3.50 (m), 3.36-3.40 (m) 3.26-3.35 (m), 3.23-3.26 (m), 3.16-3.22 (m), 3.12-3.16 (m), 2.94-3.06 (m), 2.91- 2.93 (m), 2.86-2.88 (m), 2.41-2.66 (m), 2.32-2.41 (m), 1.97-2.23 (m), 1.85-1.97 (m), 1.71-1.85 (m), 1.62-1.68 (m), 1.50- 1.61 (m), 1.37-1.46 (m), 0.98-1.14 (m), 0.85-0.92 (m).
#245	1,2-dimetil-L-prolil-N- [(3R,4S,5S)-3-metoxi-1- {(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2- metil-3-oxo-3-[(2S)-1-oxo-3- fenil-1-(piperazin-1- il)propan-2- il]amino}propil]pirrolidin-1- il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il]- N-metil-L-valinamida	LC-MS (Protocolo Q): m/z 835.0 [M+Na ⁺] (0.87 minutos) ¹ H NMR δ 9.58-9.69 (m), 8.84-9.16 (m), 8.69-8.77 (m), 8.54-8.60 (m), 8.44-8.50 (m), 8.32-8.42 (m), 8.25- 8.30 (m), 7.13-7.31 (m), 7.00-7.01 (m), 4.97-5.06 (m), 4.88-4.97 (m), 4.57-4.75 (m), 4.45-4.57 (m), 3.84-4.45 (m), 3.62- 3.84 (m), 3.40-3.62 (m), 3.13-3.33 (m), 2.77-3.10 (m), 2.67-2.75 (m), 2.47-2.57 (m), 2.38-2.45 (m), 1.92-2.35 (m), 1.58- 1.88 (m), 1.37-1.55 (m), 1.22-1.32 (m), 0.97-1.06 (m), 0.84-0.97 (m), 0.73-0.81 (m).

#246	1,2-dimetil-L-prolil-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{(2S)-1-amino-3-fenilpropan-2-il]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida	LC-MS (Protocolo Q): m/z 366.2[M+H ⁺] ² (0.91 minutos) ¹ H NMR δ 9.56-9.65 (m), 8.70-8.76 (m), 8.05-8.09 (m), 7.77-7.92 (m), 7.14-7.30 (m), 4.60-4.72 (m), 4.46-4.57 (m), 3.61-4.39 (m), 3.41-3.61 (m), 3.11-3.33 (m), 2.97-3.09 (m), 2.79-2.94 (m), 2.63-2.74 (m), 2.38-2.56 (m), 2.13-2.37 (m), 1.93-2.13 (m), 1.45-1.89 (m), 1.21-1.32 (m), 1.09-1.14 (m), 1.03-1.08 (m), 0.84-0.95 (m), 0.73-0.80 (m).
#247	2-metil-D-prolil-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[2-(ciclohepta-2,4,6-trien-1-il)etil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida	HPLC (Protocolo DB): m/z 700.51 [M+H ⁺] (2.56 minutos)

5

10

15

RESUMEN

La presente invención está dirigida a pentapéptidos citotóxicos,
5 y a métodos para utilizar los mismos para tratar el cáncer.