

Compuestos de Carfilzomib Pegilados

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a compuestos de carfilzomib pegilados, composiciones farmacéuticas que comprenden dichos compuestos, y métodos y usos de las mismas para tratar el cáncer, incluidas las malignidades hematológicas, tales como el mieloma múltiple, y los tumores sólidos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El cáncer es una de las enfermedades más comunes y una de las principales causas de muerte en todo el mundo. Solo en los Estados Unidos, el cáncer es la segunda causa de muerte, superada solamente por la enfermedad cardíaca. El cáncer se caracteriza a menudo por la desregulación de los procesos celulares normales o la proliferación celular no regulada.

El mieloma múltiple (MM) es un tipo de cáncer neoplásico progresivo y maligno que se origina en las células plasmáticas. Se caracteriza por una acumulación anormal de células plasmáticas malignas dentro de la médula ósea, y representa aproximadamente el 13% de todos los tipos de cáncer hematológicos (Palumbo and Anderson, 2011). En 2015, se esperaba que unos 26,850 nuevos casos de MM fueran diagnosticados, y se esperaba que alrededor de 11,240 personas murieran de la enfermedad en los Estados Unidos (ACS, 2015). La incidencia de MM ha aumentado constantemente debido al aumento de la esperanza de vida de la población general en los Estados Unidos (Warren *et al.*, 2013). La enfermedad afecta con mayor frecuencia a la población de edad avanzada, con una edad media de incidencia de alrededor de 69 años (Howlander *et al.*, 2013, ACS, 2015).

Los objetivos terapéuticos en el manejo de MM son proporcionar alivio sintomático, lograr el control de la enfermedad y proporcionar remisiones prolongadas (Kurtin, 2013). Convencionalmente, se ha utilizado una combinación de agentes quimioterapéuticos de dosis altas (melfalán, vincristina, ciclofosfamida, doxorrubicina, doxorrubicina liposómica, bendamustina) seguido de trasplante autólogo de células madre (ASCT) para tratar a pacientes jóvenes, vírgenes al tratamiento y en buen estado de salud (menores de 65 años de edad) (Palumbo *et al.*, 2011). La edad, las condiciones comórbidas y la evaluación geriátrica son los principales criterios para decidir la aptitud de los pacientes para tolerar una terapia de dosis alta (HDT) seguido de ASCT (Palumbo *et al.*, 2014). Para los pacientes ancianos no aptos para HDT y ASCT, el melfalán más prednisona

había sido la terapia estándar durante varias décadas (Palumbo *et al.*, 2011; Rodríguez *et al.*, 2012). Durante la última década, el algoritmo de tratamiento de MM experimentó un cambio de paradigma con la introducción de nuevos agentes inmunomoduladores (tales como talidomida, lenalidomida y pomalidomida) e inhibidores de proteasoma dirigidos (bortezomib y carfilzomib) (Richardson *et al.*, 2007; Dmoszyńska, 2008 Gupta *et al.*, 2013).

El carfilzomib es un inhibidor del proteasoma de tetrapéptido epoxi-cetona que se une de forma selectiva e irreversible al proteasoma constitutivo e inmunoproteasoma. Más específicamente, la cabeza electrofílica de epoxicetona se une al residuo de treonina catalítico de la subunidad $\beta 5$ de la proteína del proteasoma. La CFZ es bien tolerada con un perfil de toxicidad aceptable. El carfilzomib, sus formas polimórficas, métodos de fabricación, formulaciones, uso y otros atributos de carfilzomib se describen en las publicaciones US20050245435, US20140105921 y PCT WO2006017842, WO2009045497, WO201469897, WO2013169282, WO2014011695, WO2006063154, WO2014015016 y WO2010048298, cuyos contenidos se incorporan en su totalidad en la presente memoria mediante la presente referencia.

El carfilzomib ha demostrado poseer una tasa de respuesta alentadora en pacientes con MM recurrente y resistente y con los pacientes con diagnóstico reciente de MM. Con este fin, el carfilzomib fue aprobado por primera vez (como Kyprolis®) en julio de 2012 para el tratamiento en pacientes con MM recurrente y resistente como terapia de un solo agente. Más recientemente se aprobó Kyprolis en combinación con lenalidomida y dexametasona (julio de 2015) y en combinación con dexametasona (enero de 2016) para el tratamiento de pacientes con MM recurrente y resistente que han recibido de una a tres líneas de tratamiento. El régimen de tratamiento aprobado para el carfilzomib es administrarlo al paciente por infusión, ya sea durante un corto período de 10 minutos o durante un período de tiempo más lento y prolongado de 30 minutos. Esta infusión debe ocurrir durante 2 días consecutivos por semana durante tres semanas consecutivas en un ciclo de 28 días. Por lo tanto, para cumplir con este programa de tratamiento, los pacientes deben conducirse o ser conducidos dos veces por semana en días consecutivos a un centro autorizado de administración de fármacos, como un consultorio médico, una clínica o un hospital, donde el carfilzomib puede administrarse de manera adecuada y segura. Esto puede ser inconveniente o poco práctico, o simplemente puede ser una carga para algunos pacientes, aumentando la probabilidad de que se reduzca o disminuya el cumplimiento o incluso de incumplimiento total con el régimen terapéutico de carfilzomib prescrito.

El carfilzomib se metaboliza y se elimina rápidamente en seres humanos. El carfilzomib, un compuesto tetrapéptido pequeño, exhibe una semivida *in vivo* corta de aproximadamente 60

minutos o menos en seres humanos. Un mecanismo de eliminación de carfilzomib es a través del flujo sanguíneo hepático, lo cual da lugar a la semivida relativamente corta del carfilzomib. Los productos farmacéuticos que poseen vidas medias cortas o eliminación rápida en general tienden a presentar una reducción de la cobertura de la diana, lo cual conduce a una disminución y/o reducción de la actividad biológica inhibidora. Para superar tales deficiencias, típicamente se administra una cantidad adicional de fármaco para lograr suministrar más fármaco y conferir una eficacia prolongada en el sitio de acción biológica. Por lo tanto, tanto la eliminación rápida como la frecuencia de dosificación de carfilzomib de dos veces por semana dejan espacio para posibles mejoras en la eficacia, la disponibilidad del fármaco en el sitio activo y/o el cumplimiento del paciente con el programa de tratamiento.

El carfilzomib, en la forma en la que está aprobado actualmente (Kyprolis®), es una formulación liofilizada estéril que comprende sulfabutíler-beta-ciclodextrina (SBECD) y una solución amortiguadora de citrato de sodio. El liofilizado se reconstituye con agua estéril, y se infunde o se inyecta en el paciente. El excipiente SBECD actúa principalmente como un aditivo solubilizante para carfilzomib, y forma un complejo con carfilzomib, mejorando así la solubilidad en agua de carfilzomib.

La historia ha revelado que los intentos de resolver los puntos débiles de los productos farmacéuticos han llevado a la preparación de formas alternativas de estos compuestos medicinales, incluida la producción de versiones de profármaco, con el propósito de mejorar sus propiedades farmacológicas pK y/o PD. Por ejemplo, Greenwald *et al.* describen profármacos de compuestos que contienen amina (J. Med. Chem., 1999, 42, 3657-3667). El documento WO2005063777 describe profármacos de bencilfosfato y bencilfosfato sustituido para el tratamiento de la inflamación pulmonar. El documento WO20090152160 describe profármacos inhalados de carbaprotaciclina y prostaciclina para el tratamiento de la hipertensión arterial. La publicación de patente de E.U.A. 20040100225 describe profármacos de acyloximetilo de imatinib (Gleevec®). También, la publicación PCT WO2011084846 describe profármacos de aciloximetilo de risperidona. Estas divulgaciones de profármacos dan a conocer profármacos ligados al alquil-aciloximetilo. Otro ejemplo, la publicación de solicitud de patente de E.U.A. 20140105921 describe carfilzomib y otros profármacos inhibidores del proteasoma de epoxicetona que tienen un conector aciloximetilo que conecta el inhibidor a unidades de polietilenglicol (PEG). Sin embargo, se ha descubierto que estos compuestos de profármacos de carfilzomib liberan subproductos de metiluro de quinona durante el metabolismo *in vivo*, los cuales pueden ser potencialmente tóxicos y pueden presentar un riesgo de seguridad. Con este fin, sería deseable identificar formas alternativas de

carfilzomib y/o formas alternativas de suministrar el ingrediente farmacéutico activo carfilzomib a los pacientes, de modo tal de mantener o en la medida posible mejorar la eficacia y/o la seguridad de los tratamientos de carfilzomib actualmente aprobados.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención da a conocer novedosos compuestos poliméricos de carfilzomib, es decir, estructuras de carfilomib modificadas, las cuales proporcionan beneficios terapéuticos anticancerígenos al paciente manteniendo concentraciones plasmáticas de carfilzomib y exposición a proteasomas comparables o más prolongadas. Con este fin, estos compuestos poliméricos de carfilzomib proporcionan una actividad inhibidora del proteasoma comparable a la de la formulación para administración i.v. de carfilzomib ciclodextrina actualmente aprobada.

Particularmente, la presente invención da a conocer compuestos de carfilzomib pegilados, que tienen solubilidad en agua mejorada, y que son útiles para tratar diversos tipos de cáncer, incluido, sin limitarse al mismo, el mieloma múltiple. Más particularmente, los compuestos pegilados que se dan a conocer en la presente memoria mantienen o exhiben una biodisponibilidad adecuada y reducen o eliminan completamente la necesidad de excipientes o agentes solubilizantes tales como sulfobutiléter- β -ciclodextrina. La presente invención da a conocer además un método para preparar los compuestos de carfilzomib pegilados, composiciones farmacéuticas que comprenden los mismos, y métodos para usar los compuestos y composiciones para tratar diversas formas de cáncer, tales como mieloma múltiple.

En un aspecto de la invención, los compuestos de carfilzomib pegilados descritos en la presente memoria incluyen una o más porciones de PEG unidas covalentemente que (i) pueden conferir al carfilzomib mejoras en su solubilidad, permeabilidad, y propiedades farmacocinéticas (pK) y/o farmacodinámicas (PD) en comparación con el correspondiente producto de carfilzomib aprobado que no contenga tales restos poliméricos; y (ii) puede ser escindido o eliminado *in vivo* después de la administración a un sujeto suministrando de este modo además carfilzomib libre, el cual tiene capacidades probadas de seguridad y eficacia para tratar diversos tipos de cáncer, incluido, sin limitarse al mismo, el mieloma múltiple.

Los compuestos de carfilzomib pegilados que se dan a conocer en la presente memoria proporcionan además beneficios potenciales incluida, sin limitarse a la misma, una liberación prolongada que permite una disminución de la frecuencia de dosificación, menores C_{max} y, como resultado, posiblemente, efectos secundarios reducidos en comparación con el producto de

carfilzomib actualmente aprobado. Una mayor solubilidad acuosa también puede conferir un perfil de seguridad mejorado a los compuestos de la invención, lo cual podría facilitar modos de administración alternativos al modo de administración de infusión aprobado actualmente, tales como por ejemplo la administración subcutánea. Un perfil de pK y/o biodistribución modificado de los compuestos de carfilzomib pegilados de la invención puede dar lugar a una eficacia mejorada en el tratamiento de determinados tipos de cáncer, incluidos, sin limitarse a los mismos, mieloma múltiple y tumores sólidos. Además, los compuestos de carfilzomib pegilados de la invención proporcionan opciones de formulación que potencialmente poseen una mejor estabilidad química y térmica, un menor volumen de dosificación y la posibilidad de eliminar una etapa de liofilización, parte del procedimiento de fabricación del producto actualmente aprobado del fármaco carfilzomib.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 es una gráfica de las curvas generadas por las velocidades de conversión de varios compuestos de PEG ejemplificados en carfilzomib libre en plasma humano (representativo de las pK humanas);

La Figura 2 es una gráfica que refleja las pK de los compuestos de carfilzomib pegilados ejemplificativos en plasma de rata;

La Figura 3 es una ilustración gráfica de los efectos de carfilzomib y el compuesto del Ejemplo 1 sobre la actividad del proteasoma del tipo quimotripsina en la sangre, y en los tejidos de glándula adrenal, corazón e hígado;

La Figura 4 es una ilustración gráfica de las concentraciones medias de carfilzomib en plasma en el transcurso del tiempo para los Ejemplos 13, 26 y 34 de la invención;

La Figura 5 es una gráfica que ilustra la eficacia del Ejemplo 13 contra la formulación de CFZ-captisol en un modelo de xenoinjerto de cáncer en ratón;

La Figura 6 es una ilustración gráfica de la supervivencia de los ratones del estudio ilustrado en la Figura 5;

La Figura 7 es una gráfica que ilustra un segundo estudio de eficacia del Ejemplo 13 contra la formulación de CFZ-captisol en un modelo de xenoinjerto de cáncer en ratón;

La Figura 8 es una figura del espectro RMN para el Ejemplo 23;

La Figura 9 es una figura de la actividad celular CT-L para carfilzomib;

La Figura 10 es una figura de la actividad celular CT-L para el compuesto del Ejemplo 5;
La Figura 11 es una figura de la actividad celular CT-L para el compuesto del Ejemplo 35;
La Figura 12 es una figura de la actividad celular CT-L para el compuesto del Ejemplo 36;
La Figura 13 es una figura de la actividad celular CT-L para el compuesto del Ejemplo 37;
La Figura 14 es una figura de la actividad celular CT-L para el compuesto del Ejemplo 38; y
La Figura 15 es una figura de la actividad CT-L *in-vivo* para los compuestos de los Ejemplos 35 y 36.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

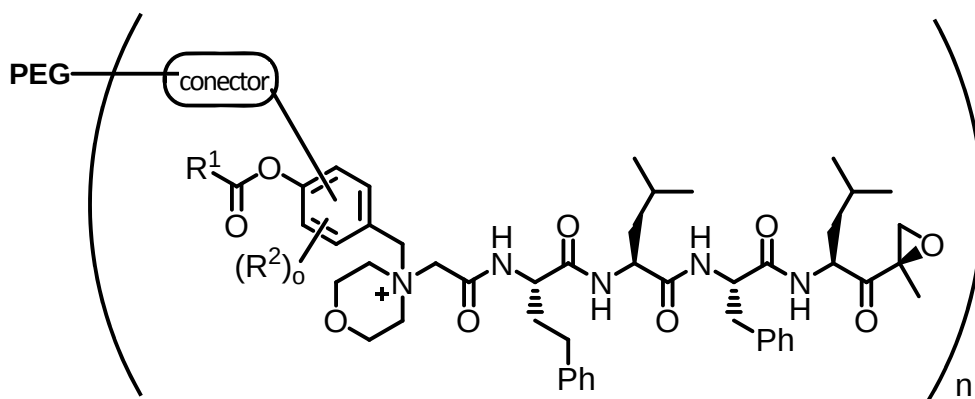
La presente invención da a conocer novedosos compuestos de carfilzomib pegilados, composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos, métodos de fabricación de los compuestos y usos de los compuestos y las composiciones que contienen los compuestos para el tratamiento del cáncer, incluido el tratamiento de neoplasias hematológicas tales como mieloma múltiple, linfoma, leucemia, y el tratamiento de otros tipos de cáncer tales como tumores sólidos. Específicamente, las unidades poliméricas de carfilzomib unido a polietilenglicol (PEG) poseen varias propiedades farmacocinéticas (pK) y/o farmacodinámicas (PD) comparables o mejoradas con respecto al Kyprolis® (carfilzomib) actualmente administrado por vía intravenosa.

El carfilzomib es un inhibidor de proteasas de epoxi cetona descrito en las patentes de Estados Unidos Nos. 7,417,042 y 7,737,112, entre otras. Los compuestos de carfilzomib pegilados descritos en la presente memoria (i) generalmente confieren propiedades mejoradas de solubilidad, permeabilidad, pK y/o PD con respecto al fármaco carfilzomib libre que no contiene tales porciones PEG; y (ii) se puede escindir *in vivo* liberando de este modo el fármaco activo carfilzomib en su forma libre. En las modalidades presentadas por la invención, la "tapa" N-terminal del carfilzomib (por ejemplo, la tapa de morfolina) se convierte en una sal cuaternaria (por ejemplo, mediante la adición de un grupo N-aciloxifenilmetilo). En algunas modalidades, la sal cuaternaria contiene una porción PEG. En algunas modalidades, los compuestos que contienen PEG son escindibles por cambio del pH y/o enzimas tales como, sin limitarse a las mismas, esterasas, citocromo P450, fosfodiesterasa, fosfoamidasa, fosfatasa y DT-diaforasa, o cualquier combinación de las mismas. En algunas modalidades, el PEG es un PEG lineal. En algunas modalidades, el PEG es un PEG bifuncional, el cual puede conjugar 1-2 compuestos por PEG. En algunas modalidades, el PEG es un PEG de cuatro brazos que puede conjugar 1-4 compuestos por PEG. En algunas modalidades, el

PEG es un PEG de ocho brazos con un núcleo de hexaglicerina que puede conjugar 1-8 compuestos por PEG. En algunas modalidades, el PEG es un PEG de ocho brazos con un núcleo de tripentaeritritol que puede conjugar 1-8 compuestos por PEG. En algunas modalidades, el PEG es un PEG ramificado de dos brazos. En algunas modalidades, el PEG es un PEG ramificado de cuatro brazos. Por otra parte, los compuestos pueden incluir además solubilizantes, mejoradores de la permeabilidad, agentes enmascarantes, vehículos macromoleculares, porciones diana y productos biológicos para mejorar la semivida y la especificidad para la enfermedad, los cuales se unen directamente al compuesto o se unen indirectamente al mismo a través de una porción espaciadora.

Los términos “aspecto” y “modalidad” se utilizan de manera indistinta en la presente memoria.

En el aspecto 1 de la invención, la invención da a conocer un compuesto carfilzomib pegilado que posee la fórmula estructural I



Fórmula I

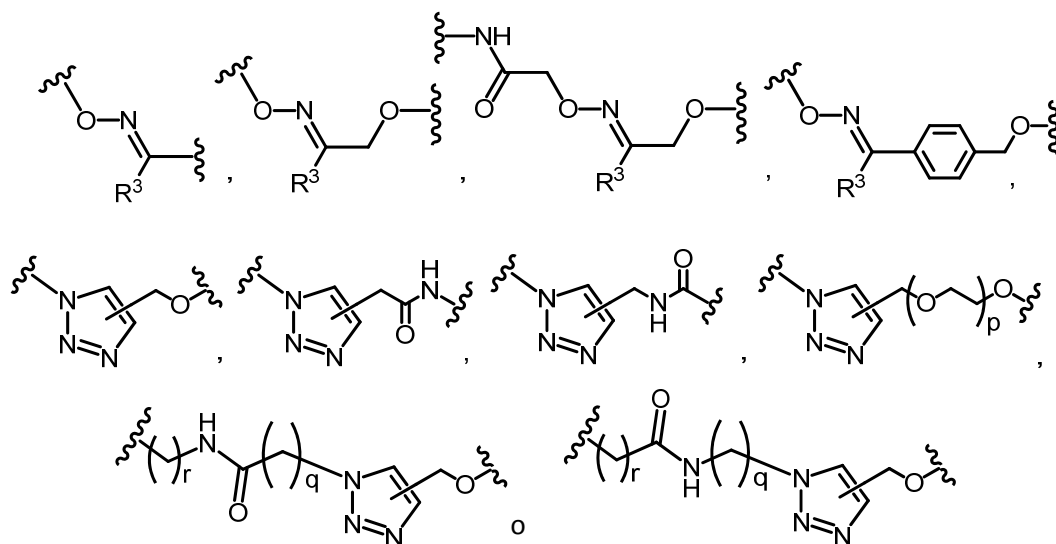
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, donde

R^1 es alquiloC₁₋₁₀ o cicloalquiloC₃₋₇;

cada R^2 , considerado en forma independiente, es alquiloC₁₋₆, -OCH₃ o halógeno;

o es un número entero a seleccionar a partir de 0, 1, 2 o 3;

conector es una porción que posee la estructura de



donde R^3 es H o $C^3/4$;

n es un número entero a seleccionar a partir de 1, 2, 3 o 4;

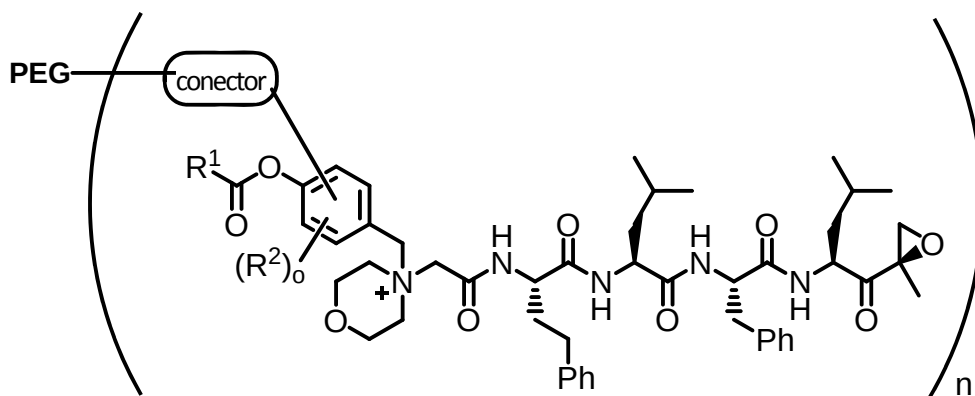
p es un número entero a seleccionar a partir de 0, 1, 2, 3 o 4;

q es un número entero a seleccionar a partir de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9;

r es un número entero a seleccionar a partir de 0, 1, 2, 3, 4 o 5; y

PEG es una porción polimérica de polietilenglicol que posee un peso molecular en el intervalo de alrededor de 500 a alrededor de 20000.

En el aspecto 1a de la invención, la invención da a conocer un compuesto carfilzomib pegilado que posee la fórmula estructural I



Fórmula I

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, donde

R¹ es alquiloCi-io o cicloalquiloC3-7;

cada R², considerado en forma independiente, es alquiloCi-6, -OCH₃ o halógeno;

o es un número entero a seleccionar a partir de 0, 1, 2 o 3;

conector es una porción que posee la estructura de

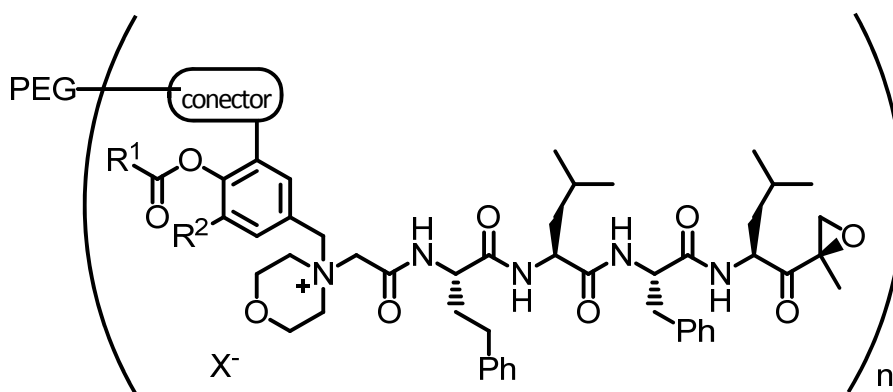
donde R³ es H o CH₃; y

p es un número entero a seleccionar a partir de 0, 1, 2, 3 o 4;

n es un número entero a seleccionar a partir de 1, 2, 3 o 4; y

PEG es una porción polimérica de polietilenglicol que posee un peso molecular en el intervalo de alrededor de 500 a alrededor de 20000.

En el aspecto 2 de la invención, la invención da a conocer el compuesto carfilzomib pegilado del aspecto 1 que posee la fórmula estructural II



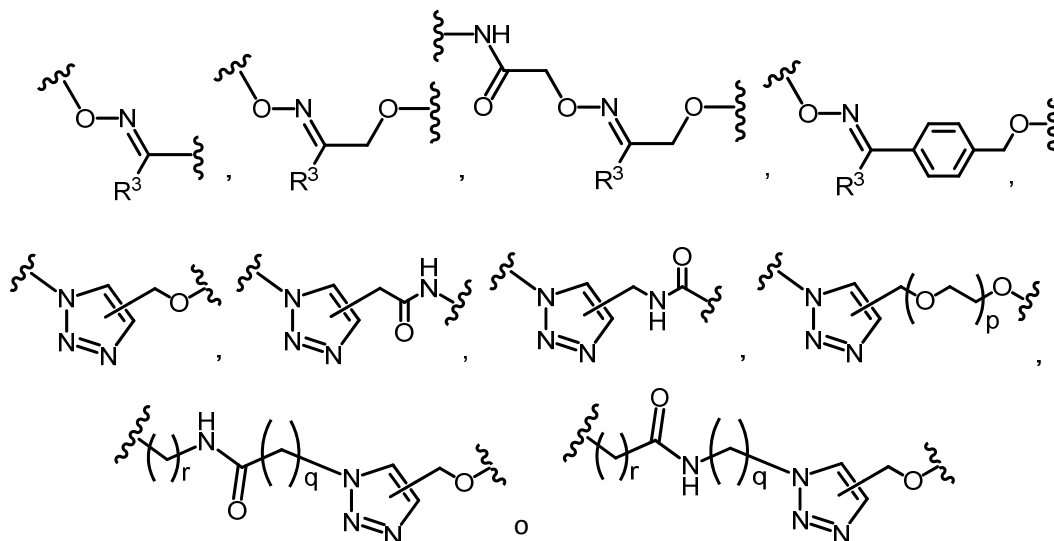
Fórmula II

donde

R¹ es alquiloC₁₋₁₀ o cicloalquiloC₃₋₇;

R^2 es alquiloCi-6, $-OCH_3$ o halógeno;

conector es una porción que posee la estructura de



donde R^3 es H o CH_3 ;

n es un número entero a seleccionar a partir de 1, 2, 3 o 4;

p es un número entero a seleccionar a partir de 0, 1, 2, 3 o 4;

q es un número entero a seleccionar a partir de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9;

r es un número entero a seleccionar a partir de 0, 1, 2, 3, 4 o 5;

X^- es una sal de contraión a seleccionar a partir de un cloruro, un bisulfato, un sulfato, un nitrato, un fosfato, un alquil-sulfonato o un aril-sulfonato; y

PEG es una porción polimérica de polietilenglicol que posee un peso molecular en el intervalo de alrededor de 2000 a alrededor de 20000.

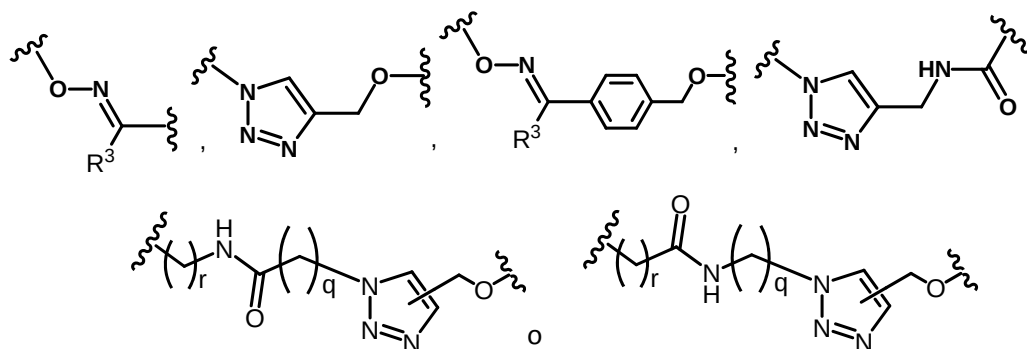
En el aspecto 3 de la invención, la invención da a conocer el compuesto conforme a los aspectos 1, 1a y 2 donde R^1 es alquiloCi-io.

En el aspecto 4 de la invención, la invención da a conocer el compuesto de uno cualquiera de los aspectos 1, 1a, 2 y 3 donde cada R^2 , considerado en forma independiente, es H, CH_3 o halógeno.

En el aspecto 5 de la invención, la invención da a conocer el compuesto de uno cualquiera de los aspectos 1, 1a, 2, 3 y 4 donde cada R^2 , considerado en forma independiente, es H, CH_3 , Cl o F.

En el aspecto 5a de la invención, la invención da a conocer el compuesto de uno cualquiera de los aspectos 1, 1a, 2, 3 y 4 donde cada R^2 , considerado en forma independiente, es H, CH_3 o F.

En el aspecto 6 de la invención, la invención da a conocer el compuesto de uno cualquiera de los aspectos 1, 1a, 2, 3, 4 y 5 donde el conector es una porción que posee la estructura de

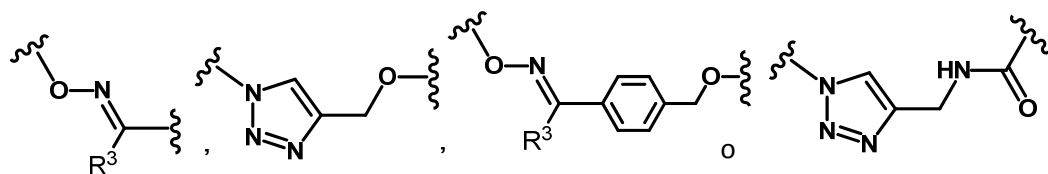


donde R³ es H o C³/₄;

q es un número entero a seleccionar a partir de 1, 2, 3, 4 o 5; y

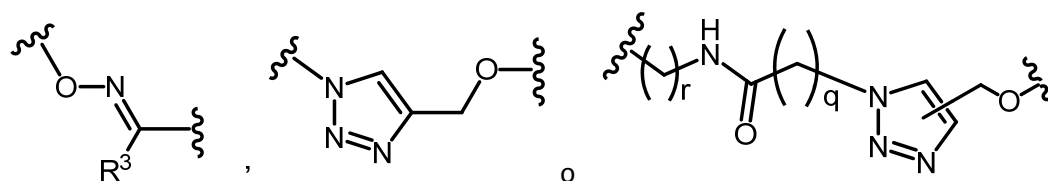
r es un número entero a seleccionar a partir de 0, 1, 2, 3 o 4.

En el aspecto 6a de la invención, la invención da a conocer el compuesto de uno cualquiera de los aspectos 1, 1a, 2, 3, 4 y 5 donde el conector es una porción que posee la estructura de



donde R³ es H o C³/₄.

En el aspecto 7 de la invención, la invención da a conocer el compuesto de uno cualquiera de los aspectos 1, 1a, 2, 3, 4, 5 y 7 donde el conector es

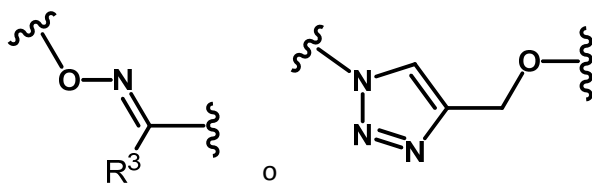


donde R³ es H o CH₃;

q es 4; y

r es 2.

En el aspecto 7a de la invención, la invención da a conocer el compuesto de uno cualquiera de los aspectos 1, 1a, 2, 3, 4, 5 y 7 donde el conector es

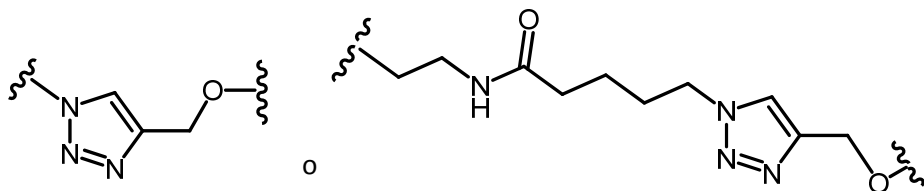


donde R^3 es H o CH_3 .

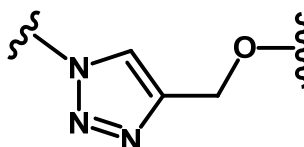
En el aspecto 8 de la invención, la invención da a conocer el compuesto de uno cualquiera de los aspectos 1, 1a, 2, 3, 4, 6, 6a, 7 y 7a donde R^3 es H.

En el aspecto 9 de la invención, la invención da a conocer el compuesto de uno cualquiera de los aspectos 1- 8 donde R^1 es metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, t-butilo, pentilo, hexilo o heptilo.

En el aspecto 10 de la invención, la invención da a conocer el compuesto de uno cualquiera de los aspectos 1-9 donde R^1 es metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, t-butilo, pentilo, hexilo o heptilo; y el conector es

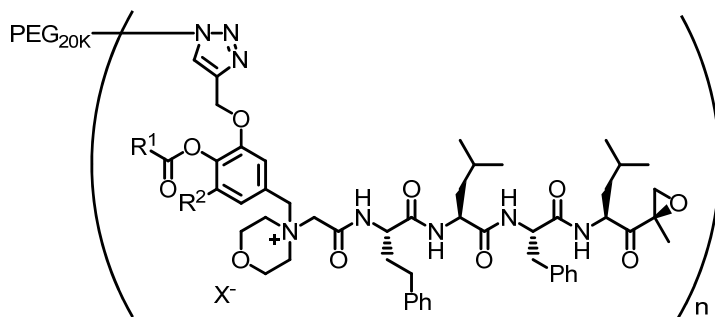
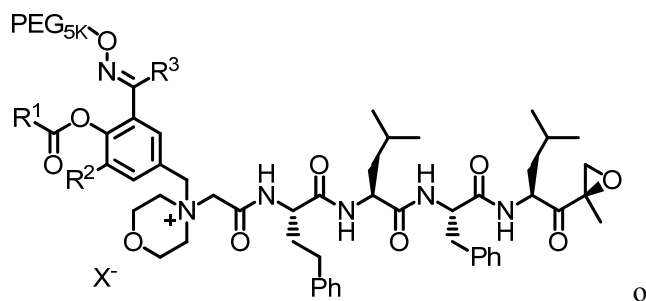
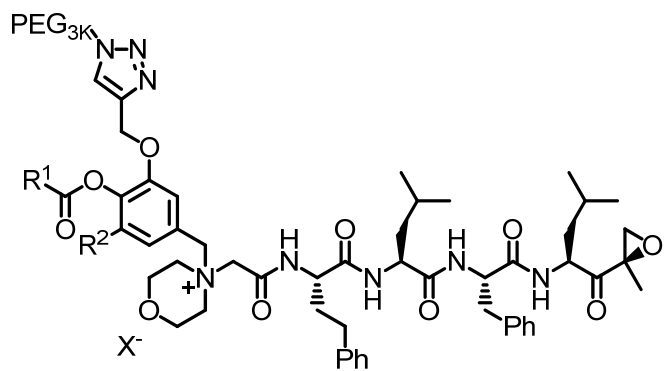


En el aspecto 10a de la invención, la invención da a conocer el compuesto de uno cualquiera de los aspectos 1-9 donde R^1 es metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, t-butilo, pentilo, hexilo o heptilo; y el conector es



Debe entenderse que en los aspectos 1, 1a, 2 y en los aspectos 3-10 el término “o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo” puede incluir una sal de un contraión que neutralice la carga catiónica del nitrógeno cuaternario, tal como la que se ilustra en la Fórmula II del aspecto 2, o las que se ilustran en los aspectos 11 -24 a continuación. Asimismo, debe entenderse que el término “uno cualquiera de los aspectos 1-X” asimismo incluye todos los sub-aspectos de 1-X divulgados en la presente memoria, incluidos, sin limitarse a los mismos, los sub-aspectos 1a, 5a, 6a, 7a y 10a.

En el aspecto 11 de la invención, la invención da a conocer un compuesto carfilzomib pegilado conforme a uno cualquiera de los aspectos 1-10, el cual posee la estructura de



donde R^1 es alquiloCi-io;

R^2 es alquiloCi-6, $-OCH_3$ o halógeno;

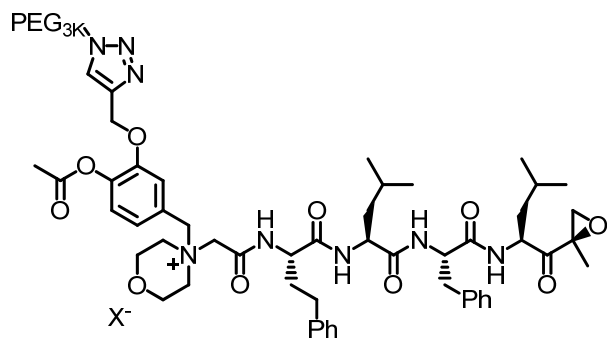
R^3 es H o CH_3 ;

X^- es un contra anión a seleccionar a partir de un anión cloruro y un anión alquil sulfonato;

n es 4; y

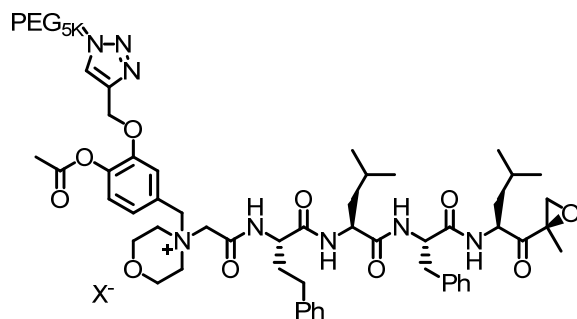
PEG es una porción polimérica de polietilenglicol que posee un peso molecular en el intervalo de alrededor de 2000 a alrededor de 20000.

En el aspecto 12 de la invención, la invención da a conocer el compuesto de uno cualquiera de los aspectos 1-11 donde el compuesto es



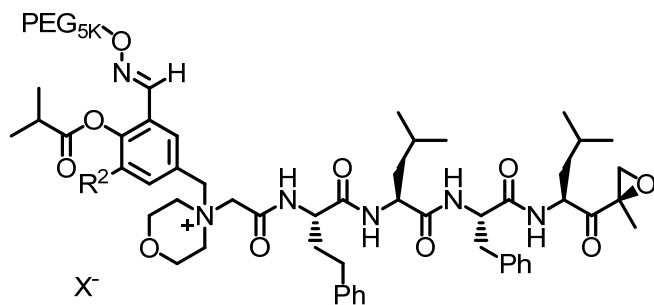
, donde X⁻ es una sal de contraión haluro, sulfonato o alquil sulfonato.

En el aspecto 12a de la invención, la invención da a conocer el compuesto de uno cualquiera de los aspectos 1-11 donde el compuesto es



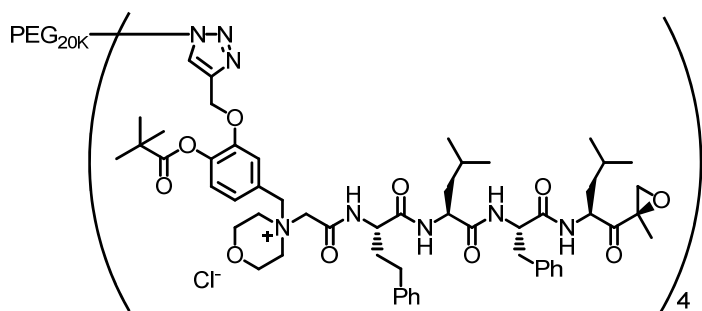
, donde X⁻ es una sal de contraión haluro, sulfonato o alquil sulfonato.

En el aspecto 13 de la invención, la invención da a conocer el compuesto de uno cualquiera de los aspectos 1-11 donde el compuesto es



, donde X⁻ es una sal de contraión haluro, sulfonato o alquil sulfonato.

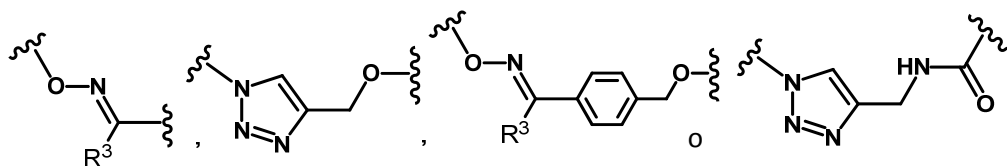
En el aspecto 14 de la invención, la invención da a conocer el compuesto de uno cualquiera de los aspectos 1-11 donde el compuesto es



En el aspecto 15 de la invención, la invención da a conocer el compuesto de uno cualquiera de los aspectos 1 y 2 donde R^1 es metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, t-butilo, pentilo, hexilo o heptilo;

cada R^2 , considerado en forma independiente, es CH_3 o halógeno;

conector es una porción que posee la estructura de



donde R^3 es H o CH_3 ; y

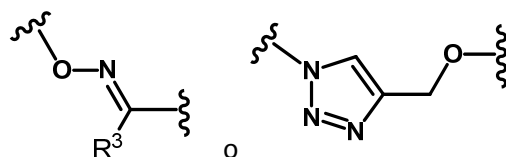
PEG es una porción polimérica de polietilenglicol que posee un peso molecular de 2000, 3000, 5000 o 20000.

En el aspecto 16 de la invención, la invención da a conocer el compuesto del aspecto 15

donde R^1 es metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, t-butilo, pentilo, hexilo o heptilo;

cada R^2 , considerado en forma independiente, es CH_3 ;

conector es una porción que posee la estructura de

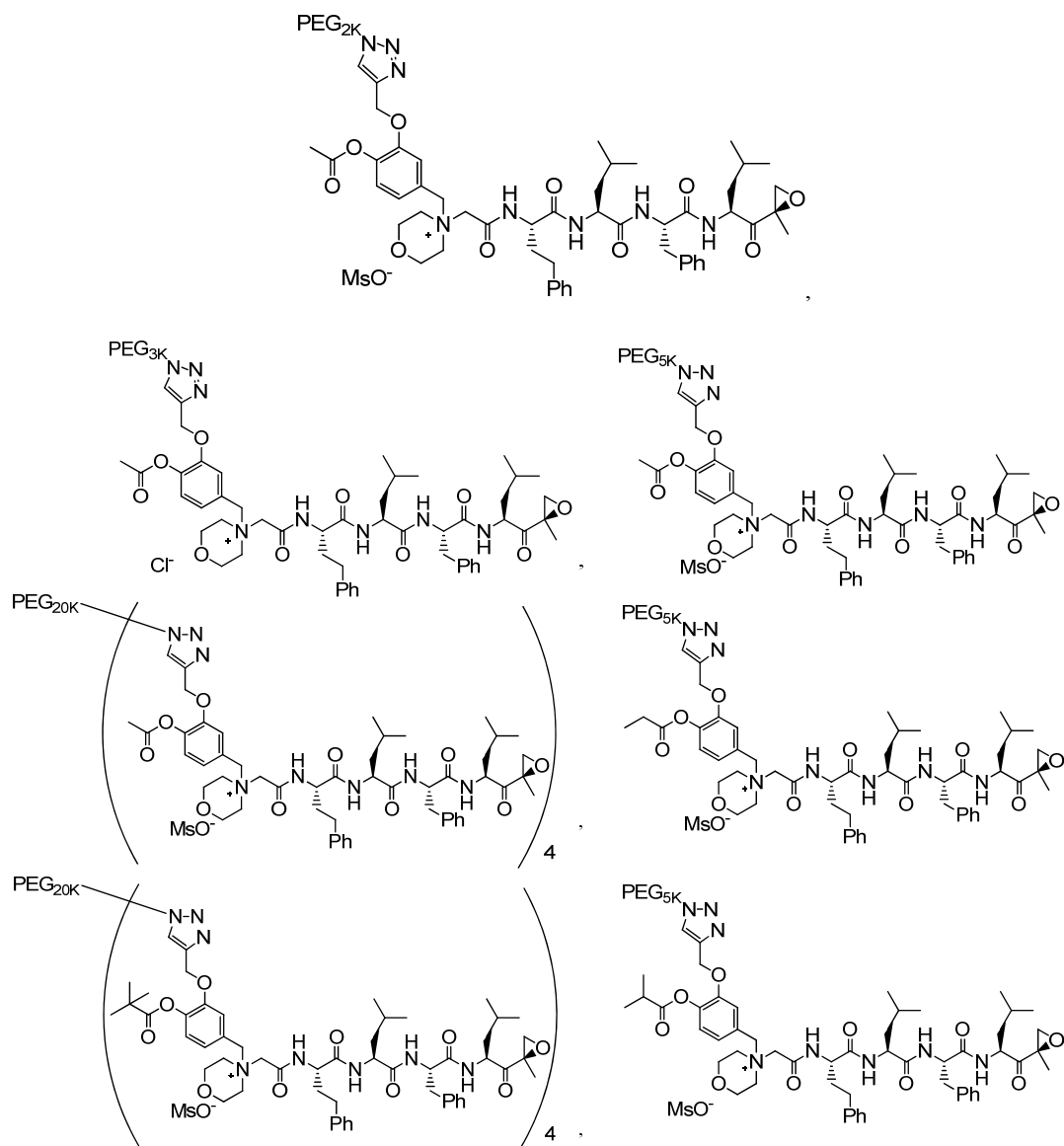


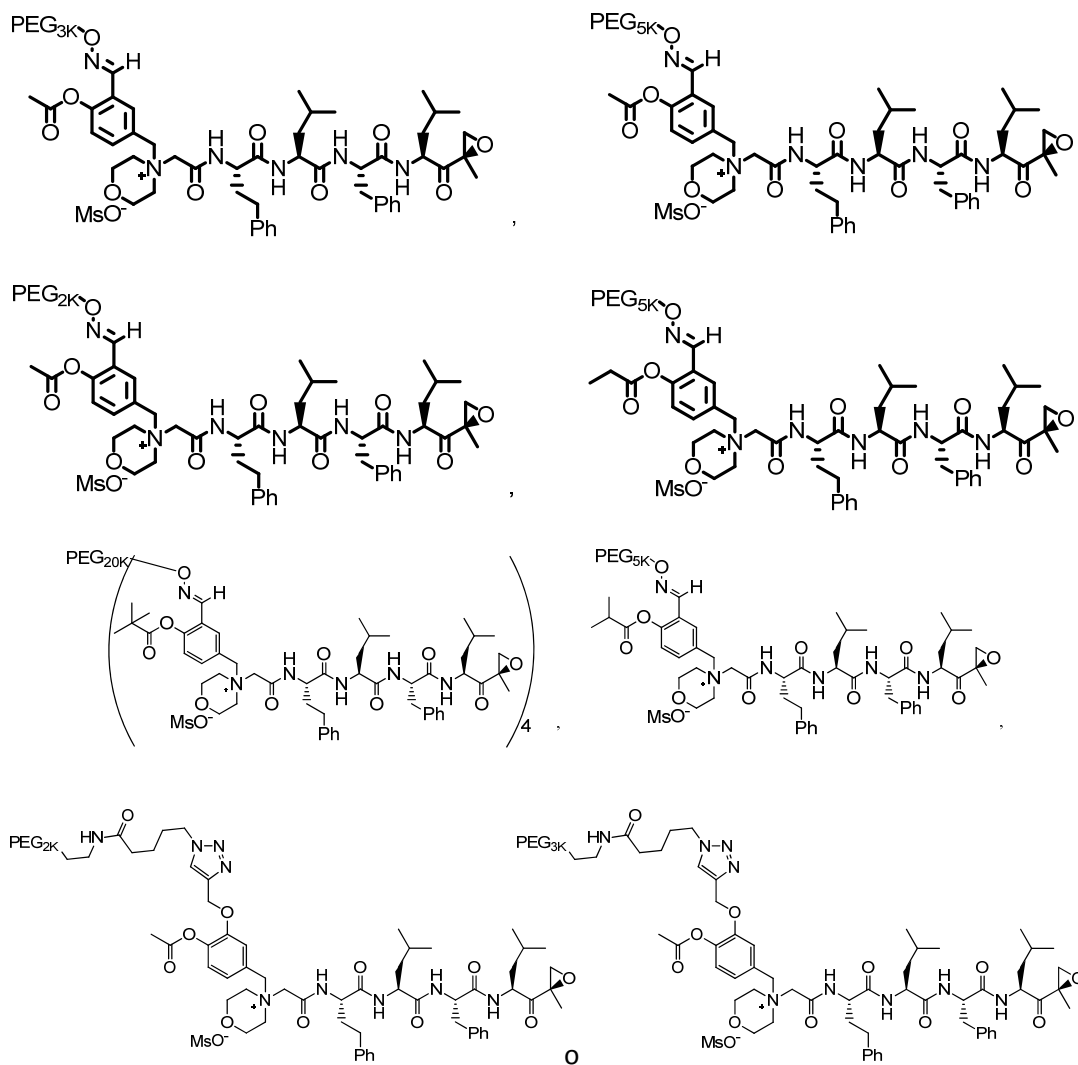
donde R^3 es H; y

PEG es una porción polimérica de polietilenglicol que posee un peso molecular de 3000, 5000 o 20000.

En el aspecto 17 de la invención, la invención da a conocer el compuesto de uno cualquiera de los aspectos 1- 16 donde el compuesto es un compuesto individual tal como se representa en los ejemplos 1-34 descritos a continuación en la Tabla 2, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

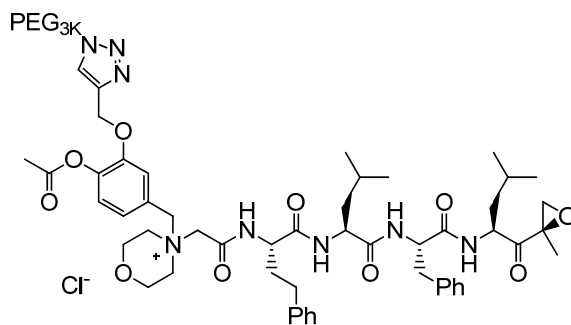
En el aspecto 18 de la invención, la invención da a conocer el compuesto de uno cualquiera de los aspectos 1- 17 donde el compuesto es



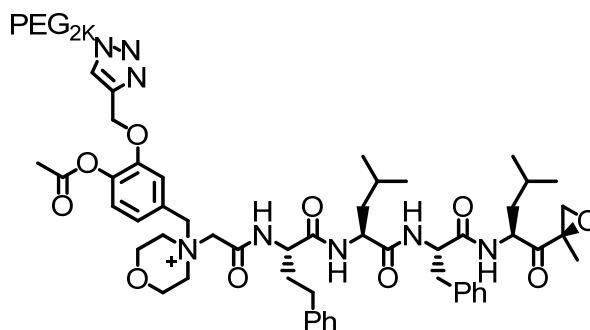


o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

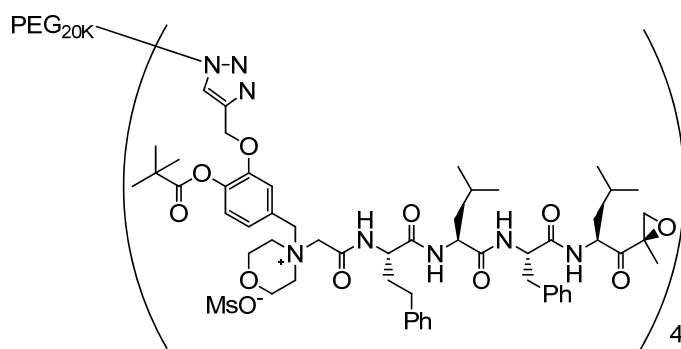
En el aspecto 19 de la invención, la invención da a conocer el compuesto de uno cualquiera de los aspectos 1- 18 donde el compuesto es



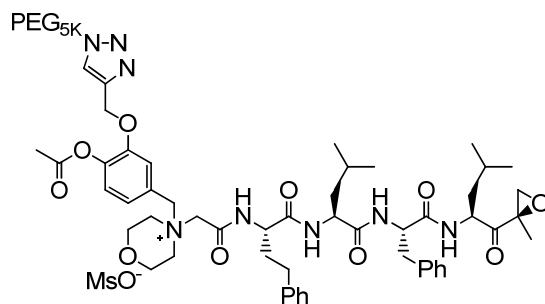
En el aspecto 19a de la invención, la invención da a conocer el compuesto de uno cualquiera de los aspectos 1- 18 donde el compuesto es



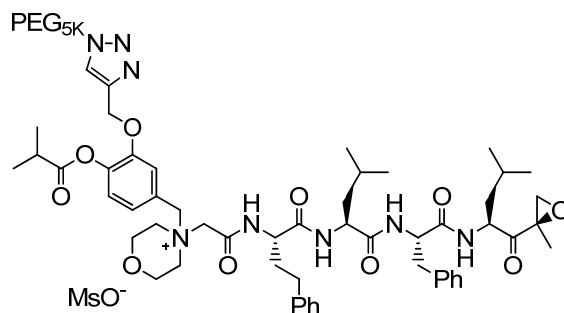
En el aspecto 20 de la invención, la invención da a conocer el compuesto de uno cualquiera de los aspectos 1- 18 donde el compuesto es



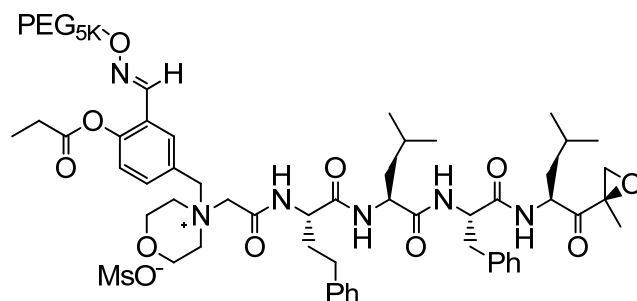
En el aspecto 21 de la invención, la invención da a conocer el compuesto de uno cualquiera de los aspectos 1- 18 donde el compuesto es



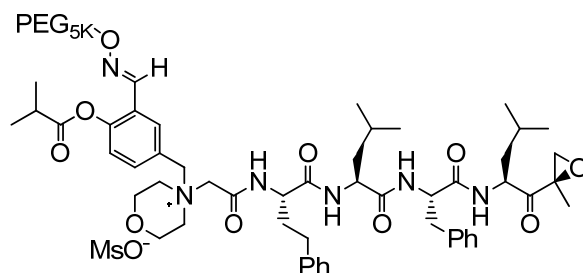
En el aspecto 22 de la invención, la invención da a conocer el compuesto de uno cualquiera de los aspectos 1- 18 donde el compuesto es



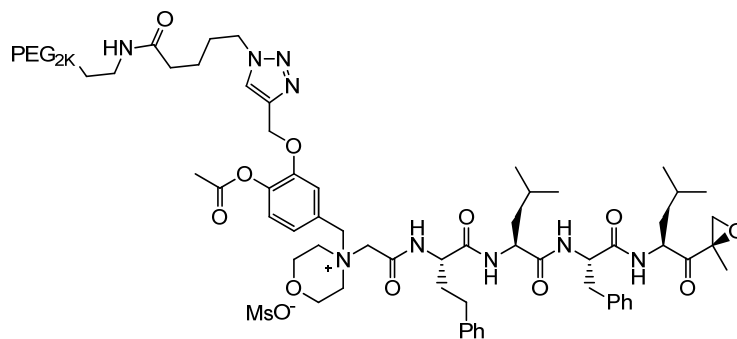
En el aspecto 23 de la invención, la invención da a conocer el compuesto de uno cualquiera de los aspectos 1- 18 donde el compuesto es



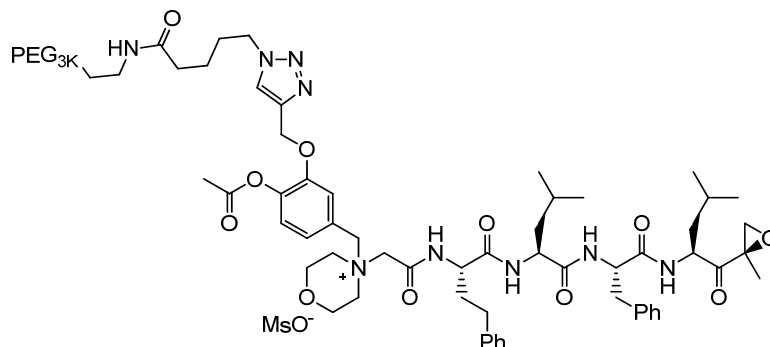
En el aspecto 24 de la invención, la invención da a conocer el compuesto de uno cualquiera de los aspectos 1- 18 donde el compuesto es



En el aspecto 25 de la invención, la invención da a conocer el compuesto de uno cualquiera de los aspectos 1- 18 donde el compuesto es



En el aspecto 26 de la invención, la invención da a conocer el compuesto de uno cualquiera de los aspectos 1- 18 donde el compuesto es



En el aspecto 27 de la invención, la invención da a conocer el compuesto de uno cualquiera de los aspectos 1- 16 donde el PEG posee un peso dentro del intervalo de alrededor de 2K a alrededor de 20K.

En el aspecto 28 de la invención, la invención da a conocer el compuesto de uno cualquiera de los aspectos 1- 16 donde el PEG posee un peso de 3K, 5K o 20K.

En el aspecto 29 de la invención, la invención da a conocer el compuesto de uno cualquiera de los aspectos 1- 16 que es una sal apta para usos farmacéuticos que comprende un contra anión a seleccionar a partir de un anión cloruro, un anión bisulfato, un anión sulfato, un anión nitrato, un anión fosfato, un anión alquil sulfonato o un anión aril sulfonato.

En el aspecto 30 de la invención, la invención da a conocer el compuesto del aspecto 29 donde el contraión es un anión cloruro o un anión alquil sulfonato.

En el aspecto 31 de la invención, la invención da a conocer el compuesto del aspecto 29 donde el contraión es un anión cloruro o un anión metan-sulfonato.

En el aspecto 32 de la invención, la invención da a conocer una composición farmacéutica que comprende el compuesto conforme a uno cualquiera de los aspectos 1-26 y un excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

En el aspecto 33 de la invención, la invención da a conocer la composición farmacéutica del aspecto 32 que se administra por vía oral o por vía parenteral, administrable por infusión o por inyección.

En el aspecto 34 de la invención, la invención da a conocer la composición farmacéutica conforme a uno cualquiera de los aspectos 32-33 que comprende uno o más de los compuestos

conforme a uno cualquiera de los aspectos 1-26 en forma conjunta con un excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

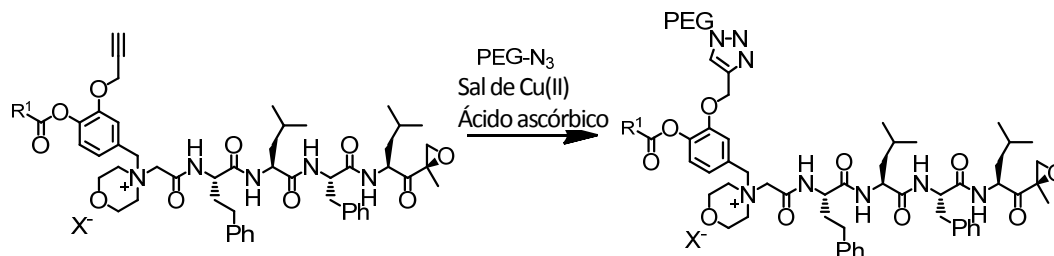
En el aspecto 35 de la invención, la invención da a conocer la composición farmacéutica conforme a uno cualquiera de los aspectos 32-34 que comprende al menos dos de los compuestos conforme a uno cualquiera de los aspectos 1-28 en forma conjunta con un excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

En el aspecto 36 de la invención, la invención da a conocer un método para tratar mieloma múltiple que comprende administrar, a un paciente que lo necesite, una cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto de uno cualquiera de los aspectos 1-31 o la composición farmacéutica de uno cualquiera de los aspectos 32-35.

En el aspecto 37 de la invención, la invención da a conocer el método conforme al aspecto 34 donde el mieloma múltiple es mieloma múltiple recurrente, resistente, o recurrente y resistente.

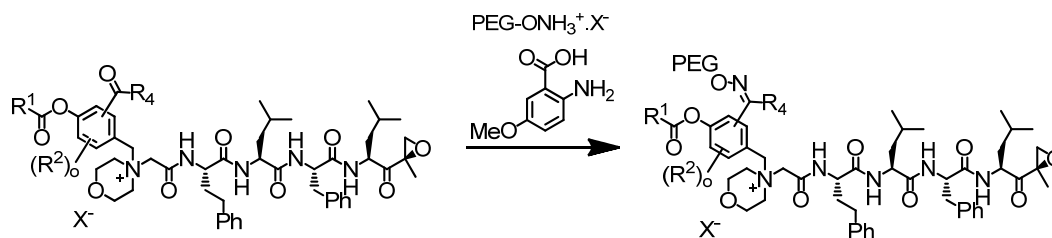
En el aspecto 38 de la invención, la invención da a conocer el método conforme al aspecto 36 donde el mieloma múltiple es mieloma múltiple de diagnóstico reciente.

En el aspecto 39 de la invención, la invención da a conocer un proceso para elaborar el compuesto conforme a uno cualquiera de los aspectos 1-16, el proceso comprende el paso de



donde X⁻ es una sal de contraión a seleccionar a partir del grupo que consiste en un anión cloruro, un anión bisulfato, un anión sulfato, un anión nitrato, un anión fosfato, un anión alquil sulfonato o un anión aril sulfonato, y PEG posee un peso dentro del intervalo de alrededor de 2K a alrededor de 20K, para preparar un compuesto de la Fórmula I.

En el aspecto 40 de la invención, la invención da a conocer un proceso para elaborar el compuesto de la Fórmula I conforme al aspecto 1, el proceso comprende el paso de



donde

X^- es una sal de contraión, a seleccionar de un anión cloruro, un anión bisulfato, un anión sulfato, un anión nitrato, un anión fosfato, un anión alquil sulfonato o un anión aril sulfonato;

PEG posee un peso dentro del intervalo de alrededor de 2K a alrededor de 20K; y

R^1 , R^2 , R^4 y o son tales como se definen en el aspecto 1, para preparar un compuesto de la Fórmula I.

En otros aspectos, la invención da a conocer compuestos que poseen la fórmula $(SM)_m$ -PEG, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la cual cada SM es un compuesto a seleccionar, en forma independiente, de la Fórmula I o de la Fórmula II tales como se definen más arriba y en cualquier otra parte de la presente memoria y se une a un PEG de un peso definido en un número n de posiciones, donde n es 2-10 (por ejemplo, n = 4 en el compuesto del aspecto 14; ver asimismo Tabla 1 a continuación).

En algunas modalidades, el átomo de nitrógeno del anillo de morfolina de carfilzomib está sustituido con la molécula de éster bencílico como se muestra en las Fórmulas I y II, formando de esa forma un átomo de nitrógeno cuaternario, siendo que la carga positiva asociada con el átomo de nitrógeno secundario está balanceada por un anión farmacéuticamente aceptable, tal como se define en la presente memoria bajo la representación X^- .

En algunos aspectos de la invención, los propios compuestos que se describen en la presente memoria exhiben una actividad terapéutica más baja en comparación con dichos inhibidores de proteasas de epoxi cetona correspondientes y exhiben mejor solubilidad, permeabilidad, y propiedades farmacocinéticas y/o farmacodinámicas *in vivo* en comparación con dichos inhibidores de proteasas de epoxi cetona.

En algunos aspectos de la invención, la molécula polimérica o la porción pegilada se separa del ingrediente activo carfilzomib mediante un cambio de pH y/o enzimas tales como, sin limitarse a las mismas, esterasas, citocromo P450, fosfodiesterasa, fosfoamidasa, fosfatasa, y DT-diaforasa, o cualquier combinación de las mismas.

En algunos aspectos de la invención, el PEG es PEG lineal. En algunos aspectos de la invención, el PEG es un PEG bifuncional que puede conjugar 1-2 compuestos por PEG. En algunos aspectos de la invención, el PEG es un PEG de cuatro brazos que puede conjugar 1-4 compuestos por PEG. En algunos aspectos de la invención, el PEG es un PEG de ocho brazos con un núcleo de hexaglicerina que puede conjugar 1-8 compuestos por PEG. En algunos aspectos de la invención, el PEG es un PEG de ocho brazos con un núcleo de tripentaeritritol que puede conjugar 1-8 compuestos por PEG. En algunos aspectos de la invención, el PEG es un PEG de dos brazos ramificado. En algunos aspectos de la invención, el PEG es un PEG de cuatro brazos ramificado. Por otra parte, los compuestos también pueden incluir solubilizantes, mejoradores de la permeabilidad, agentes enmascarantes, vehículos macromoleculares, porciones dirigidas, y técnicas biológicas para mejorar la semivida y la especificidad para la enfermedad, unidos al compuesto en forma directa o en forma indirecta mediante una molécula espaciadora.

Sin limitarse a una teoría en particular, es posible que los compuestos de la invención puedan enmascarar o parcialmente enmascarar la actividad inhibidora de proteasas en forma transitoria hasta que las porciones ligadas pegiladas se hayan separado para dar lugar a carfilzomib libre, una porción farmacéutica activa probada y reglamentariamente aprobada, en la circulación sistémica, permitiendo disminuir los efectos secundarios no deseados, los cuales podrían estar asociados con varias rutas de administración. Para dicho propósito, los compuestos de carfilzomib pegilados de la presente invención pueden actuar como profármacos de carfilzomib. En forma alternativa, como la porción pegilada se coloca cerca del extremo de morfolina de la estructura central tetrapeptídica de carilzomib, los compuestos de la presente invención, previo a la escisión de PEG, pueden poseer actividad inhibidora de los proteasomas activos.

Las propiedades benéficas de los compuestos de la presente invención pueden asimismo facilitar la administración subcutánea y prolongar la semivida de carfilzomib, por ejemplo, más allá de las 4 horas. En el aspecto 41 de la invención, la semivida en plasma humano de los compuestos de la invención es mayor que 0.5 hr. En el aspecto 42 de la invención, la semivida en plasma humano de los compuestos está entre 0.5 y 5 hr. En el aspecto 43 de la invención, la semivida en plasma humano del compuesto es mayor que 5 hr. En el aspecto 44 de la invención, la semivida en plasma humano del compuesto está entre 5 y 100 hr. En el aspecto 45 de la invención, la semivida en plasma humano del compuesto es mayor que 100 hr. En el aspecto 46 de la invención, la semivida en plasma humano del compuesto está entre 100 y 836 hr. En el aspecto 47 de la invención, la semivida en plasma humano del compuesto está entre 200 y 300 hr. En el aspecto 48 de la invención, la semivida en plasma humano del compuesto es de alrededor de 267 hr. En el

aspecto 49 de la invención, la semivida en plasma humano del compuesto es hasta 836 hr. En virtud de la prolongación de la semivida de carfilzomib, la invención potencialmente mejora la dosificación así como la conveniencia del paciente para poder cumplir con el tratamiento con carfilzomib.

En el aspecto 50 de la invención, la invención da a conocer una composición farmacéutica, la cual incluye un compuesto carfilzomib PEG conforme a lo divulgado en la presente memoria y un excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

En otros aspectos o modalidades de la invención, según se describen a continuación en la presente memoria, se dan a conocer métodos para el tratamiento de una enfermedad o afección a seleccionar a partir del grupo que consiste en cáncer, enfermedades autoinmunitarias, afecciones relacionadas con injerto o trasplante, enfermedad neurodegenerativa, afecciones asociadas a la fibrosis, afecciones relacionadas con la isquemia, infección (viral, parasitaria o procariótica) y enfermedades asociadas con la pérdida de hueso, el método comprende administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto conforme a lo divulgado en la presente memoria. Incluso en otros aspectos, la presente invención da a conocer métodos para tratar el cáncer (por ejemplo, mieloma múltiple, por ejemplo, mieloma múltiple recurrente y/o resistente) en un paciente, el método comprende administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto conforme a lo divulgado en la presente memoria.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria poseen el significado que habitualmente entiende un experto en la disciplina a la que pertenece la presente divulgación. Se describen métodos y materiales en la presente memoria que se utilizan en la presente divulgación, mientras que también pueden utilizarse otros métodos y materiales adecuados y conocidos en la materia. Los materiales, métodos, y ejemplos se proporcionan en forma ilustrativa y no deben interpretarse como un límite del alcance de la presente invención. Todas las publicaciones, solicitudes de patentes, patentes, secuencias, registros en bases de datos, y otras referencias mencionadas en la presente memoria se incorporan a la misma en su totalidad mediante la presente referencia, tal como si estuviesen escritas en la presente memoria. En el caso de existir discordancia, prevalecerá la presente memoria, incluidas las definiciones contenidas en la misma. Otras características y ventajas de la divulgación serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y de las reivindicaciones.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “aspecto” se utiliza como un sinónimo del término “modalidad.”

DEFINICIONES

Las siguientes definiciones ayudarán a comprender los términos tal como se utilizan en la presente memoria y el alcance de la invención según se describe en la presente memoria.

El término “alquilo C_{x-y} ” se refiere a grupos de hidrocarburos saturados sustituidos o no sustituidos, incluidos los grupos alquilo de cadena recta y los grupos alquilo de cadena ramificada que contienen de x a y átomos de carbono en la cadena. El término “haloalquilo” se refiere a grupos alquilo en los cuales al menos un átomo de hidrógeno es reemplazado por un halógeno (por ejemplo, flúor, cloro, bromo, yodo), por ejemplo, CH_2F , CHF_2 , trifluorometilo y 2,2,2-trifluoroetilo.

Los términos “alquenilo C_{2-y} ” y “alquinilo C_{2-y} ” se refieren a grupos alifáticos insaturados sustituidos o no sustituidos análogos a los alquilos que se describen más arriba en cuanto a su longitud y posibles sustituciones, pero que contienen al menos un doble o triple enlace, respectivamente. En algunas modalidades, los grupos divalentes alquilenilo y alquinilenilo contienen de 2 a 12 átomos de carbono. En ciertas modalidades, alquilenilo y alquinilenilo contienen de 2 a 10 átomos de carbono. En ciertas modalidades, el alquilenilo y el alquinilenilo contienen de 2 a 6 átomos de carbono (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, o 6 átomos de carbono).

El término “alcoxilo” se refiere a un grupo alquilo que posee un oxígeno unido al mismo. Entre los ejemplos representativos de los grupos alcoxilo se encuentran metoxi, etoxi, propoxi, *ter*-butoxi y similares. Un “éter” son dos hidrocarburos unidos en forma covalente mediante un oxígeno. En forma acorde, el sustituyente de un alquilo que hace a dicho alquilo un éter es o se asemeja a un alcoxilo.

El término “cicloalquilo C_{3-y} ”, tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un anillo totalmente saturado sustituido o no sustituido en el cual cada átomo del anillo es carbono y el anillo tiene un tamaño de 3 a y átomos de carbono. Por ejemplo, el término C_{3-7} cicloalquilo se entiende de forma tal que significa un anillo carbocíclico que tiene un tamaño de 3 a 7 átomos de carbono. Entre los ejemplos de dichos anillos se encuentran, por ejemplo, los anillos de ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo y cicloheptilo. Dichos anillos asimismo pueden estar sustituidos conforme a lo especificado.

Los términos “cáncer” y “canceroso” cuando se utilizan en la presente memoria se refieren a o describen la afección fisiológica de determinados sujetos la cual típicamente se caracteriza por el crecimiento celular no controlado. Entre los ejemplos de cáncer se encuentran, sin limitarse a los mismos, malignidades hematológicas o formas de cáncer que se desarrollan en la sangre tales como mieloma múltiple y leucemia, y otras formas de cáncer tales como carcinoma, linfoma, sarcoma, y

blastoma. Entre los ejemplos más particulares de dichas formas de cáncer se encuentran carcinoma de células escamosas, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas, cáncer cervical, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mamas, carcinoma de colon y cáncer de cabeza y cuello. Aunque el término "cáncer" tal como se utiliza en la presente memoria no está limitado a ninguna forma específica de la enfermedad, se cree que los métodos de la invención serán particularmente efectivos para las formas de cáncer que en determinados sujetos se han vuelto resistentes en determinado grado al tratamiento con agentes anti-cancerígenos, incluidos, sin limitarse a los mismos, los agentes quimioterapéuticos, los agentes antimitóticos, las antraciclinas y similares, y para las formas de cáncer que reinciden después del tratamiento con dichos agentes anticancerígenos.

El término "que comprende" se entiende de forma tal que tiene un alcance abierto, de forma tal que incluye a los uno o más componentes mencionados pero no excluye a otros elementos.

El término "por ejemplo" tal como se utiliza en la presente memoria se entiende de forma tal que significa "ejemplo."

El término "inhibidor" se entiende de forma tal que describe un compuesto que bloquea o disminuye una actividad de una enzima o sistema de enzimas, receptores u otras dianas farmacológicas (por ejemplo, la inhibición de la escisión proteolítica de sustratos peptídicos fluorogénicos estándares tales como suc-LLVY-AMC, Box-LLR-AMC y Z-LLE-AMC, la inhibición de varias actividades catalíticas del proteasoma 20S). Un inhibidor puede actuar con inhibición competitiva, incompetitiva o no competitiva. Un inhibidor puede unirse en forma reversible o en forma irreversible y por lo tanto el término incluye los compuestos que son sustratos "suicidas" de una enzima. Un inhibidor puede modificar uno o más sitios en o cerca del sitio activo de la enzima, o puede causar un cambio conformacional en cualquier otra parte de la enzima. El término inhibidor se utiliza en forma más amplia en la presente memoria que en la literatura específica, de modo de abarcar otras clases de agentes que poseen utilidad farmacológica o terapéutica, tales como agonistas, antagonistas, estimulantes, co-factores, y similares.

Los términos "resistente a los fármacos" y "resistente a fármacos múltiples" cuando se utilizan en la presente memoria se refieren a células cancerosas que han desarrollado resistencia y/o son resistentes al fármaco. Entre ellas se encuentran las células cancerosas que exhiben poca o ninguna eficacia o una eficacia disminuida respecto a la que exhibían al inicio de la dosificación con el fármaco. Las células cancerosas pueden ser resistentes a un fármaco o a múltiples fármacos de diferentes estructuras químicas que están dirigidos para actuar en diferentes dianas biológicas dentro de las células cancerosas.

El término "sal farmacéuticamente aceptable" abarca las sales comúnmente utilizadas para formar sales de metales alcalinos y para formar sales de adición de ácidos libres o de bases libres. La naturaleza de la sal no es crítica, siempre y cuando sea apta para usos farmacéuticos. Pueden prepararse sales de adición de ácidos del compuesto aptas para usos farmacéuticos a partir de un ácido inorgánico o a partir de un ácido orgánico. Entre los ejemplos de dichos ácidos inorgánicos se encuentran, sin limitarse a los mismos, ácido clorhídrico, bromhídrico, yodhídrico, nítrico, carbónico, sulfúrico y fosfórico. Entre los ejemplos de ácidos orgánicos se encuentran, sin limitarse a los mismos, las clases de ácidos orgánicos alifáticos, cicloalifáticos, aromáticos, arilalifáticos, heterocíclicos, carboxílicos y sulfónicos, ejemplos de los cuales son ácido fórmico, acético, adípico, butírico, propiónico, succínico, glicólico, glucónico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, glucurónico, maleico, fumárico, pirúvico, aspártico, glutámico, benzoico, antranílico, mesílico, 4-hidroxibenzoico, fenilacético, mandélico, embónico (pamoico), metansulfónico, etansulfónico, etandisulfónico, bencenesulfónico, pantoténico, 2-hidroxietansulfónico, toluenesulfónico, sulfanílico, ciclohexilaminosulfónico, camfórico, camforsulfónico, diglucónico, ciclopentanpropiónico, dodecilsulfónico, glucoheptanoico, glicerofosfónico, heptanoico, hexanoico, 2-hidroxi-etansulfónico, nicotínico, 2-naftalensulfónico, oxálico, palmoico, pectínico, persulfúrico, 2-fenilpropiónico, pícrico, piválico, propiónico, succínico, tartárico, tiociánico, mesílico, undecanoico, esteárico, algénico, β -hidroxibutírico, salicílico, galactárico y galacturónico.

Entre las sales de adición de bases del compuesto aptas para usos farmacéuticos se encuentran, sin limitarse a las mismas, las sales metálicas, tales como las sales que contienen aluminio, calcio, litio, magnesio, potasio, sodio y zinc, o sales que contienen bases orgánicas incluidas las aminas primarias, secundarias y terciarias y las aminas sustituidas incluidas las aminas cíclicas tales como cafeína, arginina, dietilamina, N-etil piperidina, histidina, glucamina, isopropilamina, lisina, morfina, N-etil morfina, piperazina, piperidina, trietilamina, trimetilamina. Todas las sales que se contemplan en la presente memoria pueden prepararse utilizando los medios convencionales a partir del correspondiente compuesto haciendo reaccionar, por ejemplo, el ácido o la base adecuada con el compuesto.

El término "proteasoma" tal como se utiliza en la presente memoria se entiende de forma tal que incluye los proteasomas inmunológicos y los constitutivos.

El término "resistente" cuando se utiliza en la presente memoria se entiende de forma tal que se refiere a persistente, resistente o no responsivo al tratamiento, estímulo (terapia) o cura, incluida la resistencia a múltiples agentes curativos terapéuticos. "Resistente" cuando se utiliza en la presente memoria en el contexto de caracterizar un cáncer o tumor se entiende de forma tal que se

refiere a que el cáncer o tumor no es responsivo o que posee una respuesta resistente o disminuida ante el tratamiento con uno o más agentes anticancerígenos. El tratamiento típicamente es continuado, prolongado y/o repetitivo durante un período de tiempo que dé lugar a que el cáncer o tumor reincida o desarrolle resistencia o se torne resistente a ese mismo tratamiento.

El término "sujeto" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a cualquier mamífero, incluidos los humanos, y animales tales como vacas, caballos, perros y gatos. Por lo tanto, la invención puede utilizarse en pacientes humanos así como en sujetos y pacientes veterinarios. En una modalidad de la invención, los compuestos de la invención pueden administrarse a un sujeto humano.

La frase "terapéuticamente efectiva" o "cantidad terapéuticamente efectiva" se entiende de forma tal que cuantifica la cantidad del compuesto de la invención que cuando se administra como parte de un régimen de dosificación deseado (a un paciente, por ejemplo, un humano) alivia un síntoma, mejora una afección, o enlentece la aparición de las afecciones propias de la enfermedad conforme a los estándares clínicamente aceptables para el trastorno o la afección a tratar o el propósito cosmético, por ejemplo, a una relación de riesgo beneficio aplicable a cualquier tratamiento médico. Por lo tanto, es la cantidad del compuesto de la invención que puede tratar el cáncer, ya sea si es mieloma múltiple u otra malignidad hematológica o un tumor sólido.

Los términos "tratar" y "tratamiento" tal como se utilizan en la presente memoria se refieren a terapia, incluidas sin limitarse a las mismas, terapia curativa, terapia profiláctica y terapia preventiva, y generalmente incluyen la reversión, la disminución o la detención de los síntomas, los signos clínicos y las patologías de fondo de una afección de forma tal de demorar o estabilizar una afección del paciente. El tratamiento profiláctico generalmente constituye en ya sea prevenir la aparición de las afecciones o retardar la aparición de una etapa pre-clínica evidente de los trastornos en los individuos. El término "tratamiento profiláctico o terapéutico" es reconocido en la disciplina e incluye la administración a un sujeto de una o más de las composiciones de la invención. Si se administra previo a la manifestación clínica de la afección no deseada (por ejemplo, enfermedad u otro estado no deseado del sujeto animal), o después de que se ha disminuido la afección, entonces el tratamiento es profiláctico, (es decir, protege al sujeto contra el desarrollo de la afección no deseada), mientras que si se administra después de la manifestación de la afección no deseada, entonces el tratamiento es terapéutico, (es decir de forma tal que disminuye, mejora o estabiliza la afección no deseada existente o los efectos secundarios de la misma).

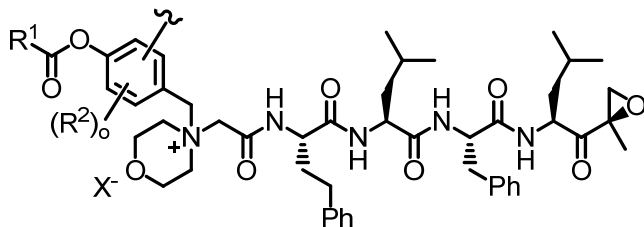
El término "sustituido" se refiere a estructuras que poseen sustituyentes que reemplazan a un hidrógeno en uno o más átomos diferentes de hidrógeno de la molécula. Debe entenderse que

“sustitución” o “sustituido con” incluye la condición implícita de que dicha sustitución satisfaga la valencia del átomo sustituido y del sustituyente, y que la sustitución dé lugar a un compuesto estable, por ejemplo, que no sufra transformación espontánea tal como redistribución, ciclación, eliminación, etc. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “sustituido” se entiende de forma tal que incluye todos los sustituyentes permitidos de los compuestos orgánicos. En un sentido amplio, entre los sustituyentes permitidos se encuentran los sustituyentes acíclicos y cíclicos, ramificados y no ramificados, carbocíclicos y heterocíclicos, aromáticos y no aromáticos de los compuestos orgánicos. Los sustituyentes permitidos pueden ser uno o más y el mismo o diferentes para los compuestos orgánicos adecuados. Para el propósito de la presente divulgación, los heteroátomos tales como nitrógeno pueden poseer sustituyentes hidrógeno y/o cualquier sustituyente permitido de los compuestos orgánicos que se describen en la presente memoria que satisfaga la valencia de los heteroátomos. Entre los sustituyentes se encuentran, por ejemplo, un halógeno, un hidroxilo, un carbonilo (tal como un carboxilo, un alcóxicarbonilo, un formilo, o un acilo), un tiocarbonilo (tal como un tioéster, un tioacetato, o un tioformato), un alcóxilo, un fosforilo, un fosfato, un fosfonato, un fosfinato, un amino, un amido, una amidina, una imina, un ciano, un nitro, un azido, un sulfidrilo, un alquiltio, un sulfato, un sulfonato, un sulfamilo, un sulfonamido, un sulfonilo, un heterociclilo, un aralquilo, o una estructura aromática o heteroaromática. Debe entenderse que las estructuras sustituidas en una cadena de hidrocarburo pueden a su vez estar sustituidas de la manera adecuada.

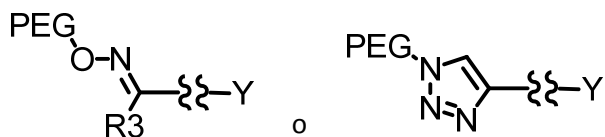
El término PEG, tal como se utiliza en la presente memoria, se entiende de forma tal que posee el significado que tradicionalmente se le ha asignado. En particular, PEG es una porción formada por la repetición de unidades poliméricas de poli(etilenglicol), siendo que el número preciso de unidades determina su peso molecular. Por ejemplo, la porción PEG utilizada en la presente invención puede poseer cualquiera de las arquitecturas divulgadas en la presente memoria así como, por ejemplo, las ilustradas en las Fórmulas A- I como se muestra en la Tabla 1. La unidad de peso molecular es el dalton. Por lo tanto, debe entenderse que cualquier referencia a un peso molecular de PEG tal como se utiliza en la presente memoria (la descripción, las reivindicaciones y el resumen), por ejemplo, la referencia a “2K”, “3K”, “5K” y “20K” o “2000”, “3000”, “5000” o “20000” con respecto a un PEG dado significa un peso del PEG de 2000 dalton (o 2 kilodalton), 3000 dalton (o 3 kilodalton), 5000 dalton (o 5 kilodalton), y 20000 dalton (o 20 kilodalton), respectivamente. Asimismo, tal como se utiliza en la presente memoria “KDa” significa kilodalton. Debe entenderse que los compuestos de carfilzomib que se muestran en las Fórmulas A, B, C, D, E, F, G, H y I en la Tabla 1 ilustran diferentes estructuras de PEG unidas covalentemente mediante

conectores tales como se describen y definen en la presente memoria. Para ayudar a comprender cada Fórmula en la Tabla 1,

Y =



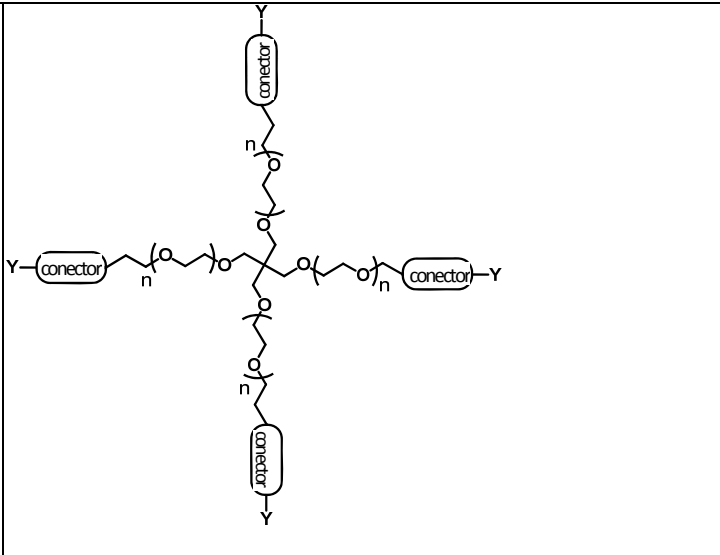
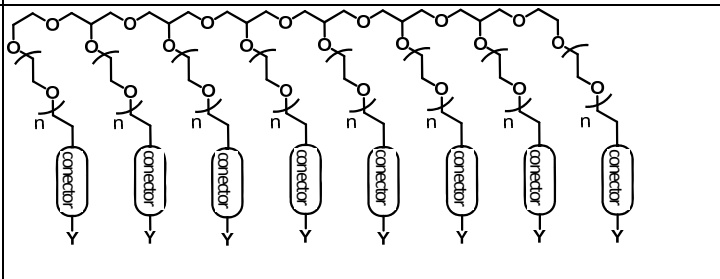
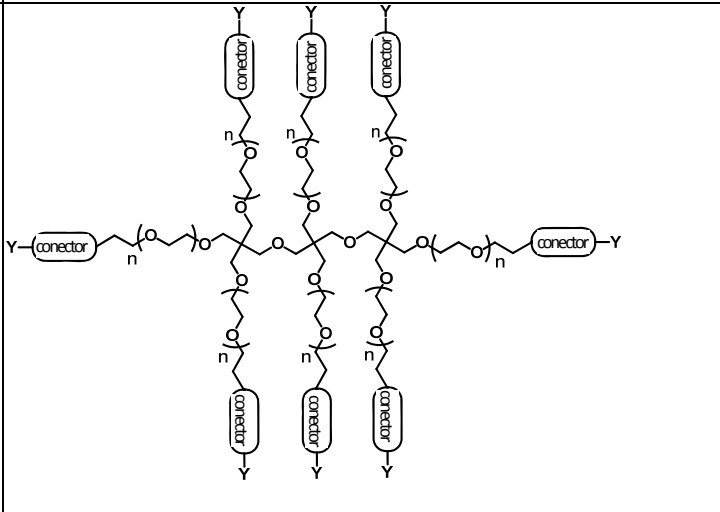
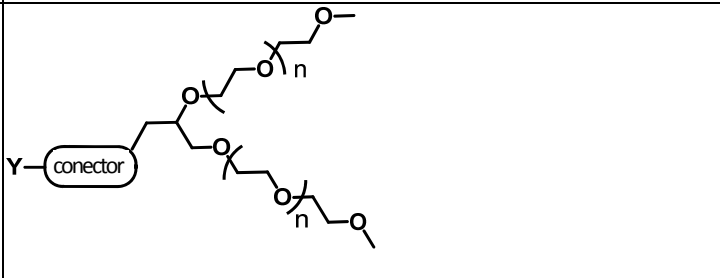
donde R^1 y R^2 son tales como se definen en la presente memoria en las Fórmulas I y II. El contra anión X^- es tal como se define en las Fórmulas I y II en la presente memoria. Por ejemplo, el contra anión X^- puede ser Cl^- , HSO_4^- , SO_4^{2-} , NO_3^- , $H_2PO_4^-$, alquil/aril- SO_3^- tal como un anión tosilato (ácido tosil sulfónico), mesilato (ácido metansulfónico) o bencilato (ácido bencil sulfónico). La porción de PEG del compuesto de carfilzomib típicamente posee un peso molecular en el intervalo de alrededor de 400 daltons a alrededor de 50000 daltons. La porción del conector de los compuestos ilustrados en las Fórmulas A – I a continuación también se define en la presente memoria en las Fórmulas I y II. Por ejemplo, el conector puede ser

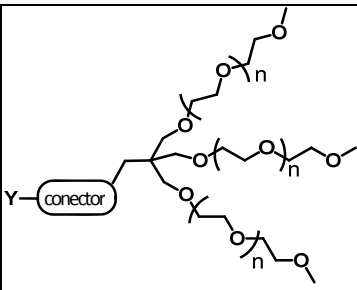
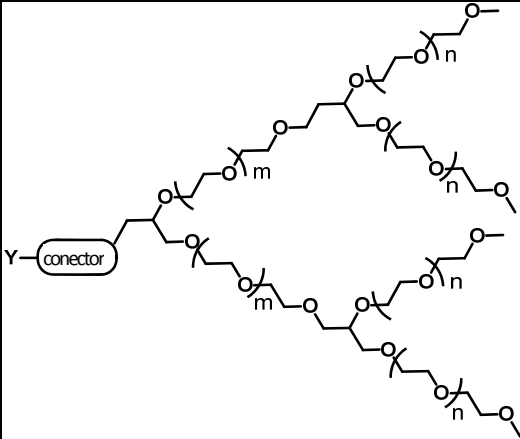
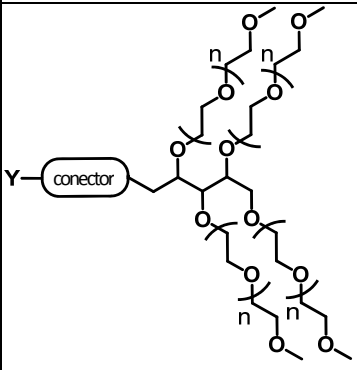


donde R^3 es H o Me.

Tabla 1

Referencia	Estructura	Tipo de PEG	Moléculas de Carfilzomib
A		lineal	1
B		bifuncional	2

C		4 brazos	4
D		Núcleo de hexaglicerina de 8 brazos	8
E		Núcleo de tripentaeritritol de 8 brazos	8
F		Ramificado de 2 brazos	1

G		Ramificado de 3 brazos	1
H		Ramificado de 4 brazos	1
I		Ramificado de 4 brazos	1

En la modalidad 51, PEG posee un peso molecular de más de 1kDa.

En la modalidad 52, PEG posee un peso molecular de alrededor de 1 kDa.

En la modalidad 53, PEG posee un peso molecular de más de 2 kDa.

En la modalidad 54, PEG posee un peso molecular de alrededor de 2 kDa.

En la modalidad 55, PEG posee un peso molecular de más de 5 kDa.

En la modalidad 56, PEG posee un peso molecular de alrededor de 5 kDa.

En la modalidad 57, PEG posee un peso molecular de más de 10 kDa.

En la modalidad 58, PEG posee un peso molecular de alrededor de 10 kDa.

En la modalidad 59, PEG posee un peso molecular de más de 20 kDa.

En la modalidad 60, PEG posee un peso molecular de alrededor de 20 kDa.

En la modalidad 61, PEG posee un peso molecular de más de 30 kDa.

En la modalidad 62, PEG posee un peso molecular de alrededor de 30 kDa.

En la modalidad 63, PEG posee un peso molecular de más de 40 kDa.

En la modalidad 64, PEG posee un peso molecular de alrededor de 40 kDa.

En la modalidad 65, PEG posee un peso molecular de más de 50 kDa.

En la modalidad 66, previo a la conjugación con los inhibidores de proteasas de epoxi cetona, PEG posee una pluralidad de grupos funcionales reactivos (por ejemplo, grupos azida).

En algunas modalidades, previo a la conjugación con los inhibidores de proteasas de epoxi cetona, PEG posee 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 grupos funcionales reactivos (por ejemplo, grupos azida).

Los compuestos carfilzomib PEG de la invención poseen una cadena polimérica de polietilenglicol (PEG) conjugada con el ingrediente farmacéutico activo carfilzomib (API). Para dicho propósito, la invención da a conocer en el aspecto 67, un compuesto de carfilzomib PEG de la Fórmula I o de la Fórmula II donde n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10. En la modalidad 68, n es 8. En la modalidad 69, n es 4. En la modalidad 70, n es 2. En la modalidad 71, n es 1.

Síntesis general y ejemplos representativos de la invención

Tal como se describen, los compuestos de carfilzomib pegilados en las Fórmulas I y II son portadores de PEG polimérico escindible del ingrediente farmacéutico activo, carfilzomib (Fórmulas I y II) y liberan carfilzomib libre *in vivo*. Los soportes poliméricos solubilizantes de polietilenglicol (PEG) del tamaño y/o el peso deseado están disponibles en el mercado y pueden adquirirse, por ejemplo, de ThermoFisher Scientific, Sigma-Aldrich y otros proveedores comerciales de materiales poliméricos. El grupo PEG puede unirse a carfilzomib en la forma de sal cuaternaria en el anillo de morfolina de una variedad de conectores, incluido un conector autoinmolado de bencilo sustituido en la posición *para* con un alcanoiolo, conforme a lo divulgado en la presente memoria. El conector contiene un grupo fenol nucleofílico latente que se convierte en

un donador de electrones después de un mecanismo de disparo biológico o químico y luego inicia una cascada de electrones que ulteriormente conduce a la liberación de carfilzomib. La combinación particular de un soporte polimérico solubilizante y la formación de una sal cuaternaria da lugar a conjugados con una solubilidad en agua extraordinariamente alta. El carfilzomib es liberado del conjugado en forma enzimática mediante una enzima esterasa o químicamente mediante una hidrólisis catalizada por hidróxido. Debe observarse que este conjugado de PEG en forma aislada/en sí mismo es activo como inhibidor del proteasoma y rápidamente libera el ingrediente farmacéutico más activo carfilzomib cuando el conjugado se expone a una enzima esterasa apropiada o a un entorno levemente básico. La velocidad de desplazamiento puede variarse dentro de un intervalo de tiempo mediante la introducción de uno o más grupos voluminosos que constituyen un impedimento estérico para el acceso de la enzima, y/o uno o más grupos moduladores de la densidad electrónica en la posición R² en las Fórmulas I y II.

Abreviaturas: Las siguientes abreviaturas que se utilizan a lo largo de los esquemas generales así también como en los ejemplos deben entenderse según los siguientes significados:

DCM diclorometano; dicloruro de metileno

DMF dimetilformamida

DMSO dimetil sulfóxido

EtOAc acetato de etilo

MeOH metanol

mpk miligramos por kilogramo; mg/kg

RT, rt temperatura ambiente

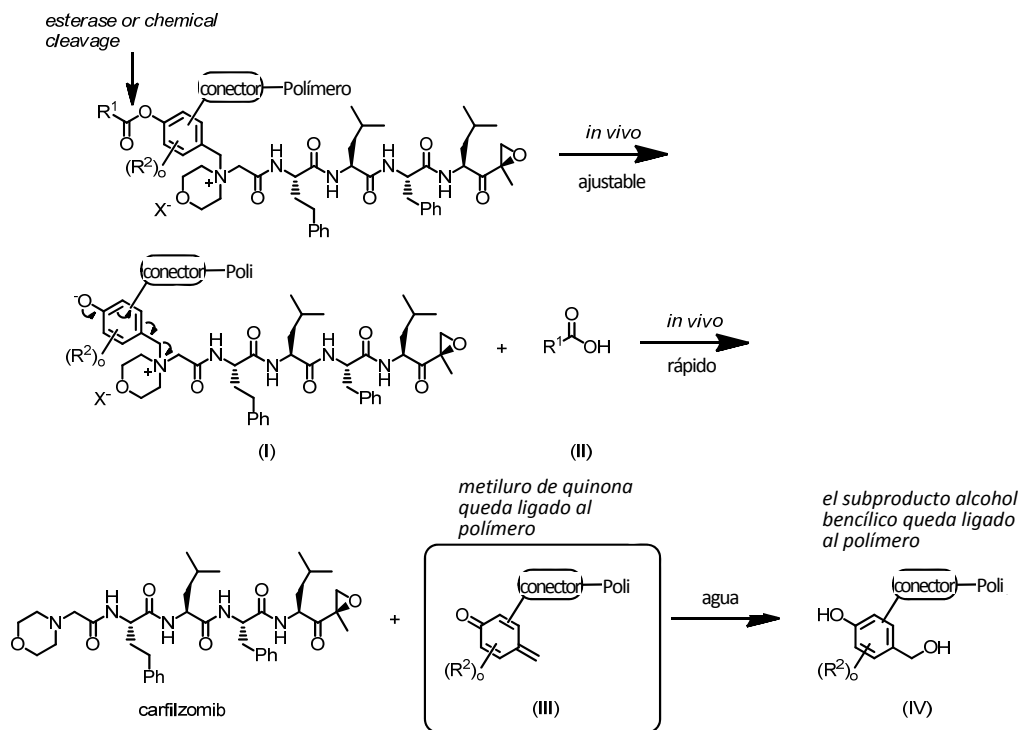
NaCl cloruro de sodio

tBuOH t-butanol; alcohol t-butílico

El material de partida carfilzomib, utilizado para preparar los compuestos de la invención, se describe en las publicaciones PCT WO2006017842, WO2009045497, WO2014169897, WO2013169282, WO2014011695, WO2006063154, WO2014015016, WO2010048298 y Patentes E.U.A Nos 7,714,042 y 7,737,112, cuyos contenidos se incorporan en su totalidad en la presente memoria mediante la presente referencia.

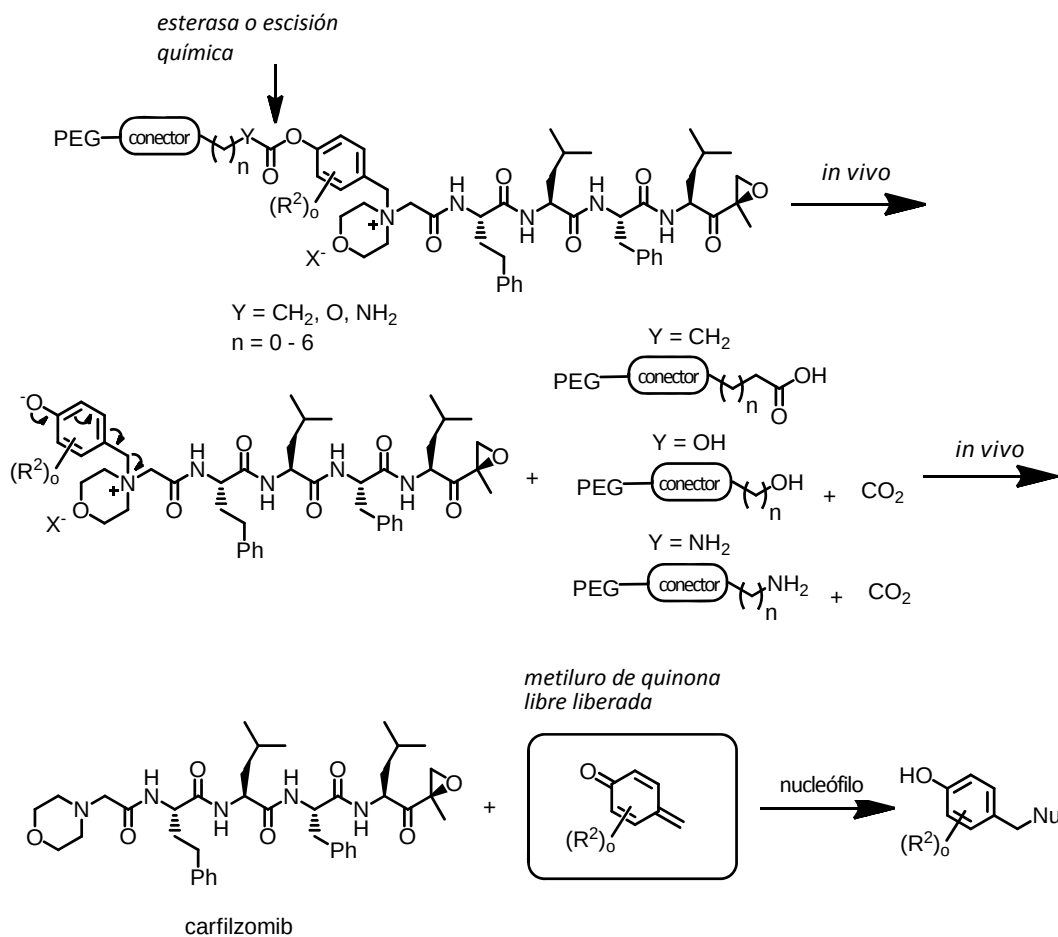
Esquema de reacción 1: Escisión de la sal cuaternaria por eliminación de bencilo

*esterasa o escisión
química*



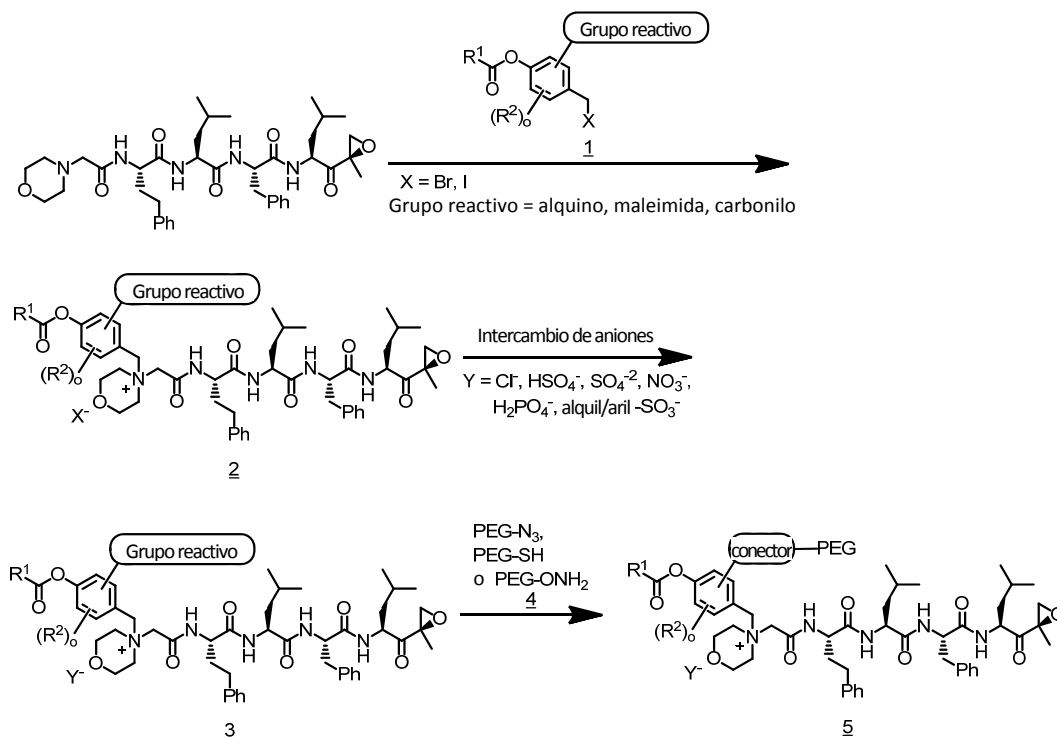
La hidrólisis enzimática y/o química del fenil éster da lugar a un ácido carboxílico (II) y a compuesto intermedio fenolato (I) que sufre la eliminación rápida 1, 6 para dar lugar a carfilzomib libre y un metiluro que permanece unido en forma covalente al polímero de PEG solubilizante. Se sabe que los metiluros de quinona son aceptores de Michael reactivos y se cree que presentan riesgos relacionados con una genotoxicidad potencial. En la presente invención, la unión permanente del subproducto del conector de metiluro de quinona al polímero puede atenuar la toxicidad impidiendo el acceso celular y disminuyendo la reactividad contra los nucleófilos del suero. El destino más probable del compuesto intermedio III *in vivo* es la reacción con agua para formar un aducto alcohol bencílico- polímero que se elimina del cuerpo rápidamente por excreción.

Esquema de reacción 2: Escisión de los conjugados de carfilzomib-polímero antes descritos



El Esquema de reacción 2 ilustra una vía metabólica para los compuestos de carfilzomib – polímero descritos en WO2014011695. En la presente memoria, como se ilustra más arriba, los conjugados de carfilzomib-polímero interactúan con una enzima esterasa o están sujetos a un ataque químico como se muestra mediante una flecha. Este ataque da lugar a la liberación de un metiluro de quinona libre (dentro de un cuadro en la figura anterior) tras la hidrólisis del éster. Este metiluro intermedio está libre para reaccionar con los nucleófilos celulares, lo cual puede dar lugar a toxicidad. Los compuestos de carfilzomib pegilados de la presente invención evitan el producto secundario potencialmente tóxico, tal como se describe en el Esquema de reacción 1.

Esquema de reacción 3: Procedimiento en dos pasos para conjugar el polímero de PEG



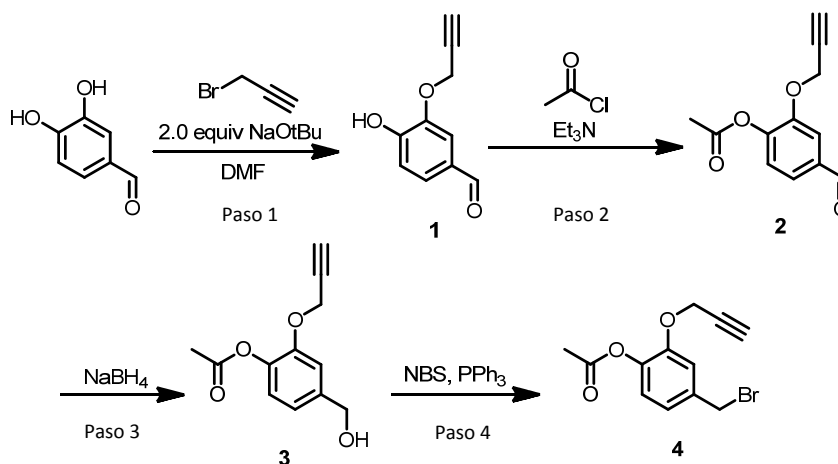
Los compuestos de carfilzomib-PEG que se dan a conocer en la presente memoria se preparan siguiendo un procedimiento en dos pasos, como se muestra en el Esquema de reacción 3. Carfilzomib se hace reaccionar primero con un haluro de bencilo adecuadamente sustituido en la posición *para* por un alcianoiloxi (1) para dar lugar a un compuesto intermedio que es una sal cuaternaria (2). El anión bromuro o yoduro de la sal cuaternaria puede intercambiarse con un anión apto para uso farmacéutico tal como bisulfato, sulfato, nitrato, fosfato monobásico o alquil/aril sulfonato utilizando una resina de intercambio iónico para dar lugar al compuesto intermedio (3). De manera conveniente, este compuesto intermedio se une covalentemente con un grupo reactivo adecuado para reaccionar con un reactivo polimérico que contiene una función complementaria (4) para dar lugar al producto deseado 5. Están comercialmente disponibles en el mercado una cantidad de reactivos de PEG en un intervalo de pesos moleculares, arquitecturas, estructuras químicas de los grupos terminales, y con varios grupos terminales reactivos (brazos) (ver Tabla 1). Los mismos pueden ser compatibles directamente con las estructuras químicas del conector que se describen en la presente divulgación o pueden requerir posterior manipulación química utilizando métodos conocidos. Los PEG de cadena ramificada y múltiples brazos pueden ofrecer ventajas respecto a los PEG lineales, entre las que se encuentran el potencial para una mayor carga de fármaco, mayor estabilidad, y/o viscosidad de las formulaciones.

El Esquema de reacción 4 ilustra las químicas “Click”, tales como la cicloadición azida 1,3dipolar/alquino de Huisgen y la oximación aminooxi/aldehído, las cuales son particularmente adecuadas para las uniones de polímeros y poliméricas de PEG debido a los altos rendimientos químicos, la inocuidad de los productos secundarios, las grandes fuerzas termodinámicas actuantes y la disponibilidad del material de partida.

La cicloadición azida 1, 3 dipolar/alquino de Huisgen requiere que el grupo bencilo esté sustituido con un grupo alquino (A1-(1-6)) capaz de reaccionar con un soporte polimérico con función azida tal como PEG-azida ($-N_3$) para dar lugar a un conjugado unido a 1,2,3-triazol (A4-(1-6)). La porción de alquino puede estar unida directamente o indirectamente mediante un alquilo espaciador (A1-1), mediante un enlace éter (A1-2,3), tioéter, sulfóxido o sulfona (A1-4), o puede estar unido mediante un enlace amida (A1-5,6). Muchos reactivos de PEG sustituido con un grupo azido están disponibles en el mercado en una amplia variedad de tamaños y arquitecturas, pero también pueden prepararse a partir de cualquier PEG-alcohol disponible mediante la activación por mesilación o tosilación, seguido de la reacción con una sal de azida. La reacción de cicloadición puede llevarse a cabo utilizando los catalizadores disponibles de sales cuprosas, pero transcurre en forma más eficiente utilizando una mezcla de cobre (II) (por ejemplo sulfato de cobre (II), metansulfonato de cobre (II)) y un agente reductor (por ejemplo ascorbato de sodio) para producir Cu (I) *in situ*. Dado que el cobre (I) es inestable en solución acuosa y en la presencia de oxígeno, opcionalmente pueden agregarse ligandos estabilizantes tales como tris-(benciltriazolilmetil)amina (TBTA), tris(3-hidroxi-propiltriazolilmetil)amina (THPTA), sulfato monobásico de 2-[4-(bis[(1-*ter*-butil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil]amino)metil]-1H-1,2,3-triazol-1-il]etil (BTTEs) o ácido 2-[4-(bis[(1-*ter*-butil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil]amino)metil]-1H-1,2,3-triazol-1-il]acético (BTAA). La reacción puede transcurrir a temperatura ambiente o a una temperatura elevada en una variedad de solventes, y mezclas de agua y una variedad de solventes orgánicos miscibles incluidos los alcoholes, DMSO, DMF, *t*BuOH y acetona. El producto final de PEG y carfilzomib (A4-(1-6)) puede redisolverse en forma conveniente mediante dilución de la mezcla de reacción con agua o salmuera, extracción con un solvente orgánico tal como DCM, y reprecipitación a partir de isopropanol o mezclas de éter/isopropanol hasta obtener el producto de la pureza deseada. La exposición de los compuestos intermedios o productos a los aniones durante los procedimientos de redisolución, tales como los aniones cloruro en la salmuera, típicamente da lugar a una mezcla de aniones en el producto final, y puede ser necesario un tratamiento final con resina de intercambio aniónico para asegurar la homogeneidad de la sal producto.

La sal cuaternaria intermedia de haluro (bromuro o yoduro, (A2-(1-6)) puede convertirse en un anión que no precipita con el catalizador de cobre (I) tal como metansulfonato, bisulfato o sulfato (A3-(1-6)) para lograr altos rendimientos de reacción. Asimismo, puede ser deseable intercambiar el anión haluro para impedir la apertura del epóxido y la posible formación de subproductos de bromohidrina o yodohidrina.

Esquema de reacción 4A1-2



Síntesis de acetato de 4-(bromometil)-2-(prop-2-iniloxi)fenilo (compuesto intermedio A1-2 en el Esquema de reacción 4)

Paso 1: 4-Hidroxi-3-(prop-2-iniloxi)benzaldehído (1)

A una mezcla de NaOtBu en DMF (150 mL) se agregó 3,4-dihidroxibenzaldehído (10 g, 72.5 mmol) en DMF (50 mL) a 20°C. La mezcla se enfrió en un baño de hielo y se agitó mientras se agregó 3-bromoprop-1-ino (8.62 g, 72.5 mmol) en pequeñas porciones, procurando mantener la temperatura interna entre 15-20°C. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla se diluyó con agua (300 mL) y se extrajo con EtOAc (200 mL×3). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua para eliminar DMF, se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, y se concentraron para dar lugar a un sólido marrón. El residuo se cristalizó varias veces a partir de DCM/éter de petróleo (30 mL/500 mL) para dar lugar al compuesto 1. ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz): δ 9.87 (s, 1H), 7.54 (d, J = 1.2 Hz, 1H), 7.49 (dd, J₁ = 1.5 Hz, J₂ = 8.1 Hz, 1H), 7.09 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 4.82 (m, 2H), 2.62 (m, 1H).

Paso 2: Acetato de 4-formil-2-(prop-2-iniloxi)fenilo (2)

A una solución del compuesto 1 (10.00 g, 56.82 mmol) en DCM (150 mL) se agregó Et₃N (11.48 g, 113.64 mmol) seguido de cloruro de acetilo (5.35 g, 68.18 mmol) a 0°C. La mezcla de

reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla se lavó con HCl acuoso 2N saturado (100 mL) y agua (50 mL), se secó sobre MgSO_4 anhidro, y se concentró para dar lugar al compuesto 2, el cual se utilizó en el próximo paso sin posterior purificación. ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz): δ 9.96 (s, 1H), 7.63 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H), 7.54 (dd, $J_1 = 1.6$ Hz, $J_2 = 8.0$ Hz, 1H), 7.25 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 4.79 (d, $J = 2.4$ Hz, 2H), 2.57 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H), 2.35 (s, 3H).

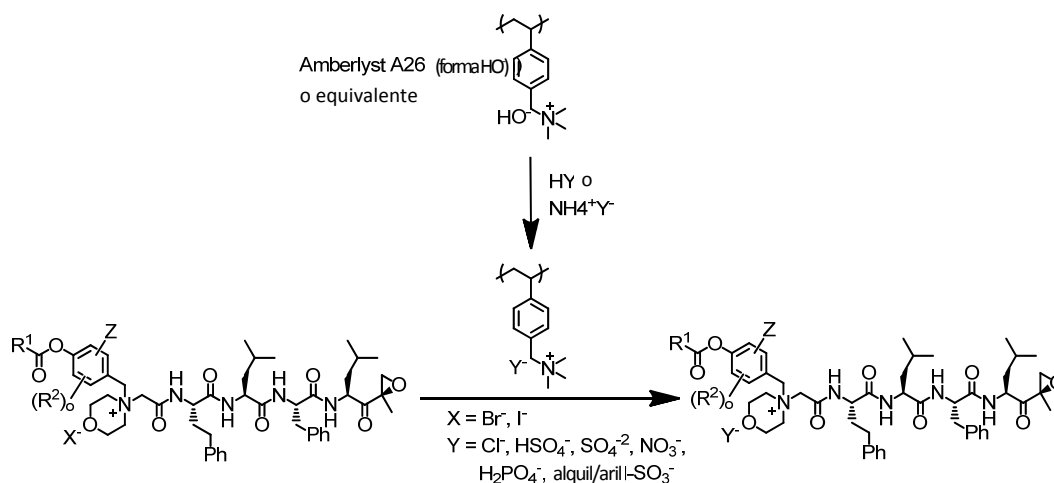
Paso 3: Acetato de 4-(Hidroximetil)-2-(prop-2-iniloxi)fenilo (3)

A una solución del compuesto 2 (12.00 g, 55.05 mmol) en DCM/MeOH (150 mL/15 mL) se agregó NaBH_4 (3.06 g, 82.57 mmol) de a porciones pequeñas a 0°C . La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. La mezcla se diluyó con acetona (5 mL), y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en columna de gel de sílice (éter de petróleo/EtOAc = 2:1) para dar lugar al compuesto 3. ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.16 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H), 7.04 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.98 (dd, $J_1 = 1.6$ Hz, $J_2 = 8.0$ Hz, 1H), 4.72 (d, $J = 2.4$ Hz, 2H), 4.69 (s, 2H), 2.53 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H), 2.32 (s, 3H).

Paso 4: Acetato de 4-(bromometil)-2-(prop-2-iniloxi)fenilo (4)

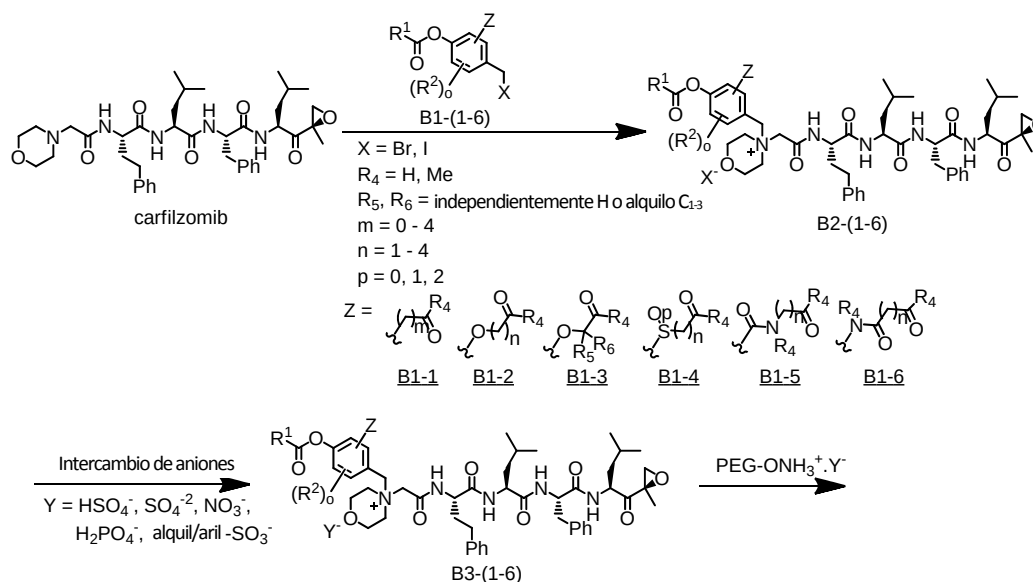
A una solución del compuesto 3 (11.50 g, 52.27 mmol) en DCM (150 mL) se agregó PPh_3 (20.50 g, 78.41 mmol) y NBS (11.04 g, 62.73 mmol) a 0°C . La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 0.5 hora. Un exceso de solvente se concentró y el residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en columna de gel de sílice (éter de petróleo/EtOAc = 20:1) para dar lugar al compuesto 4 (7.82 g, 53% de rendimiento). ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.14 (m, 1H), 7.02 (m, 2H), 4.73 (d, $J = 2.4$ Hz, 2H), 4.48 (s, 2H), 2.55 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H), 2.32 (s, 3H).

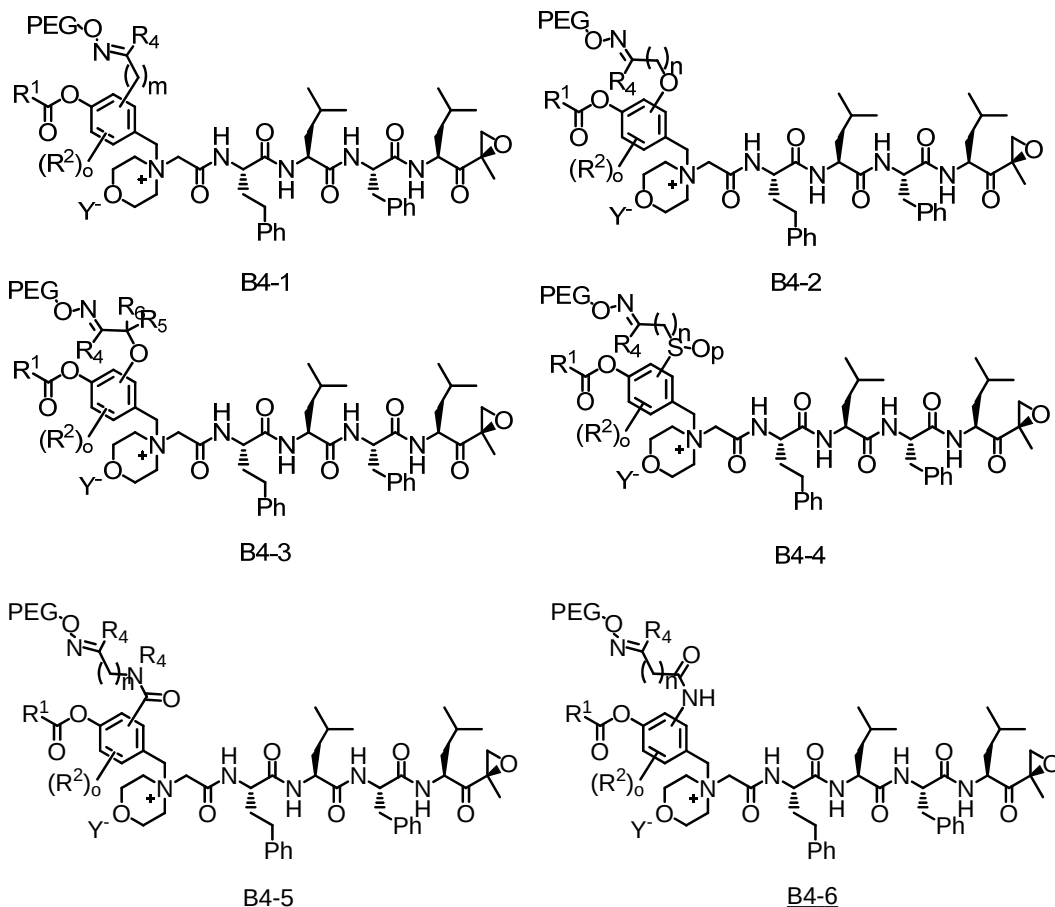
Esquema de reacción 5: Intercambio del anión de la sal cuaternaria



El intercambio iónico puede lograrse haciendo reaccionar el compuesto intermedio cuaternario de haluro con una sal de plata o de manera más práctica pasándolo por una resina de intercambio iónico, como se muestra en el Esquema de reacción 5. El anión de la sal cuaternaria de carfilzomib presente en los compuestos intermedios o en los productos finales puede convertirse en forma eficiente en un anión de ácido fuerte diferente tal como bisulfato, sulfato, fosfato monobásico, nitrato o alquil/aril sulfonato utilizando una resina de intercambio aniónico. Se pretrata una resina de intercambio aniónico tal como Amberlyst A26 (forma OH⁻) con el ácido o la sal de amonio deseada y luego se pasa la sal cuaternaria de haluro. Los conjugados preparados a partir de aniones de ácidos débiles tales como acetato, formato o lactato son inestables debido a la basicidad aumentada de la sal cuaternaria y la incompatibilidad con el grupo éster disparador.

Esquema de reacción 6: Conjugación con el polímero en dos pasos por vía de la química aminooxi/carbonilo

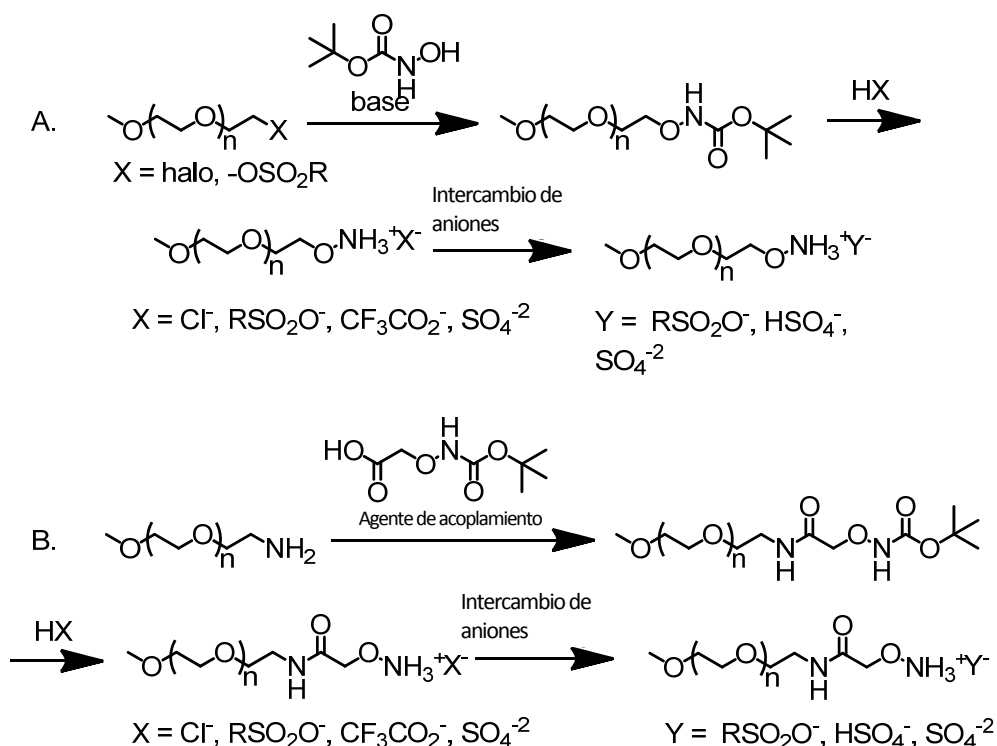




En forma alternativa, el grupo bencilo (B1-(1-6)) puede estar sustituido con un grupo carbonilo (aldehído o cetona) que es capaz de reaccionar con soportes poliméricos con la función aminooxi tales como el PEG-aminooxi (-ONH₂) para dar lugar a un conjugado estable unido a la oxima (B4-(1-6)). La porción de carbonilo puede estar unida en forma directa o unida mediante un alquilo espaciador (B1-1), unida mediante un enlace éter (B1-2,3), tioéter, sulfóxido o sulfona (B1-4), o unida mediante un enlace amida (B1-5,6). Carfilzomib y el haluro de bencilo (B1-(1-6)) se dejan reaccionar a temperatura ambiente o a una temperatura elevada en un solvente orgánico adecuado tal como acetonitrilo para dar lugar a un compuesto intermedio cuaternario (B2-(1-6)) en la forma de sal de bromuro o yoduro. Es deseable intercambiar este anión haluro para impedir la apertura del epóxido y la posible formación de productos secundarios de bromohidrina o yodohidrina. El intercambio aniónico puede llevarse a cabo haciendo reaccionar el intermedio cuaternario de haluro con una sal de plata o, de una forma más práctica, haciéndolo pasar por una resina de intercambio iónico tal como se describe más arriba (Esquema de reacción 5). El compuesto intermedio de sal cuaternaria de carfilzomib (B3-(1-6)) y el reactivo de polímero PEG-

ONH_3^+Y^- luego se dejan reaccionar a temperatura ambiente o a una temperatura elevada en un solvente orgánico adecuado tal como DCM o un solvente mixto acuoso y orgánico. Opcionalmente pueden agregarse catalizadores de la oximación tales como anilina, p-fenilenediamina, o ácido 5-metoxiantranílico pero habitualmente no son necesarios. Debe observarse que las sales del anión del compuesto intermedio de sal cuaternaria de carfilzomib (B3-(1-6)) y del reactivo PEG-aminooxi son idénticas para obviar la formación de un producto final de sales de aniones mixtas/os y la necesidad de cualquier manipulación posterior del anión. El producto final de PEG y carfilzomib puede redisolverse de manera conveniente por evaporación del solvente de reacción y reprecipitación del residuo a partir de isopropanol o mezclas éter/isopropanol hasta obtener el producto de la pureza deseada.

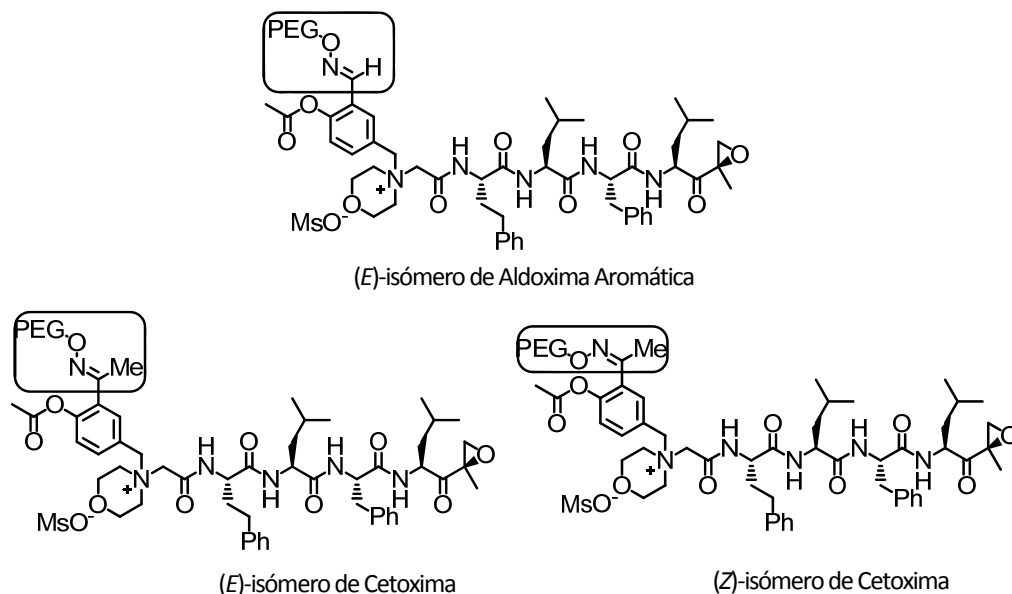
Esquema de reacción 7: Síntesis de los reactivos de PEG-aminooxi



Los reactivos de PEG-aminooxi pueden obtenerse comercialmente o pueden prepararse fácilmente a partir de materiales de partida de PEG-alcoholes, PEG-haluro (A) o PEG-amina (B) activados con mesilo o tosilo, tal como se ilustra en el Esquema de reacción 7. El compuesto intermedio protegido con *ter*-butiloxicarbonilo puede desprotegerse con un ácido fuerte tal como cloruro de hidrógeno, ácido metansulfónico, ácido trifluoroacético, o ácido sulfúrico para dar el reactivo de PEG-aminooxi en la forma de sal de cloruro, trifluoroacetato o sulfato. El anión del

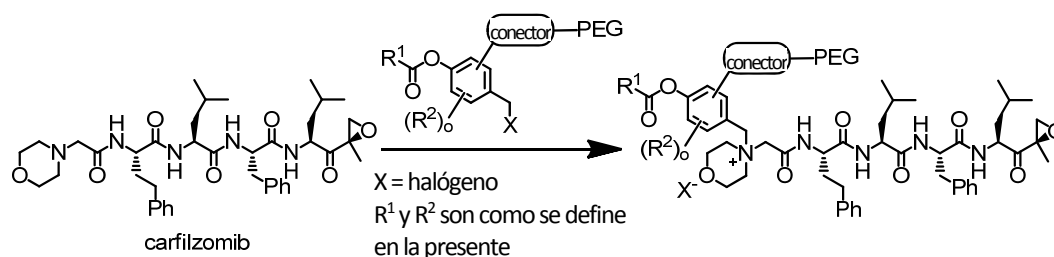
reactivo de PEG-aminooxi opcionalmente puede intercambiarse con un anión diferente utilizando una resina de intercambio aniónico.

Esquema de reacción 8: Isómeros de la oxima



Un experto en la materia comprenderá con facilidad que las oximas pueden existir como dos isómeros geométricos: un isómero *syn* (*Z*) y un isómero *anti* (*E*), tal como se ilustra en el Esquema de reacción 8. Muchos de los ejemplos de la presente divulgación son aldoximas aromáticas y existen sólo como isómeros (*E*). Las aldoximas no aromáticas y las cetoximas habitualmente pueden separarse completamente y obtenerse como un isómero (*Z*) y un isómero (*E*). Las aldoximas no aromáticas y las cetoximas conjugadas con PEG de la presente invención pueden existir como isómeros (*Z*) y (*E*) separados o como una mezcla de isómeros (*Z*) y (*E*).

Esquema de reacción 9: Conjugación directa con el polímero para formar una sal cuaternaria

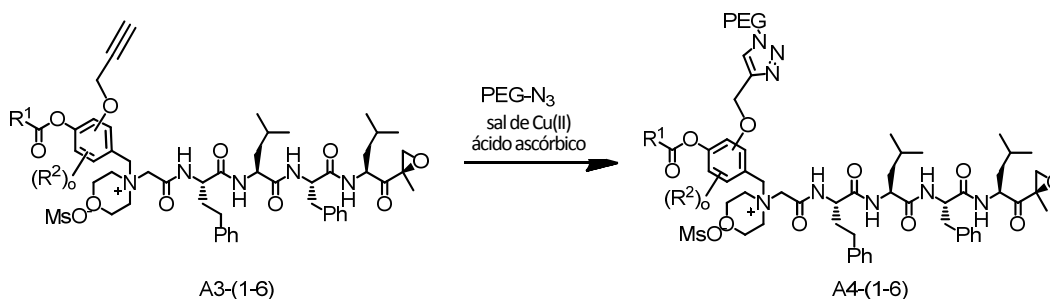


En forma alternativa, los conjugados de carfilzomib-polímero descritos en la presente memoria pueden prepararse en una reacción en un solo paso de carfilzomib y un haluro de bencilo sustituido en la posición *para* por un grupo alcaniloxi previamente unido con la cadena de polímero deseada, como se muestra en el Esquema de reacción 9. La cadena de polímero puede unirse mediante una amplia variedad de vías químicas conocidas o las vías químicas de alquino/azida o carbonilo/aminooxi descritas más arriba. Esta ruta puede ser menos deseable debido a la dificultad para separar los productos que contienen PEG de los materiales de partida pegilados que permanecieron sin reaccionar.

Ejemplos representativos de la invención

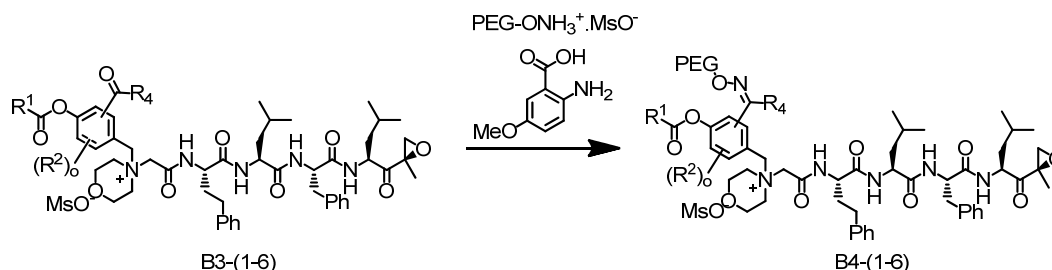
Los siguientes compuestos de carfilzomib pegilados son ejemplos representativos de la invención y no deben entenderse como un límite del alcance de la presente invención. Los compuestos de carfilzomib pegilados se prepararon utilizando los siguientes dos métodos generales para la unión de PEG (A y B).

Método A: Conector-PEG de triazol



concentró bajo vacío a 40°C. El residuo se disolvió en isopropanol (125 mL/mmol PEG-azida) a 40°C. Una vez que los sólidos se disolvieron completamente, se agregó dietil éter (90 mL/mmol PEG-azida) y la solución se enfrió en un baño de hielo. El sólido obtenido se filtró y la torta de filtración se lavó dos veces con cada uno de 2-propanol y dietil éter. La torta de filtración se disolvió en DCM y se concentró bajo vacío. El residuo se disolvió en isopropanol tibio (40°C) (200 mL/mmol PEG-azida) y luego se dejó enfriar en un baño de hielo. El sólido obtenido se filtró y la torta de filtración se lavó con 2-propanol y dietil éter, dos veces con cada uno, y luego se secó bajo vacío.

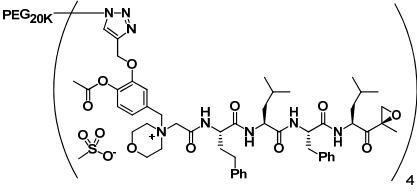
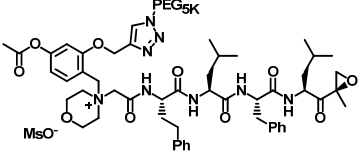
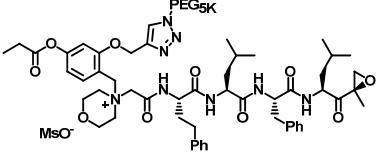
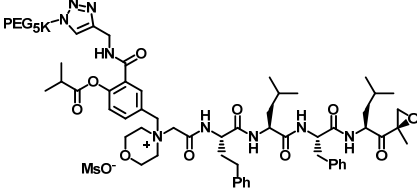
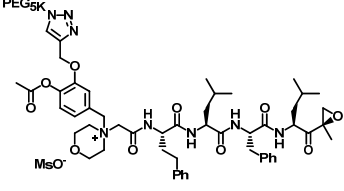
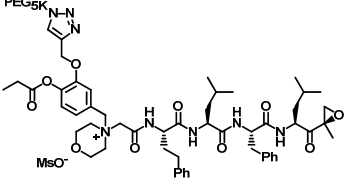
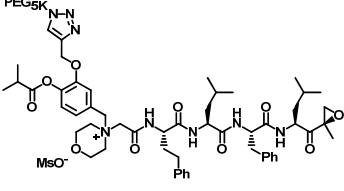
Método B: Conector-PEG de oxima

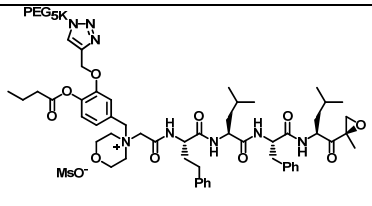
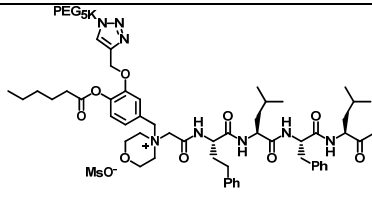
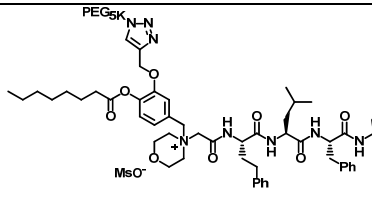
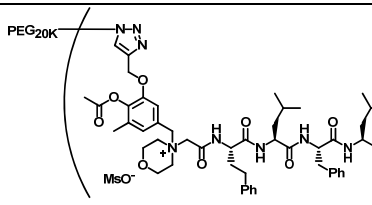
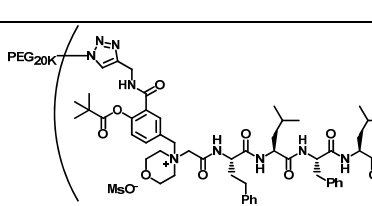
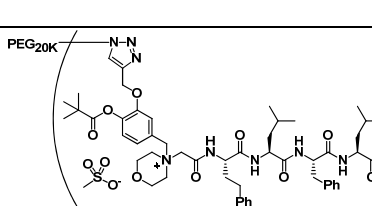
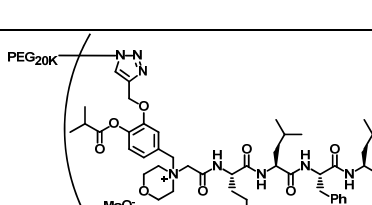


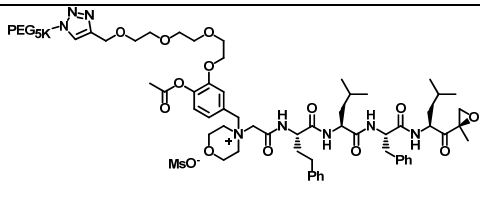
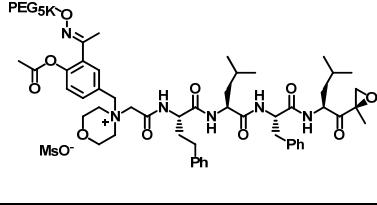
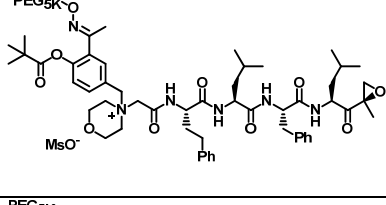
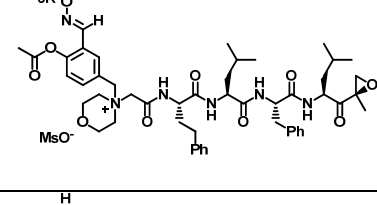
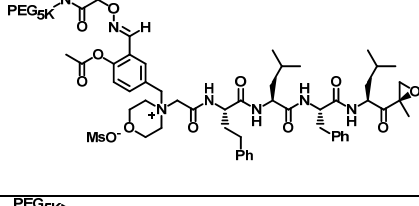
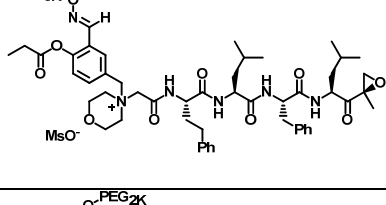
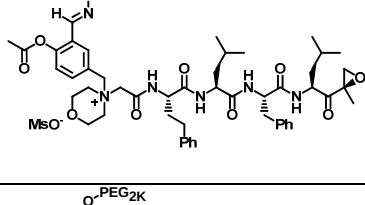
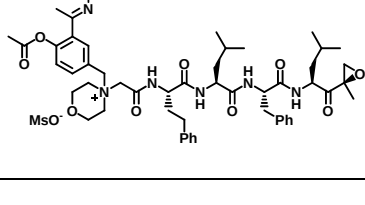
El intermediario de sal cuaternaria de carfilzomib B3-(1-6) (1 eq), PEG-OH₃⁺MsO⁻ (0.8 eq) y ácido 5-metoxiantranílico (catalizador para la oximación, 0.3 eq) en DCM (15 mL/mmol B3-(1-6)) se agitaron a temperatura ambiente hasta el consumo total del reactivo de PEG según la determinación por HPLC (detector ELS). La mezcla de reacción se evaporó hasta sequedad y el residuo se disolvió en isopropanol (15 mL/mmol B3-(1-6)) a 40°C. La solución clara se enfrió hasta temperatura ambiente y se agregó éter (5 mL/mmol B3-(1-6)) para inducir la cristalización. La mezcla se enfrió en un baño de hielo durante 5-10 minutos y el sólido formado se recolectó mediante filtración. La recrystalización a partir de isopropanol/éter se repitió una o dos veces más hasta que se eliminó todo el intermedio de sal cuaternaria de carfilzomib B3-(1-6) sin reaccionar según la detección por HPLC. El sólido final se secó bajo vacío a 30°C. Rendimiento típico: 60-80%; Tiempo de reacción típico: 10-30 min para compuestos intermedios que contienen una función aldehído, 24 h para compuestos intermedios con una función cetona.

En la Tabla 2 se muestran los Ejemplos de compuestos de carfilzomib pegilados preparados, la arquitectura de PEG y la metodología del conector de PEG. La Tabla 2 también incluye el tamaño y el peso (Daltons) del aducto de PEG y el método utilizado para unir la porción PEG a la columna de carfilzomib.

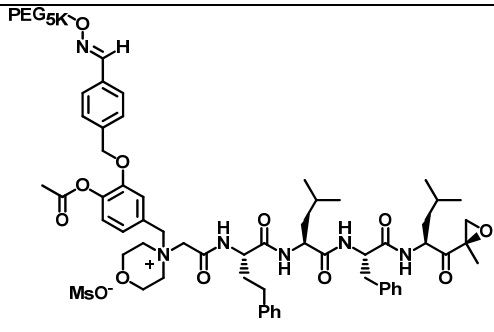
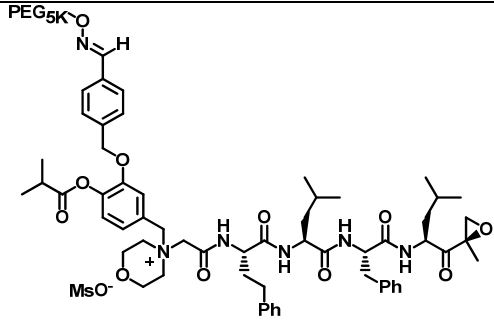
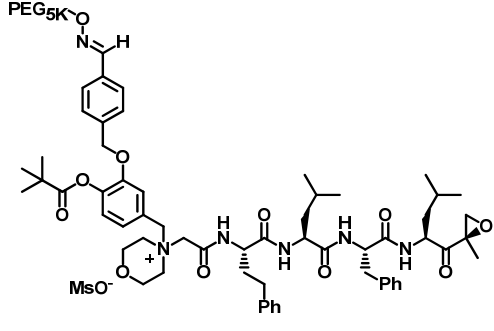
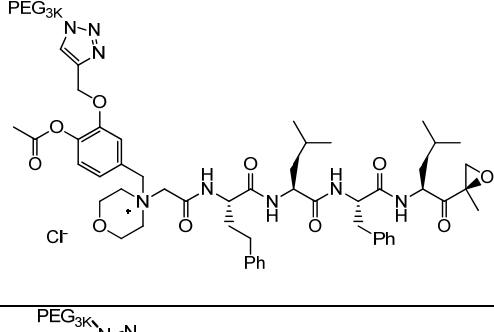
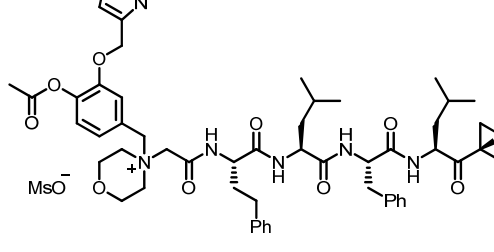
Tabla 2

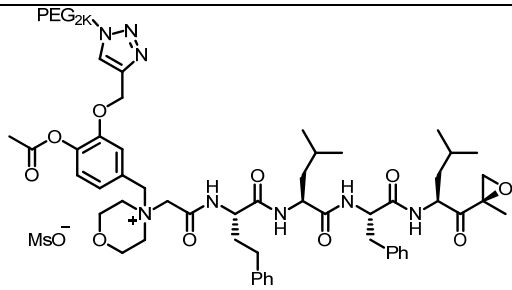
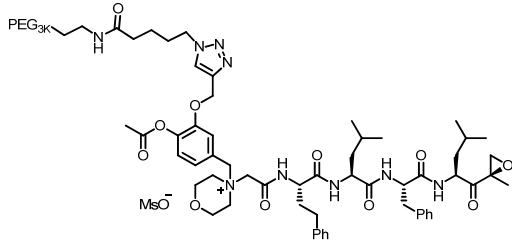
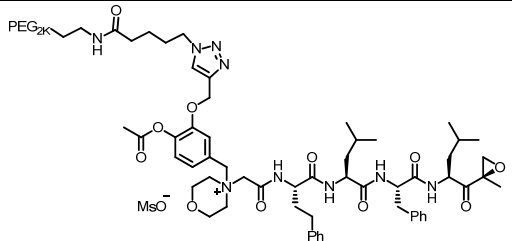
Ejemplo	Estructura	Tamaño/Brazos del PEG	Método del conector de PEG
1		20K/4	A
2		5K/1	A
3		5K/1	A
4		5K/1	A
5		5K/1	A
6		5K/1	A
7		5K/1	A

8		5K/1	A
9		5K/1	A
10		5K/1	A
11		20K/4	A
12		20K/4	A
13		20K/4	A
14		20K/4	A

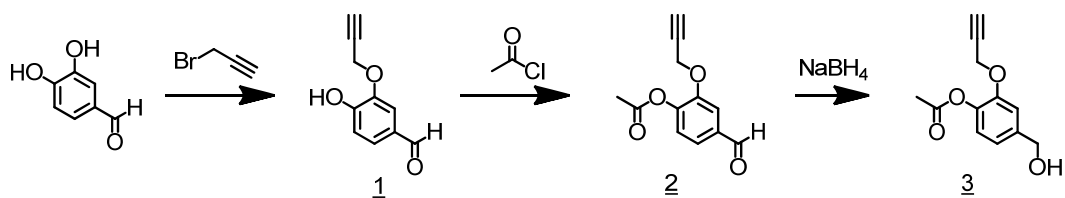
15		5K/1	A
16		5K/1	B
17		5K/1	B
18		5K/1	B
19		5K/1	B
20		5K/1	B
21		2K/1	B
22		2K/1	B

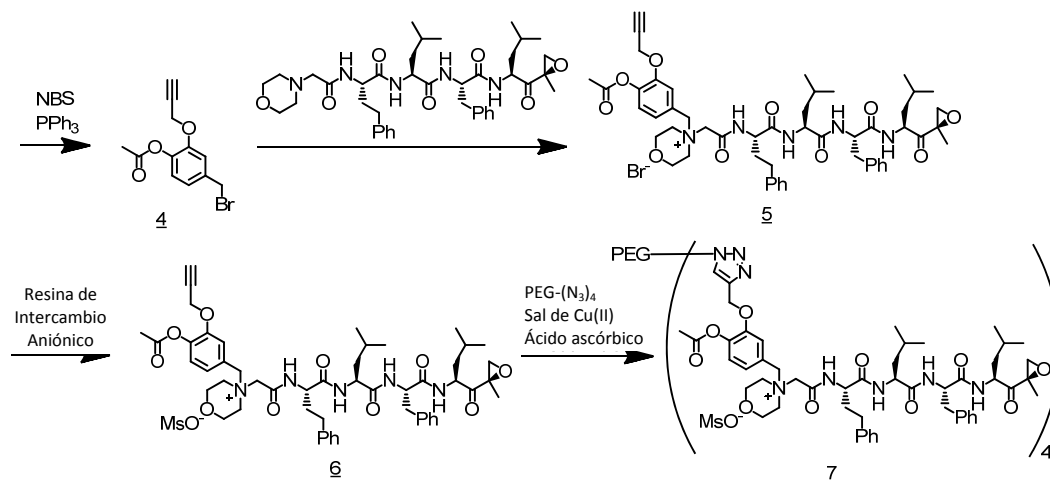
23		3K/1	B
24		3K/1	B
25		20K/4	B
26		5K/1	B
27		5K/1	B
28		5K/1	B
29		20K/4	B
30		20K/4	B

31		5K/1	B
32		5K/1	B
33		5K/1	B
34		3K/1	A
35		3K/1	A

36		2K/1	A
37		3K/1	A
38		2K/1	A

Ejemplo 1: Metansulfonato de 4-(4-acetoxi-3-((1-(PEG_{20K}-4-Arm)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)bencil)-4-((4S,7S,10S,13S)-10-bencil-7-isobutil-15-metil-13-((R)-2-metiloxiran-2-carbonil)-2,5,8,11-tetraoxo-4-fenetil-3,6,9,12-tetraazahexadecil)morfolin-4-io (7)





4-Hidroxi-3-(prop-2-iniloxi)benzaldehído (1)

A una mezcla de NaH en DMSO (300 mL) se agregó 3,4-dihidroxibenzaldehído (30 g, 217.39 mmol) en DMSO (50 mL) a 20°C. La mezcla se agitó durante 30 min y se agregó 3-bromoprop-1-ino (25.87 g, 217.39 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante una hora. La mezcla se vertió en hielo - agua (800 mL) y la solución obtenida se llevó a pH = 2. La mezcla se extrajo con EtOAc (500 mL×3), se secó sobre MgSO₄ anhidro, y se concentró. El residuo se cristalizó varias veces a partir de DCM/éter de petróleo (30 mL/500 mL) para dar lugar al compuesto 1 (30 g, 78% de rendimiento); ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz): δ 9.87 (s, 1H), 7.54 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 7.49 (dd, *J*₁ = 1.5 Hz, *J*₂ = 8.1 Hz, 1H), 7.09 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 4.82 (m, 2H), 2.62 (m, 1H).

Acetato de 4-formil-2-(prop-2-iniloxi)fenilo (2)

A una solución del compuesto 1 (10.00 g, 56.82 mmol) en DCM (150 mL) se agregó Et₃N (11.48 g, 113.64 mmol) seguido de cloruro de acetilo (5.35 g, 68.18 mmol) a 0°C. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla se lavó con solución saturada acuosa 2 N de HCl (100 mL) y agua (50 mL), se secó sobre MgSO₄ anhidro, y se concentró para dar lugar al compuesto 2 (12 g, 97% de rendimiento), el cual se utilizó en el próximo paso sin purificación adicional; ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ 9.96 (s, 1H), 7.63 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H), 7.54 (dd, *J*₁ = 1.6 Hz, *J*₂ = 8.0 Hz, 1H), 7.25 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 4.79 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H), 2.57 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H), 2.35 (s, 3H).

Acetato de 4-(Hidroximetil)-2-(prop-2-iniloxi)fenilo (3)

A una solución del compuesto 2 (12.00 g, 55.05 mmol) en DCM/MeOH (150 mL/15 mL) se agregó NaBH₄ (3.06 g, 82.57 mmol) en pequeñas porciones a 0°C. La mezcla de reacción se agitó a

temperatura ambiente durante 30 min. La mezcla se diluyó con acetona (5 mL), y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en columna de gel de sílice (éter de petróleo/EtOAc = 2:1) para dar lugar al compuesto 3 (10.32 g, 85% de rendimiento); $^1\text{H RMN}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.16 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 7.04 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 6.98 (dd, J_1 = 1.6 Hz, J_2 = 8.0 Hz, 1H), 4.72 (d, J = 2.4 Hz, 2H), 4.69 (s, 2H), 2.53 (t, J = 2.4 Hz, 1H), 2.32 (s, 3H).

Acetato de 4-(bromometil)-2-(prop-2-iniloxi)fenilo (4)

A una solución del compuesto 3 (11.50 g, 52.27 mmol) en DCM (150 mL) se agregó PPh_3 (20.50 g, 78.41 mmol) y NBS (11.04 g, 62.73 mmol) a 0°C. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 0.5 hora. Un exceso de solvente se concentró y el residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en columna de gel de sílice (éter de petróleo/EtOAc = 20:1) para dar lugar al compuesto 4 (7.82 g, 53% de rendimiento); $^1\text{H RMN}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.14 (m, 1H), 7.02 (m, 2H), 4.73 (d, J = 2.4 Hz, 2H), 4.48 (s, 2H), 2.55 (t, J = 2.4 Hz, 1H), 2.32 (s, 3H).

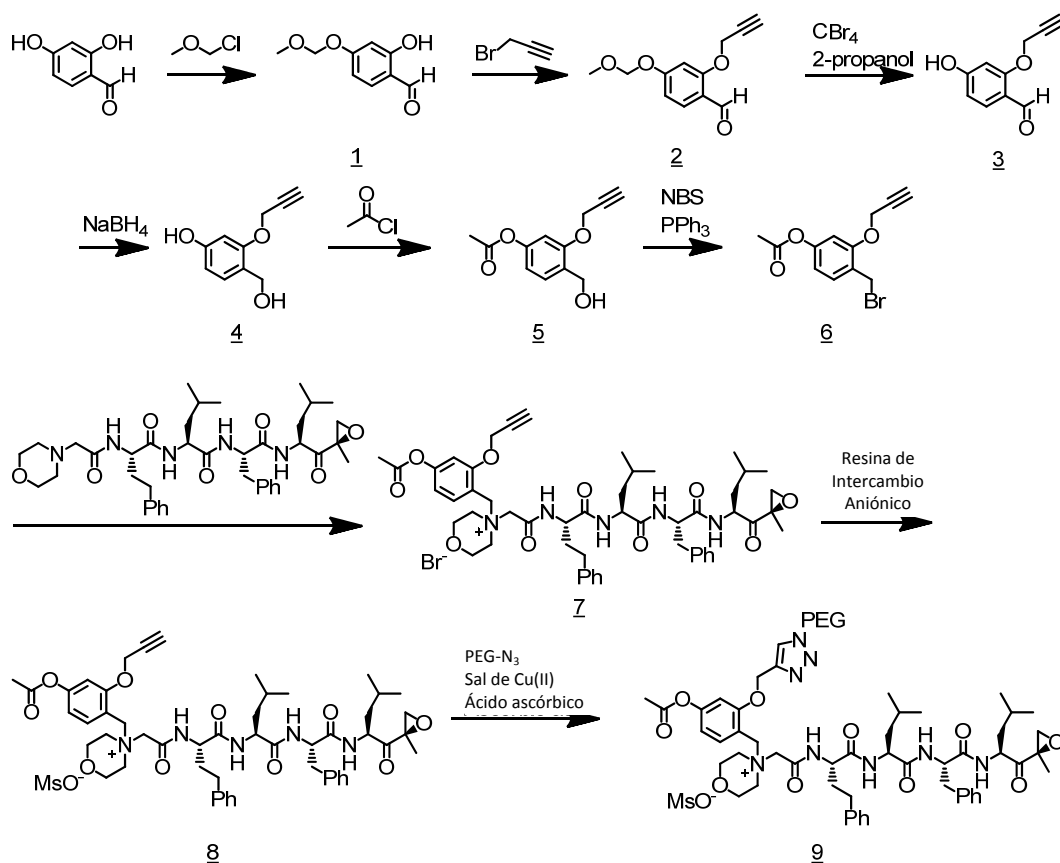
Metansulfonato de 4-(4-acetoxi-3-(prop-2-in-1-iloxi)bencil)-4-((4S,7S,10S,13S)-10-bencil-7-isobutil-15-metil-13-((R)-2-metiloxiran-2-carbonil)-2,5,8,11-tetraoxo-4-fenetil-3,6,9,12-tetraazahexadecil)morfolin-4-io (6)

A una solución del compuesto 4 (5.85 g, 20.67 mmol) en MeCN (50 mL) se agregó (S)-4-metil-N-((S)-1-(((S)-4-metil-1-((R)-2-metiloxiran-2-il)-1-oxopentan-2-il)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)-2-((S)-2-(2-morfolinoacetamido)-4-fenilbutanamido)pentanamida (4.96 g, 6.89 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 45°C durante 2 días. Un exceso de solvente se concentró y el residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en columna de gel de sílice (EtOAc/MeOH = 100:6) para dar lugar al compuesto deseado 5, el cual se convirtió en el correspondiente mesilato (3.2 g, 50% de rendimiento) mediante el tratamiento con resina de intercambio iónico; $^1\text{H RMN}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 9.66 (m, 1H), 7.83 (m, 1H), 7.36 (m, 1H), 7.26-7.14 (m, 13H), 6.72 (m, 1H), 5.18 (m, 1H), 4.90 (m, 2H), 4.77 (m, 2H), 4.53-4.36 (m, 4H), 4.26 (m, 3H), 4.08 (m, 1H), 3.92 (m, 2H), 3.74 (m, 1H), 3.46 (m, 1H), 3.35 (m, 1H), 3.13 (m, 1H), 3.04 (m, 2H), 2.81 (s, 3H), 2.75 (m, 2H), 2.62 (m, 1H), 2.33 (m, 3H), 2.20 (m, 1H), 2.12 (m, 1H), 1.70-1.53 (m, 3H), 1.50-1.33 (m, 5H), 1.25 (m, 2H), 0.90-0.81 (m, 12H).

El Ejemplo 1 se preparó a partir del compuesto 6 y $\text{PEG}_{20\text{K}}(\text{N}_3)_4$, siguiendo el procedimiento de pegilación general A; $^1\text{H RMN}$ (500 MHz, tiempo de relajación = 10 seg) DMSO- d_6 RMN: δ 9.50 (s, 4H), 8.50 (s, 4H), 8.39 (d, J = 8 Hz, 4H), 8.27 (d, J = 8 Hz, 4H), 8.11 (s, 4H), 8.05 (d, J = 8 Hz, 4H), 7.58 (s, 4H), 7.26-7.29 (m, 12H), 7.12-7.23 (m, 32H), 7.03-7.06 (m, 4H), 5.26 (m, 8H), 4.89-5.00 (m, 8H), 4.52-4.56 (m, 12H), 4.28-4.38 (m, 16H), 4.17-4.20 (m, 4H), 4.05 (m, 16H), 3.81 (t, J = 5.5 Hz, 8H), 3.63-3.66 (m, 8H), 3.50 (s, 2098H), 3.10 (d, J = 5 Hz, 4H), 2.94-2.98 (m, 12H),

2.72-2.78 (m, 4H), 2.50-2.65 (m, 8H), 2.24 (s, 12H), 1.90-1.98 (m, 4H), 1.78-1.88 (m, 4H), 1.58-1.66 (m, 8H), 1.39 (s, 12H), 1.25-1.38 (m, 12H), 0.836-0.882 (m, 24H), 0.786-0.817 (m, 24H); Carga: 87%.

Ejemplo 2: Metansulfonato de 4-(4-acetoxi-2-((1-PEG_{5K}-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)bencil)-4-((4S,7S,10S,13S)-10-bencil-7-isobutil-15-metil-13-((R)-2-metiloxiran-2-carbonil)-2,5,8,11-tetraoxo-4-fenetil-3,6,9,12-tetraazahexadecil)morfolin-4-io (9).



2-Hidroxi-4-(metoximetoxi)benzaldehído (1)

A una solución del compuesto 2,4-dihidroxibenzaldehído (5.04 g, 36.24 mmol) en THF (100 mL) se agregó DIPEA (6.52 g, 54.35 mmol) y cloro(metoxi)metano (3.21 g, 39.86 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Un exceso de solvente se concentró y el residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en columna de gel de sílice (éter de petróleo/EtOAc = 15:1) para dar lugar al compuesto 1 (3.96 g, 60% de rendimiento); ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 11.41 (s, 1H), 9.76 (s, 1H), 7.48 (dd, *J*₁ = 2.7 Hz, *J*₂ = 8.4 Hz, 1H), 6.67 (dd, *J*₁ = 2.4 Hz, *J*₂ = 8.7 Hz, 1H), 6.62 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 5.25 (d, *J* = 2.7 Hz, 2H), 3.51 (d, *J*

= 3.0 Hz, 3H).

4-(Metoximetoxi)-2-(prop-2-iniloxi)benzaldehído (2)

A una mezcla de NaH (900 mg, 21.252 mmol) en DMSO (100 mL) se agregó compuesto 1 (2.0 g, 10.63 mmol) en DMSO (50 mL) a 20°C. La mezcla se agitó a la misma temperatura durante 30 min y luego se agregó 3-bromoprop-1-ino (1.90 g, 15.94 mmol) gota a gota. La mezcla de reacción se agitó a la misma temperatura durante 4 horas y luego se vertió en hielo - agua (100 mL). La solución obtenida se llevó a pH = 2-3 y se agregó EtOAc (100 mL). Las dos fases se separaron y la fase acuosa se extrajo con EtOAc (100 mL×3). Las fases orgánicas combinadas se secaron y se concentraron. El residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en columna de gel de sílice (éter de petróleo/EtOAc = 3:1) para dar lugar al compuesto 2 (1.89 g, 80% de rendimiento); ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 10.34 (s, 1H), 7.85 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H), 6.76 (m, 2H), 5.26 (s, 2H), 4.83 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H), 3.52 (s, 3H), 2.60 (q, *J* = 2.4 Hz, 1H).

4-Hidroxi-2-(prop-2-iniloxi)benzaldehído (3)

A una solución del compuesto 2 (5.1 g, 23.18 mmol) en propan-2-ol (100 mL) se agregó CBr₄ (760 mg, 2.32 mmol). La mezcla de reacción se mantuvo a reflujo durante la noche. Un exceso de solvente se concentró y el residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en columna de gel de sílice (éter de petróleo/EtOAc = 3:1) para dar lugar al compuesto 3 (2.44 g, 60% de rendimiento); ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10.76 (s, 1H), 10.11 (s, 1H), 7.60 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 6.59 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 6.52 (dd, *J*₁ = 2.0 Hz, *J*₂ = 8.8 Hz, 1H), 4.92 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H), 3.70 (q, *J* = 2.4 Hz, 1H).

4-(Hidroximetil)-3-(prop-2-iniloxi)fenol (4)

A una solución del compuesto 3 (2.45 g, 13.92 mmol) en MeOH (40 mL) se agregó NaBH₄ (618 mg, 16.698 mmol) en pequeñas porciones a 0°C. La mezcla de reacción se agitó a la misma temperatura durante 1 hora y luego se diluyó con agua (1.5 mL). Un exceso de solvente se concentró y el residuo se volvió a disolver en EtOAc (100 mL). La solución obtenida se secó y se concentró para dar lugar al compuesto 4 (1.80 g, 74% de rendimiento), el cual se utilizó en el próximo paso sin purificación adicional; ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 6.98 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.32 (s, 1H), 6.26 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 4.65 (d, *J* = 2.0 Hz, 2H), 4.32 (s, 2H), 3.54 (m, 1H).

Acetato de 4-(Hidroximetil)-3-(prop-2-iniloxi)fenilo (5)

A una solución del compuesto 4 (1.20 g, 6.74 mmol) en DCM (30 mL) se agregó TEA (1.70 g, 16.85 mmol) seguido de cloruro de acetilo (634 mg, 8 mmol) gota a gota a 0°C. La mezcla de

reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. Un exceso de solvente se concentró y el residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en columna de gel de sílice (éter de petróleo/EtOAc = 5:1) para dar lugar al compuesto 5 (360 mg, 30% de rendimiento); ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7.38 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.79 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 6.75 (dd, *J*₁ = 2.0 Hz, *J*₂ = 8.0 Hz, 1H), 5.09 (m, *J* = 5.6 Hz, 1H), 4.82 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 4.46 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H), 3.60 (q, *J* = 2.4 Hz, 1H), 2.26 (s, 3H).

Acetato de 4-(bromometil)-3-(prop-2-iniloxi)fenilo (6)

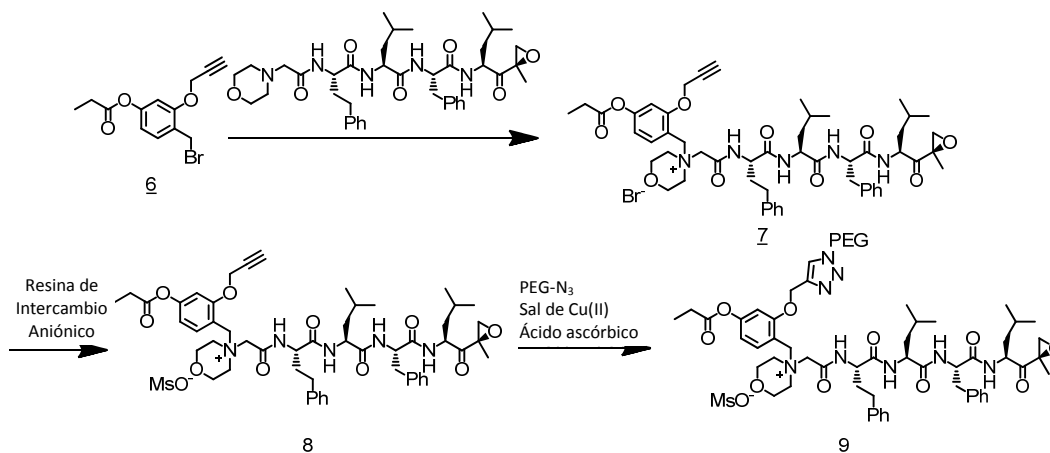
A una solución del compuesto 5 (360 mg, 1.64 mmol) en DCM (15 mL) se agregó PPh₃ (515 mg, 1.96 mmol) seguido de NBS (318 mg, 1.80 mmol) en pequeñas porciones a 0°C. La mezcla de reacción se agitó a la misma temperatura durante 30 min. Un exceso de solvente se concentró y el residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en columna de gel de sílice (éter de petróleo/EtOAc = 50:1) para dar lugar al compuesto 6 (190 mg, 41% de rendimiento); ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 7.36 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.78 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 6.73 (dd, *J*₁ = 2.0 Hz, *J*₂ = 8.4 Hz, 1H), 4.77 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H), 4.54 (s, 2H), 2.56 (q, *J* = 2.4 Hz, 1H), 2.31 (s, 3H).

Metansulfonato de 4-(4-acetoxi-2-(prop-2-in-1-iloxi)bencil)-4-((4S,7S,10S,13S)-10-bencil-7-isobutil-15-metil-13-((R)-2-metiloxiran-2-carbonil)-2,5,8,11-tetraoxo-4-fenetil-3,6,9,12-tetraazahexadecil)morfolin-4-io (8)

A una solución del compuesto 6 (190 mg, 0.67 mmol) en MeCN (10 mL) se agregó (S)-4-metil-N-((S)-1-(((S)-4-metil-1-((R)-2-metiloxiran-2-il)-1-oxopentan-2-il)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)-2-((S)-2-(2-morfolinoacetamido)-4-fenilbutanamido)pentanamida (480 mg, 0.67 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 45°C durante la noche. Un exceso de solvente se concentró y el residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en columna de gel de sílice (MeOH/EtOAc = 1:50) para dar lugar al compuesto deseado 7, el cual se convirtió en el correspondiente mesilato (340 mg, 74% de rendimiento) mediante el tratamiento con resina de intercambio iónico; ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 9.68 (m, 1H), 7.88 (m, 1H), 7.63 (m, 1H), 7.33-7.16 (m, 10H), 6.89 (m, 3H), 6.50 (m, 1H), 5.16 (m, 1H), 5.05 (m, 1H), 4.87 (m, 1H), 4.75 (m, 2H), 4.47 (m, 2H), 4.45-4.12 (m, 8H), 4.02 (m, 3H), 3.72 (m, 1H), 3.54 (m, 1H), 3.38 (m, 1H), 3.20 (m, 1H), 3.06 (m, 2H), 2.80 (s, 3H), 2.74 (m, 2H), 2.63 (m, 2H), 2.40-2.08 (m, 5H), 1.64 (m, 2H), 1.47 (s, 3H), 0.85 (m, 12H).

El compuesto del Ejemplo 2 se preparó a partir del compuesto 8 y PEG_{5K}N₃, siguiendo el procedimiento de pegilación general A

Ejemplo 3: Metansulfonato de 4-((4S,7S,10S,13S)-10-bencil-7-isobutil-15-metil-13-((R)-2-metiloxiran-2-carbonil)-2,5,8,11-tetraoxo-4-fenetil-3,6,9,12-tetraazahexadecil)-4-(2-((1-PEG_{5K}-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)-4-(propioniloxi)bencil)morfolin-4-ilo (9)



2-Hidroxi-4-(metoximetoxi)benzaldehído (1)

A una solución de 2,4-dihidroxibenzaldehído (5.0 g, 36.23 mmol) en THF se agregó DIPEA (6.52 g, 54.35 mmol) y cloro(metoxi)metano (3.21 g, 39.86 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante la noche. Un exceso de solvente se concentró y el residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en columna de gel de sílice (éter de petróleo/EtOAc = 15:1) para dar lugar al compuesto 1 (3.96 g, 60% de rendimiento); ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 11.41 (s, 1H), 9.76 (s, 1H), 7.48 (dd, *J*₁ = 2.7 Hz, *J*₂ = 8.4 Hz, 1H), 6.67 (dd, *J*₁ = 2.4 Hz, *J*₂ = 8.7 Hz, 1H), 6.62 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 5.25 (d, *J* = 2.7 Hz, 2H), 3.51 (d, *J* = 3.0 Hz, 3H).

4-(Metoximetoxi)-2-(prop-2-iniloxi)benzaldehído (2)

A una mezcla de NaH (900 mg, 21.252 mmol) en DMSO (100 mL) se agregó compuesto 1 (2.0 g, 10.626 mmol) en DMSO (50 mL) a 20°C. La mezcla se agitó a la misma temperatura durante 30 min y luego se agregó 3-bromoprop-1-ino (1.90 g, 15.94 mmol) gota a gota. La mezcla de reacción se agitó a la misma temperatura durante 4 horas y luego se vertió en hielo - agua (100 mL). La solución obtenida se llevó a pH = 2-3 y se agregó EtOAc (100 mL). Las dos fases se separaron y la fase acuosa se extrajo con EtOAc (100 mL×3). Las fases orgánicas combinadas se secaron y se concentraron. El residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en columna de gel de sílice (éter de petróleo/EtOAc = 3:1) para dar lugar al compuesto 2 (1.89 g, 80% de rendimiento); ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 10.34 (s, 1H), 7.85 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H), 6.76 (m, 2H), 5.26 (s, 2H), 4.83 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H), 3.52 (s, 3H), 2.60 (q, *J* = 2.4 Hz, 1H).

4-Hidroxi-2-(prop-2-iniloxi)benzaldehído (3)

A una solución del compuesto 2 (5.1 g, 23.18 mmol) en propan-2-ol (100 mL) se agregó CBr_4 (760 mg, 2.318 mmol). La mezcla de reacción se mantuvo a reflujo durante la noche. Un exceso de solvente se concentró y el residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en columna de gel de sílice (éter de petróleo/EtOAc = 3:1) para dar lugar al compuesto 3 (2.44 g, 60% de rendimiento); $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 10.76 (s, 1H), 10.11 (s, 1H), 7.60 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 6.59 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 6.52 (dd, J_1 = 2.0 Hz, J_2 = 8.8 Hz, 1H), 4.92 (d, J = 2.4 Hz, 2H), 3.70 (q, J = 2.4 Hz, 1H).

4-(Hidroximetil)-3-(prop-2-iniloxi)fenol (4)

A una solución del compuesto 3 (2.45 g, 13.92 mmol) en MeOH (40 mL) se agregó NaBH_4 (618mg, 16.698mmol) en pequeñas porciones a 0°C. La mezcla de reacción se agitó a la misma temperatura durante 1 hora y luego se diluyó con agua (1.5 mL). Un exceso de solvente se concentró y el residuo se volvió a disolver en EtOAc (100 mL). La solución obtenida se secó y se concentró para dar lugar al compuesto 4 (1.80 g, 74% de rendimiento), el cual se utilizó en el próximo paso sin purificación adicional; $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 6.98 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 6.32 (s, 1H), 6.26 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 4.65 (d, J = 2.0 Hz, 2H), 4.32 (s, 2H), 3.54 (m, 1H).

Propionato de 4-(Hidroximetil)-3-(prop-2-iniloxi)fenilo (5)

A una solución del compuesto 4 (2.4 g, 13.5 mmol) en DCM/THF (30 mL/5 mL) se agregó Et_3N (3.41 g, 33.75 mmol) y anhídrido propiónico (1.93 g, 14.8 mmol) a 0°C. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Un exceso de solvente se concentró y el residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en columna de gel de sílice (éter de petróleo/EtOAc = 3:1) para dar lugar al compuesto 5 (850 mg, 30% de rendimiento); $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 7.38 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 6.81 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 6.74 (dd, J_1 = 2.4 Hz, J_2 = 8.4 Hz, 1H), 5.08 (br, s, 1H), 4.80 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 4.46 (s, 2H), 3.60 (m, 1H), 2.20 (m, 2H), 1.16 (m, 3H).

Propionato de 4-(bromometil)-3-(prop-2-iniloxi)fenilo (6)

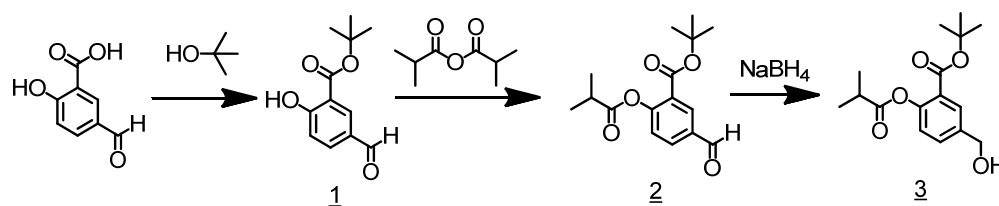
A una solución del compuesto 5 (850 mg, 3.63 mmol) en DCM (40 mL) se agregó PPh_3 (1.24 g, 4.72 mmol) y NBS (767.4 mg, 4.36 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó durante 30 min. Un exceso de solvente se concentró y el residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en columna de gel de sílice (éter de petróleo/EtOAc = 3:1) para dar lugar al compuesto 6 (780 mg, 73% de rendimiento); $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 7.34 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 6.78 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 6.73 (dd, J_1 = 2.4 Hz, J_2 = 8.4 Hz, 1H), 4.77 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 4.54 (m, 1H), 2.60 (m, 2H), 2.56 (m, 1H), 1.27 (q, J = 7.6 Hz, 3H).

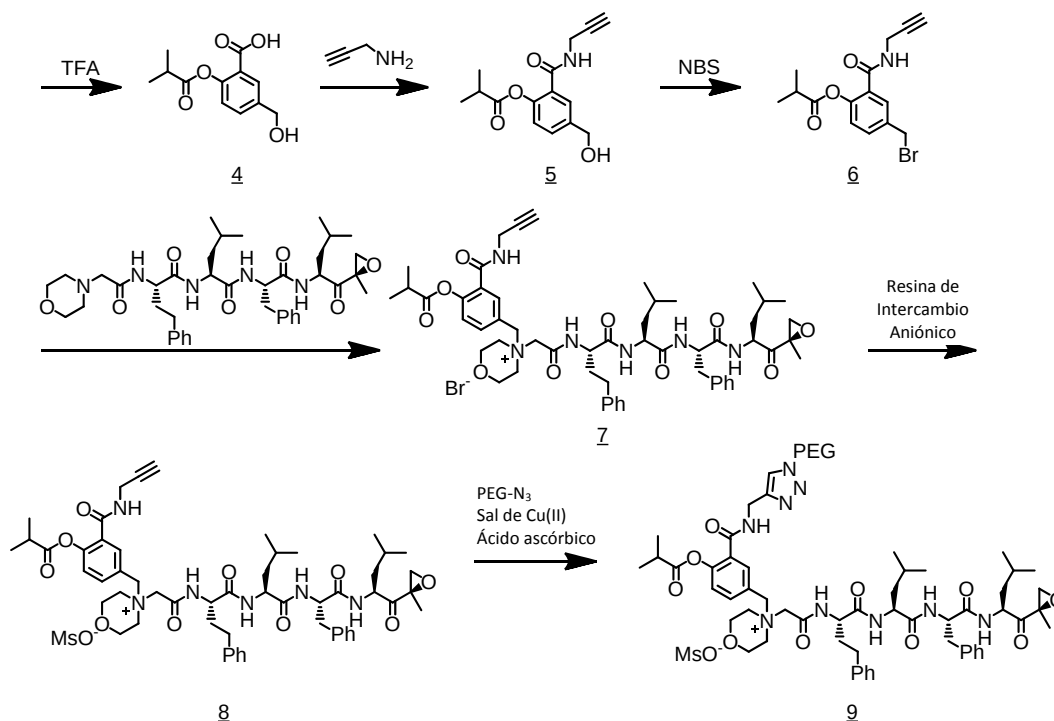
Metansulfonato de 4-((4S,7S,10S,13S)-10-bencil-7-isobutil-15-metil-13-((R)-2-metiloxiran-2-carbonil)-2,5,8,11-tetraoxo-4-fenetil-3,6,9,12-tetraazahexadecil)-4-(2-(prop-2-in-1-iloxi)-4-(propioniloxi)bencil)morfolin-4-io (8)

A una solución del compuesto 6 (780 mg, 2.626 mmol) en MeCN (10 mL) se agregó (S)-4-metil-N-((S)-1-(((S)-4-metil-1-((R)-2-metiloxiran-2-il)-1-oxopentan-2-il)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)-2-((S)-2-(2-morfolinoacetamido)-4-fenilbutanamido)pentanamida (945 mg, 1.313 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Un exceso de solvente se concentró y el residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en columna de gel de sílice (EtOAc/MeOH = 100:3) para dar lugar al compuesto deseado 7 (760 mg, 57% de rendimiento), el cual se convirtió en el correspondiente mesilato (740 mg, 97% de rendimiento) mediante el tratamiento con resina de intercambio iónico; $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 9.64 (m, 1H), 7.88 (m, 1H), 7.63 (m, 1H), 7.26 (m, 10H), 6.92 (m, 1H), 6.89 (m, 2H), 6.50 (m, 1H), 5.16 (m, 1H), 5.05 (m, 1H), 4.87 (m, 1H), 4.78 (m, 2H), 4.47 (m, 2H), 4.45-4.12 (m, 8H), 3.72 (m, 1H), 3.54 (m, 1H), 3.38 (m, 1H), 3.20 (m, 1H), 3.06 (m, 2H), 2.84 (m, 1H), 2.80 (s, 3H), 2.74 (m, 2H), 2.63 (m, 3H), 2.40-2.08 (m, 5H), 1.64 (m, 2H), 1.47 (s, 3H), 1.24 (m, 3H), 0.85 (m, 12H).

El compuesto carfilzomib pegilado del Ejemplo 3 se preparó a partir del compuesto 8 y $\text{PEG}_{5\text{K}}\text{N}_3$, siguiendo el procedimiento de pegilación general A.

Ejemplo 4: Metansulfonato de 4-((4S,7S,10S,13S)-10-bencil-7-isobutil-15-metil-13-((R)-2-metiloxiran-2-carbonil)-2,5,8,11-tetraoxo-4-fenetil-3,6,9,12-tetraazahexadecil)-4-(4-(isobutiriloxi)-3-(((1-PEG_{5K}-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)carbamoil)bencil)morfolin-4-io (9)





5-formil-2-hidroxibenzoato de *tert*-butilo (1)

A una solución del compuesto ácido 5-formil-2-hidroxibenzoico (2.01 g, 12 mmol) en 2-metilpropan-2-ol (70 mL) se agregó DCC (2.3 g, 12 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó bajo reflujo durante 3 horas. El solvente se concentró y el residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en columna de gel de sílice (éter de petróleo/EtOAc = 5:1) para dar lugar al compuesto 1 (1.8 g, 75% de rendimiento). $^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 11.76 (s, 1H), 9.91 (s, 1H), 8.33 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 8.00 (dd, $J_1 = 1.8$ Hz, $J_2 = 8.7$ Hz, 1H), 7.11 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 1.68 (s, 9H).

5-formil-2-(isobutiriloxi)benzoato de *tert*-butilo (2)

A una solución del compuesto 1 (1.01 g, 4.5 mmol) en THF (20 mL) se agregó piridina (1.07 g, 13.5 mmol) y anhídrido isobutírico (1.423 g, 9 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó durante 3 horas. Un exceso de solvente se concentró y el residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en columna de gel de sílice (éter de petróleo/EtOAc = 10:1) para dar lugar al compuesto 2 (420 mg, 36% de rendimiento). $^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 10.04 (s, 1H), 8.36 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H), 8.04 (dd, $J_1 = 2.1$ Hz, $J_2 = 8.4$ Hz, 1H), 7.25 (m, 1H), 2.91 (m, 1H), 1.59 (s, 9H), 1.36 (d, $J = 6.9$ Hz, 6H).

5-(hidroximetil)-2-(isobutiriloxi)benzoato de *tert*-butilo (3)

A una solución del compuesto 2 (400 mg, 1.37 mmol) en THF (20 mL) se agregó NaBH₄ (57.3 mg, 1.5 mol) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó durante 1 hora y luego se diluyó con acetona (1 mL). Un exceso de solvente se concentró y el residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en columna de gel de sílice (éter de petróleo/EtOAc = 8:1) para dar lugar al compuesto 3 (300 mg, 75% de rendimiento). ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7.85 (m, 1H), 7.52 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.06 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 4.73 (s, 2H), 2.88 (m, 1H), 1.57 (s, 9H), 1.30 (m, 6H).

Ácido 5-(Hidroximetil)-2-(isobutiriloxi)benzoico (4)

Una solución del compuesto 3 (400 mg, 1.38 mmol) en TFA/DCM (v/v, 3 mL/12 mL) se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla se vertió en agua y la solución acuosa se llevó a pH = 3-4. Las dos fases se separaron y la fase orgánica se secó sobre MgSO₄ anhidro y se concentró para dar lugar al compuesto 4 (202 mg, 62% de rendimiento), el cual se utilizó en el próximo paso sin purificación adicional.

Isobutirato de 4-(Hidroximetil)-2-(prop-2-inilcarbamoil)fenilo (5)

A una solución del compuesto 4 (202 mg, 0.85 mmol) en DCM (20 mL) se agregó DIPEA (219.3 mg, 1.7 mmol), HATU (969 mg, 2.55 mmol) y prop-2-in-1-amina (93.5 mg, 1.7 mmol) a 0°C. La mezcla de reacción se agitó durante 30 min. Un exceso de solvente se concentró y el residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en columna de gel de sílice (éter de petróleo/EtOAc = 5:1) para dar lugar al compuesto 5 (130 mg, 60% de rendimiento); ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7.83 (m, 1H), 7.52 (m, 1H), 7.10 (m, 1H), 4.65 (s, 2H), 4.24 (m, 2H), 2.87 (m, 1H), 2.30 (m, 1H), 1.26 (m, 6H).

Isobutirato de 4-(bromometil)-2-(prop-2-inilcarbamoil)fenilo (6)

A una solución del compuesto 5 (130 mg, 0.5 mmol) en DCM (15 mL) se agregó PPh₃ (170.3 mg, 0.65 mmol) y NBS (105.6 mg, 0.6 mmol) a 0°C. La mezcla de reacción se agitó durante 30 min y el solvente se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en columna de gel de sílice (éter de petróleo/EtOAc = 10:1) para dar lugar al compuesto 6 (50 mg, 32% de rendimiento). ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7.88 (m, 1H), 7.37 (m, 1H), 7.11 (m, 1H), 4.51 (s, 2H), 4.23 (m, 2H), 2.87 (m, 1H), 2.31 (m, 1H), 1.37 (m, 6H).

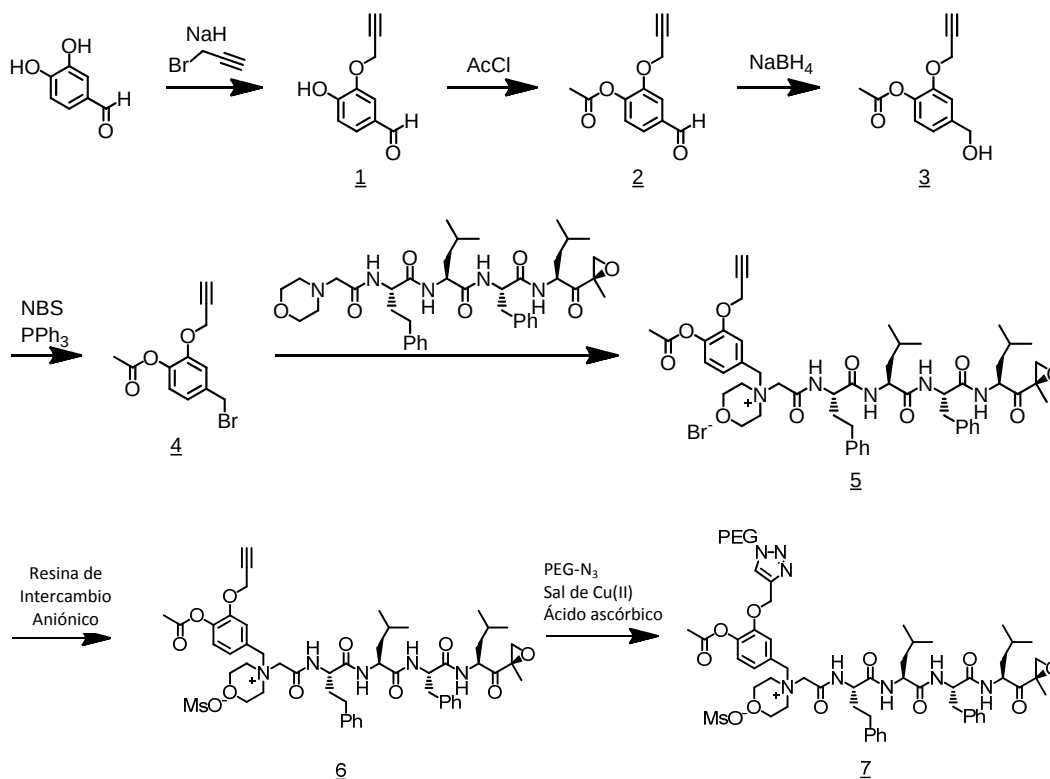
Bromuro de 4-((4S,7S,10S,13S)-10-bencil-7-isobutil-15-metil-13-((R)-2-metiloxiran-2-carbonil)-2,5,8,11-tetraoxo-4-fenil-3,6,9,12-tetraazahexadecil)-4-(4-(isobutiriloxi)-3-(prop-2-in-1-ilcarbamoil)bencil)morfolin-4-io (8)

A una solución del compuesto 6 (360 mg, 1.1 mmol) en MeCN (4 mL) se agregó (S)-4-metil-N-((S)-1-(((S)-4-metil-1-((R)-2-metiloxiran-2-il)-1-oxopentan-2-il)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-

il)-2-((S)-2-(2-morfolinoacetamido)-4-fenilbutanamido)pentanamida (720 mg, 1.0 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 45°C durante la noche. El solvente se concentró y el residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en columna de gel de sílice (EtOAc/MeOH = 50:1) para dar lugar al producto deseado 7, el cual luego se convirtió en el correspondiente mesilato (150 mg, 15% de rendimiento) mediante el tratamiento con resina de intercambio iónico; ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 9.61 (m, 1H), 7.90 (m, 1H), 7.64 (m, 2H), 7.34-7.10 (m, 12H), 6.92 (m, 1H), 6.68 (m, 1H), 5.03 (m, 2H), 4.86 (m, 1H), 4.58-4.32 (m, 4H), 4.28-4.10 (m, 5H), 3.96 (m, 4H), 3.47-3.31 (m, 2H), 3.18 (m, 1H), 3.06-2.87 (m, 2H), 2.83 (s, 3H), 2.76 (m, 2H), 2.26 (m, 1H), 2.23-2.04 (m, 3H), 1.66-1.58 (m, 2H), 1.42 (m, 4H), 1.38-1.30 (m, 6H), 1.27 (m, 4H), 0.90-0.84 (m, 12H).

El compuesto carfilzomib pegilado del Ejemplo 4 se preparó a partir del compuesto 8 y PEG_{5K}N₃, siguiendo el procedimiento de pegilación general A.

Ejemplo 5: Metansulfonato de 4-(4-acetoxi-3-((1-PEG_{5K}-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)bencil)-4-((4S,7S,10S,13S)-10-bencil-7-isobutil-15-metil-13-((R)-2-metiloxiran-2-carbonil)-2,5,8,11-tetraoxo-4-fenetil-3,6,9,12-tetraazahexadecil)morfolin-4-io (7)



4-Hidroxi-3-(prop-2-iniloxi)benzaldehído (1)

A una mezcla de NaH en DMSO (300 mL) se agregó 3,4-dihidroxibenzaldehído (30 g, 217.39 mmol) en DMSO (50 mL) a 20°C. La mezcla se agitó durante 30 min y se agregó 3-bromoprop-1-ino (25.87 g, 217.39 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante una hora. La mezcla se vertió en hielo - agua (800 mL) y la solución obtenida se llevó a pH = 2. La mezcla se extrajo con EtOAc (500 mL×3), se secó sobre MgSO₄ anhidro, y se concentró. El residuo se cristalizó varias veces a partir de DCM/éter de petróleo (30 mL/500 mL) para dar lugar al compuesto 1 (30 g, 78% de rendimiento); ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz): δ 9.87 (s, 1H), 7.54 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 7.49 (dd, *J*₁ = 1.5 Hz, *J*₂ = 8.1 Hz, 1H), 7.09 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 4.82 (m, 2H), 2.62 (m, 1H).

Acetato de 4-formil-2-(prop-2-iniloxi)fenilo (2)

A una solución del compuesto 1 (10.00 g, 56.82 mmol) en DCM (150 mL) se agregó Et₃N (11.48 g, 113.64 mmol) seguido de cloruro de acetilo (5.35 g, 68.18 mmol) a 0°C. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla se lavó con solución acuosa saturada de HCl 2 N (100 mL) y agua (50 mL), se secó sobre MgSO₄ anhidro, y se concentró para dar lugar al compuesto 2 (12 g, 97% de rendimiento), el cual se utilizó en el próximo paso sin purificación adicional; ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ 9.96 (s, 1H), 7.63 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H), 7.54 (dd, *J*₁ = 1.6 Hz, *J*₂ = 8.0 Hz, 1H), 7.25 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 4.79 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H), 2.57 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H), 2.35 (s, 3H).

Acetato de 4-(Hidroximetil)-2-(prop-2-iniloxi)fenilo (3)

A una solución del compuesto 2 (12.00 g, 55.05 mmol) en DCM/MeOH (150 mL/15 mL) se agregó NaBH₄ (3.06 g, 82.57 mmol) en pequeñas porciones a 0°C. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. La mezcla se diluyó con acetona (5 mL), y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en columna de gel de sílice (éter de petróleo/EtOAc = 2:1) para dar lugar al compuesto 3 (10.32 g, 85% de rendimiento); ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.16 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H), 7.04 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.98 (dd, *J*₁ = 1.6 Hz, *J*₂ = 8.0 Hz, 1H), 4.72 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H), 4.69 (s, 2H), 2.53 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H), 2.32 (s, 3H).

Acetato de 4-(bromometil)-2-(prop-2-iniloxi)fenilo (4)

A una solución del compuesto 3 (11.50 g, 52.27 mmol) en DCM (150 mL) se agregó PPh₃ (20.50 g, 78.41 mmol) y NBS (11.04 g, 62.73 mmol) a 0°C. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 0.5 hora. Un exceso de solvente se concentró y el residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en columna de gel de sílice (éter de petróleo/EtOAc = 20:1)

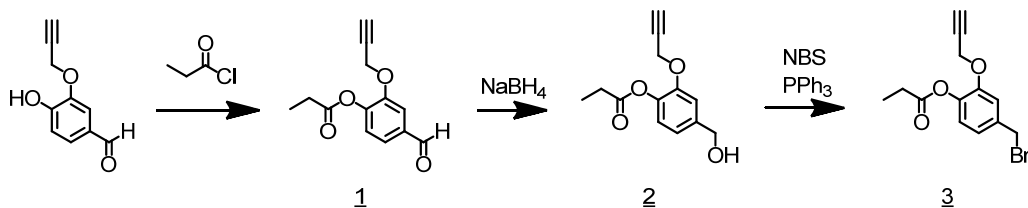
para dar lugar al compuesto 4 (7.82 g, 53% de rendimiento); $^1\text{H RMN}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.14 (m, 1H), 7.02 (m, 2H), 4.73 (d, $J = 2.4$ Hz, 2H), 4.48 (s, 2H), 2.55 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H), 2.32 (s, 3H).

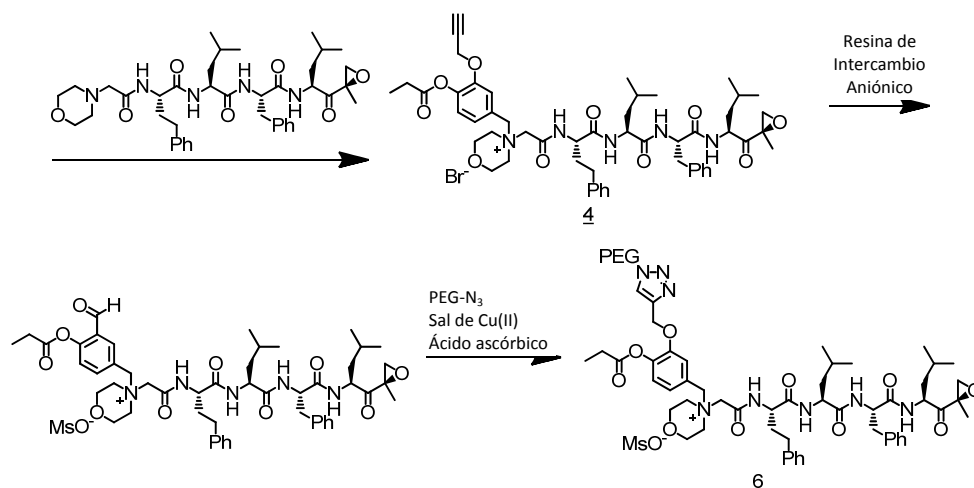
Metansulfonato de 4-(4-acetoxi-3-(prop-2-in-1-iloxi)bencil)-4-((4S,7S,10S,13S)-10-bencil-7-isobutil-15-metil-13-((R)-2-metiloxiran-2-carbonil)-2,5,8,11-tetraoxo-4-fenetil-3,6,9,12-tetraazahexadecil)morfolin-4-io (6)

A una solución del compuesto 4 (5.85 g, 20.67 mmol) en MeCN (50 mL) se agregó (S)-4-metil-N-((S)-1-(((S)-4-metil-1-((R)-2-metiloxiran-2-il)-1-oxopentan-2-il)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)-2-((S)-2-(2-morfolinoacetamido)-4-fenilbutanamido)pentanamida (4.96 g, 6.89 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 45°C durante 2 días. Un exceso de solvente se concentró y el residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en columna de gel de sílice ($\text{EtOAc/MeOH} = 100:6$) para dar lugar al compuesto deseado 5, el cual se convirtió en el correspondiente mesilato (3.2 g, 50% de rendimiento) mediante el tratamiento con resina de intercambio iónico; $^1\text{H RMN}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 9.66 (m, 1H), 7.83 (m, 1H), 7.36 (m, 1H), 7.26-7.14 (m, 13H), 6.72 (m, 1H), 5.18 (m, 1H), 4.90 (m, 2H), 4.77 (m, 2H), 4.53-4.36 (m, 4H), 4.26 (m, 3H), 4.08 (m, 1H), 3.92 (m, 2H), 3.74 (m, 1H), 3.46 (m, 1H), 3.35 (m, 1H), 3.13 (m, 1H), 3.04 (m, 2H), 2.81 (s, 3H), 2.75 (m, 2H), 2.62 (m, 1H), 2.33 (m, 3H), 2.20 (m, 1H), 2.12 (m, 1H), 1.70-1.53 (m, 3H), 1.50-1.33 (m, 5H), 1.25 (m, 2H), 0.90-0.81 (m, 12H).

El compuesto carfilzomib pegilado del Ejemplo 5 se preparó a partir del compuesto 6 y $\text{PEG}_{5K}\text{N}_3$, siguiendo el procedimiento de pegilación general A.

Ejemplo 6: Metansulfonato de 4-((4S,7S,10S,13S)-10-bencil-7-isobutil-15-metil-13-((R)-2-metiloxiran-2-carbonil)-2,5,8,11-tetraoxo-4-fenetil-3,6,9,12-tetraazahexadecil)-4-(3-((1-PEG_{5K}-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)-4-(propioniloxi)bencil)morfolin-4-io (6)





Propionato de 4-formil-2-(prop-2-in-1-iloxi)fenilo (1)

A una solución de 4-hidroxi-3-(prop-2-iniloxi)benzaldehído (2.64 g, 15 mmol) en DCM (30 mL) se agregó TEA (3 g, 30 mmol) y cloruro de propionilo (1.67 g, 18 mmol) a 0°C. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante una hora. Dicha mezcla se diluyó con agua (50 mL) y la fase de DCM se recolectó, se secó sobre MgSO₄ anhidro, y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en columna de gel de sílice (éter de petróleo/EtOAc = 10:1) para dar lugar al compuesto 1 (2.4 g, 85% de rendimiento); ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 9.97 (s, 1H), 7.64 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 7.55 (d, *J*₁ = 1.5 Hz, *J*₂ = 7.8 Hz, 1H), 7.26 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 4.79 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 2.68 (q, *J* = 7.5 Hz, 2H), 2.58 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H), 1.31 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H).

Propionato de 4-(Hidroximetil)-2-(prop-2-iniloxi)fenilo (2)

A una solución del compuesto 1 (2.32 g, 0.01 mol) en THF (30 mL) se agregó NaBH₄ (570 mg, 0.015 mol) a 0°C en pequeñas proporciones. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas y luego se diluyó con solución saturada de NH₄Cl (15 mL). La fase orgánica se recolectó y la fase acuosa se extrajo con DCM (20 mL×3). Las fases orgánicas se combinaron, se secaron sobre MgSO₄ anhidro, y se concentraron. El residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en columna de gel de sílice (éter de petróleo/EtOAc = 2:1) para dar lugar al compuesto 2 (1.7 g, 73% de rendimiento); ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 7.12-6.95 (m, 3H), 4.68 (m, 2H), 4.62 (m, 2H), 2.63 (m, 2H), 2.53 (m, 1H), 1.27 (m, 3H).

Propionato de 4-(bromometil)-2-(prop-2-iniloxi)fenilo (3)

A una solución del compuesto 2 (1.7 g, 7.26 mmol) en DCM (30 mL) se agregó PPh₃ (2.28 g, 8.7 mmol) y DIPEA (1.12 g, 8.7 mmol) en forma secuencial. La mezcla se enfrió hasta 0°C y NBS

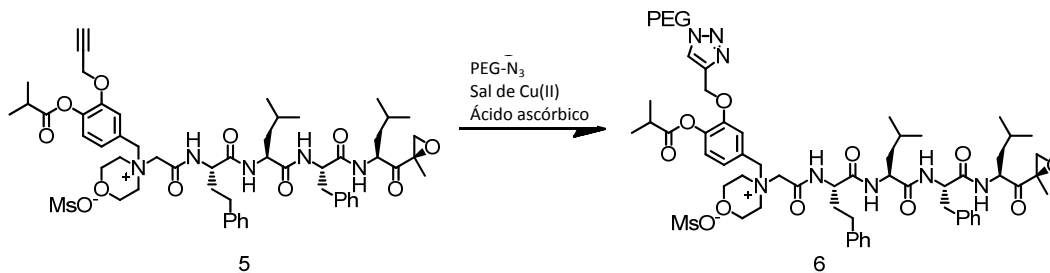
(1.4 g, 7.78 mmol) se agregó en pequeñas proporciones. La mezcla de reacción se agitó a la misma temperatura durante 20 min. Un exceso de solvente se concentró y el residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en columna de gel de sílice (éter de petróleo/EtOAc = 10:1) para dar lugar al compuesto 3 (400 mg, 19% de rendimiento).

Metansulfonato de 4-((4S,7S,10S,13S)-10-bencil-7-isobutil-15-metil-13-((R)-2-metiloxiran-2-carbonil)-2,5,8,11-tetraoxo-4-fenetil-3,6,9,12-tetraazahexadecil)-4-(3-(prop-2-in-1-iloxi)-4-(propioniloxi)bencil)morfolin-4-io (5)

A una solución del compuesto 3 (400 mg, 1.34 mmol) en MeCN (5 mL) se agregó el compuesto (S)-4-metil-N-((S)-1-(((S)-4-metil-1-((R)-2-metiloxiran-2-il)-1-oxopentan-2-il)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)-2-((S)-2-(2-morfolinoacetamido)-4-fenilbutanamido)pentanamida (484.8 mg, 0.67 mmol). La mezcla de reacción se calentó a 45°C durante la noche. Un exceso de solvente se concentró y el residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en columna de gel de sílice para dar lugar al compuesto deseado 4 (380 mg, 48% de rendimiento), el cual se convirtió en el correspondiente mesilato (370 mg, cuantitativo) mediante el tratamiento con resina de intercambio iónico; ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 9.63 (m, 1H), 7.82 (m, 1H), 7.35-7.09 (m, 13H), 6.91 (m, 1H), 6.52 (m, 1H), 5.13 (m, 1H), 5.02-4.82 (m, 5H), 4.72 (m, 2H), 4.50-3.83 (m, 11H), 3.52-3.31 (m, 2H), 3.18-2.58 (m, 11H), 1.68-1.18 (m, 9H), 0.88 (m, 12H).

El compuesto carfilzomib pegilado del Ejemplo 6 se preparó a partir del compuesto 5 y PEG_{5K}N₃, siguiendo el procedimiento de pegilación general A.

Ejemplo 7: Metansulfonato de 4-((4S,7S,10S,13S)-10-bencil-7-isobutil-15-metil-13-((R)-2-metiloxiran-2-carbonil)-2,5,8,11-tetraoxo-4-fenetil-3,6,9,12-tetraazahexadecil)-4-(4-(isobutiriloxi)-3-((1-PEG_{5K}-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)bencil)morfolin-4-io (6)

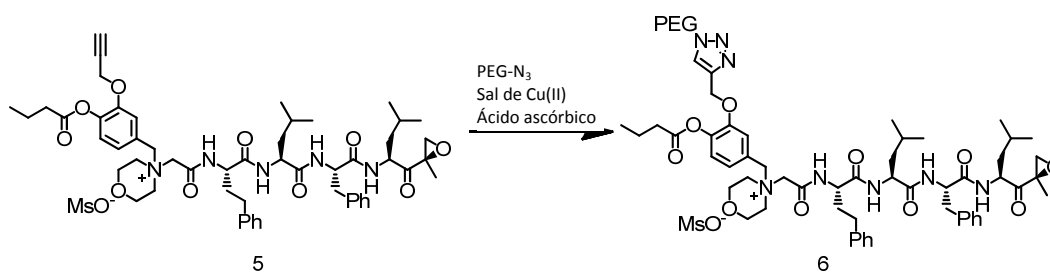


Metansulfonato de 4-((4S,7S,10S,13S)-10-bencil-7-isobutil-15-metil-13-((R)-2-metiloxiran-2-carbonil)-2,5,8,11-tetraoxo-4-fenetil-3,6,9,12-tetraazahexadecil)-4-(4-(isobutiriloxi)-3-(prop-2-in-1-iloxi)bencil)morfolin-4-io (5)

A una solución del compuesto 3 (0.5 g, 1.6 mmol) en MeCN (9 mL) se agregó (S)-4-metil-N-((S)-1-(((S)-4-metil-1-((R)-2-metiloxiran-2-il)-1-oxopentan-2-il)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)-2-(((S)-2-(2-morfolinoacetamido)-4-fenilbutanamido)pentanamida (864 mg, 1.2 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 45°C durante 20 horas. El solvente se concentró y el residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en columna de gel de sílice (EtOAc/MeOH = 100:6) para dar lugar al compuesto deseado 4, el cual luego se convirtió en el correspondiente mesilato (500 mg, 44% de rendimiento) mediante el tratamiento con resina de intercambio iónico; $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 9.67 (m, 1H), 7.82 (m, 1H), 7.27 (m, 16H), 6.85 (m, 1H), 6.47 (m, 1H), 5.13 (m, 1H), 5.02 (m, 1H), 4.85 (m, 1H), 4.70 (m, 2H), 4.45 (m, 2H), 4.37 (m, 2H), 4.23 (m, 4H), 3.92 (m, 2H), 3.84 (m, 1H), 3.46 (m, 1H), 3.35 (m, 1H), 3.15 (m, 1H), 3.03 (m, 1H), 2.92 (m, 1H), 2.80 (s, 3H), 2.73 (m, 2H), 2.58 (m, 1H), 2.20 (m, 1H), 2.12 (m, 1H), 1.70 (m, 1H), 1.62 (m, 3H), 1.43 (m, 4H), 1.28 (m, 6H), 1.21 (m, 3H), 0.85 (m, 12H).

El Ejemplo 7 se preparó utilizando métodos análogos a los descritos en el Ejemplos 3 y 5, donde los compuestos intermedios se prepararon de una forma similar, y el compuesto 5 y $\text{PEG}_{5K}\text{N}_3$ se hicieron reaccionar, siguiendo el procedimiento de pegilación general A.

Ejemplo 8: Metansulfonato de 4-((4S,7S,10S,13S)-10-bencil-7-isobutil-15-metil-13-((R)-2-metiloxiran-2-carbonil)-2,5,8,11-tetraoxo-4-fenetil-3,6,9,12-tetraazahexadecil)-4-(4-(butiriloxi)-3-((1-PEG_{5K}-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)bencil)morfolin-4-io (6)



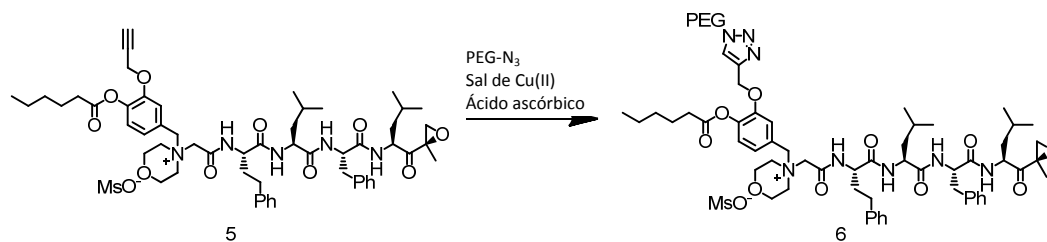
Metansulfonato de 4-((4S,7S,10S,13S)-10-bencil-7-isobutil-15-metil-13-((R)-2-metiloxiran-2-carbonil)-2,5,8,11-tetraoxo-4-fenetil-3,6,9,12-tetraazahexadecil)-4-(4-(butiriloxi)-3-(prop-2-in-1-iloxi)bencil)morfolin-4-io (5)

A una solución del compuesto 3 (0.7 g, 2.25 mmol) en MeCN (8 mL) se agregó (S)-4-metil-N-((S)-1-(((S)-4-metil-1-((R)-2-metiloxiran-2-il)-1-oxopentan-2-il)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)-2-(((S)-2-(2-morfolinoacetamido)-4-fenilbutanamido)pentanamida (0.8 g, 1.125 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 45°C durante la noche. Un exceso de solvente se concentró y el residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en columna de gel de sílice (EtOAc/MeOH

= 100/3) para dar lugar al compuesto deseado 4 (500 mg, 23.3% de rendimiento), el cual se convirtió en el correspondiente mesilato (460 mg, 92% de rendimiento) mediante el tratamiento con resina de intercambio iónico; $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 9.73 (m, 1H), 7.76 (m, 1H), 7.33-7.10 (m, 13H), 6.91 (m, 1H), 6.52 (m, 1H), 5.18 (m, 1H), 5.08-4.85 (m, 2H), 4.72 (m, 2H), 4.50-3.78 (m, 11H), 3.52-3.31 (m, 2H), 3.18-2.58 (m, 11H), 2.18 (m, 2H), 1.68-1.24 (m, 12H), 0.84 (m, 12H).

El Ejemplo 8 se preparó utilizando métodos análogos a los descritos en el Ejemplo 3, donde los compuestos intermedios se prepararon de una forma similar (utilizando cloruro de propanoilo para generar el compuesto intermedio 1 que se muestra en el Ejemplo 3), usando el compuesto 5 y $\text{PEG}_{5\text{K}}\text{N}_3$ se hicieron reaccionar, siguiendo el procedimiento de pegilación general A.

Ejemplo 9: Metansulfonato de 4-((4S,7S,10S,13S)-10-bencil-7-isobutil-15-metil-13-((R)-2-metiloxiran-2-carbonil)-2,5,8,11-tetraoxo-4-fenetil-3,6,9,12-tetraazahexadecil)-4-(4-(hexanoiloxi)-3-((1-PEG_{5K}-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)bencil)morfolin-4-io (6)

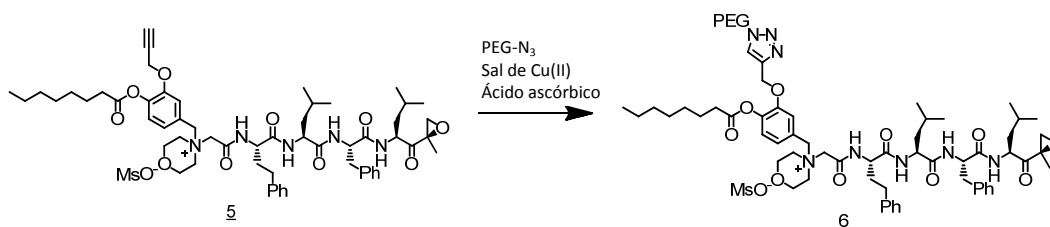


Metansulfonato de 4-((4S,7S,10S,13S)-10-bencil-7-isobutil-15-metil-13-((R)-2-metiloxiran-2-carbonil)-2,5,8,11-tetraoxo-4-fenetil-3,6,9,12-tetraazahexadecil)-4-(4-(hexanoiloxi)-3-(prop-2-in-1-iloxi)bencil)morfolin-4-io (5)

A una solución del compuesto 3 (1.41 g, 4.16 mmol) en MeCN (25 mL) se agregó (S)-4-metil-N-((S)-1-(((S)-4-metil-1-((R)-2-metiloxiran-2-il)-1-oxopentan-2-il)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)-2-((S)-2-(2-morfolinoacetamido)-4-fenilbutanamido)pentanamida (1.0 g, 1.39 mmol). La mezcla de reacción se calentó a 40-45°C durante la noche. Un exceso de solvente se concentró y el residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en columna de gel de sílice ($\text{EtOAc/MeOH} = 20:1$) para dar lugar al compuesto deseado 4, el cual se convirtió en la sal de mesilato (570 mg, 41% de rendimiento) mediante el tratamiento con resina de intercambio iónico; $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 9.72 (m, 1H), 7.82 (m, 1H), 7.34-7.15 (m, 12H), 7.10 (m, 1H), 6.82 (m, 1H), 6.43 (m, 1H), 5.15 (m, 1H), 4.98 (m, 1H), 4.76 (m, 2H), 4.46 (m, 2H), 4.38 (m, 2H), 4.25 (m, 3H), 4.12 (m, 1H), 4.01 (m, 2H), 3.85 (m, 2H), 3.47 (m, 1H), 3.36 (m, 1H), 3.15 (m, 1H), 3.01 (m, 2H), 2.80 (s, 3H), 2.72 (m, 2H), 2.60 (m, 2H), 2.51 (m, 1H), 2.35-2.14 (m, 4H), 1.76 (m, 2H), 1.55 (m, 2H), 1.48 (m, 4H), 1.37 (m, 6H), 1.23 (m, 3H), 0.86 (m, 12 H).

El Ejemplo 9 se preparó utilizando métodos análogos a los descritos en el Ejemplo 3, donde los compuestos intermedios se prepararon de una forma similar (utilizando cloruro de pentanoilo para generar el compuesto intermedio 1 que se muestra en el Ejemplo 3), usando el compuesto 5 y PEG_{5K}N₃ se hicieron reaccionar, siguiendo el procedimiento de pegilación general A.

Ejemplo 10: Metansulfonato de 4-((4S,7S,10S,13S)-10-bencil-7-isobutil-15-metil-13-((R)-2-metiloxiran-2-carbonil)-2,5,8,11-tetraoxo-4-fenetil-3,6,9,12-tetraazahexadecil)-4-(3-((1-PEG_{5K}-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)-4-(octanoiloxi)bencil)morfolin-4-io (6)

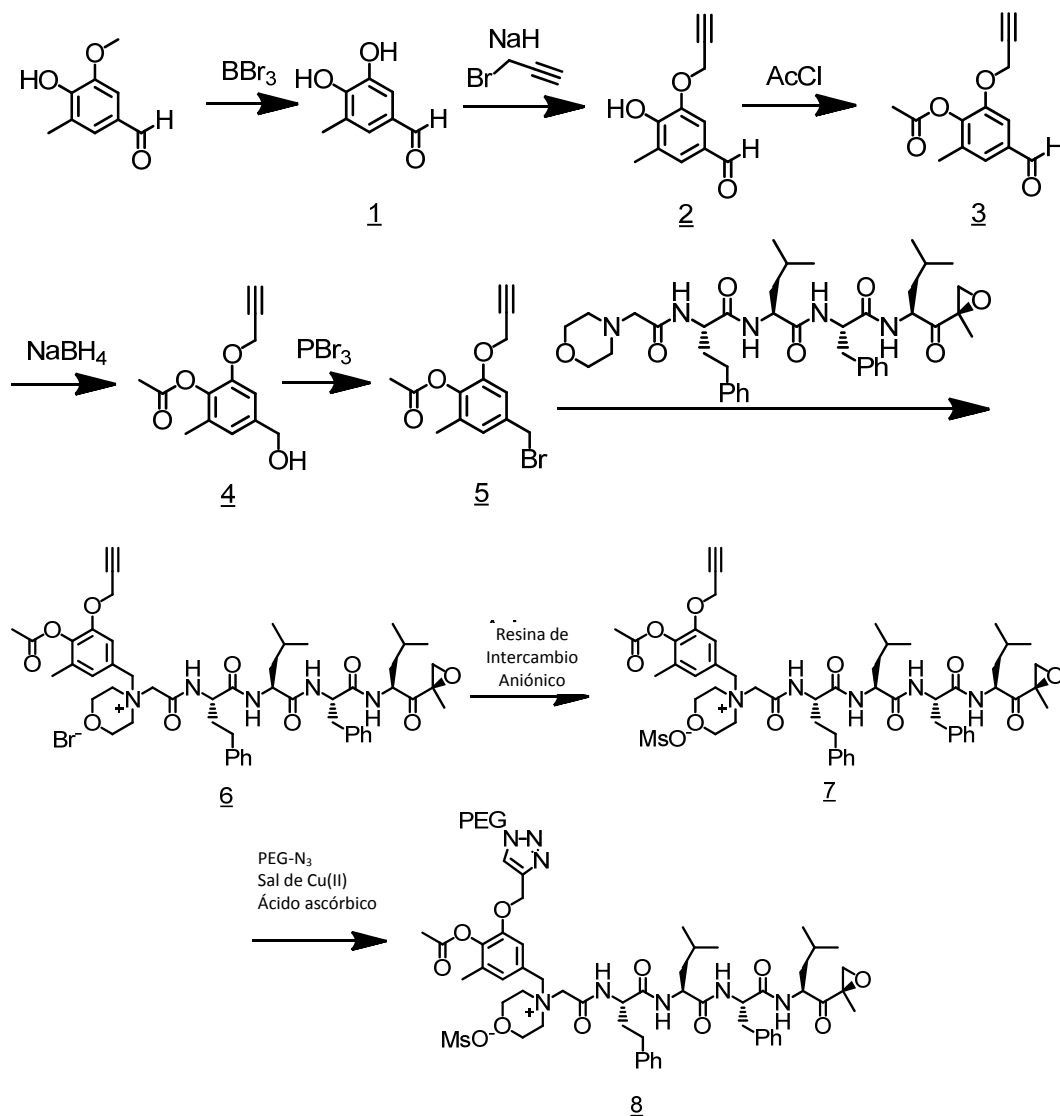


El Ejemplo 10 se preparó utilizando métodos análogos a los descritos en el Ejemplo 3, donde los compuestos intermedios se prepararon de una forma similar (utilizando cloruro de heptanoilo y trimetilamina para generar el compuesto intermedio aldehído 1 que se muestra en el Ejemplo. 3), usando el compuesto 5 y PEG_{5K}N₃ se hicieron reaccionar, siguiendo el procedimiento de pegilación general A.

Metansulfonato de 4-((4S,7S,10S,13S)-10-bencil-7-isobutil-15-metil-13-((R)-2-metiloxiran-2-carbonil)-2,5,8,11-tetraoxo-4-fenetil-3,6,9,12-tetraazahexadecil)-4-(4-(octanoiloxi)-3-(prop-2-in-1-iloxi)bencil)morfolin-4-io (5)

A una solución del compuesto 3 (1.53 g, 4.17 mmol) en MeCN (25 mL) se agregó (S)-4-metil-N-((S)-1-(((S)-4-metil-1-((R)-2-metiloxiran-2-il)-1-oxopentan-2-il)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)-2-((S)-2-(2-morfolinoacetamido)-4-fenilbutanamido)pentanamida (1.00 g, 1.39 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 40-45°C durante la noche. El solvente se concentró y el residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en columna de gel de sílice (EtOAc/MeOH = 100:5) para dar lugar al compuesto deseado 4, el cual luego se convirtió en el correspondiente mesilato (620 mg, 44% de rendimiento) mediante el tratamiento con resina de intercambio iónico; ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 9.69 (m, 1H), 7.82 (m, 1H), 7.34-7.15 (m, 12H), 7.10 (m, 1H), 6.88 (m, 1H), 6.51 (m, 1H), 5.15 (m, 1H), 4.98 (m, 1H), 4.88 (m, 1H), 4.74 (m, 2H), 4.46 (m, 2H), 4.38 (m, 2H), 4.25 (m, 4H), 4.02 (m, 2H), 3.85 (m, 1H), 3.47 (m, 1H), 3.36 (m, 1H), 3.15 (m, 1H), 3.01 (m, 2H), 2.83 (s, 3H), 2.72 (m, 2H), 2.60 (m, 3H), 2.35-2.14 (m, 3H), 1.76 (m, 2H), 1.55 (m, 2H), 1.48-1.23 (15H), 0.92-0.78 (12 H).

Ejemplo 11: Metansulfonato de 4-(4-acetoxi-3-metil-5-((1-PEG_{5K}-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)bencil)-4-((4S,7S,10S,13S)-10-bencil-7-isobutil-15-metil-13-((R)-2-metiloxiran-2-carbonil)-2,5,8,11-tetraoxo-4-fenetil-3,6,9,12-tetraazahexadecil)morfolin-4-io (8)



3,4-Dihidroxi-5-metilbenzaldehído (1)

A una solución del compuesto 4-hidroxi-3-metoxi-5-metil-benzaldehído (2.00 g, 12.04 mmol) en DCM (100 mL) se agregó BBr₃ (3.02 g, 12.04 mmol) a -78°C. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla se diluyó con solución saturada de NH₄Cl (100 mL) a -20°C. Las dos fases se separaron y la solución acuosa se extrajo con EtOAc (50 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO₄ anhidro y se concentraron. El residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en columna de gel de sílice (éter de petróleo/EtOAc =

10:1) para dar lugar al compuesto 1 (1.56 g, 85% de rendimiento); $^1\text{H RMN}$ (300 MHz, DMSO-*d*6): δ 9.94 (s, 1H), 9.69 (s, 1H), 9.47 (s, 1H), 7.21 (s, 1H), 7.15 (s, 1H), 2.02 (s, 3H).

4-Hidroxil-3-metil-5-(prop-2-iniloxi)benzaldehído (2)

A una mezcla de NaH (489.12 mg, 20.38 mmol) en DMSO (30 mL) se agregó compuesto 1 (1.55 g, 10.19 mmol) en DMSO (10 mL) a 0°C. La mezcla se agitó durante 30 min y luego 3-bromoprop-1-ino (1.21 g, 10.19 mmol) se agregó a la misma temperatura. La mezcla de reacción se agitó durante 30 min y se diluyó con agua (100 mL). La solución obtenida se llevó a pH = 4-5 y se extrajo con EtOAc (400 mL×3). Las fases de EtOAc combinadas se lavaron con salmuera (50 mL), se secaron sobre MgSO₄ anhidro y se concentraron. El residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en columna de gel de sílice (éter de petróleo/EtOAc = 10:1) para dar lugar al compuesto 2 (1.7 g, 88% de rendimiento); $^1\text{H RMN}$ (300 MHz, DMSO-*d*6): δ 9.84 (s, 1H), 9.77 (s, 1H), 7.42 (m, 2H), 4.94 (d, J = 2.1 Hz, 2H), 3.65 (m, 1H), 2.22 (s, 3H).

Acetato de 4-formil-2-metil-6-(prop-2-iniloxi)fenilo (3)

A una solución del compuesto 2 (1.60 g, 8.41 mmol) en DCM se agregó piridina (2.00 g, 25.23 mmol) seguido de cloruro de acetilo (1.32 g, 16.82 mmol) gota a gota a 0°C. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora y luego se agregó agua (100 mL). Las dos fases se separaron y la fase orgánica se lavó con HCl diluido (1 N, 50 mL), se secó sobre MgSO₄ anhidro y se concentró para dar lugar al compuesto 3 (2.0 g, cuantitativo), el cual se utilizó en el próximo paso sin purificación adicional; $^1\text{H RMN}$ (300 MHz, DMSO-*d*6): δ 9.95 (s, 1H), 7.56 (m, 2H), 4.96 (m, 2H), 3.67 (m, 1H), 2.36 (m, 3H), 2.23 (s, 3H).

Acetato de 4-(Hidroximetil)-2-metil-6-(prop-2-iniloxi)fenilo (4)

A una solución del compuesto 3 (2.00 g, 8.61 mmol) en THF (50 mL) se agregó NaBH₄ (325.80 mg, 8.61 mmol) en pequeñas porciones a 0°C. La mezcla de reacción se agitó a la misma temperatura durante 1 hora y luego se diluyó con agua (1 mL). La mezcla se diluyó con DCM (100 mL), se secó directamente sobre MgSO₄ anhidro y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en columna de gel de sílice (éter de petróleo/EtOAc = 5:1) para dar lugar al compuesto 4 (1.5 g, 74% de rendimiento); $^1\text{H RMN}$ (300 MHz, DMSO-*d*6): δ 7.00 (s, 1H), 6.86 (s, 1H), 5.26 (m, 1H), 4.78 (d, J = 2.4 Hz, 2H), 4.47 (m, 2H), 3.61 (m, 1H), 2.31 (s, 3H), 2.11 (s, 3H).

Acetato de 4-(bromometil)-2-metil-6-(prop-2-iniloxi)fenilo (5)

A una solución del compuesto 4 (1.50 g, 6.46 mmol) en DCM (50 mL) se agregó PBr₃ (1.75 g, 6.46 mmol) a 0°C. La mezcla de reacción se agitó durante 30 min y luego se diluyó con agua (50

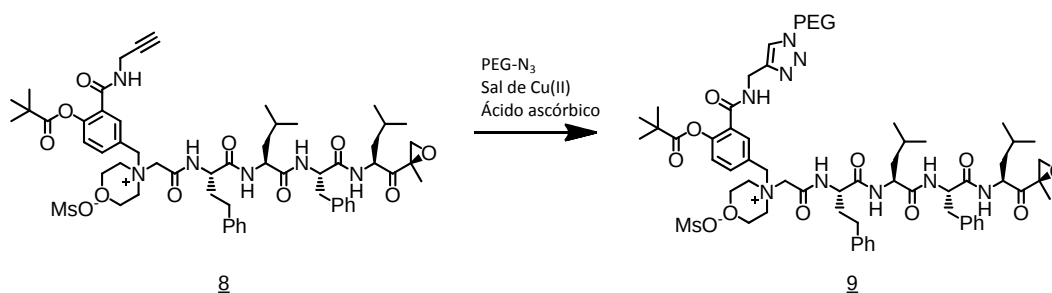
mL). Las dos fases se separaron y la fase orgánica se secó sobre MgSO_4 anhidro y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en columna de gel de sílice (éter de petróleo/EtOAc = 30:1) para dar lugar al compuesto 5 (750 mg, 39% de rendimiento); $^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 7.00 (s, 1H), 6.94 (s, 1H), 4.73 (d, J = 2.4 Hz, 2H), 4.47 (s, 2H), 2.57 (m, 1H), 2.37 (s, 3H), 2.19 (s, 3H).

Metansulfonato de 4-(4-acetoxi-3-metil-5-(prop-2-in-1-iloxi)bencil)-4-((4S,7S,10S,13S)-10-bencil-7-isobutil-15-metil-13-((R)-2-metiloxiran-2-carbonil)-2,5,8,11-tetraoxo-4-fenil-3,6,9,12-tetraazahexadecil)morfolin-4-io (7)

A una solución del compuesto 5 (351.25 mg, 1.19 mmol) en MeCN (5 mL) se agregó (S)-4-metil-N-((S)-1-(((S)-4-metil-1-((R)-2-metiloxiran-2-il)-1-oxopentan-2-il)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)-2-((S)-2-(2-morfolinoacetamido)-4-fenilbutanamido)pentanamida (428.35 mg, 595.00 μmol). La mezcla de reacción se agitó a 40-45°C durante la noche. Un exceso de solvente se concentró y el residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en columna de gel de sílice (EtOAc/MeOH = 100:1) para dar lugar al compuesto deseado 6, el cual se convirtió en el correspondiente mesilato (280 mg, 50% de rendimiento) mediante el tratamiento con resina de intercambio iónico; $^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 9.68 (m, 1H), 7.82 (m, 1H), 7.26 (m, 11H), 7.00 (m, 2H), 6.60 (m, 1H), 5.17 (m, 1H), 5.08 (m, 1H), 4.78 (m, 3H), 4.46 (m, 4H), 4.22 (m, 4H), 4.01 (m, 2H), 3.80 (m, 2H), 3.45 (m, 2H), 3.18 (m, 1H), 3.05 (m, 2H), 2.80 (s, 3H), 2.73 (m, 2H), 2.60 (m, 1H), 2.43 (m, 3H), 2.20 (m, 3H), 1.58 (m, 2H), 1.46 (m, 6H), 1.32 (m, 3H), 0.88 (m, 12H).

El Ejemplo 11 se preparó a partir del compuesto 7 y $\text{PEG}_{5K}\text{N}_3$ se hicieron reaccionar, siguiendo el procedimiento de pegilación general A.

Ejemplo 12: Metansulfonato de 4-((4S,7S,10S,13S)-10-bencil-7-isobutil-15-metil-13-((R)-2-metiloxiran-2-carbonil)-2,5,8,11-tetraoxo-4-fenil-3,6,9,12-tetraazahexadecil)-4-(3-(((1-PEG_{5K}-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)carbamoil)-4-(pivaloiloxi)bencil)morfolin-4-io (9)

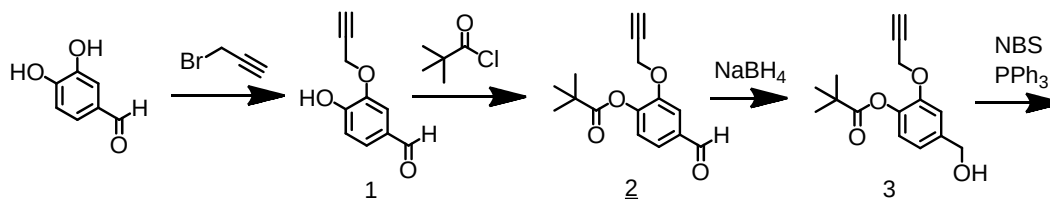


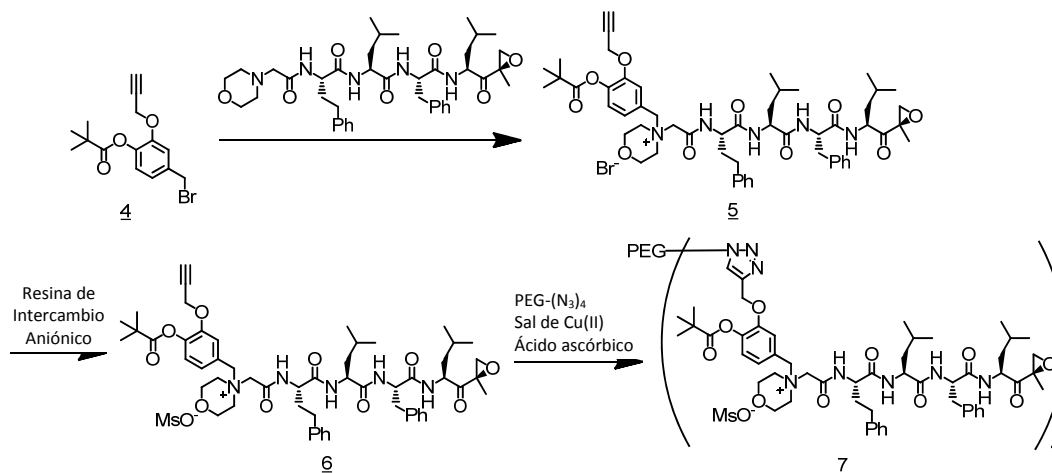
Metansulfonato de 4-((4S,7S,10S,13S)-10-bencil-7-isobutil-15-metil-13-((R)-2-metiloxiran-2-carbonil)-2,5,8,11-tetraoxo-4-fenetil-3,6,9,12-tetraazahexadecil)-4-(4-(pivaloiloxi)-3-(prop-2-in-1-ilcarbamoil)bencil)morfolin-4-io (8)

A una solución del compuesto 6 (400 mg, 1.1 mmol) en MeCN (10 mL) se agregó (S)-4-metil-N-((S)-1-(((S)-4-metil-1-((R)-2-metiloxiran-2-il)-1-oxopentan-2-il)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)-2-((S)-2-(2-morfolinoacetamido)-4-fenilbutanamido)pentanamida (720 mg, 0.1 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 45°C durante la noche. Un exceso de solvente se concentró y el residuo se cristalizó varias veces a partir de MeCN/Et₂O (v/v, 1/5) para dar lugar al compuesto deseado 7, el cual se convirtió en el correspondiente mesilato (120 mg, 11.2% de rendimiento) mediante el tratamiento con resina de intercambio iónico; ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 9.63 (m, 1H), 7.82-7.55 (m, 4H), 7.33-7.08 (m, 11H), 6.85 (m, 1H), 6.62 (m, 1H), 5.13-4.82 (m, 2H), 4.50-3.93 (m, 14H), 3.42-2.68 (m, 11H), 2.5-1.9 (m, 6H), 1.68-1.18 (m, 19H), 0.88 (m, 12H).

El Ejemplo 12 se preparó utilizando métodos análogos a los descritos en el Ejemplo 4, donde los compuestos intermedios se prepararon de una forma similar (utilizando cloruro de t-butanoilo para generar el compuesto intermedio 1 que se muestra en el Ejemplo 4), usando el compuesto 8 y PEG_{5K}N₃ se hicieron reaccionar, siguiendo el procedimiento de pegilación general A.

Ejemplo 13: formato de 4-((4S,7S,10S,13S)-10-bencil-7-isobutil-15-metil-13-((R)-2-metiloxiran-2-carbonil)-2,5,8,11-tetraoxo-4-fenetil-3,6,9,12-tetraazahexadecil)-4-(3-((1-(PEG_{20K}-4-Arm)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)-4-(pivaloiloxi)bencil)morfolin-4-io (7)





4-Hidroxiprop-2-inoxi)benzaldehído (1)

A una mezcla de NaH en DMSO (300 mL) se agregó 3,4-dihidroxibenzaldehído (30 g, 217.39 mmol) en DMSO (50 mL) a 20°C. La mezcla se agitó durante 30 min y se agregó 3-bromoprop-1-ino (25.87 g, 217.39 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante una hora y luego se vertió en hielo - agua. La solución obtenida se llevó a pH = 2 y luego se extrajo con EtOAc (500 mL×3). Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO₄ anhidro y se concentraron. El residuo se cristalizó varias veces a partir de DCM/éter de petróleo (30 mL/500 mL) para dar lugar al compuesto 1 (30 g, 78% de rendimiento); ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz): δ 9.89 (s, 1H), 7.54 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 7.49 (dd, *J*₁ = 1.5 Hz, *J*₂ = 8.1 Hz, 1H), 7.09 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 4.82 (m, 2H), 2.62 (m, 1H).

4-Formil-2-(prop-2-iniloxi)fenilpivalato (2)

A una solución del compuesto 1 (3.0 g, 17 mmol) en DCM (120 mL) se agregó Et₃N (3.45 g, 34 mmol) seguido de cloruro de pivaloilo (2.34 g, 20.4 mmol) a 0°C. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla se lavó con solución saturada de NaHCO₃ (20 mL) y agua (20 mL), se secó sobre MgSO₄ anhidro, y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en columna de gel de sílice (éter de petróleo/EtOAc = 50:1) para dar lugar al compuesto 2 (2.10 g, 47% de rendimiento) en la forma de un sólido blanco; ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz): δ 9.99 (s, 1H), 7.61 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 7.55 (dd, *J*₁ = 1.8 Hz, *J*₂ = 8.1 Hz, 1H), 7.26 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 4.77 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H), 2.58 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H), 1.42 (s, 9H).

4-(Hidroximetil)-2-(prop-2-iniloxi)fenilpivalato (3)

A una solución del compuesto 2 (1.8 g, 6.9 mmol) en DCM/MeOH (100 mL/10 mL) se agregó NaBH₄ (0.37 g, 10.4 mmol) a 0°C. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. La mezcla se diluyó con acetona (3 mL) y el solvente se concentró. El residuo se

purificó mediante cromatografía instantánea en columna de gel de sílice (éter de petróleo/EtOAc = 3:1) para dar lugar al compuesto 3 (1.50 g, 83% de rendimiento); $^1\text{H RMN}$ (CDCl_3 , 300 MHz): δ 7.11 (m, 1H), 7.00 (m, 2H), 4.68 (m, 4H), 2.53 (m, 1H), 1.41 (s, 9H).

4-(Bromometil)-2-(prop-2-inilo)fenilpivalato (4)

A una solución del compuesto 3 (1.50 g, 5.7 mmol) en DCM (60 mL) se agregó PPh_3 (1.80 g, 6.8 mmol) y NBS (1.11 g, 6.3 mmol) a 0°C. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 0.5 hora. Un exceso de solvente se concentró y el residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en columna de gel de sílice (éter de petróleo/EtOAc = 50:1) para dar lugar al compuesto 4 (1.34 g, 81% de rendimiento); $^1\text{H RMN}$ (CDCl_3 , 300 MHz): δ 7.12 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H), 7.03 (m, 2H), 4.70 (d, $J = 2.4$ Hz, 2H), 4.51 (d, $J = 3.9$ Hz, 2H), 2.56 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H), 1.40 (s, 9H).

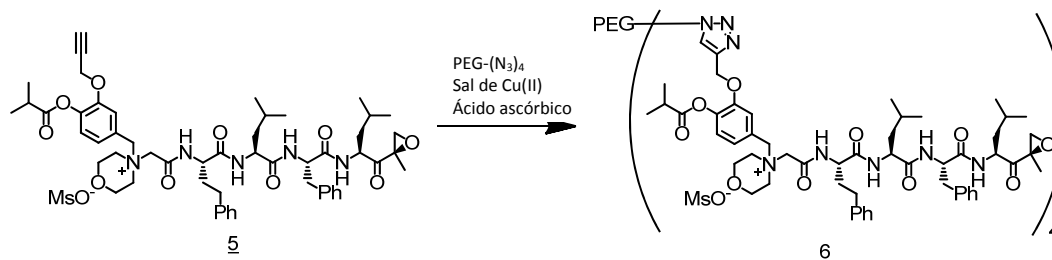
Metansulfonato de 4-((4S,7S,10S,13S)-10-bencil-7-isobutil-15-metil-13-((R)-2-metiloxiran-2-carbonil)-2,5,8,11-tetraoxo-4-fenil-3,6,9,12-tetraazahexadecil)-4-(4-(pivaloiloxi)-3-(prop-2-in-1-iloxi)bencil)morfolin-4-ilo (6)

A una solución del compuesto 4 (2.38 g, 7.3 mmol) en MeCN (30 ml) se agregó (S)-4-metil-N-((S)-1-(((S)-4-metil-1-((R)-2-metiloxiran-2-il)-1-oxopentan-2-il)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)-2-((S)-2-(2-morfolinoacetamido)-4-fenilbutanamido)pentanamida (2.64 g, 3.7 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 45°C durante la noche. Un exceso de solvente se concentró y el residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en columna de gel de sílice (EtOAc/MeOH = 100:6) para dar lugar al compuesto deseado 5, el cual se convirtió en el correspondiente mesilato (1.23 g, 25% de rendimiento) mediante el tratamiento con resina de intercambio iónico; $^1\text{H RMN}$ (CDCl_3 , 300 MHz): δ 9.83 (m, 1H), 7.92 (m, 1H), 7.50-7.11 (m, 13H), 7.03 (m, 1H), 6.62 (m, 1H), 5.25 (m, 1H), 5.15-4.90 (m, 2H), 4.88-4.75 (m, 2H), 4.70-4.20 (m, 7H), 4.20-3.90 (m, 3H), 3.70-3.40 (m, 4H), 3.26 (m, 1H), 3.15 (m, 2H), 2.90 (s, 3H), 2.85 (m, 2H), 2.40-2.10 (m, 2H), 1.87-1.63 (m, 5H), 1.55 (m, 3H), 1.41 (s, 9H), 1.38 (m, 2H), 0.89-1.05 (m, 12H).

El compuesto del Ejemplo 13 se preparó a partir del compuesto 6 y $\text{PEG}_{20\text{K}}(\text{N}_3)_4$, siguiendo el procedimiento de pegilación general A. El compuesto del Ejemplo 13 también se designa como OP-59381 en varias de las figuras ilustradas en la presente memoria. $^1\text{H RMN}$ (500 MHz, tiempo de relajación = 10 seg, DMSO-d_6) δ 8.47 (s, 4H), 8.42 (d, $J = 8.5$ Hz, 4H), 8.29 (d, $J = 7.5$ Hz, 4H), 8.11 (s, 4H), 8.07 (d, $J = 8$ Hz, 4H), 7.53 (s, 4H), 7.26-7.29 (m, 4H), 7.11-7.19 (m, 32H), 7.05-7.06 (m, 4H), 5.21 (s, 8H), 4.95 (dd, $J = 12.5$ Hz y 39.0 Hz, 8H), 4.52-4.54 (m, 12H), 4.28-4.38 (m, 16H), 4.17-4.20 (m, 4H), 4.06 (m, 20H), 3.78 (t, $J = 5.5$ Hz, 8H), 3.61-3.65 (m, 8H), 3.50 (s, 2133H), 3.35-3.37 (m, 8H), 3.10 (d, $J = 5$ Hz, 4H), 2.94-2.98 (m, 12H), 2.73-2.78 (m, 4H), 2.50-

2.65 (m, 8H), 1.90-1.98 (m, 4H), 1.78-1.88 (m, 4H), 1.51-1.68 (m, 8H), 1.39 (s, 12H), 1.25-1.38 (m, 16H), 1.18 (s, 36H), 0.833-0.881 (m, 24H), 0.782-0.815 (m, 24H); Carga: 86%.

Ejemplo 14: Metansulfonato de 4-((4S,7S,10S,13S)-10-bencil-7-isobutil-15-metil-13-((R)-2-metiloxiran-2-carbonil)-2,5,8,11-tetraoxo-4-fenetil-3,6,9,12-tetraazahexadecil)-4-(4-(isobutiriloxi)-3-((1-PEG_{20K}-4-Arm-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)bencil)morfolin-4-io (14)

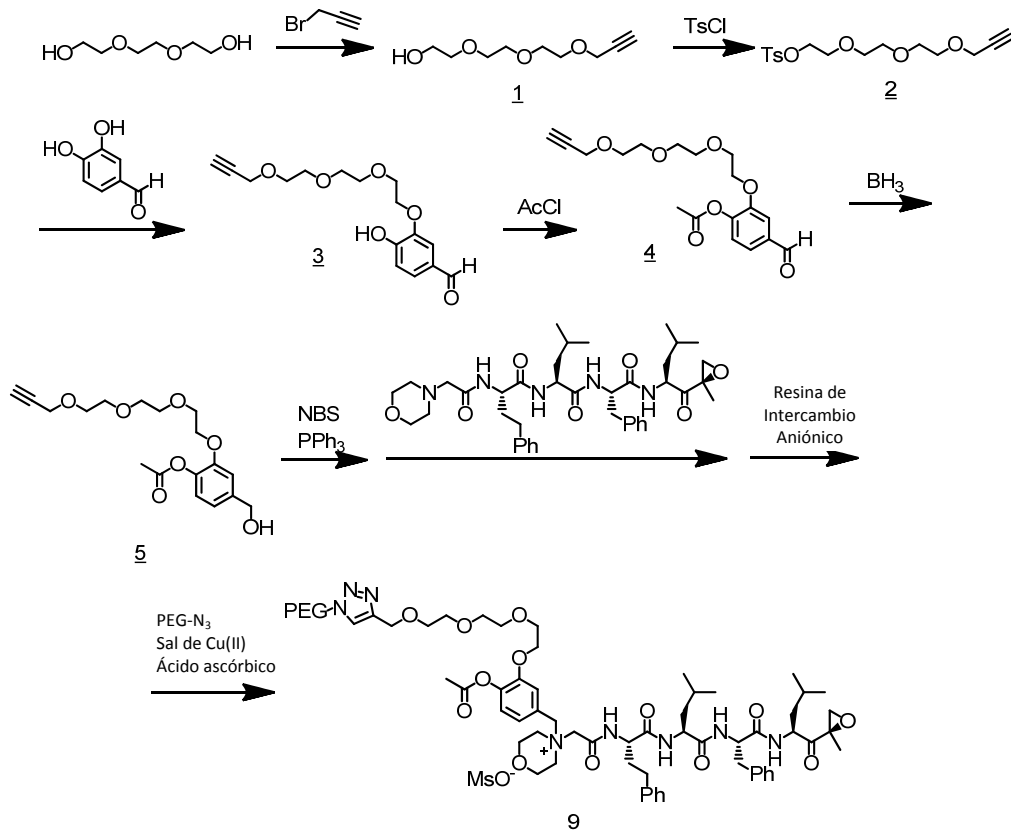


Metansulfonato de 4-((4S,7S,10S,13S)-10-bencil-7-isobutil-15-metil-13-((R)-2-metiloxiran-2-carbonil)-2,5,8,11-tetraoxo-4-fenetil-3,6,9,12-tetraazahexadecil)-4-(4-(isobutiriloxi)-3-(prop-2-in-1-iloxi)bencil)morfolin-4-io (5)

A una solución del compuesto 3 (0.5 g, 1.6 mmol) en MeCN (9 mL) se agregó (S)-4-metil-N-(((S)-1-(((S)-4-metil-1-((R)-2-metiloxiran-2-il)-1-oxopentán-2-il)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)-2-((S)-2-(2-morfolinoacetamido)-4-fenilbutanamido)pentanamida (864 mg, 1.2 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 45°C durante 20 horas. El solvente se concentró y el residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en columna de gel de sílice (EtOAc/MeOH = 100:6) para dar lugar al compuesto deseado 4, el cual luego se convirtió en el correspondiente mesilato (500 mg, 44% de rendimiento) mediante el tratamiento con resina de intercambio iónico; ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 9.67 (m, 1H), 7.82 (m, 1H), 7.27 (m, 16H), 6.85 (m, 1H), 6.47 (m, 1H), 5.13 (m, 1H), 5.02 (m, 1H), 4.85 (m, 1H), 4.70 (m, 2H), 4.45 (m, 2H), 4.37 (m, 2H), 4.23 (m, 4H), 3.92 (m, 2H), 3.84 (m, 1H), 3.46 (m, 1H), 3.35 (m, 1H), 3.15 (m, 1H), 3.03 (m, 1H), 2.92 (m, 1H), 2.80 (s, 3H), 2.73 (m, 2H), 2.58 (m, 1H), 2.20 (m, 1H), 2.12 (m, 1H), 1.70 (m, 1H), 1.62 (m, 3H), 1.43 (m, 4H), 1.28 (m, 6H), 1.21 (m, 3H), 0.85 (m, 12H).

El Ejemplo 14 se preparó utilizando métodos análogos a los descritos en el Ejemplo 3, 5 y 7 donde los compuestos intermedios se prepararon de una forma similar (utilizando cloruro de isopropanoilo para generar el compuesto intermedio 1 que se muestra en el Ejemplo 3), usando el compuesto 5 y PEG_{20K}N₃ se hicieron reaccionar, siguiendo el procedimiento de pegilación general A.

Ejemplo 15: Metansulfonato de 4-(4-acetoxi-3-(2-(2-(2-((1-PEG_{5K}-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)etoxi)etoxi)etoxi)bencil)-4-((4S,7S,10S,13S)-10-bencil-7-isobutil-15-metil-13-((R)-2-metiloxiran-2-carbonil)-2,5,8,11-tetraoxo-4-fenetil-3,6,9,12-tetraazahexadecil)morfolin-4-io (9)



2-(2-(2-(Prop-2-in-1-iloxi)etoxi)etoxi)etan-1-ol (1)

A una mezcla de NaH (3.47 g, 0.086 mol) en THF (320 mL) se agregó 2,2'-(etan-1,2 - diilbis(oxi))dietanol (20 g, 0.133 mol) a 0°C. La mezcla se agitó a la misma temperatura durante 30 min y luego se agregó 3-bromoprop-1-ino (7.93 g, 0.066 mol). La mezcla de reacción se mantuvo a 0°C durante 2 horas y luego se dejó alcanzar la temperatura ambiente durante la noche. La mezcla se diluyó con agua (4 mL) y la solución obtenida se secó directamente sobre MgSO₄ anhidro y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en columna de gel de sílice (éter de petróleo/EtOAc = 1:1) para dar lugar al compuesto 1 (10.12 g, 80% de rendimiento); ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 4.21 (d, *J* = 2.0 Hz, 2H), 3.75-3.68 (m, 10H), 3.62 (m, 2H), 2.44 (m, 1H), 2.23 (s, 1H).

4-Metilbencenosulfonato 2-(2-(2-(prop-2-in-1-iloxi)etoxi)etoxi)etil (2)

A una solución del compuesto 1 (5 g, 26.6 mmol) en DCM (80 mL) se agregó TsCl (7.6 g, 39.89 mmol) a 0°C seguido de piridina (25 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La solución en DCM se lavó con HCl (3 N, 50 mL×4), se secó y se concentró para dar lugar al compuesto 2 (7.89 g, 87% de rendimiento), el cual se utilizó en el próximo paso sin purificación adicional; $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 7.80 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.34 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 4.20 (m, 4H), 3.68 (m, 6H), 3.61 (m, 4H), 2.45 (m, 1H), 2.40 (m, 3H).

4-Hidroxi-3-(2-(2-(2-(prop-2-iniloxi)etoxi)etoxi)etoxi)benzaldehído (3)

A una mezcla de NaH (0.82 g, 20.47 mmol) en DMSO (50 mL) se agregó una solución de 3,4-dihidroxibenzaldehído (1.41 g, 10.23 mmol) en DMSO (5 mL) y una solución de compuesto 2 (3.5 g, 10.23 mmol) en DMSO (5 mL) a 20°C en forma secuencial. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla se vertió en hielo - agua (500 mL) y dicha solución acuosa se llevó a pH = 2 por HCl 2 N. La mezcla obtenida se extrajo con EtOAc (50 mL×3) y las fases de EtOAc combinadas se secaron sobre MgSO_4 anhidro y se concentraron. El residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en columna de gel de sílice (éter de petróleo/EtOAc = 1:1) para dar lugar al compuesto 3 (579 mg, 18% de rendimiento); $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 9.80 (s, 1H), 7.46 (m, 2H), 7.03 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 4.25 (m, 4H), 3.88 (m, 2H), 3.70 (m, 8H), 2.45 (m, 1H).

Acetato de 4-formil-2-(2-(2-(2-(prop-2-iniloxi)etoxi)etoxi)etoxi)fenilo (4)

A una solución del compuesto 3 (479 mg, 1.56 mmol) en THF (20 mL) se agregó TEA (471 mg, 4.67 mmol) y Ac_2O (238 mg, 2.33 mmol) a 0°C. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. Un exceso de solvente se concentró y el residuo se disolvió en EtOAc (40 mL). La solución obtenida se lavó con agua (50 mL), se secó sobre MgSO_4 anhidro y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en columna de gel de sílice (éter de petróleo/EtOAc = 2:1) para dar lugar al compuesto 4 (400 mg, 74% de rendimiento); $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 9.94 (s, 1H), 7.52 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H), 7.49 (dd, $J_1 = 1.6$ Hz, $J_2 = 8.0$ Hz, 1H), 7.22 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 4.23 (m, 2H), 4.20 (m, 2H), 3.86 (m, 2H), 3.72 (m, 8H), 2.43 (m, 1H), 2.34 (s, 3H).

Acetato de 4-(Hidroximetil)-2-(2-(2-(2-(prop-2-iniloxi)etoxi)etoxi)etoxi)fenilo (5)

A una solución del compuesto 4 (1.18 g, 3.38 mmol) en THF (50 mL) se agregó solución BH_3/THF (3.4 mL, 3.38 mmol) gota a gota a 0°C. La mezcla de reacción se agitó durante 30 min y luego se diluyó con MeOH (5 mL). La solución de reacción se concentró y el residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en columna de gel de sílice (éter de petróleo/EtOAc = 1:1) para

dar lugar al compuesto 5 (700 mg, 59% de rendimiento); $^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 7.09 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 7.03 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 6.94 (dd, J_1 = 1.8 Hz, J_2 = 8.1 Hz, 1H), 4.68 (s, 2H), 4.22 (m, 4H), 3.85 (m, 2H), 3.74 (m, 8H), 2.46 (m, 1H), 2.33 (s, 3H).

Acetato de 4-(bromometil)-2-(2-(2-(2-(prop-2-iniloxi)etoxi)etoxi)etoxi)fenilo (6)

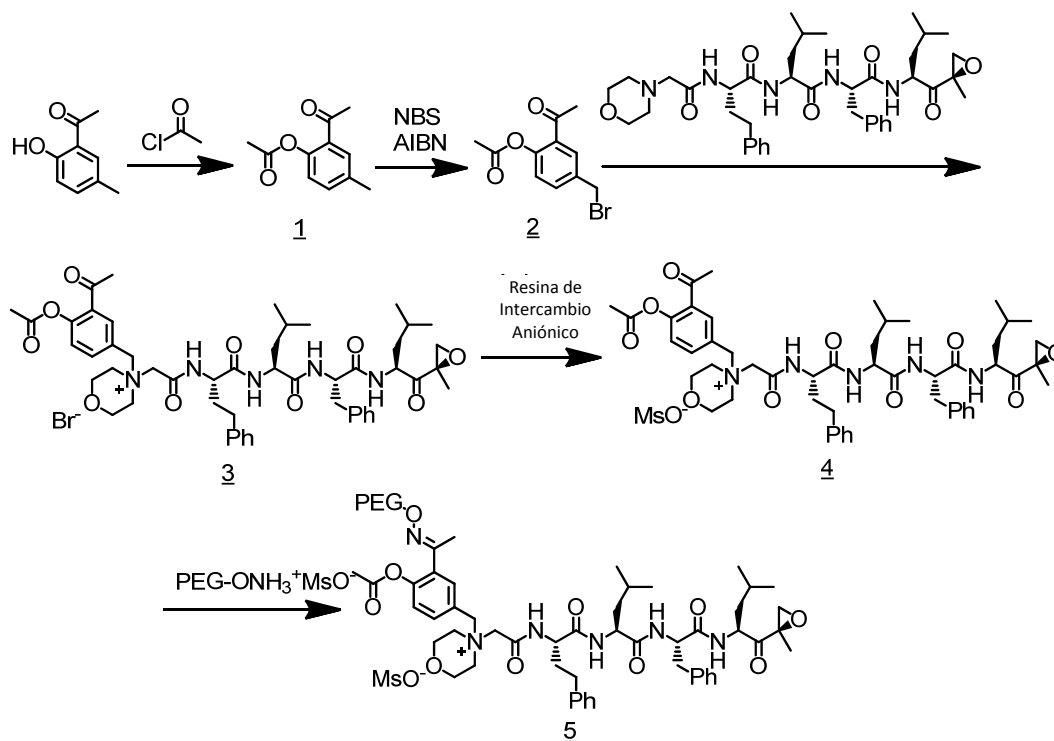
A una solución del compuesto 5 (680 mg, 1.93 mmol) en DCM (40 mL) se agregó PPh_3 (607 mg, 2.32 mmol) seguido de NBS (374 mg, 2.13 mmol) en pequeñas porciones a 0°C . Un exceso de solvente se concentró y el residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en columna de gel de sílice (éter de petróleo/ EtOAc = 3:1) para dar lugar al compuesto 6 (430 mg, 54% de rendimiento); $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 7.03 (s, 1H), 6.99 (m, 2H), 4.46 (s, 2H), 4.20-4.16 (m, 4H), 3.83 (m, 2H), 3.68 (m, 8H), 2.43 (m, 1H), 2.29 (s, 3H). El compuesto 6 se convirtió en el compuesto 8 utilizando métodos análogos a los que se describen en la presente memoria.

Metansulfonato de 4-(4-acetoxi-3-(2-(2-(2-(prop-2-in-1-iloxi)etoxi)etoxi)etoxi)bencil)-4-((4S,7S,10S,13S)-10-bencil-7-isobutil-15-metil-13-((R)-2-metiloxiran-2-carbonil)-2,5,8,11-tetraoxo-4-fenetil-3,6,9,12-tetraazahexadecil)morfolin-4-io (8)

A una solución del compuesto 6 (430 mg, 1.04 mmol) en MeCN (5 mL) se agregó compuesto (S)-4-metil-N-((S)-1-(((S)-4-metil-1-((R)-2-metiloxiran-2-il)-1-oxopentan-2-il)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)-2-((S)-2-(2-morfolinoacetamido)-4-fenilbutanamido)pentanamida (743 mg, 1.04 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Un exceso de solvente se concentró y el residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en columna de gel de sílice (EtOAc/MeOH = 10:1) para dar lugar al producto deseado 7 (160 mg, 14% de rendimiento), el cual luego se convirtió en la correspondiente sal de mesilato (135 mg, 85% de rendimiento) mediante el tratamiento con resina de intercambio iónico; $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 9.68 (m, 1H), 7.73 (m, 1H), 7.29-7.05 (m, 13H), 6.82 (m, 1H), 6.40 (m, 1H), 5.15 (m, 1H), 5.08 (m, 1H), 5.02 (m, 1H), 4.82 (m, 2H), 4.51 (m, 2H), 4.38 (m, 3H), 4.20 (m, 4H), 4.15 (m, 2H), 4.03 (m, 2H), 3.84 (m, 1H), 3.76 (m, 2H), 3.65 (m, 9H), 3.50 (m, 1H), 3.38 (m, 1H), 3.18 (m, 1H), 3.02 (m, 2H), 2.86 (m, 1H), 2.80 (s, 3H), 2.64 (m, 2H), 2.46 (m, 1H), 2.32 (m, 3H), 2.30-2.05 (m, 3H), 1.60 (m, 2H), 1.52 (m, 6H), 1.24 (m, 2H), 0.84 (12 H).

El Ejemplo 15 se preparó a partir del compuesto 8 y $\text{PEG}_{5K}\text{N}_3$, siguiendo el procedimiento de pegilación general A.

Ejemplo 16: Metansulfonato de 4-(4-acetoxi-3-(1-(PEG_{5K}-imino)etil)bencil)-4-((4S,7S,10S,13S)-10-bencil-7-isobutil-15-metil-13-((R)-2-metiloxiran-2-carbonil)-2,5,8,11-tetraoxo-4-fenetil-3,6,9,12-tetraazahexadecil)morfolin-4-io (5)



Acetato de 2-acetil-4-metilfenilo (1)

A una solución de 1-(2-hidroxi-5-metilfenil)etanona (1.5 g, 0.01 mol) en DCM (15 mL) se agregó TEA (1.5 g, 0.015 mol) y cloruro de acetilo (0.94 g, 0.012 mol) a 0°C. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla se diluyó con agua (20 mL). La fase de DCM se recolectó, se lavó con salmuera (20 mL), se secó sobre MgSO₄ anhidro, y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en columna de gel de sílice (éter de petróleo/EtOAc = 3:1) para dar lugar al compuesto 1 (0.9 g, 47% de rendimiento); ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7.64 (m, 1H), 7.37 (m, 1H), 7.02 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 2.57 (s, 3H), 2.42 (s, 3H), 2.37 (s, 3H).

Acetato de 2-acetil-4-(bromometil)fenilo (2)

A una solución del compuesto 1 (0.5 g, 2.6 mmol) en CCl₄ (20 mL) se agregó NBS (573 mg, 3.25 mmol) y AIBN (42.6 mg, 0.26 mmol). La mezcla de reacción se calentó bajo reflujo durante la noche. La mezcla se enfrió hasta temperatura ambiente y se filtró. El filtrado se concentró y el residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en columna de gel de sílice (éter de petróleo/EtOAc = 10:1) para dar lugar al compuesto 2 (160 mg, 23% de rendimiento); ¹H RMN

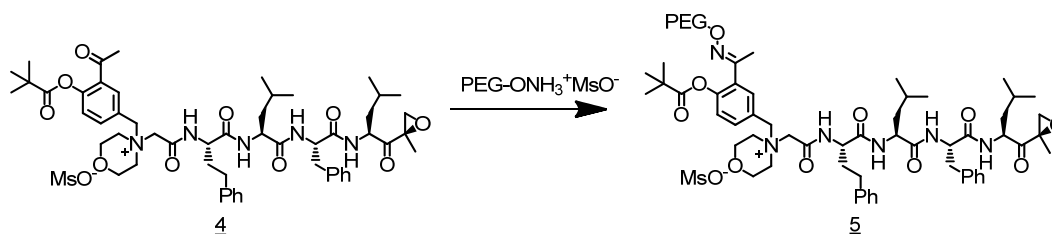
(300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.02 (m, 1H), 7.73 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.25 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 4.81 (s, 2H), 2.53 (s, 3H), 2.32 (s, 3H).

Metansulfonato de 4-(4-acetoxi-3-acetilbencil)-4-((4S,7S,10S,13S)-10-bencil-7-isobutil-15-metil-13-((R)-2-metiloxiran-2-carbonil)-2,5,8,11-tetraoxo-4-fenetil-3,6,9,12-tetraazahexadecil)morfolin-4-io (4)

A una solución del compuesto 2 (1.03 g, 3.7 mmol) en MeCN (10 mL) se agregó compuesto (S)-4-metil-N-((S)-1-(((S)-4-metil-1-((R)-2-metiloxiran-2-il)-1-oxopentan-2-il)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)-2-((S)-2-(2-morfolinoacetamido)-4-fenilbutanamido)pentanamida (884.7 mg, 1.23 mmol). La mezcla de reacción se calentó a 45°C durante la noche. Un exceso de solvente se concentró y el residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en columna de gel de sílice (EtOAc/MeOH = 100:3) para dar lugar al compuesto deseado 3, el cual se convirtió en el correspondiente mesilato (260 mg, 21% de rendimiento) mediante el tratamiento con resina de intercambio iónico; ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 9.62 (m, 1H), 8.06 (m, 1H), 7.88-7.71 (m, 2H), 7.33-7.11 (m, 11H), 6.95 (m, 1H), 6.66 (m, 1H), 5.33-4.91 (m, 2H), 4.55-3.90 (m, 11H), 3.58-2.91 (m, 4H), 2.85 (s, 3H), 2.74 (m, 2H), 2.61 (s, 3H), 2.40 (s, 3H), 2.31-1.94 (m, 7H), 1.72-1.18 (m, 8H), 0.88 (m, 12H).

El Ejemplo 16 se preparó a partir del compuesto 4 y PEG_{5K}ONH₃⁺.MsO⁻, siguiendo el procedimiento de pegilación general B.

Ejemplo 17: Metansulfonato de 4-((4S,7S,10S,13S)-10-bencil-7-isobutil-15-metil-13-((R)-2-metiloxiran-2-carbonil)-2,5,8,11-tetraoxo-4-fenetil-3,6,9,12-tetraazahexadecil)-4-(3-(1-(PEG_{5K}-imino)etil)-4-(pivaloiloxi)bencil)morfolin-4-io (5)



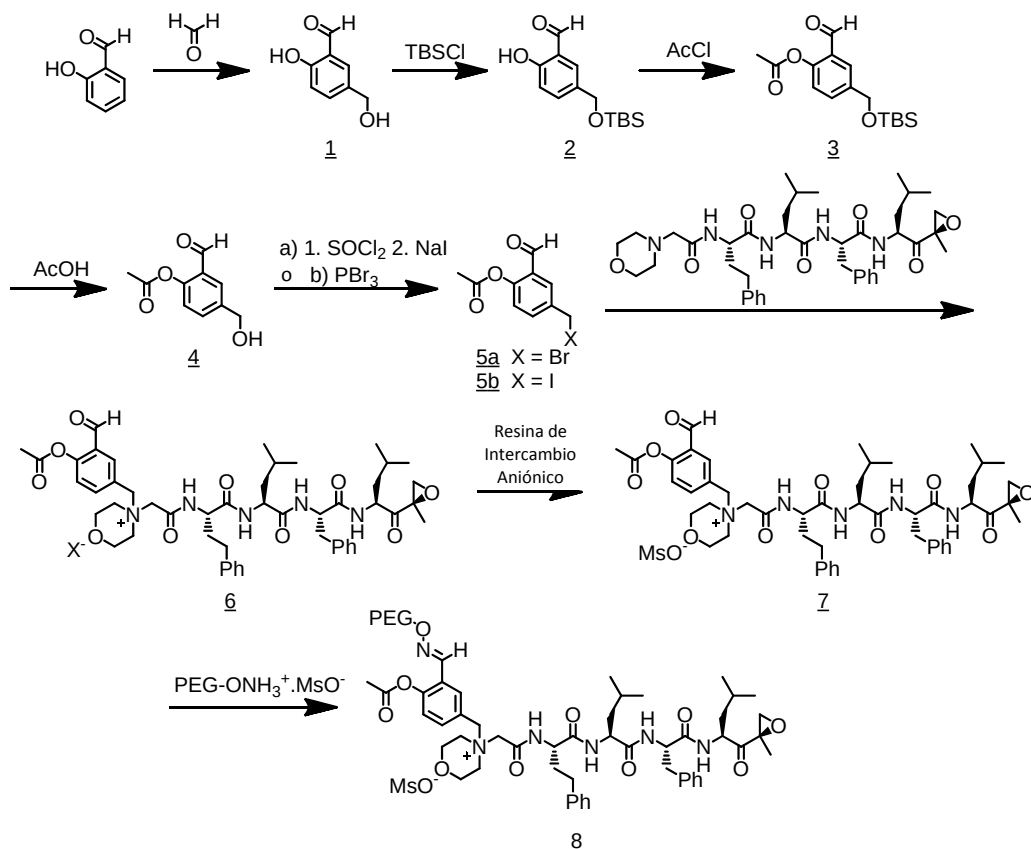
Metansulfonato de 4-(3-acetil-4-(pivaloiloxi)bencil)-4-((4S,7S,10S,13S)-10-bencil-7-isobutil-15-metil-13-((R)-2-metiloxiran-2-carbonil)-2,5,8,11-tetraoxo-4-fenetil-3,6,9,12-tetraazahexadecil)morfolin-4-io (4)

A una solución del compuesto 2 (1.03 g, 3.2 mmol) en MeCN (10 mL) se agregó (S)-4-metil-N-((S)-1-(((S)-4-metil-1-((R)-2-metiloxiran-2-il)-1-oxopentan-2-il)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-

il)-2-((S)-2-(2-morfolinoacetamido)-4-fenilbutanamido)pentanamida (766 mg, 1.06 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 45°C durante la noche. Un exceso de solvente se concentró y el residuo se cristalizó varias veces a partir de EtOAc/Et₂O (5/1, v/v) para dar lugar al compuesto deseado 3, el cual se convirtió en el correspondiente mesilato (300 mg, 32% de rendimiento) mediante el tratamiento con resina de intercambio iónico; ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 9.68 (m, 1H), 8.06 (m, 1H), 7.75 (m, 1H), 7.40-7.15 (m, 12H), 6.92 (m, 1H), 6.65 (m, 1H), 5.28-4.96 (m, 2H), 4.55-4.42 (m, 4H), 4.38-4.18 (m, 4H), 4.07-3.90 (m, 3H), 3.60-3.30 (m, 2H), 3.17 (m, 2H), 3.04 (m, 2H), 2.85 (s, 3H), 2.80 (m, 2H), 2.63 (s, 3H), 2.44 (s, 3H), 2.28-2.12 (m, 2H), 2.04 (m, 3H), 1.76 (m, 3H), 1.50-1.40 (m, 6H), 1.30-1.18 (m, 4H), 0.92-0.84 (m, 12H).

El Ejemplo 17 se preparó utilizando métodos análogos a los descritos en el Ejemplo 16, donde los compuestos intermedios se prepararon de una forma similar (utilizando cloruro de t-butanoilo para generar el compuesto intermedio 1 que se muestra en el Ejemplo 16), usando el compuesto 4 y PEG_{5K}ONH₃⁺.MsO⁻, siguiendo el procedimiento de pegilación general B.

Ejemplo 18: Metansulfonato de 4-(3-acetoxi-4-((PEG_{5K}-imino)metil)bencil)-4-((4S,7S,10S,13S)-10-bencil-7-isobutil-15-metil-13-((R)-2-metiloxiran-2-carbonil)-2,5,8,11-tetraoxo-4-fenetil-3,6,9,12-tetraazahexadecil)morfolin-4-io (8)



2-Hidroxi-5-(hidroximetil)benzaldehído (1)

A una solución acuosa de formaldehído (37%, 17 mL) se agregó 2-hidroxibenzaldehído (10.3 g, 84.4 mmol) y HCl concentrado (42 mL). La mezcla de reacción se calentó bajo reflujo durante la noche. La mezcla se enfrió hasta temperatura ambiente y luego se extrajo con EtOAc (200 mL). La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en columna de gel de sílice (éter de petróleo/EtOAc = 3:1) para dar lugar al compuesto **1** (1.97 g, 15% de rendimiento); ^1H RMN ($\text{DMSO}-d_6$, 300 MHz): δ 10.61 (s, 1H), 10.26 (s, 1H), 7.60 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 7.46 (dd, $J = 2.4, 8.7$ Hz, 1H), 6.96 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 5.18 (m, 1H), 4.42 (d, $J = 3.3$ Hz, 2H).

5-(((*tert*-Butildimetilsilil)oxi)metil)-2-hidroxibenzaldehído (2)

A una solución del compuesto **1** (2.01 g, 13.2 mmol) en DCM (60 mL) se agregó imidazol (1.43 g, 21 mmol). La solución se enfrió hasta 0°C y se agregó dimetilsilano de *tert*-butilcloro (2.57 g, 17.1 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 h y luego se vertió en agua (50 mL). Las dos fases se separaron y la fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en columna de gel de sílice (éter de petróleo/EtOAc = 50:1) para dar lugar al compuesto **2** (3.2 g, 91% de

rendimiento); ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz): δ 10.85 (br, s, 1H), 9.78 (s, 1H), 7.41 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.35 (dd, $J = 2.0, 8.4$ Hz, 1H), 6.85 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 4.59 (s, 2H), 0.82 (s, 9H), 0.00 (s, 6H).

Acetato de 4-((*tert*-butildimetilsililoxi)metil)-2-formilfenilo (3)

A una solución del compuesto 2 (25 g, 94 mmol) en DCM (500 mL) se agregó TEA (19.0 g, 188 mmol). La mezcla se enfrió hasta 0°C y se agregó cloruro de acetilo (11.1 g, 141 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. La mezcla se lavó con agua (500 mL). La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en columna de gel de sílice (éter de petróleo/EtOAc = 100:1) para dar lugar al compuesto 3 (19.7 g, 68% de rendimiento); ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz): δ 9.98 (s, 1H), 7.70 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.49 (dd, $J = 2.4, 8.4$ Hz, 1H), 7.03 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 4.66 (s, 2H), 2.28 (s, 3H), 0.83 (s, 9H), 0.00 (s, 6H).

Acetato de 2-formil-4-(hidroximetil)fenilo (4)

El compuesto 3 (3.6 g, 11.7 mmol) se disolvió en AcOH/THF/ H_2O (50 mL/25 mL/25 mL). La mezcla de reacción se agitó a 30°C durante 3 h. Un exceso de THF se eliminó y la solución obtenida se llevó a pH = 7-8 y luego se extrajo con EtOAc (50 mL $\times$ 3). Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se concentraron. El residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en columna de gel de sílice (éter de petróleo/EtOAc = 3:1) para dar lugar al compuesto 4 (2.04 g, 90% de rendimiento); ^1H RMN ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz): δ 10.08 (s, 1H), 7.85 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.67 (dd, $J = 2.4, 8.4$ Hz, 1H), 7.26 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 4.57 (s, 2H), 2.35 (s, 3H).

Acetato de 4-(bromometil)-2-formilfenilo (5a)

A una solución del compuesto 4 (2.03 g, 10.3 mmol) en DCM (80 mL) se agregó PBr_3 (2.79 g, 10.3 mmol) a 0°C . La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 h. La reacción se diluyó mediante el agregado de agua (20 mL) y la mezcla obtenida se llevó a pH = 7 con solución acuosa saturada de NaHCO_3 . La fase orgánica se separó, se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en columna de gel de sílice (éter de petróleo/EtOAc = 3:1) para dar lugar al compuesto 5a (300 mg, 11% de rendimiento); ^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz): δ 10.12 (s, 1H), 7.92 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 7.68 (dd, $J = 2.4, 8.4$ Hz, 1H), 7.22 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 4.54 (s, 2H), 2.42 (s, 3H).

Acetato de 4-(Yodometil)-2-formilfenilo (5b)

A una solución del compuesto 4 (5.0 g, 27.55 mmol) en DCM (300 mL) se agregó SOCl_2 (6.13 g, 51.55 mmol) a 0°C . La mezcla de reacción se calentó bajo reflujo durante la noche. La

mezcla se concentró y el residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en columna de gel de sílice (éter de petróleo/EtOAc = 10:1) para dar lugar al correspondiente cloruro de bencilo (2.4 g, 44% de rendimiento); ^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz): δ 10.12 (s, 1H), 7.92 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.68 (dd, J = 2.4, 8.4 Hz, 1H), 7.22 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 4.64 (s, 2H), 2.42 (s, 3H).

A una solución de cloruro de bencilo (2.4 g, 11.29 mmol) en acetona (160 mL) se agregó NaI (16.94 g, 112.94 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 30°C durante la noche. La mezcla se concentró y el residuo se disolvió en DCM (100 mL). La solución obtenida se lavó con solución acuosa saturada de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (50 mL $\times$ 3) y agua (50 mL), se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró para dar lugar al compuesto 5b (2.1 g, 61% de rendimiento), el cual se utilizó en el próximo paso sin purificación adicional. ^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz): δ 10.10 (s, 1H), 7.90 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.66 (dd, J = 2.1, 8.4 Hz, 1H), 7.16 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 4.49 (s, 2H), 2.41 (s, 3H).

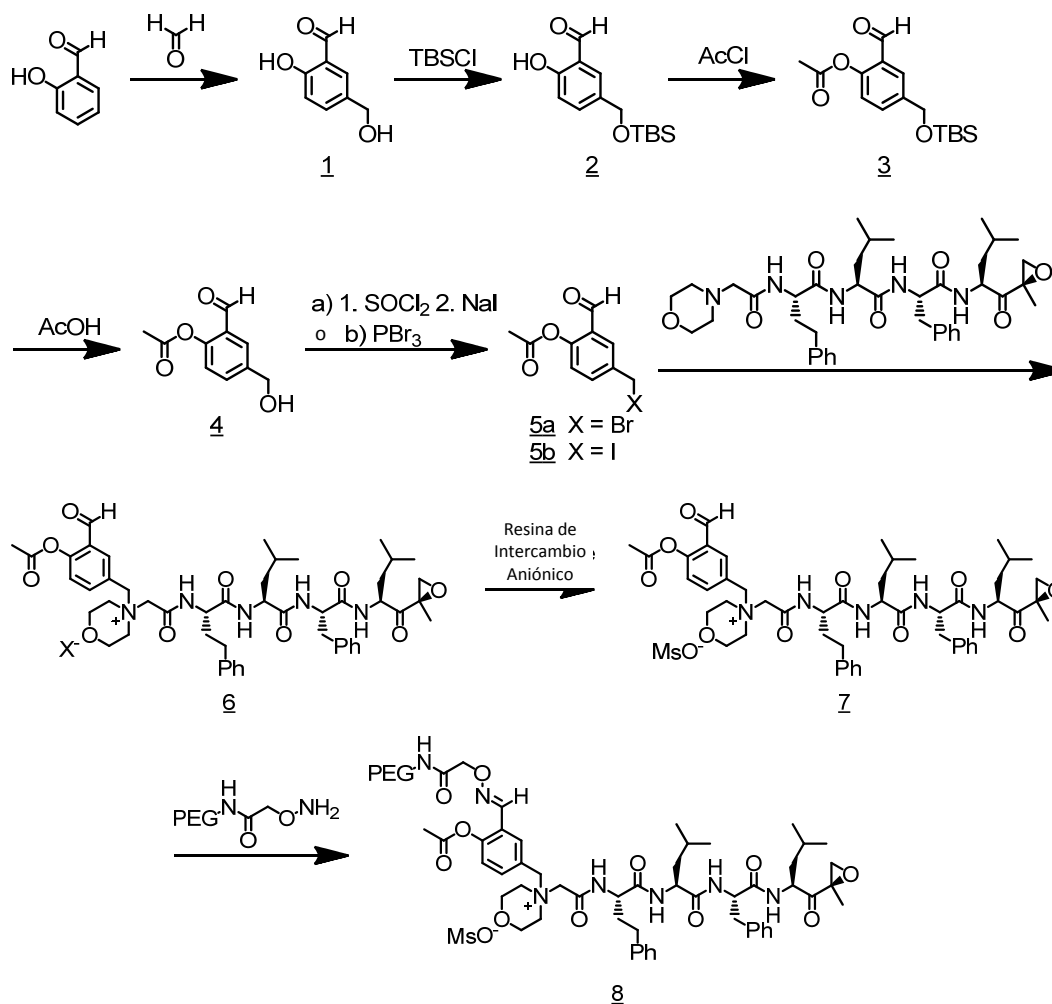
Metansulfonato de 4-(4-acetoxi-3-formilbencil)-4-((4S,7S,10S,13S)-10-bencil-7-isobutil-15-metil-13-((R)-2-metiloxiran-2-carbonil)-2,5,8,11-tetraoxo-4-fenetil-3,6,9,12-tetraazahexadecil)morfolin-4-io (7)

A una solución del compuesto 5b (380 mg, 1.48 mmol) en MeCN (5 mL) se agregó (S)-4-metil-N-((S)-1-(((S)-4-metil-1-((R)-2-metiloxiran-2-il)-1-oxopentan-2-il)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)-2-((S)-2-(2-morfolinoacetamido)-4-fenilbutanamido)pentanamida (532 mg, 0.74 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 45°C durante la noche. El solvente se eliminó bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en columna de gel de sílice (DCM/MeOH = 10:1) para dar lugar al compuesto deseado (6), el cual luego se convirtió en el correspondiente mesilato mediante el tratamiento con resina de intercambio iónico (280 mg, 39% de rendimiento); ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz): δ 10.15 (s, 1H), 9.53 (br s, 1H), 8.03 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.85 (m, 1H), 7.68 (br s, 1H), 7.37 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.26-7.13 (m, 10H), 6.84 (br s, 1H), 6.52 (br s, 1H), 5.20 (m, 2H), 4.97 (m, 1H), 4.50-3.96 (m, 7H), 3.46-3.28 (m, 2H), 3.16 (m, 1H), 3.06-2.92 (m, 3H), 2.85-2.61 (m, 7H), 2.44 (s, 3H), 2.14 (m, 2H), 1.69-1.17 (m, 11H), 0.89-0.83 (m, 12H).

El compuesto 5a también podría utilizarse para esta reacción.

El Ejemplo 18 se preparó a partir del compuesto 7 y $\text{PEG}_{5\text{K}}\text{ONH}_3^+.\text{MsO}^-$, siguiendo el procedimiento de pegilación general A.

Ejemplo 19: Metansulfonato de 4-(4-acetoxi-3-((E)-((2-(PEG_{5K}-amino)-2-oxoetoxi)imino)metil)bencil)-4-((4S,7S,10S,13S)-10-bencil-7-isobutil-15-metil-13-((R)-2-metiloxiran-2-carbonil)-2,5,8,11-tetraoxo-4-fenetil-3,6,9,12-tetraazahexadecil)morfolin-4-io (8)



2-Hidroxi-5-(hidroximetil)benzaldehído (1)

A una solución acuosa de formaldehído (37%, 17 mL) se agregó 2-hidroxibenzaldehído (10.3 g, 84.4 mmol) y HCl concentrado (42 mL). La mezcla de reacción se calentó bajo reflujo durante la noche. La mezcla se enfrió hasta temperatura ambiente y luego se extrajo con EtOAc (200 mL). La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en columna de gel de sílice (éter de petróleo/EtOAc = 3:1) para dar lugar al compuesto 1 (1.97 g, 15% de rendimiento); ¹H RMN (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 10.61 (s, 1H), 10.26 (s, 1H), 7.60 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 7.46 (dd, *J* = 2.4, 8.7 Hz, 1H), 6.96 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 5.18 (m, 1H), 4.42 (d, *J* = 3.3 Hz, 2H).

5-(((*tert*-Butildimetilsilil)oxi)metil)-2-hidroxibenzaldehído (2)

A una solución del compuesto 1 (2.01 g, 13.2 mmol) en DCM (60 mL) se agregó imidazol (1.43 g, 21 mmol). La solución se enfrió hasta 0°C y se agregó dimetilsilano de *tert*-butilcloro (2.57 g, 17.1 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 h y luego se vertió en agua (50 mL). Las dos fases se separaron y la fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en columna de gel de sílice (éter de petróleo/EtOAc = 50:1) para dar lugar al compuesto 2 (3.2 g, 91% de rendimiento); ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ 10.85 (br, s, 1H), 9.78 (s, 1H), 7.41 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.35 (dd, *J* = 2.0, 8.4 Hz, 1H), 6.85 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 4.59 (s, 2H), 0.82 (s, 9H), 0.00 (s, 6H).

Acetato de 4-((*tert*-butildimetilsililoxi)metil)-2-formilfenilo (3)

A una solución del compuesto 2 (25 g, 94 mmol) en DCM (500 mL) se agregó TEA (19.0 g, 188 mmol). La mezcla se enfrió hasta 0°C y se agregó cloruro de acetilo (11.1 g, 141 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. La mezcla se lavó con agua (500 mL). La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en columna de gel de sílice (éter de petróleo/EtOAc = 100:1) para dar lugar al compuesto 3 (19.7 g, 68% de rendimiento); ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ 9.98 (s, 1H), 7.70 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.49 (dd, *J* = 2.4, 8.4 Hz, 1H), 7.03 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 4.66 (s, 2H), 2.28 (s, 3H), 0.83 (s, 9H), 0.00 (s, 6H).

Acetato de 2-formil-4-(hidroximetil)fenilo (4)

El compuesto 3 (3.6 g, 11.7 mmol) se disolvió en AcOH/THF/H₂O (50 mL/25 mL/25 mL). La mezcla de reacción se agitó a 30°C durante 3 h. Un exceso de THF se eliminó y la solución obtenida se llevó a pH = 7-8 y luego se extrajo con EtOAc (50 mL×3). Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se concentraron. El residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en columna de gel de sílice (éter de petróleo/EtOAc = 3:1) para dar lugar al compuesto 4 (2.04 g, 90% de rendimiento); ¹H RMN (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 10.08 (s, 1H), 7.85 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.67 (dd, *J* = 2.4, 8.4 Hz, 1H), 7.26 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 4.57 (s, 2H), 2.35 (s, 3H).

Acetato de 4-(bromometil)-2-formilfenilo (5a)

A una solución del compuesto 4 (2.03 g, 10.3 mmol) en DCM (80 mL) se agregó PBr₃ (2.79 g, 10.3 mmol) a 0°C. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 h. La reacción se diluyó mediante el agregado de agua (20 mL) y la mezcla obtenida se llevó a pH = 7 con solución acuosa saturada de NaHCO₃. La fase orgánica se separó, se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en columna de

gel de sílice (éter de petróleo/EtOAc = 3:1) para dar lugar al compuesto 5a (300 mg, 11% de rendimiento); ^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz): δ 10.12 (s, 1H), 7.92 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 7.68 (dd, $J = 2.4, 8.4$ Hz, 1H), 7.22 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 4.54 (s, 2H), 2.42 (s, 3H).

Acetato de 4-(Yodometil)-2-formilfenilo (5b)

A una solución del compuesto 4 (5.0 g, 27.55 mmol) en DCM (300 mL) se agregó SOCl_2 (6.13 g, 51.55 mmol) a 0°C . La mezcla de reacción se calentó bajo reflujo durante la noche. La mezcla se concentró y el residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en columna de gel de sílice (éter de petróleo/EtOAc = 10:1) para dar lugar al correspondiente cloruro de bencilo (2.4 g, 44% de rendimiento); ^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz): δ 10.12 (s, 1H), 7.92 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 7.68 (dd, $J = 2.4, 8.4$ Hz, 1H), 7.22 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 4.64 (s, 2H), 2.42 (s, 3H).

A una solución cloruro de bencilo (2.4 g, 11.29 mmol) en acetona (160 mL) se agregó NaI (16.94 g, 112.94 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 30°C durante la noche. La mezcla se concentró y el residuo se disolvió en DCM (100 mL). La solución obtenida se lavó con solución acuosa saturada de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (50 mL $\times$ 3) y agua (50 mL), se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró para dar lugar al compuesto 5b (2.1 g, 61% de rendimiento), el cual se utilizó en el próximo paso sin purificación adicional. ^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz): δ 10.10 (s, 1H), 7.90 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 7.66 (dd, $J = 2.1, 8.4$ Hz, 1H), 7.16 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 4.49 (s, 2H), 2.41 (s, 3H).

Metansulfonato de 4-(4-acetoxi-3-formilbencil)-4-((4S,7S,10S,13S)-10-bencil-7-isobutil-15-metil-13-((R)-2-metiloxiran-2-carbonil)-2,5,8,11-tetraoxo-4-fenetil-3,6,9,12-tetraazahexadecil)morfolin-4-io (7)

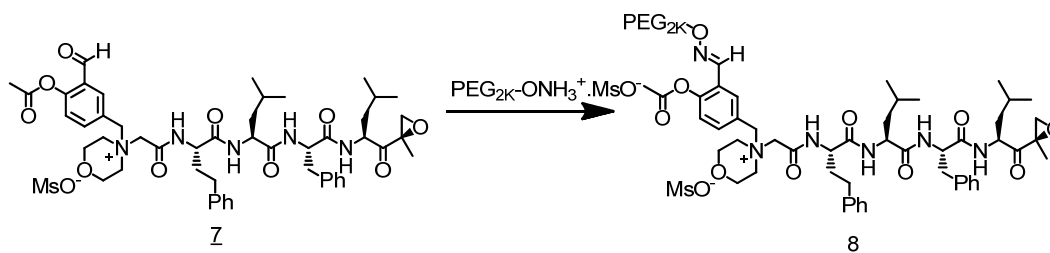
A una solución del compuesto 5b (380 mg, 1.48 mmol) en MeCN (5 mL) se agregó (S)-4-metil-N-((S)-1-(((S)-4-metil-1-((R)-2-metiloxiran-2-il)-1-oxopentan-2-il)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)-2-((S)-2-(2-morfolinoacetamido)-4-fenilbutanamido)pentanamida (532 mg, 0.74 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 45°C durante la noche. El solvente se eliminó bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en columna de gel de sílice (DCM/MeOH = 10:1) para dar lugar al compuesto deseado (6), el cual luego se convirtió en el correspondiente mesilato mediante el tratamiento con resina de intercambio iónico (280 mg, 39% de rendimiento); ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz): δ 10.15 (s, 1H), 9.53 (br s, 1H), 8.03 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.85 (m, 1H), 7.68 (br s, 1H), 7.37 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.26-7.13 (m, 10H), 6.84 (br s, 1H), 6.52 (br s, 1H), 5.20 (m, 2H), 4.97 (m, 1H), 4.50-3.96 (m, 7H), 3.46-3.28 (m, 2H), 3.16 (m, 1H), 3.06-2.92 (m, 3H), 2.85-2.61 (m, 7H), 2.44 (s, 3H), 2.14 (m, 2H), 1.69-1.17 (m, 11H), 0.89-0.83 (m, 12H).

Chemical reaction scheme showing the conversion of compound **6** to compound **7**. Compound **6** is a complex molecule featuring a central benzene ring substituted with a formyl group, an acetate group, and a quaternary ammonium salt (MsO⁻). It is linked via an amide bond to a side chain containing a phenyl group and a chiral center. The reaction is catalyzed by PEG-OH₃⁺MsO⁻ to yield compound **7**, which is identical to **6** except for the addition of a PEG group to the formyl group.

A una solución del compuesto 4 (400 mg, 1.476 mmol) en MeCN (5 mL) se agregó (S)-4-metil-N-((S)-1-(((S)-4-metil-1-((R)-2-metiloxiran-2-il)-1-oxopentan-2-il)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)-2-((S)-2-(2-morfolinoacetamido)-4-fenilbutanamido)pentanamida (318.8 mg, 0.442 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 45°C durante la noche. Un exceso de solvente se concentró y el residuo se cristalizó varias veces a partir de MeCN/Et₂O (1/5, v/v) para dar lugar al compuesto deseado 5, el cual se convirtió en el correspondiente mesilato (200 mg, 15% de rendimiento) mediante el tratamiento con resina de intercambio iónico; ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 10.18 (s, 1H), 7.68 (br, s, 1H), 8.03 (s, 1H), 7.88 (m, 1H), 7.72 (br, 1H), 7.38 (m, 1H), 7.30-7.15 (m, 10 H), 6.74 (m, 1H), 6.37 (br, 1 H), 5.25-5.01 (m, 3H), 4.50-3.90 (m, 12 H), 3.47-3.12 (m, 3H), 2.97 (m, 2H), 2.97-2.71 (m, 7H), 2.15 (m, 2H), 2.71-1.10 (m, 9H), 0.87 (m, 12 H).

El Ejemplo 20 se preparó utilizando métodos análogos a los descritos en el Ejemplo 16, donde los compuestos intermedios se prepararon de una forma similar (utilizando cloruro de etanoilo para generar el compuesto intermedio 1 que se muestra en el Ejemplo 16), usando el compuesto 6 y $\text{PEG}_{5\text{K}}\text{ONH}_3^+.\text{MsO}^-$, siguiendo el procedimiento de pegilación general B.

Ejemplo 21: Metansulfonato de 4-(3-acetoxi-4-((PEG_{2K}-imino)metil)bencil)-4-((4S,7S,10S,13S)-10-bencil-7-isobutil-15-metil-13-((R)-2-metiloxiran-2-carbonil)-2,5,8,11-tetraoxo-4-fenetil-3,6,9,12-tetraazahexadecil)morfolin-4-io (8)

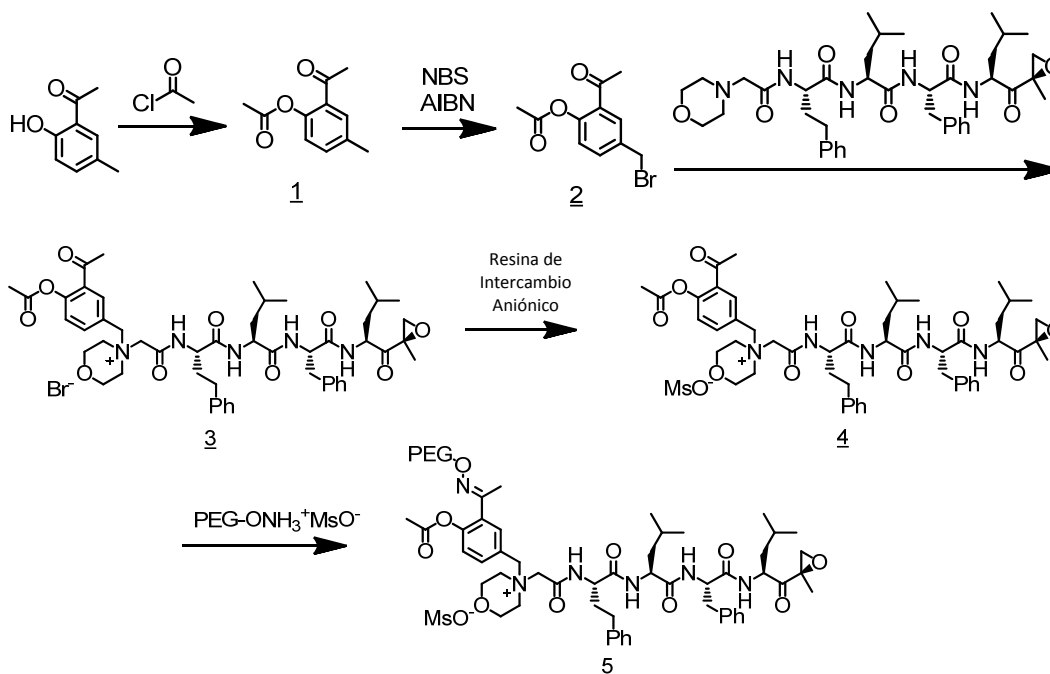


Metansulfonato de 4-(4-acetoxi-3-formilbencil)-4-((4S,7S,10S,13S)-10-bencil-7-isobutil-15-metil-13-((R)-2-metiloxiran-2-carbonil)-2,5,8,11-tetraoxo-4-fenetil-3,6,9,12-tetraazahexadecil)morfolin-4-io (7)

A una solución del compuesto 5b (380 mg, 1.48 mmol) en MeCN (5 mL) se agregó (S)-4-metil-N-((S)-1-(((S)-4-metil-1-((R)-2-metiloxiran-2-il)-1-oxopentan-2-il)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)-2-((S)-2-(2-morfolinoacetamido)-4-fenilbutanamido)pentanamida (532 mg, 0.74 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 45°C durante la noche. El solvente se eliminó bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en columna de gel de sílice (DCM/MeOH = 10:1) para dar lugar al compuesto deseado (6), el cual luego se convirtió en el correspondiente mesilato mediante el tratamiento con resina de intercambio iónico (280 mg, 39% de rendimiento); ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ 10.15 (s, 1H), 9.53 (br s, 1H), 8.03 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.85 (m, 1H), 7.68 (br s, 1H), 7.37 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.26-7.13 (m, 10H), 6.84 (br s, 1H), 6.52 (br s, 1H), 5.20 (m, 2H), 4.97 (m, 1H), 4.50-3.96 (m, 7H), 3.46-3.28 (m, 2H), 3.16 (m, 1H), 3.06-2.92 (m, 3H), 2.85-2.61 (m, 7H), 2.44 (s, 3H), 2.14 (m, 2H), 1.69-1.17 (m, 11H), 0.89-0.83 (m, 12H).

Ejemplo 21 se preparó a partir del compuesto 7 y PEG_{2K}ONH₃⁺.MsO⁻, siguiendo el procedimiento de pegilación general A.

Ejemplo 22: Metansulfonato de 4-(4-acetoxi-3-(1-(PEG_{2K}-imino)etil)bencil)-4-((4S,7S,10S,13S)-10-bencil-7-isobutil-15-metil-13-((R)-2-metiloxiran-2-carbonil)-2,5,8,11-tetraoxo-4-fenetil-3,6,9,12-tetraazahexadecil)morfolin-4-io (5)



Acetato de 2-acetil-4-metilfenilo (1)

A una solución de 1-(2-hidroxi-5-metilfenil)etanona (1.5 g, 0.01 mol) en DCM (15 mL) se agregó TEA (1.5 g, 0.015 mol) y cloruro de acetilo (0.94 g, 0.012 mol) a 0°C. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Dicha mezcla se diluyó con agua (20 mL). La fase de DCM se recolectó, se lavó con salmuera (20 mL), se secó sobre MgSO₄ anhidro, y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en columna de gel de sílice (éter de petróleo/EtOAc = 3:1) para dar lugar al compuesto 1 (0.9 g, 47% de rendimiento); ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7.64 (m, 1H), 7.37 (m, 1H), 7.02 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 2.57 (s, 3H), 2.42 (s, 3H), 2.37 (s, 3H).

Acetato de 2-acetil-4-(bromometil)fenilo (2)

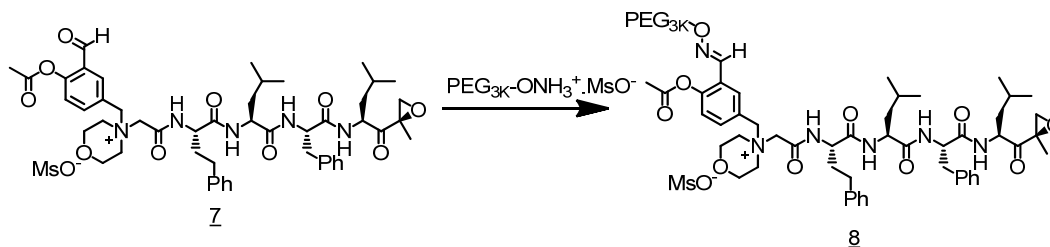
A una solución del compuesto 1 (0.5 g, 2.6 mmol) en CCl₄ (20 mL) se agregó NBS (573 mg, 3.25 mmol) y AIBN (42.6 mg, 0.26 mmol). La mezcla de reacción se calentó bajo reflujo durante la noche. La mezcla se enfrió hasta temperatura ambiente y se filtró. El filtrado se concentró y el residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en columna de gel de sílice (éter de petróleo/EtOAc = 10:1) para dar lugar al compuesto 2 (160 mg, 23% de rendimiento); ¹H RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.02 (m, 1H), 7.73 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.25 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 4.81 (s, 2H), 2.53 (s, 3H), 2.32 (s, 3H).

Metansulfonato de 4-(4-acetoxi-3-acetilbencil)-4-((4S,7S,10S,13S)-10-bencil-7-isobutil-15-metil-13-((R)-2-metiloxiran-2-carbonil)-2,5,8,11-tetraoxo-4-fenetil-3,6,9,12-tetraazahexadecil)morfolin-4-io (4)

A una solución del compuesto 2 (1.03 g, 3.7 mmol) en MeCN (10 mL) se agregó compuesto (S)-4-metil-N-((S)-1-(((S)-4-metil-1-((R)-2-metiloxiran-2-il)-1-oxopentan-2-il)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)-2-((S)-2-(2-morfolinoacetamido)-4-fenilbutanamido)pentanamida (884.7 mg, 1.23 mmol). La mezcla de reacción se calentó a 45°C durante la noche. Un exceso de solvente se concentró y el residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en columna de gel de sílice (EtOAc/MeOH = 100:3) para dar lugar al compuesto deseado 3, el cual se convirtió en el correspondiente mesilato (260 mg, 21% de rendimiento) mediante el tratamiento con resina de intercambio iónico; ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 9.62 (m, 1H), 8.06 (m, 1H), 7.88-7.71 (m, 2H), 7.33-7.11 (m, 11H), 6.95 (m, 1H), 6.66 (m, 1H), 5.33-4.91 (m, 2H), 4.55-3.90 (m, 11H), 3.58-2.91 (m, 4H), 2.85 (s, 3H), 2.74 (m, 2H), 2.61 (s, 3H), 2.40 (s, 3H), 2.31-1.94 (m, 7H), 1.72-1.18 (m, 8H), 0.88 (m, 12H).

El Ejemplo 22 se preparó a partir del compuesto 4 y PEG_{2K}ONH₃⁺.MsO⁻, siguiendo el procedimiento de pegilación general B.

Ejemplo 23: Metansulfonato de 4-(3-acetoxi-4-((PEG_{3K}-imino)metil)bencil)-4-((4S,7S,10S,13S)-10-bencil-7-isobutil-15-metil-13-((R)-2-metiloxiran-2-carbonil)-2,5,8,11-tetraoxo-4-fenetil-3,6,9,12-tetraazahexadecil)morfolin-4-io (8)



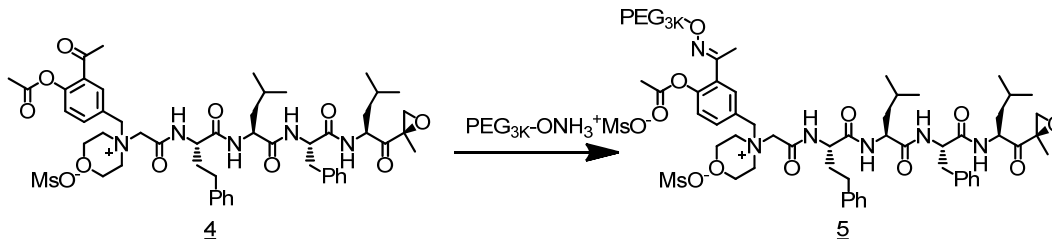
Metansulfonato de 4-(4-acetoxi-3-formilbencil)-4-((4S,7S,10S,13S)-10-bencil-7-isobutil-15-metil-13-((R)-2-metiloxiran-2-carbonil)-2,5,8,11-tetraoxo-4-fenetil-3,6,9,12-tetraazahexadecil)morfolin-4-io (7)

A una solución del compuesto 5b (380 mg, 1.48 mmol) en MeCN (5 mL) se agregó (S)-4-metil-N-((S)-1-(((S)-4-metil-1-((R)-2-metiloxiran-2-il)-1-oxopentan-2-il)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)-2-((S)-2-(2-morfolinoacetamido)-4-fenilbutanamido)pentanamida (532 mg, 0.74 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 45°C durante la noche. El solvente se eliminó bajo presión

reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en columna de gel de sílice (DCM/MeOH = 10:1) para dar lugar al compuesto deseado (**6**), el cual luego se convirtió en el correspondiente mesilato mediante el tratamiento con resina de intercambio iónico (280 mg, 39% de rendimiento); $^1\text{H RMN}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 10.15 (s, 1H), 9.53 (br s, 1H), 8.03 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.85 (m, 1H), 7.68 (br s, 1H), 7.37 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.26-7.13 (m, 10H), 6.84 (br s, 1H), 6.52 (br s, 1H), 5.20 (m, 2H), 4.97 (m, 1H), 4.50-3.96 (m, 7H), 3.46-3.28 (m, 2H), 3.16 (m, 1H), 3.06-2.92 (m, 3H), 2.85-2.61 (m, 7H), 2.44 (s, 3H), 2.14 (m, 2H), 1.69-1.17 (m, 11H), 0.89-0.83 (m, 12H).

El Ejemplo 23 se preparó utilizando métodos análogos a los descritos en el Ejemplo 16, donde los compuestos intermedios se prepararon de una forma similar (utilizando cloruro de acetilo para generar el compuesto intermedio 1 que se muestra en el Ejemplo 16), usando el compuesto 7 y $\text{PEG}_{3\text{K}}\text{ONH}_3^+.\text{MsO}^-$, siguiendo el procedimiento de pegilación general A.

Ejemplo 24: Metansulfonato de 4-(4-acetoxi-3-(1-(PEG_{3K}-imino)etil)bencil)-4-((4S,7S,10S,13S)-10-bencil-7-isobutil-15-metil-13-((R)-2-metiloxiran-2-carbonil)-2,5,8,11-tetraoxo-4-fenetil-3,6,9,12-tetraazahexadecil)morfolin-4-io (**5**)



Metansulfonato de 4-(4-acetoxi-3-acetilbencil)-4-((4S,7S,10S,13S)-10-bencil-7-isobutil-15-metil-13-((R)-2-metiloxiran-2-carbonil)-2,5,8,11-tetraoxo-4-fenetil-3,6,9,12-tetraazahexadecil)morfolin-4-io (**4**)

A una solución del compuesto 2 (1.03 g, 3.7 mmol) en MeCN (10 mL) se agregó compuesto (S)-4-metil-N-(((S)-1-(((S)-4-metil-1-((R)-2-metiloxiran-2-il)-1-oxopentan-2-il)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)-2-((S)-2-(2-morfolinoacetamido)-4-fenilbutanamido)pentanamida (884.7 mg, 1.23 mmol). La mezcla de reacción se calentó a 45°C durante la noche. Un exceso de solvente se concentró y el residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en columna de gel de sílice (EtOAc/MeOH = 100:3) para dar lugar al compuesto deseado 3, el cual se convirtió en el correspondiente mesilato (260 mg, 21% de rendimiento) mediante el tratamiento con resina de intercambio iónico; $^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 9.62 (m, 1H), 8.06 (m, 1H), 7.88-7.71 (m, 2H),

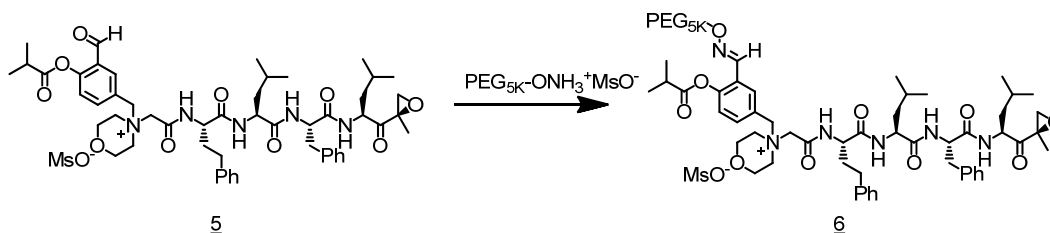
7.33-7.11 (m, 11H), 6.95 (m, 1H), 6.66 (m, 1H), 5.33-4.91 (m, 2H), 4.55-3.90 (m, 11H), 3.58-2.91 (m, 4H), 2.85 (s, 3H), 2.74 (m, 2H), 2.61 (s, 3H), 2.40 (s, 3H), 2.31-1.94 (m, 7H), 1.72-1.18 (m, 8H), 0.88 (m, 12H).

El Ejemplo 24 se preparó utilizando métodos análogos a los descritos en el Ejemplo 22, donde los compuestos intermedios se prepararon de una forma similar, y el compuesto 4 y $\text{PEG}_{3K}\text{ONH}_3^+.\text{MsO}^-$, siguiendo el procedimiento de pegilación general B.

Ejemplo 25: Metansulfonato de 4-((4S,7S,10S,13S)-10-bencil-7-isobutil-15-metil-13-((R)-2-metiloxiran-2-carbonil)-2,5,8,11-tetraoxo-4-fenetil-3,6,9,12-tetraazahexadecil)-4-(3-(2-(PEG_{20K}-4-Arm-imino)etoxi)-4-(pivaloiloxi)bencil)morfolin-4-ilo

El Ejemplo 25 se preparó utilizando métodos análogos a los descritos en el Ejemplo 17, donde los compuestos intermedios se prepararon de una forma similar, a la vez que se utilizó $\text{PEG}_{20K}\text{ONH}_3^+.\text{MsO}^-$ y se siguió el procedimiento de pegilación general B.

Ejemplo 26: Metansulfonato de 4-((4S,7S,10S,13S)-10-bencil-7-isobutil-15-metil-13-((R)-2-metiloxiran-2-carbonil)-2,5,8,11-tetraoxo-4-fenetil-3,6,9,12-tetraazahexadecil)-4-(4-(isobutiriloxi)-3-((PEG_{5K}-imino)metil)bencil)morfolin-4-ilo (6)



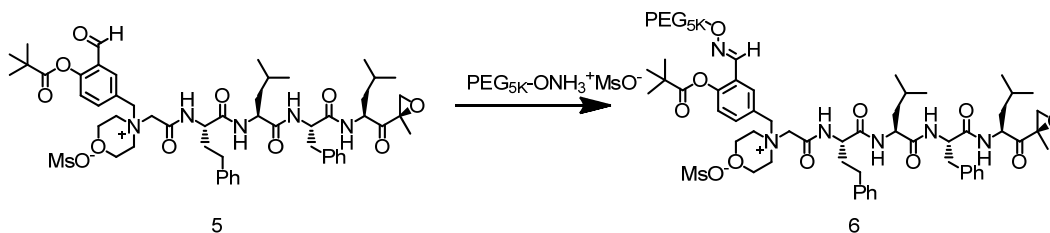
Metansulfonato de 4-((4S,7S,10S,13S)-10-bencil-7-isobutil-15-metil-13-((R)-2-metiloxiran-2-carbonil)-2,5,8,11-tetraoxo-4-fenetil-3,6,9,12-tetraazahexadecil)-4-(3-formil-4-(isobutiriloxi)bencil)morfolin-4-ilo (5)

A una solución del compuesto 3 (550 mg, 1.657 mmol) en MeCN (8 mL) se agregó (S)-4-metil-N-((S)-1-(((S)-4-metil-1-((R)-2-metiloxiran-2-il)-1-oxopentan-2-il)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)-2-((S)-2-(2-morfolinoacetamido)-4-fenilbutanamido)pentanamida (393 mg, 0.547 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 40°C durante la noche. Un exceso de solvente se concentró y el residuo se cristalizó varias veces a partir de (EtOAc/Et₂O = 1:5) para dar lugar al compuesto deseado 4, el cual se convirtió en el correspondiente mesilato 5 (115 mg, 7.5% de rendimiento)

mediante el tratamiento con resina de intercambio iónico; $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 10.18 (s, 1H), 9.68 (m, 1H), 8.04 (m, 1H), 7.89 (m, 1H), 7.81 (s, 1H), 7.35 (m, 1H), 7.30 (m, 1H), 7.11-7.29 (m, 9H), 6.79 (s, 1H), 6.44 (m, 1H), 5.18 (m, 2H), 4.99 (m, 1H), 4.41 (m, 3H), 4.20 (m, 3H), 3.99 (m, 3H), 3.40 (m, 1H), 3.30 (m, 1H), 3.20 (m, 1H), 2.95 (m, 2H), 2.92 (m, 1H), 2.79 (m, 3H), 2.75 (m, 2H), 2.21 (m, 1H), 2.09 (m, 1H), 1.83 (m, 4H), 1.62 (m, 2H), 1.49 (m, 4H), 1.38 (m, 6H), 1.24 (m, 2H), 0.88 (m, 12H).

El Ejemplo 26 se preparó utilizando métodos análogos a los descritos en el Ejemplo 16, donde los compuestos intermedios se prepararon de una forma similar (utilizando cloruro de isopropanoilo para generar el compuesto intermedio 1 que se muestra en el Ejemplo 16), usando el compuesto 5 y $\text{PEG}_{5K}\text{ONH}_3^+.\text{MsO}^-$, siguiendo el procedimiento de pegilación general B.

Ejemplo 27: Metansulfonato de 4-((4S,7S,10S,13S)-10-bencil-7-isobutil-15-metil-13-((R)-2-metiloxiran-2-carbonil)-2,5,8,11-tetraoxo-4-fenetil-3,6,9,12-tetraazahexadecil)-4-(3-((PEG_{5K}-imino)metil)-4-(pivaloiloxi)bencil)morfolin-4-io (6)



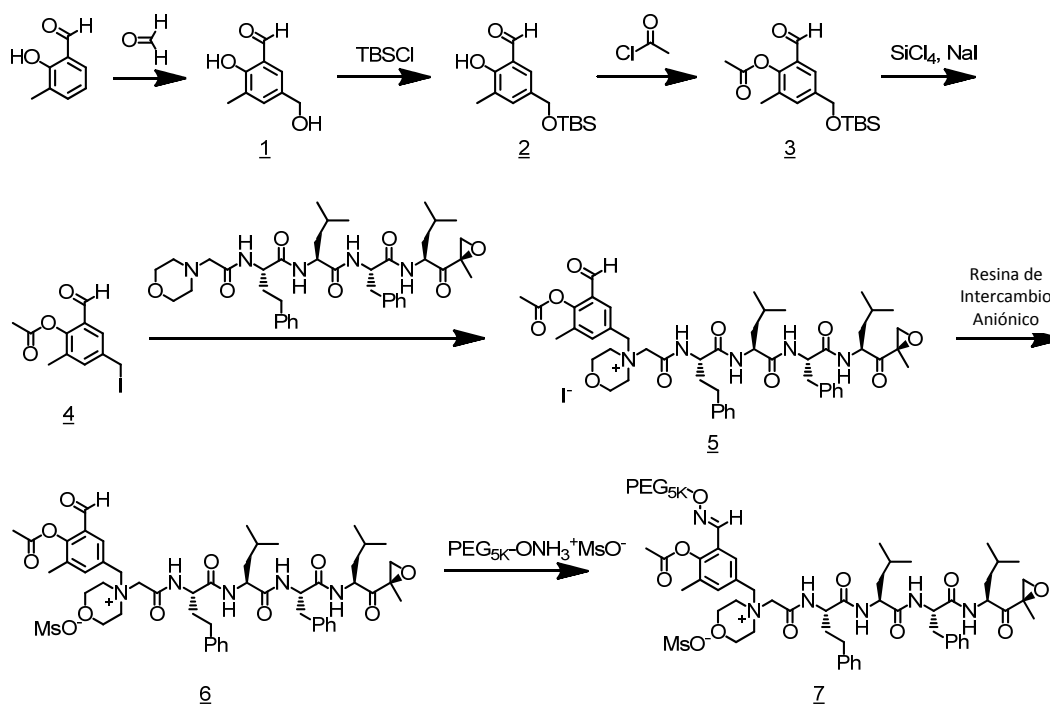
Metansulfonato de 4-((4S,7S,10S,13S)-10-bencil-7-isobutil-15-metil-13-((R)-2-metiloxiran-2-carbonil)-2,5,8,11-tetraoxo-4-fenetil-3,6,9,12-tetraazahexadecil)-4-(3-formil-4-(pivaloiloxi)bencil)morfolin-4-io (5)

A una solución del compuesto 3 (500 mg, 1.44 mmol) en MeCN (8 mL) se agregó (S)-4-metil-N-((S)-1-(((S)-4-metil-1-((R)-2-metiloxiran-2-il)-1-oxopentan-2-il)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)-2-((S)-2-(2-morfolinoacetamido)-4-fenilbutanamido)pentanamida (360 mg, 0.5 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 40°C durante la noche. Un exceso de solvente se concentró y el residuo se cristalizó varias veces a partir de (EtOAc/Et₂O = 1:5) para dar lugar al compuesto deseado 4, el cual se convirtió en el correspondiente mesilato 5 (130 mg, 12% de rendimiento) mediante el tratamiento con resina de intercambio iónico; $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 10.17 (s, 1H), 9.74 (m, 1H), 8.01 (m, 1H), 7.90 (m, 1H), 7.74 (m, 1H), 7.36-7.12 (m, 11H), 6.78 (m, 1H), 6.41 (m, 1H), 5.22 (m, 1H), 5.14 (m, 2H), 4.58-4.35 (m, 3H), 4.28-4.10 (m, 3H), 4.08-3.83 (m, 3H),

3.38 (m, 1H), 3.29 (m, 1H), 3.17 (m, 1H), 2.97 (m, 2H), 2.83 (s, 3H), 2.76 (m, 2H), 2.30-2.20 (m, 2H), 1.70-1.58 (m, 2H), 1.47 (m, 6H), 1.42 (s, 10H), 1.30-1.16 (m, 3H), 0.90-0.84 (m, 12H).

El Ejemplo 27 se preparó utilizando métodos análogos a los descritos en el Ejemplo 16, donde los compuestos intermedios se prepararon de una forma similar (utilizando cloruro de *t*-butanoilo para generar el compuesto intermedio 1 que se muestra en el Ejemplo 16), usando el compuesto 5 y PEG_{5K}ONH₃⁺.MsO⁻, siguiendo el procedimiento de pegilación general B.

Ejemplo 28: Metansulfonato de 4-(4-acetoxi-3-(1-(PEG_{5K}-imino)etil)-5-metilbencil)-4-((4S,7S,10S,13S)-10-bencil-7-isobutil-15-metil-13-((R)-2-metiloxiran-2-carbonil)-2,5,8,11-tetraoxo-4-fenetil-3,6,9,12-tetraazahexadecil)morfolin-4-ilo (7)



2-Hidroxi-5-(hidroximetil)-3-metilbenzaldehído (1)

A una mezcla de 2-hidroxi-3-metilbenzaldehído (5.01 g, 36.84 mmol) y formaldehído (37%, 7.01 g, 86.45 mmol) se agregó HCl concentrado (30 mL) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se calentó a 80°C durante 1 h. Agua (90 mL) se agregó y la mezcla obtenida se extrajo con EtOAc (100 mL×3). Las fases orgánicas combinadas se concentraron y el residuo se trató con agua (150 mL, 40°C). El sólido se separó por filtración y el filtrado se extrajo con EtOAc (100 mL×3). Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO₄ anhidro y se concentraron para dar lugar

al compuesto 1 (2.60 g, 43% de rendimiento); $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 11.26 (s, 1H), 9.88 (s, 1H), 7.41 (s, 2H), 4.66 (s, 2H), 2.28 (s, 3H).

5-(((*tert*-Butildimetilsilil)oxi)metil)-2-hidroxi-3-metilbenzaldehído (2)

A una solución del compuesto 1 (2.60 g, 15.66 mmol) en DCM (50 mL) se agregó imidazol (2.13 g, 31.33 mmol) a 0°C. Se agregó una solución de TBSCl (3.54 g, 23.50 mmol) en DCM (5 mL) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. La mezcla se concentró y el residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en columna de gel de sílice (hexano/EtOAc = 200:1) para dar lugar al compuesto 2 (3.90 g, 88.9% de rendimiento); $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 10.85 (br, s, 1H), 9.96 (s, 1H), 7.44 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 7.33 (d, J = 1.2 Hz, 1H), 4.56 (s, 2H), 2.12 (s, 3H), 0.82 (s, 9H), 0.00 (s, 6H).

Acetato de 4-(((*tert*-butildimetilsilil)oxi)metil)-2-formil-6-metilfenilo (3)

A una solución del compuesto 2 (1.70 g, 6.08 mmol) en DCM (50 mL) se agregó TEA (1.23 g, 12.14 mmol) y cloruro de acetilo (715 mg, 9.11 mmol) a 0°C. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 20 min. La mezcla se diluyó con DCM (50 mL) y luego se vertió en agua (100 mL). Las dos fases se separaron y la fase orgánica se lavó con salmuera (100 mL), se secó sobre MgSO_4 anhidro y se concentró para dar lugar al compuesto crudo 3 (1.94 g, cuantitativo), el cual se utilizó en el próximo paso sin purificación adicional; $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 9.90 (s, 1H), 7.52 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 7.35 (d, J = 1.2 Hz, 1H), 4.63 (s, 2H), 2.30 (s, 3H), 2.11 (s, 3H), 0.83 (s, 9H), 0.00 (s, 6H).

Acetato de 2-formil-4-(yodometil)-6-metilfenilo (4)

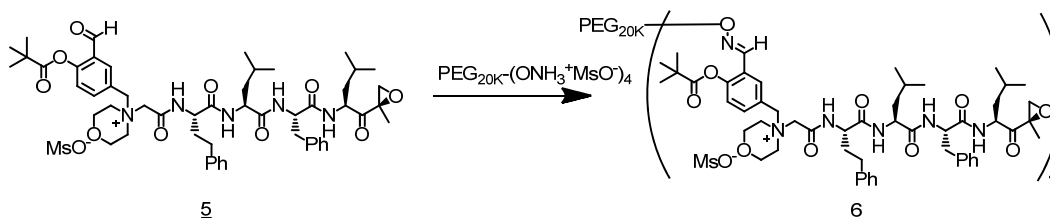
A una solución de NaI (4.66 g, 31.06 mmol) en MeCN (50 mL) se agregó compuesto 3 (2.01 g, 6.21 mmol) y SiCl_4 (1.06 g, 6.21 mmol) a 0°C. La mezcla de reacción se agitó durante 15 min a temperatura ambiente. La mezcla se concentró y el residuo se trató con DCM (100 mL). La mezcla obtenida se filtró y el filtrado se lavó con solución saturada de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (50 mL $\times$ 2), se secó sobre MgSO_4 anhidro y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en columna de gel de sílice (hexano/EtOAc = 15:1) para dar lugar al compuesto 4 (803 mg, 41% de rendimiento); $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 10.00 (s, 1H), 7.70 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.52 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 4.44 (s, 2H), 2.42 (s, 3H), 2.22 (s, 3H).

Metansulfonato de 4-(4-acetoxi-3-acetil-5-metilbencil)-4-((4S,7S,10S,13S)-10-bencil-7-isobutil-15-metil-13-((R)-2-metiloxiran-2-carbonil)-2,5,8,11-tetraoxo-4-fenetil-3,6,9,12-tetraazahexadecil)morfolin-4-io (6)

A una solución del compuesto 4 (803 mg, 1.57 mmol) en MeCN (5 mL) se agregó (S)-4-metil-N-((S)-1-(((S)-4-metil-1-((R)-2-metiloxiran-2-il)-1-oxopentan-2-il)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)-2-((S)-2-(2-morfolinoacetamido)-4-fenilbutanamido)pentanamida (340 mg, 0.47 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 40°C durante la noche. Un exceso de solvente se concentró y el residuo se recrystalizó tres veces a partir de (EtOAc/Et₂O = 1:5) para dar lugar a la sal de yodo deseada 5, el cual se convirtió en el correspondiente mesilato 6 (202 mg, 47% de rendimiento) mediante el tratamiento con resina de intercambio iónico; ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 10.05 (s, 1H), 9.55 (m, 1H), 7.86 (m, 1H), 7.74 (m, 2H), 7.13-7.29 (m, 10H), 6.85 (m, 1H), 6.51 (m, 1H), 5.23 (m, 1H), 5.05 (m, 2H), 4.45 (m, 5H), 4.22 (m, 5H), 4.00 (m, 4H), 3.30-3.52 (m, 2H), 3.17 (m, 1H), 2.98 (m, 2H), 2.83 (s, 4H), 2.76 (m, 2H), 2.46 (s, 3H), 2.29 (s, 3H), 2.08-2.25 (m, 2H), 1.48-1.69 (m, 4H), 1.45 (m, 2H), 1.38 (m, 2H), 1.25 (m, 2H), 0.88 (m, 12H).

El Ejemplo 28 se preparó a partir del compuesto 6 y PEG_{5K}ONH₃⁺.MsO⁻, siguiendo el procedimiento de pegilación general B.

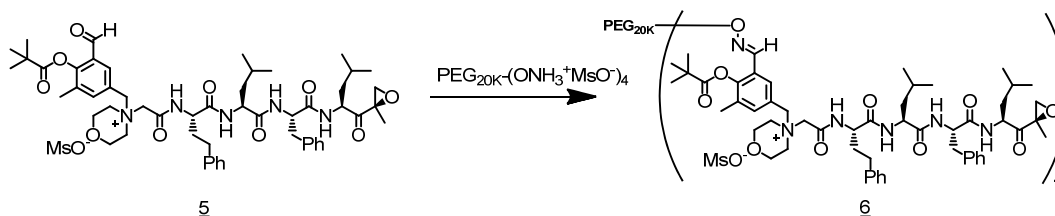
Ejemplo 29: Metansulfonato de 4-((4S,7S,10S,13S)-10-bencil-7-isobutil-15-metil-13-((R)-2-metiloxiran-2-carbonil)-2,5,8,11-tetraoxo-4-fenetil-3,6,9,12-tetraazahexadecil)-4-(3-((PEG_{20K}-4-Arm-imino)metil)-4-(pivaloiloxi)bencil)morfolin-4-io



6.41 (m, 1H), 5.22 (m, 1H), 5.14 (m, 2H), 4.58-4.35 (m, 3H), 4.28-4.10 (m, 3H), 4.08-3.83 (m, 3H), 3.38 (m, 1H), 3.29 (m, 1H), 3.17 (m, 1H), 2.97 (m, 2H), 2.83 (s, 3H), 2.76 (m, 2H), 2.30-2.20 (m, 2H), 1.70-1.58 (m, 2H), 1.47 (m, 6H), 1.42 (s, 10H), 1.30-1.16 (m, 3H), 0.90-0.84 (m, 12H).

El Ejemplo 29 se preparó utilizando métodos análogos a los descritos en el Ejemplo 18, donde los compuestos intermedios se prepararon de una forma similar (utilizando cloruro de t-butanoilo para generar el compuesto intermedio 1 que se muestra en el Ejemplo 18), usando el compuesto 5 y PEG_{20K}-(ONH₃⁺.MsO⁻)₄, siguiendo el procedimiento de pegilación general B.

Ejemplo 30: Metansulfonato de 4-((4S,7S,10S,13S)-10-bencil-7-isobutil-15-metil-13-((R)-2-metiloxiran-2-carbonil)-2,5,8,11-tetraoxo-4-fenetil-3,6,9,12-tetraazahexadecil)-4-(3-(PEG_{20K}-4-Arm-imino)metil)-5-metil-4-(pivaloiloxi)bencil)morfolin-4-io (6)



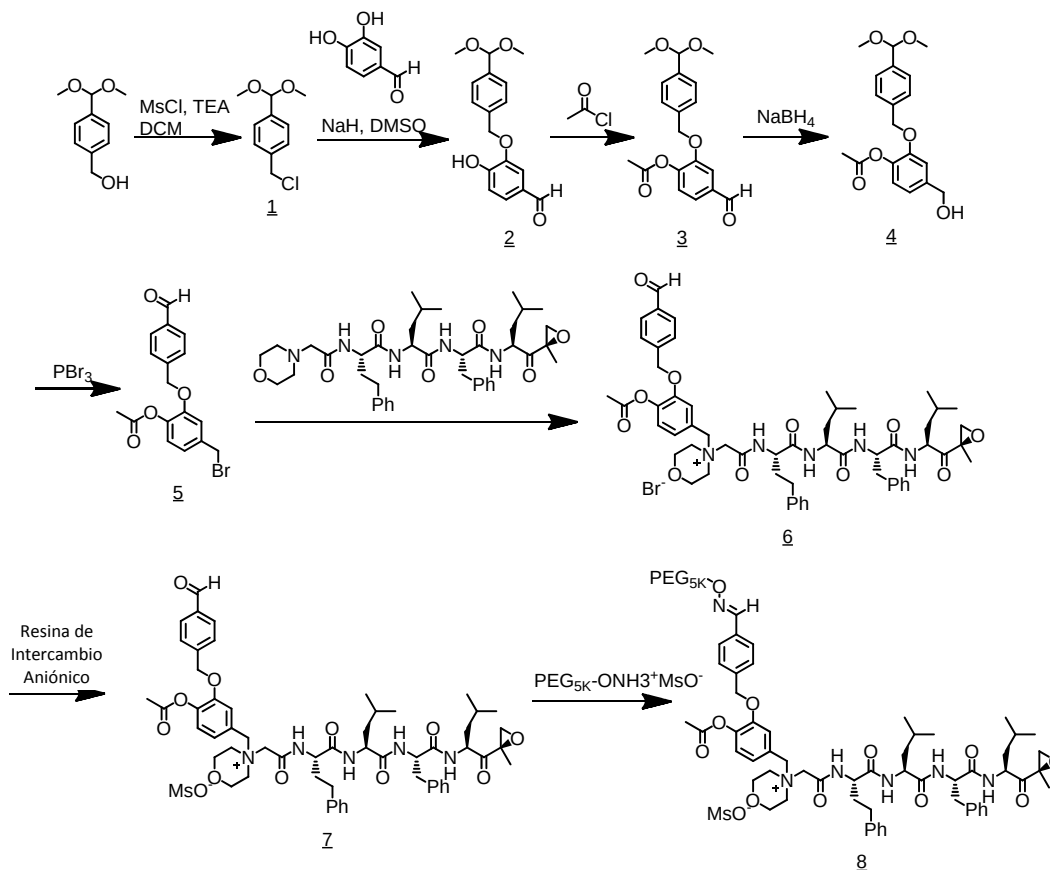
Metansulfonato de 4-((4S,7S,10S,13S)-10-bencil-7-isobutil-15-metil-13-((R)-2-metiloxiran-2-carbonil)-2,5,8,11-tetraoxo-4-fenetil-3,6,9,12-tetraazahexadecil)-4-(3-formil-5-metil-4-(pivaloiloxi)bencil)morfolin-4-io (5)

A una solución del compuesto 3 (900 mg, 2.60 mmol) en MeCN (8 mL) se agregó (S)-4-metil-N-((S)-1-(((S)-4-metil-1-((R)-2-metiloxiran-2-il)-1-oxopentan-2-il)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)-2-((S)-2-(2-morfolinoacetamido)-4-fenilbutanamido)pentanamida (624 mg, 0.87 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 40°C durante la noche. Un exceso de solvente se concentró y el residuo se cristalizó varias veces a partir de (EtOAc/Et₂O = 1:5) para dar lugar al compuesto deseado 4, el cual se convirtió en el correspondiente mesilato 5 (222 mg, 9.0% de rendimiento) mediante el tratamiento con resina de intercambio iónico; ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 10.05 (s, 1H), 9.66 (m, 1H), 7.82 (m, 3H), 7.12-7.30 (m, 10H), 6.84 (m, 1H), 6.47 (m, 1H), 5.19 (m, 1H), 5.01 (m, 2H), 4.47 (m, 5H), 4.20 (m, 4H), 3.98 (m, 4H), 3.40 (m, 1H), 3.28 (m, 1H), 3.17 (m, 1H), 2.98 (m, 2H), 2.83 (m, 4H), 2.73 (m, 2H), 2.25 (m, 3H), 2.10 (m, 2H), 1.61 (m, 2H), 1.47 (m, 12H), 1.26 (m, 2H), 0.87 (m, 12H).

El Ejemplo 30 se preparó utilizando métodos análogos a los descritos en el Ejemplo 28, donde los compuestos intermedios se prepararon de una forma similar (utilizando cloruro de t-

butanoilo para generar el compuesto intermedio 1 que se muestra en el Ejemplo 28), usando el compuesto 5 y PEG_{20K}(ONH₃⁺.MsO⁻)₄, siguiendo el procedimiento de pegilación general B.

Ejemplo 31: Metansulfonato de 4-(4-acetoxi-3-((4-(PEG_{5K}-imino)metil)bencil)oxi)bencil)-4-((4S,7S,10S,13S)-10-bencil-7-isobutil-15-metil-13-((R)-2-metiloxiran-2-carbonil)-2,5,8,11-tetraoxo-4-fenetil-3,6,9,12-tetraazahexadecil)morfolin-4-io (8)



1-(Clorometil)-4-(dimetoximetil)benceno (1)

A una solución de 4-(dimetoximetil)fenil)metanol (200 mg, 1.1 mmol) en DCM (10 ml) se agregó TEA (365.6 mg, 3.62 mmol) y MsCl (207.6 mg, 1.813 mmol) a 0°C. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 h, y luego se vertió en solución saturada de NaHCO₃ (10 mL). Las dos fases se separaron, y la capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentró para dar lugar al compuesto 1 (200 mg, 91%), el cual se utilizó en el próximo paso sin purificación adicional.

4-(4-(Dimetoximetil)benciloxi)-3-hidroxibenzaldehído (2)

A una solución del compuesto 1 (200 mg, 0.998 mmol) en DMSO (5 mL) se agregó NaH (37.4 mg, 1.1 mmol) a temperatura ambiente. Después de 30 min de reacción, se agregó una solución de 3,4-dihidroxibenzaldehído (137.7 mg, 0.998 mmol) en DMSO (5 mL) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla se vertió en solución saturada de NaHCO₃ (10 mL) y la mezcla obtenida se extrajo con DCM (10 mL×2). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentraron para dar lugar al compuesto 2 (300 mg, crudo), el cual se utilizó en el próximo paso sin purificación adicional.

Acetato de 2-(4-(Dimetoximetil)benciloxi)-4-formilfenilo (3)

A una solución del compuesto 2 (300 mg, 1 mmol) en DCM (10 mL) se agregó TEA (202 mg, 2 mmol) y AcCl (102 mg, 1.3 mmol) a 0°C. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 h, y luego se vertió en solución saturada de NaHCO₃ (10 mL). Las dos fases se separaron, y la capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentró para dar lugar al compuesto 3 (200 mg, crudo), el cual se utilizó en el próximo paso sin purificación adicional.

Acetato de 2-(4-(Dimetoximetil)benciloxi)-4-(hidroximetil)fenilo (4)

A una solución del compuesto 3 (200 mg, 0.58 mmol) en DCM/MeOH (10 mL/1mL), se agregó NaBH₄ (19.8 mg, 0.58 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 0°C durante 1 hora y luego se diluyó con acetona (5 mL). La mezcla se vertió en solución acuosa saturada de NaHCO₃ (10 mL) y se extrajo con DCM (10 mL×2). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentraron para dar lugar al compuesto 4 (300 mg, crudo), el cual se utilizó en el próximo paso sin purificación adicional.

Acetato de 4-(bromometil)-2-(4-formilbenciloxi)fenilo (5)

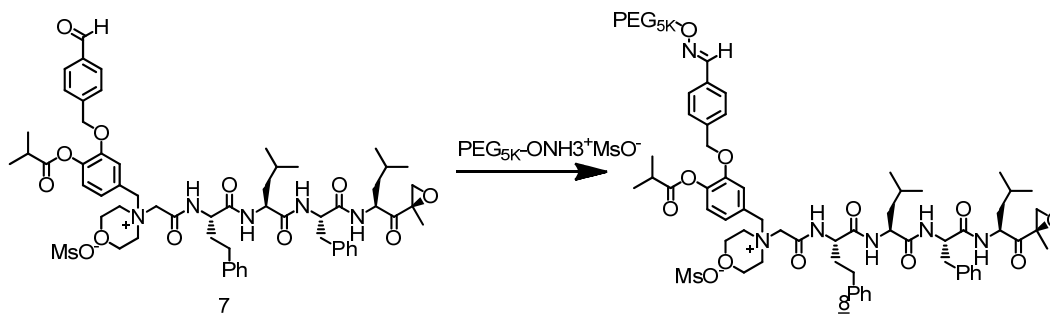
A una solución del compuesto 4 (1.8 g, 5.2 mmol) en DCM (50 mL) se agregó PBr₃ (1.41 g, 5.2 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas y luego se diluyó con solución acuosa saturada de NaHCO₃ (60 mL). Las dos capas se separaron y la fase acuosa se extrajo con DCM (50 mL×2). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentraron. El residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en columna de gel de sílice (éter de petróleo/EtOAc = 4:1) para dar lugar al compuesto 5 (327 mg, 15% de rendimiento); ¹H RMN (400 MHz, DMSO): δ 10.01 (s, 1H), 7.96-7.94 (m, 2H), 7.62-7.60 (m, 2H), 7.31 (m, 1H), 7.13- 7.07 (m, 2H), 5.26 (s, 2H), 4.68 (s, 2H), 2.27 (s, 3H).

Metansulfonato de 4-(4-acetoxi-3-((4-formilbencil)oxi)bencil)-4-((4S,7S,10S,13S)-10-bencil-7-isobutil-15-metil-13-((R)-2-metiloxiran-2-carbonil)-2,5,8,11-tetraoxo-4-fenetil-3,6,9,12-tetraazahexadecil)morfolin-4-io (7)

A una solución del compuesto 5 (320 mg, 0.884 mmol) en MeCN (6 mL) se agregó (S)-4-metil-N-((S)-1-(((S)-4-metil-1-((R)-2-metiloxiran-2-il)-1-oxopentan-2-il)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)-2-((S)-2-(2-morfolinoacetamido)-4-fenilbutanamido)pentanamida (254 mg, 0.354 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 45°C durante 48 horas. Un solvente en exceso se evaporó y el residuo se cristalizó varias veces a partir de MeCN/Et₂O (1/5, v/v) para dar lugar al producto deseado 6, el cual luego se convirtió en el correspondiente compuesto de mesilato 7 (180 mg, 47% de rendimiento) mediante el tratamiento con resina de intercambio iónico.

Una solución del compuesto 7 (500 mg, 0.46 mmol), ácido 2-amino-5-metoxibenzoico (25.5 mg, 0.14 mmol) y PEG-O-NH₂ (sal de mesilato, 2.12 g, 0.41 mmol) en DCM se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. La mezcla de reacción luego se concentró y el residuo se disolvió en *i*-PrOH a 40°C. La solución se enfrió hasta temperatura ambiente y Et₂O se agregó para inducir la cristalización. La mezcla se mantuvo en baño de hielo durante 10 min y luego se filtró. La torta de filtración se cristalizó a partir de *i*-PrOH/Et₂O (5/2) para dar lugar a 8 (2.10 g, 82% de rendimiento).

Ejemplo 32: Metansulfonato de 4-((4S,7S,10S,13S)-10-bencil-7-isobutil-15-metil-13-((R)-2-metiloxiran-2-carbonil)-2,5,8,11-tetraoxo-4-fenetil-3,6,9,12-tetraazahexadecil)-4-(4-(isobutiriloxi)-3-((4-(PEG_{5K}-imino)metil)bencil)oxi)bencil)morfolin-4-io (8)



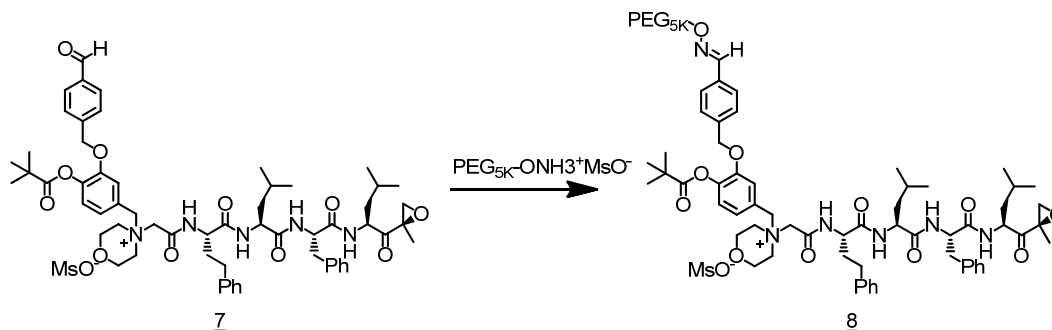
Metansulfonato de 4-((4S,7S,10S,13S)-10-bencil-7-isobutil-15-metil-13-((R)-2-metiloxiran-2-carbonil)-2,5,8,11-tetraoxo-4-fenetil-3,6,9,12-tetraazahexadecil)-4-(3-(4-formilbenciloxi)-4-(isobutiriloxi)bencil)morfolin-4-io (7)

A una solución del compuesto 5 (310.4 mg, 0.80 mmol) en MeCN (2 mL) se agregó (S)-4-metil-N-((S)-1-(((S)-4-metil-1-((R)-2-metiloxiran-2-il)-1-oxopentan-2-il)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)-2-((S)-2-(2-morfolinoacetamido)-4-fenilbutanamido)pentanamida (286 mg, 0.30 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 45°C durante 48 horas. Un solvente en exceso se evaporó y el residuo se cristalizó varias veces a partir de MeCN/Et₂O (1/5, v/v) para dar lugar al producto

deseado 6, el cual luego se convirtió en el correspondiente compuesto de mesilato 7 (280 mg, 83% de rendimiento) mediante el tratamiento con resina de intercambio iónico.

Una solución del compuesto 6 (280 mg, 0.25 mmol), ácido 2-amino-5-metoxibenzoico (14.0 mg, 0.026 mmol) y PEG-O-NH₂ (sal de mesilato, 1.16 g, 0.227 mmol) en DCM (3 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. La mezcla de reacción luego se concentró y el residuo se disolvió en *i*-PrOH a 40°C. La solución se enfrió hasta temperatura ambiente y se agregó Et₂O para inducir la cristalización. La mezcla se mantuvo en baño de hielo durante 10 min y el sólido formado se recolectó mediante filtración. La recrystalización a partir de *i*-PrOH/Et₂O (5:2) se repitió dos veces hasta que todo el 7 se eliminó para dar lugar al 8 (1.0 g, 72% de rendimiento).

Ejemplo 33: Metansulfonato de 4-((4*S*,7*S*,10*S*,13*S*)-10-bencil-7-isobutil-15-metil-13-((*R*)-2-metiloxiran-2-carbonil)-2,5,8,11-tetraoxo-4-fenetil-3,6,9,12-tetraazahexadecil)-4-(3-((4-(PEG_{5K}-imino)metil)bencil)oxi)-4-(pivaloiloxi)bencil)morfolin-4-io (8)

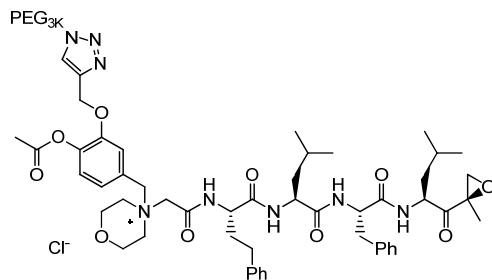


(m, 1H), 6.89 (m, 1H), 6.44 (m, 1H), 5.18 (m, 2H), 5.05-5.03 (m, 1H), 4.92-4.88 (m, 2H), 4.46-4.42 (m, 4H), 4.18-4.03 (m, 4H), 3.94-3.90 (m, 3H), 3.40-3.32 (m, 1H), 3.27-3.20 (m, 1H), 3.13 (m, 1H), 3.00-2.98 (m, 2H), 3.82-2.80 (m, 3H), 2.79 (m, 1H), 2.74-2.72 (m, 2H), 2.19 (m, 1H), 2.10-1.97 (m, 4H), 1.64-1.55 (m, 2H), 1.48-1.44 (m, 5H), 1.29 (m, 6H), 0.88-0.81 (m, 12H).

Una solución del compuesto 7 (170 mg, 0.15 mmol), ácido 2-amino-5-metoxibenzoico (28.2 mg, 0.016 mmol) y PEG-O-NH₂ (sal de mesilato, 614 mg, 0.12 mmol) en DCM se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. La mezcla de reacción luego se concentró y el residuo se disolvió en *i-PrOH* a 40°C. La solución se enfrió hasta temperatura ambiente y se agregó Et₂O para inducir la cristalización. La mezcla se mantuvo en baño de hielo durante 10 min y luego se filtró. La torta de filtración se cristalizó a partir de *i-PrOH*/Et₂O (5/2) para dar lugar al 8 (580 mg, 77%).

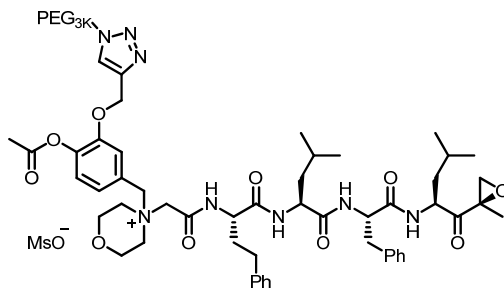
Los ejemplos representativos de profármacos de carfilzomib de los ejemplos 31-33 de la invención dan a conocer conjugados unidos por oximas con estabilidad química potencialmente mejorada. En estos ejemplos la conexión por oximas está espaciada con un grupo benciloxi donador de electrones para aumentar la estabilidad general del constructo de PEG.

Ejemplo 34: Cloruro de 4-(4-acetoxi-3-((1-PEG_{3K}-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)bencil)-4-((4S,7S,10S,13S)-10-bencil-7-isobutil-15-metil-13-((R)-2-metiloxiran-2-carbonil)-2,5,8,11-tetraoxo-4-fenetil-3,6,9,12-tetraazahexadecil)morfolin-4-io



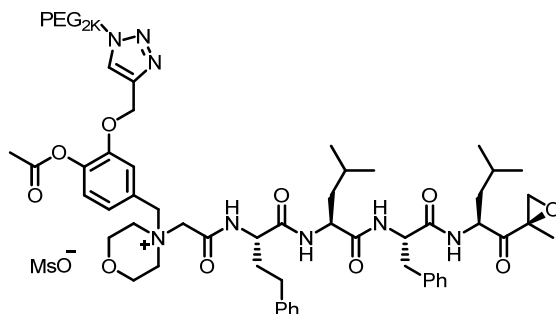
El Ejemplo 34 se preparó utilizando un método análogo al que se describe en los Ejemplos 5-11 y el método A, pero utilizando el compuesto intermedio de sal de cloruro que posee un anión cloruro como contraión.

Ejemplo 35: Mesilato de 4-(4-acetoxi-3-((1-PEG_{3K}-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)bencil)-4-((4S,7S,10S,13S)-10-bencil-7-isobutil-15-metil-13-((R)-2-metiloxiran-2-carbonil)-2,5,8,11-tetraoxo-4-fenetil-3,6,9,12-tetraazahexadecil)morfolin-4-io



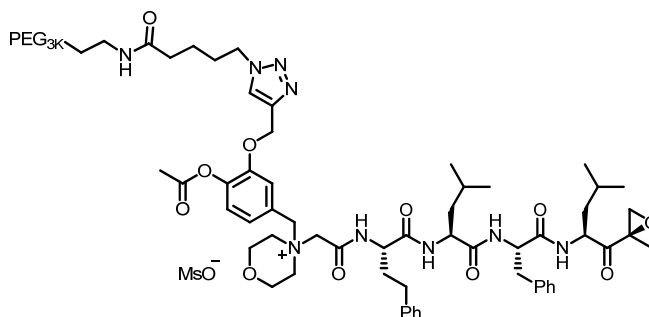
El Ejemplo 35 se preparó utilizando un método análogo al que se describe en los Ejemplos 5-11 y el método A utilizando un PEG_{3K}N₃. ¹H RMN (DMSO-d₆, 400 MHz): δ 9.19 (M, 1H), 8.24 (m, 2H), 8.12 (m, 1H), 7.90 (m, 1H), 7.62 (m, 1H), 7.22 (m, 13 H), 7.0 (m, 1H), 5.26 (m, 2H), 4.88 (m, 2H), 4.53 (m, 3H), 4.37 (br s, 4H), 4.05 (m, 5H), 3.81 (m, 2H), 3.68 (m, 4H), 3.52 (br s, 339H), 3.30 (m, 4H), 3.24 (s, 4H), 2.94 (m, 2H), 2.75 (m, 1H), 2.63 (m, 2H), 2.24 (s, 3H), 1.87 (m, 2H), 1.59 (m, 2H), 1.40 (m, 7H), 0.84 (m, 12H)

Ejemplo 36: Mesilato de 4-(4-acetoxi-3-((1-PEG_{2K}-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)bencil)-4-((4S,7S,10S,13S)-10-bencil-7-isobutil-15-metil-13-((R)-2-metiloxiran-2-carbonil)-2,5,8,11-tetraoxo-4-fenetil-3,6,9,12-tetraazahexadecil)morfolin-4-io



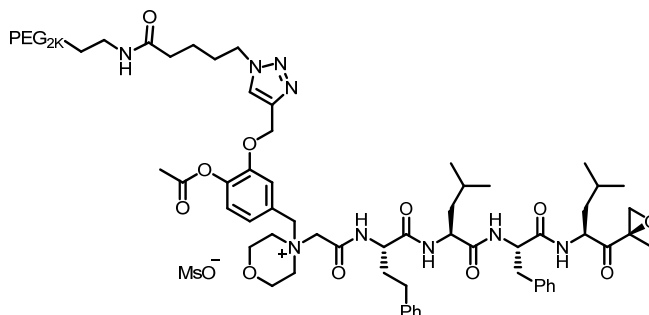
El Ejemplo 36 se preparó utilizando un método análogo al que se describe en los Ejemplos 5-11 y el método A utilizando un PEG_{2K}N₃. ¹H RMN (DMSO-d₆, 400 MHz): δ 9.44 (M, 1H), 8.26 (m, 2H), 8.16 (m, 1H), 8.00 (m, 1H), 7.62 (m, 1H), 7.22 (m, 13 H), 5.26 (m, 2H), 5.00 (m, 2H), 4.54 (m, 3H), 4.37 (m, 5H), 4.09 (m, 4H), 3.81 (m, 2H), 3.68 (m, 2H), 3.50 (br s, 218H), 3.32 (m, 2H), 3.27 (s, 1H), 3.26 (s, 4H), 2.94 (m, 2H), 2.76 (m, 1H), 2.61 (m, 2H), 2.24 (s, 3H), 1.90 (m, 2H), 1.62 (m, 2H), 1.40 (m, 7H), 0.82 (m, 12H)

Ejemplo 37: Mesilato de 4-(4-acetoxi-3-((1-(5-((2-PEG_{3K}-etil)amino)-5-oxopentil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)bencil)-4-((4S,7S,10S,13S)-10-bencil-7-isobutil-15-metil-13-((R)-2-metiloxiran-2-carbonil)-2,5,8,11-tetraoxo-4-fenetil-3,6,9,12-tetraazahexadecil)morfolin-4-io



El Ejemplo 37 se preparó utilizando un método análogo al que se describe en los Ejemplos 5-11 y el método A utilizando un PEG_{3K} con un conector derivado a partir de ácido 5-azidopentanoico. ¹H RMN (DMSO-d₆, 400 MHz): δ 9.26 (M, 1H), 8.25 (m, 2H), 8.17 (m, 1H), 7.98 (d, 1H), 7.87 (m, 1H), 7.62 (m, 1H), 7.22 (m, 11 H), 7.02 (m, 1H), 4.99 (m, 2H), 4.56 (m, 1H), 4.37 (br s, 6H), 4.11 (m, 3H), 3.71 (m, 3H), 3.52 (br s, 304H), 3.25 (br s, 7H), 2.75 (m, 1H), 2.61 (m, 2H), 2.24 (s, 3H), 2.11 (m, 1H), 1.87 (m, 2H), 1.40 (m, 5H), 0.82 (m, 12H)

Ejemplo 38: Mesilato de 4-(4-acetoxi-3-((1-(5-((2-PEG_{2K}-etil)amino)-5-oxopentil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)bencil)-4-((4S,7S,10S,13S)-10-bencil-7-isobutil-15-metil-13-((R)-2-metiloxiran-2-carbonil)-2,5,8,11-tetraoxo-4-fenetil-3,6,9,12-tetraazahexadecil)morfolin-4-ilo



El Ejemplo 38 se preparó utilizando un método análogo al que se describe en los Ejemplos 5-11 y el método A utilizando un PEG_{2K} con un conector derivado a partir de ácido 5-azidopentanoico. ¹H RMN (DMSO-d₆, 400 MHz): δ 9.56 (M, 1H), 8.29 (m, 2H), 8.18 (m, 1H), 8.04 (m, 1H), 7.92 (m, 1H), 7.62 (m, 1H), 7.22 (m, 11 H), 7.0 (m, 1H), 5.38 (m, 2H), 4.99 (m, 2H), 4.56 (m, 1H), 4.37 (br s, 7H), 4.19 (m, 3H), 4.02 (m, 3H), 3.52 (br s, 179H), 3.25 (br s, 5H), 2.94 (m, 2H), 2.80 (m, 1H), 2.63 (m, 2H), 2.24 (s, 3H), 2.10 (m, 2H), 1.87 (m, 2H), 1.40 (m, 9H), 0.82 (m, 12H)

Se puede demostrar que los compuestos ejemplificativos de la presente invención son efectivos en el tratamiento de diversos tipos de cáncer, incluido, sin limitarse al mismo, el mieloma

múltiple, en virtud de poseer perfiles farmacocinéticos y farmacodinámicos adecuados y suficientes para proporcionar dicho tratamiento contra el cáncer. Las siguientes descripciones ejemplificativas y las figuras adjuntas muestran algunos de estos perfiles farmacocinéticos y farmacodinámicos de una selección de los compuestos representativos de la invención.

Ejemplo 39: Conversión del compuesto carfilzomib pegilado plasma humano

Protocolo de conversión en plasma humano:

Se preparó una solución madre 1 milimolar (mM) del compuesto de prueba deseado en DMSO. Se preparó una solución 25 μ M del compuesto de prueba en acetonitrilo : agua por dilución de 1mM de la solución madre (es decir, 2.5 μ L de 1 mM de solución madre 1 se añadieron a 97.5 μ L de acetonitrilo: agua (50:50)). El plasma humano congelado (combinado de 5 individuos masculinos, anticoagulante 2KEDTA) se descongeló a temperatura ambiente y se centrifugó a 1400 x RCF 4°C, durante 15 minutos. Aproximadamente el 90% de la fracción sobrenadante limpia se transfirió a un tubo separado y se usó para el ensayo. Para muestras de tiempo 0 min, el plasma fue inactivado por calor a 80°C. A 72 μ L de plasma inactivado por calor se añadieron 3 μ L de la solución de trabajo 25 μ M y se añadieron 50 μ L de muestra con 200 μ L de acetonitrilo que contenía el estándar interno. Para el ensayo, se preparó una muestra de incubación 1 μ M añadiendo 20 μ L de 25 μ L de la solución de trabajo a 480 μ L de plasma. Las muestras se incubaron durante 0, 5, 1, 2, 4 y 6 h a 37°C en el baño de agua de un agitador de balanceo con agitación suave. En cada punto de tiempo, se precipitaron 50 μ L de muestra con 200 μ L de acetonitrilo que contenía el estándar interno y se centrifugó a 4000 x RCF, 4°C durante 20 minutos. Se diluyeron 150 μ L de sobrenadante con 150 μ L de agua y se analizó mediante LC-MS/MS. Se generó una curva de calibración de 8 puntos usando plasma con 5 μ L de concentración más alta de carfilzomib seguido de una dilución de 2.5 tantos. La cantidad de carfilzomib liberado se cuantificó frente a la curva de calibración y se informó en μ M.

La Figura 1 muestra la tasa de conversión de los ejemplos representativos de los compuestos de carfilzomib pegilados a la forma activa de carfilzomib, conjugada no pegilada. Como se muestra, los compuestos ejemplificativos de la invención aportan concentraciones de plasma de carfilzomib a partir del tiempo 0 y gradualmente incrementando, para la mayoría de los ejemplos representados, hasta alcanzar concentraciones significativas que duran hasta 2 horas y, en algún caso, más de 2 horas. Esta figura muestra que la semivida proyectada de los compuestos ejemplificativos de la presente invención es de menos 2 horas, y potencialmente más larga en plasma humano. Por lo tanto, la Figura 1 ilustra que los compuestos de carfilzomib pegilados de la presente invención

proporcionan una liberación lenta de la forma activa de carfilzomib en el plasma sanguíneo, de este modo permitiendo a carfilzomib una duración potencialmente más larga de acción sobre las enzimas proteosómicas celulares resultando en un efecto inhibitor prolongado de la actividad del proteasoma.

La concentración plasmática media (μM) después de la administración intravenosa del pegilado conjugado de carfilzomib a ratones Balb/c hembras ($n = 3$). La dosis indicada se expresa en mg/kg del pegilado conjugado de carfilzomib.

Ejemplo 40: pK de carfilzomib pegilado en ratones

Se administraron compuestos pegilados de carfilzomib a ratones (Balb/c, hembra, $n = 3$ por grupo de dosis) en la forma de bolo intravenoso (iv) a la dosis especificada (volumen de dosis 5 mL/kg) en una solución acuosa que contenía 10% (p/v) de etanol. Se recogieron muestras de sangre en los momentos indicados y las concentraciones plasmáticas de carfilzomib se midieron por duplicado mediante LC/MS-MS. El perfil de control para la comparación era una formulación estándar de carfilzomib, es decir, una formulación de solución acuosa de 10% de sulfobutiloéter- β -ciclodextrina (p/v) y 10 mmol/L de citrato de sodio (pH 3.5) para administración (5 mg/kg). Este estándar de carfilzomib representa la formulación actualmente aprobada para carfilzomib para el tratamiento del mieloma múltiple. Las diferentes dosis administradas a los ratones para los ejemplos 13, 16 y 18 reflejan una cantidad de carfilzomib presente y dosificada y una cantidad calculada aproximadamente igual a la cantidad de carfilzomib proporcionada en la formulación estándar de carfilzomib.

Como se muestra en la Figura 2, mientras que el Ejemplo 18 exhibió un perfil similar al del carfilzomib de control, los Ejemplos 13 y 16 exhibieron extensiones en sus perfiles. Particularmente, el Ejemplo 16 exhibió una disponibilidad mejorada de carfilzomib activo libre durante el mismo periodo de tiempo que para el control. Sin embargo, el Ejemplo 13 exhibió una liberación de carfilzomib durante un periodo de tiempo mucho más prolongado que el carfilzomib control, lo que resultó en una concentración significativamente mayor del carfilzomib en el plasma durante dicho periodo de tiempo. La concentración plasmática para el Ejemplo 13 fue varias veces superior en escala logarítmica respecto a la de control.

Ejemplo 41: Inhibición del proteasoma con los compuestos de carfilzomib pegilados vs. carfilzomib

Se administró compuesto de carfilzomib pegilado del ejemplo 1 a ratones (Balb/c, hembra, n= 3 por grupo de dosis) en la forma de bolo intravenoso (iv) a la dosis especificada (volumen de dosis 5 mL/kg) en una solución acuosa que contiene 10% (p/v) de etanol. El carfilzomib estándar se formuló en una solución acuosa de 10% de sulfobutilo-éter- β -ciclodextrina al (p/v) y 10 mmol/L de citrato de sodio (pH 3.5) para administración (5 mg/kg). En los puntos de tiempo seleccionados después de la administración i.v. del fármaco, se obtuvieron muestras de tejido (suprarrenal, corazón, hígado y médula ósea). Se recolectó sangre entera por punción cardiaca en tubos que contenían heparina sódica.

Sangre: Se recolectan aproximadamente 0.4 mL de sangre entera utilizando tubos de microcentrifugado EDTA. Las muestras se colocan inmediatamente en hielo y se centrifugan a velocidad máxima durante 2 minutos en una microcentrífuga a temperatura ambiente (RT). Los peletizados de células se almacenan en hielo húmedo. Los peletizados de células sanguíneas enteras se resuspenden en 1 mL de solución salina amortiguada con fosfato (PBS) y se centrifugan a velocidad máxima a 4°C. Los sobrenadantes se eliminan y los peletizados se lavan una segunda vez con PBS. Las muestras se resuspenden en 2 volúmenes de solución amortiguadora de lisis (Tris 20 mM, pH 8.0, 5 mM EDTA), luego se congelan y se almacenan a -80°C hasta el análisis.

Tejido de glándulas suprarrenales, corazón e hígado:

Se recogieron tejidos (glándulas suprarrenales, corazón e hígado) en los puntos de tiempo gráficos especificados después de la dosificación. Se cortaron los tejidos y se colocaron en tubos de 15 mL que contenían PBS a 4°C. Para tejidos que se homogeneizaron, las muestras se picaron con tijeras y se colocaron porciones de -0.1 – 0.2 mg en tubos de microcentrífuga de 2 mL. Las porciones de tejido se congelaron y se almacenaron a -80°C.

Procesamiento de las muestras:

Todas las muestras se descongelaron en hielo. Todos los peletizados de célula sencilla en solución amortiguadora de lisis (sangre completa) se sometieron a agitación en vortex por un tiempo breve y luego se centrifugaron a 14.000 rpm en una microcentrífuga a 4°C durante 15 minutos. El sobrenadante se transfirió en una relación de 100 μ L a 25 μ L de 50% de glicerol en una placa de muestra para obtener una concentración final de glicerol de 10%. Estas muestras estuvieron listas para ensayar, o pueden ser congeladas a -80°C. Se añadieron aproximadamente 2 volúmenes de solución amortiguadora de lisis y una cama de perlas de acero inoxidable a las partes de tejido descongeladas (glándulas suprarrenales, corazón e hígado). Las muestras se homogeneizaron a 20 MHz durante 60 segundos en cada lado y luego se centrifugaron a 14.000 rpm en una microcentrífuga a 4°C durante 15 minutos. El sobrenadante se transfirió en una relación de

100 µl a 25 µl de glicerol al 50% en una placa de muestra para obtener una concentración final de glicerol de 10%. Se tuvo cuidado de evitar la capa lipídica superior para tejidos con alto contenido de grasa (es decir, suprarrenal). Estas muestras estuvieron listas para ensayar, o pueden ser congeladas a -80°C. Las muestras congeladas en esta etapa de lisado/glicerol al 10% deben descongelarse sobre hielo antes de ensayar. La concentración de proteína para cada muestra se midió mediante ensayo de Bradford. La actividad de tipo quimiotripsina del proteasoma (CT-L) se cuantificó monitoreando la liberación de AMC libre a partir del péptido fluorogénico Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC (BostonBiochem).

Como se muestra en la Figura 3, la actividad CT-L fue comparable entre el carfilzomib estándar y el conjugado del Ejemplo 1 en sangre, así como en tejidos de la glándula suprarrenal, corazón e hígado, en ratones.

Ejemplo 42: Concentración plasmática media de carfilzomib - perfiles de tiempo para los Ejemplos 13, 26 y 34, cada uno de los cuales se administró por vía i.v..

Los compuestos de carfilzomib pegilados se administraron a ratones (Balb/c, machos, n= 9 por grupo de dosis) en la forma de bolo intravenoso (i.v.) a razón de 5 mg/kg (equivalente a carfilzomib, volumen de dosis 1 mL/kg). Se recogieron muestras de sangre de cada ratón en los puntos de tiempo indicados (0.5, 1, 2, 4, 6, 12, 16 y 24 horas después de la administración de la dosis) y 25 µL de las muestras de plasma se extrajeron mediante precipitación de proteínas con 125 µl de acetonitrilo que contenía D10-CFZ como un estándar interno y luego se centrifugó. Las concentraciones de carfilzomib en el sobrenadante se midieron mediante LC-MS/MS usando un monitoreo con reacción múltiple en el modo positivo de ionización por electrospray. El límite inferior de cuantificación del ensayo fue 0.500 ng/mL.

Como se muestra en la Figura 4, la formulación de control de estándar de carfilzomib (CFZ) ciclodextrina (5 mg/ml) en este estudio resultó en una disminución de la concentración plasmática durante un período de tiempo muy corto. El 3K-PEG CFZ (Ejemplo 34) está presente en el plasma durante hasta entre 20 y aproximadamente 25 horas después de la administración inicial del conjugado pegilado. De manera similar, el 5K-PEG CFZ (Ejemplo 26) está presente en el plasma, según se mide en la Figura 5, a concentraciones más altas durante prácticamente todo el tiempo hasta aproximadamente 25 horas. Finalmente, el 20K-PEG (Ejemplo 13) es la curva por encima de las curvas de 3K y 5K-PEG, comenzando entre ellas y revelando que este conjugado pegilado libera carfilzomib en el plasma durante el período de 25 horas medidas, de modo que aporta carfilzomib a concentraciones plasmáticas significativamente más altas durante un período de tiempo tan

prolongado. Finalmente, tal como se muestra en la Figura 4, la curva más alta en el punto de inicio, una formulación que comprende una combinación de los compuestos de 3K-PEG y de 20K-PEG de carfilzomib exhibió una concentración en plasma tanto mayor como más prolongada que la de 3K-PEG individualmente y comparable a la del compuesto de carfilzomib 20K-PEG solo de mayor peso molecular 20K-PEG.

La Tabla 4 describe los resultados obtenidos cuando se compararon los ejemplos representativos del compuesto de carfilzomib con el carfilzomib estándar y todas las muestras se dosificaron por vía i.v.

Tabla 4: Mediciones de la pK

Ejemplo No.	C _{max} (ng/mL)	AUC ₀₋₂₄ (ng.h/mL)	T _{1/2} (h)	CL/F (mL/kg/h)	Volumen de distribución (V _{dss} ; (mL/kg)
CFZ-i.v.	46.7	153	10.9	29000	245000
34	1470	2230	6.09	2230	2110
26	472	847	8.51	5770	12800
13	616	3510	3.68	1400	6900

Las formulaciones de PEG y carfilzomib dosificadas en los Ejemplos 39-41, se prepararon en general como sigue: Una cantidad deseada del compuesto de PEG-CFZ se pesó en un recipiente de vidrio estéril usando una balanza analítica. Se calculó un volumen de diluyente en función del peso del material. Se añadió un diluyente de acetato 10 mM, pH 5.0, sacarosa al 9%, al recipiente de vidrio hasta alcanzar un volumen final que dio como resultado concentraciones de los compuestos de PEG-CFZ de 1 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/mL o 20 mg/mL. Cada muestra de PEG-CFZ se agitó durante una hora a temperatura ambiente para permitir la disolución total del material. Una vez que el material se disolvió completamente en la solución, se tomó una muestra para medir el pH, el cual se encontró consistentemente en el intervalo deseado de 4.9 – 5.1. Por lo tanto, no se hicieron más ajustes de pH. Se realizaron mediciones de osmolalidad de las muestras y pruebas de endotoxina para todas las muestras y se encontró que siempre estaban dentro del intervalo de osmolalidad aceptable de 295-312 mOsm y < 1.0 EU/mL para el recuento de endotoxinas. Inmediatamente después de la disolución, las muestras se llenaron asépticamente en viales de vidrio estériles de 5 cc, se taparon con un tapón y con una tapa. Las muestras se congelaron a -70°C durante un período de 1

día a 2.5 semanas antes del transporte y la dosificación en los Ejemplos 39-41 tal como se describe más adelante en la presente.

Ejemplo 43: Estudio de eficacia del Ejemplo 13 y CFZ-captisol en el modelo de xenoinjerto de adenocarcinoma colorrectal humano HT-29 en ratones Beige SCID (Figura 5)

Procedimiento: Se adquirieron ratones hembra Beige SCID (inmunodeficiencia combinada severa) (60 más recambios) de Harlan Laboratories (Livermore, CA) de 6 a 7 semanas de edad. Después de la llegada, los animales fueron pesados usando una balanza electrónica (Ohaus SCOUT® PRO, Parsippany, NJ), se les sometió a un examen clínico para asegurar que estaban en buenas condiciones y se almacenaron 5 por jaula (antes de la dosificación). Los animales se mantuvieron en un ambiente filtrado con HEPA en un sistema de alojamiento de roedores de ventilación completa Micro-VENT (Allentown Caging Equipment Co., Allentown, NJ) permitiendo al menos 10 cambios de aire en la habitación por hora. Los controles de las salas de animales se establecieron para mantener la temperatura y la humedad relativa a $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y $50\% \pm 20\%$, respectivamente. Las habitaciones de alojamiento se mantuvieron en un ciclo de 12:12 luz/oscuridad. Las jaulas se sometieron a autoclave, y se colocaron lechos irradiados SaniChip 7990.BG (Harlan Teklad, Hayward, CA) para los animales. El agua se esterilizó en autoclave y se suministró *ad libitum* a cada jaula mediante botellas de agua. Se suministró *ad libitum* ración para roedores de 16% de proteína 2018 Teklad Global ((Harlan Teklad) irradiada a cada jaula.

Formulación del compuesto: El Ejemplo 13 se preparó tal como se describe en forma general anteriormente. El compuesto comparador de carfilzomib se preparó como CFZ-captisol (a 1 mg/ml). Se diluyó una muestra de polvo del Ejemplo 13 hasta 30 mg/mL (Grupo 3) o 50 mg/mL (cuarta dosis de inicio del Grupo 3) o 40 mg/mL (Grupo 4) en 10% de ETOH %/solución salina. El vehículo y el CFZ-captisol se almacenaron a 4°C durante todo el estudio. Durante el estudio, el Ejemplo 13 fue inspeccionado regularmente para detectar posibles cambios en la calidad de la suspensión, sin observarse ninguno.

Línea de células: Se obtuvo de ATCC (Manassas, VA) una línea de células de cáncer de adenocarcinoma colorrectal humano (CA), NCI-HT29 (HT-29; ATCC® HTB-38™). Tras la recepción en MGI, las células se cultivaron en el laboratorio durante 7 pases en RPMI 1640 y 10% de suero bovino fetal, y luego se usaron para generar reservas congeladas. Las células se recuperaron de las reservas congeladas y se cultivaron como se indica anteriormente. Después del crecimiento, las células se centrifugaron y se resuspendieron a una concentración de 5×10^7 células/mL en medio sin suero sin aditivos, y luego se combinaron a razón de 1:1 con Matrigel™

(Trevigen, Gaithersburg, MD). En el momento del implante, las células correspondían al pase 7 de MGI (MGP7).

Implante de células: Aproximadamente 3 semanas antes del día de estadificación proyectado, los ratones fueron implantados por inyección subcutánea (SC) en el flanco abdominal inferior izquierdo con 200 μ l (5.0E06 células) por ratón de la mezcla HT29:Matrigel recién preparada. Todos los procedimientos se llevaron a cabo en campanas de flujo laminar filtradas con HEPA.

Diseño del estudio: El diseño del estudio y los tratamientos de todos los grupos se muestran en la Tabla 1 (Eficacia). Cuando los tumores alcanzaron un volumen medio de aproximadamente 200 mm³ por ratón, se aleatorizaron cuarenta animales con tumores establecidos y pesos corporales moderados en 4 grupos de tratamiento (n= 10 ratones por grupo). A partir del Día 0, se administró a los animales una inyección semanal (qw) con inyección de vehículo (Grupo 1) o dos veces por semana D1D2 (es decir, dos días adyacentes cada semana) con CFZ-captisol a 5 mpk (Grupo 2) u OP -59381 a 150 mg/kg (Grupos 3). Comenzando con la cuarta dosis (es decir, después de tres semanas), la dosificación de los animales del Grupo 3 se aumentó a 250 mg/kg. Al Grupo 4 se dosificó una inyección semanal (qw) con o OP-59381 (Ejemplo 13) a 200 mg/kg. Todas estas dosis se administraron como inyecciones intravenosas (i.v.) a volúmenes de dosis de 5 mL/kg. Después de la dosificación i.v. para la séptima semana (es decir, después del Día 42 para los Grupos 1-4), la eficacia del tratamiento tumoral parecía disminuir o cesar por completo.

Tabla 5

Días 0-48				
Experimento	Grupo	Agente	Dosis (mg/kg)	Frecuencia
1	1 (n=10)	Vehículo	-	QW x 7 semanas
1	2 (n=10)	CFZ-captisol	5	QD x 2 (D1D2) x 7 semanas
1	3 (n=10)	Ejemplo 13	150/250	QW x 7 semanas
1	4 (n=10)	Ejemplo 13	200	QW x 7 semanas

Como se ve en la Figura 5, los tumores en el grupo de vehículo (Grupo 1) crecieron linealmente durante el intervalo de dosificación i.v., con tamaños de tumor en aumento hasta - 2,755% del tamaño inicial en el Día 49. Mientras que del Día 0 al Día 15 los tamaños de tumor no cambiaron respecto al control de vehículo en los tres grupos, el crecimiento del tumor el Día 19 se había atenuado significativamente en los animales tratados con 200 mpk del Ejemplo 13 y en los animales tratados con 5 mpk de CFZ-captisol. Esta atenuación significativa continuó hasta el Día 29

cuando se alcanzó en los tres grupos experimentales un nivel de significancia que continuó hasta el Día 40, demostrando que las 3 dosis eran suficientes para proporcionar actividad antitumoral.

Ejemplo 44: El Ejemplo 44 refleja los datos de supervivencia de ratón resultantes del estudio del Ejemplo 41, cuyos datos se tabulan en la Tabla 6 y se ilustran gráficamente en la Figura 6.

Tabla 6

Grupo		Vol tumor en el Día 0 (mm ³)	Vol tumor en el Día 40 (mm ³)	% de cambio respecto al vehículo	# de animales en el Día 40
1	Vehículo	95.8	2471.6	0	3
2	CFZ-Captisol 5mpk (D1D2)	95.6	1370.6	-44.5%	4
3	Ejemplo 13 – 150 mpk to 250 mpk (QW)	95.5	998.5	-59.6%	9
4	Ejemplo 13 – 200 mpk (QW)	95.9	1443.0	-41.6%	7

Los Ejemplos 41 y 42 revelan la eficacia del compuesto de carfilzomib representativo del Ejemplo 13 en un modelo xenoinjerto de ratón de una célula de cáncer de adenocarcinoma colorrectal humano. Los tumores en el grupo de vehículo crecieron linealmente durante el estudio. La dosificación intravenosa una vez por semana con el compuesto del Ejemplo 13 (200 mpk, o 150 aumentando a 250 mpk después de 3 semanas) o con CFZ-captisol (5 mpk) proporcionó una atenuación significativa del crecimiento tumoral (en comparación con el control de vehículo) en el lapso de los 19 días a partir de la primera dosis. Además, la dosificación intravenosa de ambas formulaciones se asoció con una atenuación significativa del aumento de peso.

Ejemplo 45: Estudio de eficacia del Ejemplo 13 y CFZ-captisol en el modelo de xenoinjerto de adenocarcinoma colorrectal HT-29 en ratones Beige SCID (Figura 7)

Procedimiento: Se adquirieron ratones hembra Beige SCID (inmunodeficiencia combinada severa) (60 más recambios) de Harlan Laboratories (Livermore, CA) de 6 a 7 semanas de edad. Después de la llegada, los animales fueron pesados usando una balanza electrónica (Ohaus SCOUT® PRO, Parsippany, NJ), se les sometió a un examen clínico para asegurar que estaban en buenas condiciones y se alojaron 5 por jaula (antes de la dosificación). Los animales se mantuvieron

en un ambiente filtrado con HEPA en un sistema de alojamiento de roedores de ventilación completa Micro-VENT (Allentown Caging Equipment Co., Allentown, NJ) que permitía al menos 10 cambios de aire en la habitación por hora. Los controles de las salas de animales se ajustaron a modo de mantener la temperatura y la humedad relativa a $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y $50\% \pm 20\%$, respectivamente. Las habitaciones del alojamiento se mantuvieron en un ciclo de 12:12 luz/oscuridad. Las jaulas se sometieron a autoclave, y se colocaron lechos irradiados SaniChip 7990.BG (Harlan Teklad, Hayward, CA) para los animales. El agua se esterilizó en autoclave y se suministró *ad libitum* a cada jaula mediante botellas de agua. Se suministró *ad libitum* ración para roedores de 16% de proteína 2018 Teklad Global ((Harlan Teklad) irradiada a cada jaula.

Formulación del compuesto: El Ejemplo 13 se formuló como se describe en la presente a la concentración deseada. Se proporcionó carfilzomib como CFZ-captisol (a 1 mg/ml). Una muestra en polvo del Ejemplo 13 se diluyó hasta 30 mg/mL (Grupo 3) o 50 mg/mL (Grupo 4) en 10% ETOH/solución salina. El vehículo y CFZ-captisol se almacenaron a 4°C durante todo el estudio. Durante el estudio, las preparaciones del Ejemplo 13 se examinaron periódicamente para detectar posibles cambios en la calidad de la suspensión, sin observarse ninguno.

Línea de células: Se obtuvo de ATCC (Manassas, VA) una línea de células de cáncer de adenocarcinoma colorrectal humano (CA), NCI-HT29 (HT-29; ATCC® HTB-38™). Tras la recepción en MGI, las células se cultivaron en el laboratorio durante 7 pases en RPMI 1640 y 10% de suero bovino fetal, y luego se usaron para generar reservas congeladas. Las células se recuperaron de las reservas congeladas y se cultivaron como se indica anteriormente. Después del crecimiento, las células se centrifugaron y se resuspendieron a una concentración de 5×10^7 células/mL en medio sin suero sin aditivos, y luego se combinaron a razón de 1:1 con Matrigel™ (Trevigen, Gaithersburg, MD). En el momento del implante, las células correspondían al pase 7 de MGI (MGP7).

Implante de células: Aproximadamente 3 semanas antes del día de estadificación proyectado, los ratones fueron implantados por inyección subcutánea (SC) en el flanco abdominal inferior izquierdo con 200 μl (5.0×10^6 células) por ratón de la mezcla HT29:Matrigel recién preparada. Todos los procedimientos se llevaron a cabo en campanas de flujo laminar filtradas con HEPA.

Diseño del estudio: El diseño del estudio y los tratamientos de todos los grupos se muestran en la Tabla 1 (Eficacia). Cuando los tumores alcanzaron un volumen medio de aproximadamente 200 mm^3 por ratón, se aleatorizaron cuarenta animales con tumores establecidos y pesos corporales moderados en 4 grupos de tratamiento ($n= 10$ ratones por grupo). A partir del Día 0, se administró a los animales una inyección semanal (qw) con inyección de vehículo (Grupo 1) o dos veces por

semana D1D2 (es decir, dos días adyacentes cada semana) con CFZ-captisol a 5 mpk (Grupo 2) o Ejemplo 13 a 150 mg/kg o 250 mg/kg (Grupos 3 y 4, respectivamente). Todas estas dosis se administraron como inyecciones intravenosas (i.v.) a volúmenes de dosis de 5 mL/kg. Después de la (s) administración (es) de la dosis de la sexta semana (es decir, después del Día 35), cesó la eficacia de la dosificación i.v.

Como se observa en la Figura 7, los tumores en el grupo de vehículo (Grupo 1) crecieron linealmente a lo largo del intervalo de dosificación i.v., y el tamaño tumoral aumentó hasta -2100% del tamaño inicial en el Día 41. En comparación, el crecimiento tumoral se atenuó significativamente en todos los grupos experimentales: Los tamaños del tumor del Día 41 fueron de 83.6%, 79.6% y 61.8% del control para los grupos 2, 3 y 4, respectivamente. Esta atenuación alcanzó significancia a partir de los puntos del tiempo más tempranos (9 o 12 días), demostrando que dos dosis eran suficientes para proporcionar actividad antitumoral. El crecimiento del tumor se reanudó después del final de la dosificación i.v. (después del Día 35).

Tabla 7

Días 0-48			
Grupo	Agente	Dosis	Frecuencia
1 (n=10)	Vehículo	-	QW x 6 semanas
2 (n=10)	CFZ-captisol	5 mg/kg	QD x 2 (D1D2) x 6 semanas
3 (n=10)	Ejemplo 13	150 mg/kg	QD x 2 (D1D2) x 6 semanas
4 (n=10)	Ejemplo 13	250 mg/kg	QW x 6 semanas

Ejemplo 46: Inhibición de proteosomas con los compuestos ejemplificativos en células (Figuras 9-14)

Línea de células: Se cultivaron infoblastos T de eucemia linfoblástica aguda humana MOLT-4 durante al menos 6 pasos en medio de crecimiento (medio basal RPMI-1640 suplementado con 10% de FBS al y 1x L-glutamina). Se colocaron células de suspensión en una placa de 96 pocillos a una velocidad de 1-2e6 células/mL (50 µl, - 60,000 células/pocillo) por duplicado.

Tratamiento: Las preparaciones de carfilzomib y los compuestos ejemplificativos de carfilzomib pegilados 5, 35, 36, 37 y 38 se disolvieron en DMSO a una concentración de 10 mM. Se prepararon diluciones en serie en DMSO para producir concentraciones que cubrían 7 logs, y luego cada dilución de la serie se diluyó adicionalmente x40 en medio de crecimiento. A continuación se añadieron las diluciones en igual volumen a los pocillos que contenían células,

diluyendo nuevamente las concentraciones del compuesto por dos tantos. Las células se incubaron a 37°C (5% de CO₂) durante 1 hora, después se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. El medio se removió y las células se lavaron con PBS 3 veces. Después del último lavado, se retiró el sobrenadante y los gránulos celulares se congelaron en hielo seco.

Análisis: Los peletizados de células se descongelaron y después se lisaron mediante resuspensión en solución amortiguadora de lisis 50 uL sobre hielo (Tris - HCl 20 mM, EDTA 5 mM, pH 8). La preparación se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos y luego se utilizó directamente para el ensayo de fluorescencia AMC-LLVY. Las mediciones se tomaron cada 2 minutos durante 70 minutos para generar una curva cinética, y los valores de IC₅₀ se calcularon usando la pendiente de 5-15 minutos (RFU/min, velocidad inicial).

Como se muestra en la Figura 10, el compuesto del ejemplo representativo 5 exhibió una potencia inhibidora del proteasoma celular con una IC₅₀ para la actividad tipo quimotripsina (CT - L) de aproximadamente 16.25 nM. Por comparación, la muestra de control de carfilzomib exhibió una actividad con un IC₅₀ de aproximadamente 9.2 nM, una potencia similar a la del Ejemplo 5. De forma similar, el compuesto ejemplificativo 35 (Figura 11) exhibió una potencia inhibidora del proteasoma celular con una IC₅₀ para la actividad tipo quimotripsina (CT - L) de aproximadamente 9.0 nM, el compuesto ejemplificativo 36 (Figura 12) exhibió una potencia inhibidora del proteasoma celular con una IC₅₀ para la actividad tipo quimotripsina (CT - L) de aproximadamente 21.8 nM, el compuesto ejemplificativo 37 (Figura 13) exhibió una potencia inhibidora del proteasoma celular con una IC₅₀ para la actividad tipo quimotripsina (CT - L) de aproximadamente 22.8 nM y el compuesto ejemplificativo 38 (Figura 14) exhibió una potencia inhibidora del proteasoma celular con una IC₅₀ para la actividad tipo quimotripsina (CT - L) de aproximadamente 21.8 nM. Algunos compuestos representativos de la presente invención exhiben actividad inhibidora de CT – L en la forma de compuesto carfilzomib pegilado.

Ejemplo 47: Inhibición del proteasoma con conjugados carfilzomib pegilados en comparación con carfilzomib

Los compuestos de carfilzomib pegilados de los Ejemplos 35 y 36 se administraron a ratones (Balb/c, hembra, n= 3 por grupo de dosis) en la forma de bolo subcutáneo a la dosis especificada (volumen de dosis de 5 mL/kg) en una solución acuosa que contenía 10 mmol/L de acetato sódico (pH 5.0) y 9% de sacarosa para administración (20 mg/kg). En los puntos de tiempo seleccionados después de la administración del fármaco, se recogieron muestras de sangre utilizando tubos que contenían heparina. Las muestras se colocaron inmediatamente en hielo y se centrifugaron a

velocidad máxima durante 2 minutos en una microcentrífuga a temperatura ambiente (RT). Los peletizados de células se almacenaron en hielo húmedo. Los peletizados de células sanguíneas enteras se resuspendieron en 1 mL de solución salina amortiguada con fosfato (PBS) y se centrifugaron a velocidad máxima a 4°C. Los sobrenadantes se eliminaron y los peletizados se lavaron una segunda vez con PBS. Las muestras se resuspendieron en 2 volúmenes de solución amortiguadora de lisis (Tris 20 mM, pH 8,0, 5 mM EDTA), luego se congelaron y se almacenaron a -80°C hasta el análisis.

Procesamiento de la muestra: Todas las muestras se descongelaron en hielo. Todos los peletizados de célula sencilla en solución amortiguadora de lisis (sangre completa) se sometieron a agitación en vortex por un tiempo breve y luego se centrifugaron a 14,000 rpm en una microcentrífuga a 4°C durante 15 minutos. El sobrenadante se transfirió en una proporción de 100 µl a 25 µl de glicerol al 50% en una placa de muestra para obtener una concentración final de glicerol de 10%. Estas muestras estuvieron listas para ensayar, o pueden ser congeladas a -80°C. Las muestras congeladas en esta etapa de lisado/glicerol al 10% deben descongelarse sobre hielo antes de ensayar. La concentración de proteína para cada muestra se midió mediante ensayo de Bradford. La actividad de tipo quimiotripsina del proteasoma (CT-L) se cuantificó monitoreando la liberación de AMC libre a partir del péptido fluorogénico Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC (BostonBiochem).

La Figura 15 representa la actividad farmacodinámica *in vivo* (PD) de los compuestos representativos de los Ejemplos 35 y 36 de la presente invención. Como se muestra en la Figura 15, cada uno de los ejemplos 35 y 36 exhibieron inhibición casi completa *in vivo* de CT-L durante más de 48 h después de la administración en un ratón. Incluso durante la duración de 96 horas, los compuestos continuaron exhibiendo actividad inhibidora de CT-L de aproximadamente 50% o más en el ratón.

Métodos de uso

Los efectos biológicos de la inhibición del proteasoma son útiles y deseables. Se ha sugerido la inhibición del proteasoma como una prevención y/o tratamiento de una multitud de enfermedades incluyendo, pero sin limitarse a las mismas, enfermedades proliferativas, enfermedades neurotóxicas/degenerativas, Alzheimer, enfermedades isquémicas, inflamación, enfermedades autoinmunes, VIH, cánceres, rechazo de injertos de órganos, choque séptico, inhibición de la presentación del antígeno, disminución de la expresión génica viral, infecciones parasitarias, afecciones asociadas con la acidosis, degeneración macular, afecciones pulmonares, enfermedades musculares, enfermedades fibróticas, enfermedades óseas y crecimiento del cabello. Por lo tanto, las

formulaciones farmacéuticas que comprenden los compuestos de carfilzomib pegilados de la invención en cantidades de dosificación terapéuticamente efectivas proporcionan un medio para administrar un fármaco a un paciente y tratar dichas afecciones.

A nivel celular, se ha informado acumulación de proteínas poliubiquitinadas, cambios morfológicos de las células y apoptosis tras el tratamiento de células con diversos inhibidores del proteasoma. También se ha descrito la inhibición del proteasoma y se ha demostrado clínica y comercialmente como una estrategia terapéutica antitumoral útil. Con este fin, los compuestos y las composiciones que incluyen los compuestos de la presente invención son útiles para tratar el cáncer, incluidos sin limitarse a los mismos, el mieloma múltiple recién diagnosticado y/o recurrente así como resistente.

Tanto los modelos *in vitro* como *in vivo* han demostrado que las células malignas, en general, son susceptibles a la inhibición del proteasoma. De hecho, la inhibición del proteasoma ya ha sido validada como estrategia terapéutica para el tratamiento del mieloma múltiple. Esto podría deberse en parte a la dependencia de la célula maligna altamente proliferativa del sistema de proteasoma para eliminar rápidamente las proteínas (Rolfe *et al.*, *J. Mol. Med.* (1997) 75: 5 - 17; Adams, *Nature* (2004) 4: 349 - 360). En la presente se da a conocer un método para el tratamiento del cáncer que comprende administrar a un paciente que necesita dicho tratamiento una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto carfilzomib pegilado de las Fórmulas I y II, o cualquier compuesto carfilzomib pegilado específicamente ejemplificado, tal como se da a conocer o describe en la presente.

Como se utiliza en la presente, el término cáncer incluye, sin limitarse a los mismos, cánceres de sangre y tumores sólidos. El cáncer puede afectar a los componentes de la sangre, los huesos, los órganos, el tejido de la piel y el sistema vascular, incluyendo, pero sin limitarse a los mismos, los cánceres de la vejiga, sangre, hueso, cerebro, mama, cérvix, pecho, colon, endometrio, esófago, ojo, cabeza, riñón, hígado, pulmón, ganglios linfáticos, boca, cuello, ovarios, páncreas, próstata, recto, renal, piel, estómago, testículos, garganta y útero. Los cánceres específicos incluyen, pero sin limitarse a los mismos, leucemia (leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia mielógena aguda (LMA), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia mielógena crónica (CML), leucemia de células pilosas), neoplasias de células B maduras (linfoma linfocítico pequeño), leucemia prolinfocítica de células B, linfoma linfoplasmocitario (tal como macroglobulinemia de Waldenström), linfoma de la zona marginal esplénica, mieloma de células plasmáticas, plasmacitoma, enfermedades de deposición de inmunoglobulinas monoclonales, enfermedades de cadena pesada, linfoma de células B marginales extranodales (linfoma MALT), linfoma de células

B de zona marginal nodal (NMZL), linfoma folicular, linfoma de células de manto, linfoma de células B difuso, linfoma de células B grandes mediastínicos (tímicos), linfoma de células B grandes intravasculares, linfoma de efusión primaria y linfoma/leucemia de Burkitt), neoplasias de células T maduras y células asesinas naturales (NK) (leucemia prolinfocítica de células T, leucemia linfocítica granular de células T grandes, leucemia agresiva de células NK, leucemia/linfoma de células T adultas, linfoma NK/T extranodal, linfoma de células T de tipo enteropatía, linfoma de células T hepatoesplénico, linfoma de células NK blásticas, micosis fungoide (síndrome de Sezary), linfoma cutáneo primario anaplásico de células grandes, papulosis linfomatoide, linfoma de células T angioinmunoblástico (linfoma de células T periférico no especificado y linfoma anaplásico de células grandes), linfoma de Hodgkin (esclerosis nodular, celularidad mixta, rica en linfocitos, linfocitos agotados o no agotados, linfocitos nodulares predominantes), linfoma no Hodgkin, mieloma (mieloma múltiple, mieloma indolente, mieloma quemante), enfermedad mieloproliferativa crónica, enfermedad mielodisplásica/mieloproliferativa, síndromes mielodisplásicos, trastornos linfoproliferativos asociados a inmunodeficiencia, neoplasias de células histiocíticas y dendríticas, mastocitosis, condrosarcoma, sarcoma de Ewing, fibrosarcoma, tumor de células gigantes malignas, enfermedad ósea de mieloma, osteosarcoma, cáncer de mama (dependiente de la hormona, independiente de la hormona), cánceres ginecológicos (cervical, endometrial, trompa de Falopio, enfermedad trofoblástica gestacional, ovárico, peritoneal, uterino, vaginal y vulvar), carcinoma basocelular (CBC), carcinoma de células escamosas (SCC), melanoma maligno, dermatofibrosarcoma protuberans, carcinoma de células de Merkel, sarcoma de Kaposi, astrocitoma, astrocitoma pilocítico, tumor neuroepitelial disembrionario, oligodendrogliomas, ependimoma, glioblastoma multiforme, gliomas mixtos, oligoastrocitomas, meduloblastoma, retinoblastoma, neuroblastoma, germinoma, teratoma, mesotelioma maligno (mesotelioma peritoneal, mesotelioma pericárdico, mesotelioma pleural), gastroenteropancreático o gastroenteropancreático neuroendocrino tumor (GEP-NET), carcinoide, tumor endocrino pancreático (PET), adenocarcinoma colorrectal, carcinoma colorrectal, tumor neuroendocrino agresivo, adenocarcinoma leiomiomasarcomamucinoso, adenocarcinoma de células de anillo de Signet, carcinoma hepatocelular, colangiocarcinoma, hepatoblastoma, hemangioma, adenoma hepático, hiperplasia nodular focal (carcinoma de pulmón de células escamosas, adenocarcinoma, carcinoma de pulmón de células grandes), carcinoma de pulmón de células pequeñas, carcinoma de tiroides, cáncer de próstata (refractario a la hormona, independiente de los andrógenos, dependiente de los andrógenos, insensible a las hormonas), y sarcomas de tejidos blandos (fibrosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, dermatofibrosarcoma, liposarcoma, rabdomiosarcoma,

leiomiomasarcoma, hemangiosarcoma, sarcoma sinovial, tumor maligno de vaina nerviosa periférica/neurofibrosarcoma, osteosarcoma extrasquelético).

En un aspecto, la invención proporciona un compuesto carfilzomib pegilado tal como se describe en la presente, o una composición farmacéutica que comprende el mismo, el cual puede administrarse para tratar el mieloma múltiple en un paciente. Por ejemplo, el mieloma múltiple puede incluir uno o ambos de mieloma múltiple recién diagnosticado o recurrente y/o resistente.

Muchos tumores de los tejidos hematopoyéticos y linfoides se caracterizan por un aumento de la proliferación celular, o de un tipo particular de célula. Las enfermedades mieloproliferativas crónicas (CMPDs) son trastornos de células madre hematopoyéticas clonales caracterizados por la proliferación en la médula ósea de uno o más de los linajes mieloides, dando como resultado un mayor número de granulocitos, glóbulos rojos y/o plaquetas en la sangre periférica. Como tal, el uso de un inhibidor del proteasoma para el tratamiento de tales enfermedades es atractivo y está siendo examinado (Cilloni *et al.*, *Haematologica* (2007) 92: 1124-1229). CMPD puede incluir leucemia mielógena crónica, leucemia neutrofilica crónica, leucemia eosinofílica crónica, policitemia vera, mielofibrosis idiopática crónica, trombocitemia esencial y enfermedad mieloproliferativa crónica inclasificable. Se proporciona en la presente un método de tratamiento de CMPD que comprende administrar a un paciente en necesidad de tal tratamiento una cantidad efectiva del compuesto inhibidor del proteasoma descrito en la presente.

Las enfermedades mielodisplásicas y mieloproliferativas, tales como la leucemia mielomonocítica crónica, la leucemia mielóide crónica atípica, la leucemia mielomonocítica juvenil y la enfermedad mielodisplásica/mieloproliferativa inclasificable, se caracterizan por la hiper celularidad de la médula ósea debido a la proliferación en uno o más de los linajes mieloides. La inhibición del proteasoma con una composición descrita en la presente puede servir para tratar estas enfermedades mielodisplásicas/mieloproliferativas administrando una cantidad efectiva de la composición a un paciente que necesita dicho tratamiento.

Los síndromes mielodisplásicos (MDS) se refieren a un grupo de trastornos de células madre hematopoyéticas caracterizados por displasia y hematopoyesis no efectiva en una o más de las principales líneas celulares mieloides. Dirigir un fármaco a NF-kB con un inhibidor de proteasoma en estas neoplasias malignas hematológicas induce la apoptosis, matando así la célula maligna (Braun *et al.*, *Cell Death and Differentiation* (2006) 13: 748-758). También se proporciona aquí un método para tratar MDS que comprende administrar a un paciente que necesita dicho tratamiento una cantidad efectiva de un compuesto de los que se dan a conocer en la presente. MDS incluye anemia refractaria, anemia refractaria con sideroblastos anillados, citopenia refractaria con displasia

multilineal, anemia refractaria con exceso de blastos, síndrome mielodisplásico inclasificable y síndrome mielodisplásico asociado con anomalía aislada en el cromosoma del (5q).

La mastocitosis es una proliferación de mastocitos y su subsecuente acumulación en uno o más sistemas de órganos. La mastocitosis incluye, pero no se limita a, mastocitosis cutánea, mastocitosis sistémica indolente (ISM), mastocitosis sistémica asociada con enfermedad hematológica de células no asociadas a mastocitos (SM-AHNMD), mastocitosis sistémica agresiva (ASM), leucemia de mastocitos MCL), sarcoma de mastocitos (MCS) y mastocitoma extracutáneo. También se da a conocer en la presente un método para tratar la mastocitosis que comprende administrar una cantidad efectiva del compuesto descrito en la presente a un paciente diagnosticado con mastocitosis.

Las modalidades adicionales incluyen procedimientos para afectar la regulación dependiente del proteasoma de las oncoproteínas y métodos para tratar o inhibir el crecimiento del cáncer, siendo que cada método incluye la exposición de una célula (*in vivo*, por ejemplo, en un paciente o *in vitro*) a una composición descrita en la presente. Las proteínas E6 derivadas de HPV-16 y HPV-18 estimulan la conjugación dependiente de ATP y ubiquitina y la degradación de p53 en lisados de reticulocitos crudos. Se ha demostrado que el oncogén recesivo p53 se acumula a la temperatura no permisiva en una línea de células con un E1 termolábil mutado. Los niveles elevados de p53 pueden conducir a la apoptosis. Ejemplos de proto-oncoproteínas degradadas por el sistema de ubiquitina incluyen c-Mos, c-Fos y c-Jun. Una modalidad es un método para tratar la apoptosis relacionada con p53, siendo que el método incluye administrar a un paciente una cantidad efectiva de una composición descrita en la presente.

También se ha demostrado que los inhibidores que se enlazan al proteasoma 20S estimulan la formación ósea en cultivos de órganos óseos. Además, cuando tales inhibidores se han administrado sistemáticamente a ratones, ciertos inhibidores del proteasoma aumentaron el volumen óseo y las tasas de formación ósea superiores al 70% (Garrett, I R *et al.*, *J. Clin. Invest.* (2003) 111: 1771-1782), lo cual sugiere que la maquinaria ubiquitina-proteasoma regula la diferenciación osteoblástica y la formación ósea. Por lo tanto, las composiciones descritas pueden ser útiles en el tratamiento y/o la prevención de enfermedades asociadas con la pérdida ósea, tales como osteoporosis.

El tejido óseo es una excelente fuente de factores que tienen la capacidad de estimular las células óseas. De este modo, los extractos de tejido óseo bovino contienen no sólo proteínas estructurales que son responsables de mantener la integridad estructural del hueso, sino también factores de crecimiento óseo biológicamente activos que pueden estimular la proliferación de las

células óseas. Entre estos últimos factores se encuentra una familia de proteínas llamadas proteínas morfogenéticas óseas (BMPs), recientemente descritas. Todos estos factores de crecimiento tienen efectos sobre otros tipos de células, así como sobre células óseas, incluyendo Hardy, M H *et al.*, *Trans Genet* (1992) 8: 55-61 que describe evidencia de que las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs), se expresan en forma diferenciada en folículos pilosos durante el desarrollo. Harris, S. E. *et al.*, *J Bone Miner Res* (1994) 9: 855-863 que describe los efectos de TGF- β sobre la expresión de BMP-2 y otras sustancias en células óseas. La expresión de BMP-2 en folículos maduros también se produce durante la maduración y después del período de proliferación celular (Hardy *et al.*, (1992, supra). De ese modo, los compuestos que se dan a conocer en la presente también pueden ser útiles para la estimulación del crecimiento del folículo piloso.

Finalmente, las composiciones descritas también son útiles como agentes de diagnóstico (por ejemplo, en kits de diagnóstico o para uso en laboratorios clínicos) para realizar un análisis de detección de proteínas (por ejemplo, enzimas, factores de transcripción) procesadas por hidrolasas de Ntn, incluyendo el proteasoma. Las composiciones descritas son también útiles como reactivos de investigación para unirse específicamente a la subunidad X/MB1 o cadena α e inhibir las actividades proteolíticas asociadas con ella. Por ejemplo, se puede determinar la actividad de (e inhibidores específicos de) otras subunidades del proteasoma.

La mayoría de las proteínas celulares están sujetas a procesamiento proteolítico durante la maduración o activación. Los inhibidores de enzimas descritos en la presente pueden usarse para determinar si un proceso o un producto celular, de desarrollo o fisiológico está regulado por la actividad proteolítica de una hidrolasa de Ntn particular. Uno de tales métodos incluye la obtención de un organismo, una preparación celular intacta o un extracto celular; exponer el organismo, la preparación celular o el extracto celular a una composición descrita en la presente; exponiendo al organismo, la preparación celular o el extracto celular expuesto al compuesto a una señal, y monitorear el proceso o producto. La alta selectividad de los compuestos descritos en la presente permite una eliminación y una implicación rápida y precisa del Ntn (por ejemplo, el proteasoma 20S) en un proceso celular, de desarrollo o fisiológico dado.

Composiciones farmacéuticas

La presente invención también da a conocer composiciones farmacéuticas para administrar el tratamiento para los pacientes de cáncer. Las composiciones comprenden un, y en algunas modalidades más de un, compuesto carfilzomib pegilado conforme a las Fórmulas I o II, y las subfórmulas de las mismas, conforme a lo descrito en la presente. Un tipo de composición farmacéutica

que la presente invención da a conocer es una composición farmacéutica que se administra por vía parenteral. Las composiciones para administración parenteral adecuadas para infusión, inyección o administración subcutánea pueden incluir soluciones acuosas estériles (cuando es hidrosoluble) o dispersiones y/o polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones estériles ya sea para infusión o para inyección. Para la administración intravenosa, tal como la infusión, los vehículos adecuados incluyen agua estéril para inyección, soluciones amortiguadoras estériles, tales como solución amortiguadora de citrato, agua bacteriostática y Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, NJ). En todos los casos, la composición, en particular para uso, tratamiento y consumo humano, debe ser estéril y debe ser fluida al grado de que sea fácil de agregar o cargar en una jeringa o una bolsa de infusión. La composición debe ser estable bajo las condiciones de manufactura y almacenamiento y debe preservarse contra la acción contaminante de los microorganismos tales como bacterias y hongos. El portador puede ser un medio solvente o de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones y mediante el uso de agentes tensoactivos. La prevención de la acción de los microorganismos puede lograrse mediante varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos agentes, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, y cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede llevarse a cabo incluyendo en la composición un agente que retarda la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando los compuestos activos de la invención, compuestos de carfilzomib pegilados, en la cantidad requerida en un solvente adecuado con uno o una combinación de los ingredientes que se enumeran más arriba, según se requiera, seguido de la esterilización por filtración. En general, las dispersiones se preparan incorporando el carfilzomib en un vehículo estéril, el cual contiene un medio de dispersión básico y los demás ingredientes requeridos de los que se enumeran más arriba. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, un método de preparación adecuado es el secado por congelamiento (liofilización), el cual da lugar a una forma en polvo del carfilzomib más cualquier otro ingrediente deseado a partir de una solución del mismo esterilizada por filtración.

La administración sistémica de un compuesto terapéutico de la invención tal como se describe en la presente también puede ser por medios transmucosales o transdérmicos. Para la administración transmucosa o transdérmica, se utilizan en la formulación penetrantes apropiados para la barrera a permear. Dichos penetrantes son conocidos en forma generalizada en la técnica, e incluyen, por ejemplo, para la administración transmucosa, detergentes, sales biliares y derivados de ácido fusídico. La administración transmucosa puede lograrse mediante el uso de aerosoles nasales o supositorios. Para la administración transdérmica, los compuestos activos de la invención se formulan en ungüentos, bálsamos, geles o cremas, como es conocido en forma generalizada en la disciplina.

En una modalidad, los compuestos terapéuticos de carfilzomib pegilados de la invención se preparan con portadores que protegerán los compuestos terapéuticos contra la eliminación rápida del cuerpo, tales como en las formulaciones de liberación controlada. Otros ejemplos incluyen, sin limitarse a los mismos, implantes y sistemas de suministro en microencapsulados. Pueden usarse polímeros biodegradables biocompatibles, tales como acetato de etilen vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Tales formulaciones se pueden preparar usando técnicas estándar, o se obtienen comercialmente, por ejemplo, en Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. Las suspensiones liposomales (incluyendo liposomas dirigidos a células seleccionadas con anticuerpos monoclonales para antígenos celulares) también pueden usarse como portadores farmacéuticamente aceptables. Las mismas pueden prepararse de acuerdo con métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, como se describe en la Patente de E.U.A. No. 4,522,811.

Las composiciones farmacéuticas que se dan a conocer en la presente invención se pueden administrar de una vez, o se pueden dividir en un número de dosis más pequeñas para administrarse a intervalos de tiempo. Se entiende que la dosificación precisa y la duración del tratamiento dependerá de la enfermedad que se trata y puede determinarse empíricamente usando protocolos de prueba conocidos o por extrapolación a partir de datos de ensayo *in vivo* o *in vitro*. Debe observarse que las concentraciones y valores de dosificación también pueden variar con la gravedad de la afección a aliviar. Debe entenderse además que para cualquier paciente en particular, los regímenes de dosificación específicos deben ajustarse con el tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el criterio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones y que en la presente se proporcionan intervalos de concentración sólo a modo de ejemplo los cuales no pretenden limitar el alcance o la práctica de las composiciones reivindicadas.

Pueden prepararse formas de dosificación o composiciones que contienen un compuesto carfilzomib pegilado de la invención tal como se describe en la presente en el intervalo de 0.005% a 100% con el resto formado a partir de un portador no tóxico. Los métodos para la preparación de estas composiciones son conocidos por los expertos en la técnica. Las composiciones farmacéuticas contempladas en la invención pueden contener 0.001% -100% del compuesto carfilzomib pegilado que se da a conocer en la presente, en una modalidad 0.1-95%, y en otra modalidad 75-85%. Las composiciones farmacéuticas se pueden incluir en un recipiente, paquete o dispensador junto con instrucciones para la administración. En algunas modalidades, los compuestos de carfilzomib pegilados que se dan a conocer en la presente pueden formularse como se describe en la Patente de E.U.A. No. 9309283.

Administración

Las composiciones preparadas como se describe en la presente pueden administrarse en diversas formas, dependiendo del trastorno a tratar y de la edad, el estado y el peso corporal del paciente, como es bien conocido en la disciplina. Por ejemplo, cuando las composiciones se van a administrar por vía oral, pueden formularse como comprimidos, cápsulas, gránulos, polvos o jarabes; o, para la administración parenteral, pueden formularse como inyecciones (intravenosa, intramuscular o subcutánea), preparaciones para infusión en gotas o supositorios. Para su aplicación por la vía de la membrana mucosa oftálmica, pueden formularse como gotas para los ojos o ungüentos para los ojos. Estas formulaciones pueden prepararse por los medios convencionales conjuntamente con los métodos descritos en la presente y, si se desea, el ingrediente activo puede mezclarse con cualquier aditivo o excipiente convencional, tal como un aglutinante, un agente desintegrante, un lubricante, un corrector, un agente solubilizante, un auxiliar de suspensión, un agente emulsionante o un agente de recubrimiento. Aunque la dosificación variará dependiendo de los síntomas, la edad y el peso corporal del paciente, la naturaleza y gravedad del trastorno a tratar o prevenir, la vía de administración y la forma del fármaco, en general se recomienda una dosis diaria del compuesto de 0.01 a 2000 mg para un paciente humano adulto, y se puede administrar en una dosis única o en dosis divididas. La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con un material portador para producir una forma de dosificación sencilla será generalmente la cantidad del compuesto que produce un efecto terapéutico. A continuación se proporciona más información sobre las cantidades de dosificación para los compuestos de la invención. En general, las composiciones destinadas a uso parenteral (por ejemplo, inyección intravenosa, subcutánea) incluyen un agente solubilizante. El agente solubilizante puede ser una ciclodextrina sustituida.

El tiempo de administración preciso y/o la cantidad de la composición que producirá los resultados más efectivos en términos de eficacia del tratamiento en un paciente dado dependerá de la actividad, la farmacocinética y la biodisponibilidad del compuesto carfilzomib pegilado en particular, el estado fisiológico del paciente (incluidos edad, sexo, tipo de enfermedad y escenario, estado físico general, capacidad de respuesta a una dosis dada y tipo de medicamento), la vía de administración y similares. Sin embargo, los lineamientos anteriores pueden utilizarse como base para ajustar el tratamiento, por ejemplo, determinar el tiempo óptimo y/o la cantidad de administración, lo cual no requerirá más que una experimentación rutinaria que consiste en monitorear al paciente y ajustar la dosificación y/o el tiempo.

La frase "farmacéuticamente aceptable" se emplea en la presente para referirse a aquellos ligandos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que están, dentro del alcance de un criterio médico acertado, adecuadas para ser usadas en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, de acuerdo con una relación beneficio/riesgo razonable.

La frase "portador farmacéuticamente aceptable" tal como se usa en la presente significa un material, una composición o un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como un relleno, diluyente, excipiente, solvente o material encapsulante líquido o sólido. Cada portador debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación y no debe ser perjudicial para el paciente. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como portadores farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; (2) almidones, tales como almidón de maíz, almidón de papa y β -ciclodextrina sustituida o no sustituida; (3) celulosa y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa sódica, etilcelulosa y acetato de celulosa; (4) tragacanto en polvo; (5) malta; (6) gelatina; (7) talco; (8) excipientes, tales como manteca de cacao y ceras para supositorios; (9) aceites, tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de ajonjolí, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soya; (10) glicoles, tales como propilenglicol; (11) polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; (12) ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; (13) agar; (14) agentes reguladores del pH, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; (15) ácido algínico; (16) agua libre de pirógenos; (17) solución salina isotónica; (18) solución de Ringer; (19) alcohol etílico; (20) soluciones amortiguadoras de fosfato; y (21) otras sustancias compatibles no tóxicas empleadas en las formulaciones farmacéuticas. En ciertas modalidades, las composiciones farmacéuticas que se dan a conocer en la presente son no pirogénicas, es decir, no inducen elevaciones de temperatura significativas cuando se administran a un paciente.

La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a las sales de adición de ácidos inorgánicos y orgánicos relativamente no tóxicas o a las sales básicas del (de los) compuesto (s) de la invención. Estas sales pueden prepararse *in situ* durante el aislamiento y la purificación final del compuesto o en forma separada haciendo reaccionar un compuesto carfilzomib pegilado purificado en su forma de base libre con un ácido orgánico o inorgánico adecuado y aislar la sal así formada. Las sales de adición de ácido representativas incluyen sales de bromhidrato, clorhidrato, sulfato, bisulfato, fosfato, nitrato, acetato, valerato, oleato, palmitato, estearato, laurato, benzoato, lactato, fosfato, tosilato, citrato, maleato, fumarato, succinato, tartrato, naftilato, mesilato, glucoheptonato, lactobionato, laurilsulfonato y sales de aminoácidos, y similares. (Ver, por ejemplo, Berge *et al.* (1977) "Pharmaceutical Salts", *J. Pharm. Sci.* 66: 1 - 19).

En algunas modalidades, los compuestos de carfilzomib pegilados que se dan a conocer en la presente pueden contener uno o más grupos funcionales ácidos y, por lo tanto, son capaces de formar sales farmacéuticamente aceptables con bases farmacéuticamente aceptables. El término "sales farmacéuticamente aceptables" en estos casos se refiere a las sales de adición de bases inorgánicas y orgánicas relativamente no tóxicas del compuesto. Estas sales pueden prepararse asimismo *in situ* durante el aislamiento y purificación final del inhibidor o de manera separada haciendo reaccionar el compuesto en su forma de ácido libre con una base adecuada, tal como el hidróxido, el carbonato o el bicarbonato de un catión metálico farmacéuticamente aceptable, con amoníaco, o con una amina orgánica, primaria, secundaria o terciaria farmacéuticamente aceptable. Las sales básicas representativas incluyen, sin limitarse a las mismas, sales alcalinas o alcalinotérreas tales como sales de litio, sodio, potasio, calcio, magnesio y aluminio, y similares. Las aminas orgánicas representativas útiles para la formación de sales de adición de bases incluyen etilamina, dietilamina, etilendiamina, etanolamina, dietanolamina, piperazina y similares (ver, por ejemplo, Berge *et al.*, *supra*).

También pueden estar presentes en las composiciones agentes humectantes, emulsionantes y lubricantes, tales como laurilsulfato de sodio y estearato de magnesio, así como agentes colorantes, agentes de liberación, agentes de recubrimiento, edulcorantes, aromatizantes y perfumantes, conservadores y antioxidantes.

Los ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) antioxidantes hidrosolubles, tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato sódico, metabisulfito sódico, sulfito sódico y similares; (2) antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo,

alfa-tocoferol y similares; y (3) agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico y similares.

Las formulaciones adecuadas para la administración oral pueden estar en forma de cápsulas, obleas, píldoras, comprimidos, pastillas (usando una base aromatizada, usualmente sacarosa y goma de acacia o tragacanto), polvos, gránulos o como una solución o una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso o como una emulsión líquida de aceite en agua o agua en aceite, o como un licor o un jarabe, o como pastillas (usando una matriz inerte, tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y acacia) y/o como enjuagues bucales, y similares, conteniendo cada una una cantidad predeterminada de compuesto de la invención como ingrediente activo. Una composición también se puede administrar como un bolo, electuario o pasta.

En las formas de dosificación sólidas para administración oral (cápsulas, tabletas, pastillas, grageas, polvos, gránulos y similares), el ingrediente activo (compuesto de la invención) se mezcla con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, tales como citrato de sodio o fosfato dicálcico y/o cualquiera de los siguientes: (1) rellenos o extendedores, tales como almidones, ciclodextrinas, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y/o ácido silícico; (2) aglutinantes, tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y/o acacia; (3) humectantes, tales como glicerol; (4) agentes desintegrantes, tales como agar-agar, carbonato de calcio, almidón de papa o tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos y carbonato sódico; (5) agentes retardadores de la solución, tales como parafina; (6) aceleradores de absorción, tales como compuestos de amonio cuaternario; (7) agentes humectantes, tales como, por ejemplo, alcohol acetilico y monoestearato de glicerol; (8) absorbentes, tales como caolín y arcilla de bentonita; (9) lubricantes tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato sódico y mezclas de los mismos; y (10) agentes colorantes. En el caso de las cápsulas, los comprimidos y las pastillas, las composiciones farmacéuticas también pueden comprender agentes amortiguadores del pH. También pueden emplearse composiciones sólidas de un tipo similar como cargas en cápsulas de gelatina blandas y duras usando excipientes tales como lactosa o azúcares de leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.

Se puede preparar un comprimido por compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios. Los comprimidos preparados por compresión se pueden preparar usando un aglutinante (por ejemplo, gelatina o hidroxipropilmetil celulosa), un lubricante, un diluyente inerte, conservante, un desintegrante (por ejemplo, glicolato de almidón sódico o carboximetil celulosa reticulada), un agente tensoactivo o un dispersante. Los comprimidos moldeados pueden fabricarse

moldeando en una máquina adecuada una mezcla de los inhibidores en polvo humedecidos con un diluyente líquido inerte.

Los comprimidos y otras formas de dosificación sólidas, tales como grageas, cápsulas, píldoras y gránulos, opcionalmente pueden ser marcados o preparados con recubrimientos y envolturas, tales como recubrimientos entéricos y otros recubrimientos bien conocidos en la técnica de formulación farmacéutica. También pueden formularse para proporcionar una liberación lenta o controlada del ingrediente activo contenido en los mismos usando, por ejemplo, hidroxipropilmetil celulosa en proporciones variables para proporcionar el perfil de liberación deseado, otras matrices poliméricas, liposomas y/o microesferas. Pueden esterilizarse, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro de retención de bacterias, o incorporando agentes esterilizantes en la forma de composiciones sólidas estériles que pueden disolverse en agua estéril o algún otro medio inyectable estéril inmediatamente antes de su uso. Estas composiciones opcionalmente también pueden contener agentes opacificantes y pueden poseer una composición tal que liberan el/los ingrediente(s) activo(s) solamente, o preferentemente, en una cierta porción del tracto gastrointestinal, opcionalmente, de manera retardada. Los ejemplos de composiciones de incrustación que se pueden usar incluyen sustancias poliméricas y ceras. El ingrediente activo también puede estar en forma microencapsulada, si es apropiado, con uno o más de los excipientes descritos anteriormente.

Las formas de dosificación líquidas para administración oral incluyen emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y licores farmacéuticamente aceptables. Además del ingrediente activo, las formas de dosificación líquidas pueden contener diluyentes inertes comúnmente utilizados en la técnica, tales como, por ejemplo, agua u otros solventes, agentes solubilizantes y emulsionantes tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, aceites (en particular aceite de semilla de algodón, de cacahuete, de maíz, de germen, de oliva, de ricino y de ajonjolí), glicerol, alcohol tetrahidrofurílico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitán y mezclas de los mismos.

Además de los diluyentes inertes, las composiciones para administración oral también pueden incluir adyuvantes tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, edulcorantes, aromatizantes, colorantes, perfumantes y conservadores.

Las suspensiones, además del/de los inhibidor(es) activos, pueden contener agentes de suspensión tales como, por ejemplo, alcoholes isoestearílicos etoxilados, ésteres de polioxietilen

sorbitol y sorbitán, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto y mezclas de los mismos.

Las formulaciones para administración rectal o vaginal pueden presentarse como un supositorio, el cual puede prepararse mezclando uno o más inhibidores con uno o más excipientes o portadores no irritantes adecuados que comprenden, por ejemplo, manteca de cacao, polietilenglicol, cera de supositorio o un salicilato, el cual es sólido a temperatura ambiente, pero líquido a temperatura corporal y, por lo tanto, se fundirá en el recto o cavidad vaginal y liberará el agente activo.

Las formulaciones que son adecuadas para la administración vaginal también incluyen diafragmas, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones de pulverización que contienen los vehículos que son conocidos en la técnica como apropiados.

Las formas de dosificación para la administración tópica o transdérmica de un compuesto seleccionado de la invención incluyen polvos, aerosoles, ungüentos, pastas, cremas, lociones, geles, soluciones, parches e inhalantes. El compuesto se puede mezclar en condiciones estériles con un portador farmacéuticamente aceptable, y con cualquiera de los conservadores, reguladores del pH o propelentes que puedan ser requeridos.

Los ungüentos, pastas, cremas y geles pueden contener, además del compuesto o los compuestos de la invención, excipientes, tales como grasas animales y vegetales, aceites, ceras, parafinas, almidón, tragacanto, derivados de celulosa, polietilenglicoles, siliconas, bentonitas, ácido silícico, talco y óxido de cinc, o mezclas de los mismos. Los polvos y los aerosoles pueden contener, además de los compuestos de la invención, excipientes tales como lactosa, talco, ácido silícico, hidróxido de aluminio, silicatos de calcio y poliamida en polvo, o mezclas de estas sustancias. Los aerosoles también pueden contener los propelentes habituales, tales como cloroflorohidrocarburos e hidrocarburos volátiles no sustituidos, tales como butano y propano.

Un compuesto carfilzomib pegilado de la invención puede administrarse por aerosol. Esto se logra preparando un aerosol acuoso, una preparación liposomal, o partículas sólidas que contienen la composición. Se podría usar una suspensión no acuosa (por ejemplo, propelente de fluorocarbono). En algunas modalidades, se prefieren los nebulizadores sónicos porque minimizan la exposición del agente al esfuerzo cortante, lo cual puede dar como resultado la degradación del compuesto. Habitualmente, se prepara un aerosol acuoso formulando una solución o una suspensión acuosa del agente junto con portadores y estabilizantes farmacéuticamente aceptables. Los vehículos y estabilizadores varían con los requisitos de la composición particular, pero típicamente incluyen tensoactivos no iónicos (Tweens, Pluronic, ésteres de sorbitán, lecitina, Cremophors), co-solventes

farmacéuticamente aceptables tales como polietilenglicol, proteínas inocuas como albúmina de suero, ésteres de sorbitán, ácido oleico, lecitina, aminoácidos tales como glicina, agentes reguladores del pH, sales, azúcares o alcoholes de azúcar. Los aerosoles generalmente se preparan a partir de soluciones isotónicas.

Los parches transdérmicos tienen la ventaja adicional de proporcionar una administración controlada de un compuesto de la invención en el cuerpo. Dichas formas de dosificación pueden prepararse disolviendo o dispersando el compuesto en el medio apropiado. También se pueden usar potenciadores de absorción para aumentar el flujo del/de los compuesto(s) a través de la piel. La velocidad de dicho flujo puede controlarse suministrando una membrana de control de la velocidad o dispersando el/los compuesto(s) en una matriz polimérica o un gel.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para administración parenteral comprenden uno o más compuestos de la invención en combinación con una o más soluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas, farmacéuticamente aceptables, o polvos estériles que pueden reconstituirse en soluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes del uso, los/las cuales pueden contener antioxidantes, soluciones amortiguadoras, bacteriostáticos, solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor deseado, o agentes de suspensión o espesantes. Los ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas que se dan a conocer en la presente incluyen agua para inyección, tal como para administración subcutánea (por ejemplo, agua estéril para inyección), etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares), reguladores del pH (tal como amortiguador de citrato), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, tales como lecitina, manteniendo tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones, y mediante el uso de tensoactivos.

Las composiciones farmacéuticas típicamente incluyen un portador farmacéuticamente aceptable. Tal como se usa en la presente, el término "portador farmacéuticamente aceptable" incluye un regulador de pH, agua estéril para inyección, disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción y similares, compatibles con la administración farmacéutica. En algunas modalidades, un vehículo farmacéuticamente aceptable es un sistema ácido-base regulador del pH, tal como una solución amortiguadora de citrato, para mantener un pH estable en la solución resultante. En

algunas modalidades, un portador farmacéuticamente aceptable es agua estéril para inyección. En algunas modalidades, un portador farmacéuticamente aceptable comprende ácido cítrico.

Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como conservadores, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la acción de microorganismos puede asegurarse mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, ácido fenol sórbico y similares. También puede ser deseable incluir agentes de ajuste de la tonicidad, tales como azúcares y similares en las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede provocarse mediante la inclusión de agentes que retardan la absorción tales como monoestearato de aluminio y gelatina. En algunos casos, con el fin de prolongar el efecto de un fármaco, es deseable disminuir la absorción del fármaco a partir de la inyección subcutánea o intramuscular. Por ejemplo, la absorción retardada de una forma del fármaco administrada parenteralmente se consigue disolviendo o suspendiendo el fármaco en un vehículo de aceite.

Las formas de depósito inyectables se preparan formando matrices de microencapsulación del (de los) compuesto(s) de la invención en polímeros biodegradables tales como polilactida-poliglicolida. Dependiendo de la relación, de carfilzomib a polímero, típicamente la relación en peso, y la naturaleza del polímero particular empleado, la velocidad de liberación de carfilzomib puede controlarse. Los ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen poli (ortoésteres) y poli (anhídridos). Las formulaciones inyectables de depósito también se preparan atrapando el fármaco en liposomas o microemulsiones que son compatibles con el tejido corporal.

Las preparaciones de agentes pueden administrarse por vía oral, parenteral, tópica o rectal. Se administran, por supuesto, mediante formas adecuadas para cada vía de administración. Por ejemplo, se administran en tabletas o en forma de cápsulas, mediante inyección, inhalación, loción para los ojos, ungüento, supositorio, infusión; por aplicación tópica mediante loción o ungüento; y por vía rectal mediante supositorios. En algunas modalidades, la administración es por vía oral.

Las expresiones "administración parenteral" y "administradas por vía parenteral" tal como se usan en la presente significan modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, usualmente por inyección, e incluyen, sin limitarse a las mismas, inyección intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbitaria, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal e intrasternal, e infusión.

Las frases "administración sistémica", "administradas sistémicamente", "administración periférica" y "administradas periféricamente" tal como se usan en la presente significan la

administración de un ligando, fármaco u otro material que no sea directamente en el sistema nervioso central, de forma tal que ingresa en el sistema del paciente y por lo tanto, está sujeto al metabolismo y otros procesos similares, por ejemplo, administración subcutánea.

Los compuestos de carfilzomib-PEG de la invención descritos en la presente se pueden administrar a seres humanos y otros animales para terapia mediante cualquier vía de administración adecuada, incluyendo por vía oral, nasal, por ejemplo por aerosol, rectal, intravaginal, parenteral, intrasistémica y por aplicación tópica, como por medio de polvos, ungüentos o gotas, incluidas la administración bucal y sublingual.

Independientemente de la vía de administración seleccionada, un compuesto de la invención, el cual se puede usar en una forma hidratada adecuada, y/o las composiciones farmacéuticas que se dan a conocer en la presente, se formula en una forma de dosificación farmacéuticamente aceptable por los métodos convencionales conocidos por los expertos en la técnica

Como se ha mencionado anteriormente, las cantidades de dosificación reales del compuesto carfilzomib PEG en las composiciones farmacéuticas que se dan a conocer en la presente se pueden variar para incluir una cantidad del agente de carfilzomib activo no pegilado que ha demostrado clínicamente ser efectivo y/o que es comercialmente aprobado como efectivo, para conseguir la respuesta terapéutica deseada en un paciente de cáncer, incluido, sin limitarse al mismo, un paciente con mieloma múltiple. Con este fin, la cantidad específica y/o concentración de un compuesto carfilzomib pegilado de la invención en una composición farmacéuticamente aceptable variará dependiendo de varios factores, incluyendo la dosificación del compuesto a administrar, las características farmacocinéticas del/de los compuesto(s) empleado(s), y la vía de administración. En general, las composiciones farmacéuticas que se dan a conocer en la presente pueden ser una solución acuosa que contiene aproximadamente 0.1-20% p/v de un compuesto de los que se dan a conocer en la presente, entre otras sustancias, para administración parenteral. Los intervalos de dosis típicos para los ingredientes activos del compuesto carfilzomib PEG son de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal por día, administrados en 1-4 dosis divididas cada día. Cada dosis dividida contendrá uno o más de los compuestos que se dan a conocer en la invención. La cantidad específica de dosificación de compuesto deseada debe ser una cantidad suficiente para suministrar una dosis terapéuticamente efectiva de carfilzomib libre actuante en el plasma del paciente, siendo que la cantidad de dosificación efectiva se basa en el uso aprobado por la normativa para indicaciones aprobadas por la normativa. Esta cantidad efectiva puede variar de paciente a paciente y generalmente depende de varios factores incluyendo el estado general de salud

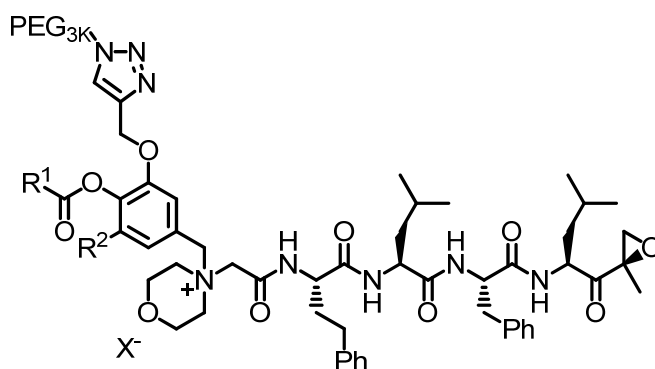
de un paciente y la composición de la formulación específica y la vía de administración del compuesto o los compuestos elegido(s).

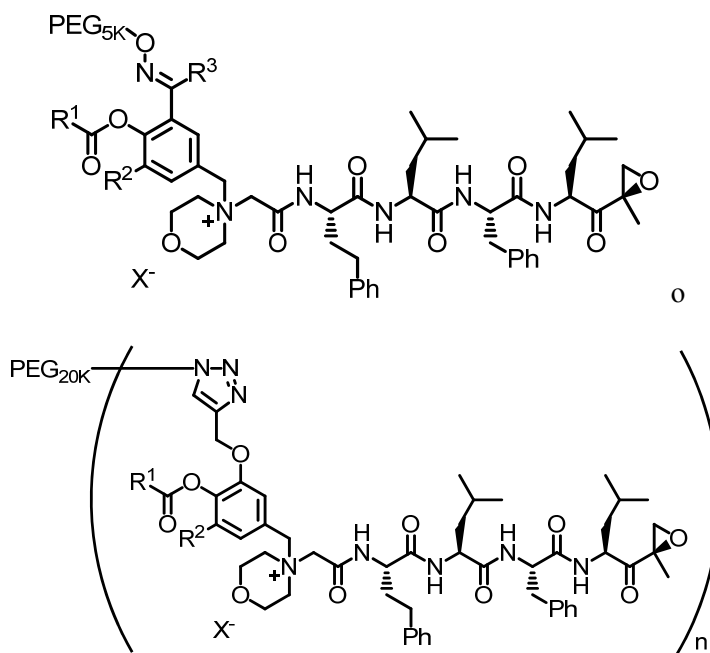
El carfilzomib está actualmente aprobado en dosis administradas una vez al día durante los dos primeros días consecutivos de cada semana durante 3 semanas consecutivas en un ciclo de 28 días, en una cantidad suficiente para proporcionar una concentración plasmática en los pacientes que oscile entre 20 mg/m^2 y 56 mg/m^2 . Por lo tanto, un compuesto carfilzomib PEG de mayor peso molecular de la invención debe administrarse en cantidades suficientes para proporcionar cantidades aproximadamente farmacocinéticamente equivalentes a los intervalos de dosificación aprobados. Por ejemplo, un compuesto conjugado de PEG de 2K de la invención es aproximadamente 24% en peso de carfilzomib libre. Por lo tanto, usando un sujeto masculino promedio con una superficie corporal media de 1.9 m^2 , para conseguir aproximadamente una dosis equivalente de 27 mg/m^2 , habría que dosificar aproximadamente 215 mg del compuesto conjugado de PEG CFZ 2k. De forma similar, se puede dosificar aproximadamente 1100 mg de un compuesto conjugado de PEG CFZ de 20K para administrar la misma cantidad de carfilzomib que una dosis de 70 mg/m^2 de la formulación actualmente aprobada para carfilzomib.

En la modalidad 71 de la invención, se da a conocer un método para tratar el cáncer en un sujeto que necesita el tratamiento, siendo que el método comprende administrar al sujeto una cantidad de dosificación efectiva de un compuesto carfilzomib pegilado de la Fórmula I para tratar el cáncer. En la modalidad 72, la invención da a conocer el método de la modalidad 71 en el cual el cáncer es mieloma múltiple. En la modalidad 73, la invención da a conocer el método de cualquiera de las modalidades 71-72 en el cual la cantidad de dosificación efectiva de carfilzomib PEG está en el intervalo de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 2000 mg. En la modalidad 74, la invención da a conocer el método de cualquiera de las modalidades 71-73 en el cual la cantidad de dosificación efectiva está en el intervalo de aproximadamente 150 mg a aproximadamente 1000 mg por día. En la modalidad 75, la invención da a conocer el método de cualquiera de las modalidades 71-74 en el cual la cantidad de dosificación efectiva del compuesto carfilzomib PEG administrado está en el intervalo de aproximadamente 200 mg a aproximadamente 500 mg por día. En la modalidad 76, la invención da a conocer el método de cualquiera de las modalidades 71-73 en el cual la cantidad de dosificación efectiva de un compuesto carfilzomib PEG de 2K administrado está en el intervalo de aproximadamente 150 mg a aproximadamente 600 mg por día. En la modalidad 77, la invención da a conocer el método de cualquiera de las modalidades 71-73 en el cual la cantidad de dosificación efectiva de un compuesto carfilzomib PEG de 3K administrado está en el intervalo de aproximadamente 300 mg a aproximadamente 2000 mg por día. En la modalidad 78, la

invención da a conocer el método de cualquiera de las modalidades 71-73 en el cual la cantidad de dosificación efectiva de un compuesto carfilzomib PEG de 5K administrado está en el intervalo de aproximadamente 800 mg a aproximadamente 3000 mg por día. En la modalidad 79, la invención da a conocer el método de cualquiera de las modalidades 71-73 en el cual la cantidad de dosificación efectiva de un compuesto de carfilzomib PEG de 20K administrado está en el intervalo de aproximadamente 800 mg a aproximadamente 3000 mg por día. En la modalidad 80, la invención da a conocer el método de cualquiera de las modalidades 71-73 en el cual la cantidad de dosificación efectiva de un compuesto carfilzomib PEG administrado está en el intervalo de aproximadamente 200 mg a aproximadamente 1500 mg por día. En la modalidad 81, la invención da a conocer el método de cualquiera de las modalidades 71-73 en el cual la cantidad de dosificación efectiva del compuesto carfilzomib PEG administrado está en el intervalo de aproximadamente 5 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg en peso del sujeto por día. En la modalidad 82, la invención da a conocer el método de cualquiera de las modalidades 71-73 en el cual la cantidad de dosificación efectiva de un compuesto carfilzomib PEG de 2K, 3K o 5K administrado está en el intervalo de aproximadamente 200 mg a aproximadamente 800 mg por día. En la modalidad 83, la invención da a conocer el método de cualquiera de las modalidades 71-73 en el cual la cantidad de dosificación efectiva de un compuesto carfilzomib PEG de 2K o 3K administrado está en el intervalo de aproximadamente 200 mg a aproximadamente 500 mg por día. En la modalidad 84, la invención da a conocer el método de cualquiera de las modalidades 71-73 en el cual la cantidad de dosificación efectiva de un compuesto carfilzomib PEG de 5K o 20K administrado está en el intervalo de aproximadamente 400 mg a aproximadamente 1000 mg por día. En la modalidad 85, la invención da a conocer el método de cualquiera de las modalidades 71-84, en el cual el método comprende además la administración de un esteroide. En la modalidad 86, la invención da a conocer el método de la modalidad 85 en el cual el esteroide se selecciona del grupo que consiste en dexametasona y prednisona. En la modalidad 87, la invención da a conocer el método de cualquiera de las modalidades 85-86 en el cual el esteroide es dexametasona. En la modalidad 88, la invención da a conocer el método de cualquiera de las modalidades 85-86 en las que el esteroide es prednisona. En la modalidad 89, la invención da a conocer el método de cualquiera de las modalidades 71-88, en el cual el método comprende además la administración de un agente inmunomodulador seleccionado del grupo que consiste en talidomida, lenalidomida y pomalidomida. En la modalidad 90, la invención da a conocer el método de la modalidad 89, en el cual el agente inmunomodulador es lenalidomida o pomalidomida. En la modalidad 91, la invención da a conocer el método de cualquiera de las modalidades 89-90, en el cual el agente inmunomodulador es lenalidomida. En la modalidad 92, la invención da a conocer el método de

cualquiera de las modalidades 89-90, en el cual el agente inmunomodulador es pomalidomida. En la modalidad 93, la invención da a conocer el método de cualquiera de las modalidades 71-88, en el cual el método comprende además la administración de un agente inhibidor de CD-38. En la modalidad 94, la invención da a conocer el método de la modalidad 93, en el cual el agente inhibidor de CD-38 es daratumumab. En la modalidad 95, la invención da a conocer el método de cualquiera de las modalidades 71-94 en el cual el cáncer es mieloma múltiple recurrente o resistente. En la modalidad 96, la invención da a conocer el método de cualquiera de las modalidades 71-94 en el cual el cáncer es un mieloma múltiple recientemente diagnosticado. En la modalidad 97, la invención da a conocer el método de la modalidad 96 en el cual el cáncer es un mieloma múltiple recientemente diagnosticado y en el cual el paciente es apto para un trasplante de células madre, según lo determinado por un médico licenciado y autorizado. En la modalidad 98, la invención da a conocer el método de la modalidad 96 en el cual el cáncer es un mieloma múltiple recientemente diagnosticado y en el cual el paciente no es apto para un trasplante de células madre, según lo determinado por un médico licenciado y autorizado. En la modalidad 99, la invención da a conocer el método de cualquiera de las modalidades 71-98, en donde el método comprende administrar al sujeto una composición farmacéutica que comprende un compuesto carfilzomib PEG de la Fórmula I. En la modalidad 100, la invención da a conocer el método de la modalidad 99 en el cual la composición farmacéutica es una solución oral o una solución parenteral. En la modalidad 101, la invención da a conocer el método de cualquiera de las modalidades 99-100, en el cual la composición farmacéutica es una preparación liofilizada que se puede reconstituir antes de la administración. En la modalidad 102, la invención da a conocer los métodos de cada una de las modalidades 71-98, en donde el compuesto carfilzomib PEG es





donde R^1 es alquiloCi-io;

R² es alquiloCi-6, -OCH₃ o halógeno;

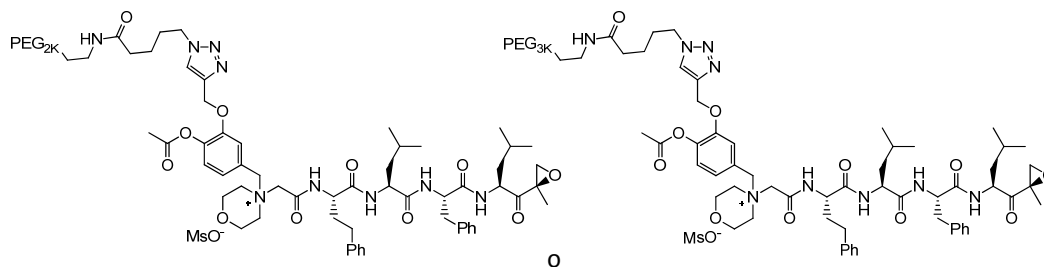
$$R^3 \text{ es } H \text{ o } CH_3;$$

X⁻ es un contra anión a seleccionar a partir de un anión cloruro y un anión alquil sulfonato;

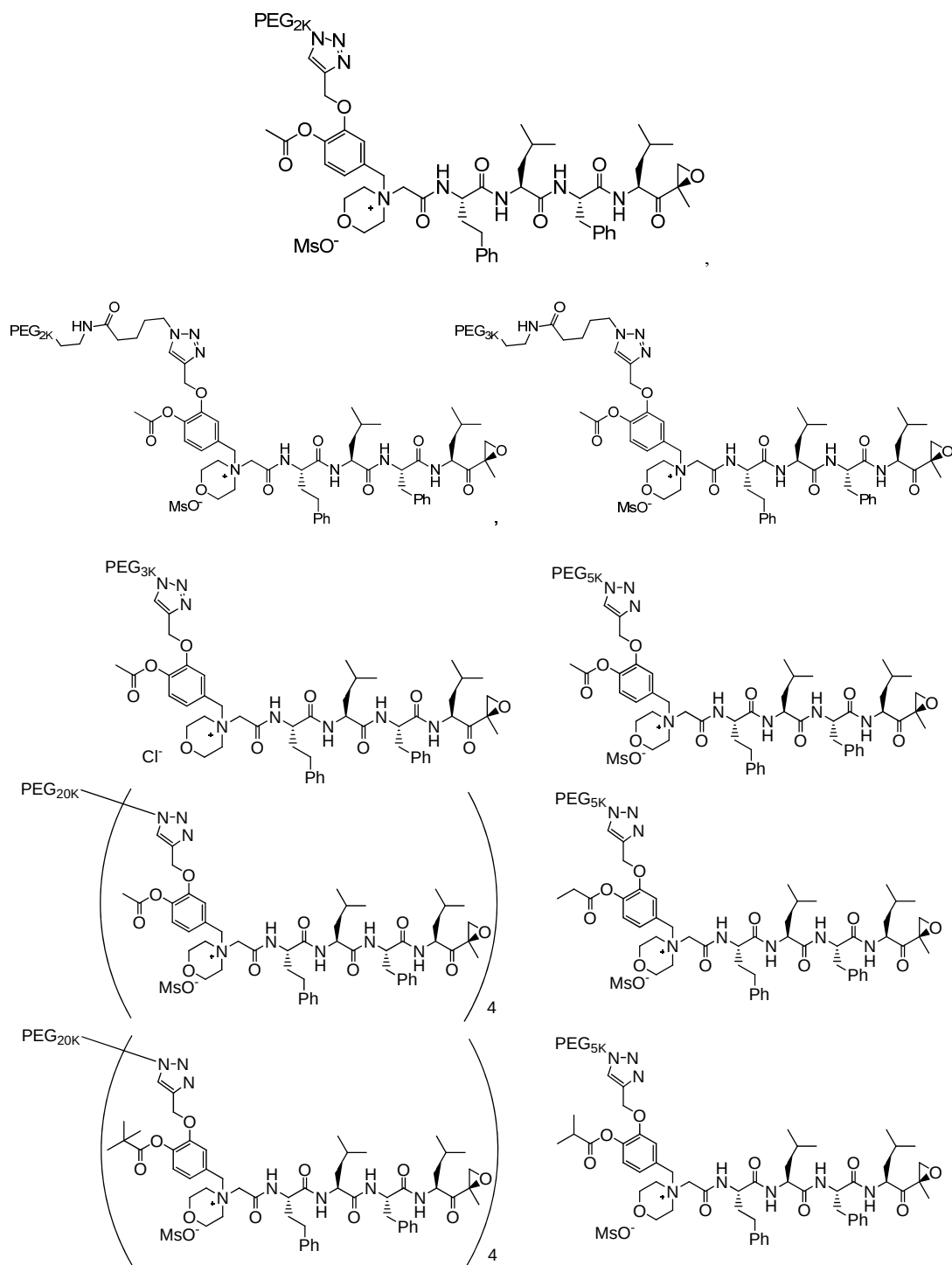
n es 4; y

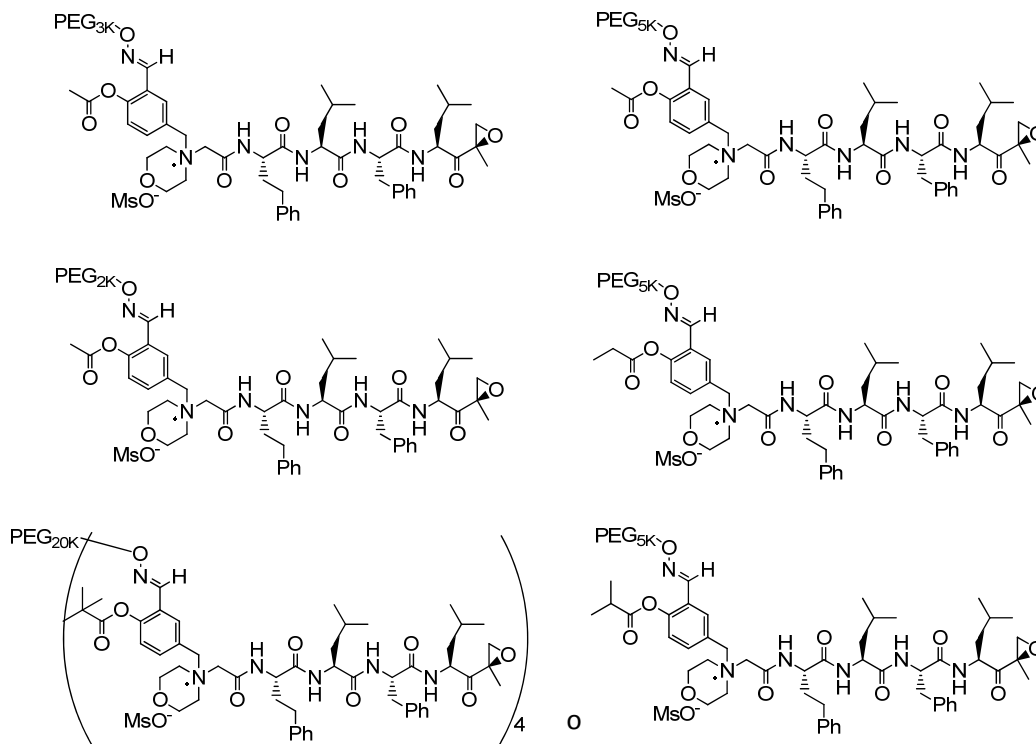
PEG es una porción polimérica de polietilenglicol de peso molecular 3000, 5000 o 20000 dalton.

En la modalidad 103, la invención da a conocer los métodos conforme a las modalidades 71-98, donde el compuesto carfilzomib pegilado es



En la modalidad 104, la invención da a conocer los métodos conforme a las modalidades 71-98, donde el compuesto carfilzomib PEG es





Combinaciones

Aunque un compuesto carfilzomib PEG de la invención se puede dosificar o administrar como único agente farmacéutico activo, también puede usarse en combinación con uno o más agentes, tales como un segundo agente anticanceroso. Cuando se administra como una combinación, el ingrediente activo de carfilzomib PEG y el otro agente pueden formularse como composiciones separadas que se administran simultáneamente o secuencialmente en diferentes momentos, o pueden suministrarse ambos agentes activos como una composición sencilla.

La frase "co-terapia" (o "terapia de combinación"), al definir el uso de un compuesto carfilzomib PEG de la presente invención y otro agente anticanceroso, pretende abarcar la administración de cada uno de los agentes en forma secuencial en un régimen que proporcionará los efectos beneficiosos de la combinación de fármacos, y también debe entenderse de forma tal que abarca la coadministración de estos agentes de una manera sustancialmente simultánea, tal como en una formulación de dosificación sencilla que tiene una relación fija de estos agentes activos, o en múltiples formulaciones de dosificación separadas para cada agente activo. Por lo tanto, la invención no se limita a una secuencia de administración, es decir, el (los) compuesto(s) de carfilzomib PEG puede(n) administrarse antes de, o simultáneamente con, o después de la administración del otro agente.

En ciertas modalidades, un compuesto carfilzomib PEG descrito en la presente se administra conjuntamente con uno o más inhibidores del proteasoma adicionales. Un inhibidor del proteasoma adicional puede incluir, por ejemplo, bortezomib, oprozomib o ixazomib. En otra modalidad, el compuesto carfilzomib PEG descrito en la presente se administra en combinación con un compuesto inmunomodulador, incluidas talidomida, lenalidomida y pomalidomida. En una modalidad de la modalidad inmediatamente precedente, el carfilzomib PEG se administra en combinación con un agente inmunomodulador seleccionado entre lenalidomida y pomalidomida. En una modalidad adicional, la invención da a conocer un método para tratar el cáncer en un sujeto mediante la administración al sujeto de una terapia de combinación que comprende un compuesto carfilzomib PEG de la Fórmula I o II y un agente inmunomodulador. En una modalidad adicional, el cáncer es mieloma múltiple.

En ciertas modalidades, un compuesto carfilzomib PEG descrito en la presente se administra conjuntamente con uno o más agentes quimioterapéuticos. Los quimioterapéuticos adecuados pueden incluir productos naturales tales como alcaloides de la vinca (es decir, vinblastina, vincristina y vinorelbina), taxanos (por ejemplo, docetaxel, paclitaxel; por ejemplo docetaxel), epidipodofilotoxinas (es decir, etopósido, tenipósido), antibióticos (dactinomicina (actinomicina D), daunorrubicina, doxorrubicina e idarubicina; por ejemplo, doxorrubicina), antraciclinas, mitoxantrona, bleomicinas, plicamicina (mitramicina) y mitomicina, enzimas (L-asparaginasa que metaboliza sistemáticamente la L-asparagina y priva a las células que no tienen la capacidad de sintetizar su propia asparagina); agentes antiplaquetarios; agentes de alquilación anti-proliferativos/antimitóticos tales como mostazas de nitrógeno (mechloretenamina, ifosfamida, ciclofosfamida y análogos, melfalán, clorambucilo; por ejemplo, melfalán), etileniminas y metilmelaminas (hexaametilmelamina y tiotepa), alquil sulfonatos (busulfán), nitrosoureas (carmustina (BCNU) y análogos, estreptozocina), trazenos - dacarbazina (DTIC); antimetabolitos anti-proliferativos/antimitóticos tales como análogos de ácido fólico (metotrexato), análogos de pirimidina (fluorouracilo, floxuridina y citarabina), análogos de purina e inhibidores relacionados (mercaptopurina, tioguanina, pentostatina y 2-clorodesoxiadenosina); inhibidores de la aromatasa (anastrozol, exemestano y letrozol); complejos de coordinación de platino (cisplatino, carboplatino), procarbazona, hidroxiaurea, mitotano, aminoglutarimida; agentes de unión al ADN/citotóxicos (por ejemplo, Zalypsis); inhibidores de la histona desacetilasa (HDAC) (por ejemplo, tricotatina, butirato de sodio, apicidano, ácido suberoil anilida hidroxámico (SAHA (Vorinostat)), tricotatina A, depsipéptido, apicidina, A-161906, scriptaid, PXD-101, CHAP, ácido butírico, depudecina, oxamflatina, fenilbutirato, ácido valproico, MS275 (N- (2-aminofenil) -4- [N- (piridina-3-ilmetoxi-carbonil) aminometil] benzamida), LAQ824/LBH589, CI994, MGCD0103, ACY1215,

Panobinostat); Hormonas (es decir, estrógeno) y agonistas hormonales tales como agonistas de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH) (goserelina, leuprolida y triptorelina). Otros agentes quimioterapéuticos pueden incluir mecloretamina, camptotecina, ifosfamida, tamoxifeno, raloxifeno, gemcitabina, navelbina, o cualquier variante análoga o derivada de cualquiera de los anteriores.

En ciertas modalidades, un compuesto carfilzomib PEG descrito en la presente se administra conjuntamente con una citocina. Entre las citocinas se encuentran, sin limitarse a las mismas, interferón- γ , - α , γ - β , interleucinas 1-8, 10 y 12, factor estimulante de colonias de monocitos y granulocitos (GM-CSF), TNF α y β , y TGF β .

En ciertas modalidades, un compuesto carfilzomib PEG descrito en la presente se administra conjuntamente con un esteroide. Entre los esteroides adecuados se encuentran, sin limitarse a los mismos, 21-acetoxipregnenolona, alclometasona, algestona, amcinonida, beclometasona, betametasona, budesonida, cloroprednisona, clobetasol, clocortolona, cloprednol, corticosterona, cortisona, cortivazol, deflazacort, desonida, desoximetasona, dexametasona, diflorasona, difluocortolona, difuprednato, enoxolona, fluazacort, flucloronide, flumetasona, flunisolida, fluocinolona acetona, fluocinonida, fluocortina butilo, fluocortolona, fluorometolona, acetato de fluperolona, acetato de fluprednideno, fluprednisolona, flurandrenolida, propionato de fluticasona, formocortal, halcinonida, propionato de halobetasol, halometasona, hidroclortisona, loteprednol etabonato, mazipredona, medrisona, meprednisona, metilprednisolona, furoato de mometasona, parametasona, prednicarboato, prednisolona, prednisolona 25-dietilaminoacetato, fosfato sódico de prednisolona, prednisona, prednival, prednilideno, rimexolona, tixocortol, triamcinolona, acetona de triamcinolona, triamcinolona bencetonida, triamcinolona hexacetona, y sales y/o derivados de los mismos (por ejemplo, hidroclortisona, dexametasona, metilprednisolona y prednisolona; por ejemplo, dexametasona). En ciertas modalidades, un compuesto carfilzomib PEG descrito en la presente se administra conjuntamente con dexametasona. En ciertas modalidades, la terapia conjunta incluye los regímenes de dosificación proporcionados en la etiqueta de KYPROLIS (carfilzomib), según lo aprobado por la US FDA y por la EMA.

En algunas modalidades, un compuesto carfilzomib PEG descrito en la presente se administra conjuntamente con un agente inmunoterapéutico. Entre los agentes inmunoterapéuticos adecuados se encuentran, sin limitarse a los mismos, moduladores MDR (verapamilo, valspordar, biricodar, tariquidar, laniquidar), ciclosporina, talidomida y anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales pueden estar desnudos o conjugados como rituximab, tositumomab, alemtuzumab,

epratuzumab, ibritumomab tiuxetan, gemtuzumab ozogamicina, bevacizumab, cetuximab, erlotinib y trastuzumab.

En ciertas modalidades, un compuesto carfilzomib PEG descrito en la presente se administra conjuntamente con uno o más inhibidores de la histona desacetilasa (HDAC) (por ejemplo, tricotatina, butirato sódico, apicidano, ácido suberoil anilida hidroxámico (SAHA) (Vorinostat), tricotatina A, depsipéptido, apicidina, A-161906, scriptaid, PXD-101, CHAP, ácido butírico, depudecina, oxamflatina, fenilbutirato, ácido valproico, MS275 (N- (2-aminofenil) -4- [N- (piridin-3-ilmetoxi) - carbonil) aminometil] benzamida), LAQ824/LBH589, CI994, MGCD0103, ACY - 1215, Panobinostat; por ejemplo SAHA, ACY - 1215, Panobinostat).

En ciertas modalidades, un compuesto carfilzomib PEG descrito en la presente se administra conjuntamente con una o más mostazas de nitrógeno (mecloretamina, ifosfamida, ciclofosfamida y análogos, melfalán, clorambucilo; por ejemplo, melfalán). En ciertas modalidades, un compuesto carfilzomib PEG descrito en la presente se administra conjuntamente con uno o más agentes de enlace al ADN/citotóxicos (por ejemplo, Zalypsis). En ciertas modalidades, un compuesto carfilzomib PEG descrito en la presente se administra conjuntamente con uno o más taxanos (por ejemplo, docetaxel, paclitaxel; por ejemplo, docetaxel).

En ciertas modalidades, un compuesto carfilzomib PEG descrito en la presente se administra conjuntamente con uno o más antibióticos (dactinomicina (actinomicina D), daunorrubicina, doxorubicina e idarubicina; por ejemplo, doxorubicina).

Lo anterior es meramente ilustrativo de la invención y no pretende limitar el alcance de la invención a los usos descritos. Las variaciones y cambios que son habituales para un experto en la técnica se consideran dentro del alcance y la naturaleza de la invención, según se definen en las reivindicaciones adjuntas.