ESTEROIDES Y CONJUGADOS DE PROTEÍNAS DE LOS MISMOS

REFERENCIA CRUZADA A LAS SOLICITUDES RELACIONADAS

[1] Esta solicitud reclama la prioridad y el beneficio de la Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos de Norteamérica No. 62/508,317 presentada el 18 de Mayo de 2017, y también de la Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos de Norteamérica No. 62/419,365, presentada el 8 de Noviembre de 2016, todo el contenido de cada una de las cuales se incorpora aquí en su totalidad para todos los propósitos.

CAMPO

[2] Se proporcionan aquí nuevos esteroides, conjugados de proteínas de los mismos, y métodos para tratar padecimientos, desórdenes, y condiciones que comprenden la administración de los esteroides y conjugados.

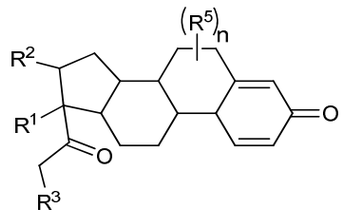
ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA

[3] Los conjugados anticuerpo-fármaco (ADCs) son anticuerpos que están unidos covalentemente a fármacos de moléculas pequeñas biológicamente activos, combinando así la especificidad dirigida de los anticuerpos con el modo de acción y la potencia de los fármacos de moléculas pequeñas. La utilidad terapéutica de los ADC(s) se ha validado en el tratamiento del cáncer y es un importante enfoque de estudio en curso. ADCETRIS® (bentruximab vedotina) y KADCYLA® (ado-trastuzumab emtansina) son ADCs aprobados para el tratamiento de ciertos tipos de cáncer, y al menos cuarenta ADCs están actualmente en desarrollo clínico.

[4] Los glucocorticoides (GCs) son esteroides de moléculas pequeñas que se unen a receptores de glucocorticoides (GRs) y se utilizan en terapias antiinflamatorias e inmunosupresoras. Sin embargo, debido a la expresión ubicua de los receptores de glucocorticoides en muchos tipos de células, los tratamientos de glucocorticoides se ven comprometidos por las toxicidades para la mayoría de los sistemas del organismo. De esta manera, existe la necesidad tanto de nuevos glucocorticoides como de nuevas terapias que minimicen los efectos secundarios que surgen de la administración de glucocorticoides, particularmente aquellos que surgen de la activación de receptores de glucocorticoides en células no objetivo. La presente divulgación proporciona soluciones a las necesidades anteriormente mencionadas, así como a otras necesidades no satisfechas en el campo al cual pertenece la presente divulgación. En la presente divulgación se incluyen conjugados anticuerpo-fármaco que comprenden cargas útiles de glucocorticoides.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

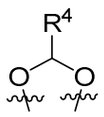
[5] Se proporcionan aquí compuestos y métodos útiles para el tratamiento de diversos padecimientos, desórdenes, o condiciones. En ciertos aspectos, los compuestos tienen la estructura de la Fórmula (**A**):



(**A**);

o una sal, solvato, estereoisómero, o derivado farmacéuticamente aceptable de la misma,

en donde:

R^1 y R^2 son, independientemente, –H, alquilo, alquil-C(O)-O–, –OH, o halo; o R^1 y R^2 conjuntamente forman  ,

en donde R^4 es alquilo, arilo, arilalquilo, o un heterocicloalquilo que contiene N,

en donde el alquilo, arilo, arilalquilo, y heterocicloalquilo que contiene N están, independientemente en cada caso, opcionalmente sustituidos con -NR^aR^b;

R^3 es –OH, R^Z-C(O)-X–, heteroalquilo, piperidinilo, –NR^aR^b, -oxiaril–NR^aR^b o -Z-$A(R^P)_t$;

R^5 es, independientemente en cada caso, –OH, halo, alquilo, o arilalquilo;

R^Z es alquilo;

X es O o NR^a;

Z es S, S(O), $S(O)_2$, SO_2NR^a, O, $C(O)NR^a$, C(O), o NR^a;

A es arilo, arilalquilo, o heteroarilo;

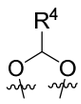
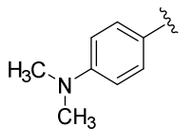
R^P es, independientemente en cada caso, halo, alquilo opcionalmente sustituido, –OH, o -NR^aR^b;

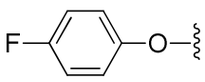
R^a y R^b son, independientemente en cada caso, –H, alquilo opcionalmente sustituido, o arilo opcionalmente sustituido;

n es un entero desde 0-19; y

t es un entero desde 1-3;

con la condición de que:

(1) R^3 no es –OH (a) cuando R^1 es –OH o (b) cuando R^1 y R^2 conjuntamente forman  , en donde R^4 es $C_{1\text{-}9}$alquilo o  y

(2) R^3 no es  .

[6] En ciertos aspectos, los compuestos son conjugados proteína-fármaco, por ejemplo, conjugados anticuerpo-fármaco, que comprenden una proteína de unión a antígeno, por ejemplo, anticuerpo y un compuesto de Fórmula (**A**).

[7] En ciertos aspectos, los compuestos son conjugados proteína-fármaco, por ejemplo, conjugados anticuerpo-fármaco, que comprenden una proteína de unión a antígeno, por ejemplo, anticuerpo, un compuesto de Fórmula (**A**) y un radical ciclodextrina.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[8] La FIGURA 1 muestra una secuencia para sintetizar los ciertos esteroides aquí descritos.

[9] La FIGURA 2 muestra una secuencia para modificar la posición del alcohol primario de la budesonida.

[10] La FIGURA 3 muestra una secuencia para modificar la posición del alcohol primario de la Flumetasona.

[11] La FIGURA 4 muestra una secuencia para modificar la posición del alcohol primario de la dexametasona.

[12] La FIGURA 5 muestra un espectro de resonancia magnética de efecto nuclear Overhauser (NOE) de dos dimensiones (a partir de ahora, “2D–NOESY”) para el compuesto 7-1*R* en la Tabla 1.

[13] La FIGURA 6 muestra un 2D–NOESY para el compuesto 7-1*S* en la Tabla 1.

[14] La FIGURA 7 muestra un espectro 2D–NOESY para 11-5*R* en la Tabla 1.

[15] La FIGURA 8 muestra un espectro 2D–NOESY para el compuesto 11-5*S* en la Tabla 1.

[16] La FIGURA 9 muestra unos métodos generales para sintetizar ciertos Enlazador-Cargas útiles.

[17] La FIGURA 10 muestra una secuencia para sintetizar DIBAC–Suc–NHS (Compuesto (**V**)).

[18] La FIGURA 11 muestra una secuencia para sintetizar DIBAC–Suc–PEG_4–ácido/NHS (Compuesto (**VI**)).

[19] La FIGURA 12 muestra una secuencia para sintetizar BCN–PEG_4–Ácido (Compuesto (**VII**)).

[20] La FIGURA 13 muestra una secuencia para sintetizar DIBAC–Suc–PEG_4–VC–pAB–PNP (Compuesto (**VIII**)).

[21] La FIGURA 14 muestra una secuencia para sintetizar Enlazador–Carga útil **1** (**LP1**).

[22] La FIGURA 15 muestra una secuencia para sintetizar Enlazador–Carga útil **2** (**LP2**) y Enlazador–Carga útil **3** (**LP3**).

[23] La FIGURA 16 muestra una secuencia para sintetizar Enlazador–Cargas útiles **4-11** (**LP4-LP11**).

[24] La FIGURA 17 muestra una secuencia para sintetizar Enlazador–Carga útil **12** (**LP12**).

[25] La FIGURA 18 muestra una secuencia de síntesis para hacer Enlazador–Carga útil **12** (**LP13**) y Enlazador–Carga útil **14** (**LP14**).

[26] La FIGURA 19 muestra un proceso sintético general para una conjugación de ADC a través de una reacción clic [2+3] con LP4.

[27] La FIGURA 20 muestra un Gel SDS-PAGE teñido con Coomassie de un anticuerpo anti-PRLR, anticuerpo anti-PRLR funcionalizado con azido, y conjugado anticuerpo anti-PRLR-LP4 como se describe en el Ejemplo 59

[28] La FIGURA 21 muestra la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) de un anticuerpo anti-PRLR, anticuerpo funcionalizado con azido, y Conjugado 4DAR anti-PRLR-LP4 como se describe en el Ejemplo 59.

[29] La FIGURA 22 muestra una ESI-MS del anticuerpo anti-PRLR, anticuerpo anti-PRLR funcionalizado con azido y conjugado anticuerpo anti-PRLR-LP4 como se describe en el Ejemplo 59.

[30] Las FIGURAS 23A y 23B muestran la activación de GR selectiva en células 293/PRLR/GRE-Luc y células 293/MMTV-Luc, respectivamente, mediante ADCs de esteroides y control de budesonida como se describe en el Ejemplo 64.

[31] La FIGURA 24 muestra la contribución del enlazador-carga útil a la activación de GR por el ADC de esteroides y el control de budesonida según se prueba en células 293/PRLR/GRE-Luc como se describe en el Ejemplo 65.

[32] Las FIGURAS 25A a 25D muestran la activación del receptor de glucocorticoides en una línea celular HEK293/MMTV–luc/IL–2Rγ/IL7R mediante

Budesonida, 11-5 en la Tabla 1, y anti-IL2Rγ ncADC a las veinticuatro (24), cuarenta y ocho (48), o setenta y dos (72) horas como se describe en el Ejemplo 66.

[33] La FIGURA 26 muestra una secuencia para sintetizar Enlazador–Carga útil (**LP7**).

[34] La FIGURA 27 muestra un proceso sintético para preparar el compuesto (**27b**).

[35] La FIGURA 28 muestra una secuencia para sintetizar Enlazador–Cargas útiles (**LP15** y **LP16**).

[36] La FIGURA 29 muestra un proceso sintético general para una conjugación de ADC a través de una reacción clic [2+3] con Ciclodextrina-Enlazador-Cargas útiles.

[37] La FIGURA 30 muestra la bioactividad de los ADCs de esteroides con y sin enlazadores de ciclodextrina en una gráfica de unidades relativas de luz (RLU) frente a Log_{10} [M].

[38] La FIGURA 31 muestra una secuencia para sintetizar ciertos esteroides (cargas útiles 1-6) aquí descritos.

[39] La FIGURA 32 muestra una secuencia para sintetizar ciertos enlazador-esteroides (LP101 a LP116).

[40] La FIGURA 33 muestra un proceso sintético general para una conjugación de ADC mediante reacción clic [2+3].

[41] La FIGURA 34 muestra la ESI–MS de anti-PRLR Ab, anti-PRLR Ab–N_3, y anti-PRLR-LPs.

[42] La FIGURA 35 muestra la ESI–MS de anti-Fel d1 Ab, anti–Fel d1 Ab–PEG_3–N_3, y anti-Fel d1 Ab-LPs.

[43] Las FIGURAS 36A y 36B muestran la bioactividad de los ADCs de esteroides en células positivas al antígeno (células 293_PRLR_PBind GR/UAS-Luc) frente a en células negativas al antígeno (células 293_PBind GR/UAS-Luc), respectivamente, en una gráfica de unidades relativas de luz (RLU) frente a Log_{10} [M].

[44] La FIGURA 37A muestra la concentración en sangre media-tiempo proporciona para los compuestos 4b y 6-I.

[45] La FIGURA 37B muestra el nivel de TNF-α en muestras de sangre de las cargas útiles 4b y 6-I como se describe en los Ejemplos 120-121.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

A. DEFINICIONES

[46] Como se utiliza aquí, “alquilo” se refiere a un radical hidrocarburo monovalente y

saturado. El alquilo opcionalmente está sustituido y puede ser lineal, ramificado, o cíclico, es decir, cicloalquilo. El alquilo incluye, pero no se limita a, aquellos que tienen 1–20 átomos de carbono, es decir, alquilo de $C_{1–20}$; 1–12 átomos de carbono, es decir, alquilo de $C_{1–12}$; 1–8 átomos de carbono, es decir, alquilo de $C_{1–8}$; 1–6 átomos de carbono, es decir, alquilo de $C_{1–6}$; y 1–3 átomos de carbono, es decir, alquilo de $C_{1–3}$. Ejemplos de radicales alquilo incluyen, pero no se limitan a metilo, etilo, *n*–propilo, *i*–propilo, *n*–butilo, *s*–butilo, *t*–butilo, *i*–butilo, un radical pentilo, un radical hexilo, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, y ciclohexilo. “Alquileno” es alquilo divalente.

[47] Como se utiliza aquí, “haloalquilo” se refiere a alquilo, según se define anteriormente, en donde el alquilo incluye al menos un sustituyente seleccionado a partir de un halógeno, por ejemplo, F, Cl, Br, o I.

[48] Como se utiliza aquí, “alquenilo” se refiere a un radical hidrocarburo monovalente que contiene al menos dos átomos de carbono y uno o más dobles enlaces carbono-carbono no aromáticos. El alquenilo opcionalmente está sustituido y puede ser lineal, ramificado, o cíclico. El alquenilo incluye, pero no se limita a, aquellos que tienen 2–20 átomos de carbono, es decir, alquenilo de $C_{2–20}$; 2–12 átomos de carbono, es decir, alquenilo de $C_{2–12}$; 2–8 átomos de carbono, es decir, alquenilo de $C_{2–8}$; 2–6 átomos de carbono, es decir, alquenilo de $C_{2–6}$; y 2–4 átomos de carbono, es decir, alquenilo de $C_{2–4}$. Ejemplos de radicales alquenilo incluyen, pero no se limitan a vinilo, propenilo, butenilo, y ciclohexenilo. “Alquenileno” es alquenilo divalente.

[49] Como se utiliza aquí, “alquinilo” se refiere a un radical hidrocarburo monovalente que contiene al menos dos átomos de carbono y uno o más triples enlaces carbono-carbono. El alquinilo opcionalmente está sustituido y puede ser lineal, ramificado, o cíclico. El alquinilo incluye, pero no se limita a, aquellos que tienen 2–20 átomos de carbono, es decir, alquinilo de $C_{2–20}$; 2–12 átomos de carbono, es decir, alquinilo de $C_{2–12}$; 2–8 átomos de carbono, es decir, alquinilo de $C_{2–8}$; 2–6 átomos de carbono, es decir, alquinilo de $C_{2–6}$; y 2–4 átomos de carbono, es decir, alquinilo de $C_{2–4}$. Ejemplos de radicales alquinilo incluyen, pero no se limitan a etinilo, propinilo, y butinilo. “Alquinileno” es alquinilo divalente.

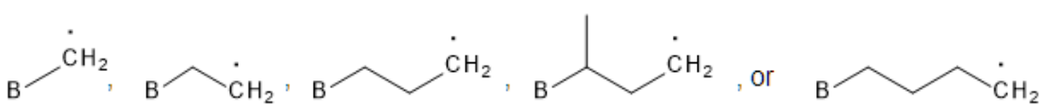
[50] Como se utiliza aquí, “alcoxi” se refiere a un radical hidrocarburo monovalente y saturado en donde el hidrocarburo incluye un enlace sencillo a un átomo de oxígeno y en donde el radical se localiza en el átomo de oxígeno, por ejemplo, $CH_3CH_2–O\cdot$ para etoxi. Los sustituyentes alcoxi se unen al compuesto que sustituyen a través de este átomo de oxígeno del sustituyente alcoxi. El alcoxi opcionalmente está sustituido y puede ser lineal,

ramificado, o cíclico, es decir, cicloalcoxi. El alcoxi incluye, pero no se limita a, aquellos que tienen 1–20 átomos de carbono, es decir, alcoxi de $C_{1–20}$; 1–12 átomos de carbono, es decir, alcoxi de $C_{1–12}$; 1–8 átomos de carbono, es decir, alcoxi de $C_{1–8}$; 1–6 átomos de carbono, es decir, alcoxi de $C_{1–6}$; y 1–3 átomos de carbono, es decir, alcoxi de $C_{1–3}$. Ejemplos de los radicales alcoxi incluyen, pero no se limitan a metoxi, etoxi, *n*–propoxi, *i*–propoxi, *n*–butoxi, *s*–butoxi, *t*–butoxi, *i*–butoxi, un radical pentoxi, un radical hexoxi, ciclopropoxi, ciclobutoxi, ciclopentoxi, y ciclohexoxi.

[51] Como se utiliza aquí, “haloalcoxi” se refiere a alcoxi, según se define anteriormente, en donde el alcoxi incluye al menos un sustituyente seleccionado a partir de un halógeno, por ejemplo, F, Cl, Br, o I.

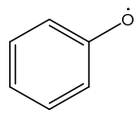
[52] Como se utiliza aquí, “arilo” se refiere a un radical monovalente que es un radical de un compuesto aromático en donde los átomos del anillo son átomos de carbono. El arilo opcionalmente está sustituido y puede ser monocíclico o policíclico, por ejemplo, bicíclico o tricíclico. Ejemplos de radicales arilo incluyen, pero no se limitan a aquellos que tienen 6 a 20 átomos de carbono del anillo, es decir, arilo de $C_{6–20}$; 6 a 15 átomos de carbono del anillo, es decir, arilo de $C_{6–15}$, y 6 a 10 átomos de carbono del anillo, es decir, arilo de $C_{6–10}$. Ejemplos de radicales arilo incluyen, pero se limitan a fenilo, naftilo, fluorenilo, azulenilo, antrilo, fenantrilo, y pirenilo.

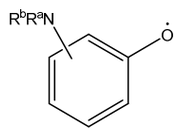
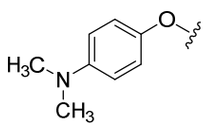
[53] Como se utiliza aquí, “arilalquilo” se refiere a un radical monovalente que es un radical de un compuesto alquilo, en donde el compuesto alquilo está sustituido con un sustituyente aromático, es decir, el compuesto aromático incluye un enlace sencillo a un grupo alquilo y en donde el radical se localiza en el grupo alquilo. Un grupo arilalquilo se une a la estructura química ilustrada por medio del grupo alquilo. Un arilalquilo se puede representar por la estructura, por ejemplo,



en donde B es un radical aromático, por ejemplo, fenilo. El arilalquilo opcionalmente está sustituido, es decir, el grupo arilo y/o el grupo alquilo, pueden estar sustituidos según se divulga aquí. Ejemplos del arilalquilo incluyen, pero no se limitan a, bencilo.

[54] Como se utiliza aquí, “ariloxi” se refiere a un radical monovalente que es un radical de un compuesto aromático en donde los átomos del anillo son átomos de carbono y en donde el anillo está sustituido con un radical oxígeno, es decir, el compuesto aromático

incluye un enlace sencillo a un átomo de oxígeno y en donde el radical se localiza en el átomo de oxígeno, por ejemplo,  para fenoxi. Los sustituyentes ariloxi se unen al compuesto que sustituyen a través de este átomo de oxígeno. El ariloxi opcionalmente está sustituido. El ariloxi incluye, pero no se limita a aquellos que tienen 6 a 20 átomos de carbono del anillo, es decir, ariloxi de $C_{6–20}$; 6 a 15 átomos de carbono del anillo, es decir, ariloxi de $C_{6–15}$, y 6 a 10 átomos de carbono del anillo, es decir, ariloxi de $C_{6–10}$. Ejemplos de los radicales ariloxi incluyen, pero no se limitan a fenoxi, naftoxi, y antroxi.

[55] Como se utiliza aquí, "R^aR^bN–ariloxi" se refiere a un radical monovalente que es un radical de un compuesto aromático en donde los átomos del anillo son átomos de carbono y en donde el anillo está sustituido con un sustituyente R^aR^bN– y un radical oxígeno, es decir, el compuesto aromático incluye un enlace sencillo a un sustituyente R^aR^bN– y un enlace sencillo a un átomo de oxígeno y en donde el radical se localiza en el átomo de oxígeno, por ejemplo,  . Los sustituyentes R^aR^bN–ariloxi se unen al compuesto que sustituyen a través de este átomo de oxígeno. R^aR^bN–ariloxi opcionalmente está sustituido. El R^aR^bN–ariloxi incluye, pero no se limita a aquellos que tienen 6 a 20 átomos de carbono del anillo, 6 a 15 átomos de carbono del anillo; y 6 a 10 átomos de carbono del anillo. Un ejemplo de un radical R^aR^bN–ariloxi incluye, pero no se limita a 4–(dimetil–amino)–fenoxi,  .

[56] Como se utiliza aquí, "arileno" se refiere a un radical divalente de un compuesto aromático en donde los átomos del anillo son solo átomos de carbono. El arileno opcionalmente está sustituido y puede ser monocíclico o policíclico, por ejemplo, bicíclico o tricíclico. Ejemplos de los radicales arileno incluyen, pero no se limitan a aquellos que tienen 6 a 20 átomos de carbono del anillo, es decir, arileno de $C_{6–20}$; 6 a 15 átomos de carbono del anillo, es decir, arileno de $C_{6–15}$, y 6 a 10 átomos de carbono del anillo, es decir, arileno de $C_{6–10}$.

[57] Como se utiliza aquí, "heteroalquilo" se refiere a un alquilo en el cual uno o más átomos de carbono están reemplazados por heteroátomos. Como se utiliza aquí, "heteroalquenilo" se refiere a un alquenilo en el cual uno o más átomos de carbono están reemplazados por heteroátomos. Como se utiliza aquí, "heteroalquinilo" se refiere a un

alquinilo en el cual uno o más átomos de carbono están reemplazados por heteroátomos. Los heteroátomos adecuados incluyen, pero no se limitan a, átomos de azufre, oxígeno, y nitrógeno. El heteroalquilo opcionalmente está sustituido. Ejemplos de los radicales heteroalquilo incluyen, pero no se limitan a, aminoalquilo, sulfonilalquilo, sulfinilalquilo. Ejemplos de los radicales heteroalquilo también incluyen, pero no se limitan a, metilamino, metilsulfonilo, y metilsulfinilo.

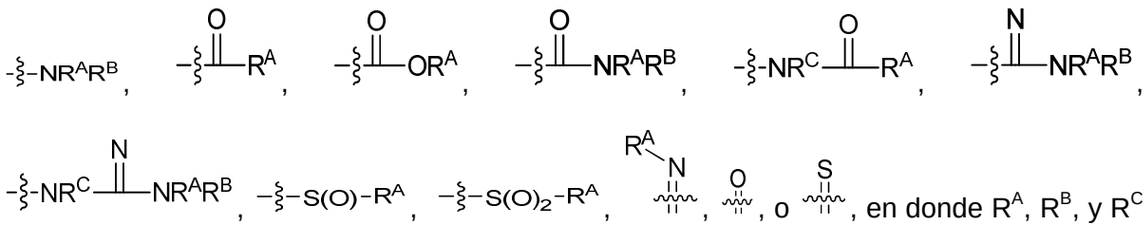
[58] Como se utiliza aquí, “heteroarilo” se refiere a un radical monovalente que es un radical de un compuesto aromático en donde los átomos del anillo contienen átomos de carbono y al menos un átomo de oxígeno, azufre, nitrógeno, o fósforo. Ejemplos de los radicales heteroarilo incluyen, pero no se limitan a aquellos que tienen 5 a 20 átomos del anillo; 5 a 15 átomos del anillo; y 5 a 10 átomos del anillo. El heteroarilo opcionalmente está sustituido.

[59] Como se utiliza aquí, “heteroarileno” se refiere a un arileno en el cual uno o más átomos de anillo del anillo aromático están reemplazados con un átomo de oxígeno, azufre, nitrógeno, o fósforo. El heteroarileno opcionalmente está sustituido.

[60] Como se utiliza aquí, “heterocicloalquilo” se refiere a un cicloalquilo en el cual uno o más átomos de carbono están reemplazados por heteroátomos. Los heteroátomos adecuados incluyen, pero no se limitan a, átomos de azufre, oxígeno, y nitrógeno. El heterocicloalquilo opcionalmente está sustituido. Ejemplos de radicales heterocicloalquilo incluyen, pero no se limitan a, morfolinilo, piperidinilo, tetrahidropiranilo, pirrolidinilo, imidazolidinilo, oxazolidinilo, tiazolidinilo, dioxolanilo, ditiolanilo, oxanilo, o tianilo.

[61] Como se utiliza aquí, “heterocicloalquilo que contiene N”, se refiere a un cicloalquilo en el cual uno o más átomos de carbono están reemplazados por heteroátomos y en donde al menos un heteroátomo es un átomo de nitrógeno. Los heteroátomos adecuados además del nitrógeno, incluyen, pero no se limitan a átomos de oxígeno y azufre. El heterocicloalquilo que contiene N opcionalmente está sustituido. Ejemplos de los radicales heterocicloalquilo que contiene N incluyen, pero no se limitan a, morfolinilo, piperidinilo, pirrolidinilo, imidazolidinilo, oxazolidinilo, o tiazolidinilo.

[62] Como se utiliza aquí, “opcionalmente sustituido”, cuando se utiliza para describir un radical, por ejemplo, alquilo opcionalmente sustituido, significa que tal radical opcionalmente está unido a uno o más sustituyentes. Ejemplos de tales sustituyentes incluyen, pero no se limitan a halo, ciano, nitro, haloalquilo, azido, epoxi, heteroarilo opcionalmente sustituido, heterocicloalquilo opcionalmente sustituido, $-\S-OR^A$, $-\S-SR^A$,

 , en donde R^A, R^B, y R^C son, independientemente en cada ocurrencia, un átomo de hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, alquilarilo, arilalquilo, heteroalquilo, heteroarilo, o heterocicloalquilo, o R^A y R^B, conjuntamente con los átomos a los cuales se unen, forman un anillo carbocíclico saturado o insaturado, en donde el anillo opcionalmente está sustituido y en donde uno o más átomos del anillo están opcionalmente reemplazados con un heteroátomo. En ciertas modalidades, cuando un radical opcionalmente está sustituido con un heteroarilo opcionalmente sustituido, heterocicloalquilo opcionalmente sustituido, o anillo carbocíclico saturado o insaturado opcionalmente sustituido, los sustituyentes en el heteroarilo opcionalmente sustituido, heterocicloalquilo opcionalmente sustituido, o anillo carbocíclico saturado o insaturado opcionalmente sustituido, si están sustituidos, no se sustituyen con sustituyentes que están adicionalmente opcionalmente sustituidos con sustituyentes adicionales. En algunas modalidades, cuando un grupo aquí descrito opcionalmente está sustituido, el sustituyente unido al grupo no está sustituido a menos que se especifique lo contrario.

[63] Como se utiliza aquí, “agente de unión” se refiere a cualquier molécula capaz de unirse con especificidad a un asociado de unión dado. En algunas modalidades, el agente de unión es un anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

[64] Como se utiliza aquí, “enlazador” se refiere a un radical divalente que enlaza covalentemente el agente de unión al esteroide aquí descrito.

[65] Como se utiliza aquí, "condiciones de síntesis de amida" se refiere a las condiciones de reacción adecuadas para facilitar la formación de una amida, por ejemplo, mediante la reacción de un ácido carboxílico, ácido carboxílico activado, o haluro de acilo con una amina. En algunos ejemplos, "condiciones de síntesis de amida" se refiere a las condiciones de reacción adecuadas para facilitar la formación de un enlace amida entre un ácido carboxílico y una amina. En algunos de estos ejemplos, el ácido carboxílico se convierte primero a un ácido carboxílico activado antes de que el ácido carboxílico activado reaccione con una amina para formar una amida. Las condiciones adecuadas para efectuar la formación de una amida incluyen, pero no se limitan a, aquellas que utilizan reactivos para efectuar la reacción entre un ácido carboxílico una amina, incluyendo, pero no limitado

a, diciclohexilcarbodiimida (DCC), diisopropilcarbodiimida (DIC), (benzotriazol–1–iloxi)tris(dimetilamino)fosfonio hexafluorofosfato (BOP), (benzotriazol–1–iloxi)tripirrolidinofosfonio hexafluorofosfato (PyBOP), (7–azabenzotriazol–1–iloxi)tripirrolidinofosfonio hexafluorofosfato (PyAOP), bromotripirrolidinofosfonio hexafluorofosfato (PyBrOP), O–(benzotriazol–1–il)–N,N,N',N'–tetrametiluronio hexafluorofosfato (HBTU), O–(benzotriazol–1–il)–N,N,N',N'–tetrametiluronio tetrafluoroborato (TBTU), 1–[Bis(dimetilamino)metileno]1*H*–1,2,3–triazolo[4,5–*b*]piridinio 3–oxid hexafluorofosfato (HATU), 2–Etoxi–1–etoxicarbonil–1,2–dihidroquinolina (EEDQ), 1–Etil–3–(3–dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), 2–Cloro–1,3–dimetilimidazolidinio hexafluorofosfato (CIP), 2–cloro–4,6–dimetoxi–1,3,5–triazina (CDMT), y carbonildiimidazol (CDI). En algunos ejemplos, un ácido carboxílico se convierte primero a un éster carboxílico activado antes de reaccionar con una amina para formar un enlace amida. En ciertas modalidades, el ácido carboxílico se hace reaccionar con un reactivo. El reactivo activa el ácido carboxílico desprotonando el ácido carboxílico y luego formando un complejo de producto con el ácido carboxílico desprotonado como resultado del ataque nucleofílico por el ácido carboxílico desprotonado sobre el reactivo protonado. Para ciertos ácidos carboxílicos, este éster activado es más susceptible posteriormente al ataque nucleofílico por una amina que lo que lo es el ácido carboxílico antes de que se convierta. Esto da como resultado la formación de enlace amida. Como tal, el ácido carboxílico se describe como activado. Los reactivos ejemplares incluyen DCC y DIC.

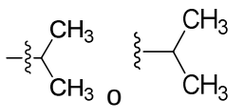
[66] Como se utiliza aquí, "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad (de un compuesto) que es suficiente para proporcionar un beneficio terapéutico a un paciente en el tratamiento o manejo de un padecimiento o desorden, o para retrasar o minimizar uno o más síntomas asociados con el padecimiento o desorden.

[67] Como se utiliza aquí, "derivado farmacéuticamente aceptable" se refiere a cualquier forma, por ejemplo, éster o profármaco de un compuesto, que proporciona dicho compuesto tras la administración a un paciente.

[68] Como se utiliza aquí, "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a cualquier sal adecuada para la administración a un paciente. Las sales adecuadas incluyen, pero no se limitan a, aquellas divulgadas en Berge *et al*., "Pharmaceutical Salts", *J. Pharm. Sci*., 1977, 66:1, incorporado aquí por referencia. Ejemplos de las sales incluyen, pero no se limitan a, sales derivadas de ácidos, derivadas de bases, orgánicas, inorgánicas, de amina, y de metales alcalinos o alcalinotérreos, incluyendo pero no limitado a, sales de calcio,

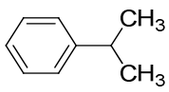
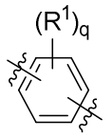
sales de magnesio, sales de potasio, sales de sodio, sales de ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido maleico, ácido malónico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p-toluensulfónico, y ácido salicílico, y similares.

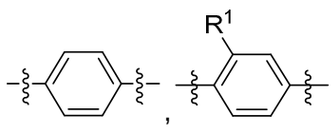
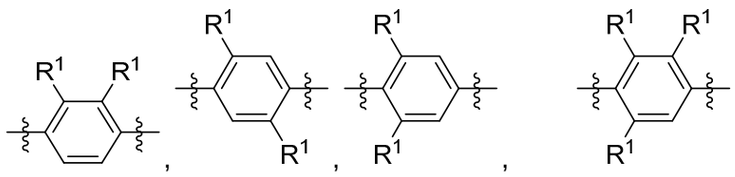
[69] Ciertos grupos, radicales, sustituyentes, y átomos se representan con una línea serpenteante que intersecta o tapa un enlace o enlaces para indicar el átomo a través del cual se unen los grupos, radicales, sustituyentes, átomos. Por ejemplo, un grupo fenilo que está sustituido con un grupo propilo representado como:

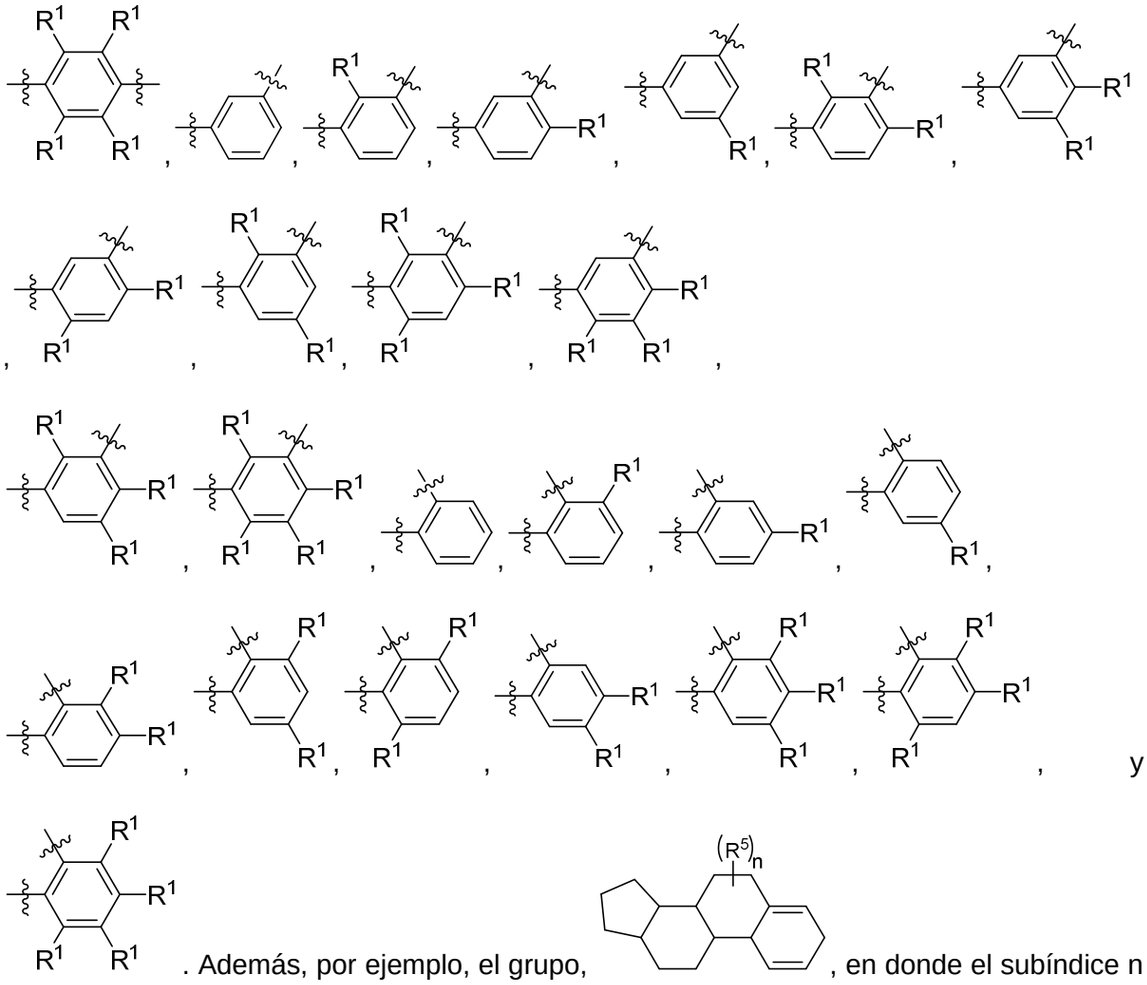


o

tiene la siguiente estructura:

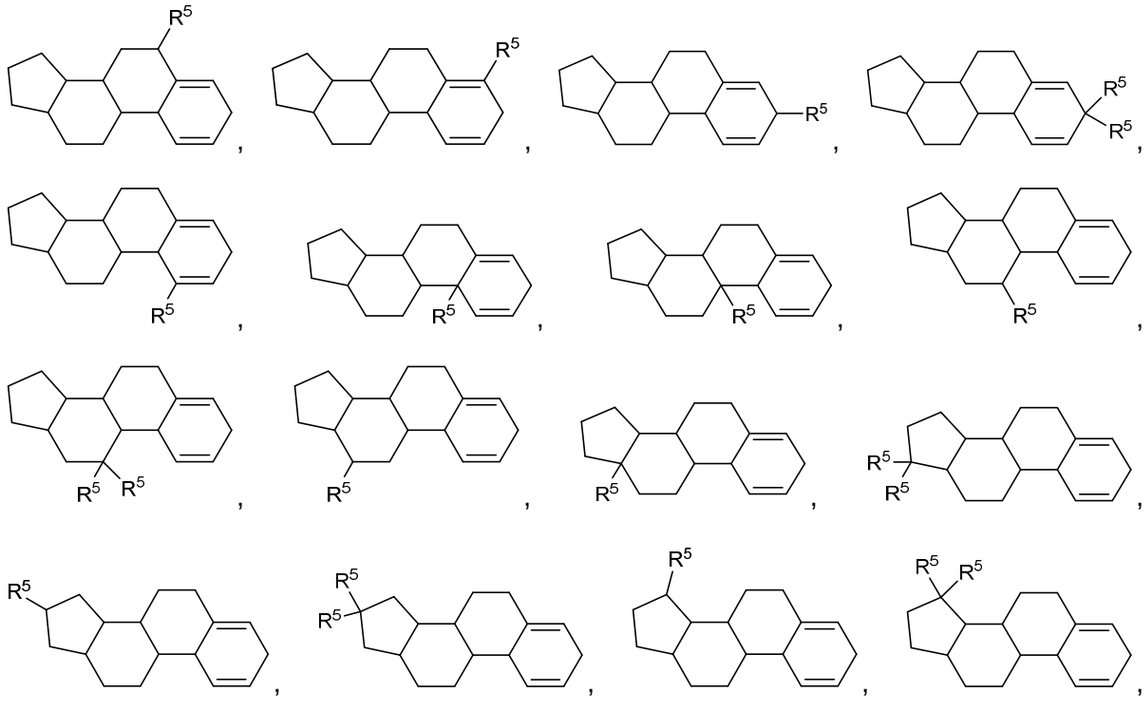
 . Como se utiliza aquí, las ilustraciones que muestran sustituyentes unidos a un grupo cíclico (por ejemplo, anillo aromático, heteroaromático, fusionado, y cicloalquilo o heterocicloalquilo saturado o insaturado) a través de un enlace entre los átomos del anillo tienen la intención de indicar, a menos que se especifique lo contrario, que el grupo cíclico puede estar sustituido con ese sustituyente en cualquier posición del anillo en el grupo cíclico o en cualquier anillo en el grupo de anillo fusionado, de acuerdo con las técnicas aquí expuestas o que se conocen en el campo al cual pertenece la presente divulgación. Por ejemplo, el grupo,  , en donde el subíndice q es un entero desde 0 hasta 4 y en que las posiciones del sustituyente R^1 se describen genéricamente, es decir, no están directamente unidas a ningún vértice de la estructura de línea de enlace, es decir, átomo de carbono de anillo específico, incluye los siguientes ejemplos, no limitativos, de grupos en los que el sustituyente R^1 se une a un átomo de carbono de anillo específico:

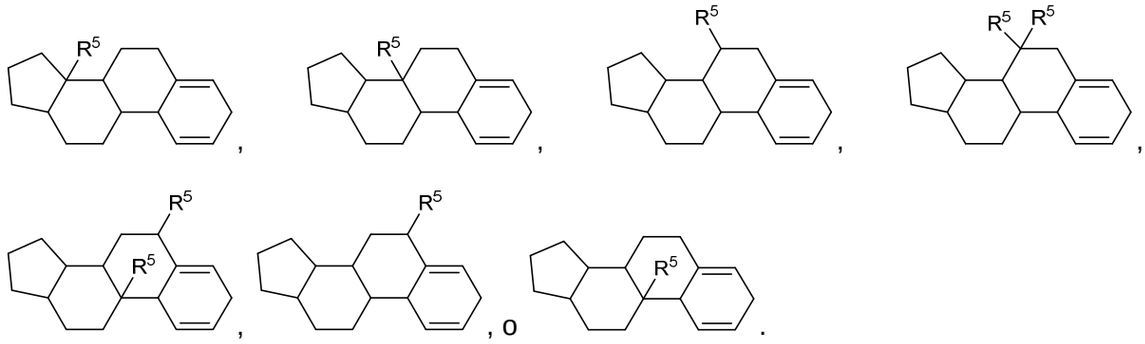
 ,  , ,

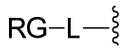


y

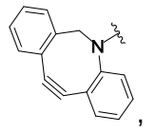
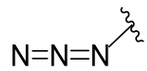
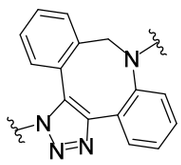
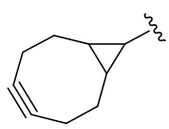
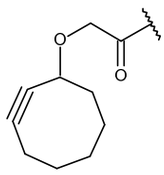
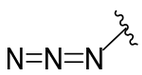
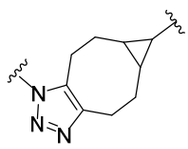
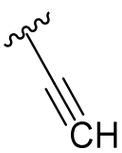
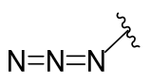
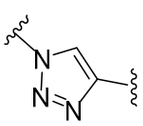
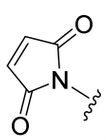
. Además, por ejemplo, el grupo, , en donde el subíndice n es un entero desde 0 hasta 19 y en que las posiciones del sustituyente R^5 se describen genéricamente, es decir, se representan como no directamente unidas a ningún vértice de la estructura de línea de enlace, incluye los siguientes ejemplos no limitativos de grupos en que el sustituyente R^5 está unido a un átomo de carbono de anillo específico:

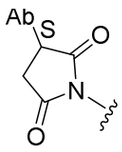


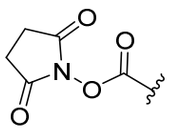


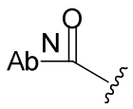
[70] Como se utiliza aquí, la frase “enlazador reactivo” o la abreviatura “RL” se refiere a un grupo monovalente que comprende un grupo reactivo y un grupo de enlace, representado como,  , en donde RG es el grupo reactivo y L es el grupo de enlace. El grupo de enlace es cualquier radical divalente que una el grupo reactivo a una carga útil. Los enlazadores reactivos (RL), conjuntamente con las cargas útiles a las cuales se unen, comprenden intermedios (“enlazador-cargas útiles”) útiles como precursores sintéticos para la preparación de los conjugados de esteroides de anticuerpos aquí descritos. El enlazador reactivo contiene un grupo reactivo (“RG”), que es un grupo funcional o radical que reacciona con una porción reactiva de un anticuerpo, anticuerpo modificado, o fragmento de unión a antígeno del mismo. El radical que resulta de la reacción del grupo reactivo con el anticuerpo, anticuerpo modificado, o fragmento de unión a antígeno del mismo, conjuntamente con el grupo de enlace, comprenden la porción de “enlazador de agente de unión” (“BL”) del conjugado, aquí descrita. En ciertas modalidades, el “grupo reactivo” es un grupo funcional o radical (por ejemplo, maleimida o éster de NHS) que reacciona con un residuo de cisteína o lisina de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo. En ciertas modalidades, el “grupo reactivo” es un grupo funcional o radical que es capaz de experimentar una reacción de química clic. En algunas modalidades de dicha reacción de química clic, el grupo reactivo es un alquino que es capaz de experimentar una reacción de cicloadición 1,3 con una azida. Tales grupos reactivos adecuados incluyen, pero no se limitan a, alquinos tensionados, por ejemplo, aquellos adecuados para cicloadiciones de alquino-azida promovidas por tensión (SPAAC), cicloalquinos, por ejemplo, ciclooctinos, alquinos benzanulados, y alquinos capaces de experimentar reacciones de cicloadición 1,3 con azidas en ausencia de catalizadores de cobre. Los alquinos adecuados también incluyen, pero no se limitan a, DIBAC, DIBO, BARAC, DIFO, alquinos sustituidos, por ejemplo, fluorados, aza-cicloalquinos, BCN, y derivados de los mismos. Los enlazador-cargas útiles que comprenden tales grupos reactivos son útiles para conjugar anticuerpos que han sido funcionalizados con grupos azido. Tales anticuerpos funcionalizados incluyen

anticuerpos funcionalizados con grupos azido-polietilenglicol. En ciertas modalidades, tal anticuerpo funcionalizado se deriva haciendo reaccionar un anticuerpo que comprende al menos un residuo de glutamina, por ejemplo, la cadena pesada Q295 (numeración EU), con un compuesto de acuerdo con la fórmula $H_2N–LL–N_3$, en donde LL es un grupo de polietilenglicol divalente, en presencia de la enzima transglutaminasa.

[71] En algunos ejemplos, el grupo reactivo es un alquino, por ejemplo,  , que puede reaccionar a través de química clic con una azida, por ejemplo,  , para formar un producto de química clic, por ejemplo,  , su regioisómero, o una mezcla de los mismos. En algunos ejemplos, el grupo reactivo es un alquino, por ejemplo,  o  , que puede reaccionar a través de química clic con una azida, por ejemplo,  para formar un producto de química clic, por ejemplo,  . En algunos ejemplos, el grupo reactivo es un alquino, por ejemplo,  , que puede reaccionar a través de química clic con una azida, por ejemplo,  , para formar un producto de química clic, por ejemplo,  , su regioisómero, o una mezcla de los mismos. En algunos ejemplos, el grupo reactivo es un grupo funcional, por ejemplo,  , que reacciona con un residuo de cisteína en un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, para formar un enlace al mismo, por

ejemplo, 

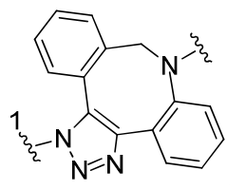
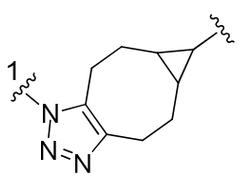
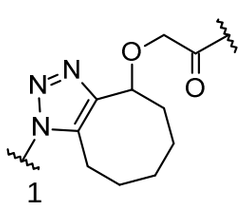
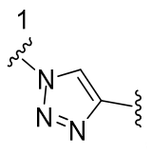
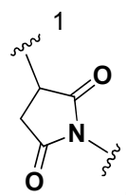
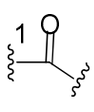
, en donde Ab se refiere a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo y S se refieren al átomo S en un residuo de cisteína a través del cual el grupo funcional se une al Ab. En algunos ejemplos, el grupo reactivo es un grupo funcional, por ejemplo, 

, que reacciona con un residuo de lisina en un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, para formar un enlace al mismo, por ejemplo, 

, en donde Ab se refiere a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo y N se refieren al átomo N en un residuo de lisina a través del cual el grupo funcional se une al Ab.

[72] Como se utiliza aquí, la frase “enlazador de agente de unión” o “BL” se refiere a cualquier radical o grupo divalente que enlaza, conecta, o une un agente de unión (por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo) con un compuesto de carga útil aquí establecido (por ejemplo, esteroide). Generalmente, los enlazadores de agente de unión adecuados para los conjugados de anticuerpos aquí descritos son aquellos que son suficientemente estables para explotar la vida media circulante del anticuerpo y, al mismo tiempo, capaces de liberar su carga útil después de la internalización -mediada por antígeno- del conjugado. Los enlazadores pueden ser escindibles o no escindibles. Los enlazadores escindibles son enlazadores que se escinden por metabolismo intracelular después de la internalización, por ejemplo, escisión por medio de hidrólisis, reducción, o reacción enzimática. Los enlazadores no escindibles son enlazadores que liberan una carga útil adjunta a través de la degradación lisosomal del anticuerpo después de la internalización. Los enlazadores adecuados incluyen, pero no se limitan a, enlazadores lábiles al ácido, enlazadores lábiles a la hidrólisis, enlazadores enzimáticamente escindibles, enlazadores lábiles a la reducción, enlazadores autoinmolativos, y enlazadores no escindibles. Los enlazadores adecuados también incluyen, pero no se limitan a, aquellos que son o comprenden glucurónidos, succinimida-tioéteres, unidades de polietilenglicol (PEG), hidrazonas, unidades mal-caproilo, unidades disulfuro (por ejemplo, –S–S–, –S–C(R^1R^2) –, en donde R^1 y R^2 son independientemente hidrógeno o hidrocarbilo), unidades carbamato, unidades para-amino-bencilo (PAB), unidades fosfato, por ejemplo, unidades

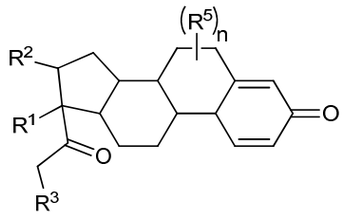
mono-, bis-, o tris- fosfato, y unidades péptido, por ejemplo, unidades péptido que contienen dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o más aminoácidos, incluyendo, pero no limitado a, valina-citrulina y unidades. En algunas modalidades, el enlazador de agente de unión (BL) comprende un radical que se forma por la reacción del grupo reactivo (RG) de un enlazador reactivo (RL) y la porción reactiva del agente de unión, por ejemplo, anticuerpo, anticuerpo modificado, o fragmento de unión a antígeno del mismo.

[73] En algunos ejemplos, el BL comprende el siguiente radical:  , su regioisómero, o una mezcla de los mismos, en donde 1 es el enlace al agente de unión. En algunos ejemplos, el BL comprende el siguiente radical:  , su regioisómero, o una mezcla de los mismos, en donde 1 es el enlace al agente de unión. En algunos ejemplos, el BL comprende el siguiente radical:  , su regioisómero, o una mezcla de los mismos, en donde 1 es el enlace al agente de unión. En algunos ejemplos, el BL comprende el siguiente radical:  , su regioisómero, o una mezcla de los mismos, en donde 1 es el enlace al agente de unión. En algunos ejemplos, el BL comprende el siguiente radical:  , en donde 1 es el enlace a la cisteína del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunos ejemplos, el BL comprende el siguiente radical:  , en donde 1 es el enlace a la lisina del anticuerpo o

fragmento de unión a antígeno del mismo. En estos ejemplos, el enlace al agente de unión es directo o por medio de un enlazador. En modalidades particulares, el agente de unión se modifica con una azida para facilitar la unión al BL. Los ejemplos se describen a continuación.

B. ESTEROIDES

[74] Se proporcionan aquí compuestos que tienen la estructura de la Fórmula (**A**):



(**A**);

o una sal, solvato, estereoisómero, o derivado farmacéuticamente aceptable de la misma, en donde:

R^1 y R^2 son, independientemente, –H, alquilo, alquilen-C(O)-O–, –OH, o halo; o R^1 y R^2 conjuntamente forman  ,

en donde R^4 es alquilo, arilo, arilalquilo, o un heterocicloalquilo que contiene N,

en donde el alquilo, arilo, arilalquilo, y heterocicloalquilo que contiene N están, independientemente en cada caso, opcionalmente sustituidos con –NR^aR^b;

R^3 es –OH, R^Z-C(O)-X–, heteroalquilo, piperidinilo, –NR^aR^b, –oxiaril-NR^aR^b, o -Z-$A(R^P)_t$;

R^5 es, independientemente en cada caso, –OH, halo, alquilo, o arilalquilo;

R^Z es alquilo;

X es O o NR^a;

Z es S, S(O), $S(O)_2$, SO_2NR^a, O, $C(O)NR^a$, C(O), o NR^a;

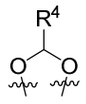
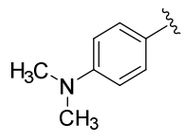
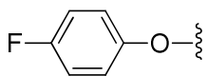
A es arilo o heteroarilo;

R^P es, independientemente en cada caso, halo, alquilo opcionalmente sustituido, –OH, o -NR^aR^b;

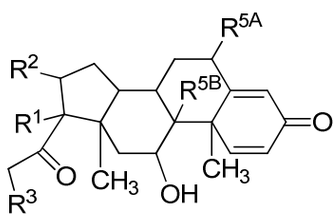
R^a y R^b son, independientemente en cada caso, –H o alquilo opcionalmente sustituido;

n es un entero desde 0-19; y

t es un entero desde 1-3;

con la condición de que (1) R^3 no es –OH (a) cuando R^1 es –OH o (b) cuando R^1 y R^2 conjuntamente forman  , en donde R^4 es $C_{1\text{-}9}$alquilo o  y (2) R^3 no es  .

[75] En algunas modalidades, el compuesto de Fórmula (**A**) tiene la estructura de la Fórmula (**A^1**):

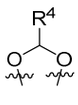


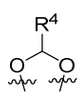
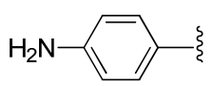
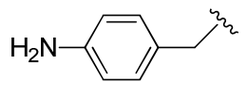
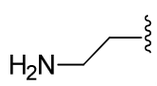
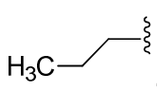
(**A^1**)

en donde R^1-R^3 son según se define anteriormente y R^{5A} y R^{5B} son cada una, independientemente, halo o un átomo de hidrógeno.

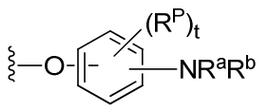
[76] En algunas modalidades del compuesto de Fórmula (**A^1**), R^{5A} y R^{5B} son átomos de hidrógeno. En algunas modalidades del compuesto de Fórmula (**A^1**), R^{5A} y R^{5B} son fluoro. En algunas modalidades del compuesto de Fórmula (**A^1**), R^{5A} es un átomo de hidrógeno y R^{5B} es fluoro.

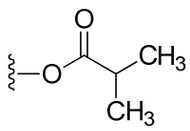
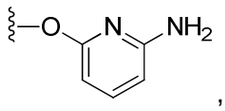
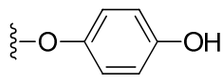
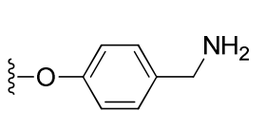
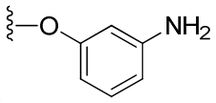
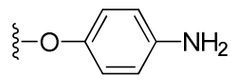
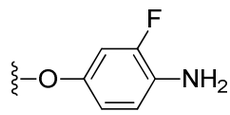
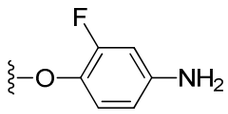
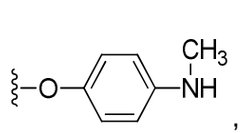
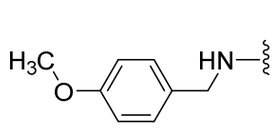
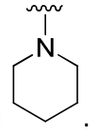
[77] En algunas modalidades del compuesto de Fórmula (**A^1**), R^1 es alquilen-C(O)-O– u –OH y R^2 es alquilo.

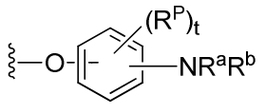
[78] En algunas modalidades del compuesto de Fórmula (**A^1**), R^1 y R^2 conjuntamente forman  , en donde R^4 es arilo, arilalquilo, o alquilo, en donde el arilo, arilalquilo, y alquilo están opcionalmente sustituidos con $–NR^aR^b$. En algunas modalidades, R^4 es –aril-NR^aR^b. En algunas modalidades, R^4 es –fenil- NR^aR^b.

[79] En algunas modalidades del compuesto de Fórmula (**A^1**), R^1 y R^2 conjuntamente forman  , en donde R^4 es  ,  ,  , o  .

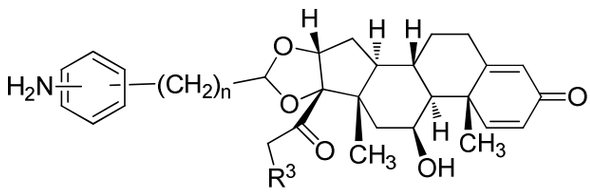
[80] En algunas modalidades del compuesto de Fórmula (**A^1**), R^3 es –OH, $–NR^aR^b$,

R^Z-C(O)-X–, o  , en donde R^P es halo, t es un entero desde 0 hasta 2, R^a es H, R^b es H o alquilo, X es O o NH, y R^Z es alquilo.

[81] En algunas modalidades del compuesto de Fórmula (**A^1**), R^3 es –OH, –NH_2, –$NHCH_3$, –$N(CH_3)_2$,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  , o  .

[82] En algunas modalidades del compuesto de Fórmula (**A^1**), R^1 y R^2 conjuntamente forman  , en donde R^4 es arilo, arilalquilo, o alquilo, en donde el arilo, arilalquilo, y alquilo están opcionalmente sustituidos con –NR^aR^b; R^3 es –OH, –NR^aR^b, R^Z-C(O)-X–, o  , en donde R^P es halo, t es un entero desde 0 hasta 2, R^a es H, R^b es H o alquilo, X es O o NH, y R^Z es alquilo; y R^5, independientemente en cada ocurrencia, es fluoro o un átomo de hidrógeno.

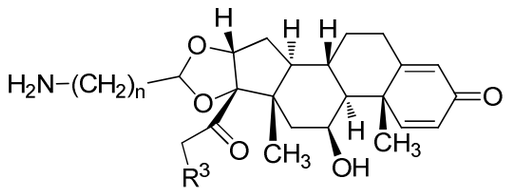
[83] También se establecen compuestos de Fórmula (**A^2**):



(**A^2**)

en donde n es un entero desde 0 hasta 4 y R^3 es –OH o R^Z-C(O)-O–; en donde R^Z es alquilo. En ciertas modalidades, n es 0 o 1.

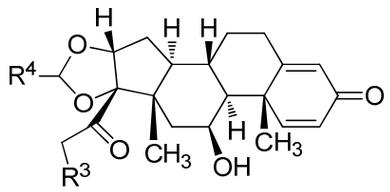
[84] También se establecen compuestos de Fórmula (**A^3**):



(**A^3**)

en donde n es un entero desde 1-4 y R^3 es –OH o R^Z-C(O)-O–; en donde R^Z es alquilo. En ciertas modalidades, n es 2.

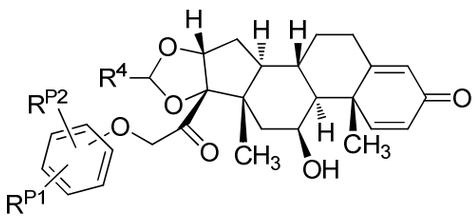
[85] También se establecen compuestos de Fórmula (**A^4**):



(**A^4**)

en donde R^3 es –NR^aR^b y R^4 es alquilo, en donde R^a y R^b son cada una, independientemente, un átomo de hidrógeno o alquilo, o R^a y R^b, tomadas conjuntamente forman un anillo de 3-7 miembros. En ciertas modalidades, R^4 es alquilo de C_{1-4}. En algunas modalidades, R^4 es propilo. En ciertas modalidades, R^3 es $–NH_2$, $–NHCH_3$, o $–N(CH_3)_2$.

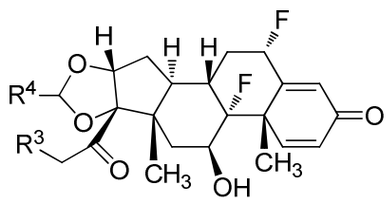
[86] También se establecen compuestos de Fórmula (**A^5**):



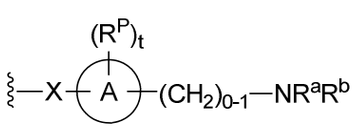
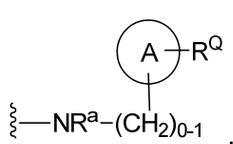
(**A^5**)

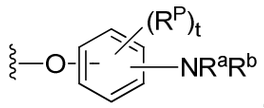
en donde R^4 es alquilo, R^{P1} es halo o un átomo de hidrógeno, y R^{P2} es –NR^aR^b u –OH, en donde R^a y R^b son cada una, independientemente, un átomo de hidrógeno o alquilo. En algunas modalidades, R^4 es alquilo de C_{1-4} y R^{P2} es $–NH_2$.

[87] También se establecen compuestos de Fórmula (**A^6**):

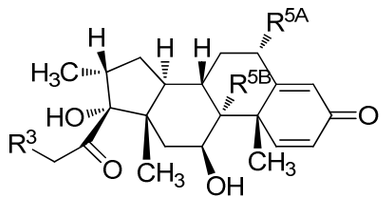


(**A^6**)

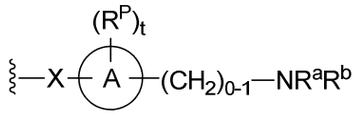
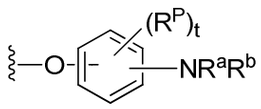
en donde R^3 es  , $R^ZC(O)X–$,  , o NR^aR^b, en donde X es O o NR^a,  es arilo o heteroarilo, R^P es halo, t es un entero desde 0-2, R^a y R^b son cada una, independientemente, un átomo de hidrógeno o alquilo, R^Z es alquilo, y R^Q

es alcoxi, y R^4 es alquilo. En algunas modalidades, R^3 es  .

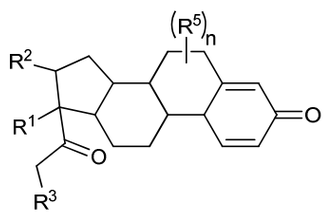
[88] También se establecen aquí compuestos de Fórmula (**A**^{7})



(**A**^{7})

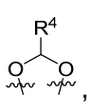
en donde R^3 es  , en donde X es O o NR^a,  es arilo o heteroarilo, R^P es halo, t es un entero desde 0-2, R^a y R^b son cada una, independientemente, un átomo de hidrógeno o alquilo, R^{5A} es un átomo de hidrógeno o fluoro, y R^{5B} es fluoro. En algunas modalidades, R^3 es  .

[89] En algunos ejemplos, se establece aquí un compuesto que tiene la estructura de la Fórmula (**I**):



(**I**)

o una sal, solvato, estereoisómero, o derivado farmacéuticamente aceptable de la misma, en donde:

R^1 y R^2 son, independientemente, –H, alquilo, alquil–C(O)–O–, –OH, o halo; o R^1 y R^2 conjuntamente forman  ,

en donde R^4 es alquilo, arilo, arilalquilo, o un heterocicloalquilo que contiene N,

en donde el alquilo, arilo, arilalquilo, y heterocicloalquilo que contiene N están, independientemente en cada caso, opcionalmente sustituidos con -NR^aR^b;

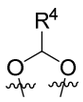
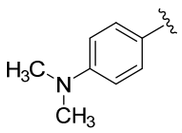
R^3 es –OH, alquil–C(O)–O–, heteroalquilo, –NR^aR^b, -NR^aR^b–ariloxi, o R^aR^bN–ariloxi–,

en donde el alquil–C(O)–O–, heteroalquilo, –NR^aR^b, y R^aR^bN–ariloxi– están opcionalmente sustituidos con halo;

R^5 es, independientemente en cada caso, –OH, halo, alquilo, o arilalquilo;

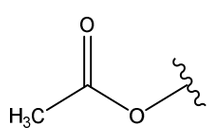
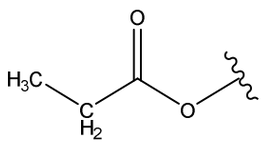
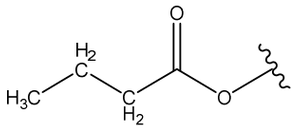
R^a y R^b son, independientemente en cada caso, H o alquilo; y

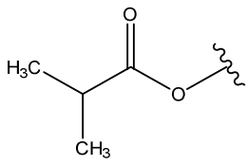
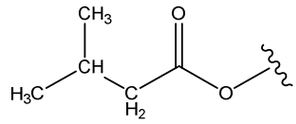
n es un entero desde 0–19;

con la condición de que R^3 no es –OH cuando ya sea (a) o (b): (a) R^1 es –OH o (b) R^1 y R^2 conjuntamente forman  y R^4 es un $C_{1–9}$alquilo o  .

[90] En algunos de estos ejemplos, R^1 y R^2 se seleccionan, independientemente, a partir de –H, alquilo, alquil–C(O)–O–, –OH, y halo. En algunos otros ejemplos, R^1 y R^2 conjuntamente forman  . En ciertos ejemplos, R^1 es –H. En ciertos otros ejemplos, R^1 es alquilo. En algunos ejemplos, R^1 es alquil–C(O)–O–. En algunos otros ejemplos, R^1 es –OH. En ciertos ejemplos, R^1 es halo. En ciertos otros ejemplos, R^1 es –F. En algunos ejemplos, R^1 es –Cl. En algunos otros ejemplos, R^1 es –Br. En ciertos ejemplos, R^1 es –I. En ciertos otros ejemplos, R^2 es –OH. En algunos ejemplos, R^2 es halo. En algunos otros ejemplos, R^2 es –F. En ciertos ejemplos, R^2 es –Cl. En ciertos otros ejemplos, R^2 es –Br. En algunos ejemplos, R^2 es –I.

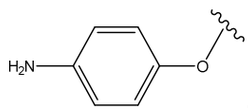
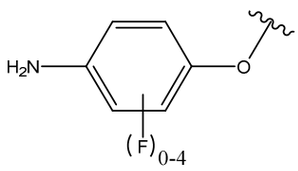
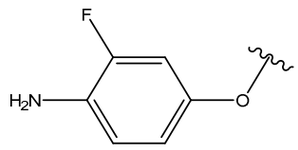
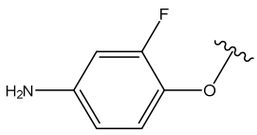
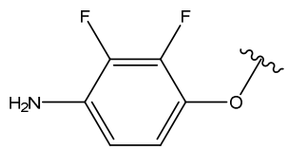
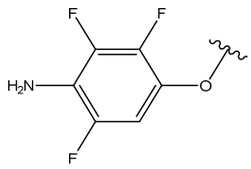
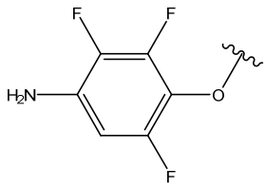
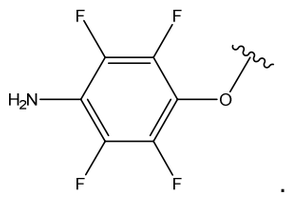
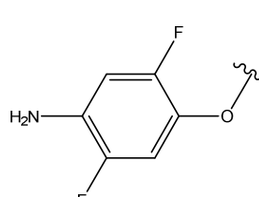
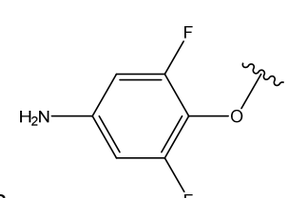
[91] En algunos ejemplos, en la Fórmula (**I**), R^5 es –OH. En algunos ejemplos, R^5 es halo tal como pero no limitado a –F, –Cl, –Br, o –I. En algunos ejemplos, R^5 es –F. En algunos ejemplos, R^5 es –Cl. En algunos ejemplos, R^5 es –Br. En algunos ejemplos, R^5 es –I. En algunos ejemplos, R^5 es alquilo tal como, pero no limitado a, metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, o nonilo. En algunos ejemplos, R^5 es bencilo.

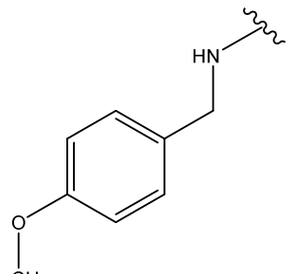
[92] En algunos ejemplos, en la Fórmula (**I**), R^3 se selecciona a partir de –OH, alquil–C(O)–O–, y R^aR^bN–ariloxi. En algunos de estos ejemplos, alquil–C(O)–O– o R^aR^bN–ariloxi opcionalmente está sustituido con halo. En algunos ejemplos, R^3 es –OH. En algunos ejemplos, R^3 es alquil–C(O)–O–. En algunos ejemplos, R^3 es R^aR^bN–ariloxi. En algunos ejemplos, R^3 es  . En algunos ejemplos, R^3 es  . En algunos ejemplos, R^3 es  . En algunos ejemplos, R^3 es


. En algunos ejemplos, R^3 es 
.

[93] En algunos ejemplos de Fórmula (**I**), R^3 es –OH, alquil–C(O)–O–, heteroalquilo, $–NR^aR^b$, o R^aR^bN–ariloxi, en donde alquil–C(O)–O– , heteroalquilo, $–NR^aR^b$, o R^aR^bN–ariloxi opcionalmente está sustituido con halo. R^a y R^b son, independientemente en cada caso, –H o alquilo.

[94] En algunos ejemplos, R^3 es R^aR^bN–ariloxi, en donde R^a y R^b son, independientemente en cada caso, –H o alquilo.

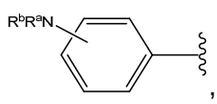
[95] En algunos ejemplos, R^3 es 
. En algunos ejemplos, R^3 es 
. En algunos ejemplos, R^3 es 
. En algunos ejemplos, R^3 es 
. En algunos ejemplos, R^3 es 
. En algunos ejemplos, R^3 es 
. En algunos ejemplos, R^3 es 
. En algunos ejemplos, R^3 es 
. En algunos ejemplos, R^3 es 
. En algunos ejemplos, R^3 es 
.

En algunos ejemplos, R^3 es 

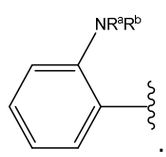
.

[96] En algunos ejemplos, R^3 es R^aR^bN–ariloxi, en donde R^a y R^b son, independientemente en cada caso, –H o alquilo.

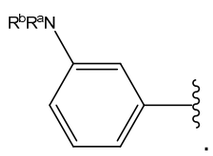
[97] En algunos ejemplos, en la Fórmula (**I**), R^4 se selecciona a partir del grupo que consiste en alquilo, arilo, arilalquilo, y un heterocicloalquilo que contiene N. En algunos de estos ejemplos, alquilo, arilo, arilalquilo, o heterocicloalquilo que contiene N están opcionalmente sustituidos con $–NR^aR^b$. En algunos ejemplos, R^4 es alquilo tal como, pero no limitado a, metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, o nonilo. En algunos ejemplos, R^4 es metilo. En algunos ejemplos, R^4 es etilo. En algunos ejemplos, R^4 es n–propilo. En algunos ejemplos, R^4 es i–propilo. En algunos ejemplos, R^4 es n–butilo. En algunos ejemplos, R^4 es i–butilo. En algunos ejemplos, R^4 es t–butilo. En algunos ejemplos, R^4 es sec–butilo. En algunos ejemplos, R^4 es pentilo. En algunos ejemplos, R^4 es hexilo. En algunos ejemplos, R^4 es heptilo. En algunos ejemplos, R^4 es octilo, o nonilo. En algunos ejemplos, R^4 es arilo tal como pero no limitado a fenilo o naftilo. En algunos ejemplos, R^4 es fenilo. En algunos ejemplos, R^4 es naftilo. En algunos ejemplos, R^4 es arilalquil– tal como pero no limitado a bencilo. En algunos ejemplos, R^4 es heterocicloalquilo que contiene N tal como pero no limitado a piperidinilo. En algunos ejemplos, R^4 es 4–amino–fenilo. En algunos ejemplos, R^4 es 4–aminofenilo opcionalmente sustituido con halo.

[98] En algunos ejemplos, R^4 es 

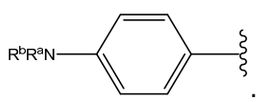
, en donde R^a y R^b son, independientemente en cada caso, H o alquilo.

[99] En algunos ejemplos, R^4 es 

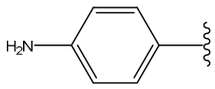
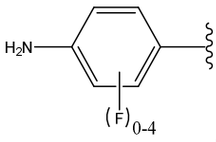
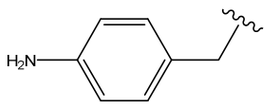
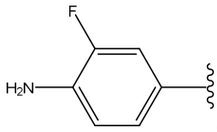
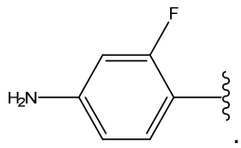
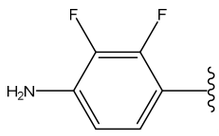
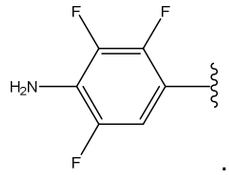
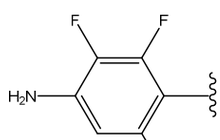
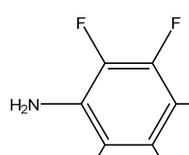
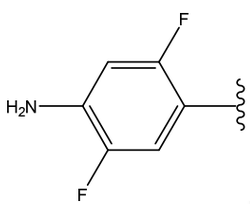
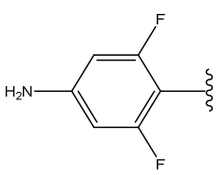
.

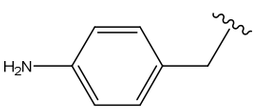
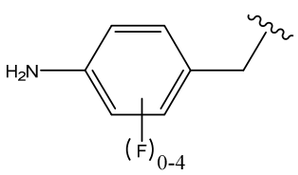
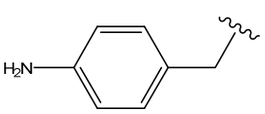
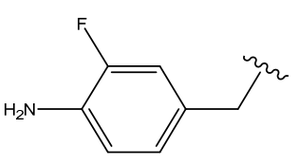
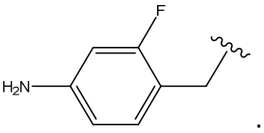
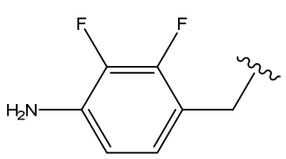
[100] En algunos ejemplos, R^4 es 

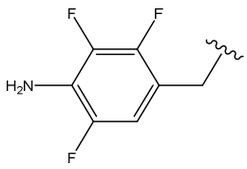
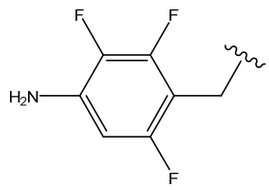
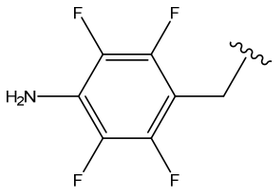
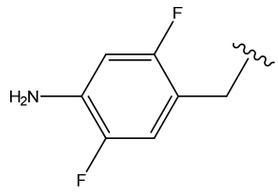
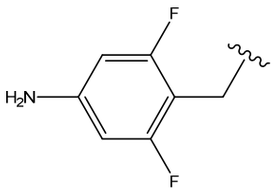
.

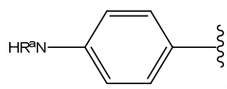
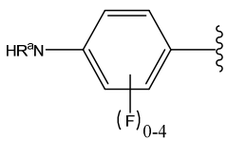
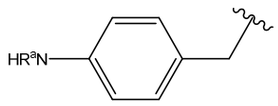
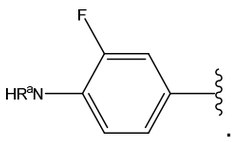
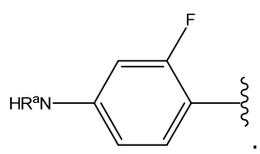
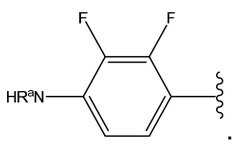
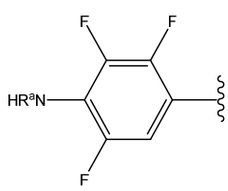
[101] En algunos ejemplos, R^4 es 

.

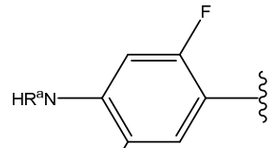
[102] En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es . En algunos ejemplos, R^4 es . En algunos ejemplos, R^4 es . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  .

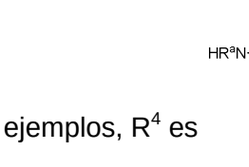
[103] En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es

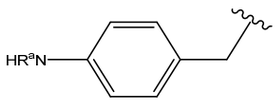
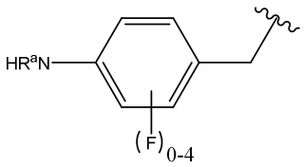
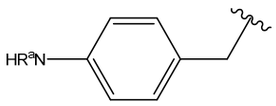
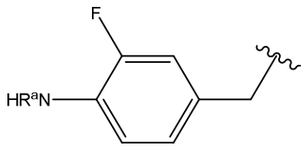
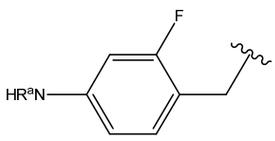
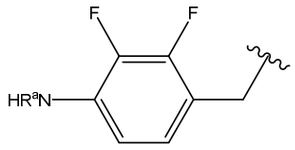
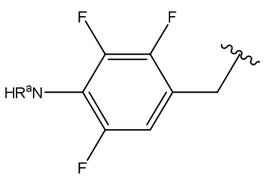
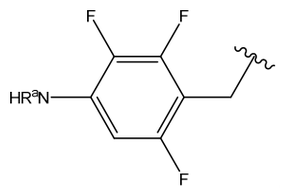
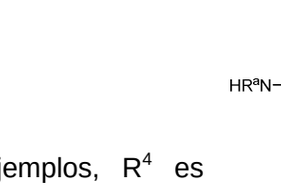
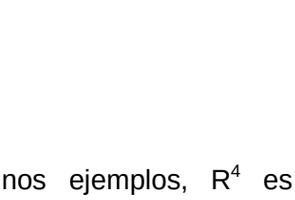

. En algunos ejemplos, R^4 es 
. En algunos ejemplos, R^4 es 
. En algunos ejemplos, R^4 es 
. En algunos ejemplos, R^4 es 
.

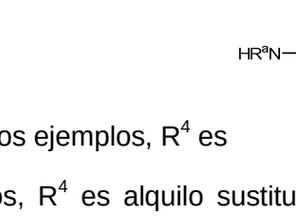
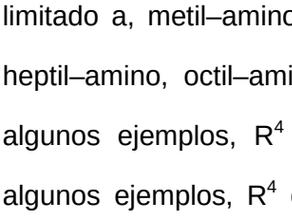
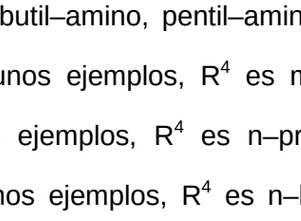
[104] En algunos ejemplos, R^4 es 
. En algunos ejemplos, R^4 es 
. En algunos ejemplos, R^4 es 
. En algunos ejemplos, R^4 es 
. En algunos ejemplos, R^4 es 
. En algunos ejemplos, R^4 es 
. En algunos ejemplos, R^4 es 
. En algunos ejemplos, R^4 es 
.

En algunos ejemplos, R^4 es
. En algunos ejemplos, R^4 es
.

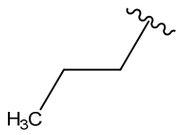
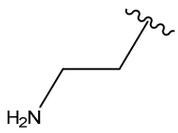
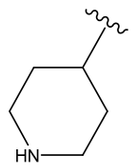
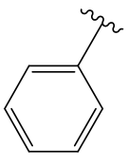
En algunos ejemplos, R^4 es
. En algunos ejemplos, R^4 es 
.

En algunos ejemplos, R^4 es 
. En algunos ejemplos, R^4 es
. En algunos ejemplos, R^4 es
.

[105] En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  .

En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  .

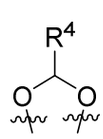
[106] En algunos ejemplos, R^4 es alquilo sustituido con amino tal como, pero no limitado a, metil–amino, etil–amino, propil–amino, butil–amino, pentil–amino, hexil–amino, heptil–amino, octil–amino, o nonil–amino. En algunos ejemplos, R^4 es metil–amino. En algunos ejemplos, R^4 es etil–amino. En algunos ejemplos, R^4 es n–propil–amino. En algunos ejemplos, R^4 es i–propil–amino. En algunos ejemplos, R^4 es n–butil–amino. En algunos ejemplos, R^4 es i–butil–amino. En algunos ejemplos, R^4 es t–butil–amino. En algunos ejemplos, R^4 es pentil–amino. En algunos ejemplos, R^4 es hexil–amino. En algunos ejemplos, R^4 es heptil–amino. En algunos ejemplos, R^4 es octil–amino. En algunos ejemplos, R^4 es nonil–amino.

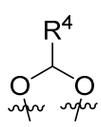
[107] En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  .

[108] En algunos ejemplos, aquí, R^a y R^b se seleccionan, independientemente en cada caso, a partir de H y alquilo. En algunos ejemplos, ambas de R^a y R^b son H. En algunos ejemplos, ambas de R^a y R^b son metilo. En algunos ejemplos, ambas de R^a y R^b son etilo. En algunos ejemplos, ambas de R^a y R^b son propilo. En algunos ejemplos, una de R^a o R^b es –H y la otra es alquilo. En algunos ejemplos, una de R^a o R^b es –H y la otra es metilo. En algunos ejemplos, una de R^a o R^b es –H y la otra es etilo. En algunos ejemplos, una de R^a o R^b es –H y la otra es propilo.

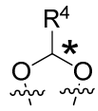
[109] En algunos ejemplos, n es un entero desde 0–19. En algunos ejemplos, n es 0. En algunos otros ejemplos, n es 1. En ciertos ejemplos, n es 2. En algunos otros ejemplos, n es 3. En ciertos ejemplos, n es 4. En algunos ejemplos, n es 5. En algunos otros ejemplos, n es 6. En ciertos ejemplos, n es 7. En algunos otros ejemplos, n es 8. En ciertos ejemplos, n es 9. En algunos ejemplos, n es 10. En algunos otros ejemplos, n es 11. En ciertos ejemplos, n es 12. En algunos otros ejemplos, n es 13. En ciertos ejemplos, n es 14. En algunos ejemplos, n es 15. En algunos otros ejemplos, n es 16. En ciertos ejemplos, n es 17. En algunos otros ejemplos, n es 18. En ciertos ejemplos, n es 19.

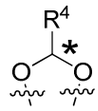
[110] En algunos ejemplos, en la Fórmula (**I**), R^3 no es –OH cuando R^1 es –OH.

[111] En algunos ejemplos, en la Fórmula (**I**), R^3 no es –OH cuando R^1 y R^2 conjuntamente forman  en donde R^4 es un $C_{1–9}$alquilo o 4–(dimetil–amino)–fenilo.

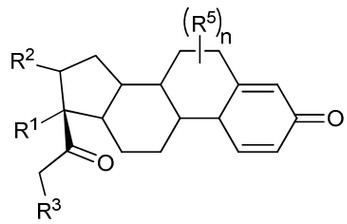
[112] En algunos ejemplos, se establece aquí un compuesto de Fórmula (**I**), en donde R^1 y R^2 conjuntamente forman  . En algunos de estos ejemplos, R^4 es alquilo, arilo, arilalquilo, o un heterocicloalquilo que contiene N. En ciertos ejemplos, alquilo, arilo,

heteroarilo, arilalquilo, o heterocicloalquilo que contiene N están opcionalmente sustituidos con $–NR^aR^b$. En algunos de estos ejemplos, R^4 es alquilo. En algunos de estos ejemplos, R^4 es arilo. En algunos de estos ejemplos, R^4 es arilalquilo. En algunos de estos ejemplos, R^4 es heterocicloalquilo que contiene N. En algunos ejemplos, R^4 es alquilo tal como, pero no limitado a, metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, o nonilo. En algunos ejemplos, R^4 es metilo. En algunos ejemplos, R^4 es etilo. En algunos ejemplos, R^4 es n–propilo. En algunos ejemplos, R^4 es i–propilo. En algunos ejemplos, R^4 es n–butilo. En algunos ejemplos, R^4 es i–butilo. En algunos ejemplos, R^4 es t–butilo. En algunos ejemplos, R^4 es sec–butilo. En algunos ejemplos, R^4 es pentilo. En algunos ejemplos, R^4 es hexilo. En algunos ejemplos, R^4 es heptilo. En algunos ejemplos, R^4 es octilo, o nonilo. En algunos ejemplos, R^4 es arilo tal como pero no limitado a fenilo o naftilo. En algunos ejemplos, R^4 es fenilo. En algunos ejemplos, R^4 es naftilo. En algunos ejemplos, R^4 es heteroaril– tal como pero no limitado a tiofeno o fenol. En algunos ejemplos, R^4 es arilalquil– tal como pero no limitado a bencilo. En algunos ejemplos, R^4 es heterocicloalquilo que contiene N tal como pero no limitado a piperidinilo. En algunos ejemplos, R^4 es 4–amino–fenilo. En algunos ejemplos, R^4 es 4–aminofenilo opcionalmente sustituido con halo.

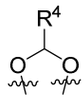
[113] En algunos ejemplos, se establece aquí un compuesto de Fórmula (**I**), en donde R^1 y R^2 conjuntamente forman  en donde R^4 se selecciona a partir del grupo que consiste en alquilo, arilo, arilalquilo, y un heterocicloalquilo que contiene N; y en donde alquilo, arilo, arilalquilo, o heterocicloalquilo que contiene N están opcionalmente sustituidos con $–NR^aR^b$; y en donde la estereoquímica del carbono indicado por * es la configuración R.

[114] En algunos ejemplos, se establece aquí un compuesto de Fórmula (**I**), en donde R^1 y R^2 conjuntamente forman  en donde R^4 se selecciona a partir del grupo que consiste en alquilo, arilo, arilalquilo, y un heterocicloalquilo que contiene N; y en donde alquilo, arilo, arilalquilo, o heterocicloalquilo que contiene N están opcionalmente sustituidos con $–NR^aR^b$; y en donde la estereoquímica del carbono indicado por * es la configuración S.

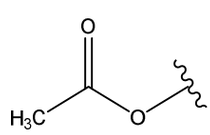
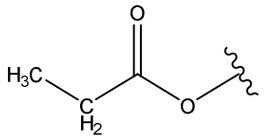
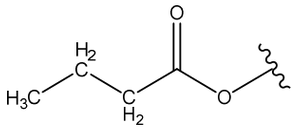
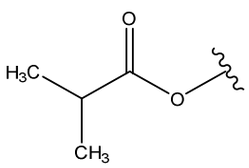
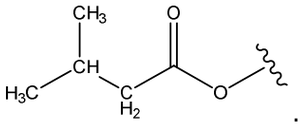
[115] En algunos ejemplos, se establece aquí un compuesto de Fórmula (**I**), en donde el compuesto tiene la estructura de la Fórmula (**PIa**):



(**Pla**).

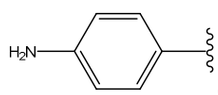
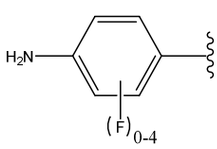
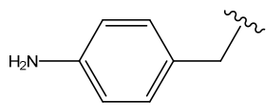
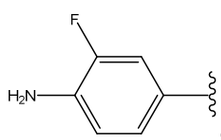
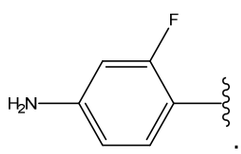
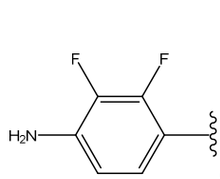
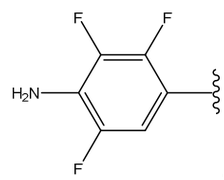
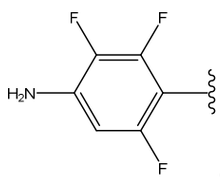
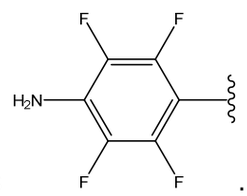
En algunos de estos ejemplos, R^1 y R^2 se seleccionan, independientemente, a partir de –H, alquilo, alquil–C(O)–O–, –OH, y halo. En algunos otros ejemplos, R^1 y R^2 conjuntamente forman  . En ciertos ejemplos, R^1 es –H. En ciertos otros ejemplos, R^1 es alquilo. En algunos ejemplos, R^1 es alquil–C(O)–O–. En algunos otros ejemplos, R^1 es –OH. En ciertos ejemplos, R^1 es halo. En ciertos otros ejemplos, R^1 es –F. En algunos ejemplos, R^1 es –Cl. En algunos otros ejemplos, R^1 es –Br. En ciertos ejemplos, R^1 es –I. En ciertos otros ejemplos, R^2 es –OH. En algunos ejemplos, R^2 es halo. En algunos otros ejemplos, R^2 es –F. En ciertos ejemplos, R^2 es –Cl. En ciertos otros ejemplos, R^2 es –Br. En algunos ejemplos, R^2 es –I.

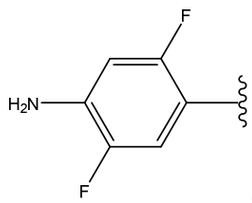
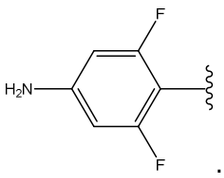
[116] En algunos ejemplos en la Fórmula (**Pla**), R^5 es –OH. En algunos ejemplos, R^5 es halo tal como pero no limitado a –F, –Cl, –Br, o –I. En algunos ejemplos, R^5 es –F. En algunos ejemplos, R^5 es –Cl. En algunos ejemplos, R^5 es –Br. En algunos ejemplos, R^5 es –I. En algunos ejemplos, R^5 es alquilo tal como, pero no limitado a, metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, o nonilo.

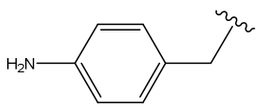
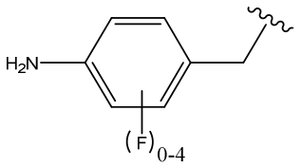
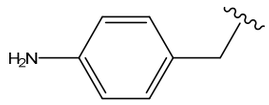
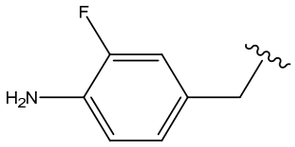
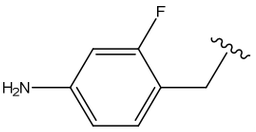
[117] En algunos ejemplos, en la Fórmula (**Pla**), R^3 se selecciona a partir de –OH, alquil–C(O)–O–, y R^aR^bN–ariloxi. En algunos de estos ejemplos, alquil–C(O)–O– o R^aR^bN–ariloxi opcionalmente está sustituido con halo. En algunos ejemplos, R^3 es –OH. En algunos ejemplos, R^3 es alquil–C(O)–O–. En algunos ejemplos, R^3 es R^aR^bN–ariloxi–. En algunos ejemplos, R^3 es  . En algunos ejemplos, R^3 es  . En algunos ejemplos, R^3 es  . En algunos ejemplos, R^3 es  . En algunos ejemplos, R^3 es  . En algunos

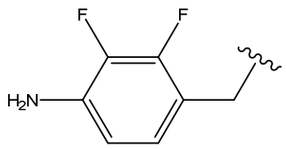
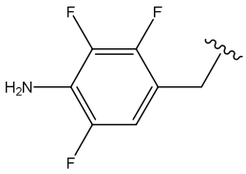
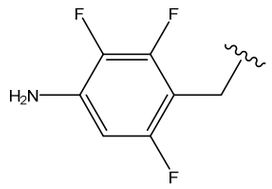
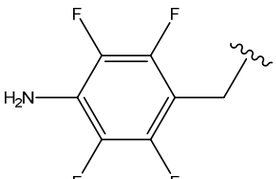
ejemplos, R^3 es R^aR^bN–ariloxi–. En algunos ejemplos, R^3 es -NR^aR^b–ariloxi.

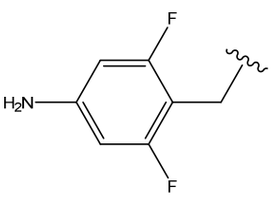
[118] En algunos ejemplos, en la Fórmula (**PIa**), R^4 se selecciona a partir del grupo que consiste en alquilo, arilo, arilalquilo, y un heterocicloalquilo que contiene N. En algunos de estos ejemplos, alquilo, arilo, arilalquilo, o heterocicloalquilo que contiene N están opcionalmente sustituidos con –NR^aR^b. En algunos ejemplos, R^4 es alquilo tal como, pero no limitado a, metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, o nonilo. En algunos ejemplos, R^4 es metilo. En algunos ejemplos, R^4 es etilo. En algunos ejemplos, R^4 es n–propilo. En algunos ejemplos, R^4 es i–propilo. En algunos ejemplos, R^4 es n–butilo. En algunos ejemplos, R^4 es i–butilo. En algunos ejemplos, R^4 es t–butilo. En algunos ejemplos, R^4 es pentilo. En algunos ejemplos, R^4 es hexilo. En algunos ejemplos, R^4 es heptilo. En algunos ejemplos, R^4 es octilo, o nonilo. En algunos ejemplos, R^4 es arilo tal como pero no limitado a fenilo o naftilo. En algunos ejemplos, R^4 es fenilo. En algunos ejemplos, R^4 es naftilo. En algunos ejemplos, R^4 es arilalquil– tal como pero no limitado a bencilo. En algunos ejemplos, R^4 es heterocicloalquilo que contiene N tal como pero no limitado a piperidinilo. En algunos ejemplos, R^4 es 4–amino–fenilo. En algunos ejemplos, R^4 es 4–aminofenilo opcionalmente sustituido con halo.

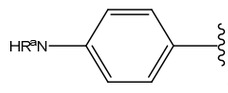
[119] En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es . En algunos ejemplos, R^4 es . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  .

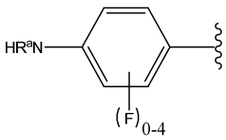
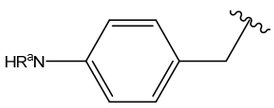
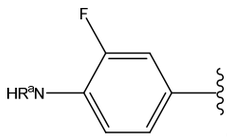
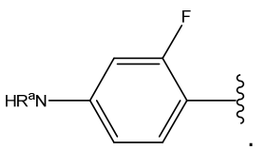
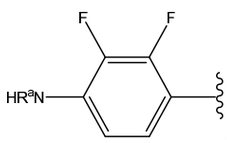
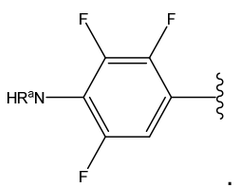
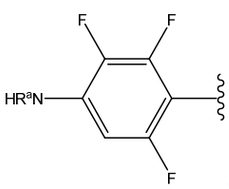
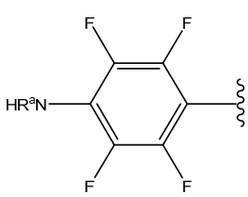
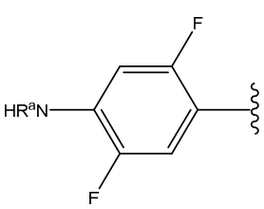
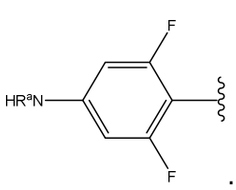
En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  .

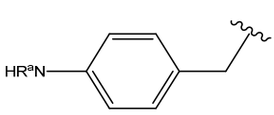
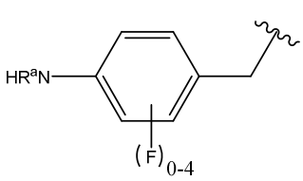
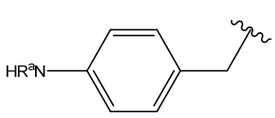
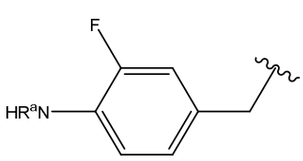
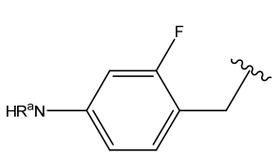
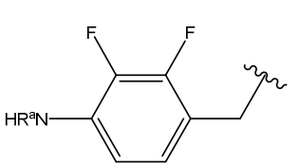
[120] En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  .

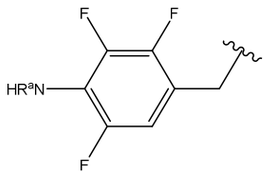
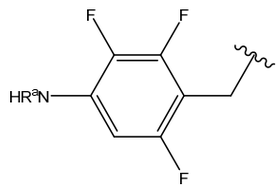
En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  .

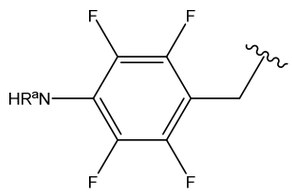
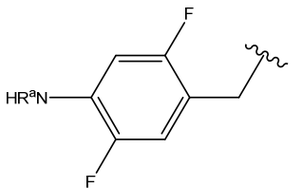
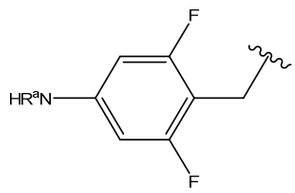
En algunos ejemplos, R^4 es  .

[121] En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es

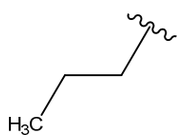
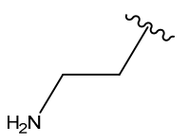
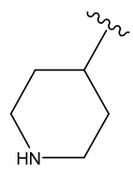

. En algunos ejemplos, R^4 es 
. En algunos ejemplos, R^4 es 
. En algunos ejemplos, R^4 es 
. En algunos ejemplos, R^4 es 
. En algunos ejemplos, R^4 es 
. En algunos ejemplos, R^4 es 
. En algunos ejemplos, R^4 es 
. En algunos ejemplos, R^4 es 
. En algunos ejemplos, R^4 es 
.

[122] En algunos ejemplos, R^4 es 
. En algunos ejemplos, R^4 es 
. En algunos ejemplos, R^4 es 
. En algunos ejemplos, R^4 es 
. En algunos ejemplos, R^4 es 
. En algunos ejemplos, R^4 es 
. En algunos

ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  .

En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  .

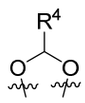
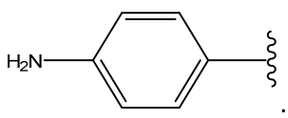
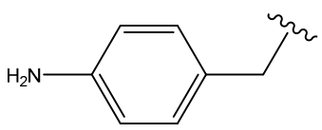
[123] En algunos ejemplos, R^4 es alquilo sustituido con amino tal como, pero no limitado a, metil–amino, etil–amino, propil–amino, butil–amino, pentil–amino, hexil–amino, heptil–amino, octil–amino, o nonil–amino. En algunos ejemplos, R^4 es metil–amino. En algunos ejemplos, R^4 es etil–amino. En algunos ejemplos, R^4 es n–propil–amino. En algunos ejemplos, R^4 es i–propil–amino. En algunos ejemplos, R^4 es n–butil–amino. En algunos ejemplos, R^4 es i–butil–amino. En algunos ejemplos, R^4 es t–butil–amino. En algunos ejemplos, R^4 es pentil–amino. En algunos ejemplos, R^4 es hexil–amino. En algunos ejemplos, R^4 es heptil–amino. En algunos ejemplos, R^4 es octil–amino. En algunos ejemplos, R^4 es nonil–amino.

[124] En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  .

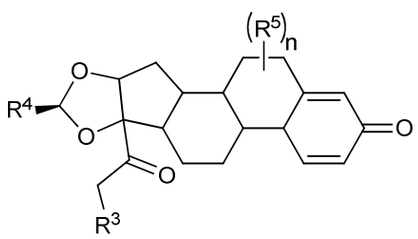
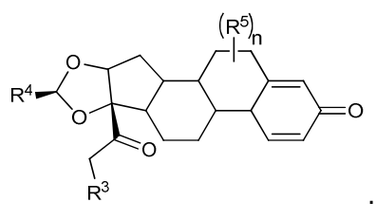
[125] En algunos ejemplos, aquí, R^a y R^b se seleccionan, independientemente en cada caso, a partir de –H o alquilo. En algunos ejemplos, ambas de R^a y R^b son –H. En algunos ejemplos, ambas de R^a y R^b son metilo. En algunos ejemplos, ambas de R^a y R^b son etilo. En algunos ejemplos, ambas de R^a y R^b son propilo. En algunos ejemplos, una de R^a o R^b es –H y la otra es alquilo. En algunos ejemplos, una de R^a o R^b es –H y la otra es metilo. En algunos ejemplos, una de R^a o R^b es –H y la otra es etilo. En algunos ejemplos, una de R^a o R^b es –H y la otra es propilo.

[126] En algunos ejemplos, en la Fórmula (**PIa**), n es un entero desde 0–19. En algunos ejemplos, n es 0. En algunos otros ejemplos, n es 1. En ciertos ejemplos, n es 2. En algunos otros ejemplos, n es 3. En ciertos ejemplos, n es 4. En algunos ejemplos, n es 5. En algunos otros ejemplos, n es 6. En ciertos ejemplos, n es 7. En algunos otros ejemplos, n es 8. En ciertos ejemplos, n es 9. En algunos ejemplos, n es 10. En algunos otros ejemplos, n es 11. En ciertos ejemplos, n es 12. En algunos otros ejemplos, n es 13. En ciertos ejemplos, n es 14. En algunos ejemplos, n es 15. En algunos otros ejemplos, n es 16. En ciertos ejemplos, n es 17. En algunos otros ejemplos, n es 18. En ciertos ejemplos, n es 19.

[127] En algunos ejemplos, en la Fórmula (**PIa**), R^3 no es –OH cuando R^1 es –OH.

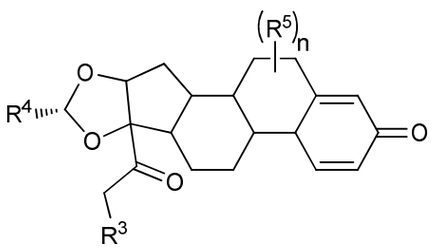
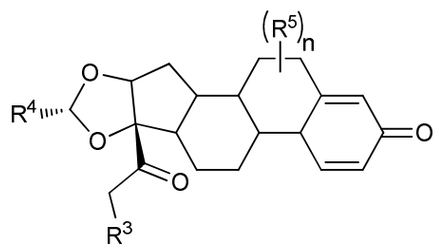
[128] En algunos ejemplos, en la Fórmula (**PIa**), R^3 no es –OH cuando R^1 y R^2 conjuntamente forman  en donde R^4 es un $C_{1–9}$alquilo o 4–(dimetil–amino)–fenilo. En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  .

[129] En algunos ejemplos, se establece aquí un compuesto de Fórmula (**PIa**), en donde el compuesto tiene la estructura de la Fórmula (**PIb–1**) o (**PIb–2**):


o
 .

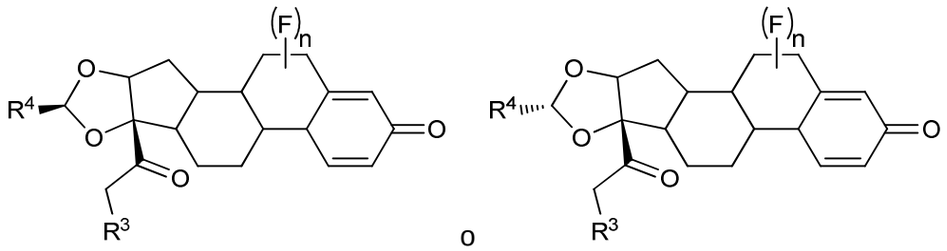
(**PIb–1**) (**P1b–2**)

[130] En algunos ejemplos, se establece aquí un compuesto de Fórmula (**PIa**), en donde el compuesto tiene la estructura de la Fórmula (**PIc–1**) o (**PIc–2**):


o
 .

(**PIc–1**) (**PIc–2**)

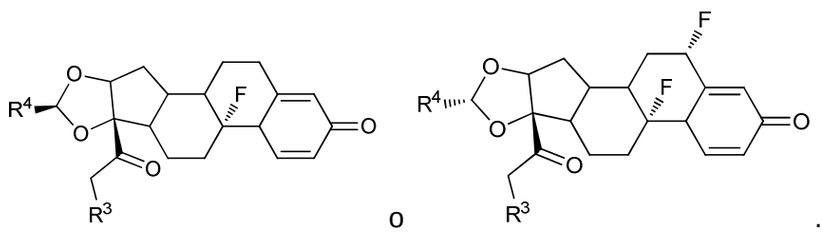
[131] En algunos ejemplos, se establece aquí un compuesto de Fórmula (**PIa**), en donde el compuesto tiene la estructura de la Fórmula (**PId–1**) o (**PId–2**):



(**PId–1**) o (**PId–2**)

En algunos ejemplos, n es 0. En algunos ejemplos, n es 1. En algunos ejemplos, n es 2.

[132] En algunos ejemplos, se establece aquí un compuesto de Fórmula (**I**), en donde el compuesto tiene la estructura de la Fórmula (**PIe–1**) o (**PIe–2**):

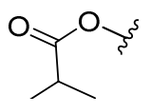


(**PIe–1**) o (**PIe–2**)

[133] En algunos ejemplos, se establece aquí un compuesto de Fórmula (**PIa**), (**PIb–1**), (**PIb–2**), (**PIc–1**), (**PIc–2**), (**PId–1**), (**PId–2**), (**PIe–1**), o (**PIe–2**) en donde R^3 se selecciona a partir de alquil–C(O)–O– o R^aR^bN–ariloxi–; en donde alquil–C(O)–O–, o R^aR^bN–ariloxi– están opcionalmente sustituidos con halo.

[134] En algunos ejemplos, se establece aquí un compuesto de Fórmula (**PIa**), (**PIb–1**), (**PIb–2**), (**PIc–1**), (**PIc–2**), (**PId–1**), (**PId–2**), (**PIe–1**), o (**PIe–2**), en donde R^3 es alquil–C(O)–O– opcionalmente sustituido con halo.

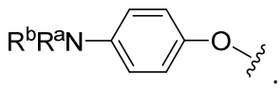
[135] En algunos ejemplos, se establece aquí un compuesto de Fórmula (**PIa**), (**PIb–1**), (**PIb–2**), (**PIc–1**), (**PIc–2**), (**PId–1**), (**PId–2**), (**PIe–1**), o (**PIe–2**), en donde R^3 es



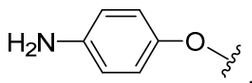
.

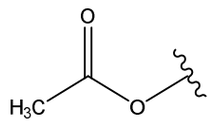
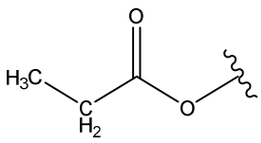
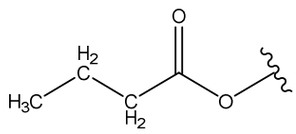
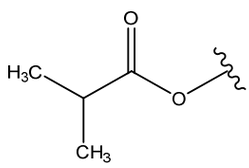
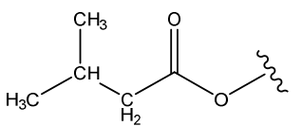
[136] En algunos ejemplos, se establece aquí un compuesto de Fórmula (**PIa**), (**PIb–1**), (**PIb–2**), (**PIc–1**), (**PIc–2**), (**PId–1**), (**PId–2**), (**PIe–1**), o (**PIe–2**), en donde R^3 es R^aR^bN–ariloxi– opcionalmente sustituido con halo.

[137] En algunos ejemplos, se establece aquí un compuesto de Fórmula (**PIa**), (**PIb–1**), (**PIb–2**), (**PIc–1**), (**PIc–2**), (**PId–1**), (**PId–2**), (**PIe–1**), o (**PIe–2**), en donde R^3 es



[138] En algunos ejemplos, se establece aquí un compuesto de Fórmula (**PIa**), (**PIb–1**), (**PIb–2**), (**PIc–1**), (**PIc–2**), (**PId–1**), (**PId–2**), (**PIe–1**), o (**PIe–2**), en donde R^3 es

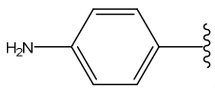
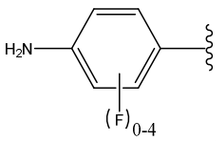
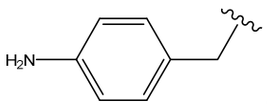
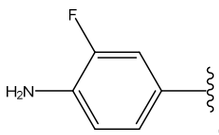
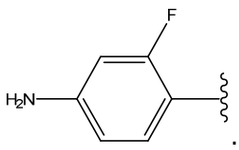
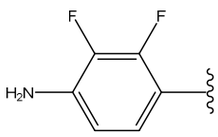
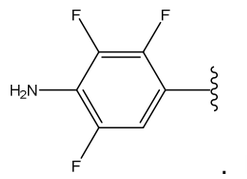
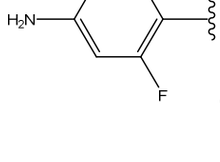
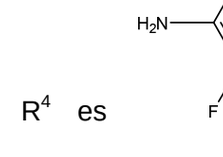
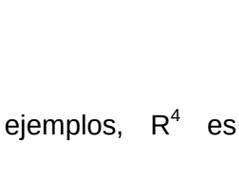
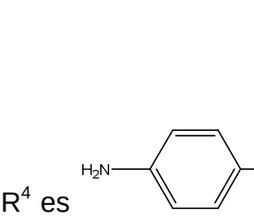


[139] En algunos ejemplos, se establece aquí un compuesto de Fórmula (**PIa**), (**PIb–1**), (**PIb–2**), (**PIc–1**), (**PIc–2**), (**PId–1**), (**PId–2**), (**PIe–1**), o (**PIe–2**), en donde R^3 se selecciona a partir de –OH, alquil–C(O)–O–, y R^aR^bN–ariloxi–. En algunos de estos ejemplos, alquil–C(O)–O– o R^aR^bN–ariloxi– opcionalmente está sustituido con halo. En algunos ejemplos, R^3 es –OH. En algunos ejemplos, R^3 es alquil–C(O)–O–. En algunos ejemplos, R^3 es R^aR^bN–ariloxi–. En algunos ejemplos, R^3 es  . En algunos ejemplos, R^3 es  . En algunos ejemplos, R^3 es  . En algunos ejemplos, R^3 es  . En algunos ejemplos, R^3 es  . En algunos ejemplos, R^3 es R^aR^bN–ariloxi–. En algunos ejemplos, R^3 es -NR^aR^b–ariloxi.

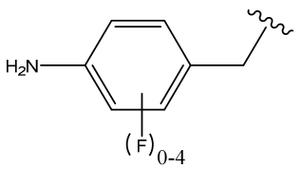
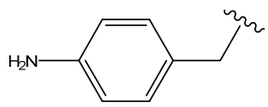
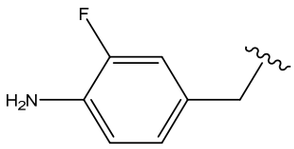
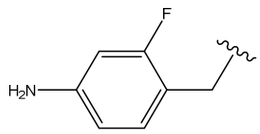
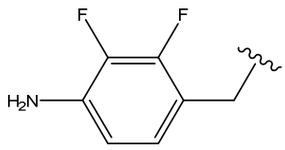
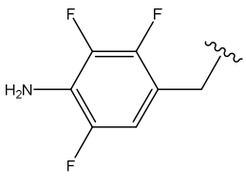
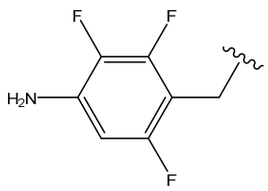
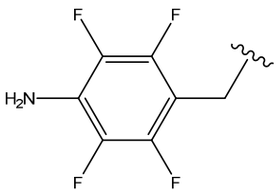
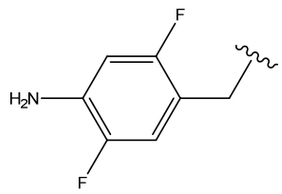
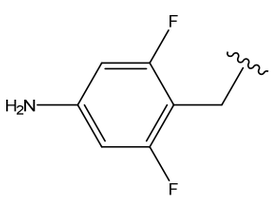
[140] En algunos ejemplos, se establece aquí un compuesto de Fórmula (**PIa**), (**PIb–1**), (**PIb–2**), (**PIc–1**), (**PIc–2**), (**PId–1**), (**PId–2**), (**PIe–1**), o (**PIe–2**), en donde R^3 es R^aR^bN–ariloxi–, en donde R^a y R^b son, independientemente en cada caso, H o alquilo.

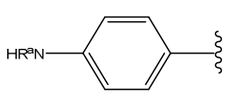
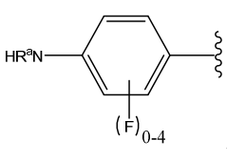
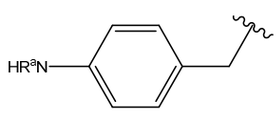
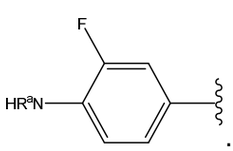
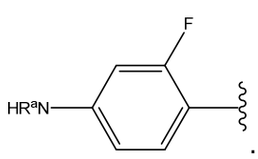
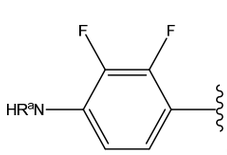
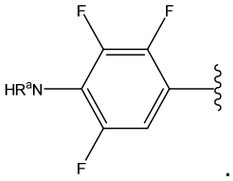
[141] En algunos ejemplos, se establece aquí un compuesto de Fórmula (**PIa**), (**PIb–1**), (**PIb–2**), (**PIc–1**), (**PIc–2**), (**PId–1**), (**PId–2**), (**PIe–1**), o (**PIe–2**), en donde R^4 se selecciona a partir del grupo que consiste en alquilo, arilo, arilalquilo, y un heterocicloalquilo que contiene N. En algunos de estos ejemplos, alquilo, arilo, arilalquilo, o heterocicloalquilo que contiene N están opcionalmente sustituidos con $–NR^aR^b$. En algunos ejemplos, R^4 es alquilo tal como, pero no limitado a, metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, o nonilo. En algunos ejemplos, R^4 es metilo. En algunos ejemplos, R^4 es etilo. En algunos

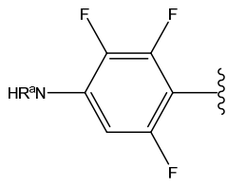
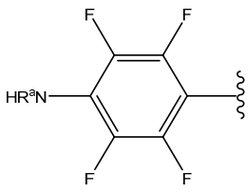
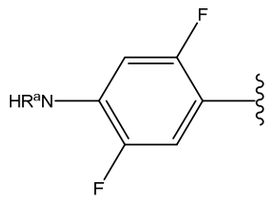
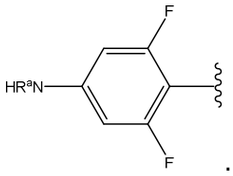
ejemplos, R^4 es n–propilo. En algunos ejemplos, R^4 es i–propilo. En algunos ejemplos, R^4 es n–butilo. En algunos ejemplos, R^4 es i–butilo. En algunos ejemplos, R^4 es t–butilo. En algunos ejemplos, R^4 es pentilo. En algunos ejemplos, R^4 es hexilo. En algunos ejemplos, R^4 es heptilo. En algunos ejemplos, R^4 es octilo, o nonilo. En algunos ejemplos, R^4 es arilo tal como pero no limitado a fenilo o naftilo. En algunos ejemplos, R^4 es fenilo. En algunos ejemplos, R^4 es naftilo. En algunos ejemplos, R^4 es arilalquil– tal como pero no limitado a bencilo. En algunos ejemplos, R^4 es heterocicloalquilo que contiene N tal como pero no limitado a piperidinilo. En algunos ejemplos, R^4 es 4–amino–fenilo. En algunos ejemplos, R^4 es 4–aminofenilo opcionalmente sustituido con halo.

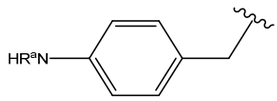
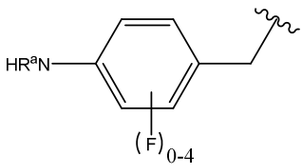
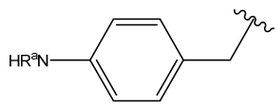
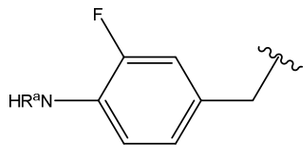
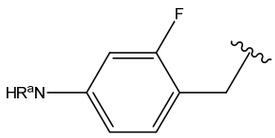
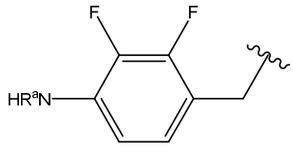
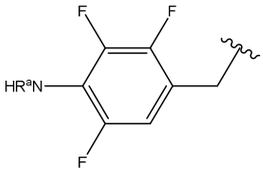
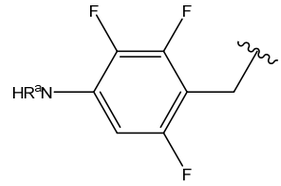
[142] En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es .

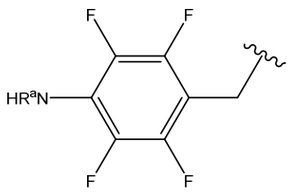
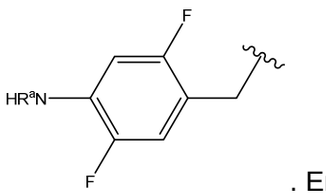
[143] En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es


. En algunos ejemplos, R^4 es 
. En algunos ejemplos, R^4 es 
. En algunos ejemplos, R^4 es 
. En algunos ejemplos, R^4 es 
. En algunos ejemplos, R^4 es 
. En algunos ejemplos, R^4 es 
. En algunos ejemplos, R^4 es 
. En algunos ejemplos, R^4 es 
. En algunos ejemplos, R^4 es 
.

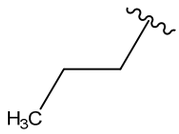
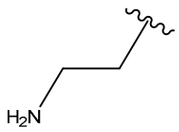
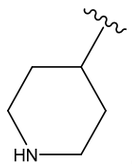
[144] En algunos ejemplos, R^4 es 
. En algunos ejemplos, R^4 es 
. En algunos ejemplos, R^4 es 
. En algunos ejemplos, R^4 es 
. En algunos ejemplos, R^4 es 
. En algunos ejemplos, R^4 es 
. En algunos ejemplos, R^4 es 
.

En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  .

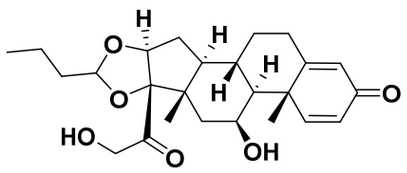
[145] En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  .

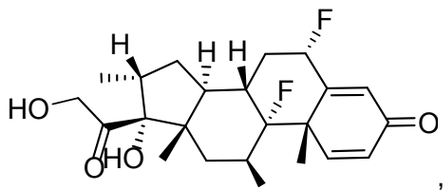
En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  .

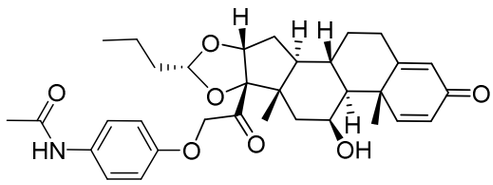
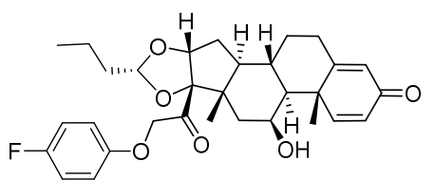
[146] En algunos ejemplos, se establece aquí un compuesto de Fórmula (**PIa**), (**PIb–1**), (**PIb–2**), (**PIc–1**), (**PIc–2**), (**PId–1**), (**PId–2**), (**PIe–1**), o (**PIe–2**), en donde R^4 es alquilo sustituido con amino tal como, pero no limitado a, metil–amino, etil–amino, propil–amino, butil–amino, pentil–amino, hexil–amino, heptil–amino, octil–amino, o nonil–amino. En algunos ejemplos, R^4 es metil–amino. En algunos ejemplos, R^4 es etil–amino. En algunos ejemplos, R^4 es n–propil–amino. En algunos ejemplos, R^4 es i–propil–amino. En algunos ejemplos, R^4 es n–butil–amino. En algunos ejemplos, R^4 es i–butil–amino. En algunos ejemplos, R^4 es t–butil–amino. En algunos ejemplos, R^4 es pentil–amino. En algunos ejemplos, R^4 es hexil–amino. En algunos ejemplos, R^4 es heptil–amino. En algunos ejemplos, R^4 es octil–amino. En algunos ejemplos, R^4 es nonil–amino.

[147] En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  .

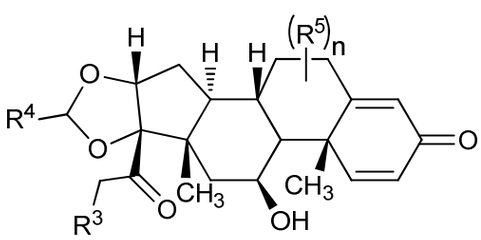
[148] El compuesto de Fórmula (**I**) no es uno de los siguientes compuestos:

 ,

 ,

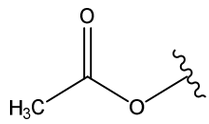
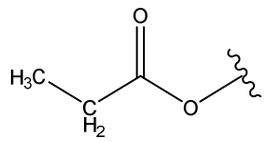
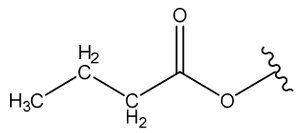
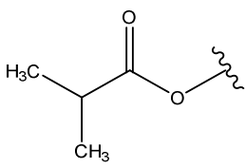
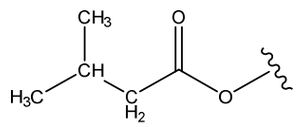
 , o  .

[149] En algunos ejemplos, se establece aquí un compuesto de Fórmula (**I**), en donde el compuesto tiene la estructura de la Fórmula (**PII**):

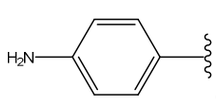
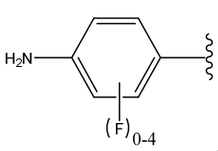
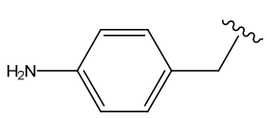


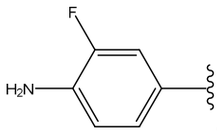
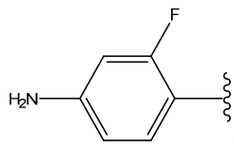
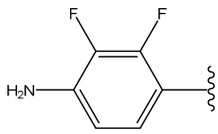
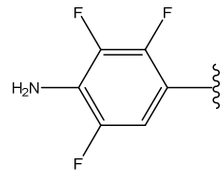
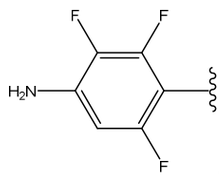
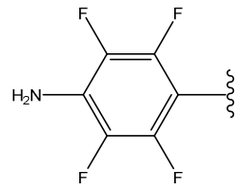
(**PII**).

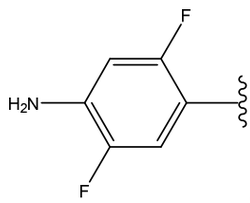
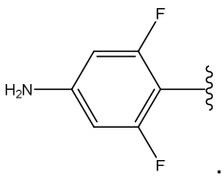
[150] En la Fórmula (**PII**), R^3 se selecciona a partir de –OH, alquil–C(O)–O–, o

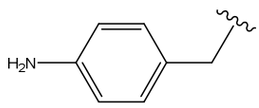
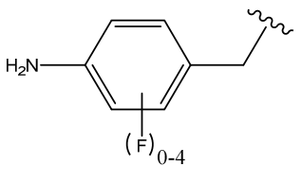
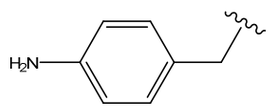
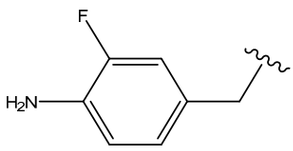
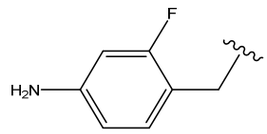
R^aR^bN–ariloxi. En algunos de estos ejemplos, alquil–C(O)–O– o R^aR^bN–ariloxi opcionalmente está sustituido con halo. En algunos ejemplos, R^3 es –OH. En algunos ejemplos, R^3 es alquil–C(O)–O–. En algunos ejemplos, R^3 es R^aR^bN–ariloxi–. En algunos ejemplos, R^3 es  . En algunos ejemplos, R^3 es  . En algunos ejemplos, R^3 es  . En algunos ejemplos, R^3 es  . En algunos ejemplos, R^3 es  . En algunos ejemplos, R^3 es R^aR^bN–ariloxi–.

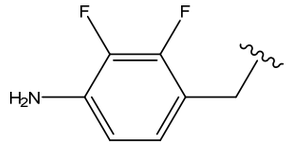
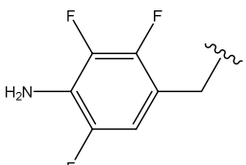
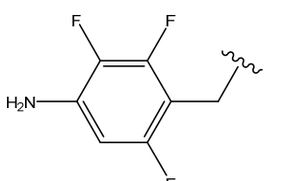
[151] En algunos ejemplos, en la Fórmula (**PII**), R^4 se selecciona a partir del grupo que consiste en alquilo, arilo, arilalquilo, y un heterocicloalquilo que contiene N. En algunos de estos ejemplos, alquilo, arilo, arilalquilo, o heterocicloalquilo que contiene N están opcionalmente sustituidos con $–NR^aR^b$. En algunos ejemplos, R^4 es alquilo tal como, pero no limitado a, metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, o nonilo. En algunos ejemplos, R^4 es metilo. En algunos ejemplos, R^4 es etilo. En algunos ejemplos, R^4 es n–propilo. En algunos ejemplos, R^4 es i–propilo. En algunos ejemplos, R^4 es n–butilo. En algunos ejemplos, R^4 es i–butilo. En algunos ejemplos, R^4 es t–butilo. En algunos ejemplos, R^4 es sec–butilo. En algunos ejemplos, R^4 es pentilo. En algunos ejemplos, R^4 es hexilo. En algunos ejemplos, R^4 es heptilo. En algunos ejemplos, R^4 es octilo, o nonilo. En algunos ejemplos, R^4 es arilo tal como pero no limitado a fenilo o naftilo. En algunos ejemplos, R^4 es fenilo. En algunos ejemplos, R^4 es naftilo. En algunos ejemplos, R^4 es arilalquil– tal como pero no limitado a bencilo. En algunos ejemplos, R^4 es heterocicloalquilo que contiene N tal como pero no limitado a piperidinilo. En algunos ejemplos, R^4 es 4–amino–fenilo. En algunos ejemplos, R^4 es 4–aminofenilo opcionalmente sustituido con halo.

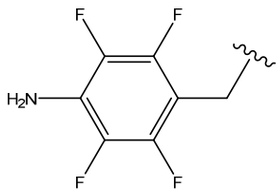
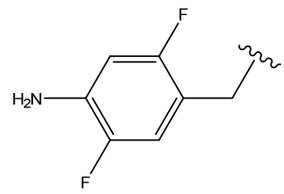
[152] En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos,

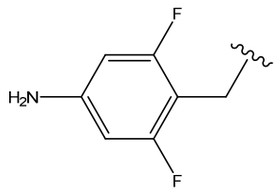
R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  .

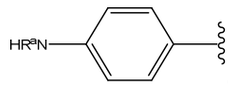
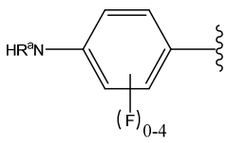
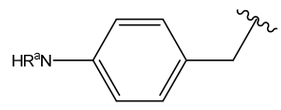
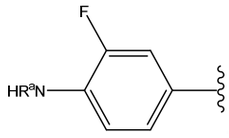
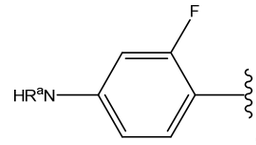
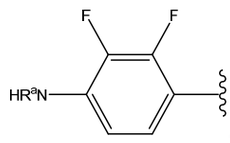
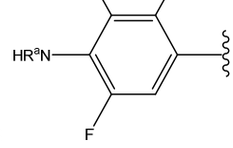
En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  .

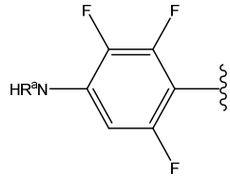
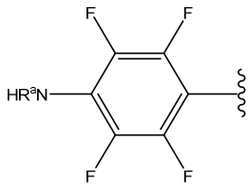
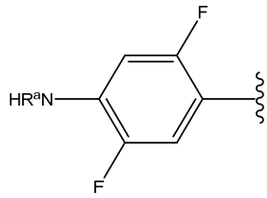
[153] En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  .

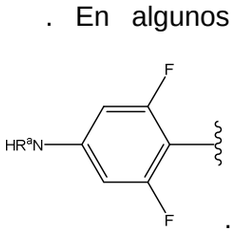
En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  .

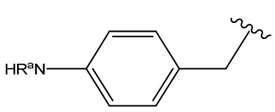
ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  .

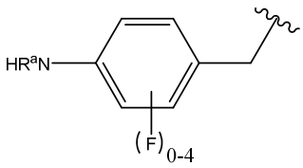
En algunos ejemplos, R^4 es  .

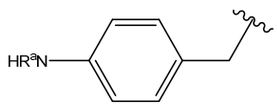
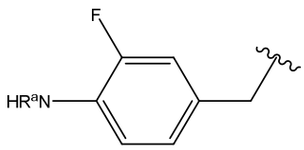
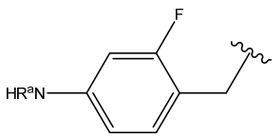
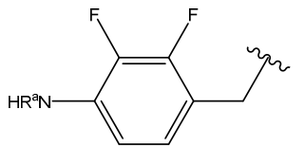
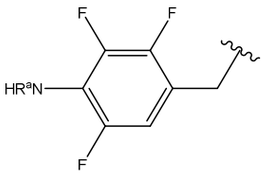
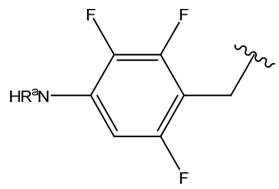
[154] En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es .

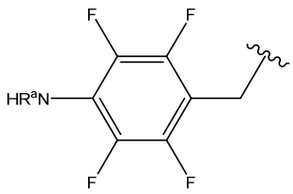
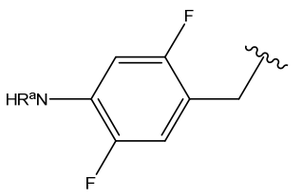
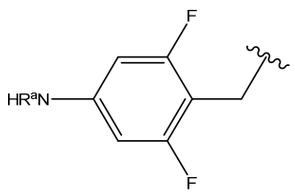
En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  .

En algunos ejemplos, R^4 es  .

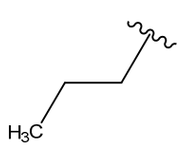
[155] En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es

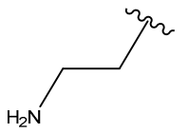


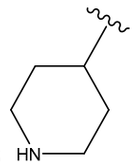
. En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  .

En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  .

[156] En algunos ejemplos, R^4 es alquilo sustituido con amino tal como, pero no limitado a, metil–amino, etil–amino, propil–amino, butil–amino, pentil–amino, hexil–amino, heptil–amino, octil–amino, o nonil–amino. En algunos ejemplos, R^4 es metil–amino. En algunos ejemplos, R^4 es etil–amino. En algunos ejemplos, R^4 es n–propil–amino. En algunos ejemplos, R^4 es i–propil–amino. En algunos ejemplos, R^4 es n–butil–amino. En algunos ejemplos, R^4 es i–butil–amino. En algunos ejemplos, R^4 es t–butil–amino. En algunos ejemplos, R^4 es pentil–amino. En algunos ejemplos, R^4 es hexil–amino. En algunos ejemplos, R^4 es heptil–amino. En algunos ejemplos, R^4 es octil–amino. En algunos ejemplos, R^4 es nonil–amino.

[157] En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es



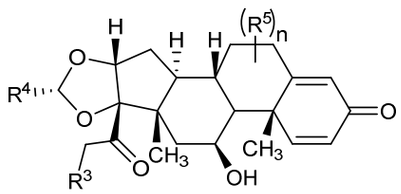
. En algunos ejemplos, R^4 es 

.

[158] En algunos ejemplos, aquí, R^a y R^b se seleccionan, independientemente en cada caso, a partir de H o alquilo. En algunos ejemplos, ambas de R^a y R^b son –H. En algunos ejemplos, ambas de R^a y R^b son metilo. En algunos ejemplos, ambas de R^a y R^b son etilo. En algunos ejemplos, ambas de R^a y R^b son propilo. En algunos ejemplos, una de R^a o R^b es –H y la otra es alquilo. En algunos ejemplos, una de R^a o R^b es –H y la otra es metilo. En algunos ejemplos, una de R^a o R^b es –H y la otra es etilo. En algunos ejemplos, una de R^a o R^b es –H y la otra es propilo.

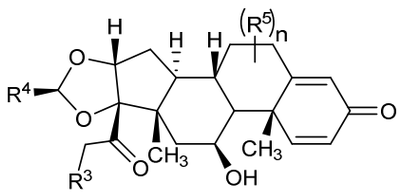
[159] En algunos ejemplos, en la Fórmula (**PII**), n es un entero desde 0–19. En algunos ejemplos, n es 0. En algunos otros ejemplos, n es 1. En ciertos ejemplos, n es 2. En algunos otros ejemplos, n es 3. En ciertos ejemplos, n es 4. En algunos ejemplos, n es 5. En algunos otros ejemplos, n es 6. En ciertos ejemplos, n es 7. En algunos otros ejemplos, n es 8. En ciertos ejemplos, n es 9. En algunos ejemplos, n es 10. En algunos otros ejemplos, n es 11. En ciertos ejemplos, n es 12. En algunos otros ejemplos, n es 13. En ciertos ejemplos, n es 14. En algunos ejemplos, n es 15. En algunos otros ejemplos, n es 16. En ciertos ejemplos, n es 17. En algunos otros ejemplos, n es 18. En ciertos ejemplos, n es 19.

[160] En algunos ejemplos, se establece aquí un compuesto de Fórmula (**I**), en donde el compuesto tiene la estructura de la Fórmula (**PIIa**) o (**PIIb**):



(PIIa)

o



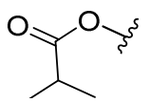
(PIIb)

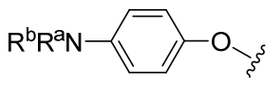
.

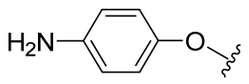
[161] En algunos ejemplos, se establece aquí un compuesto de Fórmula (**PIIa**) o (**PIIb**), en donde R^4 se selecciona a partir de 4–amino–fenilo, 4–amino–1–metil–fenilo, 2–amino–etilo, piperidinilo, o propilo. En algunos ejemplos, R^4 es 4–amino–fenilo. En algunos ejemplos, R^4 es 4–amino–1–metil–fenilo. En algunos ejemplos, R^4 es 2–amino–etilo. En algunos ejemplos, R^4 es piperidinilo. En algunos ejemplos, R^4 es propilo. En algunos ejemplos, R^4 es n–propilo. En algunos ejemplos, R^4 es i–propilo.

[162] En algunos ejemplos, se establece aquí un compuesto de Fórmula (**PIIa**) o

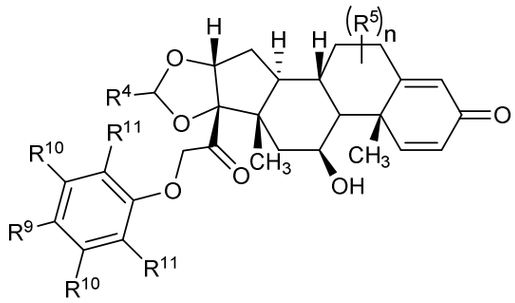
(**PIIb**), en donde R^3 se selecciona a partir de alquil–C(O)–O– o R^aR^bN–ariloxi; en donde alquil–C(O)–O–, o R^aR^bN–ariloxi están opcionalmente sustituidos con halo.

[163] En algunos ejemplos, se establece aquí un compuesto de Fórmula (**PIIa**) o (**PIIb**), en donde R^3 es  .

[164] En algunos ejemplos, se establece aquí un compuesto de Fórmula (**PIIa**) o (**PIIb**), en donde R^3 es  .

[165] En algunos ejemplos, se establece aquí un compuesto de Fórmula (**PIIa**) o (**PIIb**), en donde R^3 es  .

[166] En algunos ejemplos, se establece aquí un compuesto de Fórmula (**PIIa**) o (**PIIb**), en donde el compuesto tiene la estructura de la Fórmula (**PIII**):



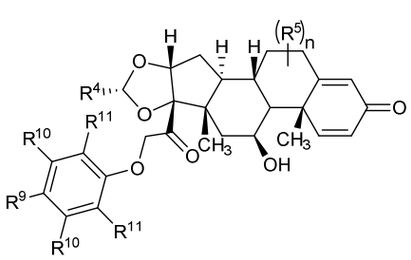
(PIII)

.

[167] En la Fórmula (**PIII**), R^9 se selecciona a partir de H o $–NR^aR^b$. En algunos ejemplos, R^9 es H. En algunos otros ejemplos, R^9 es $–NR^aR^b$, R^4, R^4, y el subíndice n se definen como en la Fórmula I y como se indica anteriormente.

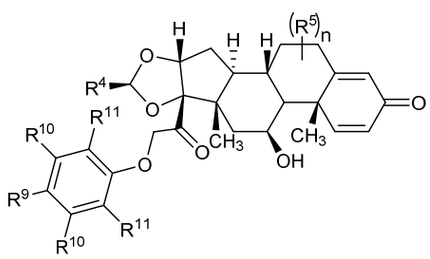
[168] En la Fórmula (**PIII**), R^{10} y R^{11}, se seleccionan cada una, independientemente en cada caso, a partir de H, F, o $–NR^aR^b$.

[169] En algunos ejemplos, se establece aquí un compuesto de Fórmula (**III**), en donde el compuesto tiene la estructura de la Fórmula (**PIIIa**) o (**PIIIb**):



(PIIIa)

o

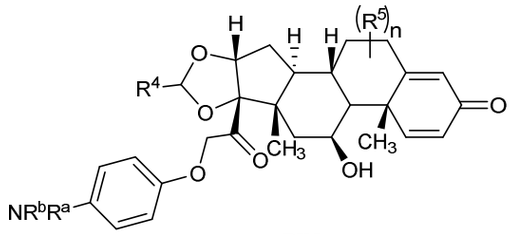


(PIIIb)

.

[170] En algunos ejemplos, se establece aquí un compuesto de Fórmula (**I**), en

donde el compuesto tiene la estructura de la Fórmula (**PIV**):

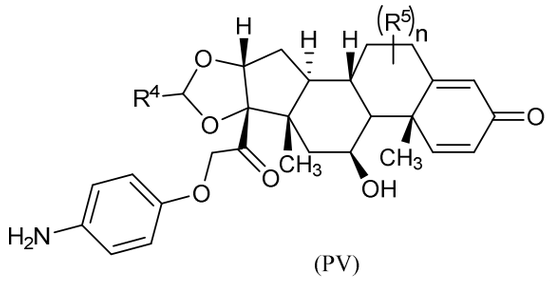


(PIV)

.

En la Fórmula (PIV), $–NR^aR^b$, R^4, R^5, y el subíndice n se definen como en la Fórmula I y como se indica anteriormente.

[171] En algunos ejemplos, se establece aquí un compuesto de Fórmula (**I**), en donde el compuesto tiene la estructura de la Fórmula (**PV**):

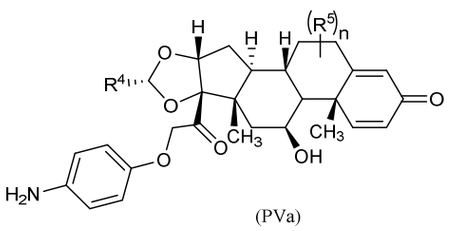


(PV)

.

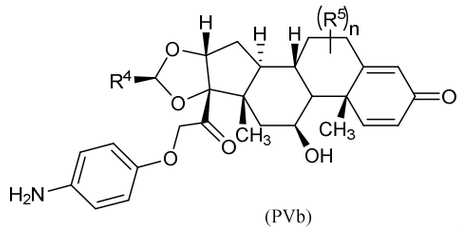
En la Fórmula (PV), R^4, R^4, y el subíndice n se definen como en la Fórmula I y como se indica anteriormente.

[172] En algunos ejemplos, se establece aquí un compuesto de Fórmula (**PV**), en donde el compuesto tiene la estructura de la Fórmula (**PVa**) o (**PVb**):



(PVa)

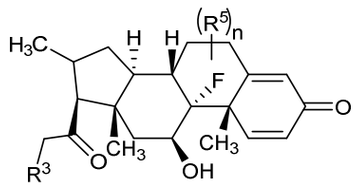
o



(PVb)

.

[173] En algunos ejemplos, se establece aquí un compuesto de Fórmula (**I**), en donde el compuesto tiene la estructura de la Fórmula (**PVI**):



(PVI)

.

En la Fórmula (**PVI**) R^3 se selecciona a partir de alquil–C(O)–O– o R^aR^bN–ariloxi, en donde alquil–C(O)–O–, o $–NR^aR^b$–ariloxi están opcionalmente sustituidos con halo.

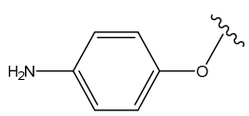
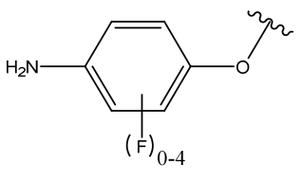
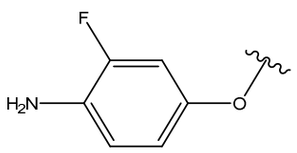
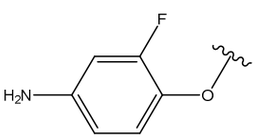
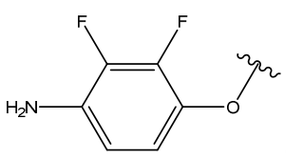
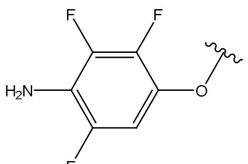
[174] En algunos ejemplos, en la Fórmula (**PVI**), R^4 se selecciona a partir de –H, –

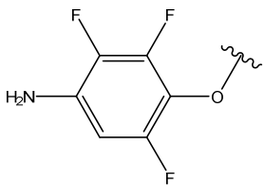
OH, halo, o alquilo. En algunos ejemplos, R^4 es halo tal como pero no limitado a –F, –Cl, –Br, o –I. En algunos ejemplos, R^4 es –F. En algunos ejemplos, R^4 es –Cl. En algunos ejemplos, R^4 es –Br. En algunos ejemplos, R^4 es –I. En algunos ejemplos, R^4 es alquilo tal como, pero no limitado a, metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, o nonilo. El subíndice n es un entero desde 0–19. En algunos ejemplos, n es 0. En algunos otros ejemplos, n es 1. En ciertos ejemplos, n es 2. En algunos otros ejemplos, n es 3. En ciertos ejemplos, n es 4. En algunos ejemplos, n es 5. En algunos otros ejemplos, n es 6. En ciertos ejemplos, n es 7. En algunos otros ejemplos, n es 8. En ciertos ejemplos, n es 9. En algunos ejemplos, n es 10. En algunos otros ejemplos, n es 11. En ciertos ejemplos, n es 12. En algunos otros ejemplos, n es 13. En ciertos ejemplos, n es 14. En algunos ejemplos, n es 15. En algunos otros ejemplos, n es 16. En ciertos ejemplos, n es 17. En algunos otros ejemplos, n es 18. En ciertos ejemplos, n es 19.

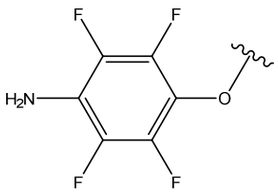
[175] En algunos ejemplos, en la Fórmula (**PVI**), R^3 se selecciona a partir de –OH, alquil–C(O)–O–, $–NR^aR^b$, o NR^aR^b–ariloxi. En algunos de estos ejemplos, alquil–C(O)–O– o R^aR^bN–ariloxi opcionalmente está sustituido con halo. En algunos ejemplos, R^3 es –OH. En algunos ejemplos, R^3 es alquil–C(O)–O–. En algunos ejemplos, R^3 es R^aR^bN–ariloxi.

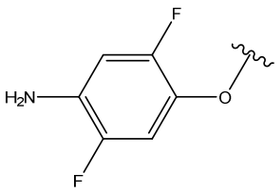
[176] En algunos ejemplos, R^3 es $–NR^aR^b$. En algunos ejemplos, R^3 es $–NH_2$. En algunos ejemplos, R^3 es $–NH(CH_3)$.

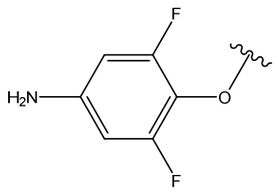
[177] En algunos ejemplos, R^3 es R^aR^bN–ariloxi.

[178] En algunos ejemplos, R^3 es  . En algunos ejemplos, R^3 es  . En algunos ejemplos, R^3 es  . En algunos ejemplos, R^3 es  . En algunos ejemplos, R^3 es  . En algunos ejemplos, R^3 es  . En algunos ejemplos, R^3 es

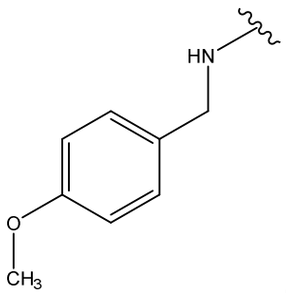


. En algunos ejemplos, R^3 es 

. En algunos ejemplos, R^3 es 

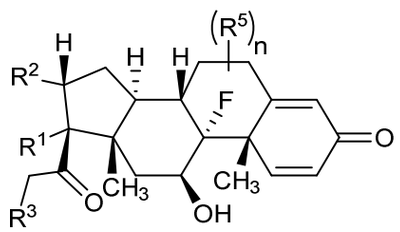
. En algunos ejemplos, R^3 es 

.

En algunos ejemplos, R^3 es 

.

[179] En algunos ejemplos, se establece aquí un compuesto de Fórmula (**I**), en donde el compuesto tiene la estructura de la Fórmula (**PVII**):



(PVII)

.

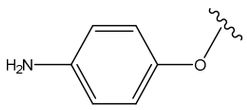
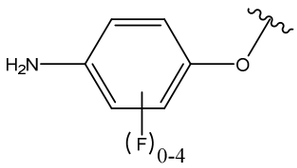
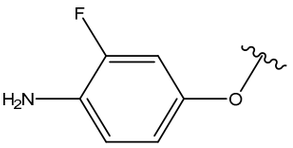
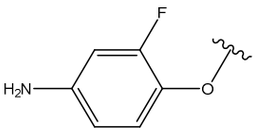
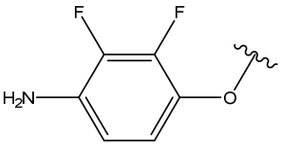
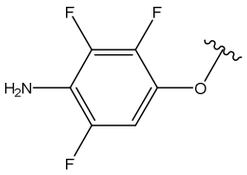
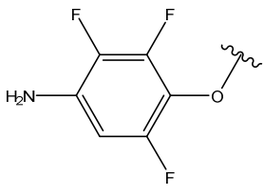
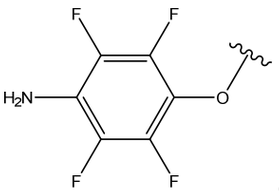
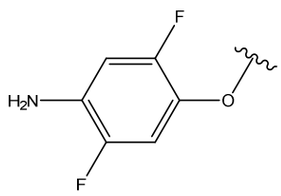
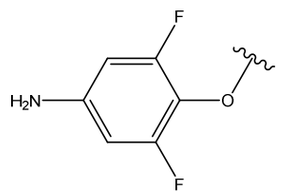
En la Fórmula (**PVII**) R^3 se selecciona a partir de alquil–C(O)–O– o R^aR^bN–ariloxi, en donde alquil–C(O)–O–, o R^aR^bN–ariloxi están opcionalmente sustituidos con halo.

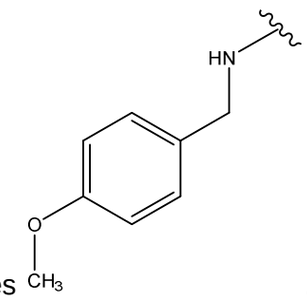
[180] En algunos ejemplos, en la Fórmula (**PVII**), R^4 se selecciona a partir de –H, –OH, halo, o alquilo. En algunos ejemplos, R^4 es halo tal como pero no limitado a –F, –Cl, –Br, o –I. En algunos ejemplos, R^4 es –F. En algunos ejemplos, R^4 es –Cl. En algunos ejemplos, R^4 es –Br. En algunos ejemplos, R^4 es –I. En algunos ejemplos, R^4 es alquilo tal como, pero no limitado a, metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, o nonilo. El subíndice n es un entero desde 0–19. En algunos ejemplos, n es 0. En algunos otros ejemplos, n es 1. En ciertos ejemplos, n es 2. En algunos otros ejemplos, n es 3. En ciertos ejemplos, n es 4. En algunos ejemplos, n es 5. En algunos otros ejemplos, n es 6. En ciertos ejemplos, n es 7. En algunos otros ejemplos, n es 8. En ciertos ejemplos, n es 9. En algunos ejemplos, n es 10. En algunos otros ejemplos, n es 11. En ciertos ejemplos, n es 12. En algunos otros ejemplos, n es 13. En ciertos ejemplos, n es 14. En algunos ejemplos,

n es 15. En algunos otros ejemplos, n es 16. En ciertos ejemplos, n es 17. En algunos otros ejemplos, n es 18. En ciertos ejemplos, n es 19. En algunos ejemplos, en la Fórmula (**PVII**), R^3 se selecciona a partir de –OH, alquil–C(O)–O–, $–NR^aR^b$, o R^aR^bN–ariloxi. En algunos de estos ejemplos, alquil–C(O)–O– o NR^aR^b–ariloxi opcionalmente está sustituido con halo. En algunos ejemplos, R^3 es –OH. En algunos ejemplos, R^3 es alquil–C(O)–O–. En algunos ejemplos, R^3 es R^aR^bN–ariloxi.

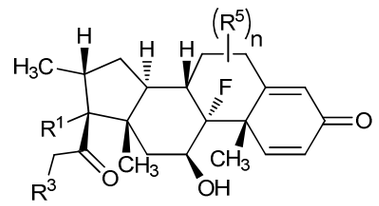
[181] En algunos ejemplos, R^3 es $–NR^aR^b$. En algunos ejemplos, R^3 es $–NH_2$. En algunos ejemplos, R^3 es $–NH(CH_3)$.

[182] En algunos ejemplos, R^3 es R^aR^bN–ariloxi–.

[183] En algunos ejemplos, R^3 es  . En algunos ejemplos, R^3 es  . En algunos ejemplos, R^3 es  . En algunos ejemplos, R^3 es  . En algunos ejemplos, R^3 es  . En algunos ejemplos, R^3 es  . En algunos ejemplos, R^3 es  . En algunos ejemplos, R^3 es  . En algunos ejemplos, R^3 es  . En algunos ejemplos, R^3 es  .

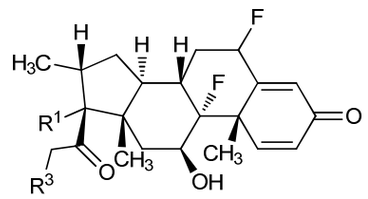
En algunos ejemplos, R^3 es  .

[184] En algunos ejemplos, se establece aquí un compuesto de Fórmula (**PVII**), en donde el compuesto tiene la estructura de la Fórmula (**PVIIa**):

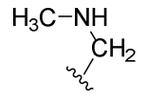


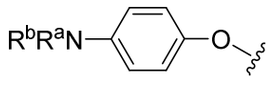
(**PVIIa**).

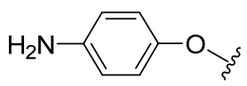
[185] En algunos ejemplos, se establece aquí un compuesto de Fórmula (**PVII**), en donde el compuesto tiene la estructura de la Fórmula (**PVIIb**):



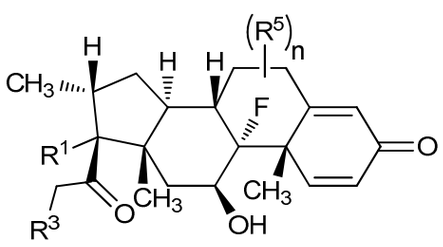
(**PVIIb**).

[186] En algunos ejemplos, se establece aquí un compuesto de Fórmula (**PVII**), (**PVIIa**), o (**PVIIb**), en donde R^3 es  o R^aR^bN–ariloxi– opcionalmente sustituido con halo.

[187] En algunos ejemplos, se establece aquí un compuesto de Fórmula (**PVII**), (**PVIIa**), o (**PVIIb**), en donde R^3 es  .

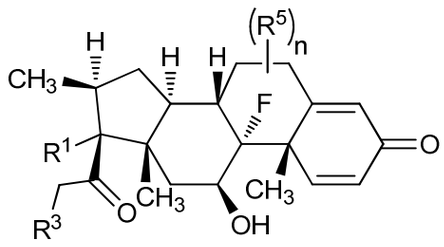
[188] En algunos ejemplos, se establece aquí un compuesto de Fórmula (**PVII**), (**PVIIa**), o (**PVIIb**), en donde R^3 es  .

[189] En algunos ejemplos, se establece aquí un compuesto de Fórmula (**PVII**), en donde el compuesto tiene la estructura de la Fórmula (**PVIIb–1**) o (**PVIIb–2**):



(**PVIIb–1**)

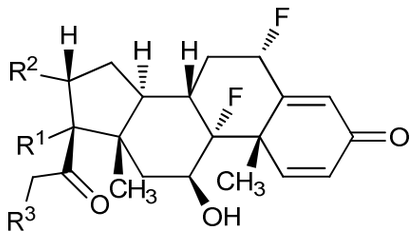
o



(**PVIIb–2**).

[190] En algunos ejemplos, se establece aquí un compuesto de Fórmula (**PVII**), (**PVIIa**), (**PVIIb**), (**PVIIb–1**), o (**PVIIb–2**), en donde R^3 es alquil–C(O)–O– o R^aR^bN–ariloxi.

[191] En algunos ejemplos, se establece aquí un compuesto de Fórmula (**I**), en donde el compuesto tiene la estructura de la Fórmula (**PVIII**):



(**PVIII**).

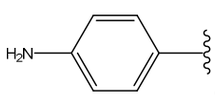
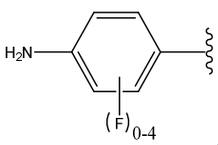
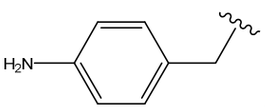
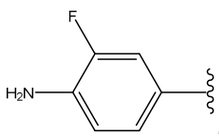
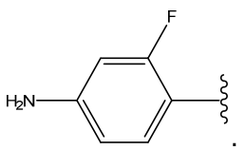
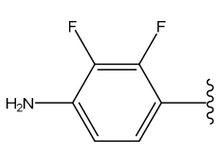
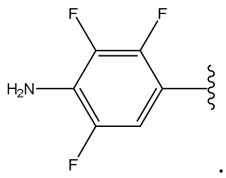
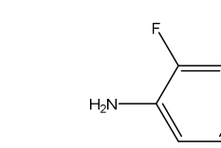
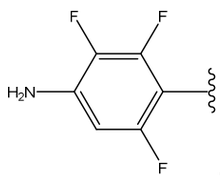
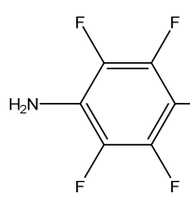
[192] En algunos ejemplos, de cualquiera de la Fórmula (**PI**), (**PIa**), (**PIb–1**), (**PIb–2**), (**PIc–1**), (**PIc–2**), (**PId–1**), (**PId–2**), (**PIe–1**), (**PIe–2**), (**PII**), (**PIIa**), (**PIIb**), (**PIIIa**), (**PIIIb**), (**PIV**), (**PV**), (**PVa**), (**PVb**), (**PVI**), (**PVII**), (**PVIIa**), (**PVIIb**), (**PVIIb–1**), o (**PVIIb–2**), en donde halo, cuando está presente, es fluoro.

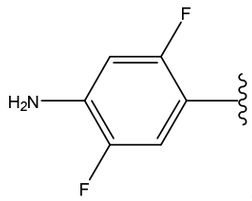
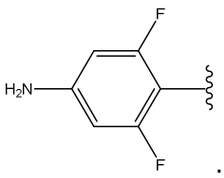
[193] En algunos ejemplos del compuesto de Fórmula (**I**), R^1 y R^2 se seleccionan, independientemente, a partir de –H, alquilo, alquil–C(O)–O–, –OH, o halo. En algunos otros ejemplos, R^1 y R^2 conjuntamente forman  . En ciertos ejemplos, R^1 es –H. En ciertos otros ejemplos, R^1 es alquilo. En algunos ejemplos, R^1 es alquil–C(O)–O–. En algunos otros ejemplos, R^1 es –OH. En ciertos ejemplos, R^1 es halo. En ciertos otros ejemplos, R^1 es –F. En algunos ejemplos, R^1 es –Cl. En algunos otros ejemplos, R^1 es –Br. En ciertos ejemplos, R^1 es –I. En ciertos otros ejemplos, R^2 es –OH. En algunos ejemplos, R^2 es halo. En algunos otros ejemplos, R^2 es –F. En ciertos ejemplos, R^2 es –Cl. En ciertos otros ejemplos, R^2 es –Br. En algunos ejemplos, R^2 es –I.

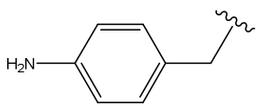
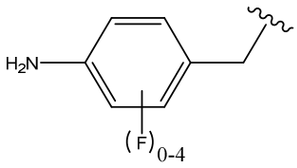
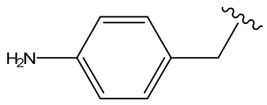
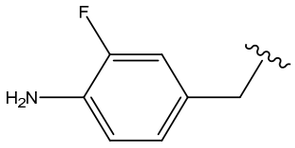
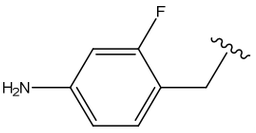
[194] En algunos ejemplos, en la Fórmula (**I**), R^5 se selecciona, independientemente en cada caso, a partir de –OH, halo, alquilo, o arilalquilo. En algunos ejemplos, R^5 es –OH. En algunos ejemplos, R^5 es halo tal como pero no limitado a –F, –Cl, –Br, o –I. En algunos ejemplos, R^5 es –F. En algunos ejemplos, R^5 es –Cl. En algunos ejemplos, R^5 es –Br. En

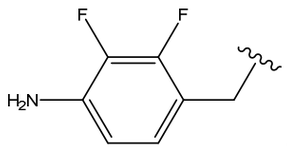
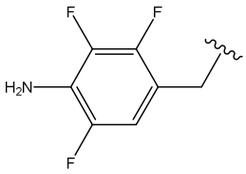
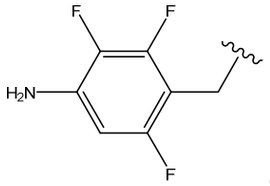
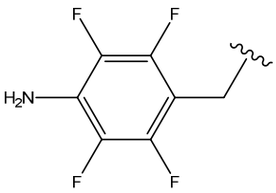
algunos ejemplos, R^5 es –I. En algunos ejemplos, R^5 es alquilo tal como, pero no limitado a, metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, o nonilo. En algunos ejemplos, R^5 es bencilo.

[195] En algunos ejemplos, en la Fórmula (**I**), R^4 se selecciona a partir del grupo que consiste en alquilo, arilo, arilalquilo, y un heterocicloalquilo que contiene N. En algunos de estos ejemplos, alquilo, arilo, arilalquilo, o heterocicloalquilo que contiene N están opcionalmente sustituidos con $–NR^aR^b$. En algunos ejemplos, R^4 es alquilo tal como, pero no limitado a, metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, o nonilo. En algunos ejemplos, R^4 es metilo. En algunos ejemplos, R^4 es etilo. En algunos ejemplos, R^4 es n–propilo. En algunos ejemplos, R^4 es i–propilo. En algunos ejemplos, R^4 es n–butilo. En algunos ejemplos, R^4 es i–butilo. En algunos ejemplos, R^4 es t–butilo. En algunos ejemplos, R^4 es sec–butilo. En algunos ejemplos, R^4 es pentilo. En algunos ejemplos, R^4 es hexilo. En algunos ejemplos, R^4 es heptilo. En algunos ejemplos, R^4 es octilo, o nonilo. En algunos ejemplos, R^4 es arilo tal como pero no limitado a fenilo o naftilo. En algunos ejemplos, R^4 es fenilo. En algunos ejemplos, R^4 es naftilo. En algunos ejemplos, R^4 es arilalquil– tal como pero no limitado a bencilo. En algunos ejemplos, R^4 es heterocicloalquilo que contiene N tal como pero no limitado a piperidinilo. En algunos ejemplos, R^4 es 4–amino–fenilo. En algunos ejemplos, R^4 es 4–aminofenilo opcionalmente sustituido con halo.

[196] En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  .

En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  .

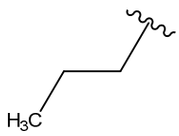
[197] En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  .

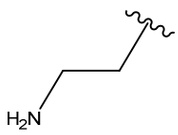
En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es  . En algunos ejemplos, R^4 es .

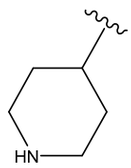
En algunos ejemplos, R^4 es .

[198] En algunos ejemplos, R^4 es alquilo sustituido con amino tal como, pero no limitado a, metil–amino, etil–amino, propil–amino, butil–amino, pentil–amino, hexil–amino, heptil–amino, octil–amino, o nonil–amino. En algunos ejemplos, R^4 es metil–amino. En

algunos ejemplos, R^4 es etil–amino. En algunos ejemplos, R^4 es n–propil–amino. En algunos ejemplos, R^4 es i–propil–amino. En algunos ejemplos, R^4 es n–butil–amino. En algunos ejemplos, R^4 es i–butil–amino. En algunos ejemplos, R^4 es t–butil–amino. En algunos ejemplos, R^4 es sec–butilo. En algunos ejemplos, R^4 es pentil–amino. En algunos ejemplos, R^4 es hexil–amino. En algunos ejemplos, R^4 es heptil–amino. En algunos ejemplos, R^4 es octil–amino. En algunos ejemplos, R^4 es nonil–amino.

[199] En algunos ejemplos, R^4 es 

. En algunos ejemplos, R^4 es 

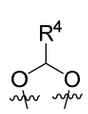
. En algunos ejemplos, R^4 es 

.

[200] En algunos ejemplos, aquí, R^a y R^b se seleccionan, independientemente en cada caso, a partir de H o alquilo. En algunos ejemplos, ambas de R^a y R^b son H. En algunos ejemplos, ambas de R^a y R^b son metilo. En algunos ejemplos, ambas de R^a y R^b son etilo. En algunos ejemplos, ambas de R^a y R^b son propilo. En algunos ejemplos, una de R^a o R^b es H y la otra es alquilo. En algunos ejemplos, una de R^a o R^b es H y la otra es metilo. En algunos ejemplos, una de R^a o R^b es H y la otra es etilo. En algunos ejemplos, una de R^a o R^b es H y la otra es propilo.

[201] En algunos ejemplos, en la Fórmula (**I**), n es un entero desde 0–19. En algunos ejemplos, n es 0. En algunos otros ejemplos, n es 1. En ciertos ejemplos, n es 2. En algunos otros ejemplos, n es 3. En ciertos ejemplos, n es 4. En algunos ejemplos, n es 5. En algunos otros ejemplos, n es 6. En ciertos ejemplos, n es 7. En algunos otros ejemplos, n es 8. En ciertos ejemplos, n es 9. En algunos ejemplos, n es 10. En algunos otros ejemplos, n es 11. En ciertos ejemplos, n es 12. En algunos otros ejemplos, n es 13. En ciertos ejemplos, n es 14. En algunos ejemplos, n es 15. En algunos otros ejemplos, n es 16. En ciertos ejemplos, n es 17. En algunos otros ejemplos, n es 18. En ciertos ejemplos, n es 19.

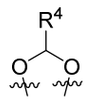
[202] En algunos ejemplos, en la Fórmula (**I**), R^3 no es –OH cuando R^1 es –OH.

[203] En algunos ejemplos, en la Fórmula (**I**), R^3 no es –OH cuando R^1 y R^2 conjuntamente forman 

en donde R^4 es un $C_{1–9}$alquilo o 4–(dimetil–amino)–fenilo.

[204] En algunos ejemplos, se establece aquí un compuesto de Fórmula (**I**), en

donde R^1 y R^2 conjuntamente forman  . En algunos de estos ejemplos, R^4 es alquilo, arilo, arilalquilo, o un heterocicloalquilo que contiene N. En ciertos ejemplos, alquilo, arilo, arilalquilo, o heterocicloalquilo que contiene N están opcionalmente sustituidos con $–NR^aR^b$. En algunos de estos ejemplos, R^4 es alquilo. En algunos de estos ejemplos, R^4 es arilo. En algunos de estos ejemplos, R^4 es arilalquilo. En algunos de estos ejemplos, R^4 es heterocicloalquilo que contiene N. En algunos ejemplos, R^4 es alquilo tal como, pero no limitado a, metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, o nonilo. En algunos ejemplos, R^4 es metilo. En algunos ejemplos, R^4 es etilo. En algunos ejemplos, R^4 es n–propilo. En algunos ejemplos, R^4 es i–propilo. En algunos ejemplos, R^4 es n–butilo. En algunos ejemplos, R^4 es i–butilo. En algunos ejemplos, R^4 es t–butilo. En algunos ejemplos, R^4 es sec–butilo. En algunos ejemplos, R^4 es pentilo. En algunos ejemplos, R^4 es hexilo. En algunos ejemplos, R^4 es heptilo. En algunos ejemplos, R^4 es octilo. En algunos ejemplos, R^4 es nonilo. En algunos ejemplos, R^4 es arilo tal como pero no limitado a fenilo o naftilo. En algunos ejemplos, R^4 es fenilo. En algunos ejemplos, R^4 es naftilo. En algunos ejemplos, R^4 es arilalquil– tal como pero no limitado a bencilo. En algunos ejemplos, R^4 es heterocicloalquilo que contiene N tal como pero no limitado a piperidinilo. En algunos ejemplos, R^4 es 4–amino–fenilo. En algunos ejemplos, R^4 es 4–aminofenilo opcionalmente sustituido con halo.

[205] En algunos ejemplos, se establece aquí un compuesto de Fórmula (**I**), en donde R^1 y R^2 conjuntamente forman  en donde R^4 se selecciona a partir del grupo que consiste en alquilo, arilo, arilalquilo, y un heterocicloalquilo que contiene N; y en donde alquilo, arilo, arilalquilo, o heterocicloalquilo que contiene N están opcionalmente sustituidos con $–NR^aR^b$; y en donde la estereoquímica del carbono indicado por * es R.

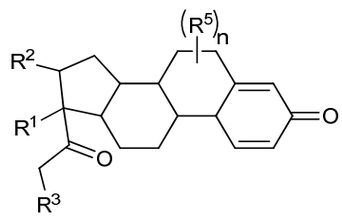
[206] En algunos ejemplos, se establece aquí un compuesto de Fórmula (**I**), en donde R^1 y R^2 conjuntamente forman  en donde R^4 se selecciona a partir del grupo que consiste en alquilo, arilo, arilalquilo, y un heterocicloalquilo que contiene N; y en donde alquilo, arilo, arilalquilo, o heterocicloalquilo que contiene N están opcionalmente sustituidos con $–NR^aR^b$; y en donde la estereoquímica del carbono indicado por * es S.

[207] En la Fórmula (I), R^3 no es –OH cuando R^1 es –OH o cuando R^1 y R^2

conjuntamente forman  en donde R^4 es un $C_{1–9}$alquilo o 4–(dimetil–amino)–fenilo.

[208] En algunos ejemplos, la carga útil aquí establecida es un derivado o análogo de budesonida o diflorasona. En ciertos ejemplos, el derivado es una amina o anilina que contiene la molécula que está relacionada en estructura a la budesonida o diflorasona. Como se establece aquí, las cargas útiles aquí establecidas así como otros esteroides pueden conjugarse a un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo con base en los métodos aquí establecidos. Como se establece aquí, las cargas útiles aquí establecidas así como otros esteroides pueden conjugarse a un anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, y también a un radical ciclodextrina con base en los métodos aquí establecidos. Como se enseña aquí, enlazador–cargas útiles estables pueden utilizarse con estos métodos de conjugación para producir anticuerpo–esteroide–conjugados. En algunos ejemplos, los conjugados anticuerpo-esteroide también incluyen un radical ciclodextrina.

[209] En algunas modalidades, se proporcionan aquí compuestos de Fórmula (**I^1**):



(**I^1**);

o sal, solvato, estereoisómero, o derivado farmacéuticamente aceptable de la misma,

en donde:

R^1 y R^2 son, independientemente, –H, alquilo, alquil–C(O)–O–, –OH, o halo; o R^1 y R^2 conjuntamente forman  ,

en donde R^4 es alquilo, arilo, arilalquilo, o un heterocicloalquilo que contiene N,

en donde el alquilo, arilo, arilalquilo, y heterocicloalquilo que contiene N están, independientemente en cada caso, opcionalmente sustituidos con –NR^aR^b;

R^5 es, independientemente en cada caso, –OH, halo, alquilo, o arilalquilo;

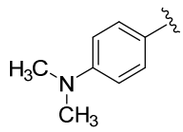
R^3 es –OH, alquil–C(O)–O–, o –X–aril–NR^aR^b, en donde X se selecciona a partir de S, S(O), $S(O)_2$, SO_2NR^a, $CONR^a$, C(O), o NR^a, en donde el alquil–C(O)–O– y –X–aril–NR^aR^b

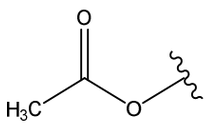
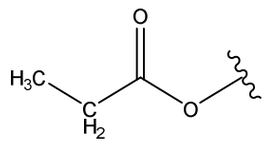
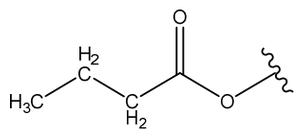
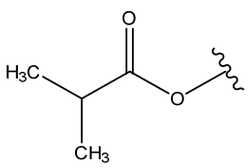
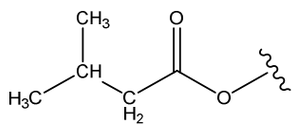
están opcionalmente sustituidos con halo o profármaco.

R^a y R^b son, independientemente en cada caso, H o alquilo, arilo;

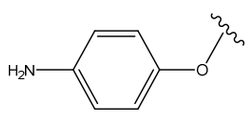
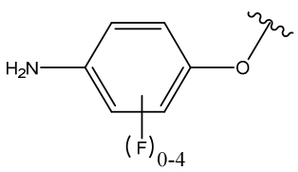
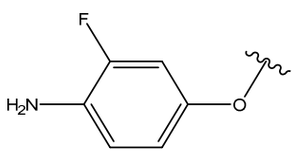
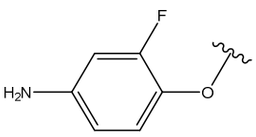
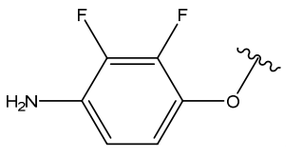
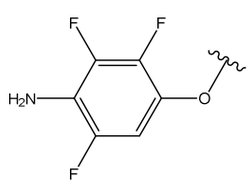
R^c es –H o alquilo; y

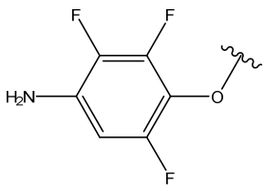
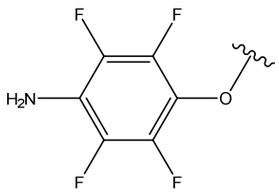
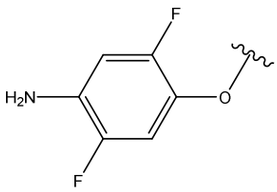
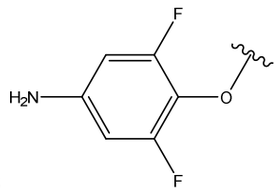
n es un entero desde 0–19;

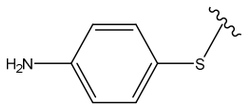
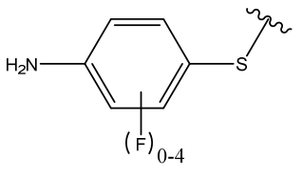
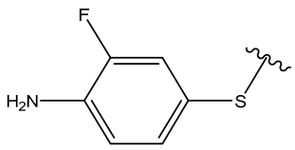
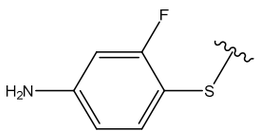
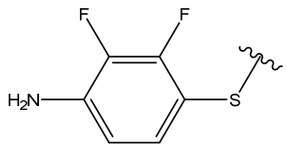
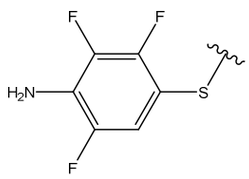
con la condición de que R^3 no es –OH cuando ya sea (a) o (b): (a) R^1 es –OH o (b) R^1 y R^2 conjuntamente forman  y R^4 es un $C_{1–9}$alquilo o  .

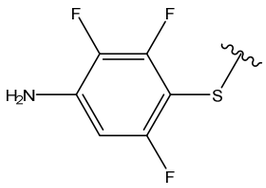
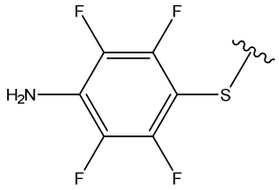
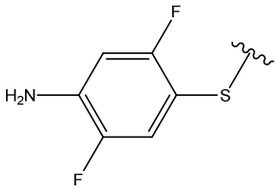
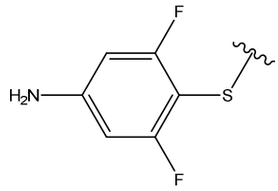
[210] En algunos de estos ejemplos, alquil–C(O)–O– o –X–aril–NR^aR^b opcionalmente está sustituido con halo. En algunos ejemplos, R^3 es –OH. En algunos ejemplos, R^3 es alquil–C(O)–O–. En algunos ejemplos, R^3 es R^aR^bN–ariloxi. En algunos ejemplos, R^3 es  . En algunos ejemplos, R^3 es  . En algunos ejemplos, R^3 es  . En algunos ejemplos, R^3 es  . En algunos ejemplos, R^3 es  .

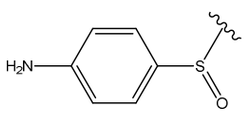
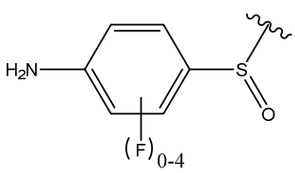
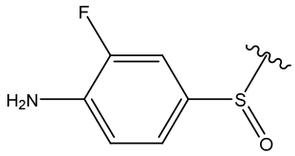
[211] En algunos ejemplos, R^3 es –X–aril–NR^aR^b.

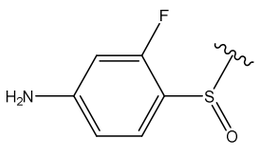
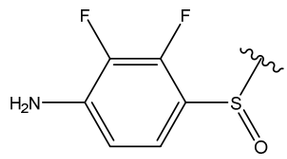
[212] En algunos ejemplos, R^3 es  . En algunos ejemplos, R^3 es  . En algunos ejemplos, R^3 es  . En algunos ejemplos, R^3 es  . En algunos ejemplos, R^3 es  . En algunos ejemplos, R^3 es  . En algunos ejemplos, R^3 es .

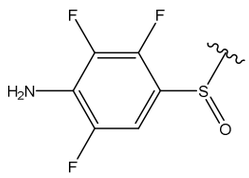
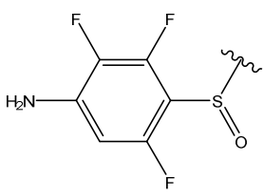
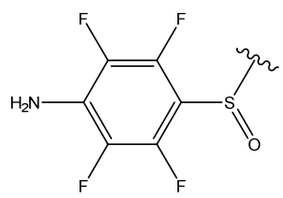
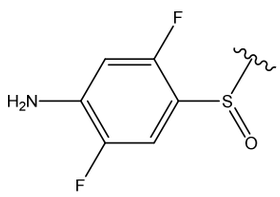
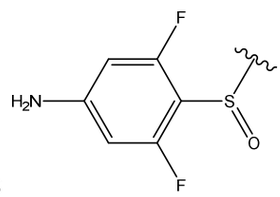

. En algunos ejemplos, R^3 es 
. En algunos ejemplos, R^3 es 
. En algunos ejemplos, R^3 es 
.

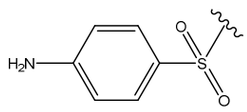
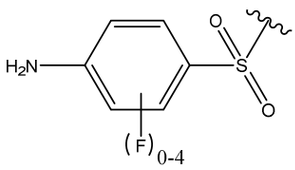
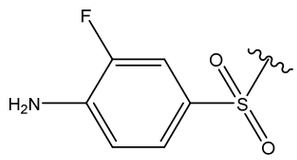
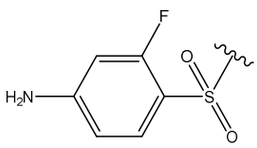
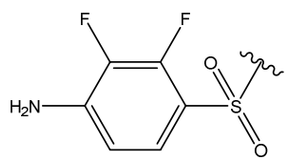
[213] En algunos ejemplos, R^3 es 
. En algunos ejemplos, R^3 es 
. En algunos ejemplos, R^3 es 
. En algunos ejemplos, R^3 es 
. En algunos ejemplos, R^3 es 
. En algunos ejemplos, R^3 es 
.

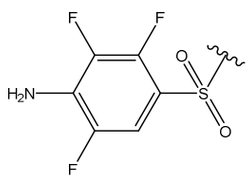
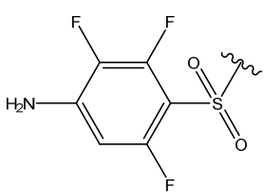
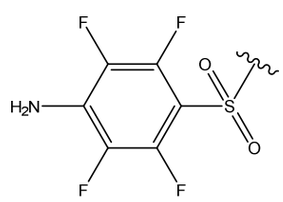
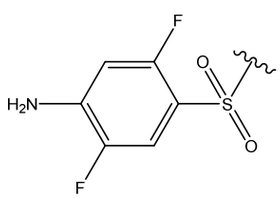
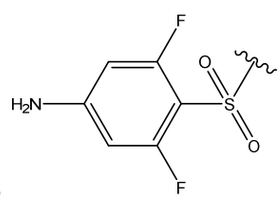
En algunos ejemplos, R^3 es 
. En algunos ejemplos, R^3 es 
. En algunos ejemplos, R^3 es 
. En algunos ejemplos, R^3 es 
.

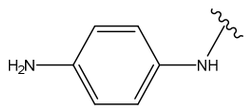
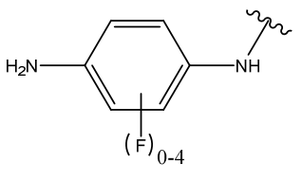
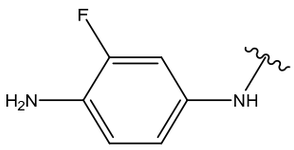
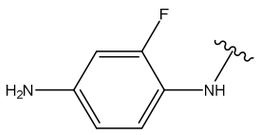
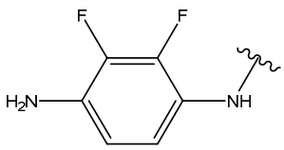
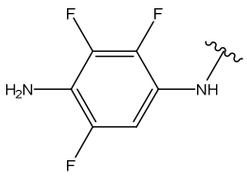
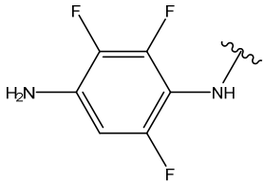
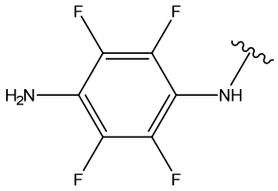
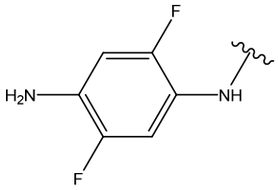
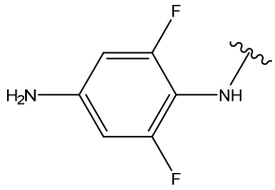
[214] En algunos ejemplos, R^3 es 
. En algunos ejemplos, R^3 es 
. En algunos ejemplos, R^3 es 
. En algunos

ejemplos, R^3 es  . En algunos ejemplos, R^3 es  .

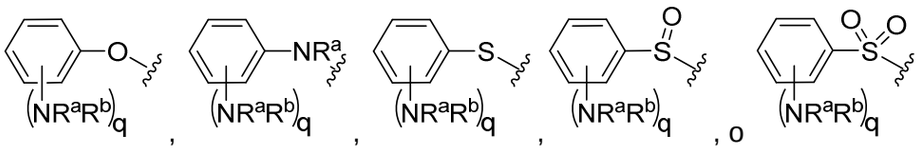
En algunos ejemplos, R^3 es  . En algunos ejemplos, R^3 es  . En algunos ejemplos, R^3 es  . En algunos ejemplos, R^3 es  . En algunos ejemplos, R^3 es  .

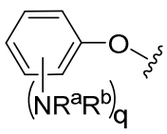
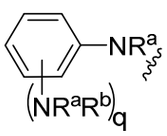
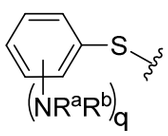
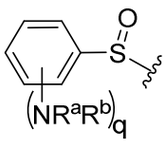
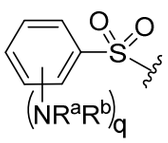
[215] En algunos ejemplos, R^3 es  . En algunos ejemplos, R^3 es  . En algunos ejemplos, R^3 es  . En algunos ejemplos, R^3 es  . En algunos ejemplos, R^3 es  .

En algunos ejemplos, R^3 es  . En algunos ejemplos, R^3 es  . En algunos ejemplos, R^3 es  . En algunos ejemplos, R^3 es  . En algunos ejemplos, R^3 es  .

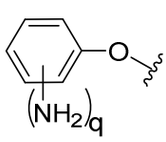
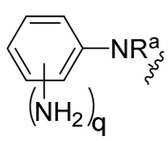
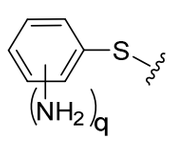
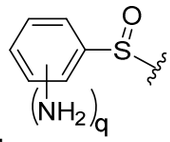
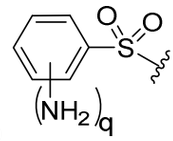
[216] En algunos ejemplos, R^3 es  . En algunos ejemplos, R^3 es  . En algunos ejemplos, R^3 es  . En algunos ejemplos, R^3 es  . En algunos ejemplos, R^3 es  . En algunos ejemplos, R^3 es  . En algunos ejemplos, R^3 es  . En algunos ejemplos, R^3 es  . En algunos ejemplos, R^3 es  . En algunos ejemplos, R^3 es  .

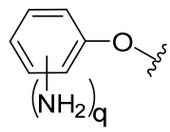
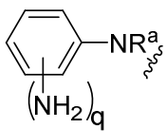
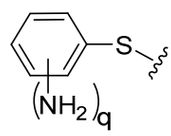
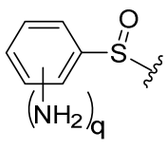
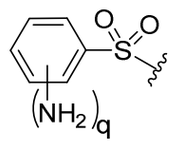
[217] En algunos ejemplos, se establece aquí un compuesto de Fórmula (**I**), en donde R^3 tiene una estructura seleccionada a partir de una de las siguientes estructuras:



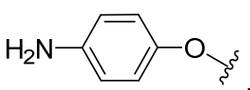
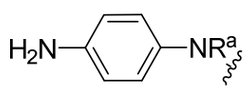
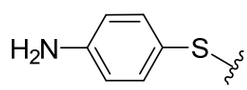
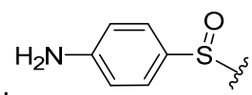
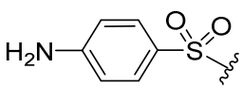
[218] En algunos ejemplos, R^3 es  . En algunos ejemplos, R^3 es  . En algunos ejemplos, R^3 es  . En algunos ejemplos, R^3 es  . En algunos ejemplos, R^3 es  . En estos ejemplos, q es un entero desde 0 hasta 5.

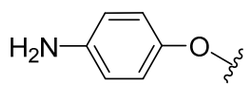
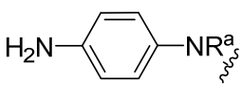
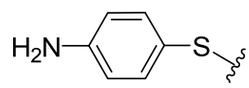
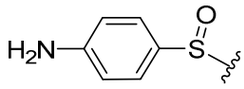
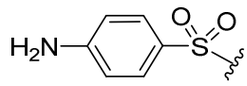
[219] En algunos ejemplos, se establece aquí un compuesto de Fórmula (**I**), en donde R^3 tiene una estructura seleccionada a partir de una de las siguientes estructuras:





, o  .

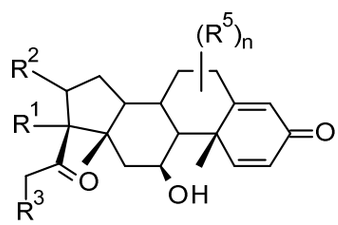
[220] En algunos ejemplos, R^3 es  . En algunos ejemplos, R^3 es  . En algunos ejemplos, R^3 es  . En algunos ejemplos, R^3 es  . En algunos ejemplos, R^3 es  . En estos ejemplos, q es un entero desde 0 hasta 5.

[221] En algunos ejemplos, se establece aquí un compuesto de Fórmula (**I**), en donde R^3 tiene una estructura seleccionada a partir de una de las siguientes estructuras:





, o  .

En algunos ejemplos, R^3 es  . En algunos ejemplos, R^3 es  . En algunos ejemplos, R^3 es  . En algunos ejemplos, R^3 es  . En algunos ejemplos, R^3 es  .

[222] En algunos ejemplos, se establece aquí un compuesto de Fórmula (**I**), en donde el compuesto tiene la estructura de la Fórmula **1000**:



1000

o una sal, solvato, o estereoisómero farmacéuticamente aceptable de la misma. En la Fórmula **1000**, R^1 y R^2 se seleccionan, independientemente, a partir del grupo que consiste en -H, -OH, alquilo, -O-C(O)-alquilo, y halo; o R^1 y R^2 conjuntamente forman  , en donde R^4 se selecciona a partir del grupo que consiste en alquilo, arilo, alquilarilo, arilalquilo, heteroarilo, -alquilen-NR^aR^b, -X-arilen-Y-NR^aR^b, -X-heteroarilen-Y-NR^aR^b, y heterocicloalquilo que contiene N; en donde X está ausente, -N-, -CH_2-, u -O-; en donde Y está ausente o -CH_2-. R^3 se selecciona a partir del grupo que consiste en -OH, -O-C(O)-alquilo, -O-arilo, -NR^aR^b, -alquilen-NR^aR^b, -X-arilen-Y-NR^aR^b, -X-heteroarilen-Y-NR^aR^b, y heterocicloalquilo que contiene N; en donde X está ausente, -N-, -CH_2-, u -O-; en donde Y está ausente o -CH_2-. R^5 se selecciona, independientemente en cada caso, a partir de un sustituyente en el grupo que consiste en –OH, halo, y alquilo; n es un entero desde 0-19; y cada R^5 se posiciona en cualquier átomo de anillo. R^a y R^b se seleccionan, independientemente en cada caso, a partir del grupo que consiste en –H y alquilo; o R^a y R^b se ciclizan para formar cicloheteroalquilo con tres a seis átomos de anillo, incluyendo un heteroátomo, que es el N al cual se unen. R^a y R^b están, independientemente en cada caso, opcionalmente sustituidas con al menos un sustituyente seleccionado a partir del grupo que consiste en -OH, -PO_4H, NH_2, -C(O)OH, y -C(O)CH_3.

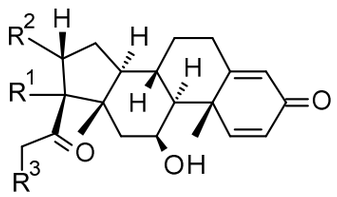
[223] En ciertas modalidades, se proporcionan aquí compuestos de acuerdo con la Fórmula 1000, en donde R^3 se selecciona a partir del grupo que consiste en -alquilen-NR^aR^b, -X-arilen-Y-NR^aR^b, -X-heteroarilen-Y-NR^aR^b, y heterocicloalquilo que contiene N; en donde X está ausente, -N-, -CH_2-, u -O-; en donde Y está ausente o -CH_2-; y R^4 se selecciona a partir del grupo que consiste en alquilo, arilo, alquilarilo, arilalquilo, heteroarilo, -alquilen-NR^aR^b, -X-arilen-Y-NR^aR^b, -X-heteroarilen-Y-NR^aR^b, y heterocicloalquilo que contiene N; en donde X está ausente, -N-, -CH_2-, u -O-; en donde Y está ausente o -CH_2-.

[224] En ciertas modalidades, se proporcionan aquí compuestos de acuerdo con la Fórmula 1000, en donde R^3 se selecciona a partir del grupo que consiste en -OH, -O-C(O)-alquilo, -O-arilo, -NR^aR^b, -alquilen-NR^aR^b, -X-arilen-Y-NR^aR^b, -X-heteroarilen-Y-NR^aR^b, y heterocicloalquilo que contiene N; en donde X está ausente, -N-, -CH_2-, u -O-; en donde Y está ausente o -CH_2-; y R^4 se selecciona a partir del grupo que consiste en -alquilen-NR^aR^b, -X-arilen-Y-NR^aR^b, -X-heteroarilen-Y-NR^aR^b, y heterocicloalquilo que contiene N; en donde X está ausente, -N-, -CH_2-, u -O-; en donde Y está ausente o -CH_2-.

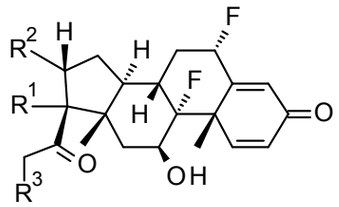
[225] En ciertas modalidades, se proporcionan aquí compuestos de acuerdo con la

Fórmula 1000, en donde R^3 es -NR^aR^b; y R^4 es alquilo. En ciertas modalidades, R^3 es –NH_2. En ciertas modalidades, R^4 es n-propilo. En ciertas modalidades, R^3 es –NH_2 y R^4 es n-propilo.

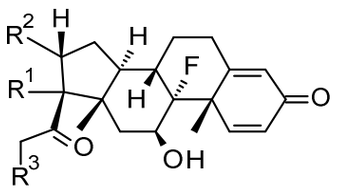
[226] En ciertas modalidades, el compuesto de Fórmula 1000 es de acuerdo con la Fórmula 1010, 1020, 1030, o 1040:



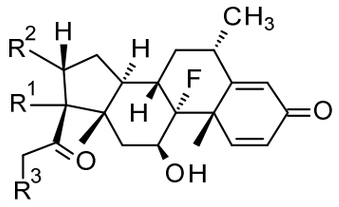
1010



1020



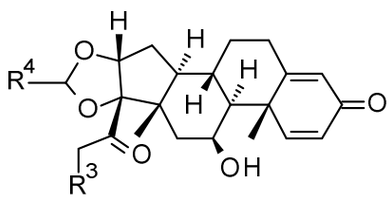
1030



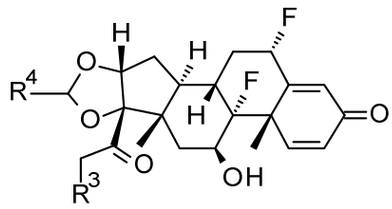
1040

o una sal, solvato, o estereoisómero farmacéuticamente aceptable de la misma.

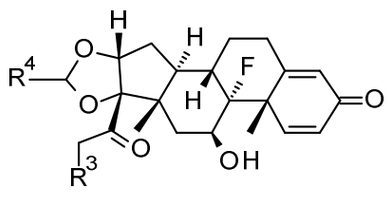
[227] En ciertas modalidades, el compuesto de Fórmula **1000** es de acuerdo con la Fórmula 1110, 1120, 1130, o 1140:



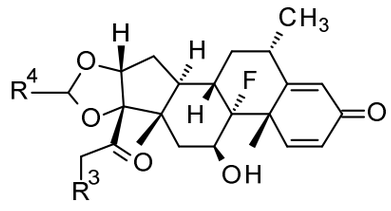
1110



1120



1130



1140

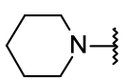
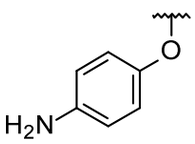
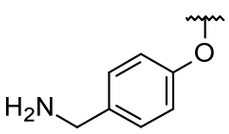
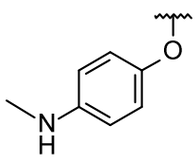
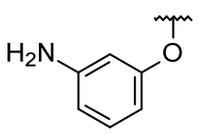
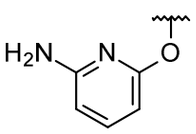
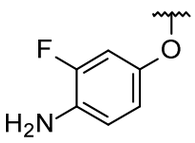
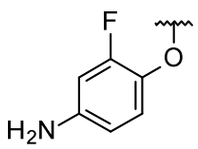
o una sal, solvato, o estereoisómero farmacéuticamente aceptable de la misma.

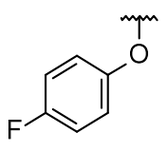
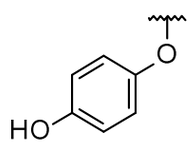
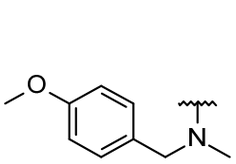
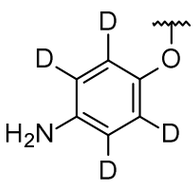
[228] En ciertas modalidades de acuerdo con cualquiera de las Fórmulas 1000-1140, R^3 es -OH o -O-C(O)-alquilo; y R^4 es -alquilen-NR^aR^b, -X-arilen-NR^aR^b, -X-heteroarilen-NR^aR^b, o heterocicloalquilo que contiene N; en donde X está ausente o -CH_2-. En ciertas modalidades, R^4 es -alquilen-NH_2, -C_6H_5-NH_2 o -CH_2-C_6H_5-NH_2.

[229] En ciertas modalidades de acuerdo con cualquiera de las Fórmulas 1000-1140,

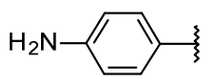
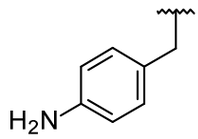
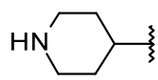
R^3 es -O-arilo, -NR^aR^b, -alquilen-NR^aR^b, -X-arilen-Y-NR^aR^b, -X-heteroarilen-Y-NR^aR^b, o heterocicloalquilo que contiene N; en donde X está ausente, -N-, -CH_2-, u -O-; en donde Y está ausente o -CH_2-; y R^4 es alquilo, arilo, alquilarilo, o arilalquilo. En ciertas modalidades, R^3 es -O-arilen-NR^aR^b, -O-heteroarilen-NR^aR^b; en donde arilo o heteroarilo opcionalmente está sustituido con halógeno, deuterio, hidroxilo, o metoxilo. En ciertas modalidades, R^3 es -O-fenil-NR^aR^b, -O-heteroarilen-NR^aR^b; en donde fenilo o heteroarilo opcionalmente está sustituido con halógeno o deuterio. En ciertas modalidades de acuerdo con este párrafo, R^4 es n-propilo.

[230] En ciertas modalidades, se proporcionan aquí compuestos de acuerdo con cualquiera de las Fórmulas 1000-1140, en donde R^3 es -NR^aR^b; y R^4 es alquilo. En ciertas modalidades, R^3 es –NH_2. En ciertas modalidades, R^4 es n-propilo. En ciertas modalidades, R^3 es –NH_2 y R^4 es n-propilo.

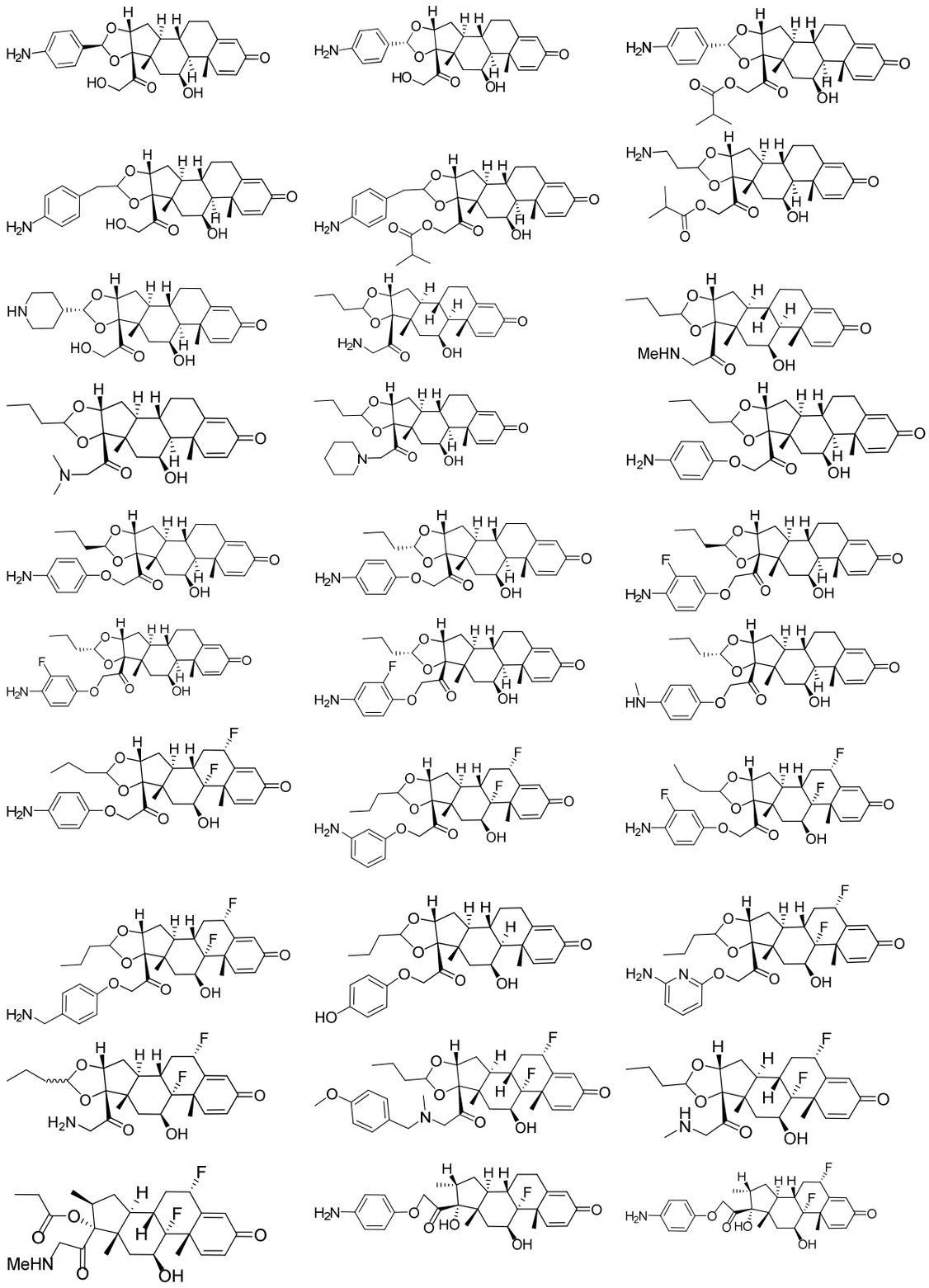
[231] En cualquiera de las Fórmulas 1000-1140, R^3 puede ser cualquier R^3 específica proporcionada anteriormente. En modalidades particulares, R^3 es -NH_2, -N(H)CH_3, -N$(CH_3)_2$, o  . En modalidades particulares, R^3 es  ,  ,  ,  ,  ,  ,  .

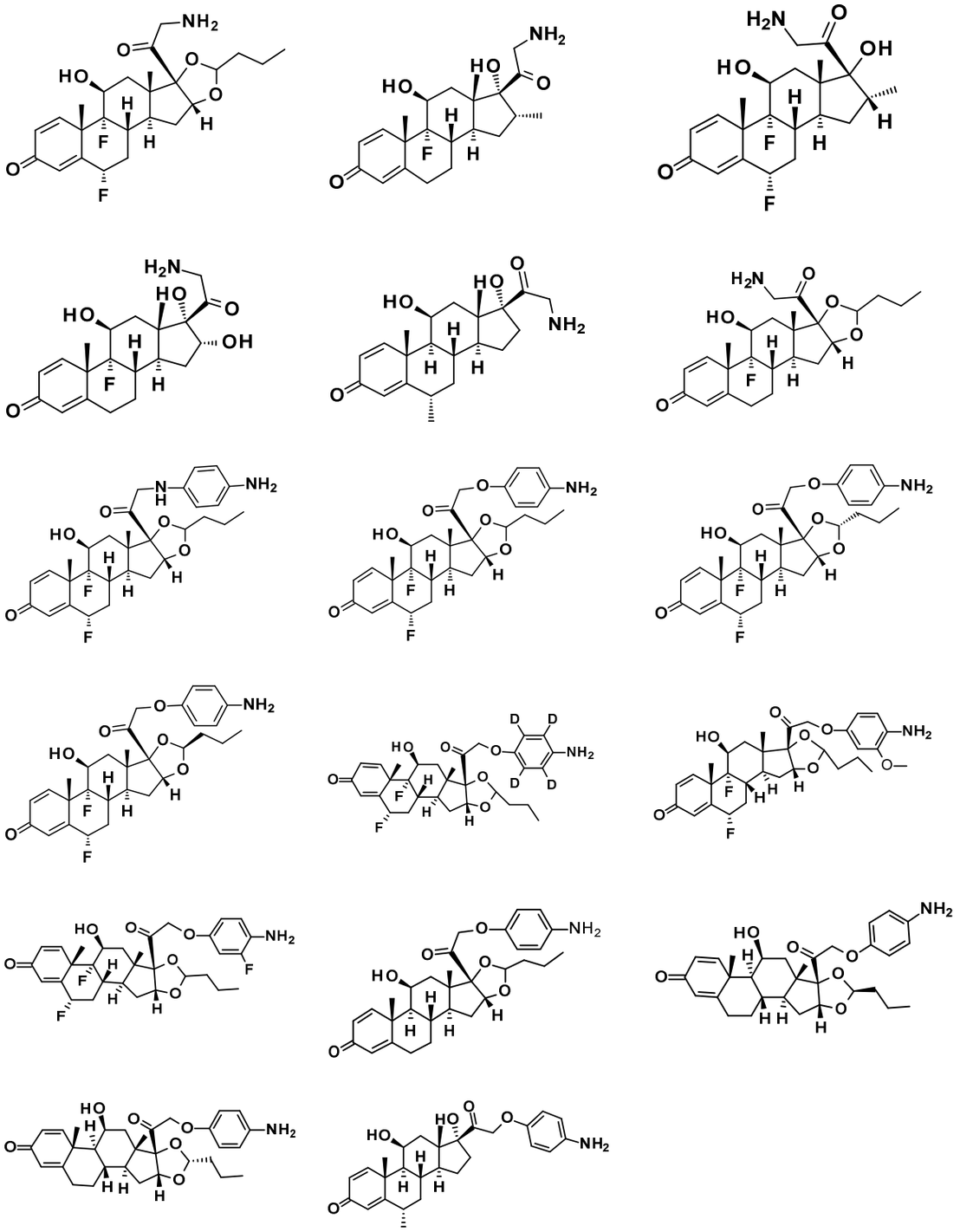
En modalidades particulares, R^3 es  ,  , o  . En modalidades particulares, R^3 es  .

[232] En cualquiera de las Fórmulas 1000-1140, R^4 puede ser cualquier R^4 específica proporcionada anteriormente. En modalidades particulares, R^4 se selecciona a

partir de -CH_2-CH_2-NH_2,  ,  , y  . En modalidades particulares, R^4 es n-propilo.

[233] También se establecen aquí compuestos que tienen las siguientes estructuras:





o una sal, solvato, o estereoisómero farmacéuticamente aceptable de las mismas.

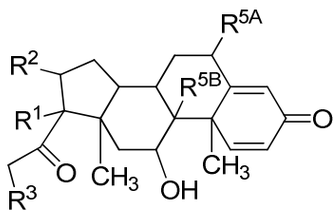
[234] Se incluyen dentro del alcance de esta divulgación sales, solvatos, formas cristalinas, formas amorfas, formas polimórficas, regioisómeros, estereoisómeros, profármacos, por ejemplo, fosfatasa-profármacos, glucosa-profármacos, profármacos de éster, etcétera, metabolitos, y aductos fisiológicos farmacéuticamente aceptables de las cargas útiles de esteroides aquí descritas, incluyendo aquellos de Fórmula (**I**), (**I^{I}**) y (**A^{1}**)-(**A^{7}**).

C. CONJUGADOS DE ESTEROIDE DE PROTEÍNA

[235] Se proporcionan aquí conjugados de proteína de los esteroides aquí descritos.

Tales conjugados incluyen proteínas, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que se unen covalentemente, por ejemplo, a través de los enlazadores de agente de unión aquí descritos, a los compuestos descritos en la Sección B anterior, por ejemplo, los compuestos de Fórmula (**A**), (**A^1**), (**A^2**), (**A^3**), (**A^4**), (**A^5**), (**A^6**), (**A^7**), (**I**), (**I^1**), (**PIa**), (**PIb–1**), (**PIb–2**), **PIc–1**), (**PIc–2**), (**PId–1**), (**PId–2**), (**PIe–1**), (**PIe–2**), (**PII**), (**PIIa**), (**PIIb**), (**PIII**), (**PIIIa**), (**PIIIb**), (**PIV**), (**PV**), (**PVa**), (**PVb**), (**PVI**), (**PVII**), (**PVIIa**), (**PVIIb**), (**PVIIb–1**), (**PVIIb–2**), (**PVIII**), y (**1000**)-(**1140**).

[236] El enlazador de agente de unión se puede unir a un esteroide aquí descrito en cualquier radical o posición adecuada del esteroide, incluyendo, por ejemplo, a través de una amida, éter, éster, carbamato, o amina. Por ejemplo, el enlazador de agente de unión puede unirse a los compuestos a través de R^1, R^3, o R^4 o grupo hidroxilo representado Fórmula (**A^1**):



(**A^1**).

En ciertas modalidades, los esteroides aquí descritos se unen al enlazador de agente de unión reaccionando un grupo amino o hidroxilo del esteroide con un grupo reactivo adecuado presente en el enlazador. En algunas modalidades, el enlazador de agente de unión también incluye un radical ciclodextrina. Por ejemplo, el radical ciclodextrina puede unirse a la estructura química principal del enlazador de agente de unión.

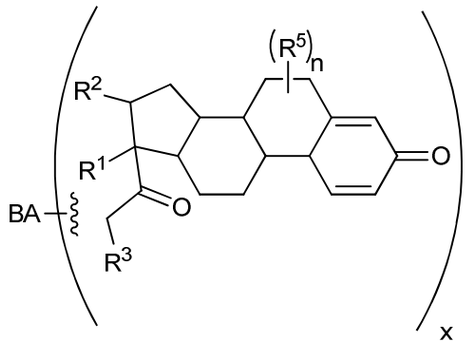
[237] En ciertas modalidades, se proporcionan aquí compuestos que tienen la estructura:

BA-(L-PAY)$_x$

en donde BA es un agente de unión según se describe aquí; L es un enlazador opcional según se describe aquí; PAY es un compuesto de esteroide según se describe aquí; y x es un entero desde 1-30. En modalidades particulares, cada PAY es un radical obtenible mediante la remoción de un átomo, por ejemplo un átomo de hidrógeno a partir de un compuesto de acuerdo con una Fórmula seleccionada a partir del grupo que consiste en las Fórmulas (**A**), (**A^1**), (**A^2**), (**A^3**), (**A^4**), (**A^5**), (**A^6**), (**A^7**), (**I**), (**I1**), (**PIa**), (**PIb–1**), (**PIb–2**), **PIc–1**), (**PIc–2**), (**PId–1**), (**PId–2**), (**PIe–1**), (**PIe–2**), (**PII**), (**PIIa**), (**PIIb**), (**PIII**), (**PIIIa**), (**PIIIb**), (**PIV**),

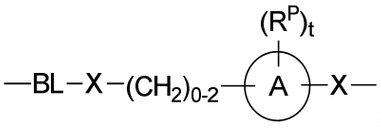
(**PV**), (**PVa**), (**PVb**), (**PVI**), (**PVII**), (**PVIIa**), (**PVIIb**), (**PVIIb–1**), (**PVIIb–2**), (**PVIII**), y (**1000**)-(**1140**). Ejemplos de tales compuestos se describen en detalle a continuación.

[238] En ciertas modalidades, se proporcionan aquí compuestos que tienen la estructura de la Fórmula (**III**):

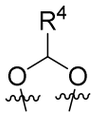


(**III**);

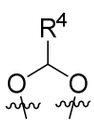
en donde ya sea (a) o (b):

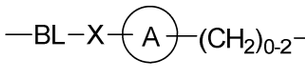
(a) R^3 es –BL–, –BL–X–, o 

;

R^1 y R^2 son cada una, independientemente, –H, alquilo, alquil–C(O)–O–, –OH, o halo; o R^1 y R^2 conjuntamente forman 

, en donde R^4 es alquilo, arilo, arilalquilo, o un heterocicloalquilo que contiene N; en donde el alquilo, arilo, arilalquilo, y heterocicloalquilo que contiene N están opcionalmente sustituidos con $–NR^aR^b$; o

(b) R^3 es –OH, alquil–C(O)–O–, heteroalquilo, $–NR^aR^b$ o ariloxi, en donde el alquil–C(O)–O–, heteroalquilo, o ariloxi opcionalmente está sustituido con –NR^aR^b, -NR^aR^b–ariloxi, o halo, y R^1 y R^2 conjuntamente forman 

, en donde R^4 es –BL–, 

,

, o –BL–Y, en donde Y es un heterociclo divalente que contiene N;

–BL– es un enlazador de agente de unión divalente;

R^5 es, independientemente en cada caso, –OH, halo, alquilo, o arilalquilo;

R^a y R^b son, independientemente en cada caso, –H o alquilo;

R^P, independientemente en cada caso, es halo;

BA es un agente de unión unido a –BL–;

X, independientemente en cada caso, es NR^a u O;

 es arilo o heteroarilo;

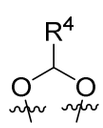
t es un entero desde 0-2;

x es un entero desde 1–30; y

n es un entero desde 0–19.

[239] En algunos ejemplos, el subíndice x es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30. En algunos ejemplos, el subíndice x es 0. En algunos ejemplos, el subíndice x es 1. En algunos ejemplos, el subíndice x es 2. En algunos ejemplos, el subíndice x es 3. En algunos ejemplos, el subíndice x es 4. En algunos ejemplos, el subíndice x es 5. En algunos ejemplos, el subíndice x es 6. En algunos ejemplos, el subíndice x es 7. En algunos ejemplos, el subíndice x es 8. En algunos ejemplos, el subíndice x es 9. En algunos ejemplos, el subíndice x es 10. En algunos ejemplos, el subíndice x es 11. En algunos ejemplos, el subíndice x es 12. En algunos ejemplos, el subíndice x es 13. En algunos ejemplos, el subíndice x es 14. En algunos ejemplos, el subíndice x es 15. En algunos ejemplos, el subíndice x es 16. En algunos ejemplos, el subíndice x es 17. En algunos ejemplos, el subíndice x es 18. En algunos ejemplos, el subíndice x es 19. En algunos ejemplos, el subíndice x es 20. En algunos ejemplos, el subíndice x es 21. En algunos ejemplos, el subíndice x es 22. En algunos ejemplos, el subíndice x es 23. En algunos ejemplos, el subíndice x es 24. En algunos ejemplos, el subíndice x es 25. En algunos ejemplos, el subíndice x es 26. En algunos ejemplos, el subíndice x es 27. En algunos ejemplos, el subíndice x es 28. En algunos ejemplos, el subíndice x es 29. En algunos ejemplos, el subíndice x es 30.

[240] En algunos ejemplos de Fórmula (**III**), R^1 y R^2 son, cada una, independientemente, –H, alquilo, u –OH. En algunos ejemplos de Fórmula (**III**), una de R^1 o R^2 es –H, alquilo, u –OH. En algunos ejemplos de Fórmula (**III**), ambas de R^1 y R^2 son ya sea –H, alquilo, u –OH.

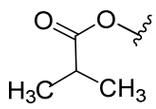
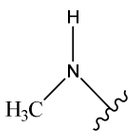
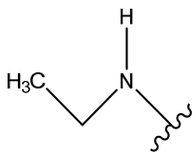
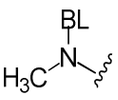
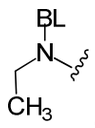
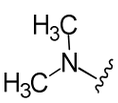
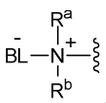
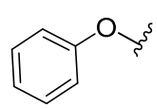
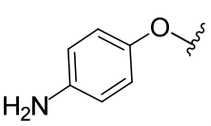
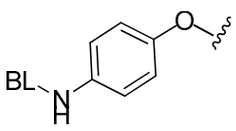
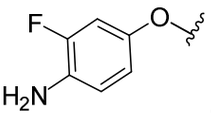
[241] En algunos ejemplos de Fórmula (**III**), R^1 y R^2 conjuntamente forman 

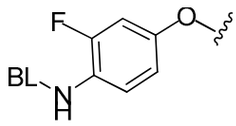
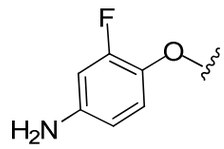
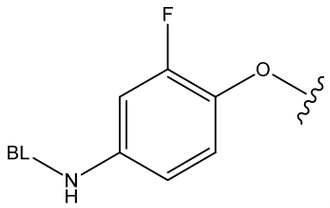
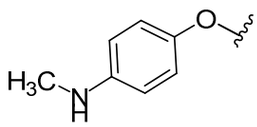
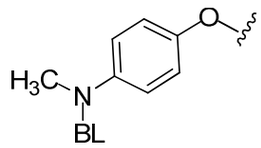
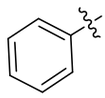
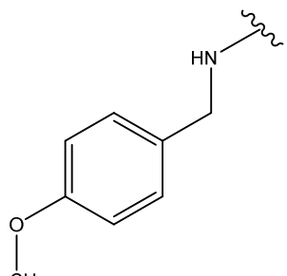
. En algunos ejemplos, R^4 es –RL. En algunos ejemplos, R^4 es RL–NR^a–arilo. En algunos otros ejemplos, R^4 es alquilo. En ciertos ejemplos, R^4 es arilalquilo, En algunos ejemplos, R^4

es arilo. En otros ejemplos, R^4 es heterocicloalquilo que contiene N. En algunos de estos ejemplos, el alquilo, arilo, arilalquilo, o heterocicloalquilo que contiene N opcionalmente está sustituido.

[242] En algunos ejemplos de Fórmula (**III**), R^5 es –H o halo. En algunos ejemplos de Fórmula (**II**), R^5 es –H o fluoro. En algunos ejemplos de Fórmula (**III**), una de R^5 es –H o halo. En algunos ejemplos de Fórmula (**III**), R^5 es –H o halo y n es 2. En algunos ejemplos de Fórmula (**III**), R^5 es –F y n es 1. En algunos ejemplos de Fórmula (**II**), R^5 es –F y n es 2.

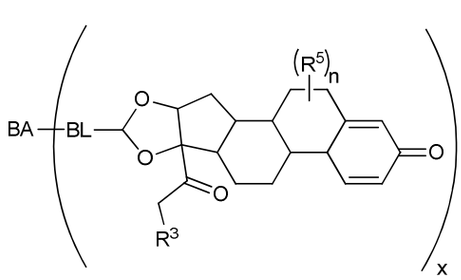
[243] En algunos ejemplos de Fórmula (**III**), R^3 es BL. En algunos ejemplos de Fórmula (**III**), R^3 es RL–NR^a–ariloxi–. En algunos otros ejemplos de Fórmula (**III**), R^3 es –OH. En algunos otros ejemplos de Fórmula (**III**), R^3 es alquil–C(O)–O–. En algunos otros ejemplos de Fórmula (**III**), R^3 es heteroalquilo. En algunos otros ejemplos de Fórmula (**III**), R^3 es –N–R^aR^b. En algunos otros ejemplos de Fórmula (**III**), R^3 es arilo. En algunos otros ejemplos de Fórmula (**III**), R^3 es ariloxi. En algunos otros ejemplos de Fórmula (**III**), alquil–C(O)–O–, heteroalquilo, o ariloxi opcionalmente está sustituido con –NR^aR^b o halo.

En algunos ejemplos de Fórmula (**II**), R^3 es –OH. En algunos ejemplos de Fórmula (**III**), R^3 es alquil–C(O)–O–. En algunos ejemplos R^3 es  En algunos ejemplos de Fórmula (**III**), R^3 es heteroalquilo. En algunos ejemplos R^3 es  o  . En algunos ejemplos de Fórmula (**III**), R^3 es  o  . En algunos ejemplos de Fórmula (**III**), R^3 es –NR^aR^b. En algunos ejemplos, R^3 es -NR^aR^b–ariloxi. En algunos ejemplos, R^3 es  . En algunos ejemplos R^3 es  . En algunos ejemplos, R^3 es  . En algunos ejemplos R^3 es ariloxi. En algunos ejemplos R^3 es  . En algunos ejemplos R^3 es  . En algunos ejemplos, R^3 es  . En algunos ejemplos R^3 es  . En algunos ejemplos,

R^3 es  . En algunos ejemplos R^3 es  . En algunos ejemplos, R^3 es  . En algunos ejemplos R^3 es  . En algunos ejemplos, R^3 es  . En algunos ejemplos R^3 es  . En algunos ejemplos, R^3 es  .

[244] En la Fórmula (**III**), el subíndice n es un entero desde 0–19. En algunos ejemplos, n es 0. En algunos otros ejemplos, n es 1. En ciertos ejemplos, n es 2. En algunos otros ejemplos, n es 3. En ciertos ejemplos, n es 4. En algunos ejemplos, n es 5. En algunos otros ejemplos, n es 6. En ciertos ejemplos, n es 7. En algunos otros ejemplos, n es 8. En ciertos ejemplos, n es 9. En algunos ejemplos, n es 10. En algunos otros ejemplos, n es 11. En ciertos ejemplos, n es 12. En algunos otros ejemplos, n es 13. En ciertos ejemplos, n es 14. En algunos ejemplos, n es 15. En algunos otros ejemplos, n es 16. En ciertos ejemplos, n es 17. En algunos otros ejemplos, n es 18. En ciertos ejemplos, n es 19.

[245] En algunos ejemplos, se establece aquí un compuesto que tiene la estructura de la Fórmula (**IIIa**):



(**IIIa**);

en donde:

BA es un agente de unión;

R^5 es, independientemente en cada caso, –OH, halo, o alquilo;

R^3 se selecciona a partir de –OH, alquil–C(O)–O–, heteroalquilo, $–NR^aR^b$, $-NR^aR^b$–ariloxi, o ariloxi, en donde el alquil–C(O)–O–, heteroalquilo, o ariloxi opcionalmente está sustituido con $–NR^aR^b$ o halo;

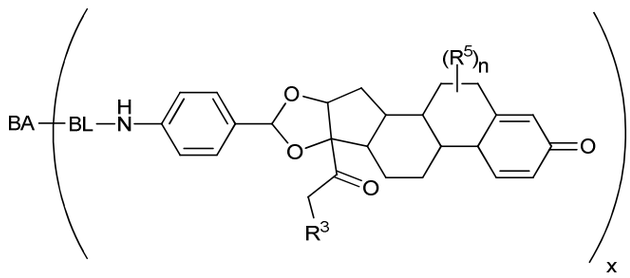
BL es un enlazador de agente de unión;

R^a y R^b se seleccionan, independientemente en cada caso, a partir de H, alquilo, y alquil–C(O);

n es un entero desde 0 hasta 19; y

x es un entero desde 1 hasta 30.

[246] En algunos ejemplos, se establece aquí un compuesto que tiene la estructura de la Fórmula (**IIIa2**):



(**IIIa2**);

en donde:

BA es un agente de unión;

R^5 es, independientemente en cada caso, –OH, halo, o alquilo;

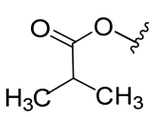
R^3 es –OH, alquil–C(O)–O–, heteroalquilo, $–NR^aR^b$, $-NR^aR^b$–ariloxi, o ariloxi, en donde el alquil–C(O)–O–, heteroalquilo, o ariloxi opcionalmente está sustituido con $–NR^aR^b$ o halo;

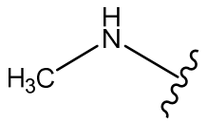
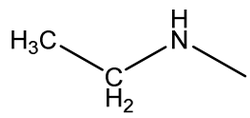
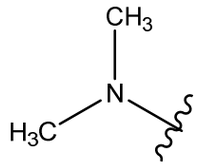
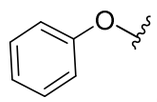
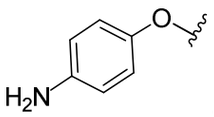
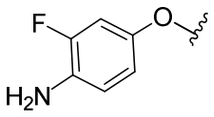
BL es un enlazador de agente de unión;

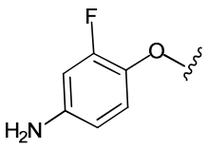
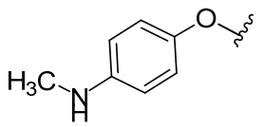
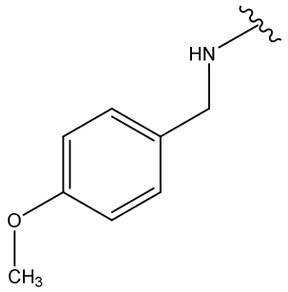
R^a y R^b se seleccionan, independientemente en cada caso, a partir de H, alquilo, o alquil–C(O);

n es un entero desde 0 hasta 19; y

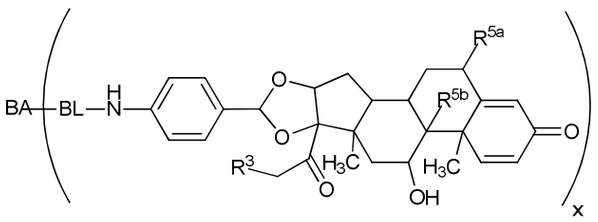
x es un entero desde 0 hasta 30.

En algunos ejemplos de Fórmula (**IIIa2**), R^3 es –OH. En algunos ejemplos de Fórmula (**IIIa2**), R^3 es alquil–C(O)–O–. En algunos ejemplos R^3 es  En algunos

ejemplos de Fórmula (**IIIa2**), R^3 es heteroalquilo. En algunos ejemplos R^3 es  o  . En algunos ejemplos de Fórmula (**IIIa2**), R^3 es –NR^aR^b. En algunos ejemplos R^3 es  . En algunos ejemplos R^3 es ariloxi. En algunos ejemplos R^3 es  . En algunos ejemplos R^3 es  . En algunos ejemplos R^3 es  .

En algunos ejemplos R^3 es  . En algunos ejemplos R^3 es  . En algunos ejemplos, R^3 es  .

[247] En algunos ejemplos, el compuesto de Fórmula (**IIIa2**) tiene la siguiente estructura:



en donde:

BA es un agente de unión;

R^3 es –OH o alquil–C(O)–O–;

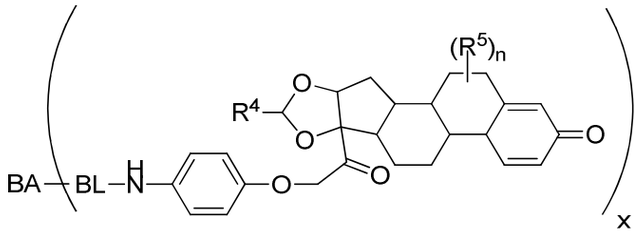
R^{5a} y R^{5b} son cada una, independientemente, –F o H;

BL es un enlazador de agente de unión; y

x es un entero desde 1 hasta 30.

[248] En algunos ejemplos, se establece aquí un compuesto que tiene la estructura

de la Fórmula (**IIIb**):



(**IIIb**);

en donde

BA es un agente de unión;

R^5 es, independientemente en cada caso, –OH, halo, o alquilo;

R^4 se selecciona a partir de alquilo, arilo, arilalquilo, o un heterocicloalquilo que contiene N, en donde el alquilo, arilo, arilalquilo, o heterocicloalquilo que contiene N están opcionalmente sustituidos con $–NR^aR^b$;

RL es un enlazador de agente de unión;

R^a y R^b se seleccionan, independientemente en cada caso, a partir de H, alquilo, y alquil–C(O);

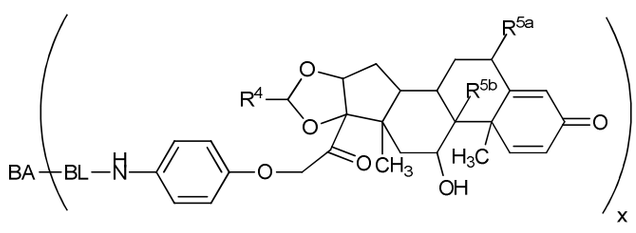
n es un entero desde 0 hasta 19; y

x es un entero desde 0 hasta 30.

[249] En algunos ejemplos de Fórmula (**IIIb**), R^5 es –H o halo. En algunos ejemplos de Fórmula (**IIIb**), R^5 es fluoro. En algunos ejemplos de Fórmula (**IIIb**), n es al menos 2, y dos de R^5 es halo. En algunos ejemplos de Fórmula (**IIIb**), R^5 es –F y n es 1. En algunos ejemplos de Fórmula (**IIIb**), R^5 es –F.

[250] En algunos ejemplos de Fórmula (**IIIb**), R^4 es alquilo. En algunos ejemplos de Fórmula (**IIb**), R^4 es metilo, etilo, *n*–propilo, *i*–propilo, *n*–butilo, *s*–butilo, *t*–butilo, *i*–butilo, un radical pentilo, un radical hexilo, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, o ciclohexilo. En algunos ejemplos de Fórmula (**IIIb**), R^4 es *n*–propilo.

[251] En algunos ejemplos, el compuesto de Fórmula (**IIIb**) tiene la siguiente estructura:



en donde:

BA es un agente de unión;

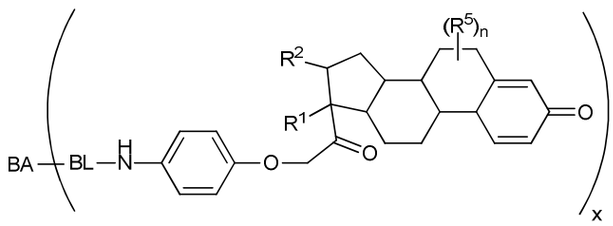
R^4 es alquilo;

R^{5a} y R^{5b} son cada una, independientemente, –F o H;

BL es un enlazador de agente de unión; y

x es un entero desde 1 hasta 30.

[252] En algunos ejemplos, se establece aquí un compuesto que tiene la estructura de la Fórmula (**IIIc**):



(**IIIc**);

en donde

BA es un agente de unión;

R^1 y R^2 son, independientemente, –H, alquilo, alquil–C(O)–O–, –OH, o halo;

R^5 se selecciona, independientemente en cada caso, a partir de –OH, halo, o alquilo;

BL es un enlazador de agente de unión;

n es un entero desde 0 hasta 19; y

x es un entero desde 1 hasta 30.

[253] En algunos ejemplos de Fórmula (**IIIc**), R^5 es halo. En algunos ejemplos de Fórmula (**IIIc**), R^5 es fluoro. En algunos ejemplos de Fórmula (**IIIc**), una de R^5 es halo. En algunos ejemplos de Fórmula (**IIIc**), dos de R^5 es halo. En algunos ejemplos de Fórmula (**IIIc**), R^5 es –F y n es 2.

[254] En algunos ejemplos de Fórmula (**IIIc**), R^1 es CH_3.

[255] En otros ejemplos de Fórmula (**IIIc**), R^1 es OH.

[256] En algunos otros ejemplos de Fórmula (**IIIc**), R^1 es H.

[257] En algunos ejemplos de Fórmula (**IIIc**), R^2 es CH_3.

[258] En otros ejemplos de Fórmula (**IIIc**), R^2 es OH.

[259] En algunos otros ejemplos de Fórmula (**IIIc**), R^2 es H.

[260] En algunos ejemplos de Fórmula (**IIIc**), R^1 es CH_3 y R^2 es CH_3.

[261] En otros ejemplos de Fórmula (**IIIc**), R^1 es CH_3 y R^2 es OH.

[262] En algunos ejemplos de Fórmula (**IIIc**), R^1 es CH_3 y R^2 es H.

[263] En algunos otros ejemplos de Fórmula (**IIIc**), R^1 es OH y R^2 es CH_3.

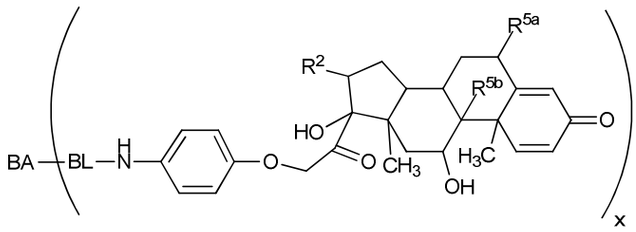
[264] En otros ejemplos de Fórmula (**IIIc**), R^1 es OH y R^2 es OH.

[265] En algunos ejemplos de Fórmula (**IIIc**), R^1 es H y R^2 es H.

[266] En algunos otros ejemplos de Fórmula (**IIIc**), R^1 es H y R^2 es OH.

[267] En otros ejemplos de Fórmula (**IIIc**), R^1 es H y R^2 es H.

[268] En algunas modalidades, el compuesto de Fórmula (**IIIc**) tiene la siguiente estructura:



(**IIIc**)

en donde:

BA es un agente de unión;

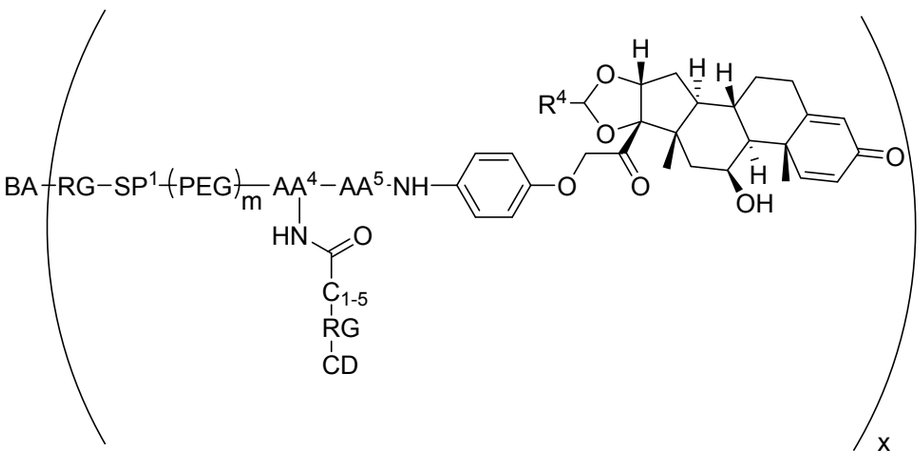
R^2 es metilo;

R^{5a} y R^{5b} son cada una, independientemente, –F o H;

BL es un enlazador de agente de unión; y

x es un entero desde 0 hasta 30.

[269] En algunas modalidades, el compuesto de Fórmula (**IIIc**) tiene la siguiente estructura:



;

BA es un agente de unión;

RG es un residuo de grupo reactivo;

CD es una ciclodextrina;

SP^1 es un grupo espaciador;

AA^4 es un residuo de aminoácido;

AA^5 es un residuo de dipéptido;

PEG es polietilenglicol;

m es un entero desde 0 hasta 4;

x es un entero desde 0 hasta 30;

R^4 es alquilo, arilo, arilalquilo, o un heterocicloalquilo que contiene N; en donde el alquilo, arilo, arilalquilo, y heterocicloalquilo que contiene N están opcionalmente sustituidos con $–NR^aR^b$;

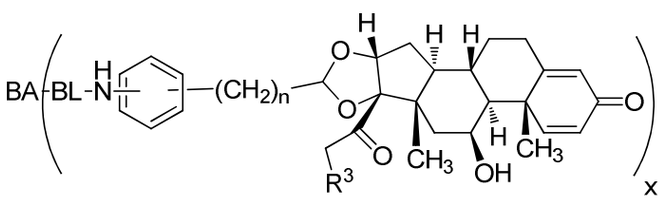
R^a y R^b son, independientemente en cada caso, –H o alquilo;

BA es un agente de unión unido a –BL–;

SP^1 y **SP^2** son cada uno, independientemente en cada caso, ausente o un residuo de grupo espaciador, y en donde **SP^1** comprende un enlazador trivalente; **AA^4** es un enlazador trivalente que comprende un residuo de aminoácido; **AA^5** es un residuo de di-péptido; **PEG** es un residuo de polietilenglicol; en donde el  indica el átomo a través del cual el grupo químico indicado se une a los grupos adyacentes en la fórmula, **CD** es, independientemente en cada caso, ausente o un residuo de ciclodextrina, en donde al menos una **CD** está presente, el subíndice **m** es un entero desde 0 hasta 5; En estos ejemplos, el subíndice **m** es 0, 1, 2, 3, 4, o 5. En algunos ejemplos, el subíndice **m** es 0. En algunos ejemplos, el subíndice **m** es 1. En algunos ejemplos, el subíndice **m** es 2. En algunos ejemplos, el subíndice **m** es 3. En algunos ejemplos, el subíndice **m** es 4. En algunos ejemplos, el subíndice **m** es 5. En algunos ejemplos, cualquiera de **AA^4** o **AA^5** comprende, independientemente en cada caso, un aminoácido seleccionado a partir de alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina, triptófano, fenilalanina, prolina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina, glutamina, ácido aspártico, ácido glutámico, lisina, arginina, histidina, o citrulina, un derivado de los mismos, o una combinación de los mismos. En ciertas modalidades, **AA^4** es un aminoácido seleccionado a partir de alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina, triptófano, fenilalanina, prolina, glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina, glutamina, ácido aspártico, ácido glutámico, lisina, arginina, histidina, o citrulina, un derivado de los mismos, o una combinación de los mismos. En ciertas modalidades, **AA^4** es lisina. En ciertas modalidades, **AA^4** es lisina o un derivado de lisina. En ciertas modalidades, el **AA^5** es valina-citrulina. En algunas modalidades, el **AA^5** es citrulina-valina. En algunas modalidades, el **AA^5** es valina-alanina. En algunas modalidades, el **AA^5** es alanina-valina. En algunas modalidades, el **AA^5** es valina-glicina. En algunas modalidades, el **AA^5** es glicina-valina. En algunas modalidades, el **AA^5** glutamato-valina-

citrulina. En algunas modalidades, el **AA^5** es glutamina-valina-citrulina. En algunas modalidades, el **AA^5** es lisina-valina-alanina. En algunas modalidades, el **AA^5** es lisina-valina-citrulina. En algunas modalidades, el **AA^5** es glutamato-valina-citrulina. En algunos ejemplos, **SP^1** se selecciona independientemente en cada caso a partir del grupo que consiste en alquileno de C_{1-6}, -NH-, -C(O)-, $(-CH_2-CH_2-O)_e$, -NH-CH_2-CH_2-$(-O-CH_2-CH_2)_e$-C(O)-, -C(O)-$(CH_2)_u$-C(O)-, -C(O)-NH-$(CH_2)_v$-, y combinaciones de los mismos, en donde el subíndice **e** es un entero desde 0 hasta 4, el subíndice **u** es un entero desde 1 hasta 8, y el subíndice **v** es un entero desde 1 hasta 8. En algunos ejemplos, **SP^2** se selecciona independientemente en cada caso a partir del grupo que consiste en alquileno de C_{1-6}, -NH-, -C(O)-, $(-CH_2-CH_2-O)_e$, -NH-CH_2-CH_2-$(-O-CH_2-CH_2)_e$-C(O)-, -C(O)-$(CH_2)_u$-C(O)-, -C(O)-NH-$(CH_2)_v$-, y combinaciones de los mismos, en donde el subíndice **e** es un entero desde 0 hasta 4, el subíndice **u** es un entero desde 1 hasta 8, y el subíndice **v** es un entero desde 1 hasta 8.

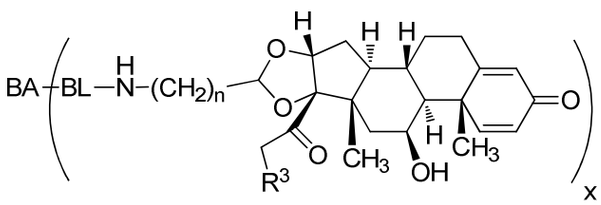
[270] También se establecen compuestos de Fórmula (**B^2**):



(**B^2**)

en donde n es un entero desde 0 hasta 4, R^3 es –OH o R^Z-C(O)-O–; en donde R^Z es alquilo, BL es un enlazador de agente de unión, BA es un agente de unión, y x es un entero desde 1 hasta 30. En ciertas modalidades, n es 0 o 1 y x es un entero desde 1-6. En ciertas modalidades, x es 4.

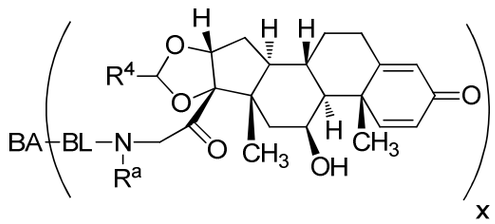
[271] También se establecen compuestos de Fórmula (**B^3**):



(**B^3**)

en donde n es un entero desde 1-4, R^3 es –OH o R^Z-C(O)-O–; en donde R^Z es alquilo, BL es un enlazador de agente de unión, BA es un agente de unión, y x es un entero desde 1-30. En ciertas modalidades, n es 2 y x es un entero desde 1-6. En ciertas modalidades, x es 4.

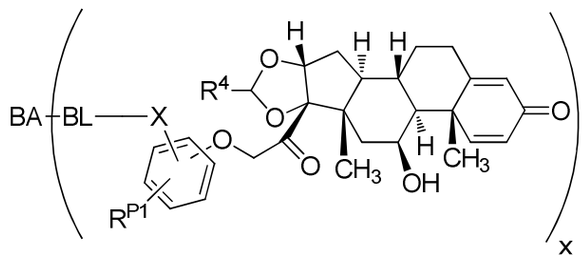
[272] También se establecen compuestos de Fórmula (**B^4**):



(**B^4**)

en donde R^4 es alquilo, en donde R^a es un átomo de hidrógeno o alquilo, BL es un enlazador de agente de unión, y BA es un agente de unión. En ciertas modalidades, R^4 es alquilo de C_{1-4}. En algunas modalidades, R^4 es propilo. En ciertas modalidades, R^3 es $–NH_2$, $–NHCH_3$, o $–N(CH_3)_2$. En ciertas modalidades, x es un entero desde 1-6. En ciertas modalidades, x es 4.

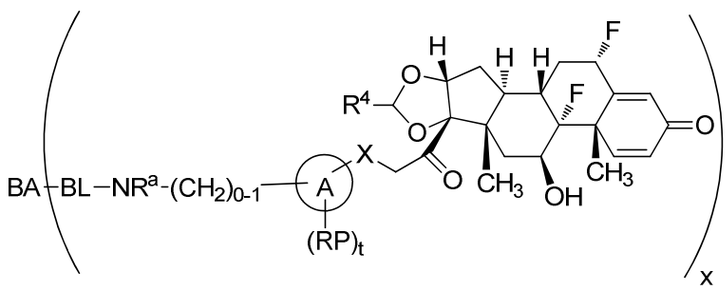
[273] También se establecen compuestos de Fórmula (**B^5**):



(**B^5**)

en donde R^4 es alquilo, R^{P1} es halo o un átomo de hidrógeno, y X es NR^a u O, en donde R^a es un átomo de hidrógeno o alquilo, BL es un enlazador de agente de unión, BA es un agente de unión, y x es un entero desde 1-30. En algunas modalidades, R^4 es alquilo de C_{1-4}, X es NH, y x es un entero desde 1-6. En ciertas modalidades, x es 4.

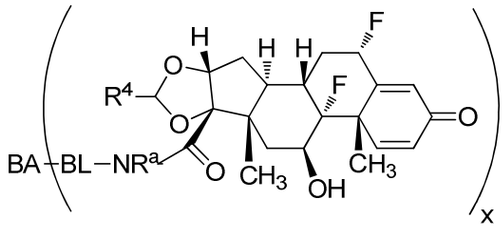
[274] También se establecen compuestos de Fórmula (**B^{6A}**):



(**B^{6A}**)

en donde X es O o NR^a, (A) es arilo o heteroarilo, R^P es halo, t es un entero desde 0-2, R^a es un átomo de hidrógeno o alquilo, BL es un enlazador de agente de unión, BA es un agente de unión, y x es un entero desde 1-30, y R^4 es alquilo. En algunas modalidades X es O, R^4 es alquilo, y x es un entero desde 1-6. En ciertas modalidades, x es 4.

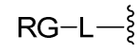
[275] También se establecen aquí compuestos de Fórmula (**B**^{6B})

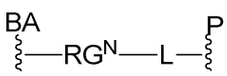


(**B**^{6B})

en donde Ra es un átomo de hidrógeno o alquilo, BL es un enlazador de agente de unión, BA es un agente de unión, y x es un entero desde 1-30. En algunas modalidades, x es un entero desde 1-6. En algunas modalidades, x es 4.

[276] Como se utiliza aquí, la frase “enlazador de agente de unión” o “BL” se refiere a cualquier radical o grupo divalente que enlaza, conecta, o une un agente de unión (por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo) con un compuesto de carga útil aquí establecido (por ejemplo, esteroide). Generalmente, los enlazadores de agente de unión adecuados para los conjugados de anticuerpos aquí descritos son aquellos que son suficientemente estables para explotar la vida media circulante del anticuerpo y, al mismo tiempo, capaces de liberar su carga útil después de la internalización -mediada por antígeno- del conjugado. Los enlazadores pueden ser escindibles o no escindibles. Los enlazadores escindibles son enlazadores que se escinden por metabolismo intracelular después de la internalización, por ejemplo, escisión por medio de hidrólisis, reducción, o reacción enzimática. Los enlazadores no escindibles son enlazadores que liberan una carga útil adjunta a través de la degradación lisosomal del anticuerpo después de la internalización. Los enlazadores adecuados incluyen, pero no se limitan a, enlazadores lábiles al ácido, enlazadores lábiles a la hidrólisis, enlazadores enzimáticamente escindibles, enlazadores lábiles a la reducción, enlazadores autoinmolativos, y enlazadores no escindibles. Los enlazadores adecuados también incluyen, pero no se limitan a, aquellos que son o comprenden glucurónidos, succinimida-tioéteres, unidades de polietilenglicol (PEG), carbamatos, hidrazonas, unidades de mal–caproilo, unidades de disulfuro (por ejemplo, –S-S–, –S-S- C(R^1)(R^2)–, en donde R^1 y R^2 son independientemente hidrógeno o hidrocarbilo), unidades de para-amino-bencilo (PAB), unidades de fosfato, por ejemplo, unidades de mono-, bis-, y tris- fosfato, péptidos, por ejemplo, unidades de péptido que contienen dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, o más unidades de aminoácido, incluyendo pero no limitado a unidades de valina–citrulina, unidades de valina–alanina, unidades de valina–arginina, unidades de valina–lisina, unidades de -lisina-valina–citrulina,

y unidades de -lisina-valina–alanina. En algunas modalidades, el grupo de enlazador de agente de unión de los conjugados aquí descritos se derivan a partir de la reacción de un grupo de “enlazador reactivo” de un enlazador–carga útil aquí descrito con una porción reactiva de un anticuerpo. El grupo de enlazador reactivo (RL) se refiere a un grupo monovalente que comprende un grupo reactivo y un grupo de enlace, representado como  , en donde RG es el grupo reactivo, L es el grupo de enlace, y la línea serpenteante representa un enlace a una carga útil. El grupo de enlace es cualquier radical divalente que una el grupo reactivo a la carga útil. El grupo de enlace también puede ser cualquier radical trivalente que una el grupo reactivo, la carga útil y un radical ciclodextrina. En algunos ejemplos, el grupo de enlace es trivalente e incluye un radical ciclodextrina unido a un grupo trivalente (por ejemplo, un residuo de lisina) en el grupo de enlace. Los enlazadores reactivos (RL), conjuntamente con las cargas útiles a las cuales se unen, comprenden intermedios (“enlazador-cargas útiles”) útiles como precursores sintéticos para la preparación de los conjugados de esteroides de anticuerpos aquí descritos. El enlazador reactivo contiene un grupo reactivo (RG), que es un grupo funcional o radical que reacciona con una porción reactiva de un anticuerpo, anticuerpo modificado, o fragmento de unión a antígeno del mismo. El radical que resulta de la reacción del grupo reactivo (RG) con el anticuerpo, anticuerpo modificado, o fragmento de unión a antígeno del mismo, conjuntamente con el grupo de enlace (L), comprenden la porción de “enlazador de agente de unión” (BL) del conjugado, aquí descrita. De esta manera en algunas modalidades, BL es tiene la siguiente estructura:

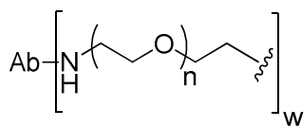


en donde  es el enlace al agente de unión, RG^N es el radical que resulta de la reacción de un grupo reactivo de un enlazador–carga útil con una porción reactiva de un agente de unión, L es un grupo de enlace, y  es un enlace a una carga útil.

[277] En ciertas modalidades, RG^N se deriva a partir de la reacción de RG con un residuo de cisteína o lisina de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo. En ciertas modalidades, RG^N se deriva a partir de una reacción de química clic. En algunas modalidades de dicha reacción de química clic, RG^N se deriva a partir de una reacción de cicloadición 1,3 entre un alquino y una azida. Ejemplos no limitantes de tales RG^Ns incluyen

aquellos derivados a partir de alquinos tensionados, por ejemplo, aquellos adecuados para cicloadiciones de alquino-azida promovidas por tensión (SPAAC), cicloalquinos, por ejemplo, ciclooctinos, alquinos benzanulados, y alquinos capaces de experimentar reacciones de cicloadición 1,3 con azidas en ausencia de catalizadores de cobre. Los RG^Ns adecuados también incluyen, pero no se limitan a aquellos derivados a partir de DIBAC, DIBO, BARAC, alquinos sustituidos, por ejemplo, fluorados, aza-cicloalquinos, BCN, y derivados de los mismos. Los conjugados que contienen tales grupos de RG^N pueden derivarse a partir de anticuerpos que han sido funcionalizados con grupos azido. Tales anticuerpos funcionalizados incluyen anticuerpos funcionalizados con grupos azido-polietilenglicol. En ciertas modalidades, tal anticuerpo funcionalizado se deriva haciendo reaccionar un anticuerpo que comprende al menos un residuo de glutamina con un compuesto de acuerdo con la fórmula H_2N-LL-N_3, en donde LL es un grupo de polietilenglicol divalente, en presencia de la enzima transglutaminasa, por ejemplo, transglutaminasa microbiana. Los residuos de glutamina adecuados de un anticuerpo incluyen Q295, o aquellos derivados por inserción o mutación, por ejemplo, mutación N297Q.

[278] En algunas modalidades, el BA de los conjugados aquí descritos es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunas modalidades, los conjugados aquí descritos se derivan a partir de anticuerpos funcionalizados con azido. En ciertas modalidades, el BA de los conjugados aquí descritos es:



en donde Ab es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, n es un entero desde 1 hasta 10, w es el número de radicales de enlazador carga útil, y $\sim$ es un enlace a un solo enlazador de agente de unión (BL), por ejemplo, un enlace a un radical derivado a partir de una reacción de cicloadición 1,3 entre un alquino y una azida. En ciertas modalidades, w es 3. En ciertas modalidades, w es 2 o 4, es decir, el conjugado comprende 2 o 4 radicales enlazador carga útil.

[279] En algunas modalidades, BL es un radical divalente de Fórmula (**BL^A**);

$$–RG^N–(SP^1)_q–(A)_z–(NR^a)_s–(B)_t–(CH_2)_u–(O)_v–(SP^2)_w–$$

(**BL^A**);

en donde RG^N es según se define aquí;

A es un aminoácido o un péptido;

R^a es H o alquilo;

B es arilo, heteroarilo, o heterocicloalquilo, en donde arilo, heteroarilo, o heterocicloalquilo opcionalmente está sustituido con alquilo, –OH, o $–NR^aR^b$;

SP^1 y SP^2 son, independientemente, unos grupos espaciadores; y q, z, s, t, u, v, y w son, independientemente en cada caso, 0 o 1.

[280] En algunas otras modalidades, BL es un radical trivalente de Fórmula (**BL^B**);

$$–RG^N–(SP^1)_q–(A)_z–(NR^a)_s–(B)_t–(CH_2)_u–(O)_v–(SP^2)_w–$$

(**BL^B**);

en donde RG^N es según se define aquí;

A es tripéptido, en donde al menos uno de los aminoácidos en el tripéptido se une directamente o indirectamente a un radical ciclodextrina;

R^a es H o alquilo;

B es arilo, heteroarilo, o heterocicloalquilo, en donde arilo, heteroarilo, o heterocicloalquilo opcionalmente está sustituido con alquilo, –OH, o $–NR^aR^b$;

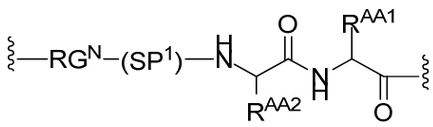
SP^1 y SP^2 son, independientemente, unos grupos espaciadores; y q, z, s, t, u, v, y w son, independientemente en cada caso, 0 o 1.

[281] En algunos ejemplos, la ciclodextrina (CD) se une directamente a un residuo de aminoácido, tal como un residuo de aminoácido lisina. Esto significa que la CD está una posición de enlace lejos del enlazador covalente de aminoácido lisina. En algunos de estos ejemplos, el enlazador covalente también se une directamente a un radical de carga útil. Esto significa que el enlazador covalente está una posición de enlace lejos de una carga útil tal como, pero no limitado a una carga útil de esteroides aquí establecida. En algunos de estos ejemplos, el enlazador covalente también se une directamente a un radical CD. Esto significa que el enlazador covalente está una posición de enlace lejos de una CD, tal como la CD(s) aquí establecida. En algunos de estos ejemplos, el enlazador covalente es un aminoácido lisina o un derivado del mismo.

[282] En algunos ejemplos, la CD se une indirectamente a un enlazador covalente en un grupo de enlace (por ejemplo, un BL). Esto significa que la CD está más que una posición de enlace lejos del enlazador covalente. Esto también significa que la CD se une a través de otro radical al enlazador covalente. Por ejemplo, la CD se puede unir a un grupo de maleimida que se une a un grupo de polietilenglicol que se une al enlazador covalente. En algunos de estos ejemplos, el enlazador covalente también se une indirectamente a un

radical de carga útil. Esto significa que el enlazador covalente está más que una posición de enlace lejos de una carga útil tal como, pero no limitado a una carga útil de esteroides aquí establecida. Esto también significa que el enlazador covalente se une a través de otro radical a la carga útil. Por ejemplo, el enlazador covalente puede estar unido a un dipéptido, tal como pero no limitado a Val-Ala o Val-Cit, que puede estar unido a para-amino benzoilo que puede estar unido a la carga útil. En algunos de estos ejemplos, el enlazador covalente también se une indirectamente a un radical ciclodextrina. Esto significa que el enlazador covalente está más que una posición de enlace lejos de una ciclodextrina, tal como las ciclodextrinas aquí establecidas. Esto también significa que el enlazador covalente se une a través de otro radical a la ciclodextrina. Por ejemplo, el enlazador covalente puede estar unido a un grupo de polietilenglicol que puede estar unido al grupo reactivo que puede estar unido a la ciclodextrina. En algunos de estos ejemplos, el enlazador covalente es un aminoácido lisina o un derivado del mismo.

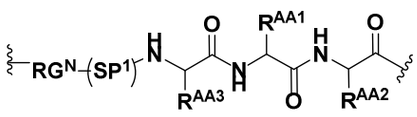
[283] En algunas modalidades, BL es $–RG^N–(SP^1)_q–(A)_z–$. En algunas modalidades, BL es $–RG^N–(SP^1)_q–(A)_2–$. En algunas modalidades, BL es un radical de Fórmula (**BL^{A1}**)



(**BL^{A1}**)

en donde R^{AA1} y R^{AA2} son cada una, independientemente, cadenas laterales de aminoácidos. En algunos ejemplos de Fórmula RL^{A1}, SP^1 es un grupo de polietilenglicol divalente y RG^N es un aducto de reacción de cicloadición 1,3 de la reacción entre un alquino y una azida.

[284] En algunas modalidades, BL es $–RG^N–(SP^1)_q–(A)_z–$. En algunas modalidades, BL es $–RG^N–(SP^1)_q–(A)_2–$. En algunas modalidades, BL es un radical de Fórmula (**BL^{B1}**)



(**BL^{B1}**)

[285] en donde R^{AA1} y R^{AA2} son cada una, independientemente, cadenas laterales de aminoácidos. R^{AA3} es una cadena lateral de aminoácidos que se une directamente o indirectamente a un radical ciclodextrina. En algunos ejemplos de Fórmula RL^{B1}, SP^1 es un grupo de polietilenglicol divalente y RG^N es un aducto de reacción de cicloadición 1,3 de la reacción entre un alquino y una azida.

[286] En algunas modalidades, BL tiene la siguiente estructura:

$$–RG^N–(SP^1)q–Z^1–Z^2–Z^3{}_{0–1}–$$

en donde:

RG^N, SP^1, son según se define aquí;

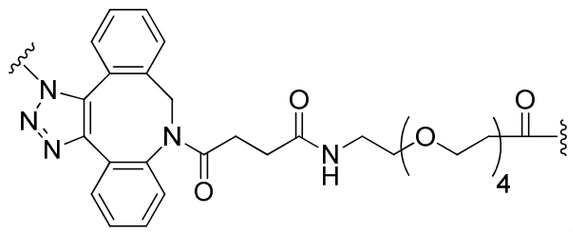
q es 0 o 1;

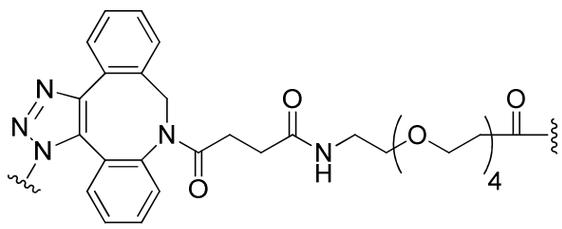
Z^1 es un grupo de caproilo o polietilenglicol;

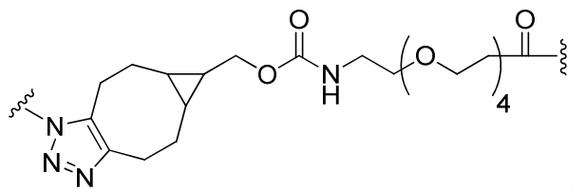
Z^2 es un dipéptido o tripéptido; y

Z^3 es un grupo de PAB.

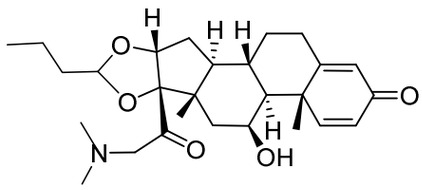
En ciertas modalidades, RG^N se deriva a partir de un grupo reactivo de química clic y Z^1 es un grupo de polietilenglicol. En ciertas modalidades, RGN-(SP1)q-Z1- es:

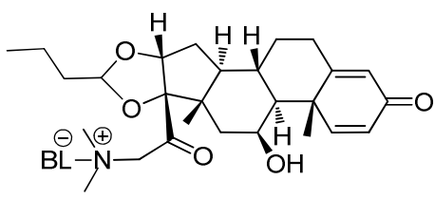

,


, o una mezcla de los mismos; o

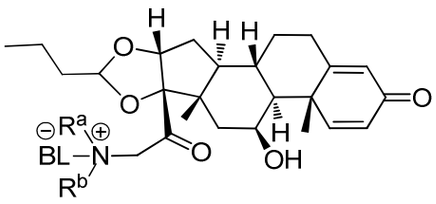

. En algunas modalidades, el dipéptido es valina-citrulina o valina alanina.

[287] En algunas modalidades, el BL se une a la carga útil por medio de amina terciaria. Por ejemplo, si el esteroide es el siguiente compuesto,


, el RL puede unirse a la amina terciaria de la siguiente manera:


.

[288] En algunos ejemplos, se establece un compuesto de la siguiente manera:



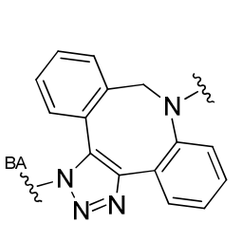
,

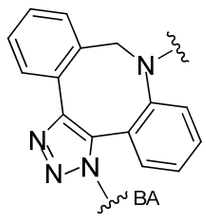
en donde:

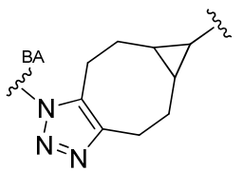
BL es un enlazador de agente de unión según se define anteriormente;

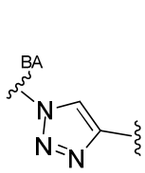
R^a y R^b son, independientemente en cada caso, –H o alquilo.

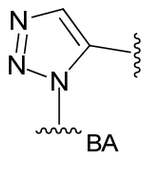
[289] En algunos ejemplos, aquí RG^N se deriva a partir de un grupo reactivo de química clic. En algunos ejemplos, RG^N es:



, 

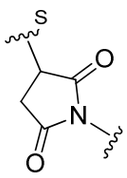
, o una mezcla de los mismos; 

; o 

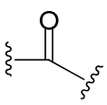
, 

, o una mezcla de los mismos; en donde 

es una unión a un agente de unión.

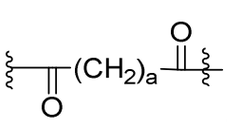
[290] En algunos otros ejemplos, aquí RG^N se selecciona a partir de un grupo que reacciona con un residuo de cisteína o lisina en un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunos ejemplos, RG^N es 

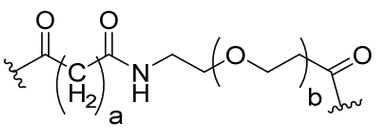
; en donde 

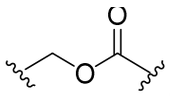
es un enlace a cisteína de un agente de unión, por ejemplo, anticuerpo. En algunos ejemplos, RG^N es 

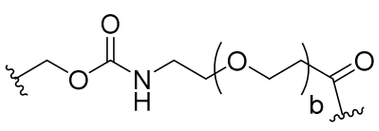
.

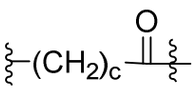
[291] En algunas modalidades, SP^1 se selecciona a partir de:



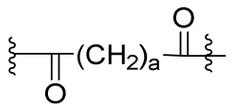
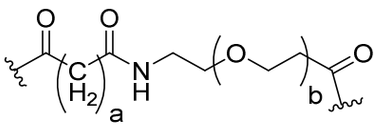
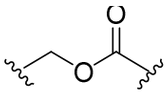
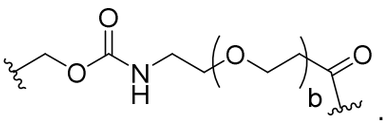
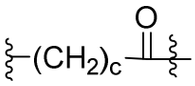
, 

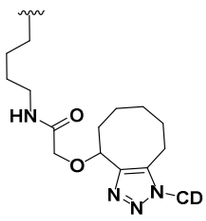
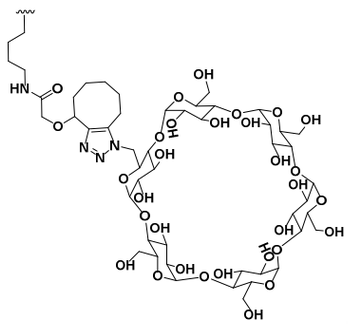
, 

, 

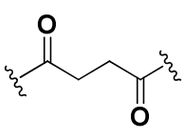
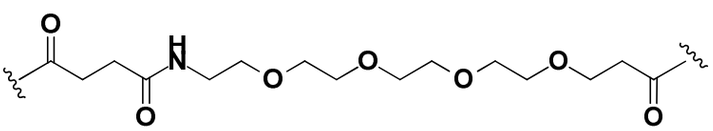
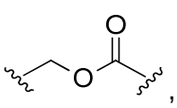
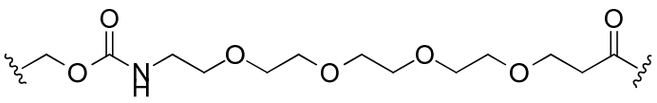
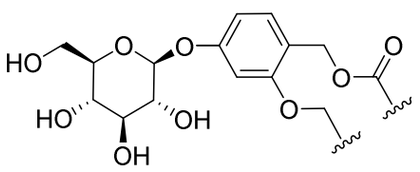
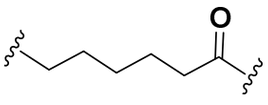
y 

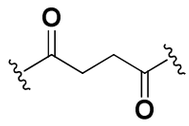
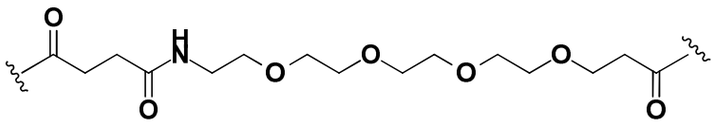
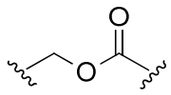
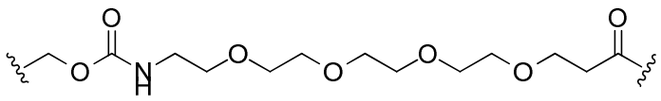
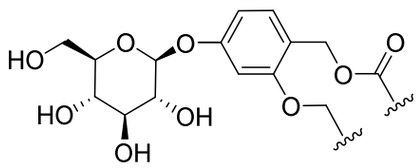
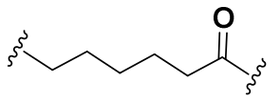
.

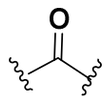
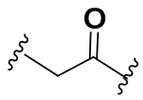
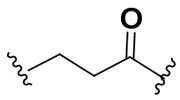
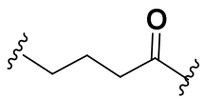
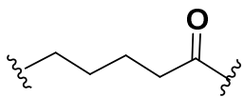
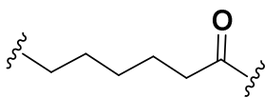
En algunos ejemplos, SP^1 es  . En algunos otros ejemplos, SP^1 es  . En otros ejemplos, SP^1 es  . En todavía otros ejemplos, SP^1 es  . En algunos otros ejemplos, SP^1 es  . En cualquiera de los ejemplos anteriores, los subíndices a, b, y c son independientemente, en cada caso, un entero desde 1 hasta 20.

[292] En algunas modalidades, R^{AA3} se selecciona a partir de  , en donde CD es un radical ciclodextrina. En algunas modalidades, R^{AA3} se selecciona a partir de  .

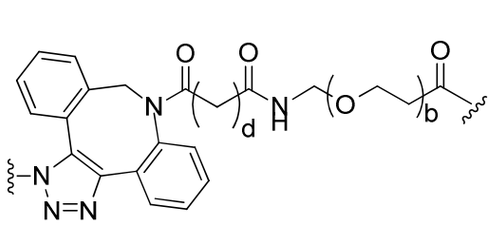
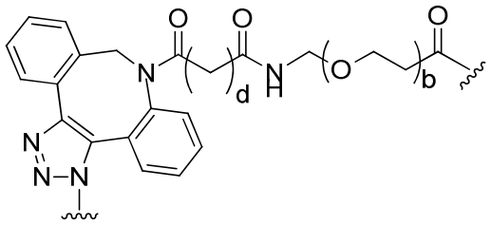
[293] En cualquiera de los compuestos de Fórmula (**II**), (**IIa**), (**IIb**), o (**IIc**), SP^1 se selecciona a partir de:

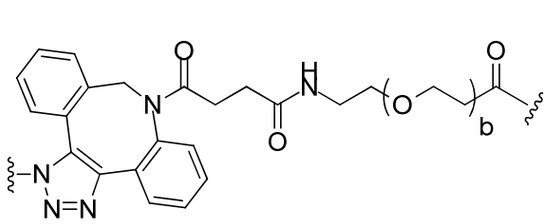
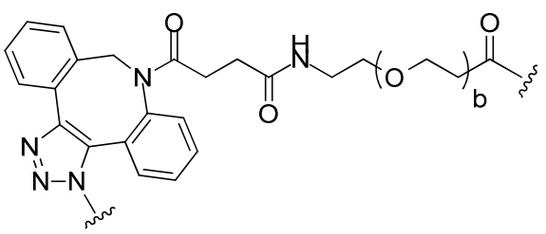
 ,  ,  ,  ,  , y  .

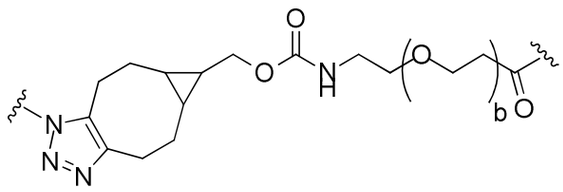
[294] En algunos ejemplos, SP^1 es  . En algunos ejemplos, SP^1 es   . En algunos ejemplos, SP^1 es  . En algunos ejemplos, SP^1 es  . En algunos ejemplos, SP^1 es  .

[295] En algunos ejemplos, SP^1 es  . En algunos ejemplos, SP^1 es  . En algunos ejemplos, SP^1 es  . En algunos ejemplos, SP^1 es  . En algunos ejemplos, SP^1 es  . En algunos ejemplos, SP^1 es  .

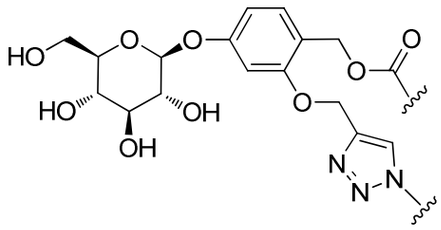
[296] En algunas modalidades, BL–SP^1 es:

 ,  , o una mezcla de los mismos;

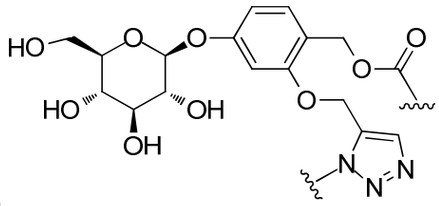
 ,  , o una mezcla de los mismos;



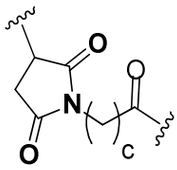
;



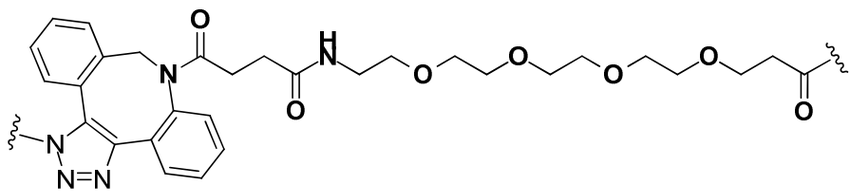
,



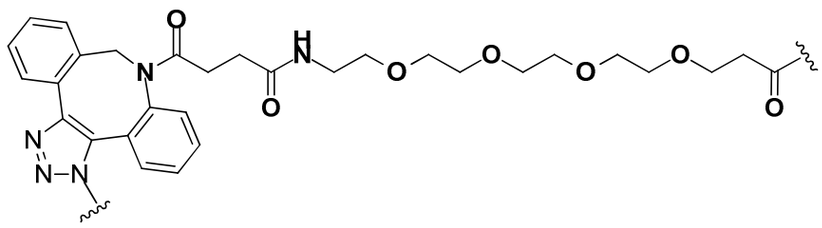
, o una mezcla de los mismos;

o  . En algunos de estos ejemplos, los subíndices b, c, y d son independientemente, en cada caso, un entero desde 1 hasta 20.

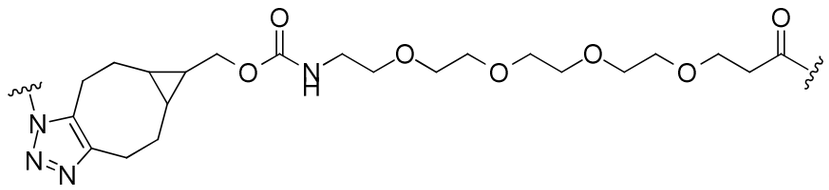
[297] En cualquiera de los compuestos de Fórmula (**II**), (**IIa**), (**IIb**), o (**IIc**), BL–SP^1 se selecciona a partir de:



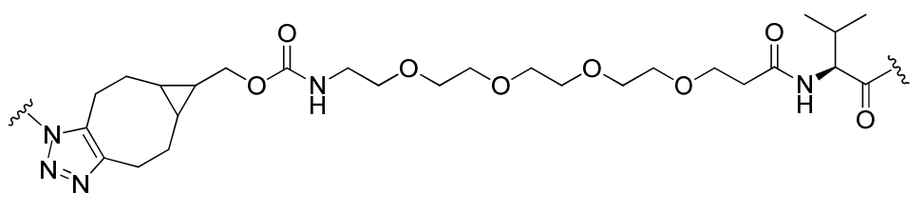
,



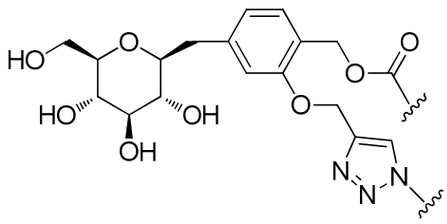
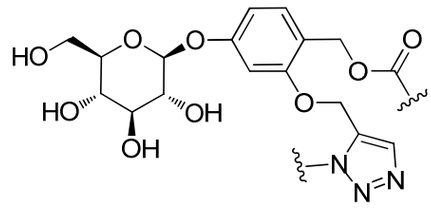
, o una mezcla de los mismos;



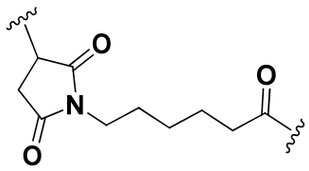
;



;

, o una mezcla de los mismos;

o  .

[298] En algunas modalidades, A es un péptido seleccionado a partir de valina–citrulina, citrulina–valina, lisina–fenilalanina, fenilalanina–lisina, valina–asparagina, asparagina–valina, treonina–asparagina, asparagina–treonina, serina–asparagina, asparagina–serina, fenilalanina–asparagina, asparagina–fenilalanina, leucina–asparagina, asparagina–leucina, isoleucina–asparagina, asparagina–isoleucina, glicina–asparagina, asparagina–glicina, ácido glutámico–asparagina, asparagina–ácido glutámico, citrulina–asparagina, asparagina–citrulina, alanina–asparagina, o asparagina–alanina.

[299] En algunos ejemplos, A es valina–citrulina o citrulina–valina.

[300] En algunos ejemplos, A es valina–alanina o alanina–valina.

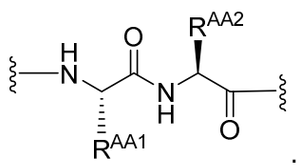
[301] En algunos ejemplos, A es lisina-valina–alanina o alanina–valina-lisina.

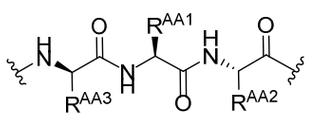
[302] En algunos ejemplos, A es lisina-valina–citrulina o citrulina–valina-lisina.

[303] En algunos ejemplos, A es valina.

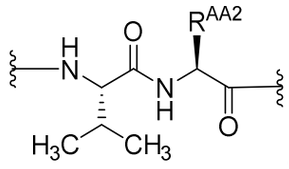
[304] En algunos ejemplos, A es alanina.

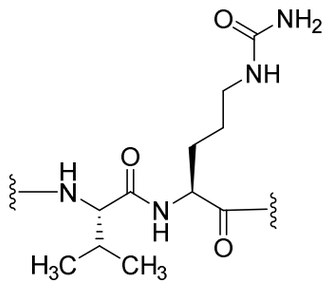
[305] En algunos ejemplos, A es citrulina.

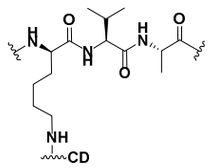
[306] En algunos ejemplos, A es  . En algunos de estos ejemplos, R^{AA1} es una cadena lateral de aminoácidos, y en donde R^{AA2} es una cadena lateral de aminoácidos.

[307] En algunos ejemplos, A es  . En algunos de estos ejemplos, R^{AA1} es una cadena lateral de aminoácidos, R^{AA2} es una cadena lateral de aminoácidos, y R^{AA3} es una cadena lateral de aminoácidos que se une directamente o

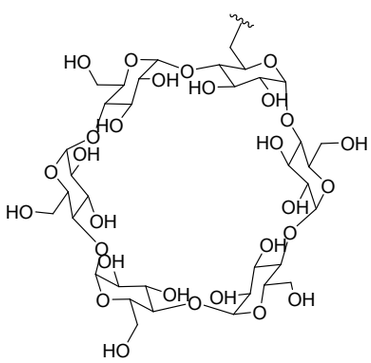
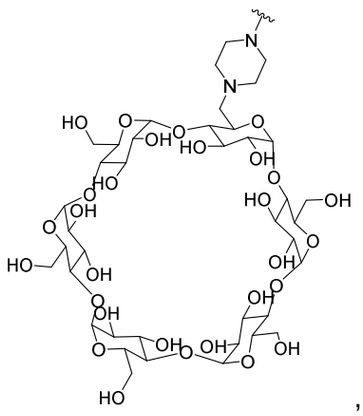
indirectamente a un radical ciclodextrina.

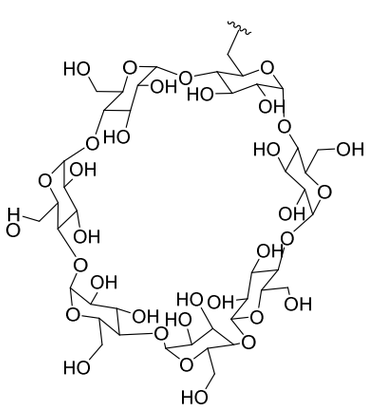
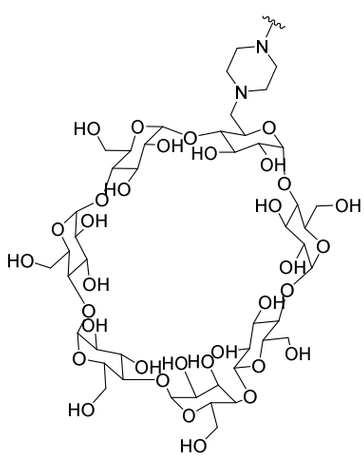
[308] En algunos ejemplos, A es  .

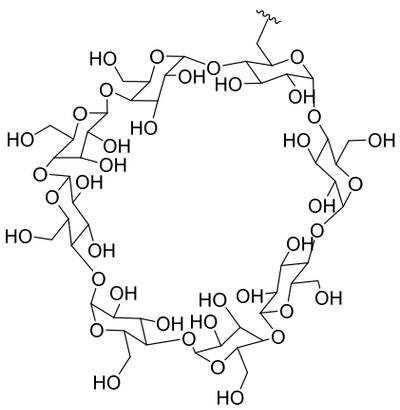
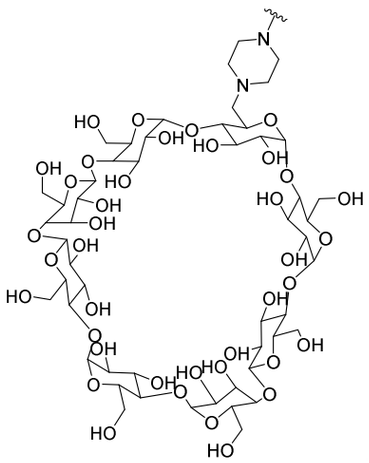
[309] En algunos ejemplos, A es  .

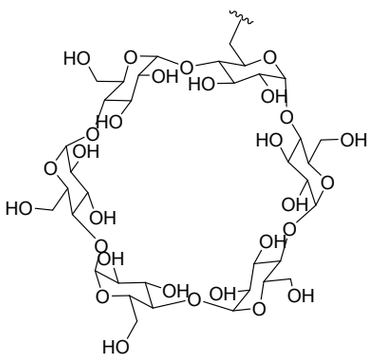
[310] En algunos ejemplos, A es  , en donde representa un enlace directo o indirecto a un radical ciclodextrina.

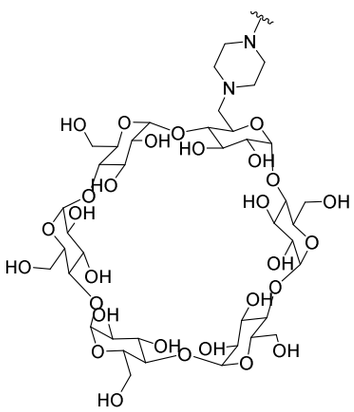
[311] En algunos ejemplos, incluyendo cualquiera de los anteriores, CD se selecciona, independientemente en cada caso, a partir de

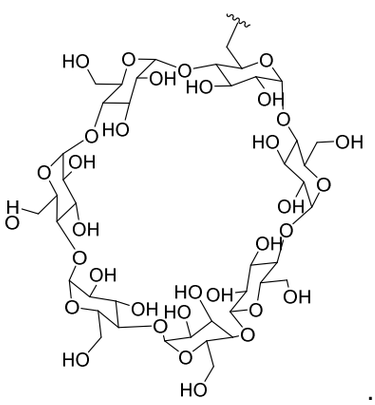
 ,  ,

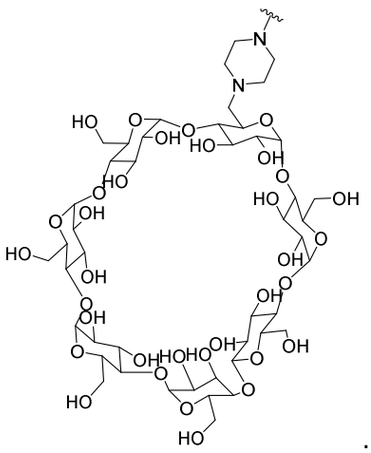
 ,  ,

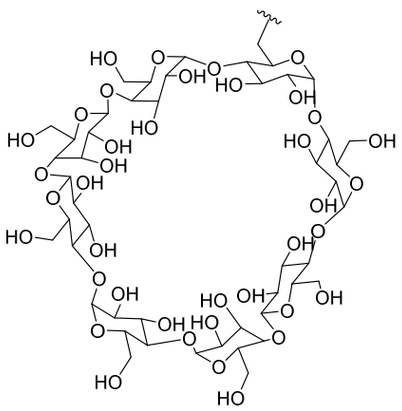

, y 
.

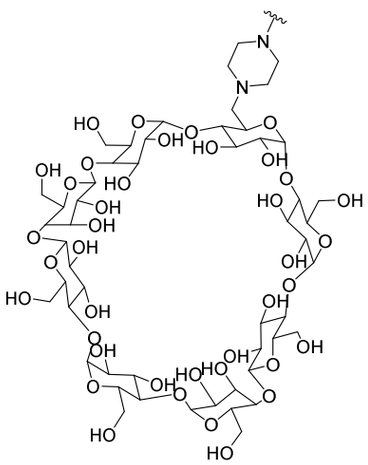

En algunos ejemplos, la CD es .

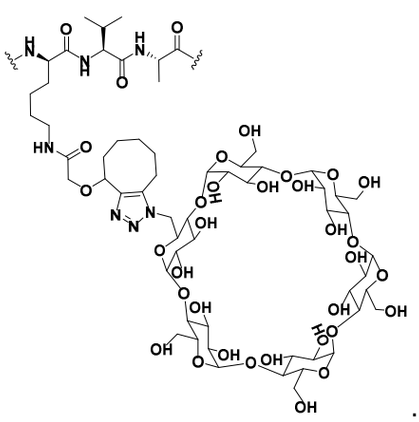

En algunos ejemplos, la CD es .


En algunos ejemplos, la CD es .

En algunos ejemplos, la CD es  .

En algunos ejemplos, la CD es  .

En algunos ejemplos, la CD es  .



[312] En algunos ejemplos, A es .

[313] En algunos ejemplos, R^a es H

[314] En algunos ejemplos, R^a es alquilo

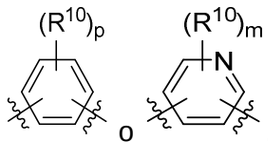
[315] En algunos ejemplos, R^a es metilo, etilo, n–propilo, i–propilo, n–butilo, t–butilo, i–butilo, o pentilo.

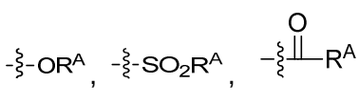
[316] En algunas modalidades, B es arilo.

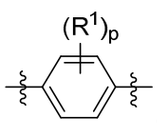
[317] En algunos ejemplos, B es fenilo.

[318] En algunos ejemplos de compuestos de Fórmula (**II**), (**IIa**), (**IIb**), o (**IIc**), B es fenilo o piridinilo.

[319] En algunos ejemplos aquí, B es:

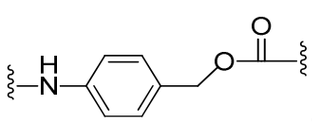


En estos ejemplos, R^{10} es alquilo, alquenilo, alquinilo, alcoxi, arilo, alquilarilo, arilalquilo, halo, haloalquilo, haloalcoxi, heteroarilo, heterocicloalquilo, hidroxilo, ciano, nitro,  , NR^aR^b, o azido. En estos ejemplos, los subíndices p y m se seleccionan independientemente, en cada caso, a partir de un entero desde 0 hasta 4.

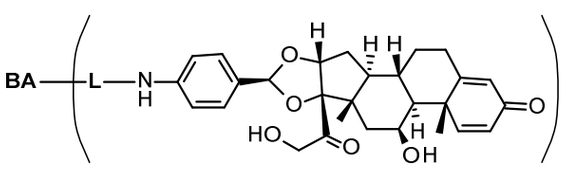
[320] En algunos ejemplos aquí, B es:  .

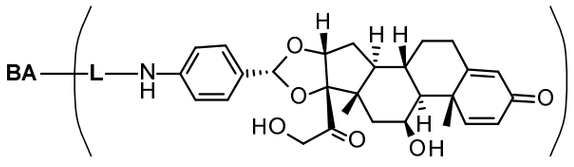
En estos ejemplos, p es 0, 1, 2, 3 o 4. En algunos de estos ejemplos, R^1 es, independientemente en cada ocurrencia, alquilo, alcoxi, haloalquilo, o halo. En algunos ejemplos, R^1 es alquilo. En algunos ejemplos, R^1 es alcoxi. En algunos ejemplos, R^1 es haloalquilo. En algunos ejemplos, R^1 es halo.

[321] En algunas modalidades de Fórmula (**BL^A**), el $–(NR^a)_s–(B)_t–(CH_2)_u–(O)_v–(SP^2)_w$ es:

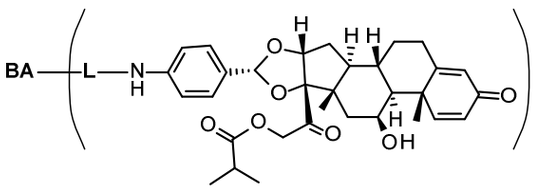
 .

[322] Se establecen aquí conjugados anticuerpo-esteroide que tiene las siguientes fórmulas:

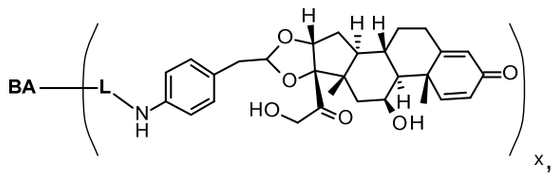



BA
L
N
H
O
HO
OH
x

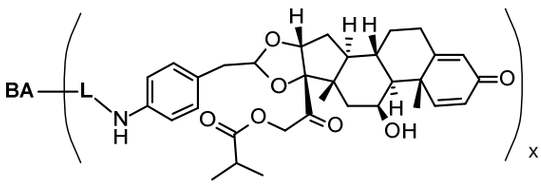
,


BA
L
N
H
O
OH
x

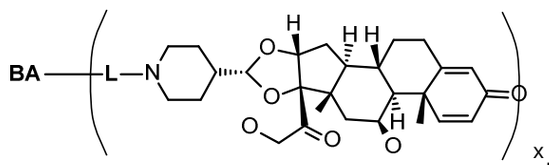
,


BA
L
N
H
O
HO
OH
x

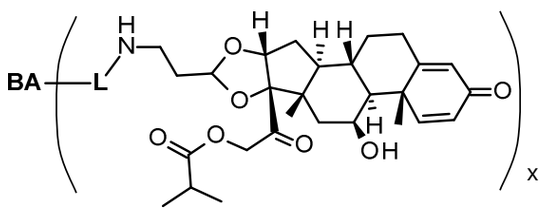
,


BA
L
N
H
O
OH
x

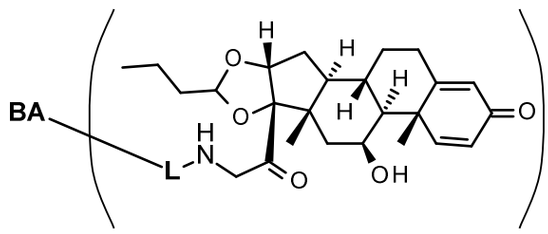
,


BA
L
N
O
H
x

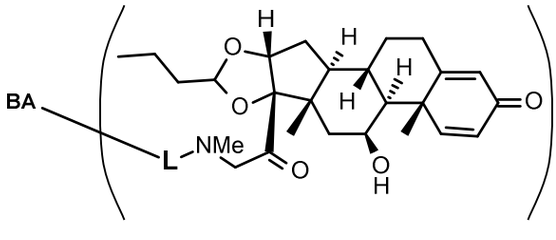
,


BA
L
N
H
O
OH
x

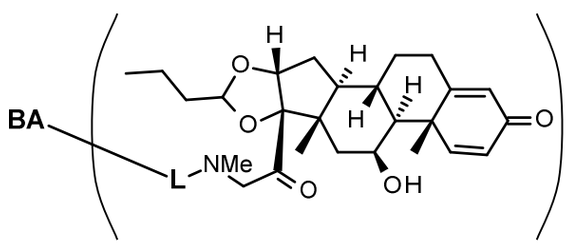
,


BA
L
N
H
O
OH
x

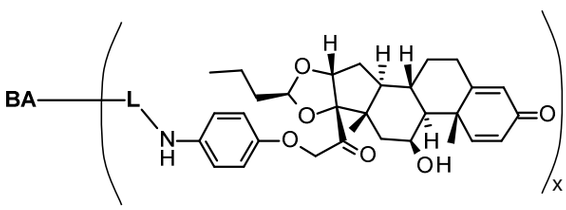
,


BA
L
NMe
O
OH
x

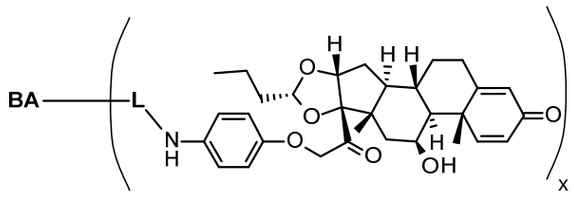
,

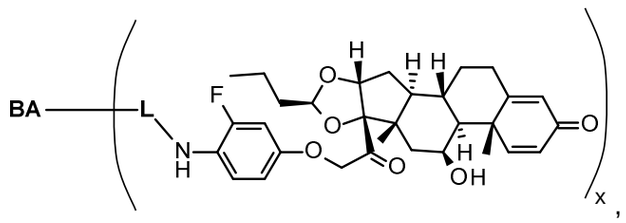

BA
L
NMe
O
OH
x

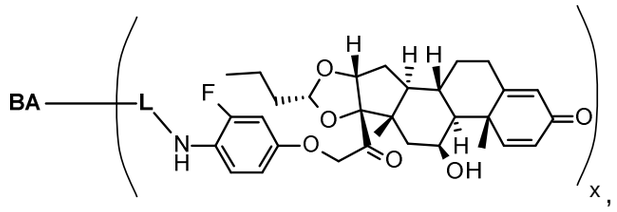
,

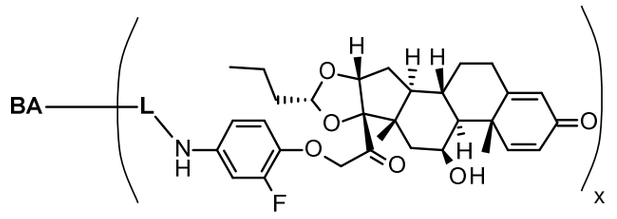

BA
L
N
H
O
OH
x

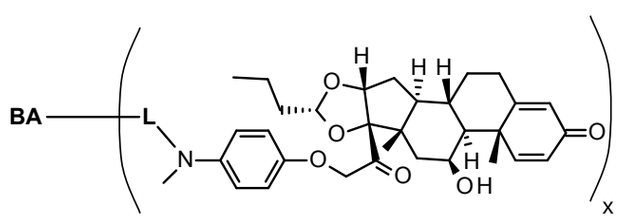
,

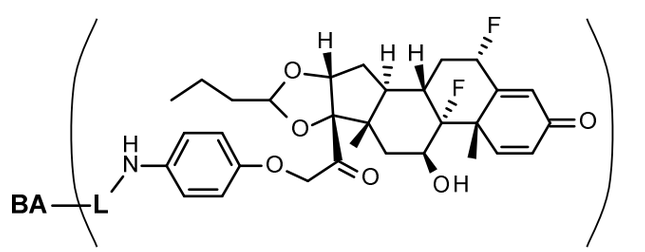

BA
L
N
H
O
O
O
O
H
H
H
OH
x,

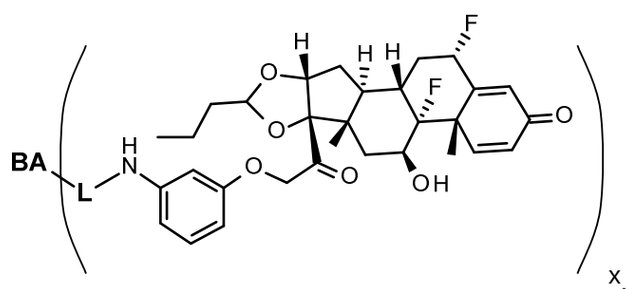

BA
L
N
H
F
O
O
O
O
H
H
H
OH
x,

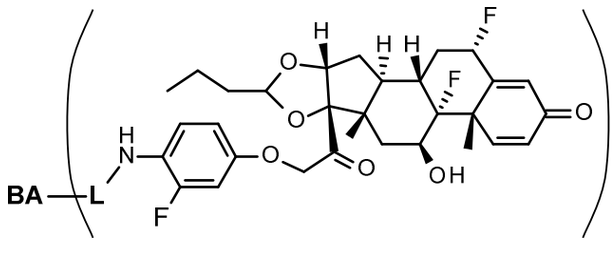

BA
L
N
H
F
O
O
O
O
H
H
H
OH
x,


BA
L
N
H
O
O
O
O
H
H
H
OH
F
x,

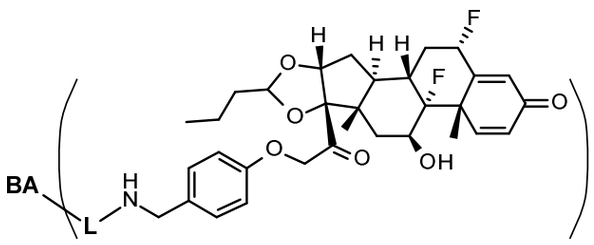

BA
L
N
O
O
O
O
H
H
H
OH
x,


BA
L
H
N
O
O
O
O
H
H
H
F
F
OH
x,

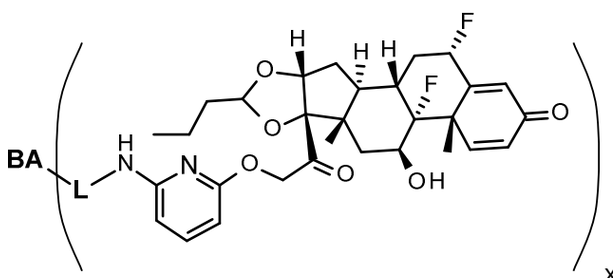

BA
L
H
N
O
O
O
O
H
H
H
F
F
OH
x,


BA
L
H
N
O
F
H
O
O
O
OH
F
H
H
H
O
F
O

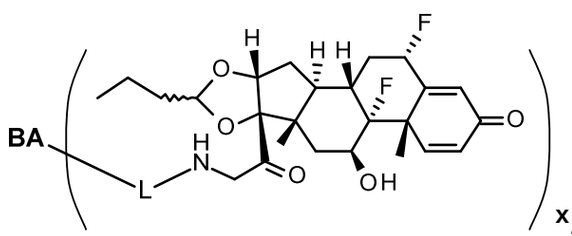
x,


BA
L
H
N
O
H
H
H
O
F
O
O
O
OH
F

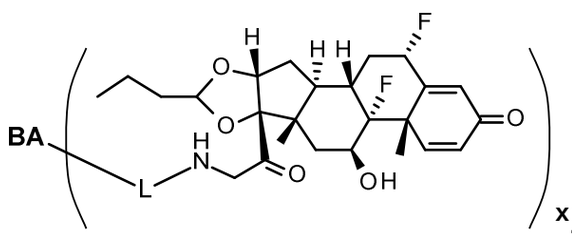
x,


BA
L
H
N
N
O
H
H
H
O
F
O
O
O
OH
F

x,

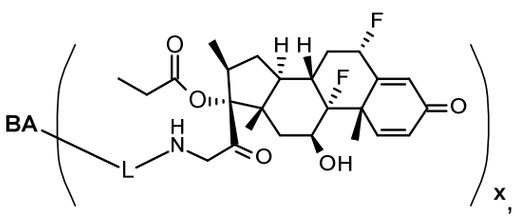

BA
L
H
N
O
H
H
H
O
F
O
O
O
OH
F

x,

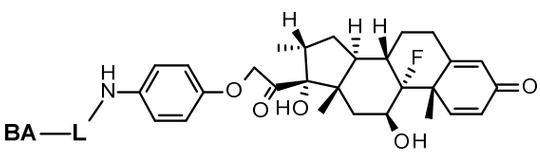

BA
L
H
N
O
H
H
H
O
F
O
O
O
OH
F

x,

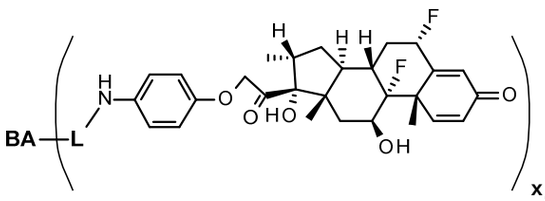
5


BA
L
H
N
O
O
H
H
O
F
O
O
OH
F

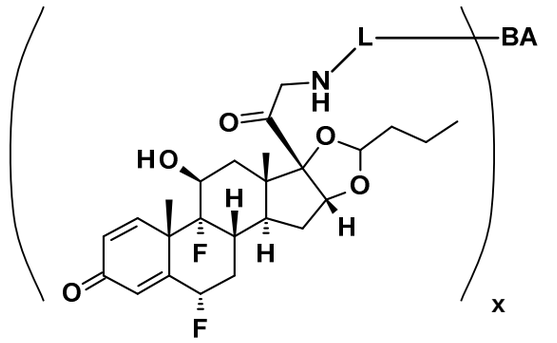
x,


BA
L
H
N
O
O
HO
H
H
H
O
F
O
OH

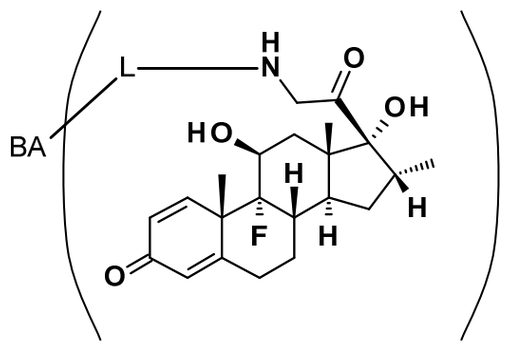
x,


BA
L
H
N
O
O
HO
H
H
H
F
F
O
OH
x

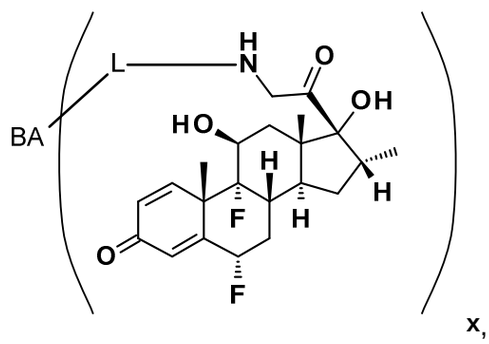
,


L
BA
N
H
O
O
HO
H
O
H
F
H
O
F
x

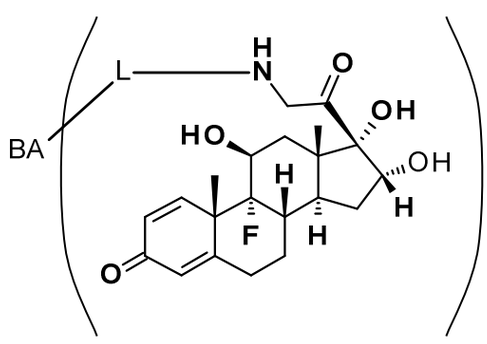
,


L
H
N
O
BA
OH
HO
H
H
F
H
O
x

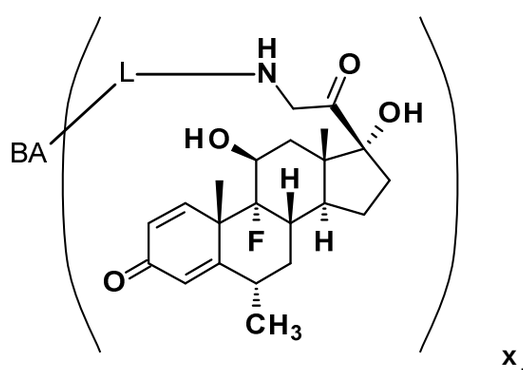
,


L
H
N
O
BA
OH
HO
H
H
F
H
O
F
x

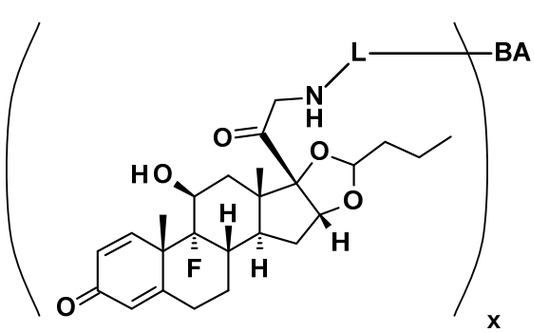
,


L
H
N
O
BA
OH
HO
OH
H
H
F
H
O
x

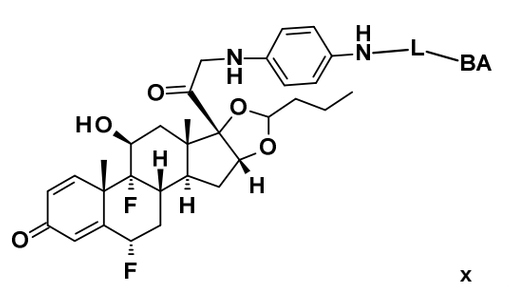
,


L
H
N
O
BA
OH
HO
H
H
F
H
O
CH3
x

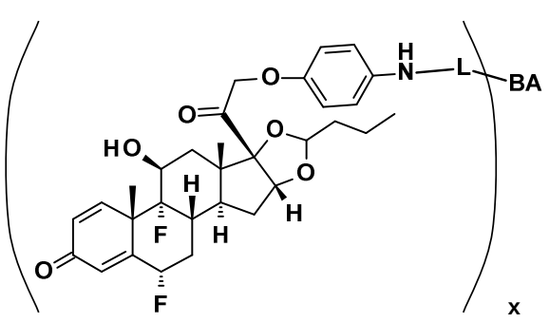
,


L
BA
N
H
O
O
HO
H
O
O
H
F
H
O
x

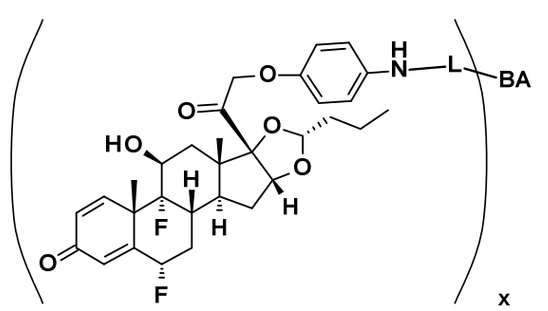
,


N
H
L
BA
N
H
O
O
HO
H
O
O
H
F
H
O
x

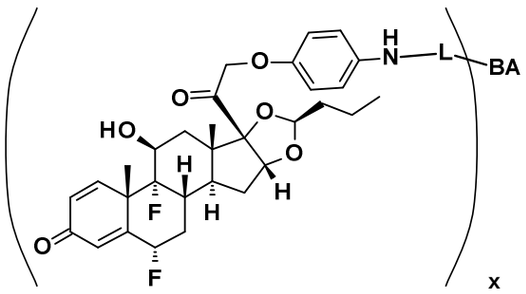
,

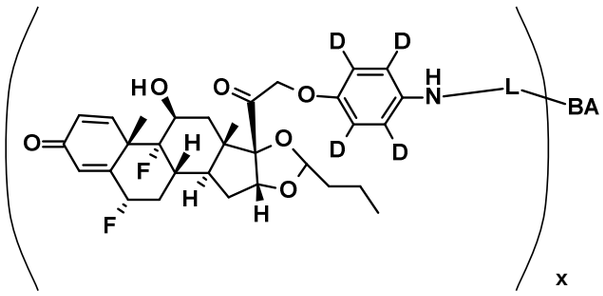

O
H
N
L
BA
O
O
HO
H
O
O
H
F
H
O
F
x

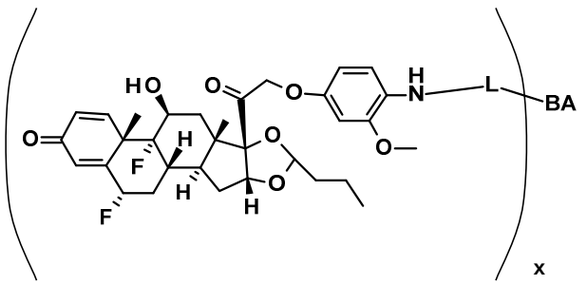
,

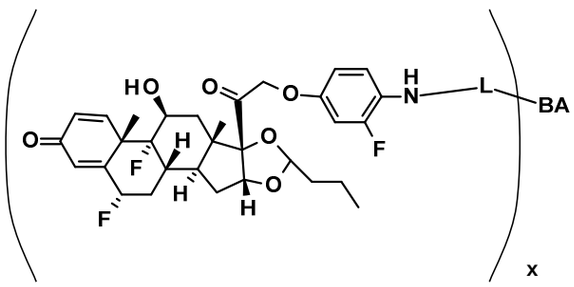

O
H
N
L
BA
O
O
HO
H
O
O
H
F
H
O
F
x

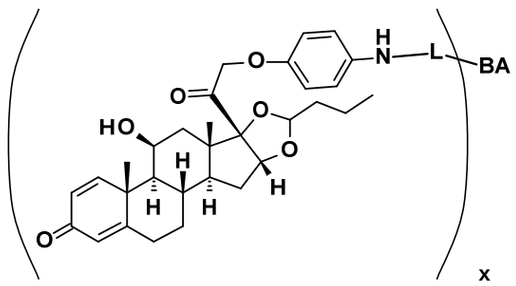
,

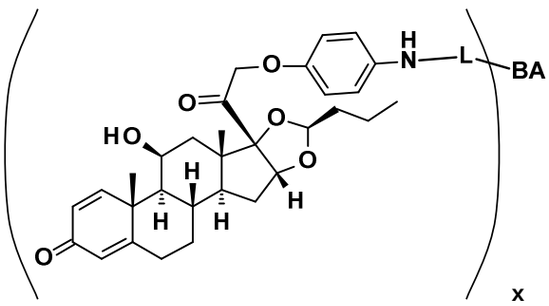

x ,

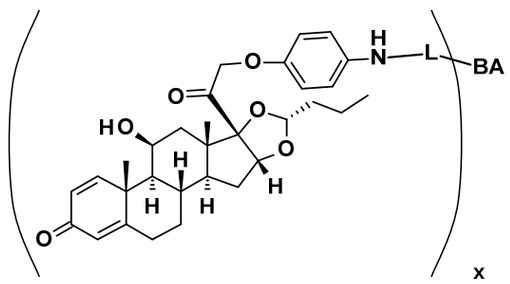

x ,

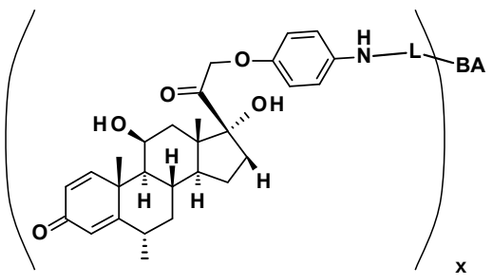

x ,


x ,


x ,

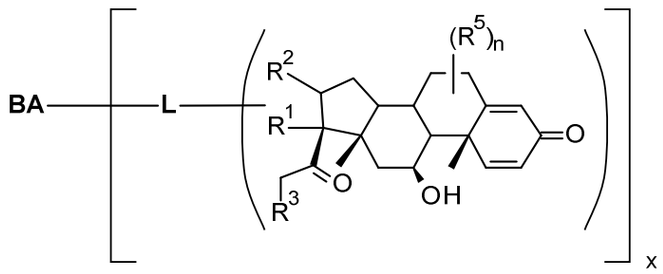

x ,


x ,


x , o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de las mismas;

en donde BA es un agente de unión, y x es un entero desde 1-30. En modalidades particulares, BA es un anticuerpo. En algunas modalidades, x es un entero desde 1 hasta 4. En algunas modalidades, x es 4. En algunas modalidades, x es 2.

[323] Se establecen aquí conjugados anticuerpo-esteroide de acuerdo con la Fórmula **1200**:



1200

o una sal, solvato, o estereoisómero farmacéuticamente aceptable de la misma, en donde: BA es un agente de unión; cada L es un enlazador opcional; BA o L se une covelentemente a R^3 o R^4; y x es un entero desde 1 hasta 30. Los expertos reconocerán que cuando L está presente, L se une a R^3 o R^4; cuando L no está presente, BA se une a R^3 o R^4. Los grupos R^3 o R^4 se describen en detalle a continuación. En modalidades particulares, BA es un anticuerpo. En algunas modalidades, x es un entero desde 1 hasta 4. En algunas modalidades, x es 4. En algunas modalidades, x es 2.

[324] En ciertas modalidades de Fórmula 1200, R^1 y R^2 se seleccionan, independientemente, a partir del grupo que consiste en -H, -OH, alquilo, -O-C(O)-alquilo, y halo; o R^1 y R^2 conjuntamente forman  . En ciertas modalidades, R^3 se selecciona a partir del grupo que consiste en -alquilen-NR^aR^b, -X-arilen-Y-NR^aR^b, -X-heteroarilen-Y-NR^aR^b, y heterocicloalquilo que contiene N; en donde X está ausente, -N-, -CH_2-, u -O-; en donde Y está ausente o -CH_2-; y R^4 se selecciona a partir del grupo que consiste en alquilo, arilo, alquilarilo, arilalquilo, heteroarilo, -alquilen-NR^aR^b, -X-arilen-Y-NR^aR^b, -X-heteroarilen-Y-NR^aR^b, y heterocicloalquilo que contiene N; en donde X está ausente, -N-, -CH_2-, u -O-; en donde Y está ausente o -CH_2-.

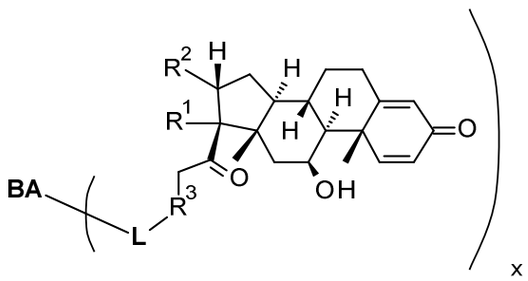
[325] En ciertas modalidades de Fórmula 1200, R^3 se selecciona a partir del grupo que consiste en -OH, -O-C(O)-alquilo, -O-arilo, -NR^aR^b, -alquilen-NR^aR^b, -X-arilen-Y-NR^aR^b, -X-heteroarilen-Y-NR^aR^b, y heterocicloalquilo que contiene N; en donde X está ausente, -N-, -CH_2-, u -O-; en donde Y está ausente o -CH_2-; y R^4 se selecciona a partir del grupo que consiste en -alquilen-NR^aR^b, -X-arilen-Y-NR^aR^b, -X-heteroarilen-Y-NR^aR^b, y

heterocicloalquilo que contiene N; en donde X está ausente, -N-, -CH_2-, u -O-; en donde Y está ausente o -CH_2-.

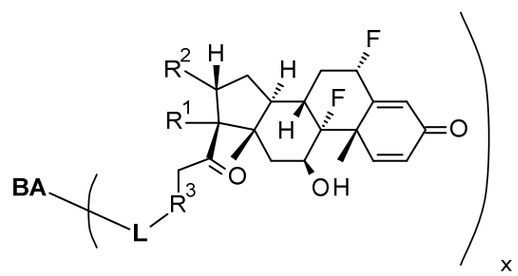
[326] En ciertas modalidades de Fórmula 1200, R^3 es -NR^aR^b; y R^4 es alquilo.

[327] En cada modalidad de Fórmula 1200, BA o L se une a un grupo funcional en R^3 o R^4. Por ejmplo, si R^3 o R^4 comprende un grupo amino, BA o L se puede unir al grupo amino, sustituyendo un átomo de hidrógeno. En cada modalidad, R^5 se selecciona, independientemente en cada caso, a partir de un sustituyente en el grupo que consiste en –OH, halo, y alquilo; n es un entero desde 0-19; y cada R^5 se posiciona en cualquier átomo de anillo. En cada modalidad, R^a y R^b se seleccionan, independientemente en cada caso, a partir del grupo que consiste en -H y alquilo; o R^a y R^b se ciclizan para formar cicloheteroalquilo con tres a seis átomos de anillo, incluyendo un heteroátomo, que es el N al cual se unen. En modalidades particulares, BA es un anticuerpo. En algunas modalidades, x es un entero desde 1 hasta 4. En algunas modalidades, x es 4. En algunas modalidades, x es 2.

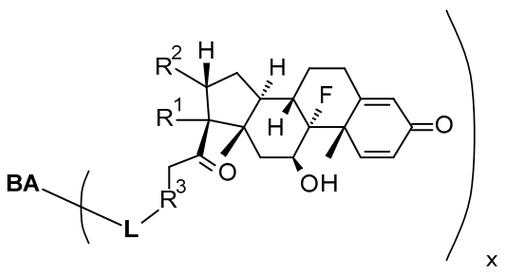
[328] Se establecen aquí conjugados anticuerpo-esteroide de acuerdo con de acuerdo con la Fórmula 1210, 1220, 1230, o 1240:



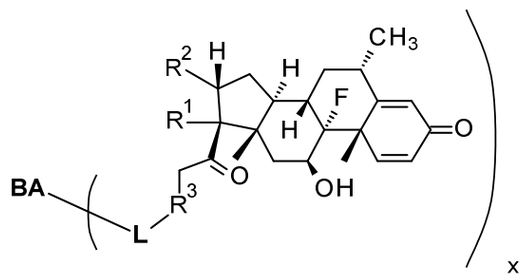
1210



1220



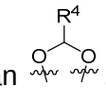
1230



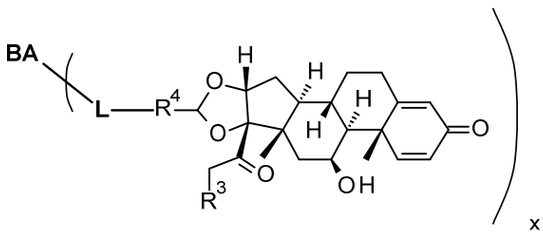
1240

o una sal, solvato, o estereoisómero farmacéuticamente aceptable de la misma; en donde R^3 se une covelentemente a L o BA.

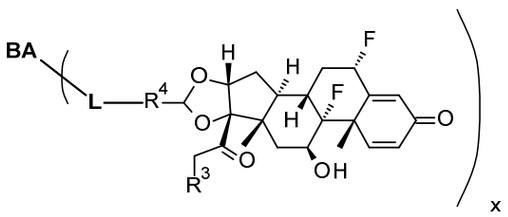
[329] En ciertas modalidades de Fórmula 1210, 1220, 1230, o 1240, R^1 y R^2 se seleccionan, independientemente, a partir del grupo que consiste en -H, -OH, alquilo, -O-

C(O)-alquilo, y halo; o R^1 y R^2 conjuntamente forman  . En ciertas modalidades, R^3 se selecciona a partir del grupo que consiste en -alquilen-NR^aR^b, -X-arilen-Y-NR^aR^b, -X-heteroarilen-Y-NR^aR^b, y heterocicloalquilo que contiene N; en donde X está ausente, -N-, -CH_2-, u -O-; en donde Y está ausente o -CH_2-; y R^4 se selecciona a partir del grupo que consiste en alquilo, arilo, alquilarilo, arilalquilo, heteroarilo, -alquilen-NR^aR^b, -X-arilen-Y-NR^aR^b, -X-heteroarilen-Y-NR^aR^b, y heterocicloalquilo que contiene N; en donde X está ausente, -N-, -CH_2-, u -O-; en donde Y está ausente o -CH_2-. En ciertas modalidades, R^3 es -NR^aR^b; y R^4 es alquilo. En cada modalidad, BA o L se une a un grupo amino en R^3, por ejmplo, sustituyendo un átomo de hidrógeno. En cada modalidad, R^a y R^b se seleccionan, independientemente en cada caso, a partir del grupo que consiste en -H y alquilo; o R^a y R^b se ciclizan para formar cicloheteroalquilo con tres a seis átomos de anillo, incluyendo un heteroátomo, que es el N al cual se unen. En modalidades particulares, BA es un anticuerpo. En algunas modalidades, x es un entero desde 1 hasta 4. En algunas modalidades, x es 4. En algunas modalidades, x es 2.

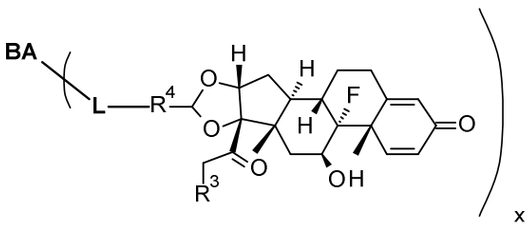
[330] Se establecen aquí conjugados anticuerpo-esteroide de acuerdo con de acuerdo con la Fórmula 1310, 1320, 1330, o 1340:



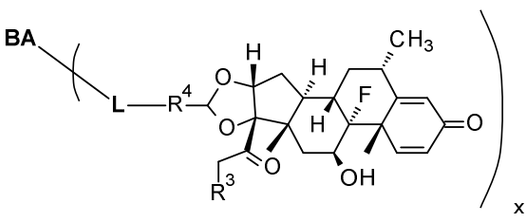
1310



1320



1330



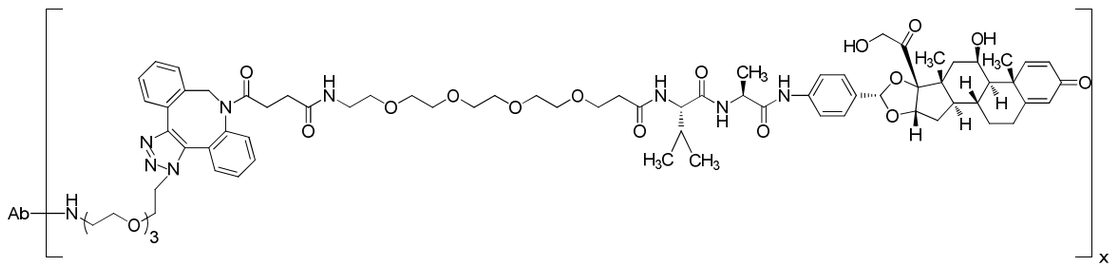
1340

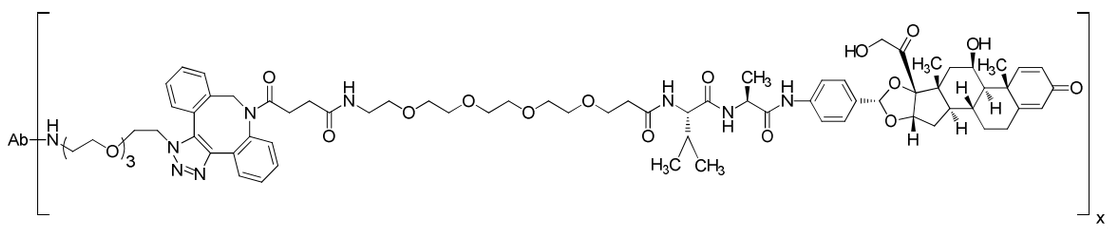
o una sal, solvato, o estereoisómero farmacéuticamente aceptable de la misma; en donde R^4 se une covelentemente a L o BA.

[331] En ciertas modalidades de Fórmula 1310, 1320, 1330, o 1340, R^3 se selecciona a partir del grupo que consiste en -OH, -O-C(O)-alquilo, -O-arilo, -NR^aR^b, -alquilen-NR^aR^b, -X-arilen-Y-NR^aR^b, -X-heteroarilen-Y-NR^aR^b, y heterocicloalquilo que

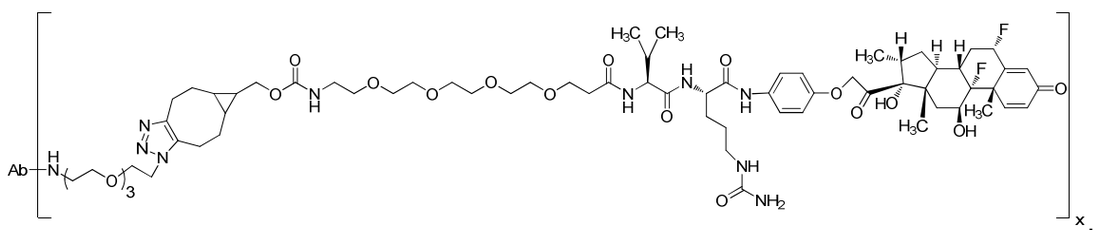
contiene N; en donde X está ausente, -N-, $-CH_2-$, u -O-; en donde Y está ausente o $-CH_2-$; y R^4 se selecciona a partir del grupo que consiste en -alquilen-NR^aR^b, -X-arilen-Y-NR^aR^b, -X-heteroarilen-Y-NR^aR^b, y heterocicloalquilo que contiene N; en donde X está ausente, -N-, $-CH_2-$, u -O-; en donde Y está ausente o $-CH_2-$. En cada modalidad, BA o L se une a un grupo amino en R^4, por ejmplo, sustituyendo un átomo de hidrógeno. En cada modalidad, R^a y R^b se seleccionan, independientemente en cada caso, a partir del grupo que consiste en -H y alquilo; o R^a y R^b se ciclizan para formar cicloheteroalquilo con tres a seis átomos de anillo, incluyendo un heteroátomo, que es el N al cual se unen. En modalidades particulares, BA es un anticuerpo. En algunas modalidades, x es un entero desde 1 hasta 4. En algunas modalidades, x es 4. En algunas modalidades, x es 2.

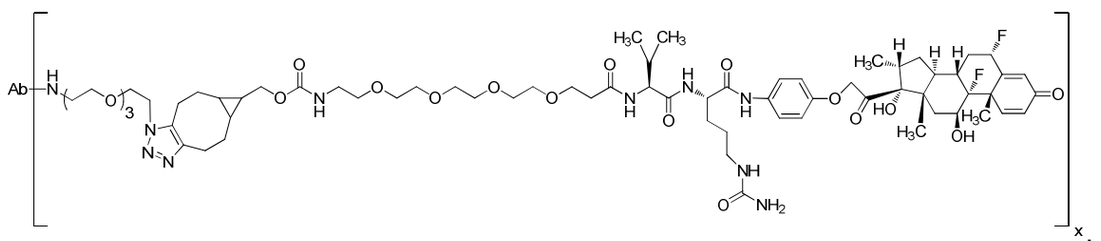
[332] También se establecen aquí conjugados anticuerpo-esteroide que tiene las siguientes fórmulas:



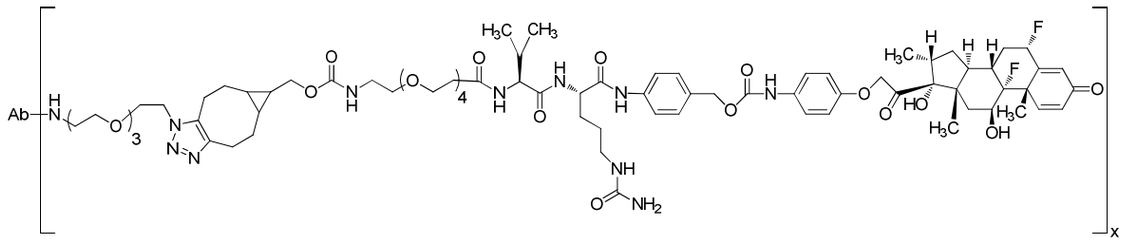


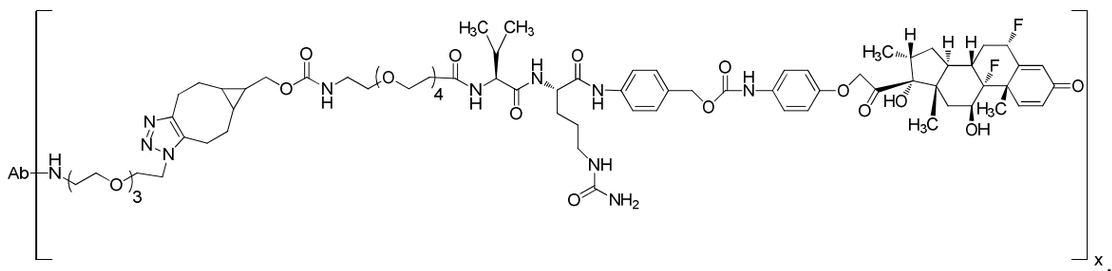
una mezcla de las mismas;



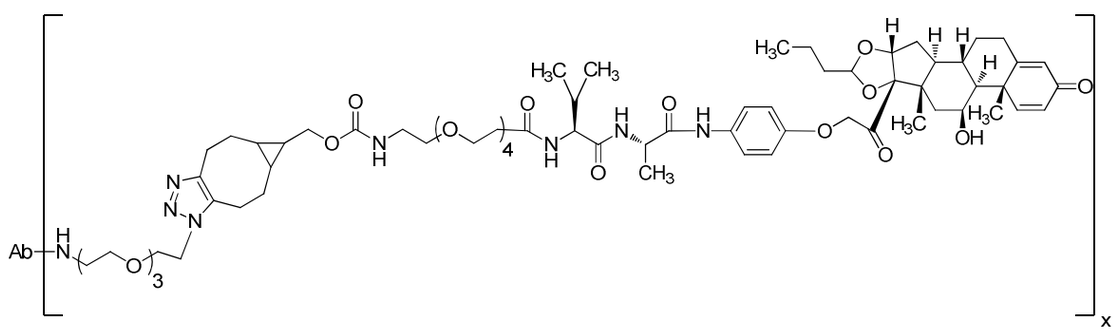


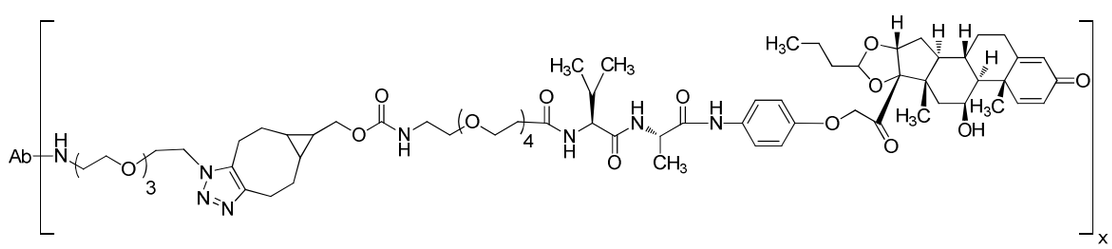
una mezcla de las mismas;



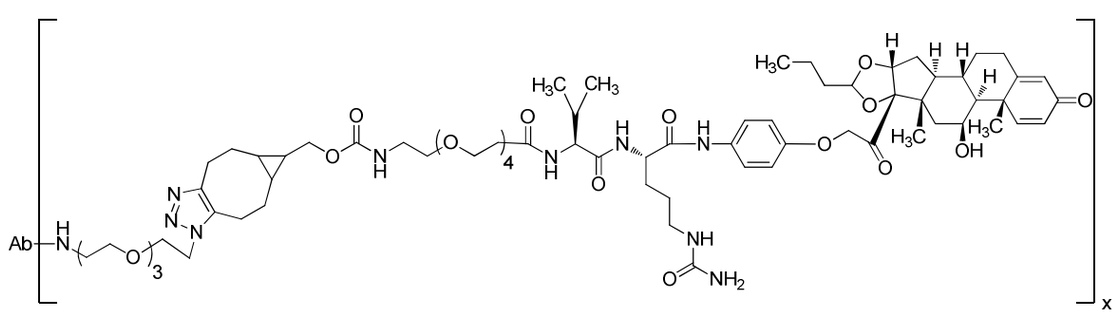


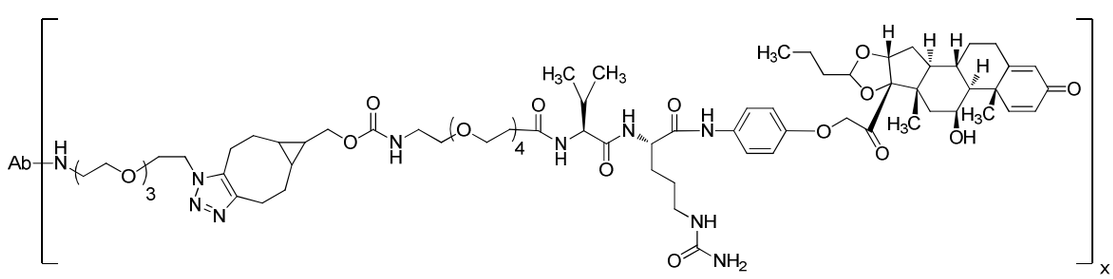
una mezcla de las mismas;



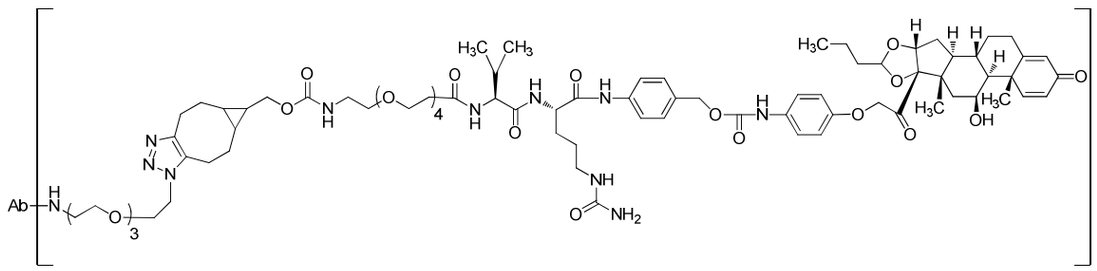


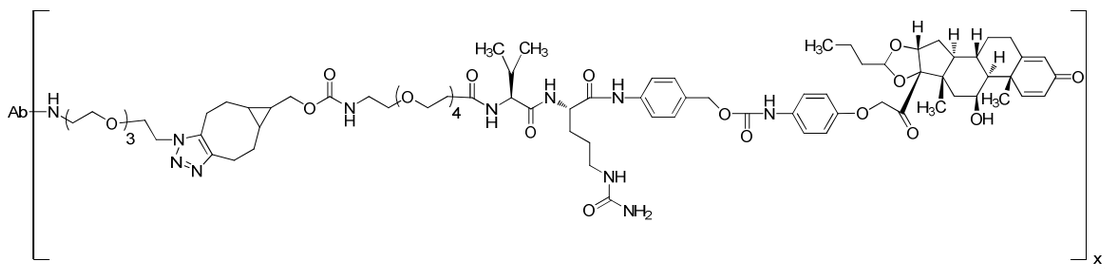
una mezcla de las mismas;



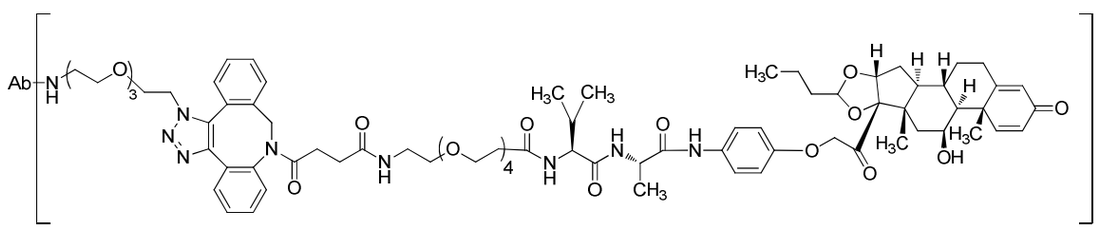


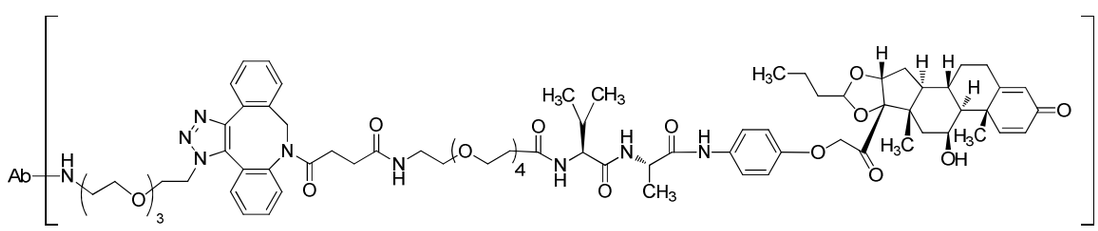
una mezcla de las mismas;



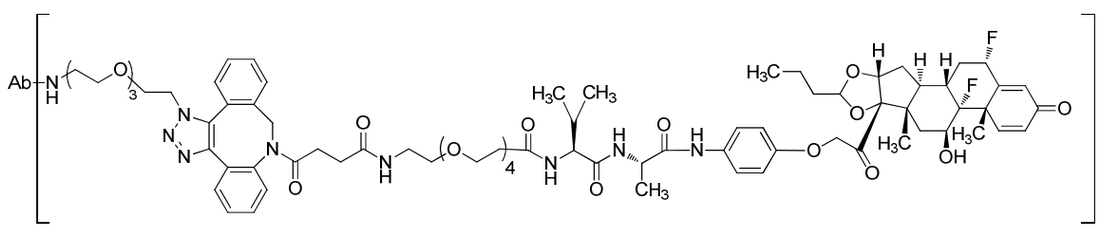


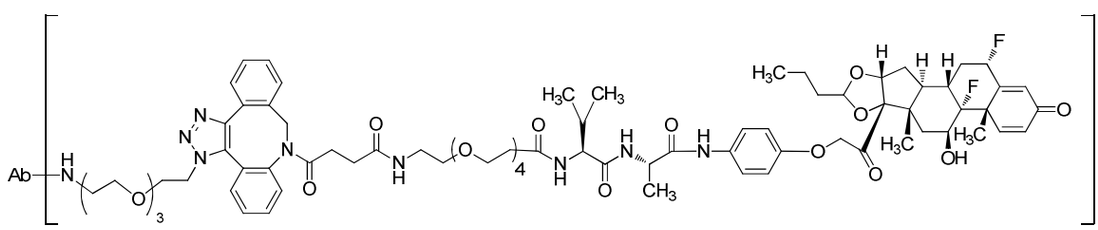
una mezcla de las mismas;



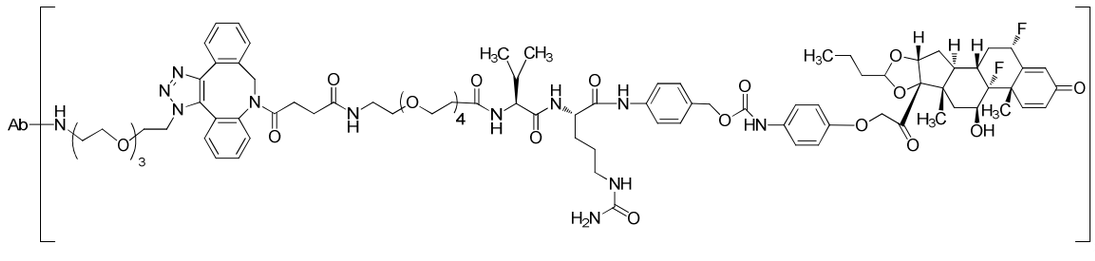


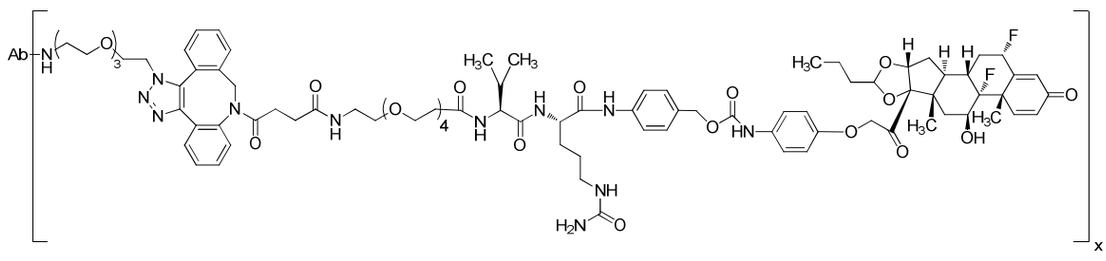
una mezcla de las mismas;



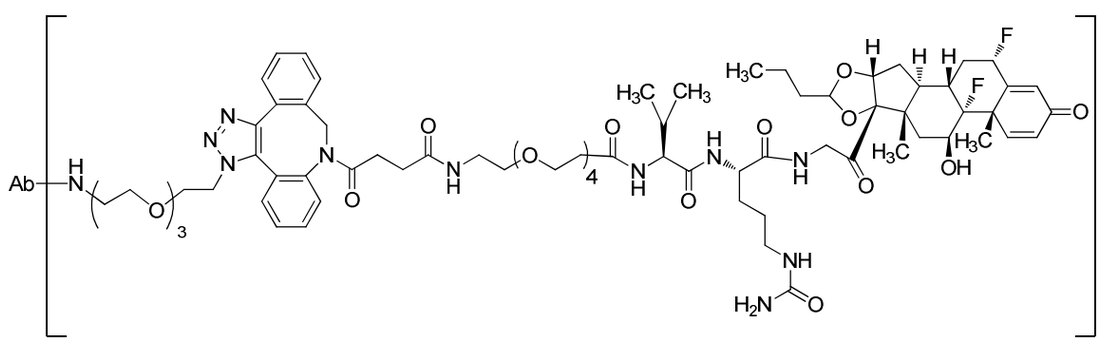


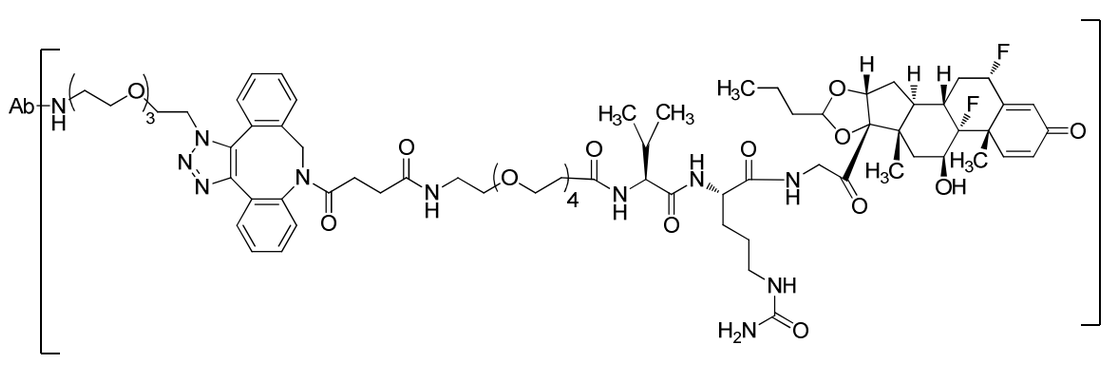
una mezcla de las mismas;



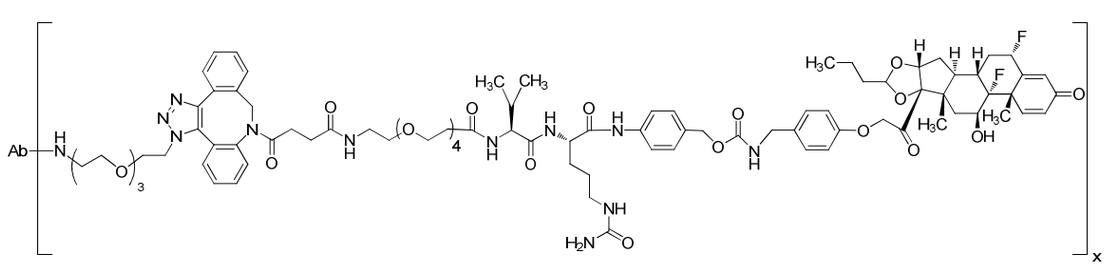


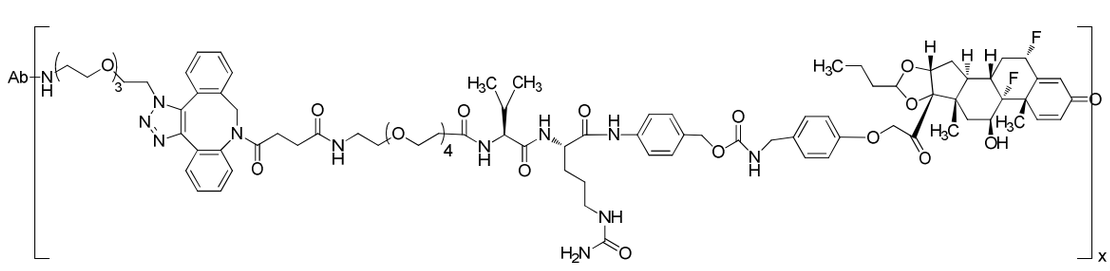
una mezcla de las mismas;





o una mezcla de las mismas;

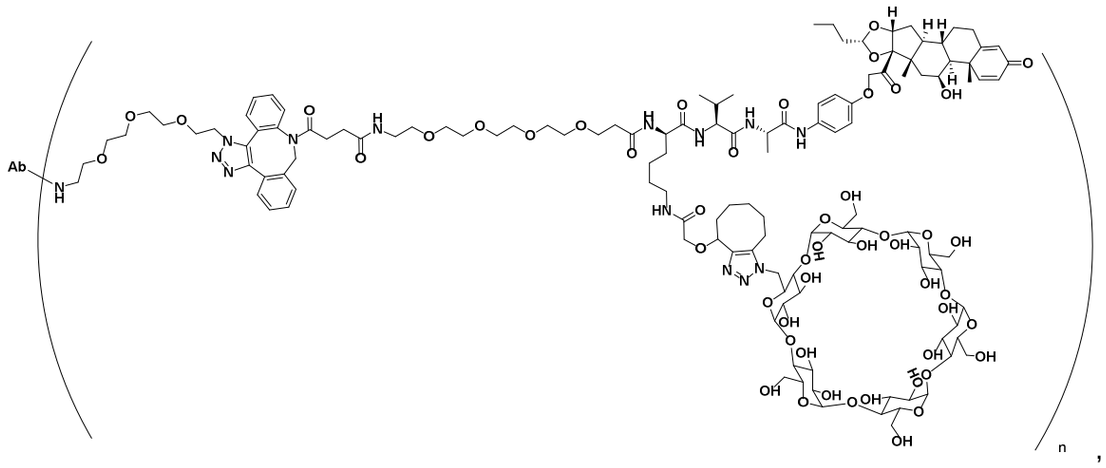


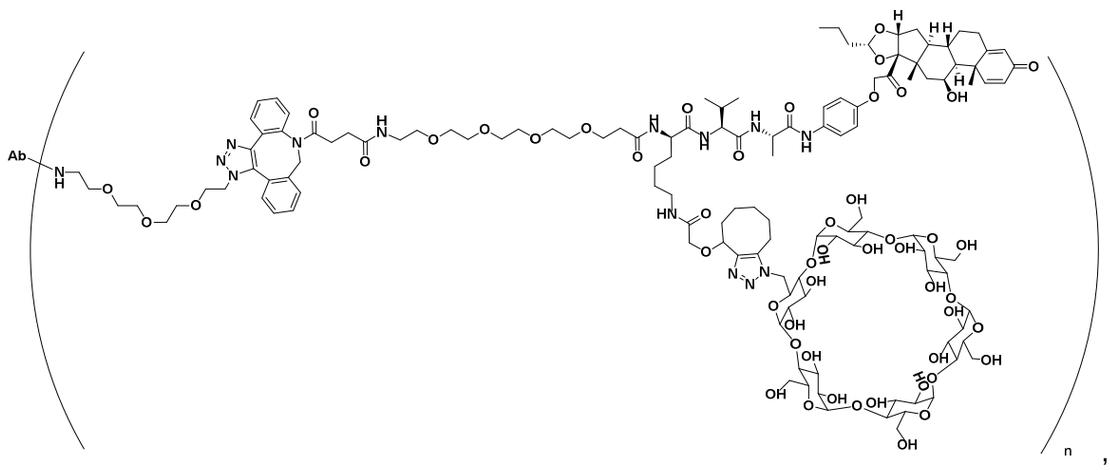


una mezcla de las mismas;

en donde Ab es un anticuerpo y x es un entero desde 1-30. En algunas modalidades, x es un entero desde 1 hasta 4. En algunas modalidades, x es 4. En algunas modalidades, x es 2.

[333] También se establecen aquí conjugados anticuerpo-esteroide que tiene las siguientes fórmulas:

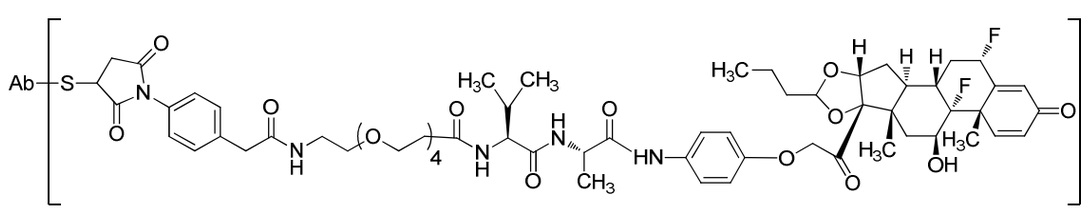




o mezclas de las mismas.

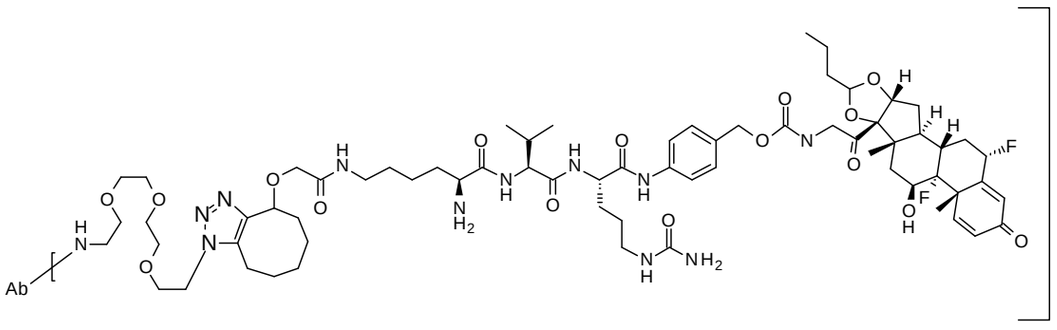
En modalidades particulares, Ab es un anticuerpo y x es un entero desde 1-30. En algunas modalidades, x es un entero desde 1 hasta 4. En algunas modalidades, x es 4. En algunas modalidades, x es 2.

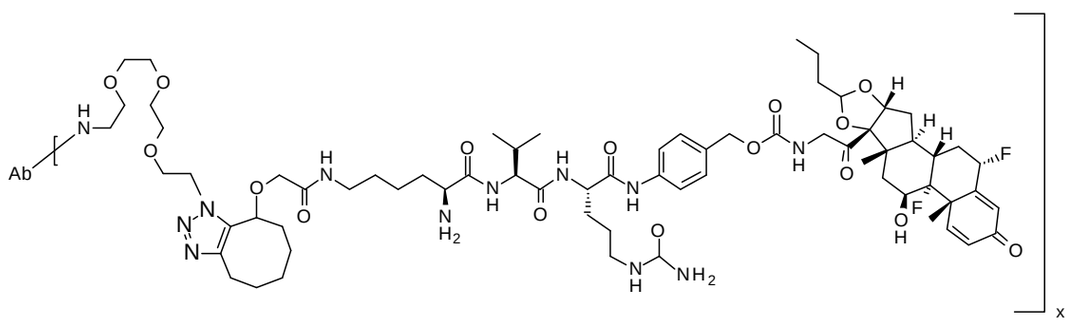
[334] También se establecen aquí conjugados anticuerpo-esteroide que tiene la siguente fórmula:



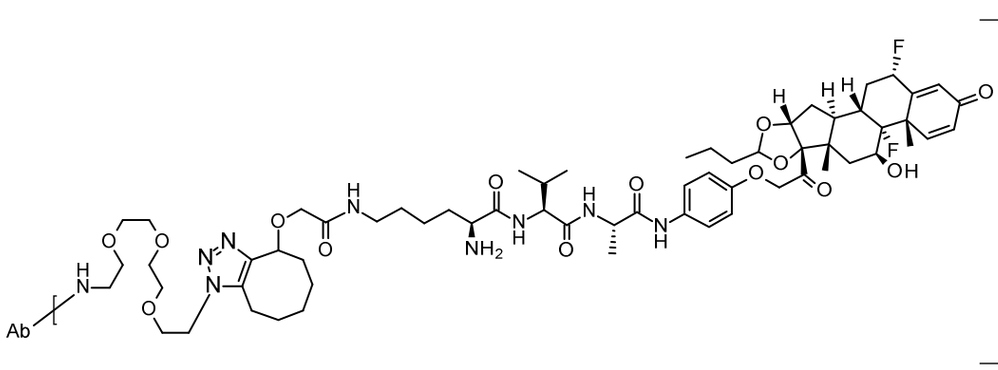
[335] También se establecen aquí conjugados anticuerpo-esteroide que tiene las

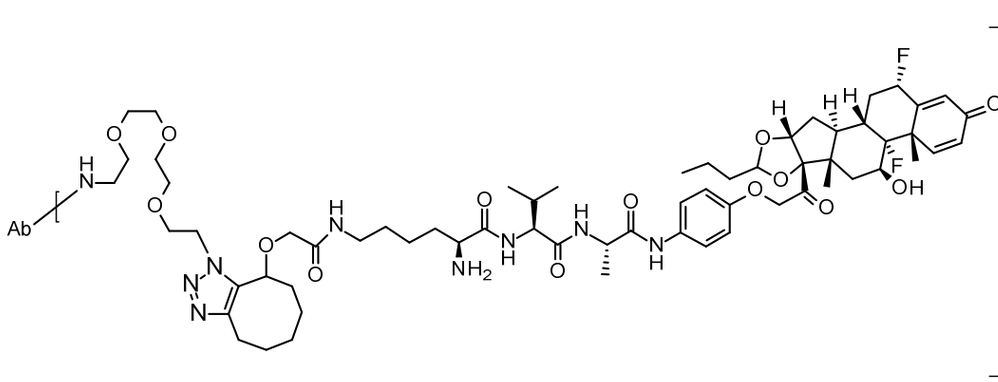
siguientes fórmulas:



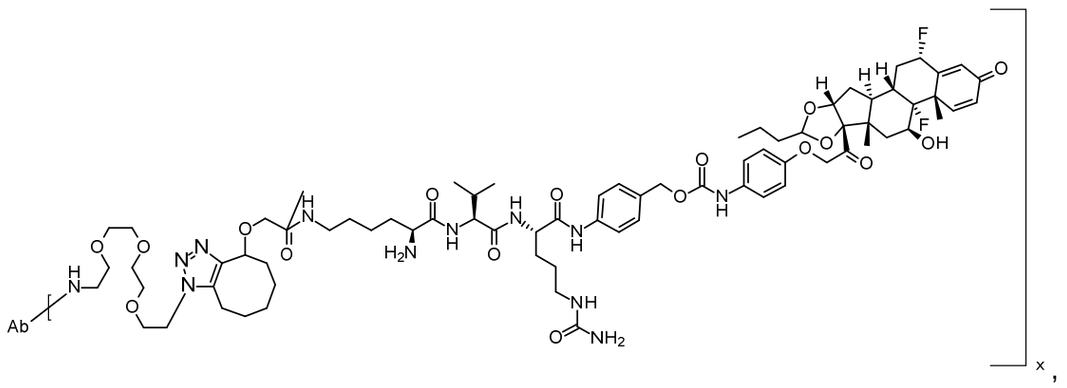


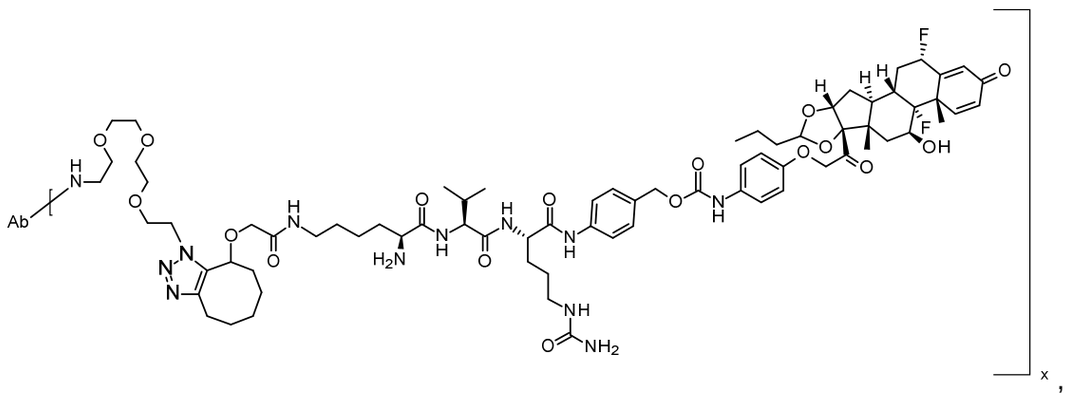
o mezclas de las mismas;



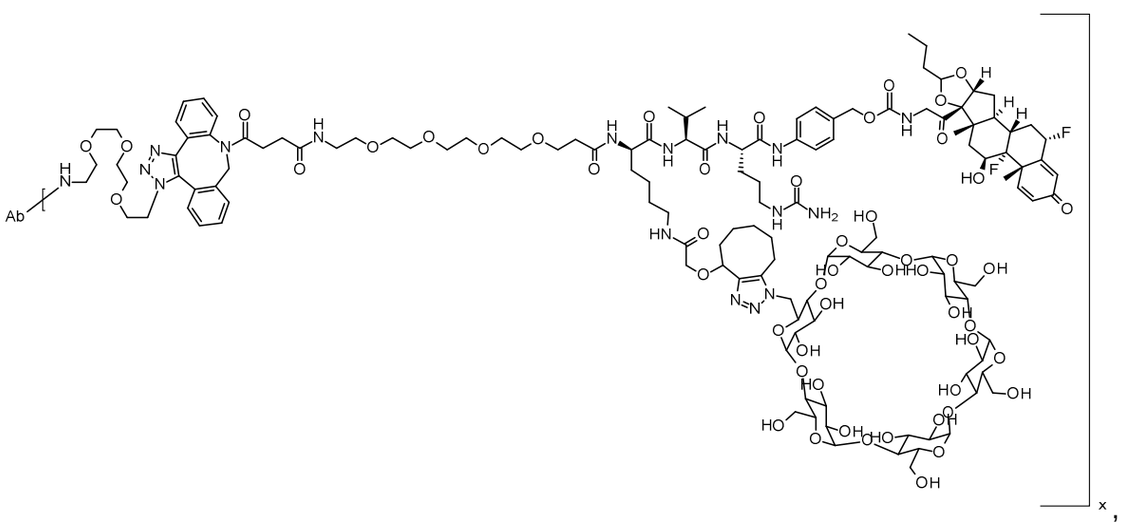


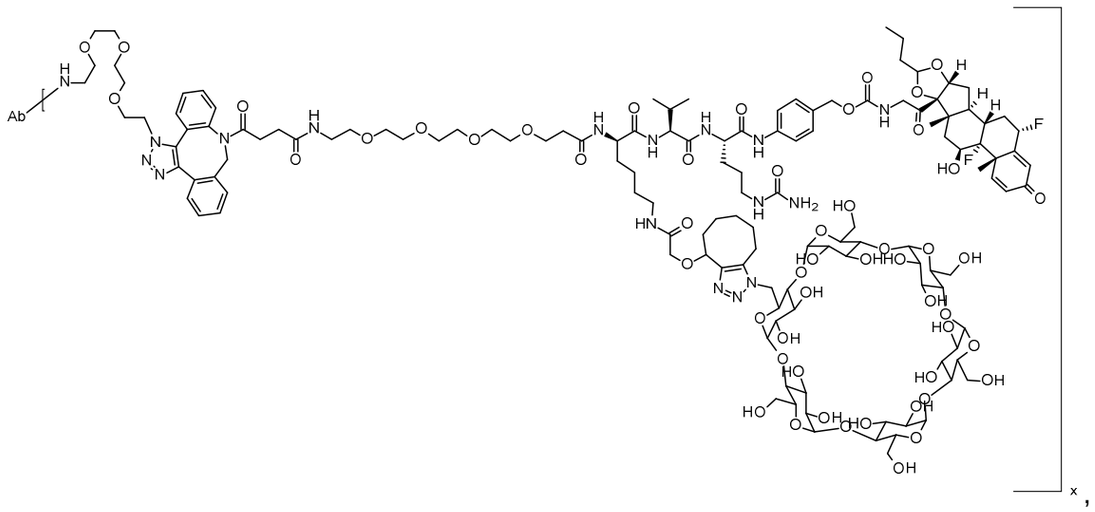
o mezclas de las mismas;



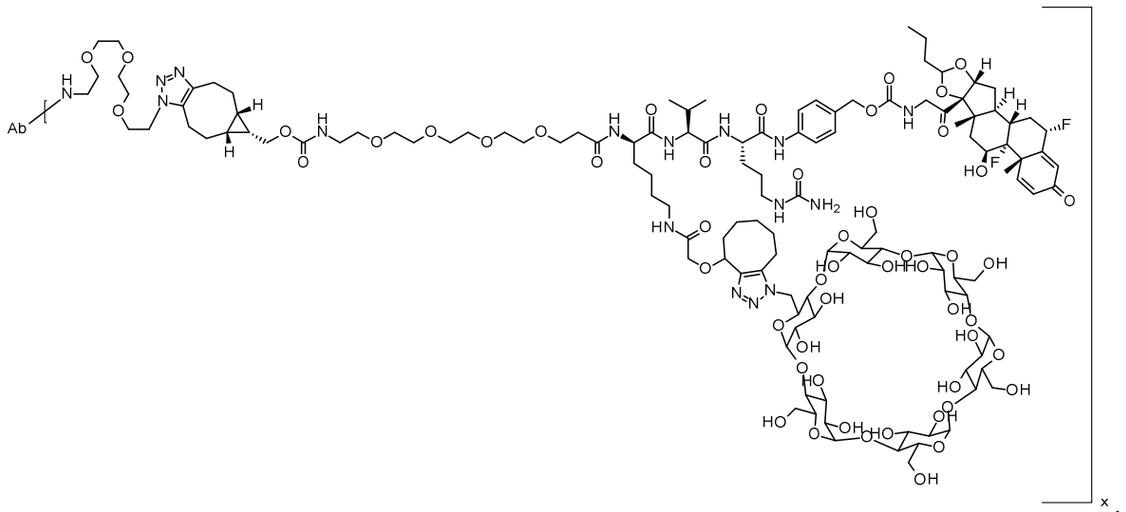


o mezclas de las mismas;

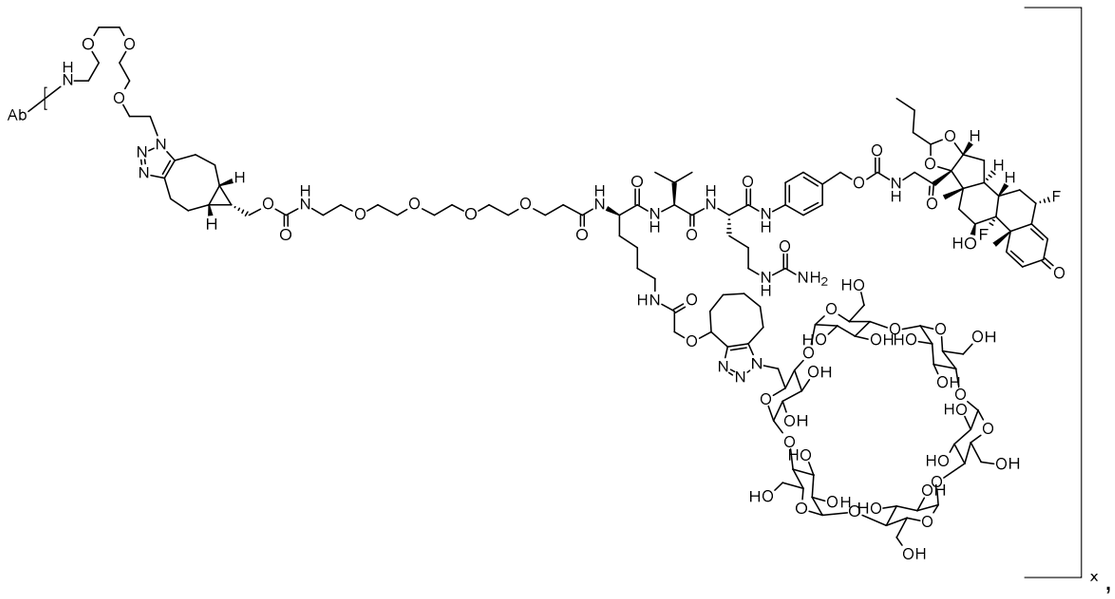




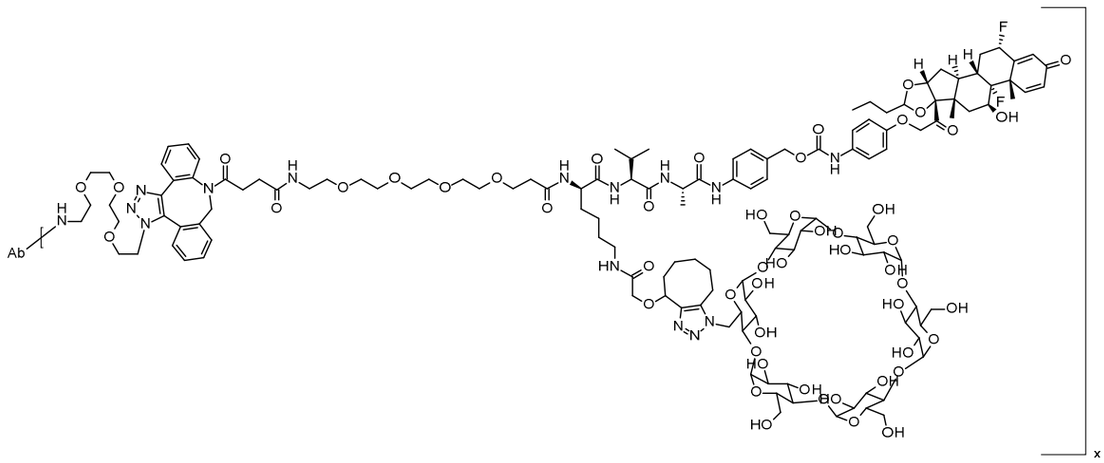
o mezclas de las mismas;

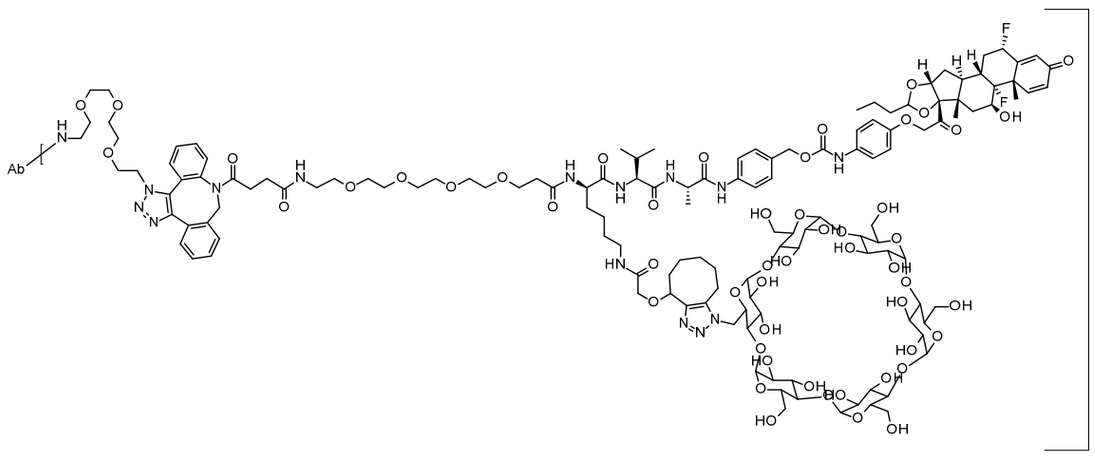


5

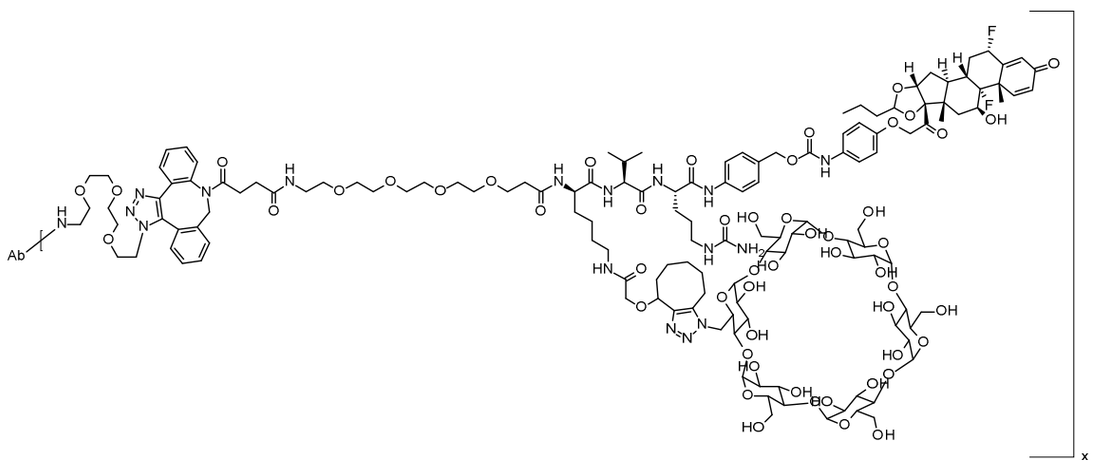


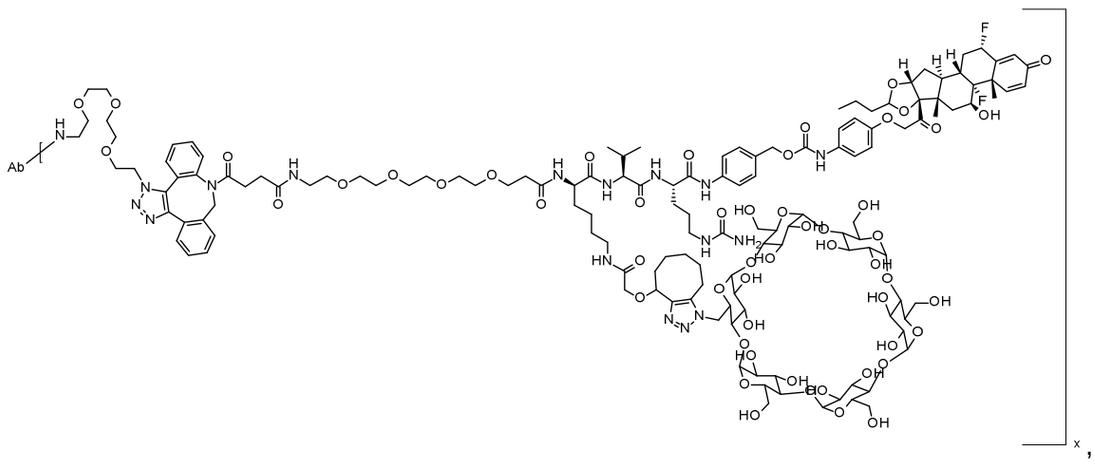
o mezclas de las mismas;



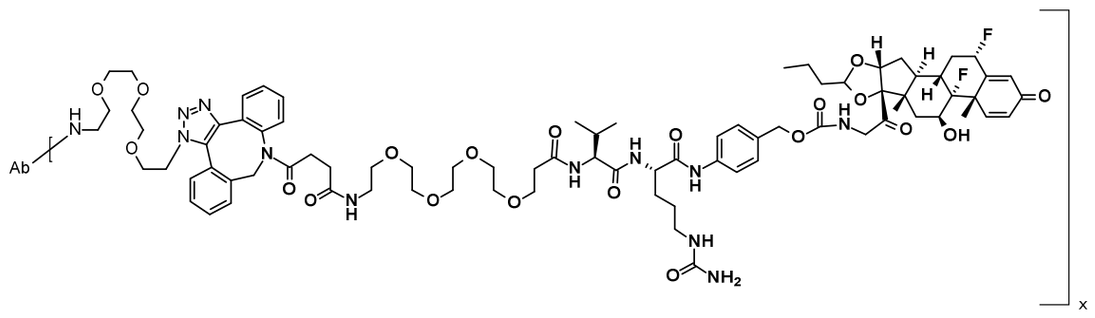


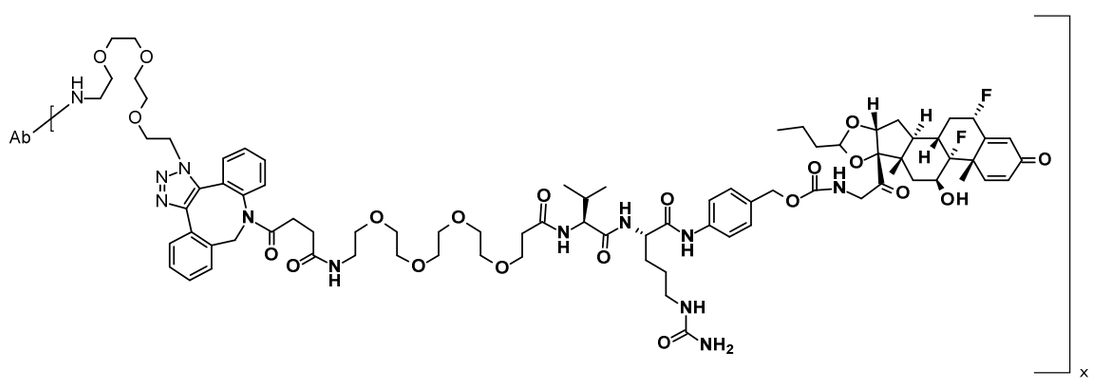
o mezclas de las mismas;



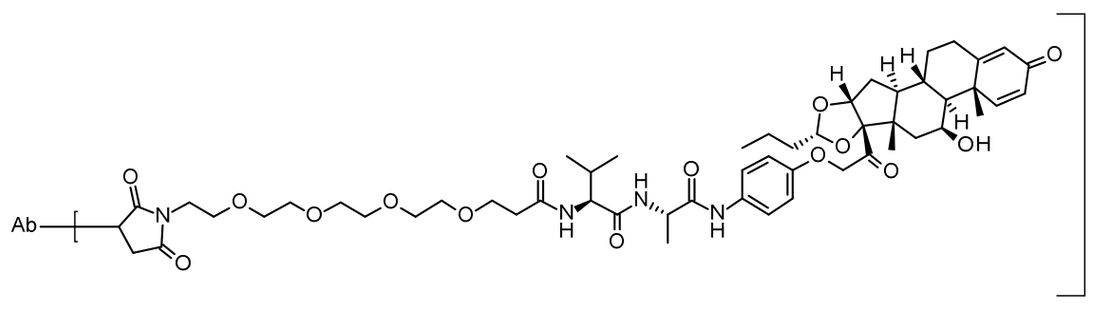


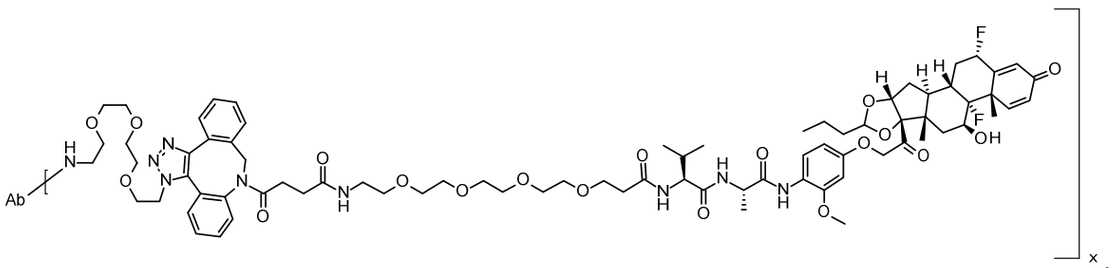
o mezclas de las mismas;

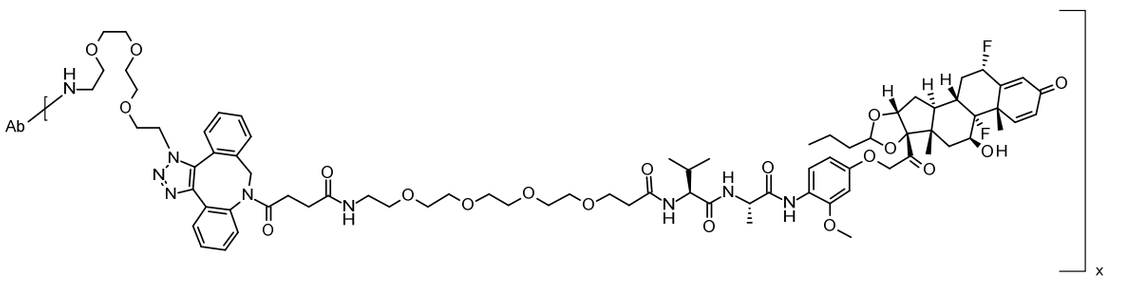




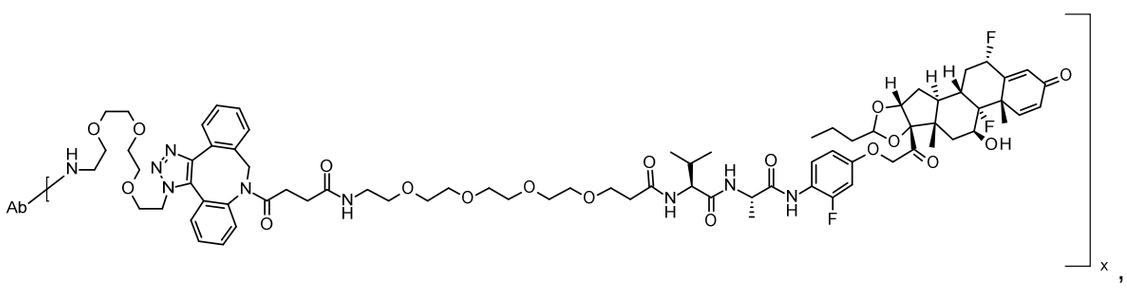
o mezclas de las mismas;

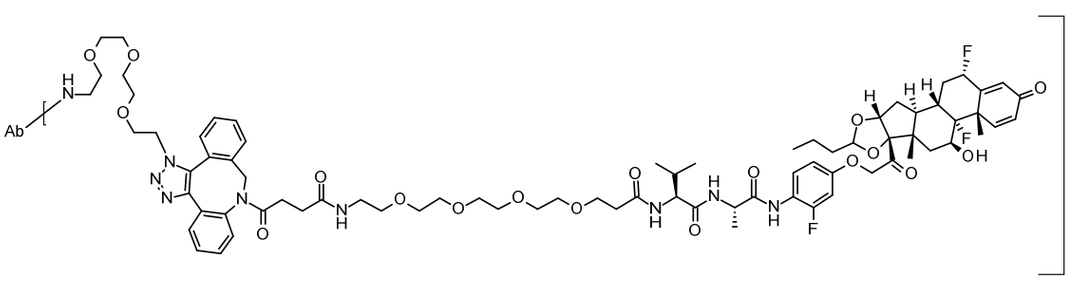




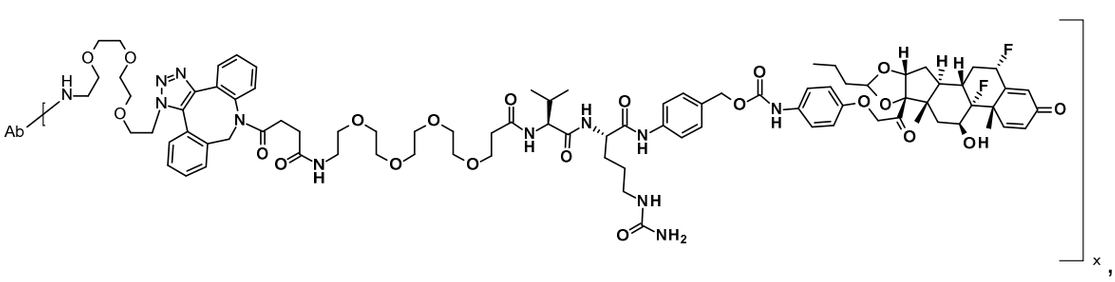


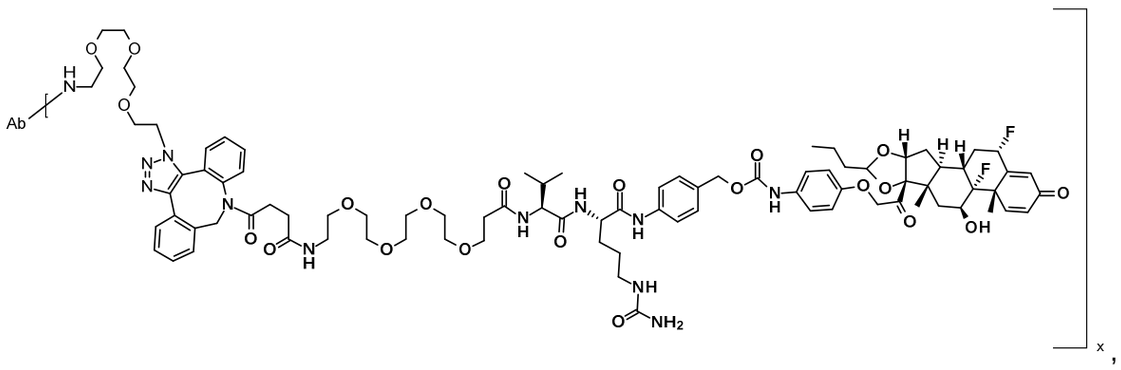
o mezclas de las mismas;





o mezclas de las mismas;





o mezclas de las mismas.

En modalidades particulares, Ab es un anticuerpo y x es un entero desde 1-30. En algunas modalidades, x es un entero desde 1 hasta 4. En algunas modalidades, x es 4. En algunas modalidades, x es 2.

[336] También se proporcionan aquí conjugados de agente de unión de budesonida o diflorasona.

[337] Los agentes de unión adecuados para cualquiera de los conjugados proporcionados en la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos, linfocinas, hormonas, factores de crecimiento, receptores virales, interleucinas, o cualquier otra molécula o sustancia de unión a células o de unión a péptidos.

[338] En algunas modalidades, el agente de unión es un anticuerpo. El término “anticuerpo”, según se utiliza aquí, significa cualquier molécula o complejo molecular de unión a antígeno que comprenda al menos una región de determinación de complementariedad (CDR) que se une específicamente a o interactúa con un antígeno particular. El término “anticuerpo” incluye moléculas de inmunoglobulina que comprenden cuatro cadenas de polipéptido, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces de disulfuro, así como multímeros de las mismas (por ejemplo, IgM). Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (abreviada aquí como HCVR o V_H) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada comprende tres dominios, C_H1, C_H2 y C_H3. Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (abreviada aquí como LCVR o V_L) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera comprende un dominio (C_L1). Las regiones V_H y V_L pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones de determinación de complementariedad (CDRs), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones de armazón (FR). Cada V_H y V_L está compuesta de tres CDRs y cuatro FRs, dispuestas desde el terminal amino hasta el terminal carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2,

FR3, CDR3, FR4. En algunas modalidades, las FRs del anticuerpo (o porción de unión a antígeno del mismo) pueden ser idénticas a las secuencias de línea germinal humana, o pueden ser naturalmente o artificialmente modificadas. Una secuencia de consenso de aminoácidos se puede definir con base en un análisis lado a lado de dos o más CDRs.

[339] El término “anticuerpo”, según se utiliza aquí, también incluye fragmentos de unión a antígeno de moléculas de anticuerpo completas. Los términos “porción de unión a antígeno” de un anticuerpo, “fragmento de unión a antígeno” de un anticuerpo, y similares, según se utiliza aquí, incluyen cualquier polipéptido o glicoproteína de origen natural, enzimáticamente obtenible, sintético, o genéticamente diseñado que se una específicamente a un antígeno para formar un complejo. Los fragmentos de unión a antígeno de un anticuerpo pueden derivarse, por ejemplo, a partir de moléculas de anticuerpo completas utilizando cualquier técnica estándar adecuada, tal como las técnicas de digestión proteolítica o de ingeniería genética recombinante que involucran la manipulación y la expresión de ADN que codifica dominios de anticuerpo variable y opcionalmente constante. Tal ADN es conocido y/o está fácilmente disponible a partir de, por ejemplo, fuentes comerciales, bibliotecas de ADN (incluyendo, por ejemplo, bibliotecas de fago-anticuerpos), o se puede sintetizar. El ADN puede secuenciarse y manipularse químicamente o mediante el uso de técnicas de biología molecular, por ejemplo, para disponer uno o más dominios variables y/o constantes en una configuración adecuada, o para introducir codones, crear residuos de cisteína, modificar, agregar o eliminar aminoácidos, etcétera.

[340] Ejemplos no limitantes de los fragmentos de unión a antígeno incluyen: (i) fragmentos Fab; (ii) fragmentos F(ab')2; (iii) fragmentos Fd; (iv) fragmentos Fv; (v) moléculas de cadena sencilla Fv (scFv); (vi) fragmentos dAb; y (vii) unidades de reconocimiento mínimo que consisten en los residuos de aminoácidos que imitan la región hipervariable de un anticuerpo (por ejemplo, una región de determinación de complementariedad (CDR) aislada tal como un péptido CDR3), o un péptido FR3-CDR3-FR4 restringido. Otras moléculas diseñadas, tales como anticuerpos específicos al dominio, anticuerpos de dominio sencillo, anticuerpos de dominio eliminado, anticuerpos quiméricos, anticuerpos injertados con CDR, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, minicuerpos, nanocuerpos (por ejemplo, nanocuerpos monovalentes, nanocuerpos bivalentes, etcétera), inmunofarmacéuticos modulares pequeños (SMIPs), y dominios de IgNAR variable de tiburón, también se incluyen dentro de la expresión “fragmento de unión a antígeno”, según

se utiliza aquí.

[341] Un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo típicamente comprenderá al menos un dominio variable. El dominio variable puede ser de cualquier tamaño o composición de aminoácidos y generalmente comprenderá al menos una CDR que es adyacente a o en marco con una o más secuencias de armazón. En los fragmentos de unión a antígeno que tienen un dominio de V_H asociado con un dominio de V_L, los dominios de V_H y V_L pueden situarse uno con relación al otro en cualquier disposición adecuada. Por ejemplo, la región variable puede ser dimérica y contener dímeros de V_H-V_H, V_H-V_L o V_L-V_L. Alternativamente, el fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo puede contener un dominio de V_H o V_L monomérico.

[342] En ciertas modalidades, un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo puede contener al menos un dominio variable unido covalentemente a al menos un dominio constante. Las configuraciones ejemplares, no limitantes, de los dominios variable y constante que pueden encontrarse dentro de un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo de la presente divulgación incluyen: (i) V_H-C_H1; (ii) V_H-C_H2; (iii) V_H-C_H3; (iv) V_H-C_H1-C_H2; (v) V_H-C_H1-C_H2-C_H3; (vi) V_H-C_H2-C_H3; (vii) V_H-C_L; (viii) V_L-C_H1; (ix) V_L-C_H2; (x) V_L-C_H3; (xi) V_L-C_H1-C_H2; (xii) V_L-C_H1-C_H2-C_H3; (xiii) V_L-C_H2-C_H3; y (xiv) V_L-C_L. En cualquier configuración de dominios variable y constante, incluyendo cualquiera de las configuraciones ejemplares listadas anteriormente, los dominios variable y constante pueden estar ya sea directamente unidos entre sí o pueden estar unidos por una región de enlazador o bisagra completa o parcial. Una región de bisagra puede consistir en al menos 2 (por ejemplo, 5, 10, 15, 20, 40, 60 o más) aminoácidos que dan como resultado una unión flexible o semiflexible entre dominios variable y/o constante adyacentes en una sola molécula de polipéptido. Además, un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo de la presente divulgación puede comprender un homo-dímero o hetero-dímero (u otro multímero) de cualquiera de las configuraciones de dominio variable y constante listadas anteriormente en asociación no covalente entre sí y/o con uno o más dominios V_H o V_L monoméricos (por ejemplo, mediante enlace(s) de disulfuro).

[343] Como con las moléculas de anticuerpo completas, los fragmentos de unión a antígeno pueden ser monoespecíficos o multiespecíficos (por ejemplo, biespecíficos). Un fragmento de unión a antígeno multiespecífico de un anticuerpo típicamente comprenderá al menos dos dominios variables diferentes, en donde cada dominio variable es capaz de unirse específicamente a un antígeno separado o a un epítope diferente en el mismo

antígeno. Cualquier formato de anticuerpo multiespecífico, incluyendo los formatos de anticuerpo biespecífico ejemplares aquí descritos, puede adaptarse para el uso en el contexto de un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo de la presente divulgación utilizando técnicas de rutina disponibles en la técnica.

[344] Los anticuerpos de la presente divulgación pueden funcionar a través de la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) o la citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC). La “citotoxicidad dependiente del complemento” (CDC) se refiere a la lisis de células que expresan antígeno por un anticuerpo de la presente divulgación en presencia del complemento. La “citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos” (ADCC) se refiere a una reacción mediada por células en que células citotóxicas no específicas que expresan receptores Fc (FcRs) (por ejemplo, células asesinas naturales (NK), neutrófilos, y macrófagos) reconocen el anticuerpo unido en una célula objetivo y por lo tanto conducen a la lisis de la célula objetivo. La CDC y la ADCC se pueden medir utilizando ensayos que son bien conocidos y están disponibles en la técnica. (*Véanse, por ejemplo*, las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 5,500,362 y 5,821,337, y Clynes *et al.* (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. (EE. UU.) *95*:652-656). La región constante de un anticuerpo es importante en la capacidad de un anticuerpo para fijar el complemento y mediar la citotoxicidad dependiente de células. Por lo tanto, el isotipo de un anticuerpo se puede seleccionar con base en si es deseable que el anticuerpo medie la citotoxicidad.

[345] Los anticuerpos útiles para los compuestos aquí incluyen anticuerpos humanos. El término “anticuerpo humano”, según se utiliza aquí, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica al sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*), por ejemplo en las CDRs y en particular CDR3. Sin embargo, el término “anticuerpo humano”, según se utiliza aquí, no pretende incluir anticuerpos en los cuales secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, han sido injertadas sobre secuencias de armazón humanas. El término “anticuerpo humano” no incluye moléculas existentes de manera natural que normalmente existen sin modificación o intervención/manipulación humana, en un organismo vivo existente de manera natural, no

modificado.

[346] Los anticuerpos pueden, en algunas modalidades, ser anticuerpos humanos recombinantes. El término “anticuerpo humano recombinante”, según se utiliza aquí, pretende incluir todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como los anticuerpos expresados utilizando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula hospedera (descrita más adelante), anticuerpos aislados a partir de una biblioteca de anticuerpos humanos combinatorios, recombinantes (descrita más adelante), anticuerpos aislados a partir de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico para los genes de inmunoglobulina humana (*véase, por ejemplo*, Taylor *et al.* (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295) o anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique el empalme de secuencias de genes de inmunoglobulina humana a otras secuencias de ADN. Tales anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables y constantes derivadas a partir de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. En ciertas modalidades, sin embargo, tales anticuerpos humanos recombinantes se someten a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se utiliza un animal transgénico para secuencias de Ig humana, mutagénesis somática *in vivo*) y, por lo tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones de V_H y V_L de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque se derivan de y se relacionan a las secuencias de V_H y V_L de línea germinal humana, pueden no existir naturalmente en el repertorio de línea germinal del anticuerpo humano *in vivo*.

[347] Los anticuerpos humanos pueden existir en dos formas que están asociadas con la heterogeneidad de la bisagra. En una forma, una molécula de inmunoglobulina comprende un constructo estable de cuatro cadenas de aproximadamente 150-160 kDa en que los dímeros se mantienen unidos mediante un enlace de disulfuro de cadena pesada entre cadenas. En una segunda forma, los dímeros no se unen a través de enlaces de disulfuro entre cadenas y una molécula de aproximadamente 75-80 kDa se forma compuesta de una cadena ligera y pesada covalentemente acoplada (medio anticuerpo). Estas formas han sido extremadamente difíciles de separar, incluso después de la purificación por afinidad.

[348] La frecuencia de aparición de la segunda forma en varios isotipos de IgG intactos se debe a, pero no se limita a, las diferencias estructurales asociadas con el isotipo de la región de bisagra del anticuerpo. Una sola sustitución de aminoácidos en la región de bisagra de la bisagra de IgG4 humana puede reducir significativamente la aparición de la

segunda forma (Angal *et al.* (1993) Molecular Immunology 30:105) a niveles típicamente observados utilizando una bisagra de IgG1 humana. La presente divulgación abarca anticuerpos que tienen una o más mutaciones en la bisagra, región de C_H2 o C_H3 que puede ser deseable, por ejemplo, en la producción, para mejorar el rendimiento de la forma del anticuerpo deseada.

[349] Los anticuerpos útiles para los compuestos aquí pueden ser anticuerpos aislados. Un “anticuerpo aislado”, según se utiliza aquí, significa un anticuerpo que ha sido identificado y separado y/o recuperado a partir de al menos un componente de su ambiente natural. Por ejemplo, un anticuerpo que se ha separado o removido a partir de al menos un componente de un organismo, o de un tejido o célula en que el anticuerpo existe naturalmente o se produce naturalmente, es un “anticuerpo aislado” para los propósitos de la presente divulgación. Un anticuerpo aislado también incluye un anticuerpo *in situ* dentro de una célula recombinante. Los anticuerpos aislados son anticuerpos que se han sometido a al menos una etapa de purificación o aislamiento. De acuerdo con ciertas modalidades, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otros químicos y/o materiales celulares.

[350] Los anticuerpos útiles para los compuestos aquí descritos pueden comprender una o más sustituciones, inserciones y/o deleciones de aminoácidos en las regiones de armazón y/o de CDR de los dominios variables de cadena pesada y ligera en comparación con las secuencias de línea germinal correspondientes a partir de las cuales se derivaron los anticuerpos. Tales mutaciones pueden determinarse fácilmente comparando las secuencias de aminoácidos aquí descritas a las secuencias de línea germinal disponibles a partir de, por ejemplo, bases de datos públicas de secuencias de anticuerpos. La presente divulgación incluye anticuerpos, y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que se derivan a partir de cualquiera de las secuencias de aminoácidos aquí descritas, en donde uno o más aminoácidos dentro de una o más regiones de armazón y/o de CDR están mutados al residuo(s) correspondiente de la secuencia de línea germinal a partir de la cual se derivó el anticuerpo, o al residuo(s) correspondiente de otra secuencia de línea germinal humana, o a una sustitución de aminoácidos conservadora del residuo(s) de línea germinal correspondiente (tales cambios de secuencia se refieren aquí colectivamente como “mutaciones de línea germinal”). Una persona de habilidad ordinaria en la técnica, comenzando con las secuencias de región variable de cadena pesada y ligera aquí descritas, puede producir fácilmente numerosos anticuerpos y fragmentos de unión a

antígeno que comprenden una o más mutaciones de línea germinal individuales o combinaciones de las mismas. En ciertas modalidades, todos los residuos de armazón y/o de CDR dentro de los dominios V_H y/o V_L se vuelven a mutar a los residuos encontrados en la secuencia de línea germinal original a partir de la cual se derivó el anticuerpo. En otras modalidades, solo ciertos residuos se vuelven a mutar a la secuencia de línea germinal original, por ejemplo, solo los residuos mutados encontrados dentro de los primeros 8 aminoácidos de FR1 o dentro de los últimos 8 aminoácidos de FR4, o solo los residuos mutados encontrados dentro de CDR1, CDR2 o CDR3. En otras modalidades, uno o más de los residuos de armazón y/o de CDR se mutan al residuo(s) correspondiente de una secuencia de línea germinal diferente (es decir, una secuencia de línea germinal que es diferente de la secuencia de línea germinal a partir de la cual el anticuerpo fue originalmente derivado). Adicionalmente, los anticuerpos de la presente divulgación pueden contener cualquier combinación de dos o más mutaciones de línea germinal dentro de las regiones de armazón y/o de CDR, por ejemplo, en donde ciertos residuos individuales se mutan al residuo correspondiente de una secuencia de línea germinal particular mientras que ciertos otros residuos que difieren de la secuencia de línea germinal original se mantienen o se mutan al residuo correspondiente de una secuencia de línea germinal diferente. Una vez obtenidos, los anticuerpos y los fragmentos de unión a antígeno que contienen una o más mutaciones de línea germinal pueden ensayarse fácilmente para una o más propiedades deseadas tales como, especificidad de unión mejorada, afinidad de unión aumentada, propiedades biológicas agonistas o antagonistas realzadas o mejoradas (según pueda ser el caso), inmunogenicidad reducida, etcétera.

[351] En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, anticuerpo policlonal, fragmento de anticuerpo (Fab, Fab', y F(ab)2, minicuerpo, diacuerpo, tricuerpo, y similares), o anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos aquí pueden humanizarse utilizando los métodos descritos en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 6,596,541 y la Publicación de los Estados Unidos de Norteamérica No. 2012/0096572, cada una incorporada por referencia en su totalidad.

[352] Cuando el agente de unión es un anticuerpo, se une a un asociado de unión a antígeno que es un polipéptido y puede ser una molécula transmembrana (por ejemplo, un receptor) o un factor de crecimiento que podría ser glicosilado o fosforilado.

[353] Los objetivos adecuados a los que se une el agente de unión incluyen cualquier objetivo al que sea deseable la entrega de esteroides. En algunas modalidades, el

agente de unión es un anticuerpo, anticuerpo modificado, o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a un objetivo seleccionado a partir de: AXL, BAFFR, BCMA, componentes de lista BCR, BDCA2, BDCA4, BTLA, BTNL2 BTNL3, BTNL8, BTNL9, C10orf54, CCR1, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR9, CCR10, CD11c, CD137, CD138, CD14, CD168, CD177, CD19, CD20, CD209, CD209L, CD22, CD226, CD248, CD25, CD27, CD274, CD276, CD28, CD30, CD300A, CD33, CD37, CD38, CD4, CD40, CD44, CD45, CD46, CD47, CD48, CD5, CD52, CD55, CD56, CD59, CD62E, CD68, CD69, CD70, CD74, CD79a, CD79b, CD8, CD80, CD86, CD90.2, CD96, CLEC12A, CLEC12B, CLEC7A, CLEC9A, CR1, CR3, CRTAM, CSF1R, CTLA4, CXCR1/2, CXCR4, CXCR5, DDR1, DDR2, DEC–205, DLL4, DR6, FAP, FCamR, FCMR, FcR's, Fire, GITR, HHLA2, HLA clase II, HVEM, ICOSLG, IFNLR1, IL10R1, IL10R2, IL12R, IL13RA1, IL13RA2, IL15R, IL17RA, IL17RB, IL17RC, IL17RE, IL20R1, IL20R2, IL21R, IL22R1, IL22RA, IL23R, IL27R, IL29R, IL2Rg, IL31R, IL36R, IL3RA, IL4R, IL6R, IL5R, IL7R, IL9R, Integrinas, LAG3, LIFR, MAG/Siglec–4, MMR, MSR1, NCR3LG1, NKG2D, NKp30, NKp46, PDCD1, PROKR1, PVR, PVRIG, PVRL2, PVRL3, RELT, SIGIRR, Siglec–1, Siglec–10, Siglec–5, Siglec–6, Siglec–7, Siglec–8, Siglec–9, SIRPA, SLAMF7, TACI, componentes/asoc. de lista TCR, PTCRA, TCRb, CD3z, CD3, TEK, TGFBR1, TGFBR2, TGFBR3, TIGIT, TLR2, TLR4, TROY, TSLPR, TYRO, VLDLR, VSIG4, y VTCN1.

[354] Los enlazadores de agente de unión pueden unirse al agente de unión, por ejemplo, anticuerpo o molécula de unión a antígeno, a través de una unión en un aminoácido particular dentro del anticuerpo o molécula de unión a antígeno. Uniones de aminoácidos ejemplares que se pueden utilizar en el contexto de este aspecto de la divulgación incluyen, por ejemplo, lisina (*véase, por ejemplo*, US 5,208,020; US 2010/0129314; Hollander *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, 2008, 19:358–361; WO 2005/089808; US 5,714,586; US 2013/0101546; y US 2012/0585592), cisteína (*véase, por ejemplo*, US 2007/0258987; WO 2013/055993; WO 2013/055990; WO 2013/053873; WO 2013/053872; WO 2011/130598; US 2013/0101546; y US 7,750,116), selenocisteína (*véase, por ejemplo*, WO 2008/122039; y Hofer *et al*., *Proc. Natl. Acad. Sci., EE. UU, 2008, 105*:12451–12456), formil glicina (*véase, por ejemplo*, Carrico *et al*., *Nat. Chem*. *Biol.*, 2007, 3:321–322; Agarwal *et al*., *Proc. Natl. Acad. Sci., EE. UU., 2013, 110*:46–51, y Rabuka *et al*., *Nat. Protocols*, 2012*, 10*:1052–1067), aminoácidos no naturales (*véase, por ejemplo*, WO 2013/068874, y WO 2012/166559), y aminoácidos ácidos (*véase, por ejemplo*, WO 2012/05982). Los enlazadores pueden conjugarse a través de glutamina a través de conjugación quimio-

enzimática basada en transglutaminasa (*véase, por ejemplo*, *Dennler et al., Bioconjugate Chem*. 2014, 25, 569–578). Los enlazadores también pueden conjugarse a una proteína de unión a antígeno mediante la unión a carbohidratos (*véase, por ejemplo*, US 2008/0305497, WO 2014/065661, y Ryan *et al*., *Food & Agriculture Immunol.*, 2001, *13*:127–130) y enlazadores de disulfuro (*véase, por ejemplo*, WO 2013/085925, WO 2010/010324, WO 2011/018611, WO 2014/197854, y Shaunak *et al*., *Nat. Chem. Biol.*, 2006, *2*:312–313). En algunos ejemplos, el agente de unión es un anticuerpo, y el anticuerpo está unido al enlazador a través de un residuo de lisina. En algunas modalidades, el anticuerpo está unido al enlazador a través de un residuo de cisteína.

D. MÉTODOS DE PREPARACIÓN DE COMPUESTOS

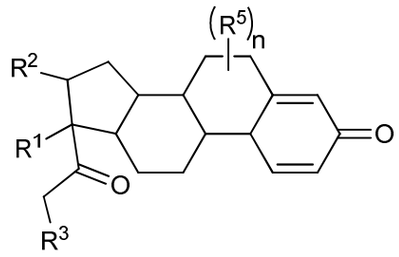
[355] Los conjugados aquí descritos se pueden sintetizar acoplando los enlazador-cargas útiles aquí descritas con un agente de unión, por ejemplo, anticuerpo bajo condiciones de conjugación estándar (*véase, por ejemplo*, *Drug Deliv*. Junio de 2016; 23(5):1662-6; *AAPS Journal*, Vol. 17, No. 2, Marzo de 2015; y *Int. J. Mol. Sci*. 2016, 17, 561, la totalidad de las cuales se incorpora aquí por referencia). Los enlazador-cargas útiles son intermedios sintéticos que comprenden la carga útil de interés y el radical de enlace que en última instancia sirve como el radical (o la porción del mismo) que conecta el agente de unión con la carga útil. Los enlazador-cargas útiles comprenden un grupo reactivo que reacciona con el agente de unión para formar los conjugados aquí descritos. Cuando el agente de unión es un anticuerpo, el anticuerpo se puede acoplar a un enlazador-carga útil a través de una o más cisteína, lisina, u otro residuo del anticuerpo. Los enlazador-cargas útiles se pueden acoplar a residuos de cisteína, por ejemplo, sometiendo el anticuerpo a un agente de reducción, por ejemplo, ditioteritol, para escindir los enlaces de disulfuro del anticuerpo, purificando el anticuerpo reducido, por ejemplo, mediante filtración en gel, y posteriormente haciendo reaccionar el anticuerpo con un enlazador-carga útil que contiene un radical reactivo, por ejemplo, un grupo maleimido. Los solventes adecuados incluyen, pero no se limitan a, agua, DMA, DMF, y DMSO. Los enlazador-cargas útiles que contienen un grupo reactivo, por ejemplo, éster activado o grupo haluro de ácido, pueden acoplarse a residuos de lisina. Los solventes adecuados incluyen, pero no se limitan a, agua, DMA, DMF, y DMSO. Los conjugados se pueden purificar utilizando técnicas de proteínas conocidas, incluyendo, por ejemplo, cromatografía de exclusión por tamaño, diálisis, y ultrafiltración/diafiltración.

[356] Los agentes de unión, por ejemplo, anticuerpos, también pueden conjugarse

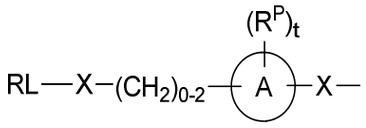
mediante una reacción de química clic. En algunas modalidades de dicha reacción de química clic, el enlazador-carga útil comprende un grupo reactivo, por ejemplo, un alquino que es capaz de experimentar una reacción de cicloadición 1,3 con una azida. Tales grupos reactivos adecuados incluyen, pero no se limitan a, alquinos tensionados, por ejemplo, aquellos adecuados para cicloadiciones de alquino-azida promovidas por tensión (SPAAC), cicloalquinos, por ejemplo, ciclooctinos, alquinos benzanulados, y alquinos capaces de experimentar reacciones de cicloadición 1,3 con azidas en ausencia de catalizadores de cobre. Los alquinos adecuados también incluyen, pero no se limitan a, DIBAC, DIBO, BARAC, DIFO, alquinos sustituidos, por ejemplo, fluorados, aza-cicloalquinos, BCN, y derivados de los mismos. Los enlazador-cargas útiles que comprenden tales grupos reactivos son útiles para conjugar anticuerpos que han sido funcionalizados con grupos azido. Tales anticuerpos funcionalizados incluyen anticuerpos funcionalizados con grupos azido-polietilenglicol. En ciertas modalidades, tal anticuerpo funcionalizado se deriva haciendo reaccionar un anticuerpo que comprende al menos un residuo de glutamina, por ejemplo, la cadena pesada Q295, con un compuesto de acuerdo con la fórmula $H_2N–LL–N_3$, en donde LL es un grupo de polietilenglicol divalente, en presencia de la enzima transglutaminasa. Por conveniencia, en ciertas Fórmulas aquí, el anticuerpo Ab es un anticuerpo modificado, con uno o más grupos $–LL–N_3$ covalentemente unidos, o residuos de los mismos. Preferiblemente, cada $–LL–N_3$ se une covalentemente a una cadena lateral de aminoácido de un residuo de glutamina del anticuerpo. También preferiblemente, el $–LL–N_3$ es o puede ser reaccionado con un grupo reactivo RG para formar un enlace covalente a un enlazador-carga útil. Nuevamente por conveniencia, en ciertas fórmulas aquí, los grupos -$LL–N_3$ están expresamente dibujados.

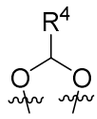
[357] Se establecen aquí métodos para sintetizar los conjugados aquí descritos que comprenden contactar un agente de unión, por ejemplo, anticuerpo, con un enlazador-carga útil aquí descrito. En ciertas modalidades, el enlazador-carga útil incluye un radical ciclodextrina.

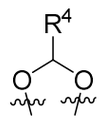
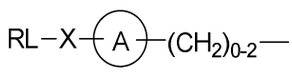
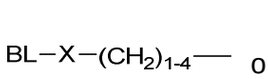
[358] En algunas modalidades, el enlazador carga útil es un compuesto de Fórmula (**II**):



(**II**)

(a) R^3 es RL–, RL–X–, o  ;

R^1 y R^2 son cada una, independientemente, –H, alquilo, alquil–C(O)–O–, –OH, o halo; o R^1 y R^2 conjuntamente forman  , en donde R^4 es alquilo, arilo, arilalquilo, o un heterocicloalquilo que contiene N; en donde el alquilo, arilo, arilalquilo, y heterocicloalquilo que contiene N están opcionalmente sustituidos con $–NR^aR^b$; o

(b) R^3 es –OH, alquil–C(O)–O–, heteroalquilo, $–NR^aR^b$ o ariloxi, en donde el alquil–C(O)–O–, heteroalquilo, o ariloxi opcionalmente está sustituido con $–NR^aR^b$ o halo, y R^1 y R^2 conjuntamente forman  , en donde R^4 es –RL–,  ,  o RL–Y, en donde Y es un heterociclo divalente que contiene N;

RL es un enlazador reactivo;

R^5 es, independientemente en cada caso, –OH, halo, alquilo, o arilalquilo;

R^a y R^b son, independientemente en cada caso, –H o alquilo;

R^P, independientemente en cada caso, es halo;

X, independientemente en cada caso, es NR^a u O;

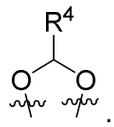
 es arilo o heteroarilo; y

n es un entero desde 0–19.

[359] Los compuestos de Fórmula (**II**) son enlazador-cargas útiles que son útiles como intermedios sintéticos en la síntesis de los conjugados aquí descritos. Estos enlazador-cargas útiles comprenden un grupo reactivo que puede reaccionar con un

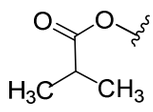
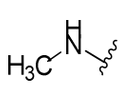
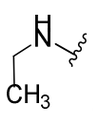
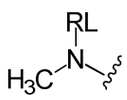
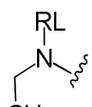
anticuerpo para formar los conjugados aquí descritos.

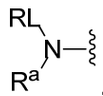
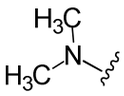
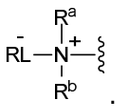
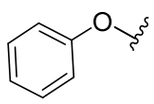
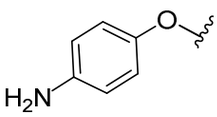
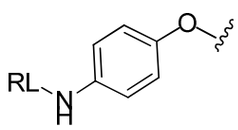
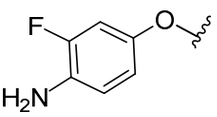
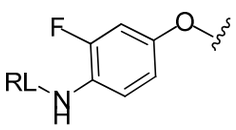
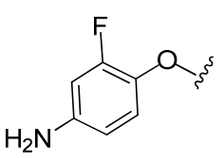
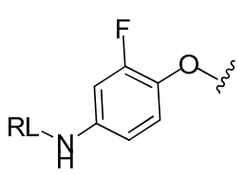
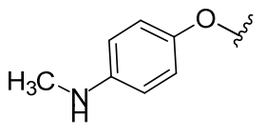
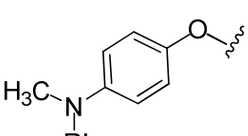
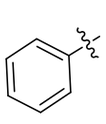
[360] En algunos ejemplos de Fórmula (**II**), R^1 y R^2 son, cada una, independientemente, –H, alquilo, u –OH. En algunos ejemplos de Fórmula (**II**), una de R^1 o R^2 es –H, alquilo, u –OH. En algunos ejemplos de Fórmula (**II**), ambas de R^1 y R^2 son ya sea –H, alquilo, u –OH.

[361] En algunos ejemplos de Fórmula (**II**), R^1 y R^2 conjuntamente forman  . En algunos ejemplos, R^4 es –RL. En algunos ejemplos, R^4 es RL–NR^a–arilo. En algunos otros ejemplos, R^4 es alquilo. En ciertos ejemplos, R^4 es arilalquilo, En algunos ejemplos, R^4 es arilo. En otros ejemplos, R^4 es heterocicloalquilo que contiene N. En algunos de estos ejemplos, el alquilo, arilo, arilalquilo, o heterocicloalquilo que contiene N opcionalmente está sustituido.

[362] En algunos ejemplos de Fórmula (**II**), R^5 es halo. En algunos ejemplos de Fórmula (**II**), R^5 es fluoro. En algunos ejemplos de Fórmula (**II**), una de R^5 es halo. En algunos ejemplos de Fórmula (**II**), R^5 es halo y n es 2. En algunos ejemplos de Fórmula (**II**), R^5 es –F y n es 1. En algunos ejemplos de Fórmula (**II**), R^5 es –F y n es 2.

[363] En algunos ejemplos de Fórmula (**II**), R^3 es RL. En algunos ejemplos de Fórmula (**II**), R^3 es RL–NR^a–ariloxi–. En algunos otros ejemplos de Fórmula (**II**), R^3 es –OH. En algunos otros ejemplos de Fórmula (**II**), R^3 es alquil–C(O)–O–. En algunos otros ejemplos de Fórmula (**II**), R^3 es heteroalquilo. En algunos otros ejemplos de Fórmula (**II**), R^3 es –N–R^aR^b. En algunos otros ejemplos de Fórmula (**II**), R^3 es arilo. En algunos otros ejemplos de Fórmula (**II**), R^3 es ariloxi. En algunos otros ejemplos de Fórmula (**II**), alquil–C(O)–O–, heteroalquilo, o ariloxi opcionalmente está sustituido con –NR^aR^b o halo.

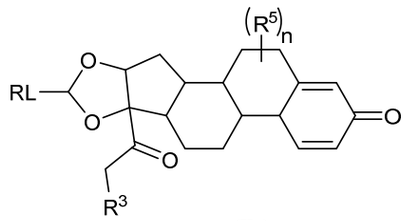
[364] En algunos ejemplos de Fórmula (**II**), R^3 es –OH. En algunos ejemplos de Fórmula (**II**), R^3 es alquil–C(O)–O–. En algunos ejemplos de Fórmula (**II**), R^3 es 
En algunos ejemplos de Fórmula (**II**), R^3 es heteroalquilo. En algunos ejemplos de Fórmula (**II**), R^3 es  o  . En algunos ejemplos de Fórmula (**II**), R^3 es  o  . En algunos ejemplos de Fórmula (**II**), R^3 es –NR^aR^b. En algunos ejemplos de

Fórmula (**II**), R^3 es  . En algunos ejemplos de Fórmula (**II**), R^3 es  . En algunos ejemplos de Fórmula (**II**), R^3 es  . En algunos ejemplos de Fórmula (**II**), R^3 es ariloxi. En algunos ejemplos de Fórmula (**II**), R^3 es  . En algunos ejemplos de Fórmula (**II**), R^3 es  . En algunos ejemplos de Fórmula (**II**), R^3 es  . En algunos ejemplos de Fórmula (**II**), R^3 es  . En algunos ejemplos de Fórmula (**II**), R^3 es  . En algunos ejemplos de Fórmula (**II**), R^3 es  . En algunos ejemplos de Fórmula (**II**), R^3 es  . En algunos ejemplos de Fórmula (**II**), R^3 es  . En algunos ejemplos de Fórmula (**II**), R^3 es  . En algunos ejemplos de Fórmula (**II**), R^3 es ariloxi sustituido con alquilo C1-C6. En algunos ejemplos de Fórmula (**II**), R^3 es . En algunos ejemplos de Fórmula (**II**), R^3 es . En algunos ejemplos de Fórmula (**II**), R^3 es . En algunos ejemplos de Fórmula (**II**), R^3 es . En algunos ejemplos de Fórmula (**II**), R^3 es  .

[365] En la Fórmula (**II**), el subíndice n es un entero desde 0–19. En algunos ejemplos, n es 0. En algunos otros ejemplos, n es 1. En ciertos ejemplos, n es 2. En algunos otros ejemplos, n es 3. En ciertos ejemplos, n es 4. En algunos ejemplos, n es 5. En algunos otros ejemplos, n es 6. En ciertos ejemplos, n es 7. En algunos otros ejemplos, n es 8. En ciertos ejemplos, n es 9. En algunos ejemplos, n es 10. En algunos otros ejemplos, n es 11. En ciertos ejemplos, n es 12. En algunos otros ejemplos, n es 13. En ciertos ejemplos, n es 14. En algunos ejemplos, n es 15. En algunos otros ejemplos, n es 16. En ciertos ejemplos, n es 17. En algunos otros ejemplos, n es 18. En ciertos ejemplos, n

es 19.

[366] En algunos ejemplos, se establece aquí un compuesto que tiene la estructura de la Fórmula (**IIa**):



(IIa) ;

en donde:

R^5 es, independientemente en cada caso, –OH, halo, o alquilo;

R^3 se selecciona a partir de –OH, alquil–C(O)–O–, heteroalquilo, $–NR^aR^b$ o ariloxi, en donde

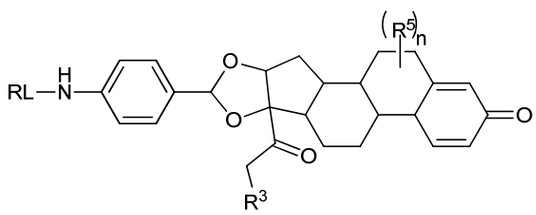
el alquil–C(O)–O–, heteroalquilo, o ariloxi opcionalmente está sustituido con $–NR^aR^b$ o halo;

RL es un enlazador reactivo;

R^a y R^b se seleccionan, independientemente en cada caso, a partir de H, alquilo, y alquil–C(O); y

n es un entero desde 0–19.

[367] En algunos ejemplos, se establece aquí un compuesto que tiene la estructura de la Fórmula (**IIa2**):



(**IIa2**);

en donde:

R^5 es, independientemente en cada caso, –OH, halo, o alquilo;

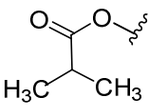
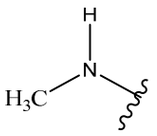
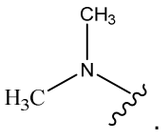
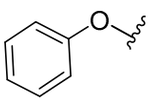
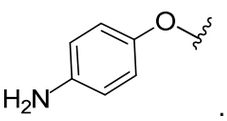
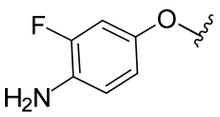
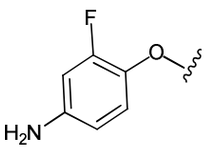
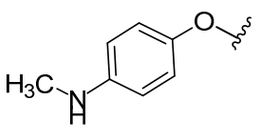
R^3 es –OH, alquil–C(O)–O–, heteroalquilo, $–NR^aR^b$ o ariloxi, en donde el alquil–C(O)–O–, heteroalquilo, o ariloxi opcionalmente está sustituido con $–NR^aR^b$ o halo;

RL es un enlazador reactivo;

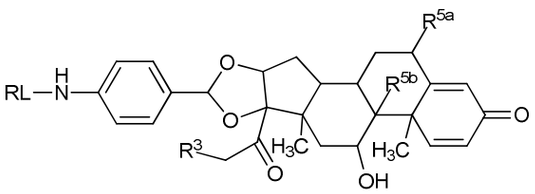
R^a y R^b se seleccionan, independientemente en cada caso, a partir de H, alquilo, o alquil–C(O); y

n es un entero desde 0–19.

En algunos ejemplos de Fórmula (**IIa2**), R^3 es –OH. En algunos ejemplos de Fórmula

(**IIa2**), R^3 es alquil–C(O)–O–. En algunos ejemplos R^3 es  En algunos ejemplos de Fórmula (**IIa2**), R^3 es heteroalquilo. En algunos ejemplos R^3 es  o. En algunos ejemplos de Fórmula (**IIa2**), R^3 es $–NR^aR^b$. En algunos ejemplos R^3 es  . En algunos ejemplos de Fórmula (**IIa2**), R^3 es ariloxi. En algunos ejemplos de Fórmula (**IIa2**), R^3 es  . En algunos ejemplos de Fórmula (**IIa2**), R^3 es  . En algunos ejemplos de Fórmula (**IIa2**), R^3 es  . En algunos ejemplos de Fórmula (**IIa2**), R^3 es  . En algunos ejemplos de Fórmula (**IIa2**), R^3 es  .

[368] En algunos ejemplos, el compuesto de Fórmula (**IIa2**) tiene la siguiente estructura:



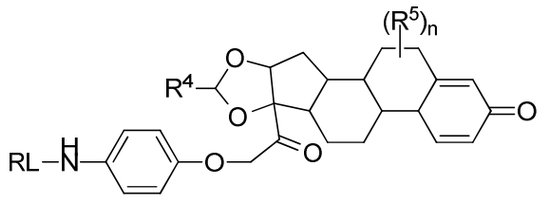
en donde:

R^3 es –OH o alquil–C(O)–O–;

R^{5a} y R^{5b} son cada una, independientemente, –F o H; y

RL es un enlazador reactivo.

[369] En algunos ejemplos, se establece aquí un compuesto que tiene la estructura de la Fórmula (**IIb**):



(**IIb**);

en donde

R^5 es, independientemente en cada caso, –OH, halo, o alquilo;

R^4 se selecciona a partir de alquilo, arilo, arilalquilo, o un heterocicloalquilo que contiene N, en donde el alquilo, arilo, arilalquilo, o heterocicloalquilo que contiene N están opcionalmente sustituidos con $–NR^aR^b$;

RL es un enlazador reactivo;

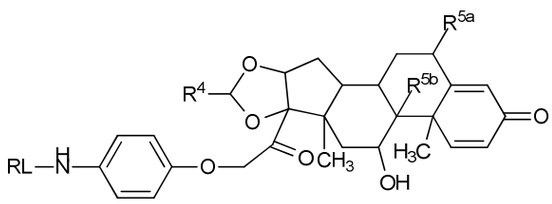
R^a y R^b se seleccionan, independientemente en cada caso, a partir de H, alquilo, y alquil–C(O); y

n es un entero desde 0–19.

[370] En algunos ejemplos de Fórmula (**IIb**), R^5 es halo. En algunos ejemplos de Fórmula (**IIb**), R^5 es fluoro. En algunos ejemplos de Fórmula (**IIb**), n es al menos 2, y dos de R^5 es halo. En algunos ejemplos de Fórmula (**IIb**), R^5 es F y n es 1. En algunos ejemplos de Fórmula (**IIb**), R^5 es –F.

[371] En algunos ejemplos de Fórmula (**IIb**), R^4 es alquilo. En algunos ejemplos de Fórmula (**IIb**), R^4 es metilo, etilo, *n*–propilo, *i*–propilo, *n*–butilo, *s*–butilo, *t*–butilo, *i*–butilo, un radical pentilo, un radical hexilo, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, o ciclohexilo. En algunos ejemplos de Fórmula (**IIb**), R^4 es *n*–propilo.

[372] En algunos ejemplos, el compuesto de Fórmula (**IIb**) tiene la siguiente estructura:



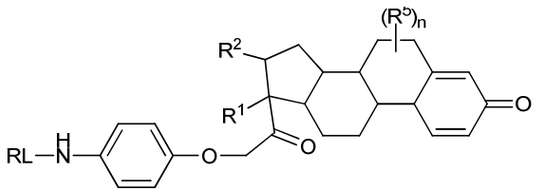
en donde:

R^4 es alquilo;

R^{5a} y R^{5b} son cada una, independientemente, –F o H; y

RL es un enlazador reactivo.

[373] En algunos ejemplos, se establece aquí un compuesto que tiene la estructura de la Fórmula (**IIc**):



(**IIc**);

en donde

R^1 y R^2 son, independientemente, –H, alquilo, alquil–C(O)–O–, –OH, o halo;

R^5 se selecciona, independientemente en cada caso, a partir de –OH, halo, o alquilo;

RL es un enlazador reactivo; y

n es un entero desde 0–19.

[374] En algunos ejemplos de Fórmula (**IIc**), R^5 es –halo. En algunos ejemplos de Fórmula (**IIc**), R^5 es fluoro. En algunos ejemplos de Fórmula (**IIc**), una de R^5 es halo. En algunos ejemplos de Fórmula (**IIc**), dos de R^5 es halo. En algunos ejemplos de Fórmula (**IIc**), R^5 es –F y n es 2.

[375] En algunos ejemplos de Fórmula (**IIc**), R^1 es CH_3.

[376] En otros ejemplos de Fórmula (**IIc**), R^1 es OH.

[377] En algunos otros ejemplos de Fórmula (**IIc**), R^1 es H.

[378] En algunos ejemplos de Fórmula (**IIc**), R^2 es CH_3.

[379] En otros ejemplos de Fórmula (**IIc**), R^2 es OH.

[380] En algunos otros ejemplos de Fórmula (**IIc**), R^2 es H.

[381] En algunos ejemplos de Fórmula (**IIc**), R^1 es CH_3 y R^2 es CH_3.

[382] En otros ejemplos de Fórmula (**IIc**), R^1 es CH_3 y R^2 es OH.

[383] En algunos ejemplos de Fórmula (**IIc**), R^1 es CH_3 y R^2 es H.

[384] En algunos otros ejemplos de Fórmula (**IIc**), R^1 es OH y R^2 es CH_3.

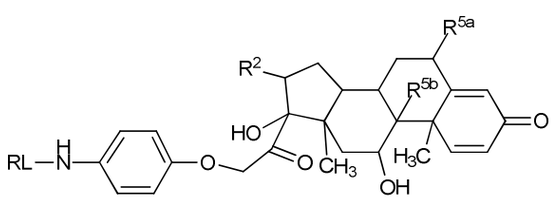
[385] En otros ejemplos de Fórmula (**IIc**), R^1 es OH y R^2 es OH.

[386] En algunos ejemplos de Fórmula (**IIc**), R^1 es H y R^2 es H.

[387] En algunos otros ejemplos de Fórmula (**IIc**), R^1 es H y R^2 es OH.

[388] En otros ejemplos de Fórmula (**IIc**), R^1 es H y R^2 es H.

[389] En algunas modalidades, el compuesto de Fórmula (**IIc**) tiene la siguiente estructura:



(**IIc**)

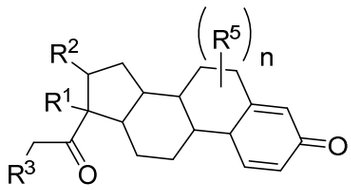
en donde:

R^2 es metilo;

R^{5a} y R^{5b} son cada una, independientemente, –F o H; y

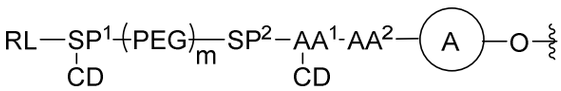
RL es un enlazador reactivo.

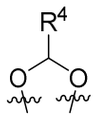
[390] En ciertas modalidades, se establece aquí un compuesto que tiene la estructura de la Fórmula (**III-R**):



(**III-R**);

en donde:



R^3 es ; R^1 y R^2 son cada una, independientemente, –H, alquilo, alquil–C(O)–O–, –OH, o halo; o R^1 y R^2 conjuntamente forman  , en donde R^4 es alquilo, arilo, arilalquilo, o un heterocicloalquilo que contiene N; en donde el alquilo, arilo, arilalquilo, y heterocicloalquilo que contiene N están opcionalmente sustituidos con $–NR^aR^b$;

R^5 es, independientemente en cada caso, –OH, halo, alquilo, o arilalquilo;

R^a y R^b son, independientemente en cada caso, –H o alquilo;

R^P, independientemente en cada caso, es halo;

 es arilo o heteroarilo;

t es un entero desde 0-2;

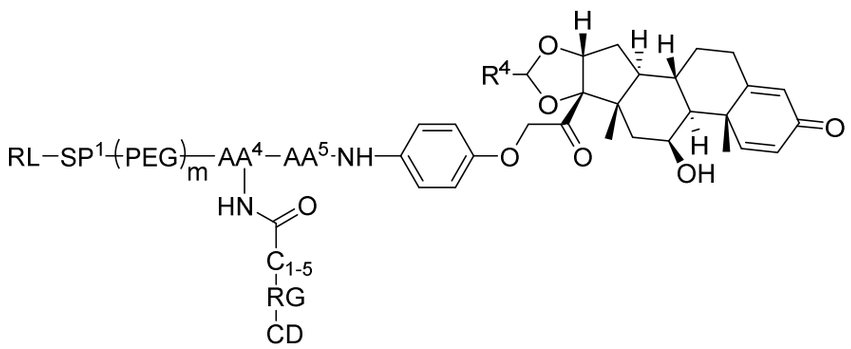
x es un entero desde 1–30; y en donde

RL es un enlazador reactivo, definido a continuación; **SP^1** y **SP^2** son cada uno, independientemente en cada caso, ausente o un residuo de grupo espaciador, y en donde **SP^1** comprende un enlazador trivalente; **AA^1** es un enlazador trivalente que comprende un residuo de aminoácido; **AA^2** es un residuo de di-péptido; **PEG** es un residuo de

polietilenglicol; en donde el  indica el átomo a través del cual el grupo químico indicado se une a los grupos adyacentes en la fórmula, **CD** es, independientemente en cada caso, ausente o un residuo de ciclodextrina, en donde al menos una **CD** está presente, el subíndice **m** es un entero desde 0 hasta 5; En estos ejemplos, el subíndice **m** es 0, 1, 2, 3, 4, o 5. En algunos ejemplos, el subíndice **m** es 0. En algunos ejemplos, el subíndice **m** es 1. En algunos ejemplos, el subíndice **m** es 2. En algunos ejemplos, el subíndice **m** es 3. En algunos ejemplos, el subíndice **m** es 4. En algunos ejemplos, el subíndice **m** es 5. En algunos ejemplos, cualquiera de $\mathbf{AA^1}$ o $\mathbf{AA^2}$ comprende, independientemente en cada caso, un aminoácido seleccionado a partir de alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina, triptófano, fenilalanina, prolina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina, glutamina, ácido aspártico, ácido glutámico, lisina, arginina, histidina, o citrulina, un derivado de los mismos, o una combinación de los mismos. En ciertas modalidades, $\mathbf{AA^1}$ es un aminoácido seleccionado a partir de alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina, triptófano, fenilalanina, prolina, glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina, glutamina, ácido aspártico, ácido glutámico, lisina, arginina, histidina, o citrulina, un derivado de los mismos, o una combinación de los mismos. En ciertas modalidades, $\mathbf{AA^1}$ es lisina. En ciertas modalidades, $\mathbf{AA^1}$ es lisina o un derivado de lisina. En ciertas modalidades, el $\mathbf{AA^2}$ es valina-citrulina. En algunas modalidades, el $\mathbf{AA^2}$ es citrulina-valina. En algunas modalidades, el $\mathbf{AA^2}$ es valina-alanina. En algunas modalidades, el $\mathbf{AA^2}$ es alanina-valina. En algunas modalidades, el $\mathbf{AA^2}$ es valina-glicina. En algunas modalidades, el $\mathbf{AA^2}$ es glicina-valina. En algunas modalidades, el $\mathbf{AA^2}$ glutamato-valina-citrulina. En algunas modalidades, el $\mathbf{AA^2}$ es glutamina-valina-citrulina. En algunas modalidades, el $\mathbf{AA^2}$ es lisina-valina-alanina. En algunas modalidades, el $\mathbf{AA^2}$ es lisina-valina-citrulina. En algunas modalidades, el $\mathbf{AA^2}$ es glutamato-valina-citrulina. En algunos ejemplos, $\mathbf{SP^1}$ se selecciona independientemente en cada caso a partir del grupo que consiste en alquileno de $C_{1\text{-}6}$, -NH-, -C(O)-, $(\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O})_e$, -NH-$CH_2$-$CH_2$-$(\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2)_e$-C(O)-, -C(O)-$(CH_2)_u$-C(O)-, -C(O)-NH-$(CH_2)_v$-, y combinaciones de los mismos, en donde el subíndice **e** es un entero desde 0 hasta 4, el subíndice **u** es un entero desde 1 hasta 8, y el subíndice **v** es un entero desde 1 hasta 8. En algunos ejemplos, $\mathbf{SP^2}$ se selecciona independientemente en cada caso a partir del grupo que consiste en alquileno de $C_{1\text{-}6}$, -NH-, -C(O)-, $(\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O})_e$, -NH-$CH_2$-$CH_2$-$(\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2)_e$-C(O)-, -C(O)-$(CH_2)_u$-C(O)-, -C(O)-NH-$(CH_2)_v$-, y combinaciones de los mismos, en donde el subíndice **e** es un entero desde 0 hasta 4, el subíndice **u** es un entero desde 1

hasta 8, y el subíndice **v** es un entero desde 1 hasta 8.

[391] En ciertas modalidades, se establece aquí un compuesto que tiene la estructura de la Fórmula (**IIIc-R**):



;

Fórmula (**IIIc-R**)

RL es un enlazador reactivo;

CD es una ciclodextrina;

SP^1 es un grupo espaciador;

AA^4 es un residuo de aminoácido;

AA^5 es un residuo de dipéptido;

PEG es polietilenglicol;

m es un entero desde 0 hasta 4;

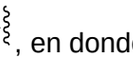
x es un entero desde 0 hasta 30;

R^4 es alquilo, arilo, arilalquilo, o un heterocicloalquilo que contiene N; en donde el alquilo, arilo, arilalquilo, y heterocicloalquilo que contiene N están opcionalmente sustituidos con $–NR^aR^b$;

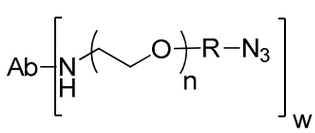
R^a y R^b son, independientemente en cada caso, –H o alquilo;

SP^1 y **SP^2** son cada uno, independientemente en cada caso, ausente o un residuo de grupo espaciador, y en donde **SP^1** comprende un enlazador trivalente; **AA^4** es un enlazador trivalente que comprende un residuo de aminoácido; **AA^5** es un residuo de dipéptido; **PEG** es un residuo de polietilenglicol; en donde el  indica el átomo a través del cual el grupo químico indicado se une a los grupos adyacentes en la fórmula, **CD** es, independientemente en cada caso, ausente o un residuo de ciclodextrina, en donde al menos una **CD** está presente, el subíndice **m** es un entero desde 0 hasta 5; En estos ejemplos, el subíndice **m** es 0, 1, 2, 3, 4, o 5. En algunos ejemplos, el subíndice **m** es 0. En algunos ejemplos, el subíndice **m** es 1. En algunos ejemplos, el subíndice **m** es 2. En algunos ejemplos, el subíndice **m** es 3. En algunos ejemplos, el subíndice **m** es 4. En

algunos ejemplos, el subíndice **m** es 5. En algunos ejemplos, cualquiera de **AA^4** o **AA^5** comprende, independientemente en cada caso, un aminoácido seleccionado a partir de alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina, triptófano, fenilalanina, prolina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina, glutamina, ácido aspártico, ácido glutámico, lisina, arginina, histidina, o citrulina, un derivado de los mismos, o una combinación de los mismos. En ciertas modalidades, **AA^4** es un aminoácido seleccionado a partir de alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina, triptófano, fenilalanina, prolina, glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina, glutamina, ácido aspártico, ácido glutámico, lisina, arginina, histidina, o citrulina, un derivado de los mismos, o una combinación de los mismos. En ciertas modalidades, **AA^4** es lisina. En ciertas modalidades, **AA^4** es lisina o un derivado de lisina. En ciertas modalidades, el **AA^5** es valina-citrulina. En algunas modalidades, el **AA^5** es citrulina-valina. En algunas modalidades, el **AA^5** es valina-alanina. En algunas modalidades, el **AA^5** es alanina-valina. En algunas modalidades, el **AA^5** es valina-glicina. En algunas modalidades, el **AA^5** es glicina-valina. En algunas modalidades, el **AA^5** glutamato-valina-citrulina. En algunas modalidades, el **AA^5** es glutamina-valina-citrulina. En algunas modalidades, el **AA^5** es lisina-valina-alanina. En algunas modalidades, el **AA^5** es lisina-valina-citrulina. En algunas modalidades, el **AA^5** es glutamato-valina-citrulina. En algunos ejemplos, **SP^1** se selecciona independientemente en cada caso a partir del grupo que consiste en alquileno de C_{1-6}, -NH-, -C(O)-, $(-CH_2-CH_2-O)_e$, -NH-CH_2-CH_2-$(-O-CH_2-CH_2)_e$-C(O)-, -C(O)-$(CH_2)_u$-C(O)-, -C(O)-NH-$(CH_2)_v$-, y combinaciones de los mismos, en donde el subíndice **e** es un entero desde 0 hasta 4, el subíndice **u** es un entero desde 1 hasta 8, y el subíndice **v** es un entero desde 1 hasta 8. En algunos ejemplos, **SP^2** se selecciona independientemente en cada caso a partir del grupo que consiste en alquileno de C_{1-6}, -NH-, -C(O)-, $(-CH_2-CH_2-O)_e$, -NH-CH_2-CH_2-$(-O-CH_2-CH_2)_e$-C(O)-, -C(O)-$(CH_2)_u$-C(O)-, -C(O)-NH-$(CH_2)_v$-, y combinaciones de los mismos, en donde el subíndice **e** es un entero desde 0 hasta 4, el subíndice **u** es un entero desde 1 hasta 8, y el subíndice **v** es un entero desde 1 hasta 8.

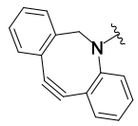
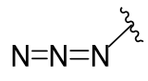
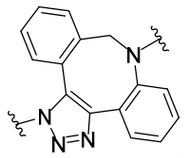
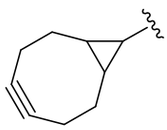
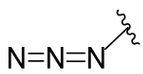
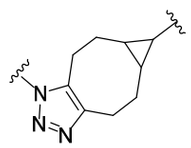
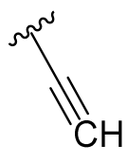
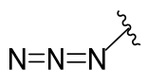
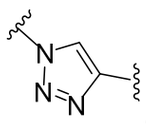
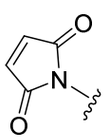
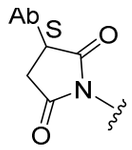
[392] Como se utiliza aquí, la frase “enlazador reactivo”, o la abreviatura “RL” se refiere a un grupo monovalente que comprende un grupo reactivo y un grupo de enlace, representado como,  , en donde RG es el grupo reactivo y L es el grupo de enlace. El grupo de enlace es cualquier radical divalente que una el grupo reactivo a una carga útil. El grupo de enlace también incluye cualquier radical trivalente que una el grupo reactivo, un radical ciclodextrina, y una carga útil. Los enlazadores reactivos (RL), conjuntamente con

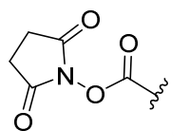
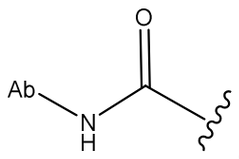
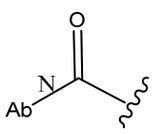
las cargas útiles a las cuales se unen, comprenden intermedios (“enlazador-cargas útiles”) útiles como precursores sintéticos para la preparación de los conjugados de esteroides de anticuerpos aquí descritos. El enlazador reactivo contiene un grupo reactivo (“RG”), que es un grupo funcional o radical que reacciona con una porción reactiva de un anticuerpo, anticuerpo modificado, o fragmento de unión a antígeno del mismo. El radical que resulta de la reacción del grupo reactivo con el anticuerpo, anticuerpo modificado, o fragmento de unión a antígeno del mismo, conjuntamente con el grupo de enlace, comprenden la porción de “enlazador de agente de unión” (“BL”) del conjugado, aquí descrita. En ciertas modalidades, el “grupo reactivo” es un grupo funcional o radical (por ejemplo, maleimida o éster de NHS) que reacciona con un residuo de cisteína o lisina de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo. En ciertas modalidades, el “grupo reactivo” es un grupo funcional o radical que es capaz de experimentar una reacción de química clic. En algunas modalidades de dicha reacción de química clic, el grupo reactivo es un alquino que es capaz de experimentar una reacción de cicloadición 1,3 con una azida. Tales grupos reactivos adecuados incluyen, pero no se limitan a, alquinos tensionados, por ejemplo, aquellos adecuados para cicloadiciones de alquino-azida promovidas por tensión (SPAAC), cicloalquinos, por ejemplo, ciclooctinos, alquinos benzanulados, y alquinos capaces de experimentar reacciones de cicloadición 1,3 con alquinos en ausencia de catalizadores de cobre. Los alquinos adecuados también incluyen, pero no se limitan a, DIBAC, DIBO, BARAC, alquinos sustituidos, por ejemplo, fluorados, aza-cicloalquinos, BCN, y derivados de los mismos. Los enlazador-cargas útiles que comprenden tales grupos reactivos son útiles para conjugar anticuerpos que han sido funcionalizados con grupos azido. Tales anticuerpos funcionalizados incluyen anticuerpos funcionalizados con grupos azido-polietilenglicol. En ciertas modalidades, tal anticuerpo funcionalizado se deriva haciendo reaccionar un anticuerpo que comprende al menos un residuo de glutamina, por ejemplo, la cadena pesada Q295, con un compuesto de acuerdo con la fórmula $H_2N–LL–N_3$, en donde LL es, por ejemplo, un grupo de polietilenglicol divalente, o en donde LL es un grupo trivalente que incluye polietilenglicol y un radical ciclodextrina, en presencia de la enzima transglutaminasa. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo funcionalizado que tiene la siguiente estructura:



en donde Ab es un anticuerpo, R es hidrocarbilo, n es un entero desde 1 hasta 10, w es un

entero desde 1-10. En ciertas modalidades, R es etileno. En ciertas modalidades, n es 3. En ciertas modalidades, w es 2 o 4.

En algunos ejemplos, el grupo reactivo es un alquino, por ejemplo,  , que puede reaccionar por medio de química clic con una azida, por ejemplo,  , para formar un producto de química clic, por ejemplo,  , su regioisómero, o una mezcla de los mismos. En algunos ejemplos, el grupo reactivo es un alquino, por ejemplo,  , que puede reaccionar por medio de química clic con una azida, por ejemplo,  para formar un producto de química clic, por ejemplo,  . En algunos ejemplos, el grupo reactivo es un alquino, por ejemplo,  , que puede reaccionar por medio de química clic con una azida, por ejemplo,  , para formar un producto de química clic, por ejemplo,  , su regioisómero, o una mezcla de los mismos. En algunos ejemplos, el grupo reactivo es un grupo funcional, por ejemplo,  , que reacciona con un residuo de cisteína en un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, para formar un enlace al mismo, por ejemplo,  , en donde Ab se refiere a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo y S se refiere al átomo S en un residuo de cisteína a través del cual el grupo funcional se une al Ab. En

algunos ejemplos, el grupo reactivo es un grupo funcional, por ejemplo,  , que reacciona con un residuo de lisina en un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, para formar un enlace al mismo, por ejemplo,  , en donde Ab se refiere a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo y –NH- se refiere al extremo del residuo de lisina a través del cual el grupo funcional se une al Ab. En algunos ejemplos, este átomo N en un residuo de lisina a través del cual se une el grupo funcional se indica aquí como la letra N sobre un enlace, por ejemplo,  .

[393] En algunas modalidades, RL es un radical monovalente de Fórmula (RL^A);

$RG–(SP^1)_q–(A)_z–(NR^a)_s–(B)_t–(CH_2)_u–(O)_v–(SP^2)_w–(RL^A)$;

en donde RG es un grupo reactivo;

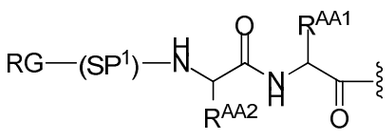
A es un aminoácido o un péptido;

R^a es H o alquilo;

B es arilo, heteroarilo, o heterocicloalquilo, en donde arilo, heteroarilo, o heterocicloalquilo opcionalmente está sustituido con alquilo, –OH, o $–N–R^aR^b$;

SP^1 y SP^2 son, independientemente, unos grupos espaciadores; y q, z, s, t, u, v, y w son, independientemente en cada caso, 0 o 1.

[394] En algunas modalidades, RL es $RG–(SP^1)_q–(A)_z–$. En algunas modalidades, RL es $RG–(SP^1)_q–(A)_2–$. En algunas modalidades, RL es un radical de Fórmula (**RL^{A1}**)



(**RL^{A1}**)

en donde R^{AA1} y R^{AA2} son cada una, independientemente, cadenas laterales de aminoácidos. En algunos ejemplos de Fórmula RL^{A1}, SP^1 es un grupo de polietilenglicol divalente y RG es un grupo que comprende un alquino que es capaz de experimentar una reacción de cicloadición 1,3 con una azida.

[395] En algunas modalidades, RL tiene la siguiente estructura:

$RG–(SP^1)q–Z^1–Z^2–Z^3{}_{0–1}–$

en donde:

RG, SP^1, y q son según se define aquí;

Z^1 es un grupo de caproilo o polietilenglicol;

Z^2 es un dipéptido; y

Z^3 es un grupo de PAB.

[396] En algunas otras modalidades, BL es un radical trivalente de Fórmula (**BL^B**);

$–RG^N–(SP^1)_q–(A)_z–(NR^a)_s–(B)_t–(CH_2)_u–(O)_v–(SP^2)_w–$(**$BL^B$**);

en donde RG^N es según se define aquí;

A es tripéptido, en donde al menos uno de los aminoácidos en el tripéptido se une directamente o indirectamente a un radical ciclodextrina;

R^a es H o alquilo;

B es arilo, heteroarilo, o heterocicloalquilo, en donde arilo, heteroarilo, o heterocicloalquilo opcionalmente está sustituido con alquilo, –OH, o $–NR^aR^b$;

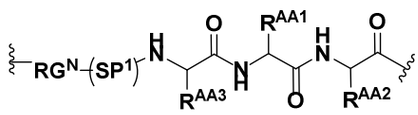
SP^1 y SP^2 son, independientemente, unos grupos espaciadores; y q, z, s, t, u, v, y w son, independientemente en cada caso, 0 o 1.

[397] En algunos ejemplos, la ciclodextrina (CD) se une directamente a un residuo de aminoácido, tal como un residuo de aminoácido lisina. Esto significa que la CD está una posición de enlace lejos del enlazador covalente del aminoácido lisina. En algunos de estos ejemplos, el enlazador covalente también se une directamente a un radical de carga útil. Esto significa que el enlazador covalente está una posición de enlace lejos de una carga útil tal como, pero no limitado a una carga útil de esteroides aquí establecida. En algunos de estos ejemplos, el enlazador covalente también se une directamente a un radical CD. Esto significa que el enlazador covalente está una posición de enlace lejos de una CD, tal como la CD(s) aquí establecida. En algunos de estos ejemplos, el enlazador covalente es un aminoácido lisina o un derivado del mismo.

[398] En algunos ejemplos, la CD se une indirectamente a un enlazador covalente en un grupo de enlace (por ejemplo, un BL). Esto significa que la CD está más que una posición de enlace lejos del enlazador covalente. Esto también significa que la CD se une a través de otro radical al enlazador covalente. Por ejemplo, la CD se puede unir a un grupo de maleimida que se une a un grupo de polietilenglicol que se une al enlazador covalente. En algunos de estos ejemplos, el enlazador covalente también se une indirectamente a un radical de carga útil. Esto significa que el enlazador covalente está más que una posición de enlace lejos de una carga útil tal como, pero no limitado a una carga útil de esteroides aquí

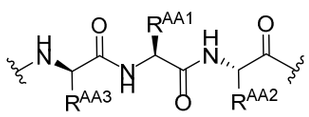
establecida. Esto también significa que el enlazador covalente se une a través de otro radical a la carga útil. Por ejemplo, el enlazador covalente puede estar unido a un dipéptido, tal como pero no limitado a Val-Ala o Val-Cit, que puede estar unido a para-amino benzoilo que puede estar unido a la carga útil. En algunos de estos ejemplos, el enlazador covalente también se une indirectamente a un radical ciclodextrina. Esto significa que el enlazador covalente está más que una posición de enlace lejos de una ciclodextrina, tal como las ciclodextrinas aquí establecidas. Esto también significa que el enlazador covalente se une a través de otro radical a la ciclodextrina. Por ejemplo, el enlazador covalente puede estar unido a un grupo de polietilenglicol que puede estar unido al grupo reactivo que puede estar unido a la ciclodextrina. En algunos de estos ejemplos, el enlazador covalente es un aminoácido lisina o un derivado del mismo.

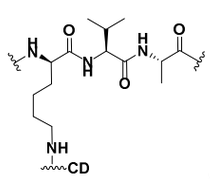
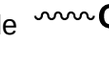
[399] En algunas modalidades, BL es $–RG^N–(SP^1)_q–(A)_z–$. En algunas modalidades, BL es $–RG^N–(SP^1)_q–(A)_2–$. En algunas modalidades, BL es un radical de la Fórmula (**BL^{B1}**)



(**BL^{B1}**)

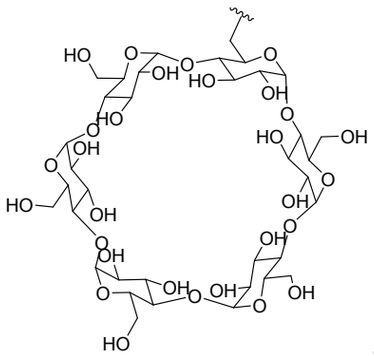
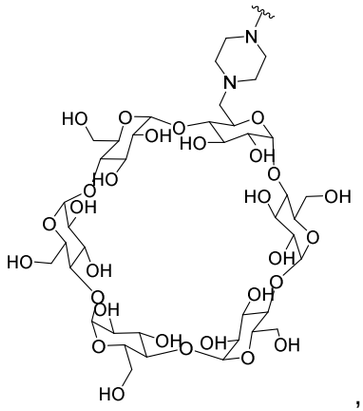
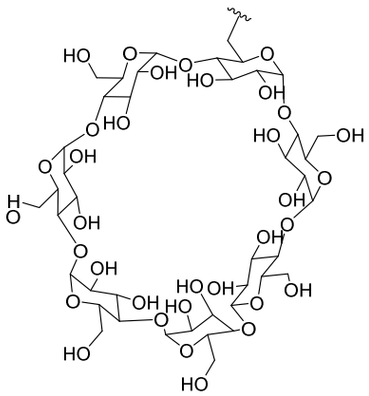
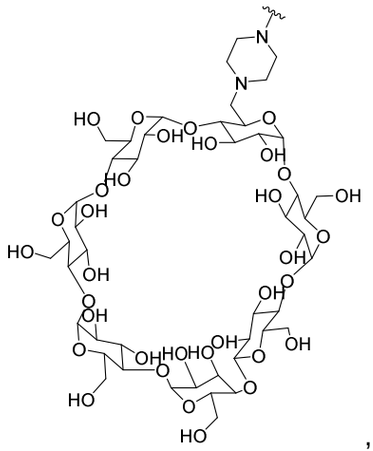
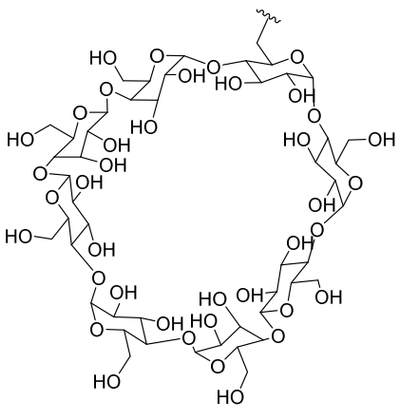
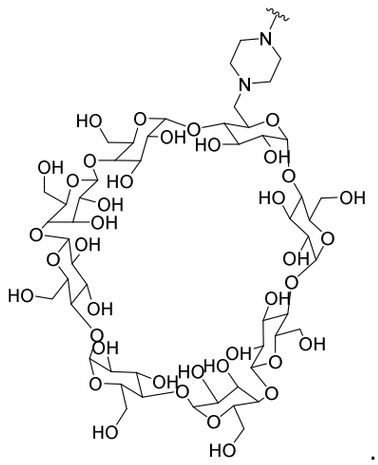
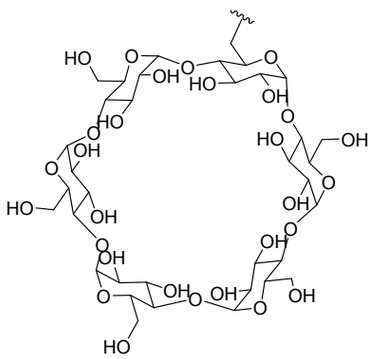
en donde R^{AA1} y R^{AA2} son cada una, independientemente, cadenas laterales de aminoácidos. R^{AA3} es una cadena lateral de aminoácidos que se une directamente o indirectamente a un radical ciclodextrina. En algunos ejemplos de Fórmula RL^{B1}, SP^1 es un grupo de polietilenglicol divalente y RG^N es un aducto de reacción de cicloadición 1,3 de la reacción entre un alquino y una azida.

[400] En algunos ejemplos, A es  . En algunos de estos ejemplos, R^{AA1} es una cadena lateral de aminoácidos, R^{AA2} es una cadena lateral de aminoácidos, y R^{AA3} es una cadena lateral de aminoácidos que se une directamente o indirectamente a un radical ciclodextrina.

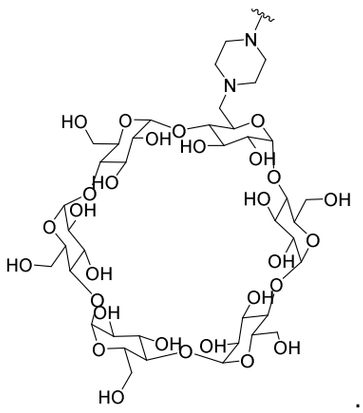
[401] En algunos ejemplos, A es  , en donde  representa un enlace directo o indirecto a un radical ciclodextrina.

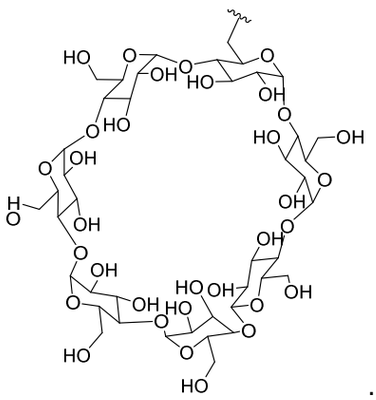
[402] En algunos ejemplos, incluyendo cualquiera de los anteriores, **CD** se

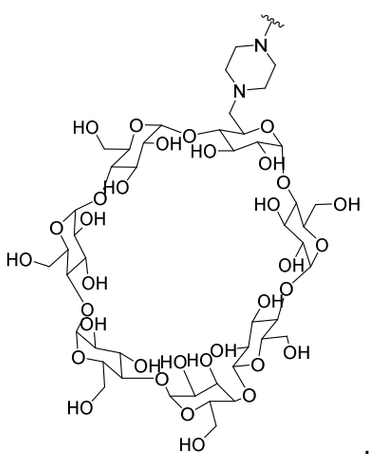
selecciona, independientemente en cada caso, a partir de

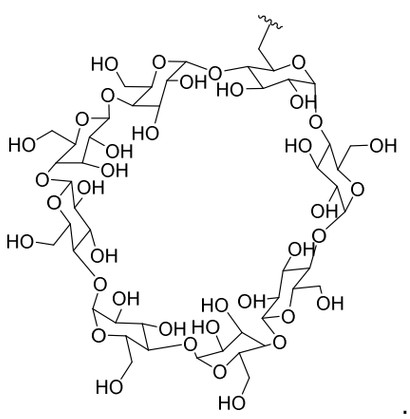

,

,

,

,

, y

.


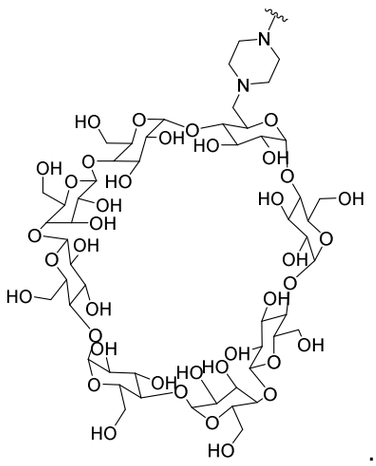
En algunos ejemplos, la CD es .

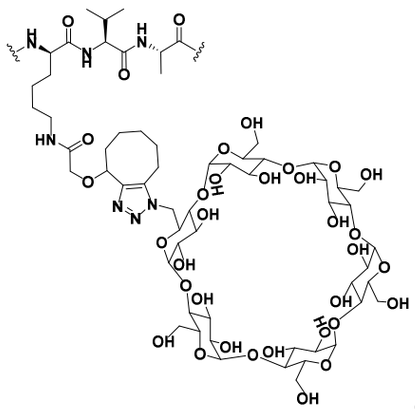
En algunos ejemplos, la CD es  .

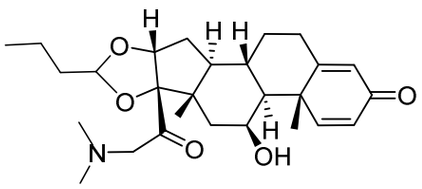
En algunos ejemplos, la CD es  .

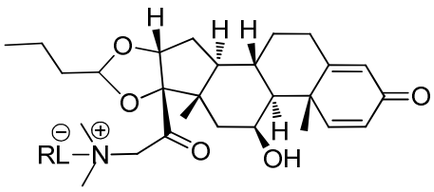
En algunos ejemplos, la CD es  .

En algunos ejemplos, la CD es  .

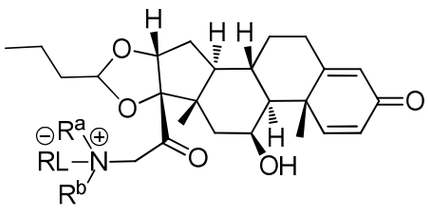
En algunos ejemplos, la CD es  .

[403] En algunos ejemplos, A es  .

[404] En algunas modalidades, el RL se une a una amina terciaria. Por ejemplo, si el esteroide es el siguiente compuesto,  , el RL puede enlazarse a la amina terciaria de la siguiente manera:

 .

[405] En algunos ejemplos, se establece un compuesto de la siguiente manera:

 ,

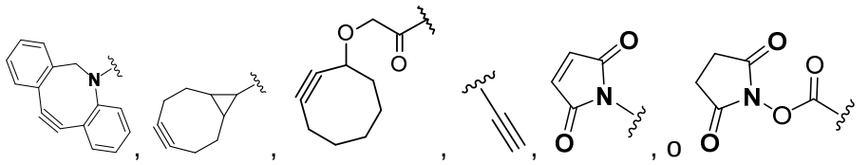
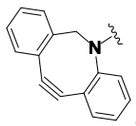
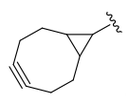
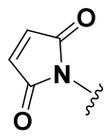
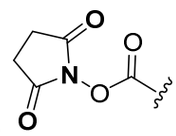
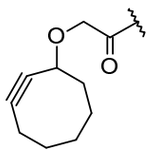
en donde:

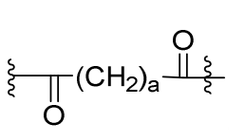
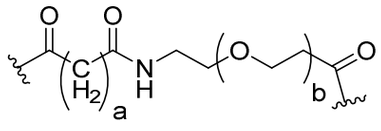
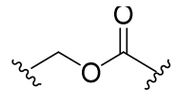
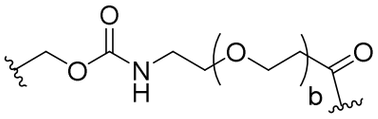
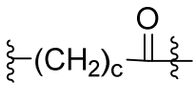
RL es un enlazador reactivo según se define anteriormente;

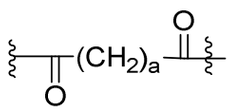
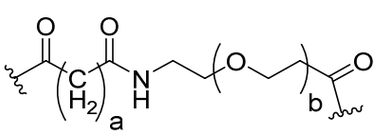
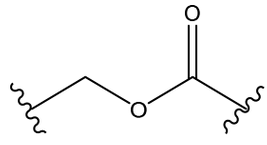
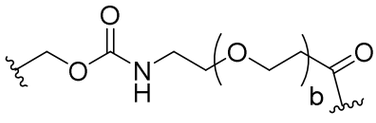
R^a y R^b son, independientemente en cada caso, –H o alquilo.

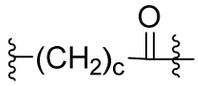
[406] En algunos ejemplos, aquí RG se selecciona a partir de un grupo reactivo de química clic.

[407] En algunos otros ejemplos, aquí RG se selecciona a partir de un grupo que reacciona con un residuo de cisteína o lisina en un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

[408] En algunas modalidades, RG es  . En algunos ejemplos, RG es  . En otros ejemplos, RG es  . En algunos otros ejemplos, RG es  . En algunos ejemplos, RG es  . En otros ejemplos, RG es  . En otros ejemplos, RG es  .

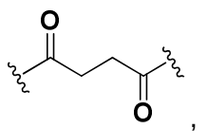
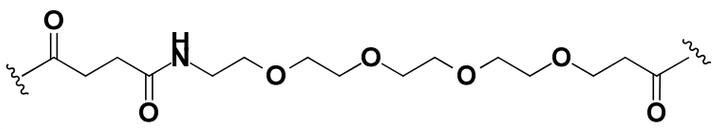
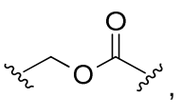
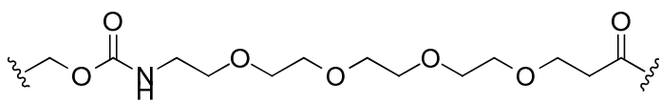
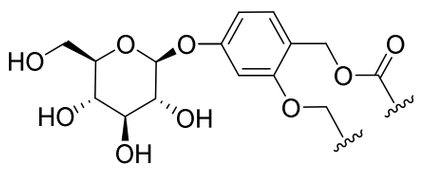
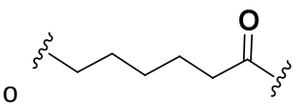
[409] En algunas modalidades, SP^1 se puede seleccionar a partir de:  ,  ,  ,  o  .

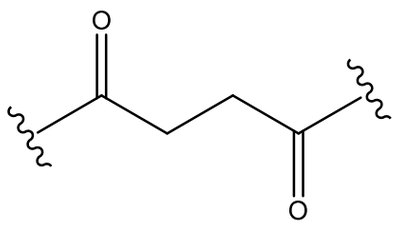
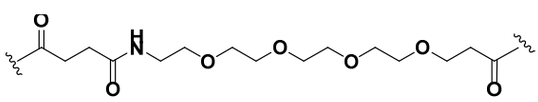
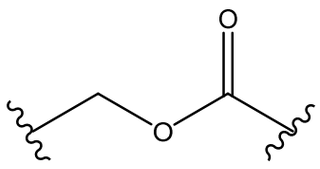
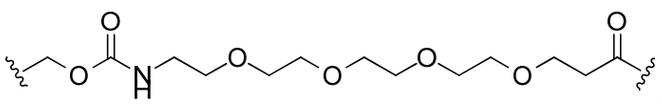
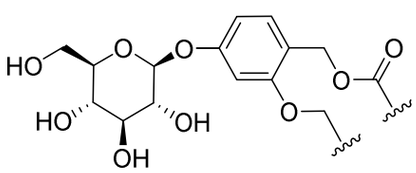
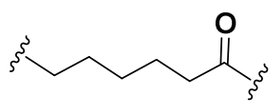
En algunos ejemplos, SP^1 es  . En algunos otros ejemplos, SP^1 es  . En otros ejemplos, SP^1 es  . En todavía otros ejemplos, SP^1 es  . En algunos otros ejemplos, SP^1 es

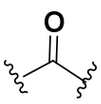

.

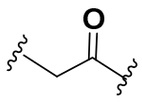
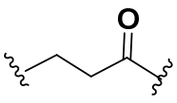
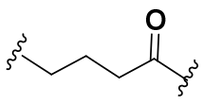
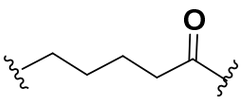
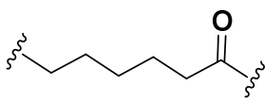
[410] En cualquiera de los ejemplos anteriores, los subíndices a, b, y c son independientemente, en cada caso, un entero desde 1 hasta 20.

[411] En cualquiera de los compuestos de Fórmula (**II**), (**IIa**), (**IIb**), o (**IIc**), SP^1 se puede seleccionar a partir de:

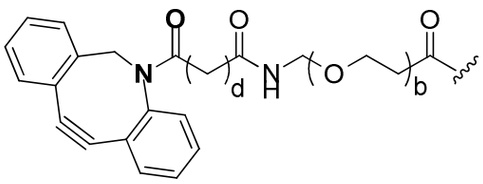
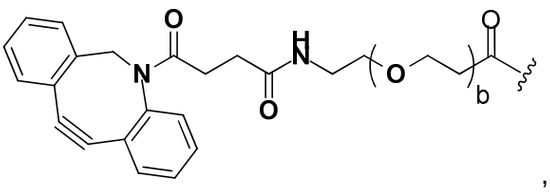
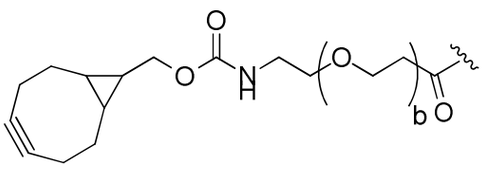
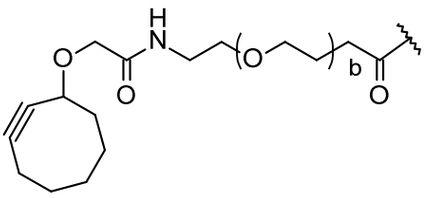
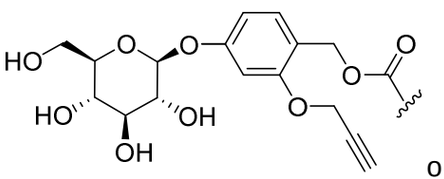
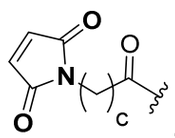

,

,

,

,

,

o .

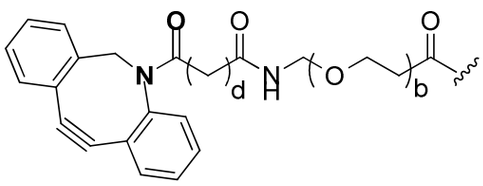
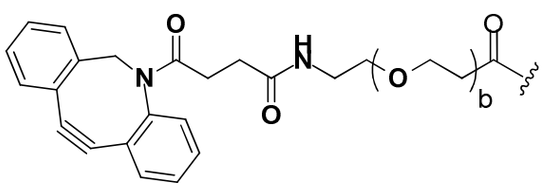
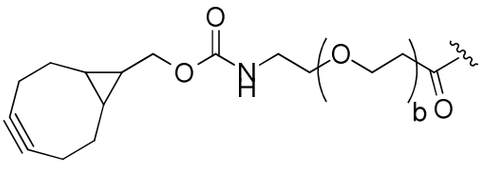
[412] En algunos ejemplos, SP^1 es  . En algunos ejemplos, SP^1 es  ,  . En algunos ejemplos, SP^1 es  . En algunos ejemplos, SP^1 es  . En algunos ejemplos, SP^1 es  .

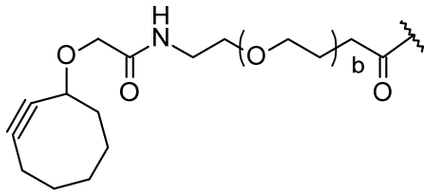
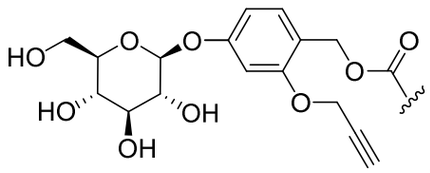
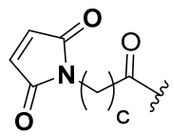
[413] En algunos ejemplos, SP^1 es  . En algunos ejemplos, SP^1 es

 . En algunos ejemplos, SP^1 es  . En algunos ejemplos, SP^1 es  . En algunos ejemplos, SP^1 es  . En algunos ejemplos, SP^1 es  .

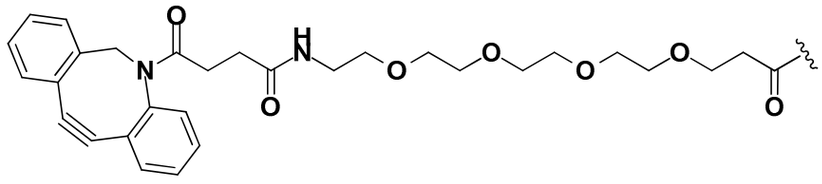
[414] En algunas modalidades, RL–SP^1 se puede seleccionar a partir del grupo que consiste en:

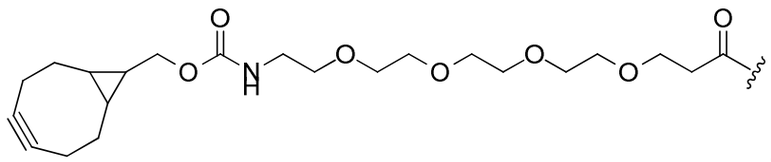
 ,  ,  ,  ,  o  . En algunos de estos ejemplos, los subíndices b, c, y d son independientemente, en cada caso, un entero desde 1 hasta 20.

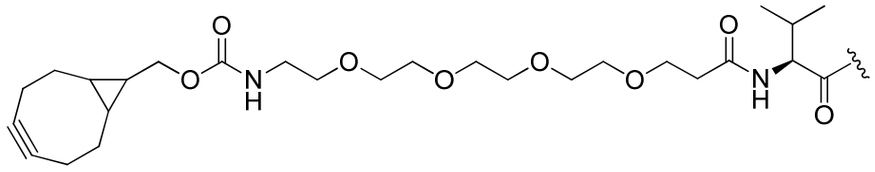
[415] En algunos ejemplos RL–SP^1– es  . En algunos ejemplos RL–SP^1 es  . En algunos ejemplos RL–SP^1 es  . En algunos ejemplos RL–SP^1

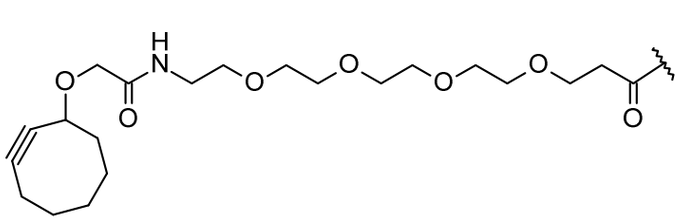
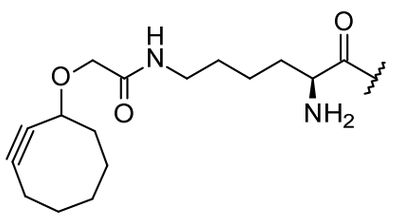
es  . En algunos ejemplos RL–SP[1] es  . En algunos ejemplos RL–SP[1] es  .

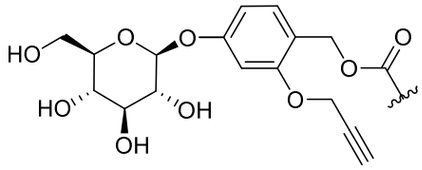
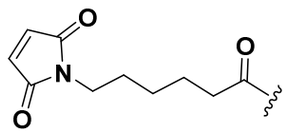
[416] En cualquiera de los compuestos de Fórmula (**II**), (**IIa**), (**IIb**), o (**IIc**), RL–SP[1] se selecciona a partir de:

 ,

 ,

 ,

 ,  ,

 o  ,

[417] En algunas modalidades, A es un péptido seleccionado a partir de valina–citrulina, citrulina–valina, lisina–fenilalanina, fenilalanina–lisina, valina–asparagina, asparagina–valina, treonina–asparagina, asparagina–treonina, serina–asparagina, asparagina–serina, fenilalanina–asparagina, asparagina–fenilalanina, leucina–asparagina,

asparagina–leucina, isoleucina–asparagina, asparagina–isoleucina, glicina–asparagina, asparagina–glicina, ácido glutámico–asparagina, asparagina–ácido glutámico, citrulina–asparagina, asparagina–citrulina, alanina–asparagina, o asparagina–alanina.

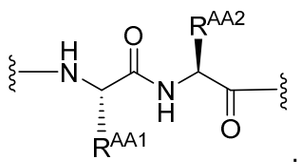
[418] En algunos ejemplos, A es valina–citrulina o citrulina–valina.

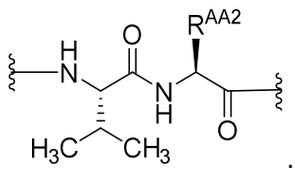
[419] En algunos ejemplos, A es valina–alanina o alanina–valina.

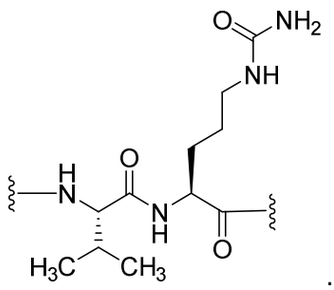
[420] En algunos ejemplos, A es valina.

[421] En algunos ejemplos, A es alanina.

[422] En algunos ejemplos, A es citrulina.

[423] En algunos ejemplos, A es  . En algunos de estos ejemplos, R^{AA1} es una cadena lateral de aminoácidos, y en donde R^{AA2} es una cadena lateral de aminoácidos.

[424] En algunos ejemplos, A es  .

[425] En algunos ejemplos, A es  .

[426] En algunos ejemplos, R^a es H

[427] En algunos ejemplos, R^a es alquilo

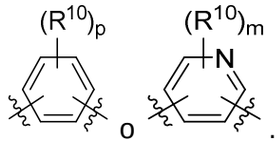
[428] En algunos ejemplos, R^a es metilo, etilo, n–propilo, i–propilo, n–butilo, t–butilo, i–butilo, o pentilo.

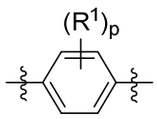
[429] En algunas modalidades, B es arilo.

[430] En algunos ejemplos, B es fenilo.

[431] En algunos ejemplos de compuestos de Fórmula (**II**), (**IIa**), (**IIb**), o (**IIc**), B es fenilo o piridinilo.

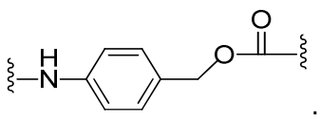
[432] En algunos ejemplos aquí, B es:



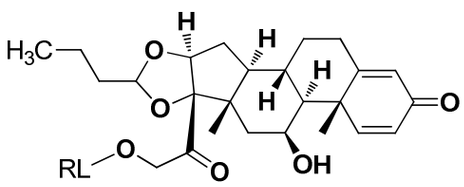
[433] En estos ejemplos, R^{10} es alquilo, alquenilo, alquinilo, alcoxi, arilo, alquilarilo, arilalquilo, halo, haloalquilo, haloalcoxi, heteroarilo, heterocicloalquilo, hidroxilo, ciano, nitro,  , NR^aR^b, o azido. En estos ejemplos, los subíndices p y m se seleccionan independientemente, en cada caso, a partir de un entero desde 0 hasta 4. En algunos ejemplos aquí, B es:  .

En estos ejemplos, p es 0, 1, 2, 3 o 4. En algunos de estos ejemplos, R^1 es, independientemente en cada ocurrencia, alquilo, alcoxi, haloalquilo, o halo. En algunos ejemplos, R^1 es alquilo. En algunos ejemplos, R^1 es alcoxi. En algunos ejemplos, R^1 es haloalquilo. En algunos ejemplos, R^1 es halo.

[434] En algunas modalidades de Fórmula (RL^A), el $–(NR^a)_s–(B)_t–(CH_2)_u–(O)_v–(SP^2)_w$ es:

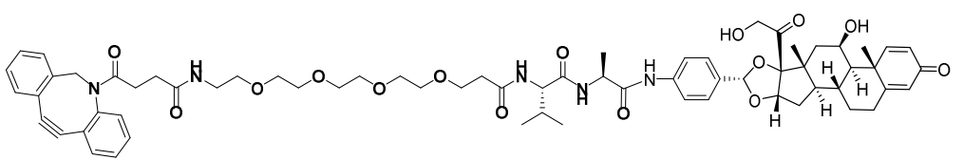
 .

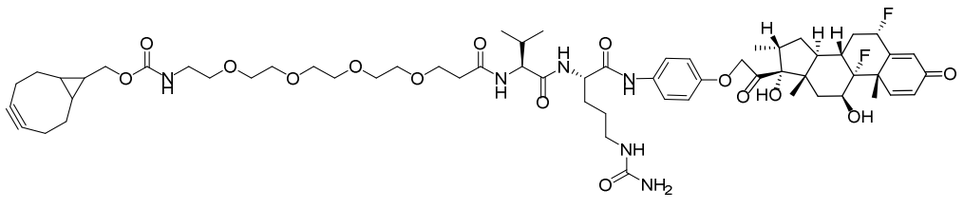
[435] También se proporcionan aquí enlazador–cargas útiles de budesonida o diflorasona. En algunas modalidades, se proporciona aquí un enlazador–carga útil que tiene la siguiente estructura:

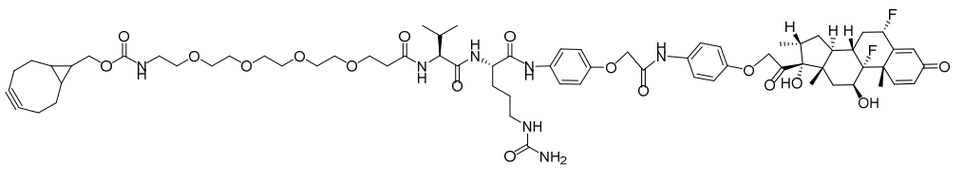


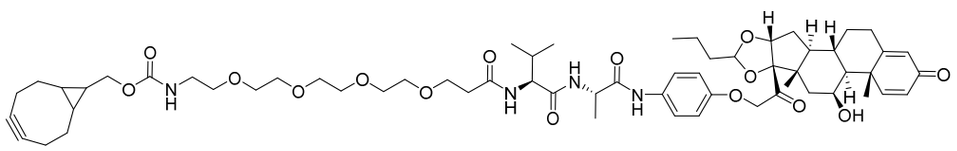
en donde RL es un enlazador reactivo.

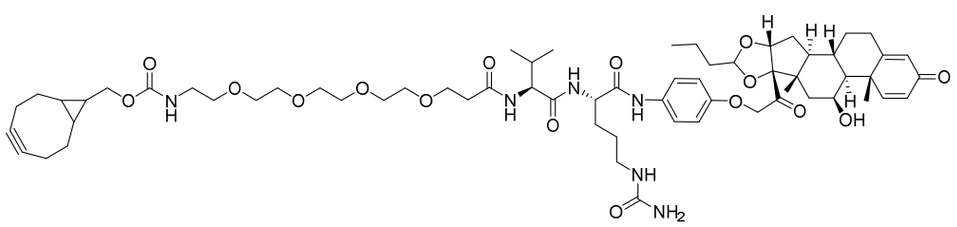
[436] Ejemplos de los enlazador-cargas útiles incluyen, pero no se limitan a:

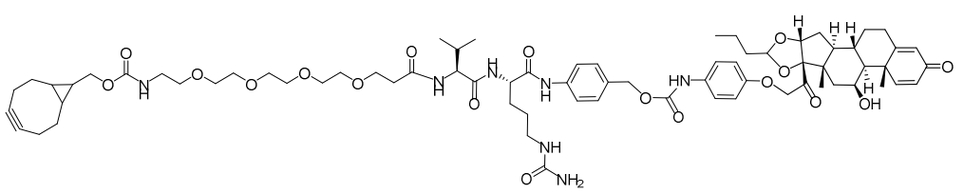




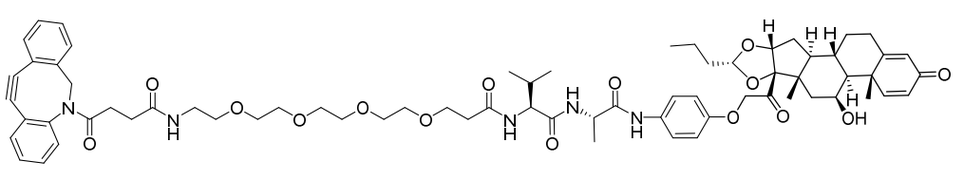


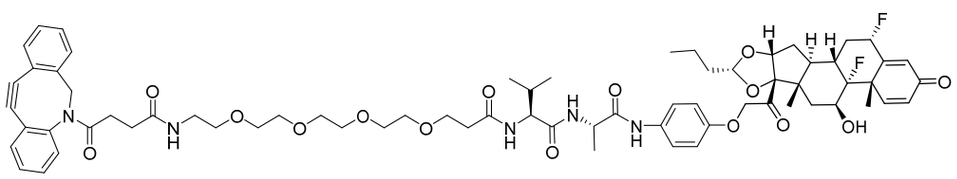


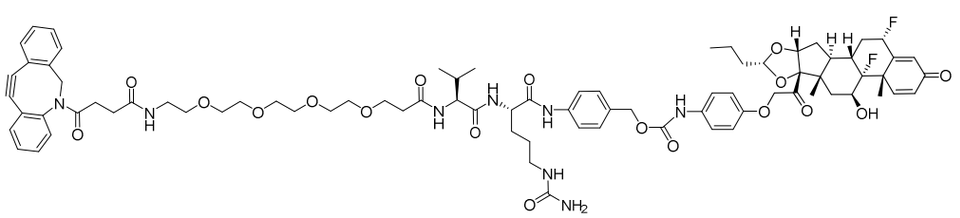


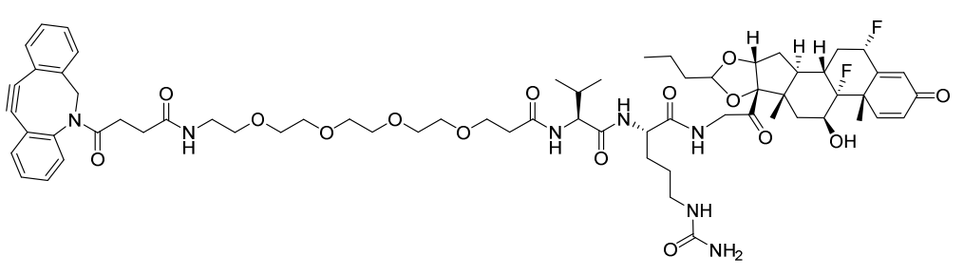


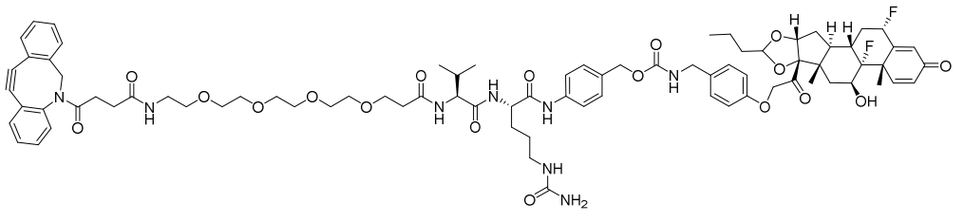
5

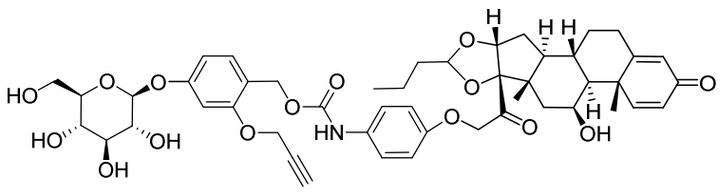


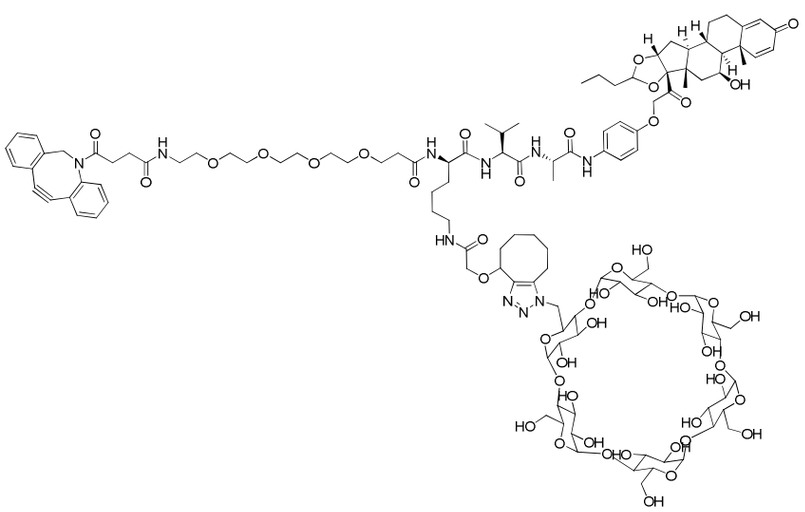


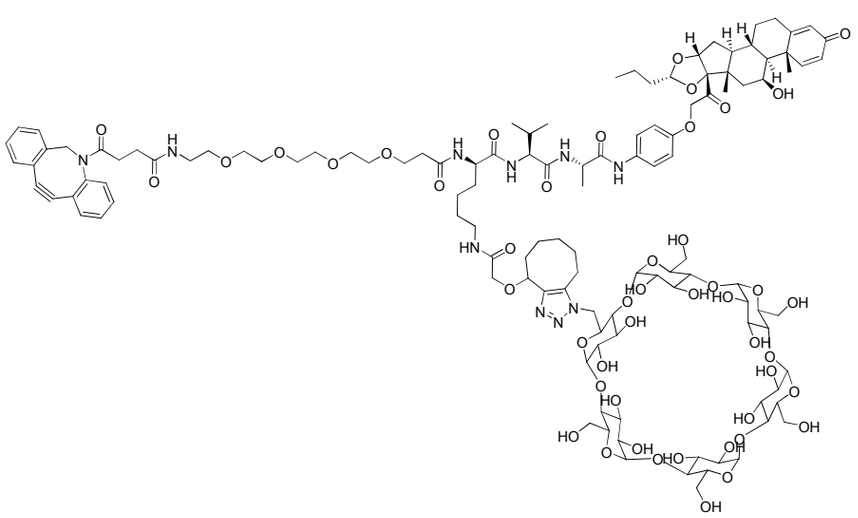


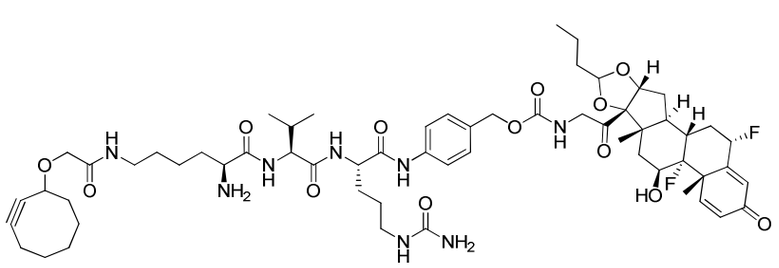




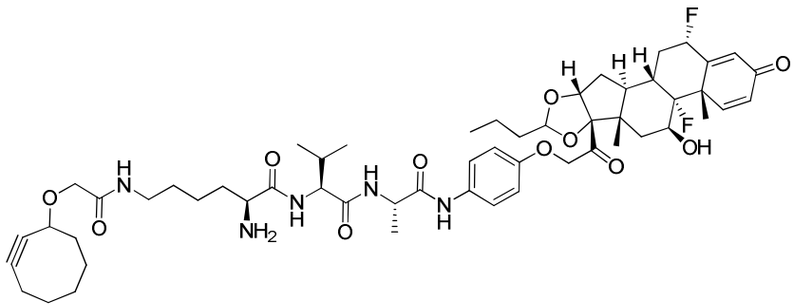


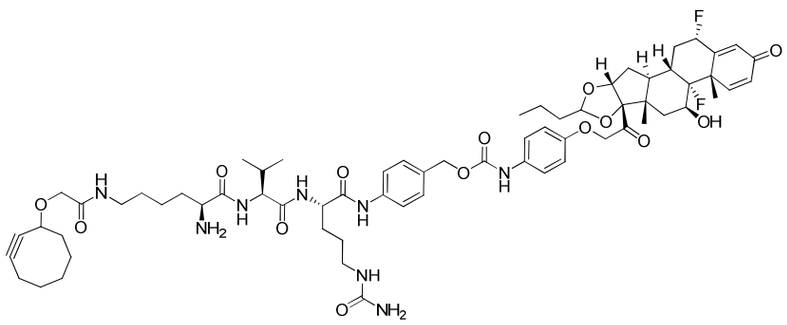


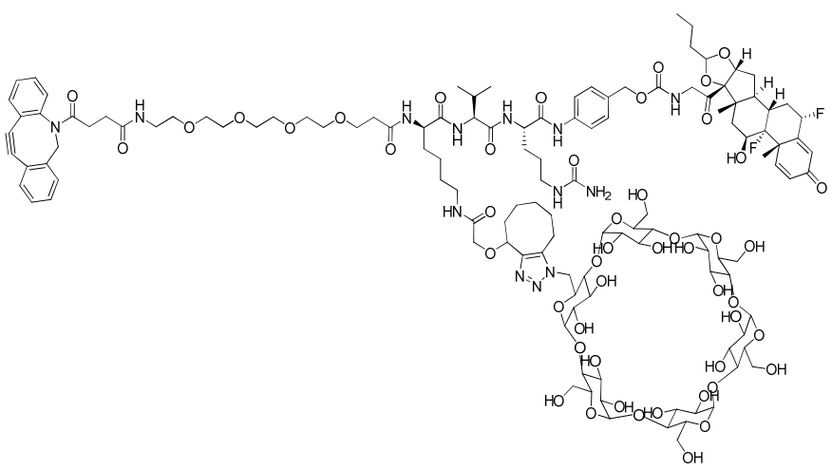


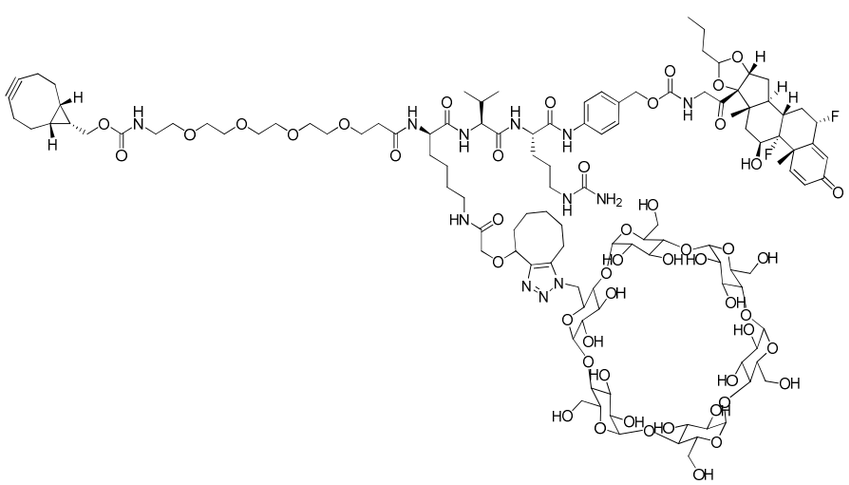


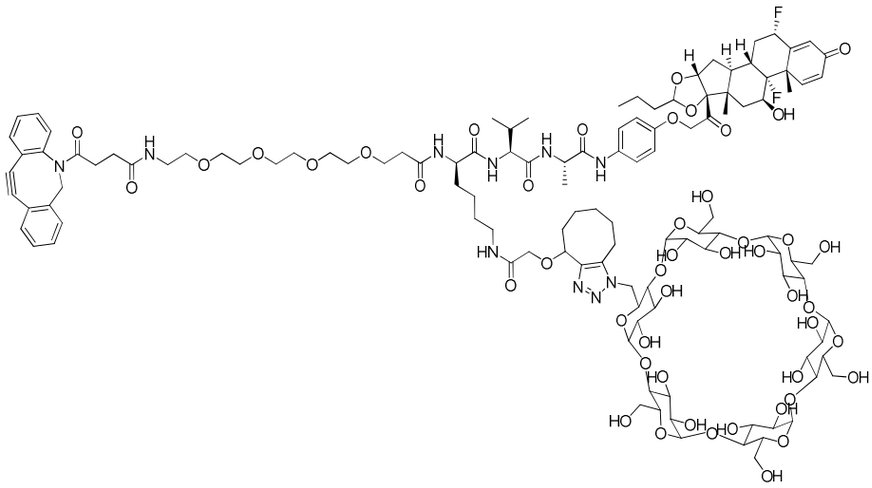
5

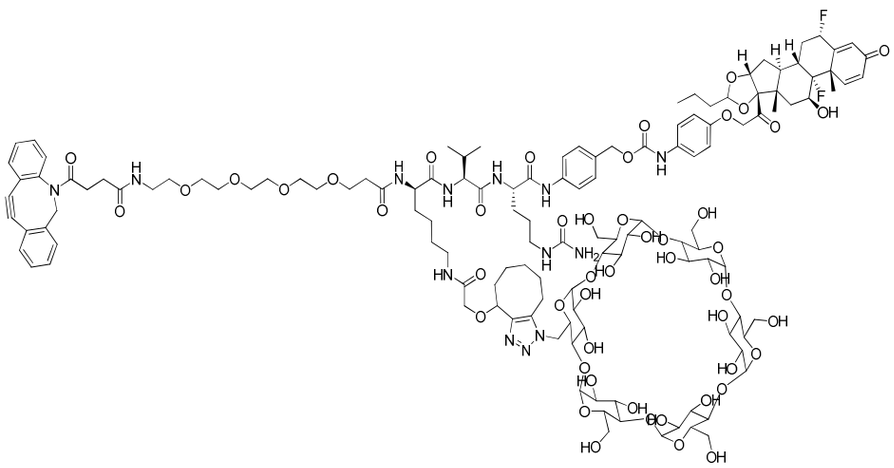


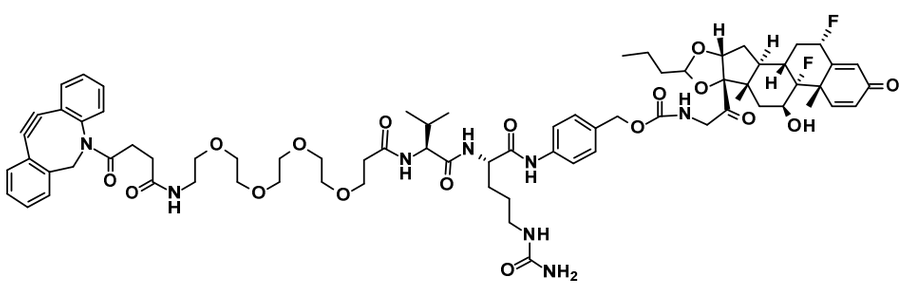


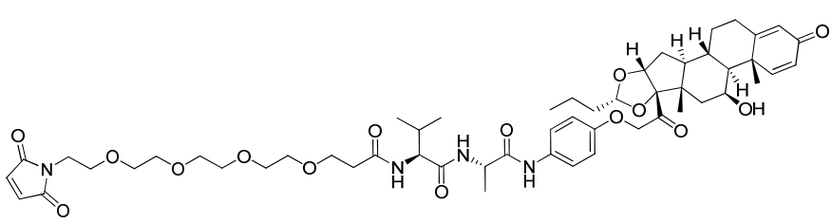


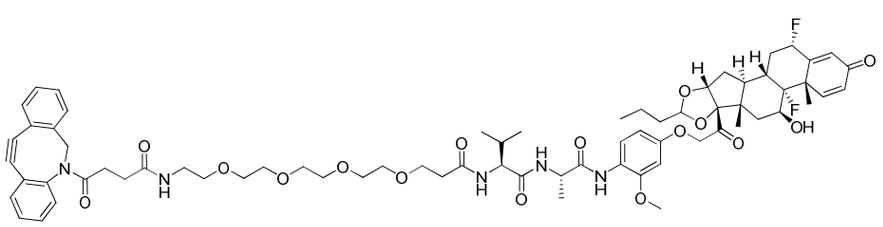


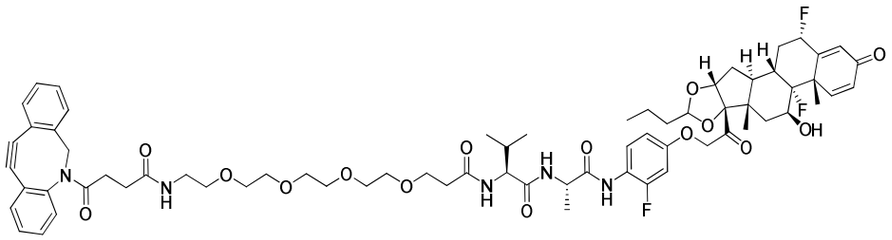


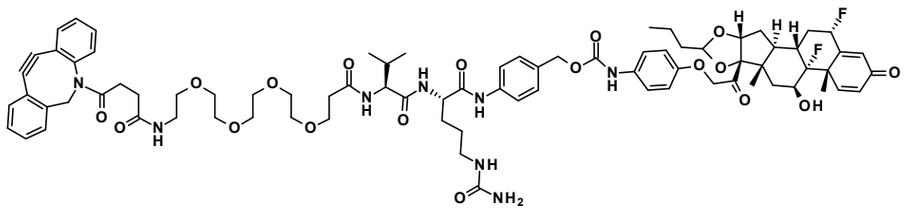


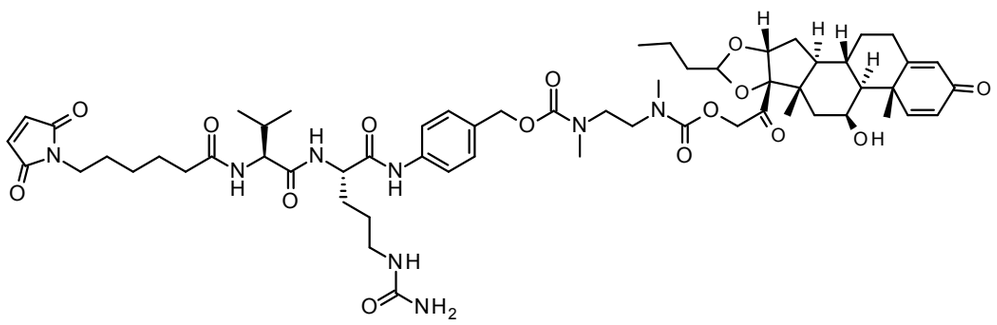




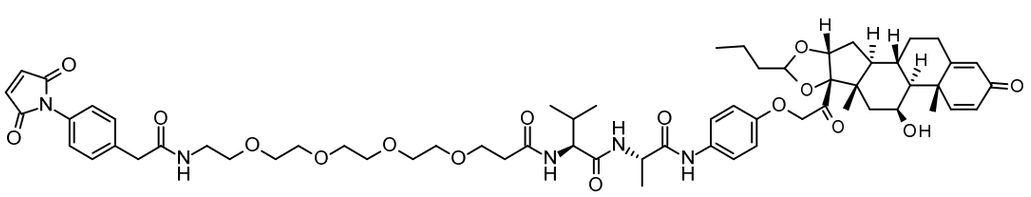








y



y sales de los mismos.

E. COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS Y MÉTODOS DE TRATAMIENTO

[437] La presente divulgación incluye métodos para tratar padecimientos, condiciones, o desórdenes, por ejemplo, padecimientos inflamatorios y desórdenes autoinmunes, o manejar los síntomas de los mismos, que comprenden administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más de los compuestos aquí divulgados. Se incluyen cualesquiera padecimientos, desórdenes, o condiciones asociadas con el receptor de glucocorticoides, la unión de glucocorticoides y/o la señalización del receptor de glucocorticoides. Tales métodos comprenden administrar una carga útil de esteroides o conjugado de proteínas de la misma aquí descritos a un paciente. De esta manera, en esta divulgación se incluyen métodos para tratar un padecimiento, desorden, o condición asociada con el receptor de glucocorticoides que comprenden administrar un compuesto de Fórmula (**I**), (**I**)^{1}, o un conjugado de proteínas del mismo, por ejemplo, el compuesto de

Fórmula (**III**) a un paciente que tiene dicho padecimiento, desorden, o condición. Aquí se establecen métodos para tratar un padecimiento, desorden, o condición asociada con el receptor de glucocorticoides que comprenden administrar un conjugado de proteínas de un compuesto de Fórmula seleccionada a partir del grupo que consiste en (**A**), (**A**^{1}), (**A**^{2}), (**A**^{3}), (**A**^{4}), (**A**^{5}), (**A**^{6}), (**A**^{7}), (**I**), (**I**^{1}), (**PIa**), (**PIb–1**), (**PIb–2**), **PIc–1**), (**PIc–2**), (**PId–1**), (**PId–2**), (**PIe–1**), (**PIe–2**), (**PII),** (**PIIa**), (**PIIb**), (**PIII**), (**PIIIa**), **(PIIIb),** (**PIV**), (**PV**), (**PVa**), (**PVb**), (**PVI**), (**PVII**), (**PVIIa**), (**PVIIb**), (**PVIIb–1**), (**PVIIb–2**), (**PVIII**), y combinaciones de las mismas.

[438] En algunas modalidades, el padecimiento, desorden, o condición es un estado alérgico, incluyendo pero no limitado a asma, dermatitis atópica, dermatitis de contacto, reacciones de hipersensibilidad a fármacos, rinitis alérgica estacional o perenne, y padecimiento del suero; padecimientos dermatológicos, incluyendo pero no limitado a, dermatitis herpetiforme bullosa, eritrodermia exfoliativa, micosis fungoide, pénfigo, y eritema multiforme severo (síndrome de Stevens-Johnson); desórdenes endocrinos, incluyendo pero no limitado a, insuficiencia adrenocortical primaria o secundaria, hiperplasia adrenal congénita, hipercalcemia asociada con cáncer, y tiroiditis no supurativa; padecimientos gastrointestinales; desórdenes hematológicos, incluyendo pero no limitado a, anemia hemolítica adquirida (autoinmune), anemia hipoplásica congénita (eritroide) (anemia de Diamond-Blackfan), púrpura trombocitopénica idiopática en adultos, aplasia pura de glóbulos rojos, y trombocitopenia secundaria; triquinosis; meningitis tuberculosa con bloqueo subaracnoideo o bloqueo inminente; padecimientos neoplásicos, incluyendo pero no limitado a, leucemias y linfomas; desórdenes del sistema nervioso, incluyendo pero no limitado a, exacerbaciones agudas de esclerosis múltiple, edema cerebral asociado con tumor cerebral primario o metastásico, craneotomía, o lesión en la cabeza; padecimientos oftálmicos, incluyendo pero no limitado a, oftalmia simpática, arteritis temporal, uveítis, y condiciones inflamatorias oculares que no responden a los corticosteroides tópicos; padecimientos renales, incluyendo pero no limitado a, para inducir una diuresis o remisión de proteinuria en el síndrome nefrótico idiopático o aquel debido al lupus eritematoso; padecimientos respiratorios, incluyendo pero no limitado a beriliosis, tuberculosis pulmonar fulminante o diseminada cuando se utiliza concurrentemente con quimioterapia antituberculosa apropiada, neumonías eosinofílicas idiopáticas, sarcoidosis sintomática; y desórdenes reumáticos, incluyendo pero no limitado al uso como terapia complementaria para la administración a corto plazo (para llevar al paciente durante un episodio agudo o una exacerbación) en artritis gotosa aguda, carditis reumática aguda, espondilitis

anquilosante, artritis psoriásica, artritis reumatoide, incluyendo artritis reumatoide juvenil, y para uso en dermatomiositis, polimiositis, y lupus eritematoso sistémico.

[439] En algunos ejemplos, se establece aquí un método para tratar un padecimiento, desorden, o condición seleccionada a partir de un padecimiento autoinmune, una alergia, artritis, asma, un desorden respiratorio, un desorden sanguíneo, un cáncer, un padecimiento de colágeno, unos desórdenes del tejido conectivo, un padecimiento dermatológico, un padecimiento ocular, un problema endocrino, un padecimiento inmunológico, un padecimiento inflamatorio, un desorden intestinal, un padecimiento gastrointestinal, un desorden neurológico, una condición por trasplante de órgano, un desorden reumatoide, un desorden de la piel, una condición de hinchazón, una condición de cicatrización de herida, y una combinación de los mismos que comprende administrar una carga útil de esteroides o conjugado de la misma aquí descritos.

[440] En algunos ejemplos, el desorden autoinmune se selecciona a partir de esclerosis múltiple, hepatitis autoinmune, herpes zoster, lupus eritematoso sistémico (es decir, lupus), miastenia gravis, distrofia muscular de Duchenne, y sarcoidosis. En algunos ejemplos, el desorden respiratorio se selecciona a partir de asma, padecimiento pulmonar obstructivo crónico, inflamación bronquial, y bronquitis aguda. En algunos ejemplos, el cáncer se selecciona a partir de leucemia, leucemia linfoblástica, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfoblástica crónica, linfoma de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin (NHL), y mieloma múltiple. En algunos ejemplos, el padecimiento de colágeno es lupus eritematoso sistémico. En algunos ejemplos, el padecimiento ocular es queratitis. En algunos ejemplos, el problema endocrino se selecciona a partir del padecimiento de Addison, insuficiencia adrenal, hiperplasia adrenal congénita, y adrenocortical. En algunos ejemplos, el padecimiento inflamatorio se selecciona a partir de inflamación articular, inflamación de tendón, bursitis, epicondilitis, padecimiento de Crohn, padecimiento inflamatorio de los intestinos, tiroiditis neumonitis lipídica, urticaria, pericarditis, síndrome nefrótico, y uveítis. En algunos ejemplos, el desorden intestinal se selecciona a partir de colitis ulcerativa, padecimiento de Crohn, y padecimiento inflamatorio de los intestinos. En algunos ejemplos, el desorden reumatoide se selecciona a partir de artritis reumatoide, polimialgia reumática, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante, y lupus eritematoso sistémico. En algunos ejemplos, el desorden de la piel se selecciona a partir de psoriasis, eczema, y hiedra venenosa. En algunos ejemplos, el desorden neurológico es polirradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria crónica.

[441] En algunas modalidades, los compuestos aquí descritos se administran a un paciente para tratar un evento inflamatorio agudo, incluyendo pero no limitado a, traumatismo, edema cerebral, y padecimiento injerto contra huésped. En algunas modalidades, los compuestos aquí descritos se administran para tratar efectos linfolíticos, incluyendo pero no limitado a aquellos asociados con malignidades hematológicas, por ejemplo, leucemias, linfomas, y mielomas.

[442] En algunos ejemplos, se establece un método para reducir la inflamación en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente efectiva de un esteroide o conjugado del mismo aquí descritos. En algunos ejemplos, se establece aquí un método para modular el sistema inmune en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente efectiva de un esteroide o conjugado del mismo aquí descritos. En algunos ejemplos, se establece aquí un método para modular los niveles de cortisol en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente efectiva de un esteroide o conjugado del mismo aquí descritos. En algunos ejemplos, se establece aquí un método para reducir la migración de linfocitos en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente efectiva de un esteroide o conjugado del mismo aquí descritos. En algunos ejemplos, se establece aquí un método para tratar la hipercalcemia debida al cáncer, padecimiento de Meniere, la migraña, la cefalea en racimos, una úlcera aftosa severa, laringitis, tuberculosis severa, una reacción de Herxheimer a la sífilis, una insuficiencia cardíaca descompensada, rinitis alergia o pólipos nasales, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una carga útil de esteroides o conjugado de la misma aquí descritos. En algunos ejemplos, los compuestos aquí descritos pueden utilizarse para tratar el padecimiento inflamatorio del intestino, el padecimiento de Crohn, o la colitis ulcerativa. En algunos ejemplos, el padecimiento, desorden, o condición es una condición inflamatoria crónica, incluyendo pero no limitado a asma, infecciones de la piel, e infecciones oculares. En algunos ejemplos, los compuestos aquí descritos se utilizan para la inmunosupresión en pacientes sometidos a trasplante de órganos.

[443] En algunas modalidades, las cargas útiles de esteroides y los conjugados de las mismas aquí descritos se administran a un paciente para tratar un desorden nervioso asociado con la señalización de GR, incluyendo pero no limitado a desórdenes psiquiátricos tales como esquizofrenia, adicción a las drogas, el desorden de estrés postraumático

(PTSD), y desórdenes del estado de ánimo, abuso de sustancias, estrés, y ansiedad. En algunas modalidades, las cargas útiles de esteroides y los conjugados de las mismas aquí descritos se administran a un paciente para tratar un desorden del sistema visual, incluyendo pero no limitado a inflamación ocular (por ejemplo, conjuntivitis, queratitis, uveítis), edema macular, y degeneración macular. En algunas modalidades, las cargas útiles de esteroides y los conjugados de las mismas aquí descritos se administran a un paciente para tratar un desorden cardiovascular. En algunas modalidades, las cargas útiles de esteroides y los conjugados de las mismas aquí descritos se administran a un paciente para tratar un desorden del metabolismo del hígado y/o la glucosa. En algunas modalidades, las cargas útiles de esteroides y los conjugados de las mismas aquí descritos se administran a un paciente para tratar un desorden del sistema musculoesquelético. En algunas modalidades, las cargas útiles de esteroides y los conjugados de las mismas aquí descritos se administran a un paciente para tratar una condición inflamatoria cutánea, tal como eczema y psoriasis.

[444] Los conjugados de proteínas aquí descritos proporcionan un medio para la entrega dirigida de su carga útil de esteroides a células particulares o sistemas de órganos, reduciendo o previniendo por consiguiente los efectos secundarios que resultan de la administración de la carga útil de esteroides no conjugados libres. De esta manera, se proporcionan aquí métodos para tratar un padecimiento, desorden, o condición asociada con el receptor de glucocorticoides que comprenden administrar un conjugado de Fórmula (I) o $(I)^1$, a un paciente que tiene dicho padecimiento, desorden, o condición, en donde se reducen los efectos secundarios asociados con la administración de la carga útil de esteroides libres de dicho conjugado. Adicionalmente, se proporcionan aquí métodos para entregar un compuesto de Fórmula (I) o $(I)^1$ a una célula que comprenden poner en contacto dicha célula con un conjugado de proteínas, el compuesto de Fórmula (I) o $(I)^1$, en donde el conjugado de proteínas comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a un antígeno de la superficie de dicha célula.

[445] Los compuestos aquí descritos pueden administrarse solos o junto con uno o más agentes terapéuticos adicionales. Los uno o más agentes terapéuticos adicionales pueden administrarse justo antes de, concurrentemente con, o poco después de la administración de los compuestos aquí descritos. La presente divulgación también incluye composiciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de los compuestos aquí descritos en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales, y métodos de tratamiento

que comprenden administrar tales combinaciones a sujetos que lo necesitan.

[446] Los agentes terapéuticos adicionales adecuados incluyen, pero no se limitan a: un segundo glucocorticoide, un agente terapéutico autoinmune, una hormona, un agente biológico, o un anticuerpo monoclonal. Los agentes terapéuticos adecuados también incluyen, pero no se limitan a cualesquiera sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de un compuesto aquí establecido.

[447] Los compuestos aquí descritos también pueden administrarse y/o coformularse en combinación con antivirales, antibióticos, analgésicos, corticosteroides, esteroides, oxígeno, antioxidantes, inhibidores de COX, cardioprotectores, quelantes de metales, IFN-gamma y/o NSAIDs.

[448] En algunas modalidades de los métodos aquí descritos, múltiples dosis de un compuesto aquí descrito (o una composición farmacéutica que comprende una combinación de un compuesto aquí descrito y cualquiera de los agentes terapéuticos adicionales aquí mencionados) pueden administrarse a un sujeto durante un periodo de tiempo definido. Los métodos de acuerdo con este aspecto de la divulgación comprenden administrar secuencialmente a un sujeto múltiples dosis de un compuesto aquí descrito. Según se utiliza aquí, “administrar secuencialmente” significa que cada dosis del compuesto se administra al sujeto en un diferente punto en el tiempo, por ejemplo, en diferentes días separados por un intervalo predeterminado (por ejemplo, horas, días, semanas o meses). La presente divulgación incluye métodos que comprenden administrar secuencialmente al paciente una sola dosis inicial de un compuesto aquí descrito, seguido por una o más dosis secundarias del compuesto, y opcionalmente seguido por una o más dosis terciarias del compuesto.

[449] Los términos “dosis inicial”, “dosis secundarias”, y “dosis terciarias”, se refieren a la secuencia temporal de administración de los compuestos aquí descritos. Por lo tanto, la “dosis inicial” es la dosis que se administra al comienzo del régimen de tratamiento (también referida como la “dosis de línea base”); las “dosis secundarias” son las dosis que se administran después de la dosis inicial; y las “dosis terciarias” son las dosis que se administran después de las dosis secundarias. Las dosis inicial, secundarias, y terciarias pueden todas contener la misma cantidad el compuesto aquí descrito, pero generalmente pueden diferir entre sí en términos de la frecuencia de administración. En ciertas modalidades, la cantidad del compuesto contenido en las dosis inicial, secundarias y/o terciarias varía de una a otra (por ejemplo, ajustada hacia arriba o hacia abajo según sea

apropiado) durante el curso del tratamiento. En ciertas modalidades, dos o más (por ejemplo, 2, 3, 4 o 5) dosis se administran al comienzo del régimen de tratamiento como “dosis de carga” seguido por dosis posteriores que se administran en una base menos frecuente (por ejemplo, “dosis de mantenimiento”).

[450] En ciertas modalidades ejemplares de la presente divulgación, cada dosis secundaria y/o terciaria se administra 1 a 26 (por ejemplo, 1, 1½, 2, 2½, 3, 3½, 4, 4½, 5, 5½, 6, 6½, 7, 7½, 8, 8½, 9, 9½, 10, 10½, 11, 11½, 12, 12½, 13, 13½, 14, 14½, 15, 15½, 16, 16½, 17, 17½, 18, 18½, 19, 19½, 20, 20½, 21, 21½, 22, 22½, 23, 23½, 24, 24½, 25, 25½, 26, 26½, o más) semanas después de la dosis inmediatamente precedente. La frase “la dosis inmediatamente precedente”, según se utiliza aquí, significa, en una secuencia de múltiples administraciones, la dosis el compuesto que se administra a un paciente antes de la administración de la próxima siguiente dosis en la secuencia sin dosis intermedias.

[451] Los métodos de acuerdo con este aspecto de la divulgación pueden comprender administrar a un paciente cualquier número de dosis secundarias y/o terciarias del compuesto. Por ejemplo, en ciertas modalidades, solo se administra una dosis secundaria única al paciente. En otras modalidades, se administran al paciente dos o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más) dosis secundarias. Del mismo modo, en ciertas modalidades, solo se administra una dosis terciaria única al paciente. En otras modalidades, se administran al paciente dos o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más) dosis terciarias. El régimen de administración puede llevarse a cabo indefinidamente a lo largo de la duración de la vida de un sujeto particular, o hasta que tal tratamiento ya no sea terapéuticamente necesario o ventajoso.

[452] En modalidades que implican múltiples dosis secundarias, cada dosis secundaria puede administrarse en la misma frecuencia que las otras dosis secundarias. Por ejemplo, cada dosis secundaria se puede administrar al paciente 1 a 2 semanas o 1 a 2 meses después de la dosis inmediatamente precedente. De manera similar, en modalidades que implican múltiples dosis terciarias, cada dosis terciaria se puede administrar en la misma frecuencia que las otras dosis terciarias. Por ejemplo, cada dosis terciaria se puede administrar al paciente 2 a 12 semanas después de la dosis inmediatamente precedente. En ciertas modalidades de la divulgación, la frecuencia en la cual se administran las dosis secundarias y/o terciarias a un paciente puede variar a lo largo del curso del régimen de tratamiento. La frecuencia de administración también puede ajustarse durante el curso del tratamiento por un médico, dependiendo de las necesidades

del paciente individual después del examen clínico.

[453] La presente divulgación incluye regímenes de administración en los cuales se administran 2 a 6 dosis de carga a un paciente en una primera frecuencia (por ejemplo, una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez al mes, una vez cada dos meses, etcétera), seguido por la administración de dos o más dosis de mantenimiento al paciente en una base menos frecuente. Por ejemplo, de acuerdo con este aspecto de la divulgación, si las dosis de carga se administran en una frecuencia de una vez al mes, entonces las dosis de mantenimiento se pueden administrar al paciente una vez cada seis semanas, una vez cada dos meses, una vez cada tres meses, etcétera.

[454] La presente divulgación incluye composiciones farmacéuticas de los compuestos y/o conjugados aquí descritos, por ejemplo, los compuestos de Fórmula (I) y (II), por ejemplo, composiciones que comprenden un compuesto aquí descrito, una sal, estereoisómero, polimorfo de los mismos, y un vehículo, diluyente, y/o excipiente farmacéuticamente aceptable. Ejemplos de vehículos, diluyentes y excipientes adecuados incluyen, pero no se limitan a: amortiguadores para el mantenimiento del pH apropiado de la composición (por ejemplo, amortiguadores de citrato, amortiguadores de succinato, amortiguadores de acetato, amortiguadores de fosfato, amortiguadores de lactato, amortiguadores de oxalato y similares), proteínas portadoras (por ejemplo, albúmina sérica humana), nanopartículas, solución salina, polioles (por ejemplo, trehalosa, sacarosa, xilitol, sorbitol, y similares), surfactantes (por ejemplo, polisorbato 20, polisorbato 80, polioxolato, y similares), antimicrobianos, y antioxidantes .

[455] En algunos ejemplos, se establece aquí un método para tratar un padecimiento, desorden, o condición que incluye administrar a un paciente que tiene dicho desorden una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de Fórmula I, III, o una composición farmacéutica de los mismos.

[456] En algunos ejemplos, se establece aquí un método para tratar un padecimiento, desorden, o condición que incluye administrar a un paciente que tiene dicho desorden una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto aquí establecido, o una composición farmacéutica del mismo.

[457] En algunos ejemplos, se establece aquí un método para tratar un padecimiento, desorden, o condición seleccionada a partir del grupo que consiste en un padecimiento inmunológico, padecimiento autoinmune, inflamación, asma, o un desorden inflamatorio del intestino, padecimiento de Crohn, colitis ulcerativa.

[458] En algunos ejemplos, se establece aquí un método para tratar un padecimiento, desorden, o condición teniendo como objetivo un antígeno, por ejemplo, un antígeno que se expresa en la superficie celular, al cual la entrega de esteroides puede lograr un beneficio terapéutico, que comprende administrar los conjugados aquí descritos. En algunas modalidades, el antígeno es AXL, BAFFR, BCMA, componentes de lista BCR, BDCA2, BDCA4, BTLA, BTNL2 BTNL3, BTNL8,BTNL9, C10orf54, CCR1, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR9, CCR10, CD11c, CD137, CD138, CD14, CD168, CD177, CD19, CD20, CD209, CD209L, CD22, CD226, CD248, CD25, CD27, CD274, CD276, CD28, CD30, CD300A, CD33, CD37, CD38, CD4, CD40, CD44, CD45, CD47, CD46, CD48, CD5, CD52, CD55, CD56, CD59, CD62E, CD68, CD69, CD70, CD74, CD79a, CD79b, CD8, CD80, CD86, CD90.2, CD96, CLEC12A, CLEC12B, CLEC7A, CLEC9A, CR1, CR3, CRTAM, CSF1R, CTLA4, CXCR1/2, CXCR4, CXCR5, DDR1, DDR2, DEC–205, DLL4, DR6, FAP, FCamR, FCMR, FcR's, Fire, GITR, HHLA2, HLA clase II, HVEM, ICOSLG, IFNLR1, IL10R1, IL10R2, IL12R, IL13RA1, IL13RA2, IL15R, IL17RA, IL17RB, IL17RC, IL17RE, IL20R1, IL20R2, IL21R, IL22R1, IL22RA, IL23R, IL27R, IL29R, IL2Rg, IL31R, IL36R, IL3RA, IL4R, IL6R, IL5R, IL7R, IL9R, Integrinas, LAG3, LIFR, MAG/Siglec–4, MMR, MSR1, NCR3LG1, NKG2D, NKp30, NKp46, PDCD1, PROKR1, PVR, PVRIG, PVRL2, PVRL3, RELT, SIGIRR, Siglec–1, Siglec–10, Siglec–5, Siglec–6, Siglec–7, Siglec–8, Siglec–9, SIRPA, SLAMF7, TACI, componentes/asoc. de lista TCR, PTCRA, TCRb, CD3z, CD3, TEK, TGFBR1, TGFBR2, TGFBR3, TIGIT, TLR2, TLR4, TROY, TSLPR, TYRO, VLDLR, VSIG4, o VTCN1. En algunas modalidades, el antígeno es IL2R–γ.

[459] En algunos ejemplos, se establece aquí un método para tratar un padecimiento, desorden, o condición seleccionada a partir de un padecimiento inmunológico, un padecimiento autoinmune, un padecimiento inflamatorio, un padecimiento dermatológico, o un padecimiento gastrointestinal.

[460] En algunos ejemplos, el padecimiento es padecimiento de Crohn, colitis ulcerativa, síndrome de Cushing, insuficiencia adrenal, o hiperplasia adrenal congénita.

[461] En algunos ejemplos, el padecimiento es inflamación, asma, o un desorden inflamatorio del intestino.

[462] En algunos ejemplos, el padecimiento es un padecimiento autoinmune seleccionado a partir de esclerosis múltiple, artritis reumatoide, padecimiento inflamatorio del intestino, colitis ulcerativa, psoriasis, o eczema.

[463] En algunos ejemplos, se establece aquí un método para reducir o mejorar los

efectos secundarios de la quimioterapia, en donde el método incluye administrar a un paciente que tiene dicho desorden una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto o una composición aquí descritos.

[464] En algunos ejemplos, se establece aquí un método para reducir o mejorar los efectos secundarios de la terapia inmunosupresora, en donde el método incluye administrar a un paciente que tiene dicho desorden una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto o una composición aquí descritos.

[465] En algunos ejemplos, se establece aquí un método para tratar el cáncer, en donde el método incluye administrar a un paciente que tiene dicho desorden una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto o una composición aquí descritos. En algunos ejemplos, el cáncer se selecciona a partir de leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfoblástica crónica, linfoma de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin (NHL), o mieloma múltiple, así como otros.

F. EJEMPLOS

[466] Ciertas modalidades se ilustran mediante los siguientes ejemplos no limitativos.

[467] Los reactivos y los solventes se obtuvieron a partir de fuentes comerciales tales como Sinopharm Chemical Reagent Co. (SCRC), Sigma–Aldrich, Alfa, u otros proveedores, a menos que se indique explícitamente lo contrario.

[468] La ^{1}H NMR y otros espectros de NMR se registraron en un Bruker AVIII 400 o Bruker AVIII 500. Los datos se procesaron con el software Nuts o el software MestReNova, midiendo los cambios de protones en partes por millón (ppm) campo abajo desde un tetrametil silano estándar interno.

[469] Las mediciones de HPLC-MS se realizaron en un sistema Agilent 1200 HPLC/6100 SQ utilizando las siguientes condiciones:

[470] El método A para la medición de HPLC-MS incluyó, como la Fase Móvil: A: Agua (ácido trifluoroacético TFA al 0.01%) y B: acetonitrilo (TFA al 0.01%). La Fase de Gradiente fue 5% de B que se incrementó a 95% de B durante un periodo de tiempo de 15 minutos (min) y en una tasa de flujo de 1.0 mL/min. La columna utilizada fue una SunFire C18, 4.6x50 mm, 3.5 µm. La temperatura de la columna fue 50 ºC. Los detectores incluyeron un ELSD (detector de dispersión de luz evaporativa) de convertidor analógico a digital (en adelante “ADC ELSD”), DAD (detector de matriz de diodos, 214 nm y 254 nm), e ionización por electropulverización-ionización a presión atmosférica (ES-API).

[471] El método B para las mediciones de HPLC-MS incluyó, como la Fase Móvil: A: Agua (NH_4HCO_3 10mM) y B: acetonitrilo. La Fase de Gradiente fue 5% de B que se incrementó a 95% de B durante un periodo de tiempo de 15 minutos y una tasa de flujo de 1.0 mL/min. La columna utilizada fue una XBridge C18, 4.6x50 mm, 3.5 µm. La temperatura de la columna fue 50 ºC. Los detectores incluyeron un ADC ELSD, DAD (214 nm y 254 nm) y un detector selectivo de masa (MSD ES–API).

[472] La medición de LC–MS se realizó en un sistema Agilent 1200 HPLC/6100 SQ utilizando las siguientes condiciones:

[473] El método A para la medición de LC-MS se realizó en un instrumento WATERS 2767. La columna fue una Shimadzu Shim–Pack, PRC–ODS, 20x250mm, 15µm, dos conectadas en serie. La Fase Móvil fue A: Agua (TFA al 0.01%) y B: acetonitrilo (TFA al 0.01%). La Fase de Gradiente fue 5% de B que se incrementó a 95% de B durante un periodo de tiempo de 3 minutos y en una tasa de flujo de 1.8 - 2.3 mL/min. La columna utilizada fue una SunFire C18, 4.6x50 mm, 3.5 µm. La temperatura de la columna fue 50 ºC. Los detectores incluyeron un ELSD (detector de dispersión de luz evaporativa) de convertidor analógico a digital, DAD (detector de matriz de diodos) (214 nm y 254 nm), y ES-API.

[474] El método B para la medición de LC-MS se realizó en un instrumento Gilson GX–281. La columna fue una Xbridge Prep C18 10 um OBD, 19x250 mm. La Fase Móvil fue A: Agua (NH_4HCO_3 10mM) y B: Acetonitrilo. La Fase de Gradiente fue 5% de B que se incrementó a 95% de B durante un periodo de tiempo de 3 minutos y en una tasa de flujo de 1.8-2.3 mL/min. La columna utilizada fue una XBridge C18, 4.6x50 mm, 3.5 µm. La temperatura de la columna fue 50 ºC. Los detectores incluyeron ADC ELSD, DAD (214 nm y 254 nm) y detector selectivo de masa (MSD) (ES–API).

[475] La cromatografía líquida a alta presión preparativa (Prep–HPLC) se realizó en un instrumento Gilson GX-281. Se utilizaron dos sistemas de solventes, uno ácido y otro básico. El sistema de solvente ácido incluyó una columna Waters SunFire 10 µm C18 (100 Å, 250 x 19 mm). El solvente A para la prep-HPLC fue TFA al 0.05% en agua y el solvente B fue acetonitrilo. La condición de elución fue una gradiente lineal que aumentó el solvente B de 5% a 100% durante un periodo de tiempo de 20 minutos y en una tasa de flujo de 30 mL/min. El sistema de solvente básico incluyó una columna Waters Xbridge 10 µm C18 (100 Å, 250 x 19 mm). El solvente A para la prep-HPLC fue bicarbonato de amonio 10 mM (NH_4HCO_3) en agua y el solvente B fue acetonitrilo. La condición de elución fue una

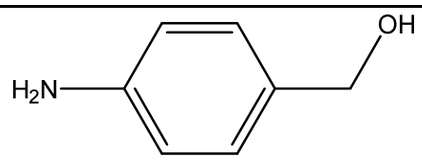
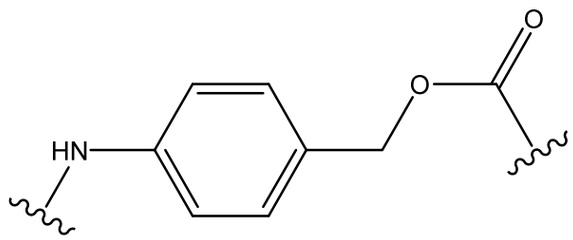
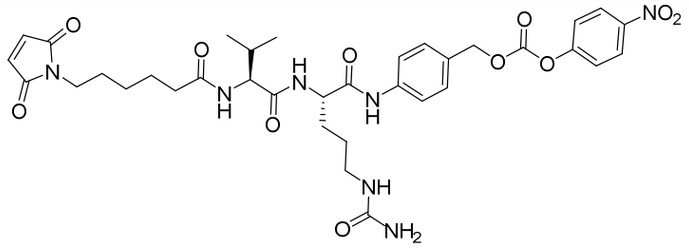
gradiente lineal que incrementó el solvente B de 5% a 100% durante un periodo de tiempo de 20 minutos y en una tasa de flujo de 30 mL/min.

[476] La cromatografía instantánea se realizó en un instrumento Biotage, con sílice de Columna Instantánea Agela-CS. La cromatografía instantánea de fase inversa se realizó en un instrumento Biotage, con Boston ODS o Agela C18, a menos que se indique explícitamente lo contrario.

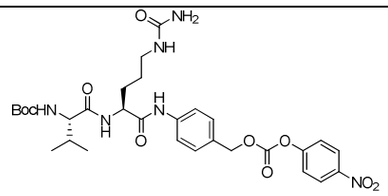
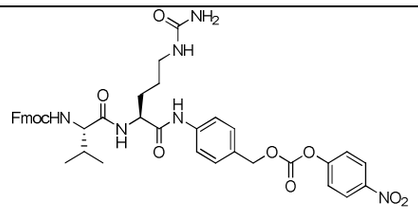
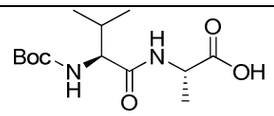
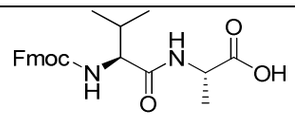
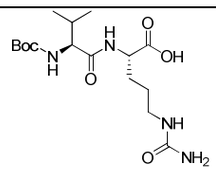
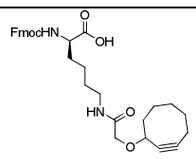
[477] Las siguientes abreviaturas se utilizan en los Ejemplos y en toda la especificación:

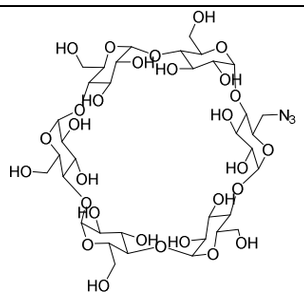
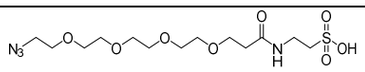
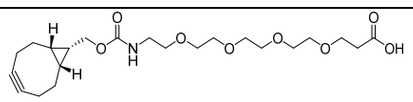
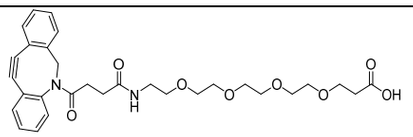
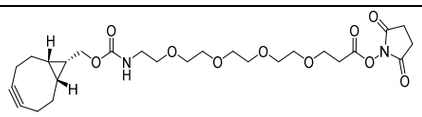
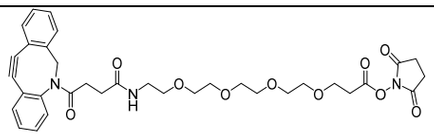
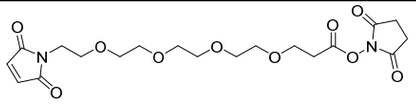
Abreviatura	**Término**
ADC	Conjugado anticuerpo–fármaco
Anticuerpo aglicosilado	Anticuerpo que no tiene ningún residuo de glicano
API	Ionización a presión atmosférica
ac.	acuoso
Boc	N–ter–butoxicarbonilo
BupH™	Prod# 28372 Termocientífico, que contiene fosfato de sodio 100 mM y cloruro de sodio 150 mM, libre de potasio, el pH se ajustó de 7.2 a 7.6–7.8 MQ, a menos que se indique lo contrario.
CD	Ciclodextrina
COT	Ciclooctinol
Da	Dalton
DAD	Detector de matriz de diodos
DAR	Relación fármaco a anticuerpo
DCM	Diclorometano
DIBAC	Dibenzociclooctino; o 11,12–didehidro–5,6–dihidro–Dibenz[*b*,*f*]azocina; o Ácido dibenz[b,f]azocina–5(6H)–butanoico, 11,12–didehidro
DIBAC–Suc	Ácido 11,12–didehidro–5,6–dihidro–Dibenz[*b*,*f*]azocina succinámico
DIBAC–Suc–PEG_4–VC–pAB–PNP	Carbonato de {4–[(2S)–2–[(2S)–2–[1–(4–{2–azatriciclo[10.4.0.$0^{4,9}$]hexadeca–1(12),4(9),5,7,13,15–hexaen–10–in–2–il}–4–oxobutanamido)–3,6,9,12–tetraoxapentadecan–15–amido]–3–metilbutanamido]–5–(carbamoilamino)pentanamido]fenil}metil 4–nitrofenilo
DIBACT	3*H*–Benzo[*c*]–1,2,3–triazolo[4,5–*e*][1]benzazocina, 8,9–dihidro– ; o Dibenzociclooctino triazol
DIPEA	Diisopropiletilamina
DMF	N,N–dimetilformamida

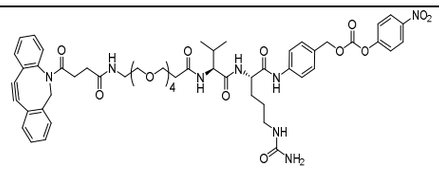
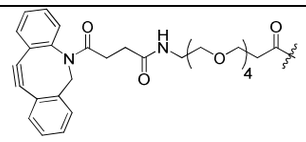
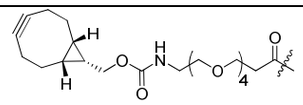
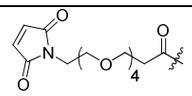
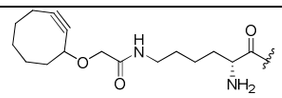
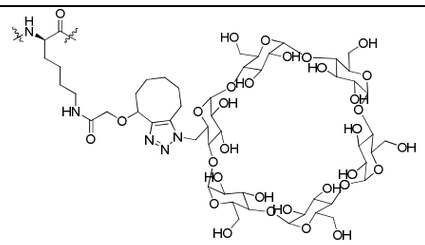
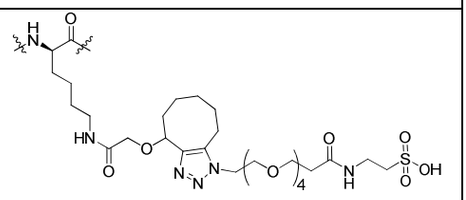
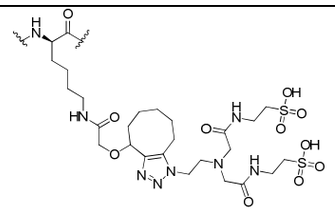
Abreviatura	**Término**
DMSO	Dimetilsulfóxido
EC	Comisión de enzimas
ELSD	Detector de dispersión de luz evaporativa
ESI	Ionización por electropulverización
Fmoc	Cloruro de fluorenilmetiloxicarbonilo
Fmoc–vcPAB–PNP	p–nitrofenil carbonato del alcohol N–Fmoc–L–valina–L–citrulina–p–aminobencílico
g	Gramo
HATU	Hexafluorofosfato de 2–(7–Aza–1H–benzotriazol–1–il)–1,1,3,3–tetrametiluronio
HC	Cadena pesada de inmunoglobulina
HEK	Riñón embrionario humano (células)
HPLC	Cromatografía líquida de alto rendimiento
h	Horas
LC	Cromatografía líquida
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
MALDI	Ionización/desorción láser asistida por matriz
MC	Maleimidocaproilo
mg	miligramos
min	minutos
mL	mililitros
mmh	*etiqueta myc–myc*–hexahistidina
µL	microlitros
mM	milimolar
µM	micromolar
MMAE	Monometil auristatina E
MS	Espectrometría de masas
MsCl	Cloruro de metanosulfonilo
MSD	Detector selectivo de masa
MTG	Transglutaminasa microbiana (MTG EC 2.3.2.13, Zedira, Darmstadt, Alemania)
MW	Peso molecular
ncADC	Conjugación anticuerpo fármaco no citotóxica
NHS	N–hidroxi succinimida
nM	nanomolar
NMR	Resonancia magnética nuclear
NOESY	Espectroscopia de efecto Overhauser nuclear
PAB	Alcohol para–amino-bencílico

Abreviatura	**Término**
	
PABC	Para–aminobenciloxi(carbonilo) 
PBS	Amortiguador de fosfato de sodio 10 mM y cloruro de sodio 150 mM
PBSg	Fosfato 10 mM, cloruro de sodio 150 mM, glicerol al 5%
PEG	Polietilenglicol
PNP	p–nitrofenilo
MC–VC–PAB–PNP	
ppm	Partes por millón (cambio químico)
RP	Fase inversa
RT	Temperatura ambiente
SDS–PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
SEC	Cromatografía de exclusión por tamaño
Suc	Ácido succínico
TCEP	Clorhidrato de tris(2–carboxietil)fosfina
TEA	Trietilamina
TFA	Ácido trifluoroacético
TG	Transglutaminasa
THF	Tetrahidrofurano
TOF	Tiempo de vuelo
UPLC	Cromatografía líquida de ultra desempeño
UV	Ultravioleta
VA	Valina–alanina
VC	Valina–citrulina

Abreviatura	Término
VC–PABC	Valina–citrulina–para–aminobenciloxi(carbonilo)
CD	Ciclodextrina
HATU	Hexafluorofosfato de 2–(7–Aza–1H–benzotriazol–1–il)–1,1,3,3–tetrametiluronio
MC	Maleimidocaproilo
COT	Ciclooctinol
SFC	Cromatografía de fluidos supercríticos

Abreviatura	Nombre IUPAC	Estructura
Boc-vcPAB-PNP (L2a)	*ter*-butil (*S*)-3-metil-1-((*S*)-1-(4-(((4-nitrofenoxi)carboniloxi)metil)fenilamino)-1-oxo-5-ureidopentan-2-ilamino)-1-oxobutan-2-ilcarbamato	
Fmoc-vcPAB-PNP (L2b)	(9*H*-fluoren-9-il)metil (*S*)-3-metil-1-((*S*)-1-(4-(((4-nitrofenoxi)carboniloxi)metil)fenilamino)-1-oxo-5-ureidopentan-2-ilamino)-1-oxobutan-2-ilcarbamato	
Boc-Val-Ala-OH (L3a)	Ácido (*S*)-2-((*S*)-2-(*ter*-butoxicarbonilamino)-3-metilbutanamido)propanoico	
Fmoc-Val-Ala-OH (L3b)	Ácido (*S*)-2-((*S*)-2-(((9*H*-fluoren-9-il)metoxi)carbonilamino)-3-metilbutanamido)propanoico	
Boc-Val-Cit-OH (L3c)	Ácido (6*S*,9*S*)-1-amino-9-isopropil-13,13-dimetil-1,8,11-trioxo-12-oxa-2,7,10-triazatetradecano-6-carboxílico	
Fmoc-*D*-Lys-COT (L5)	Ácido (2*R*)-2-(((9*H*-fluoren-9-il)metoxi)carbonilamino)-6-(2-(ciclooct-2-iniloxi)acetamido)hexanoico	

Abreviatura	**Nombre IUPAC**	**Estructura**
CD-N_3 (L7a)	5-(azidometil)-10,15,20,25,30-pentaquis(hidroximetil)-2,4,7,9,12,14,17,19,22,24,27,29-dodecaoxaheptaciclo[26.2.2.$2^{3,6}$.$2^{8,11}$.$2^{13,16}$.$2^{18,21}$.$2^{23,26}$]dotetracontano-31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42-dodecol	
N_3-PEG_4-$CONHCH_2CH_2SO_3H$ (L7b)	Ácido 1-azido-15-oxo-3,6,9,12-tetraoxa-16-azaoctadecano-18-sulfónico	
Ácido BCN-PEG_4 (L9a)	Ácido (e*ndo*)-1-(biciclo[6.1.0]non-4-in-9-il)-3-oxo-2,7,10,13,16-pentaoxa-4-azanonadecan-19-óico	
Ácido DIBAC-PEG_4 (L9b)	Ácido 1-(4-{2-azatriciclo[10.4.0.$0^{4,9}$]hexadeca-1(12),4(9),5,7,13,15-hexaen-10-in-2-il}-4-oxobutanamido)-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-óico	
BCN-PEG_4-NHS (L10a)	1-(biciclo[6.1.0]non-4-in-9-il)-3-oxo-2,7,10,13,16-pentaoxa-4-azanonadecan-19-oato de (*endo*)-2,5-dioxopirrolidin-1-ilo	
DIBAC-PEG_4-NHS (L10b)	1-(4-{2-azatriciclo[10.4.0.$0^{4,9}$]hexadeca-1(12),4(9),5,7,13,15-hexaen-10-in-2-il}-4-oxobutanamido)-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-oato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo	
MAL-PEG_4-NHS (L10c)	1-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-oato	

Abreviatura	Nombre IUPAC	Estructura
	de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo	
DIBAC-PEG_4-vcPAB-PNP (L11)	4-nitrofenil carbonato de {4-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-[1-(4-{2-azatriciclo[10.4.0.$0^{4,9}$]hexadeca-1(12),4(9),5,7,13,15-hexaen-10-in-2-il}-4-oxobutanamido)-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-amido]-3-metilbutanamido]-5-(carbamoilamino)pentanamido]fenil}metilo	
Lk-DIBAC	-	
Lk-BCN	-	
Lk-MAL	-	
Lk-CCK	-	
aCDCCK	-	
SulCCK	-	
dualSulCCK	-	

MÉTODOS DE PREPARACIÓN

EJEMPLO 1

[478] Este ejemplo demuestra un método para hacer derivados químicos de

Desonida con control estereoquímico en la posición C^{22}. En las FIGURAS 1 y 2, la posición C^{22} se identifica para los compuestos **7**, **8** y **11** con un asterisco, es decir, *. La síntesis de esteroides con control estereoquímico en la posición C^{22} se realizó siguiendo la ruta sintética representada en las FIGURAS 1 y 2.

[479] La Desonida (**1**), que es un nombre genérico para (1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*S*,13*R*)–11–hidroxi–8–(2–hidroxiacetil)–6,6,9,13–tetrametil–5,7–dioxapentaciclo[10.8.0.$0^{2,9}$.$0^{4,8}$.$0^{13,18}$]icosa–14,17–dien–16–ona, se hizo reaccionar con anhídrido isobutírico (compuesto **2**) para producir el intermedio **3** mediante esterificación en la posición del alcohol primaria del compuesto **1**. El compuesto **3** se hizo reaccionar con una serie de aldehídos (**4-1; 4-2; 4-3; y 4-4**, que difieren cada uno con respecto al grupo R-CHO ilustrado a la derecha de estas etiquetas numéricas) mediante transacetalación bajo condiciones de $HClO_4$ de ácido fuerte para producir alcoholes **5** y ésteres **6**. Como se indica en la FIGURA 1, estos aldehídos difirieron entre sí con respecto al grupo R indicado en la FIGURA 1.

[480] Los alcoholes **5** y el éster **6** se separaron mediante cromatografía en columna.

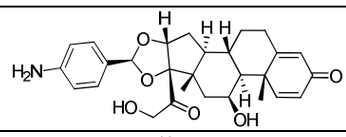
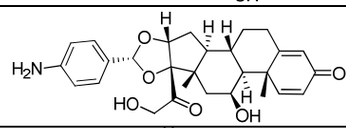
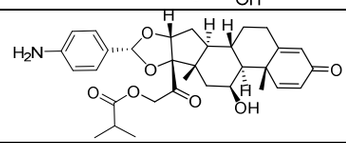
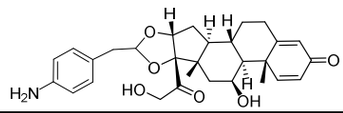
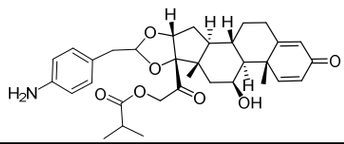
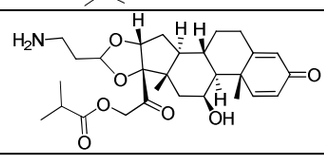
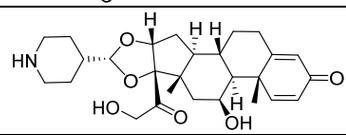
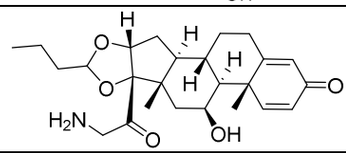
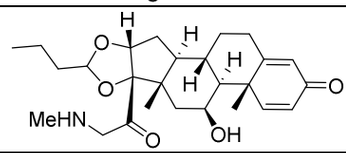
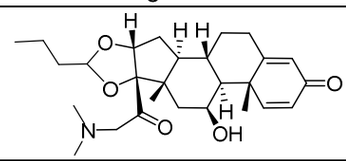
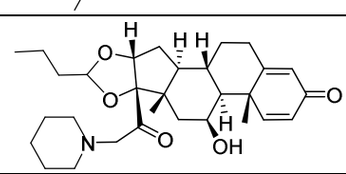
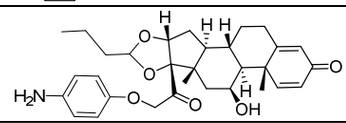
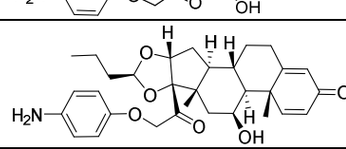
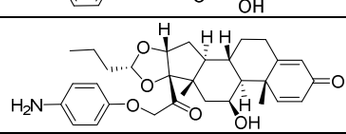
[481] Cada alcohol **5** o éster **6** se hizo reaccionar individualmente con dietilamina para remover el grupo Fmoc o con Fe/NH_4Cl para reducir nitro para proporcionar los compuestos **7** y **8** de epímero que tienen ambos estereoquímica R/S en C^{22}, respectivamente.

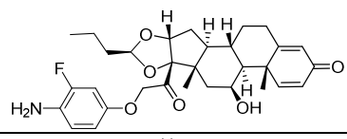
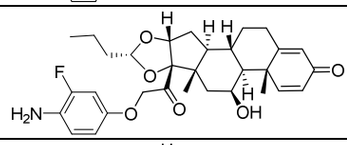
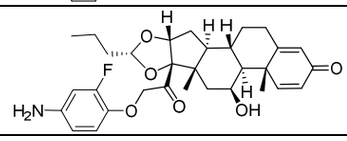
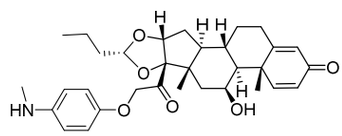
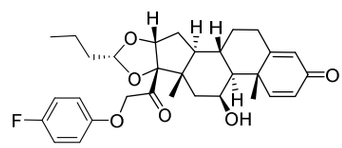
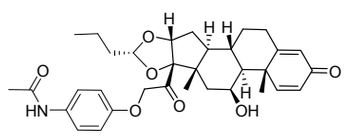
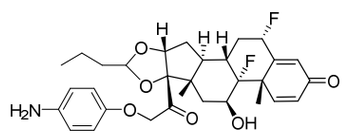
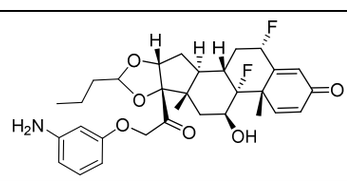
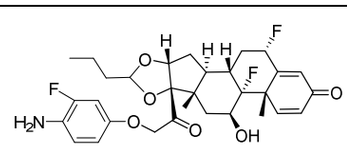
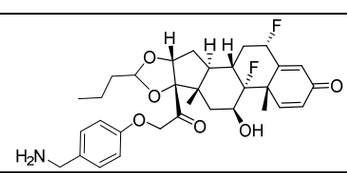
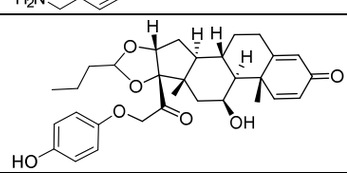
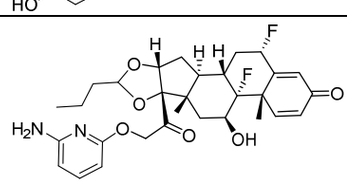
[482] Como se detalla a continuación, los epímeros R y S se separaron y se identificaron sus configuraciones *R*- y *S*-. Los epímeros R de, por ejemplo, los compuestos **7** y **8** en la FIGURA **1** se aislaron y se confirmaron como el estereoisómero mayoritario por 90% mayor mediante ^1H NMR. La configuración C^{22} de cada epímero se determinó mediante estudios espectroscópicos 2D-NOESY.

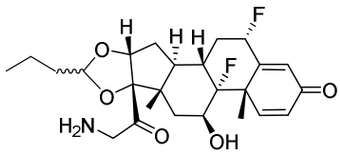
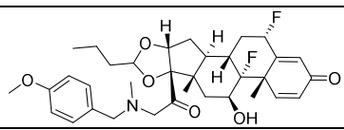
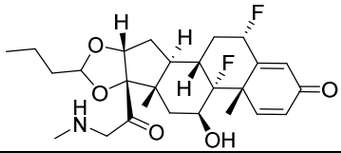
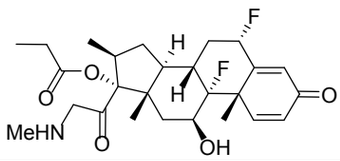
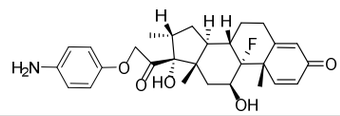
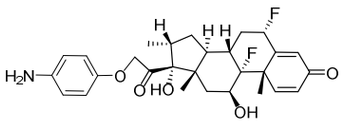
[483] La siguiente Tabla 1 presenta los esteroides hechos utilizando los métodos aquí descritos.

Tabla 1 – Estructura y propiedades químicas-físicas de los compuestos

Comp. No	C^{22}	**Estructura**	**MF**	**MW (Cal.)**	**MS (M+H)**	**Pureza de HPLC (%)**	**cLogP**

7-1	*S*		$C_{28}H_{33}NO_6$	479.6	480.2	96	2.53
7-1	*R*		$C_{28}H_{33}NO_6$	479.6	480.3	100	2.53
8-1	*R*		$C_{32}H_{39}NO_7$	549.7	550.3	96	4.22
7-2	*R/S*		$C_{29}H_{35}NO_6$	493.6	494.3	98	2.59
8-2	*R/S*		$C_{33}H_{41}NO_7$	563.7	564.3	98	4.28
8-3	*R/S*		$C_{27}H_{37}NO_6$	471.6	472.2	96	1.63
7-4	*R*		$C_{27}H_{37}NO_6$	471.6	472.2	96	1.63
11-1	*R/S*		$C_{25}H_{35}NO_5$	429.6	429.9	100	2.63
11-2	*R/S*		$C_{26}H_{37}NO_5$	443.6	444.2	96	3.06
11-3	*R/S*		$C_{27}H_{39}NO_5$	457.6	458.2	100	3.44
11-4	*R/S*		$C_{30}H_{43}NO_5$	497.3	498.2	94	4.29
11-5	*R/S*		$C_{31}H_{39}NO_6$	521.6	522.3	100	4.24
11-5	*S*		$C_{31}H_{39}NO_6$	521.6	522.2	99.8	4.24
11-5	*R*		$C_{31}H_{39}NO_6$	521.6	522.2	99.1	4.24

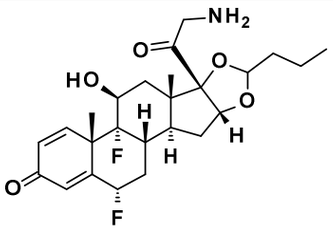
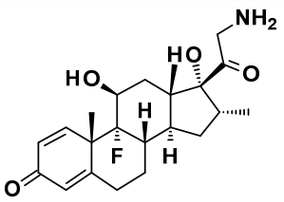
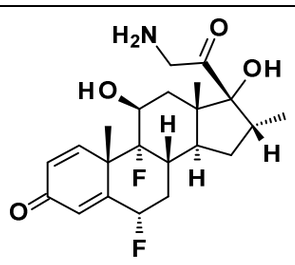
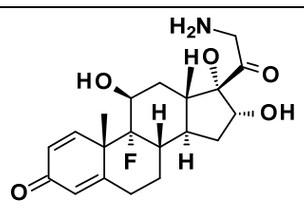
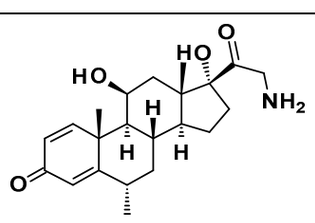
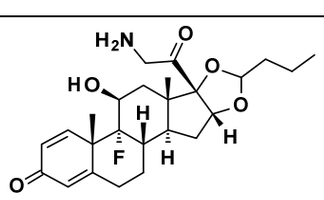
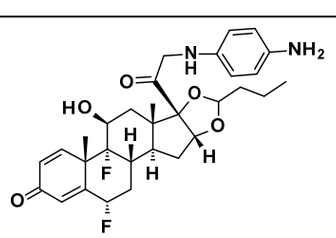
11-6	*S*		$C_{31}H_{38}FNO_6$	539.6	540.3	98	4.38
11-6	*R*		$C_{31}H_{38}FNO_6$	539.6	540.3	100	4.38
11-7	*R*		$C_{31}H_{38}FNO_6$	539.6	540.2	100	4.38
11-8	*R*		$C_{32}H_{41}NO_6$	535.7	518.2 (M+H-H_2O)	100	4.54
11-10	*R/S*		$C_{31}H_{37}FO_6$	524.3	525.3	100	5.21
11-11	*R/S*		$C_{33}H_{41}NO_7$	563.7	564.4	100	4.31
11-12	*R/S*		$C_{31}H_{37}F_2NO_6$	557.6	558.3	97	3.94
11-12	*R*		$C_{31}H_{37}F_2NO_6$	557.6	558.2	100	
11-13	*R*		$C_{31}H_{37}F_2NO_6$	557.6	558.2	100	3.94
11-14	*R/S*		$C_{31}H_{36}F_3NO_6$	575.6	576.2	100	4.09
11-15	*R/S*		$C_{32}H_{39}F_2NO_6$	554.2	555.2	100	3.90
11-16	*R/S*		$C_{31}H_{38}O_7$	522.3	523.5	100	4.76
11-17	*R/S*		$C_{30}H_{36}F_2N_2O_6$	558.6	559.2	100	3.91

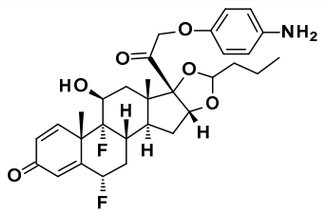
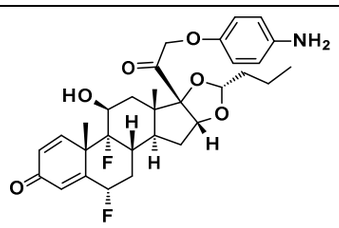
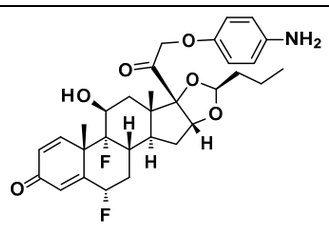
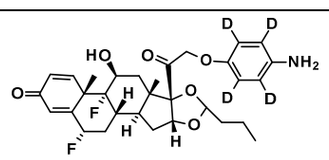
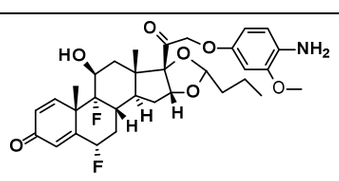
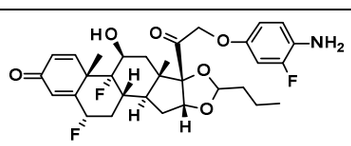
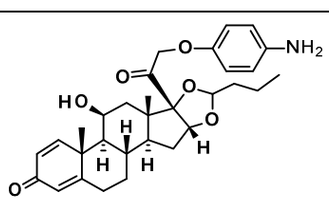
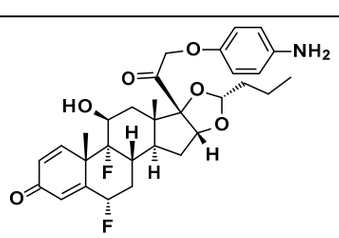
11-19	*R/S*		$C_{25}H_{33}F_2NO_5$	465.2	466.2	98.5	2.33
11-19	*R*					100	
11-20	*R/S*		$C_{34}H_{43}F_2NO_6$	599.2	600.3	100	4.71
11-21	*R/S*		$C_{26}H_{35}F_2NO_5$	479.3	480.2	100	2.76
14-2			$C_{26}H_{35}F_2NO_5$	479.6	480.2	98	2.81
15-5			$C_{26}H_{35}F_2NO_5$	479.6	480.2	98	2.81
16-5			$C_{28}H_{33}F_2NO_5$	483.6	484	98	2.85

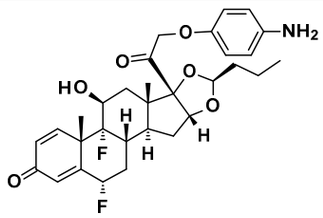
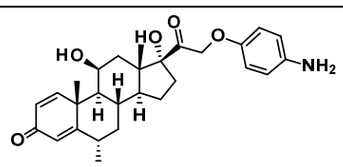
[484] La siguiente Tabla 2 presenta esteroides hechos utilizando los métodos aquí descritos.

5

Tabla 2 – Estructura y propiedades químicas-físicas de los compuestos

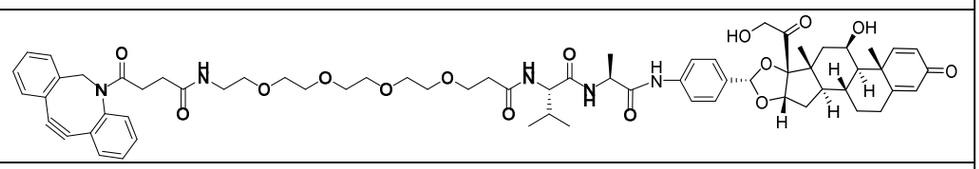
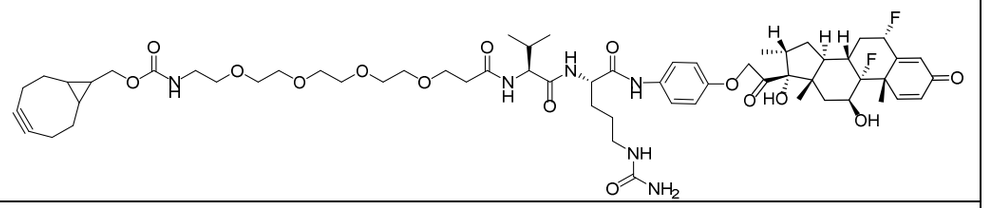
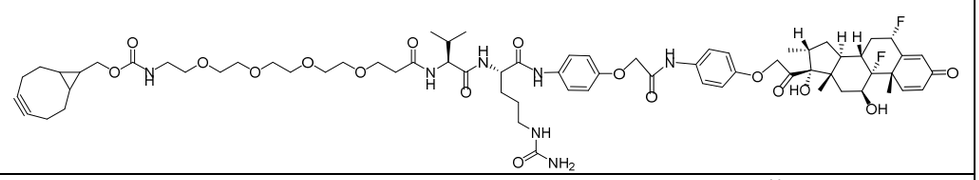
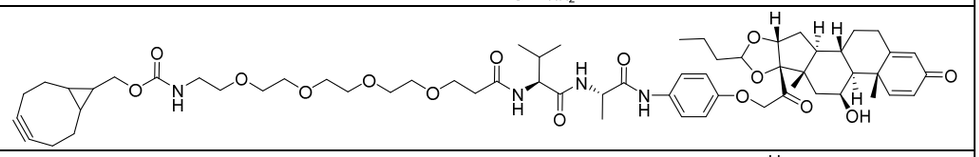
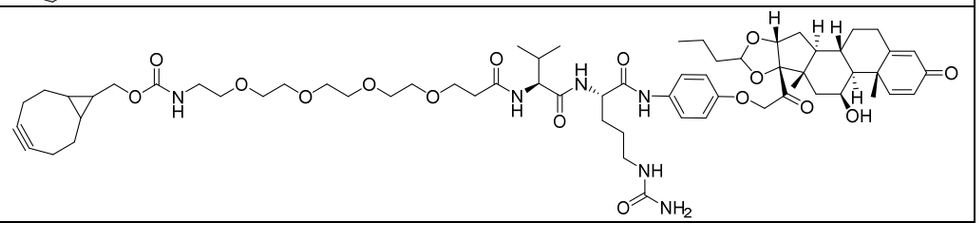
Comp. No	Estructura	MF	MS (m/z) 100%	Pico m/z más alto	Pureza de HPLC (%)
4b		$C_{25}H_{33}F_2NO_5$. $C_2HF_3O_2$	466.2 (M+H)	466.2 (M+H)	98.5
4c		$C_{24}H_{31}F_4NO_6$	392.2 (M+H)	392.2 (M+H)	> 99
4d		$C_{24}H_{30}F_5NO_6$	410.2 (M+H)	410.2 (M+H)	98
4e		$C_{21}H_{28}FNO_5.C_2HF_3O_2$	394.2 (M+H)	394.2 (M+H)	> 99
4f		$C_{22}H_{31}NO_4$	374.3 (M+H)	374.3 (M+H)	> 99
4h		$C_{25}H_{34}FNO_5.C_2HF_3O_2$	448.2 (M+H)	448.2 (M+H)	> 99
5-I		$C_{31}H_{38}F_2N_2O_5.C_2HF_3O_2$	557.1 (M+H)	557.1 (M+H)	> 99

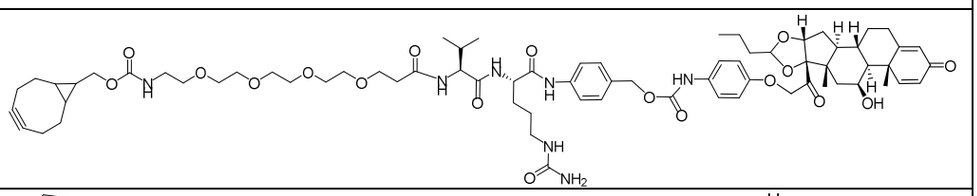
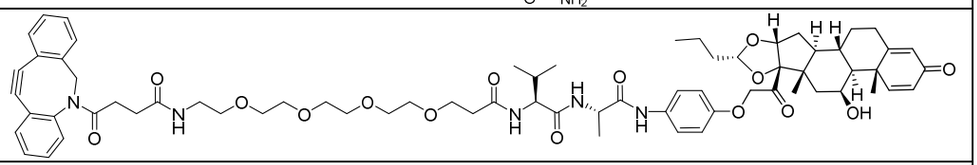
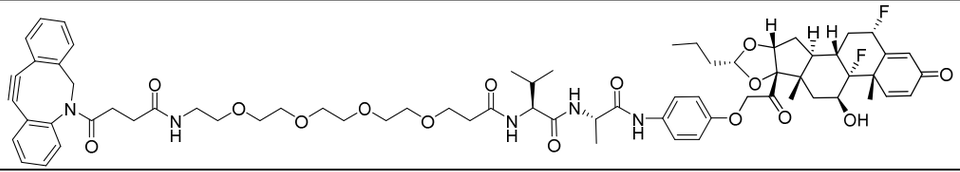
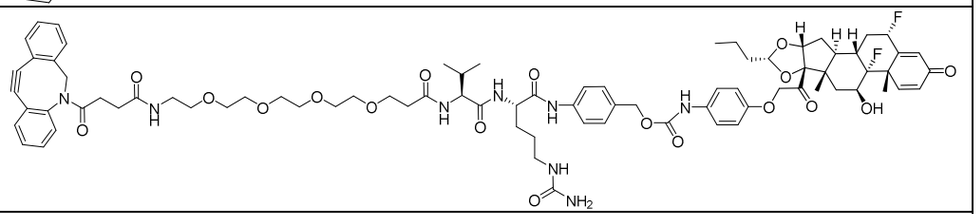
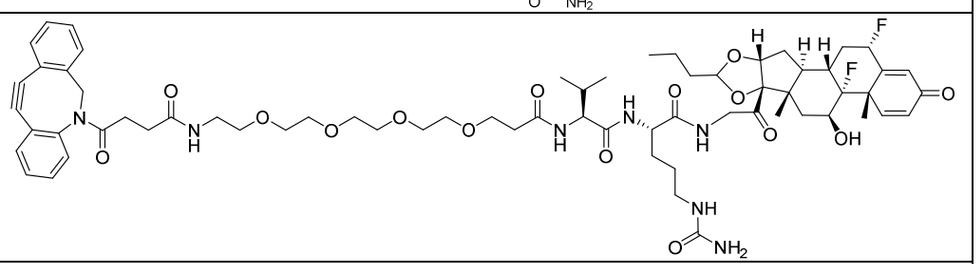
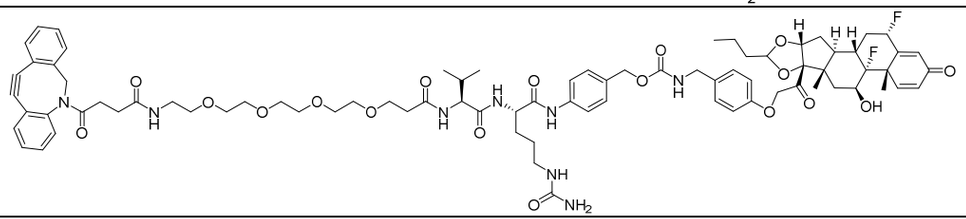
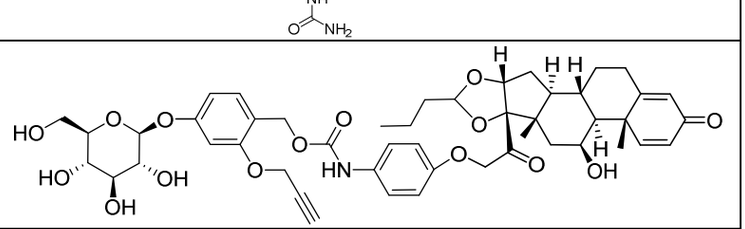
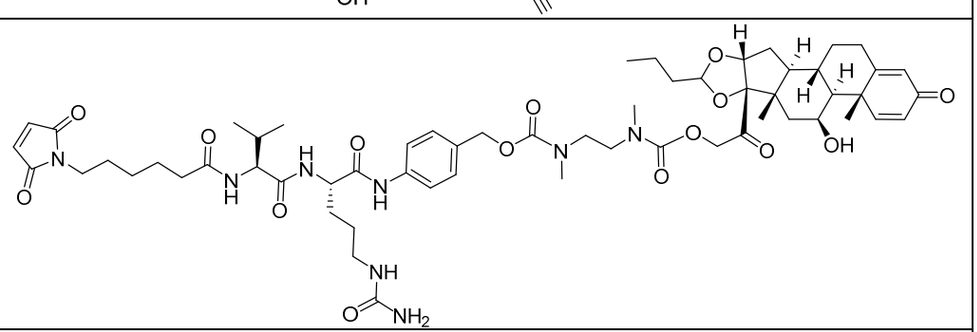
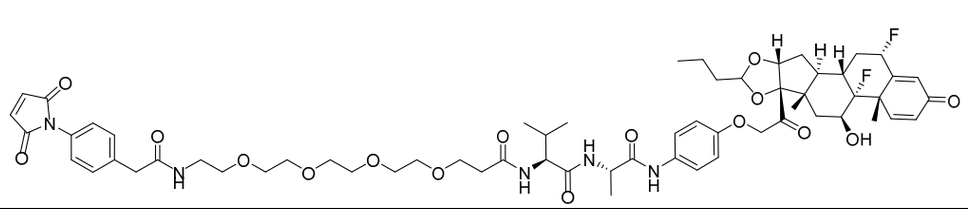
Comp. No	Estructura	MF	MS (m/z) 100%	Pico m/z más alto	Pureza de HPLC (%)
6-I		$C_{31}H_{37}F_2NO_6$	522.3 (M+H)	522.3 (M+H)	97
***R*-6-I**		$C_{31}H_{37}F_2NO_6$	522.2 (M+H)	522.2 (M+H)	> 99
***S*-6-I**		$C_{31}H_{37}F_2NO_6$	522.2 (M+H)	522.2 (M+H)	97
6-I D		$C_{31}H_{37}F_2NO_6$	297.6 (M/2+H)	558.2 (M+H) (10%)	98.4
6-II		$C_{32}H_{39}F_2NO_7.C_2HF_3O_2$	558.3 (M+H)	558.3 (M+H)	> 99
6-III		$C_{31}H_{36}F_3NO_6$	558.3 (M+H)	558.3 (M+H)	> 99
6-VI		$C_{31}H_{39}NO_6$	576.2 (M+H)	576.2 (M+H)	> 99
***R*-6-VI**		$C_{31}H_{39}NO_6$	588.3 (M+H)	588.3 (M+H)	> 99

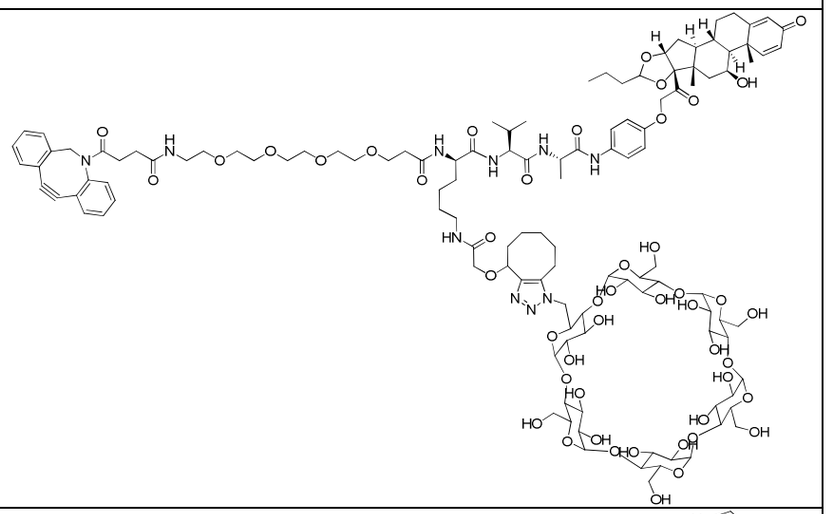
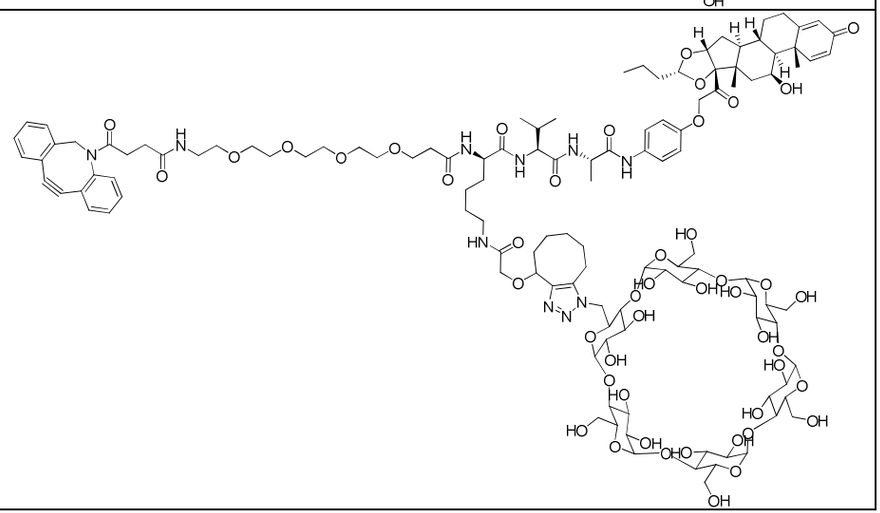
Comp. No	Estructura	MF	MS (m/z) 100%	Pico m/z más alto	Pureza de HPLC (%)
***S*-6-VI**		$C_{31}H_{39}NO_6$	587.2 (M-55)	665.2 (M+Na) (25%)	> 99
6-VII		$C_{28}H_{35}NO_5$	587.3 (M+H)	587.3 (M+H)	> 99

[485] La siguiente Tabla 3 presenta los enlazador cargas útiles hechos utilizando los métodos aquí descritos.

Tabla 3. Ejemplos de enlazador–cargas útiles

LP No.	Estructuras de los enlazador-cargas útiles
LP1	
LP2	
LP3	
LP4	
LP5	

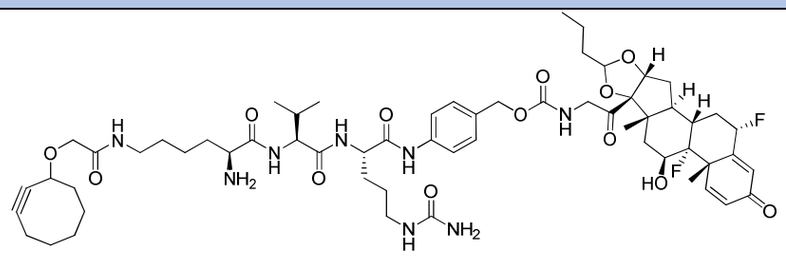
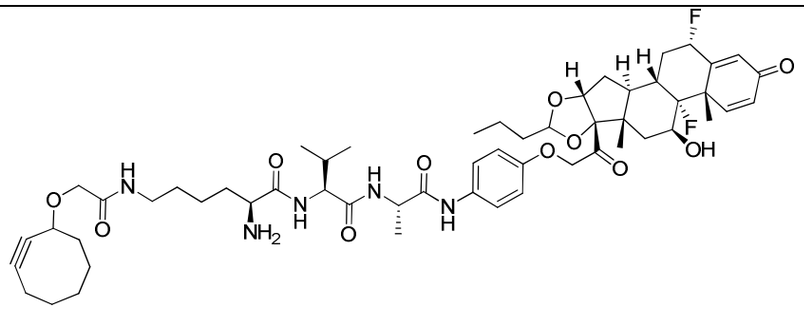
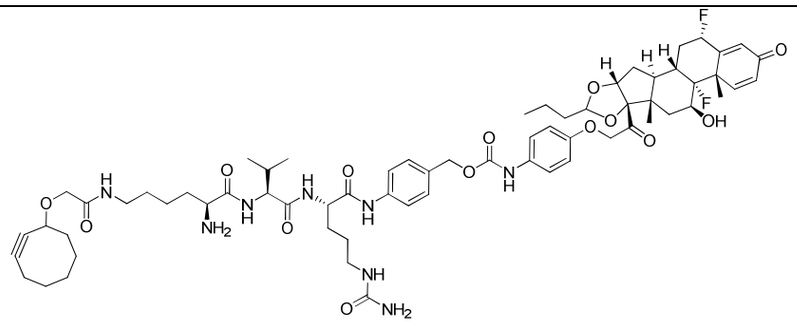
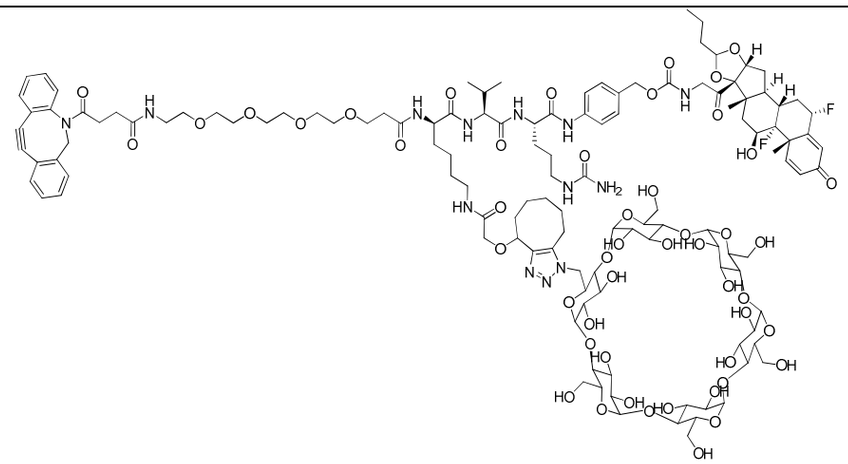
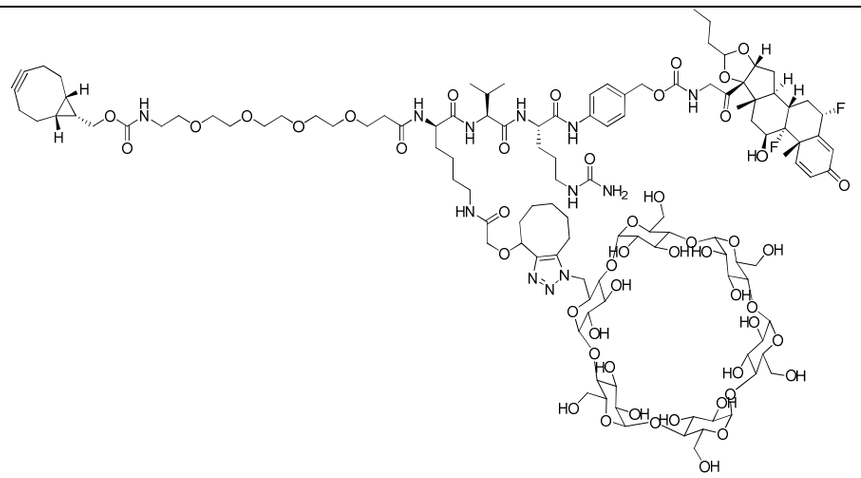
LP No.	Estructuras de los enlazador-cargas útiles
LP6	
LP7	
LP8	
LP9	
LP10	
LP11	
LP12	
LP13	
LP14	

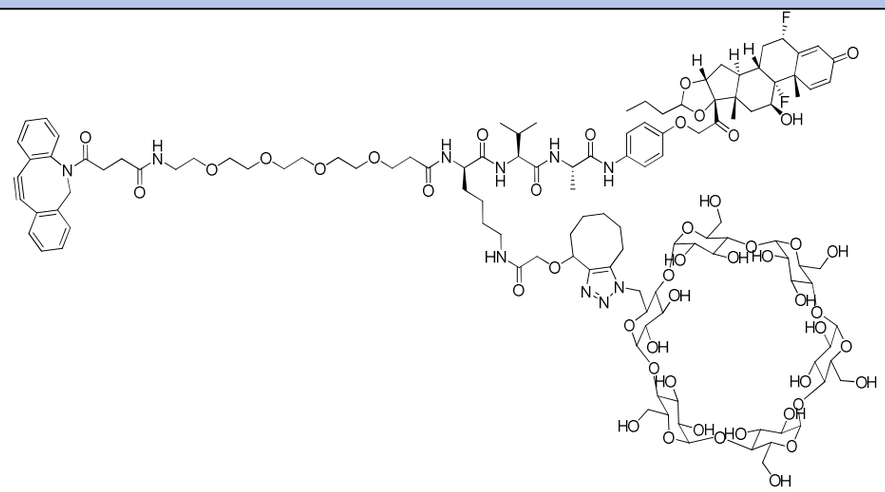
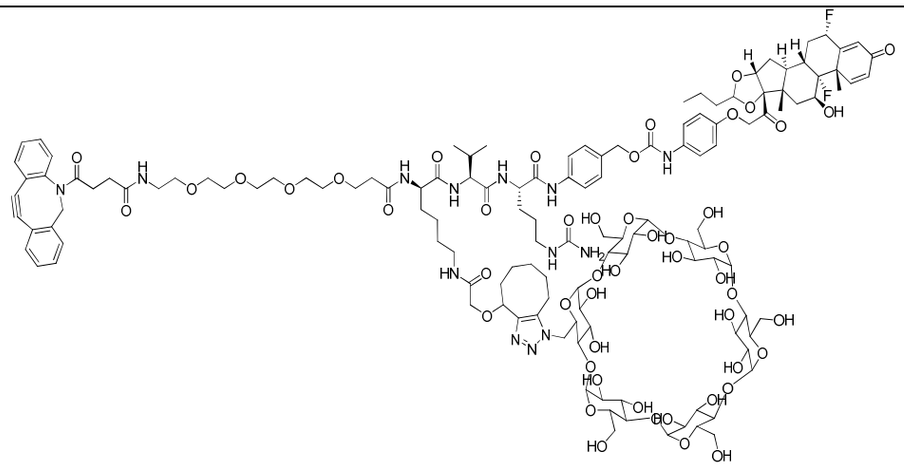
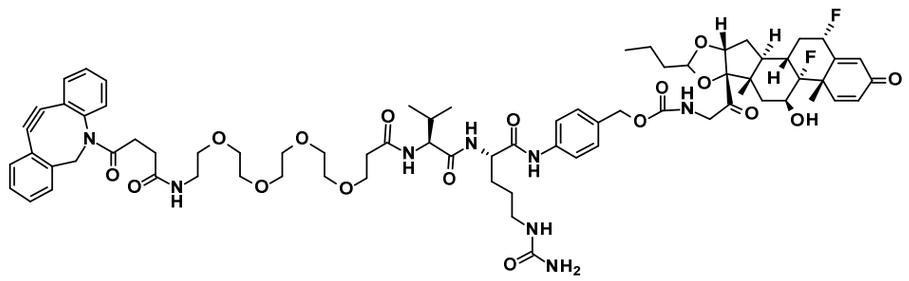
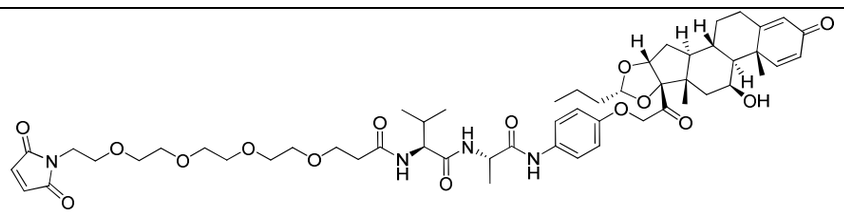
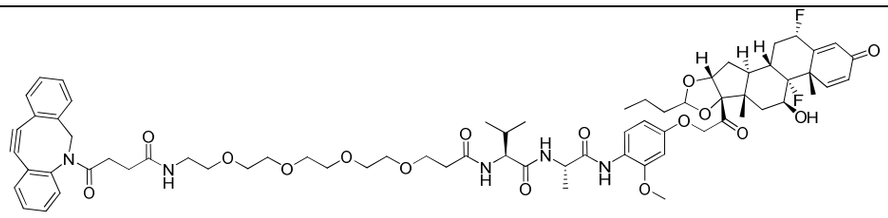
LP No.	Estructuras de los enlazador-cargas útiles
LP15	
LP16	

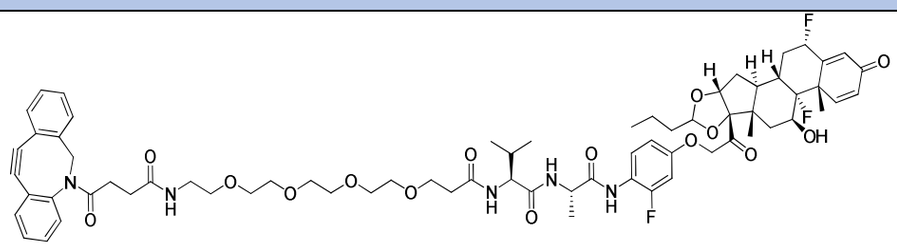
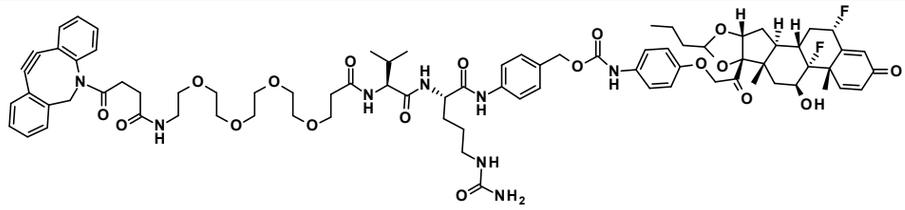
[486] La siguiente Tabla 4 presenta los enlazador cargas útiles hechos utilizando los métodos aquí descritos.

Tabla 4. Ejemplos de enlazador-cargas útiles

	Estructura

	Estructura
LP101	
LP102	
LP103	
LP104	
LP105	

	Estructura
LP108	
LP110	
LP112	
LP113	
LP114	

	Estructura
LP115	
LP116	

EJEMPLO 2

[487] Este ejemplo demuestra métodos para hacer derivados químicos de budesonida, dexametasona, y flumetasona. Estos métodos se ilustran, en general, como se muestra en las FIGURAS 2, 3 y 4.

[488] Como se muestra en la FIGURA 2, análogos de mesilato de Budesonida (**9**) o su análogo de difluoro (**9B**) se hicieron reaccionar con alquilaminas o fenoles sustituidos (**10**) para producir compuestos que incluyen anilina o amina (**11**), tales como los compuestos **11-1** a **11- 23** en la FIGURA 2.

[489] Como se muestra en la FIGURA 3, análogos de mesilato de Dexametasona (**12**) se hicieron reaccionar con alquilaminas o fenoles sustituidos (**10**) para producir compuestos que incluyen anilina o amina (**14**) o (**15**) en la FIGURA 3.

[490] Como se muestra en la FIGURA 4, análogos de mesilato de Flumetasona (**13**) se hicieron reaccionar con alquilaminas o fenoles sustituidos (**10**) para producir compuestos que incluyen anilina o amina (**16**) en la FIGURA 4.

[491] Como se detalla a continuación, epímeros estereoquímicamente puros de **11-5*S*** y **11-*5R*** en la Tabla 1 se obtuvieron mediante separación quiral a partir de una mezcla de sus correspondientes isómeros ***R/S***. La estereoquímica absoluta para cada compuesto se determinó mediante 2D-NOESY. Los espectros de 2D-NOESY mostraron que H^{22} y H^{18} estaban correlacionados en **11-5*R***, y que no había correlación entre H^{22} y H^{18} en **11-5*S***. De modo semejante, los centros quirales en la posición C^{22} se identificaron para los compuestos **7-1*S***, **7-1*R***, **7-4*R***, **8-1*R***, **11-6*S*, 11-6*R*, 11-7*R***, **11-8*R*, 11-12*R*, 11-13*R***, y **11-19*R*** en la Tabla 1 mediante 2D-NOESY.

EJEMPLO 3

[492] Este ejemplo demuestra un método para hacer los compuestos **7-1*S*** y **7-1*R*** en la Tabla 1. Este ejemplo se refiere a los compuestos numerados en la FIGURA 1.

[493] 2–Metilpropanoato de 2–[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*S*,13*R*)–11–hidroxi–9,13–dimetil–6–(4–nitrofenil)–16–oxo–5,7–dioxapentaciclo[10.8.0.$0^{2,9}$.$0^{4,8}$.$0^{13,18}$]icosa–14,17–dien–8–il]–2–oxoetilo (**5–1**) y

[494] (1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*S*,13*R*)–11–Hidroxi–8–(2–hidroxiacetil)–9,13–dimetil–6–(4–nitrofenil)–5,7–dioxapentaciclo[10.8.0.$0^{2,9}$.$0^{4,8}$.$0^{13,18}$]icosa–14,17–dien–16–ona (**6–1**).

[495] **Etapa 1**: El compuesto **3** se sintetizó de acuerdo con los procedimientos en US2007/135398, cuyos contenidos completos se incorporan aquí por referencia en su totalidad para todos los propósitos, haciendo reaccionar desonida (**1**) con ácido isobutírico en acetona.

[496] **Etapa 2**: A una solución de compuesto **3** (320 mg, 0.657 mmol) en nitropropano (20 mL) se añadió ácido perclórico acuoso (70%, 1.90 g, 1.33 mmol) a gotas a 0 °C, seguido por la adición de 4–nitrobenzaldehído (**4–1**, 151 mg, 1.00 mmol). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche, y luego se diluyó con acetato de etilo (80 mL). La mezcla resultante se lavó con una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio (30 mL x 3) y luego con salmuera (30 mL x 2). La solución resultante se secó luego sobre sulfato de sodio y se concentró *in vacuo*. El residuo se purificó luego mediante cromatografía instantánea eluyendo con acetato de etilo al 0–35% en éter de petróleo para producir el compuesto (**5–1**) como un sólido amarillo (120 mg, rendimiento del 32%), que era una mezcla de epímeros 5*R*/5*S* en una relación 3/1 con base en ^{1}H NMR, y eluyendo adicionalmente con acetato de etilo al 60-70% en éter de petróleo para producir el compuesto (**6–1**) como un sólido amarillo (150 mg, rendimiento del 36%), que era una mezcla de epímeros 6*R*/6*S* en una relación 5/1 con base en ^{1}H NMR (R/S no determinada).

[497] Compuesto (**5–1**): ESI m/z: 580 $(M + H)^+$. ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz, epímeros A y B con relación = 3) δ 8.27 y 8.25 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.62 y 7.55 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.28–7.21 (m, 1H), 6.33–6.23 (m, 1H), 6.03 y 6.05 (s, 1H), 5.62 y 6.16 (s, 1H), 5.12 y 5.43 (d, J = 5.4 Hz, 1H), 4.97 y 4.77 (d, J = 17.6 Hz, 1H), 4.88 y 4.33 (d, J = 17.6 Hz, 1H), 4.52 (br s, 1H), 2.80–2.50 (m, 2H), 2.44–2.29 (m, 1H), 2.29–2.05 (m, 3H), 2.01–1.84 (m, 2H), 1.80–1.67 (m, 2H), 1.51 y 1.59 (br s, 1H), 1.46 y 1.48 (s, 3H), 1.29–1.07 (m, 7H), 1.03 y 1.05 (s, 3H) ppm.

[498] Compuesto **6–1**: ESI m/z: 510 $(M + H)^+$. ^{1}H NMR ($DMSO_{d6}$, 400 MHz, epímeros

A y B con relación = 5) δ 8.26 y 8.24 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.77 y 7.57 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.32 (d, *J* = 10.0 Hz, 1H), 6.17 y 6.18 (dd, *J* = 10.0 Hz, 1.8 Hz, 1H), 5.93 y 5.95 (s, 1H), 5.63 y 6.28 (s, 1H), 5.14 y 5.03 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H), 4.99 y 5.35 (d, *J* = 6.3 Hz, 1H), 4.82 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 4.64–4.13 (m, 3H), 2.64–2.51 (m, 1H), 2.37–2.24 (m, 1H), 2.20–1.99 (m, 2H), 1.94–1.57 (m, 5H), 1.40 (s, 3H), 1.14–0.98 (m, 2H), 0.88 (s, 3H) ppm.

[499] **Etapa 3**: Producción (1*S*,2*S*,4*R*,6*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*S*,13*R*)–6–(4–Aminofenil)–11–hidroxi–8–(2–hidroxiacetil)–9,13–dimetil–5,7–dioxapentaciclo[10.8.0.$0^{2,9}$.$0^{4,8}$.$0^{13,18}$]icosa–14,17–dien–16–ona (**7-1*R***) en la Tabla 1) y (1*S*,2*S*,4*R*,6*S*,8*S*,9*S*,11*S*,12*S*,13*R*)–6–(4–Aminofenil)–11–hidroxi–8–(2–hidroxiacetil)–9,13–dimetil–5,7–dioxapentaciclo[10.8.0.$0^{2,9}$.$0^{4,8}$.$0^{13,18}$]icosa–14,17–dien–16–ona (**7-1*S***) en la Tabla 1).

[500] Polvo de hierro (56.0 mg, 1.00 mmol) y cloruro de amonio (53.5 mg, 1.00 mmol) se añadieron simultáneamente a una solución de compuesto **5-1** (51.0 mg, 0.100 mmol) en una solución combinada de etanol (3 mL) y agua (0.5 mL). La suspensión se agitó a 80 ºC durante una hora y se filtró a través de Celita para remover el sólido. El filtrado se concentró *in vacuo* y el residuo se purificó mediante prep-HPLC (método B) para producir el compuesto **7-1*R*** (30 mg, rendimiento del 63%) como un sólido blanco y el compuesto **7-1*S*** (8 mg, rendimiento del 17%) como un sólido blanco.

[501] Se utilizó espectroscopía 2D-NOESY para determinar las configuraciones estereoquímicas de los centros quirales del compuesto **7-1*R*** y el compuesto **7-1*S***. Los espectros 2D-NOESY confirmaron que existe una correlación entre H^{22} y H^{21} en el compuesto **7-1*R***, lo que indica que tiene un centro quiral de configuración R. No se observó correlación entre H^{22} y H^{21} en el compuesto **7-1*S***, lo que indica que tiene un centro quiral de configuración S. El estudio de NMR también mostró que el cambio de H^{22} en el compuesto **7-1*R*** (5.33 ppm) fue mucho mayor que aquel del compuesto **7-1*S*** (6.01 ppm), lo que indica que el H^{22} del compuesto **7-1*R*** estaba más impedido. Los espectros 2D-NOESY del compuesto **7-1-22*R*** y el compuesto **7-1-22*S*** se muestran en las FIGURAS 5 y 6.

[502] Compuesto **7-1*R*** en la Tabla 1: ESI m/z: 480 $(M + H)^+$. ^{1}H NMR ($MeOD_{d4}$, 400 MHz) δ 7.46 (d, *J* = 10.1 Hz, 1H), 7.17 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.67 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.27 (dd, *J* = 10.1, 1.8 Hz, 1H), 6.04 (s, 1H), 5.33 (s, 1H), 5.00 (d, *J* = 5.4 Hz, 1H), 4.61 (d, *J* = 19.4 Hz, 1H), 4.50–4.39 (m, 1H), 4.31 (d, *J* = 19.4 Hz, 1H), 2.78–2.61 (m, 1H), 2.47–2.35 (m, 1H), 2.35–2.22 (m, 1H), 2.22–2.10 (m, 1H), 2.04–1.94 (m, 1H), 1.91–1.66 (m, 4H), 1.51 (s, 3H), 1.25–1.11 (m, 1H), 1.07 (dd, *J* = 11.2 Hz, 3.5 Hz, 1H), 0.99 (s, 3H) ppm.

[503] Compuesto **7-1*S*** en la Tabla 1: ESI m/z: 480 $(M + H)^+$. ^{1}H NMR ($MeOD_{d4}$, 400

MHz) δ 7.47 (d, J = 10.1 Hz, 1H), 7.02 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 6.65 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 6.27 (dd, J = 10.1, 1.8 Hz, 1H), 6.03 (s, 1H), 6.01 (s, 1H), 5.36 (d, J = 6.2 Hz, 1H), 4.46–4.31 (m, 2H), 4.12 (d, J = 19.2 Hz, 1H), 2.75–2.61 (m, 1H), 2.47–2.35 (m, 1H), 2.27–2.11 (m, 2H), 2.08–1.97 (m, 1H), 1.96–1.73 (m, 4H), 1.51 (s, 3H), 1.33–1.17 (m, 2H), 1.17–1.09 (m, 1H), 1.01 (s, 3H) ppm.

EJEMPLO 4

[504] Este ejemplo demuestra un método para hacer compuestos (**8-1*R/S***) y el compuesto (**8-1*R***) en la Tabla 1. Este ejemplo se refiere a la numeración de compuestos en la FIGURA 1.

[505] 2–Metilpropanoato de 2–[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*S*,13*R*)–6–(4–aminofenil)–11–hidroxi–9,13–dimetil–16–oxo–5,7–dioxapentaciclo[10.8.0.$0^{2,9}$.$0^{4,8}$.$0^{13,18}$]icosa–14,17–dien–8–il]–2–oxoetilo (**8–1*R***).

[506] Polvo de hierro (56.0 mg, 1.00 mmol) y cloruro de amonio (53.5 mg, 1.00 mmol) se añadieron simultáneamente a una solución de compuesto (**6–1**) (58.0 mg, 0.100 mmol) en una solución combinada de etanol (3 mL) y agua (1 mL). La suspensión resultante se agitó a 80 ºC durante una hora y se filtró a través de Celita para remover el sólido. El filtrado se concentró *in vacuo* y el residuo se purificó mediante prep-HPLC (método B) para producir el compuesto (**8-1*R***) y su enantiómero (es decir, estereoquímica S en C^{22}) (26 mg, rendimiento del 45%) como un sólido blanco. La relación del epímero R al epímero S es 4:1 mediante HPLC y ^{1}H NMR. ESI m/z: 550 $(M + H)^+$.

[507] El epímero *R* se aisló adicionalmente y la configuración se determinó mediante 2D NMR.

[508] Compuesto **(8–1*R***): ESI m/z: 550 $(M + H)^+$. ^{1}H NMR ($MeOD_{d4}$, 500 MHz) δ 7.46 (d, J = 10.0 Hz, 1H), 7.19 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 6.69 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 6.27 (dd, J = 10.0 Hz, 2.0 Hz, 1H), 6.05 (s, 1H), 5.44 (s, 1H), 5.07 (d, J = 17.5 Hz, 1H), 4.96 (d, J = 5.5 Hz, 1H), 4.88 (d, J = 17.5 Hz, 1H), 4.48–4.44 (m, 1H), 2.73–2.64 (m, 2H), 2.42–2.39 (m, 1H), 2.32–2.24 (m, 1H), 2.19–2.15 (m, 1H), 2.03–1.99 (m, 1H), 1.95–1.92 (m, 1H), 1.90–1.83 (m, 2H), 1.76–1.69 (m, 1H), 1.52 (s, 3H), 1.27–1.12 (m, 7H), 1.09–1.05 (m, 1H), 1.02 (s, 3H) ppm.

EJEMPLO 5

[509] Este ejemplo demuestra un método para hacer el compuesto (**7-2*R/S***) en la Tabla 1. Este ejemplo se refiere a la numeración de compuestos en la FIGURA 1.

[510] **Etapa 1**: 1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*S*,13*R*)–11–Hidroxi–8–(2–hidroxiacetil)–9,13–dimetil–6–[(4–nitrofenil)metil]–5,7–dioxapentaciclo[10.8.0.$0^{2,9}$.$0^{4,8}$.$0^{13,18}$]icosa–14,17–dien–

16–ona (**5–2**).

[511] A una solución de compuesto (**3**) (226 mg, 0.464 mmol) en nitropropano (10 mL) se añadió ácido perclórico acuoso (70%, 985 mg, 6.90 mmol) a gotas a 0 °C, seguido por la adición de 2–(4–nitrofenil)acetaldehído (**4–2**, 115 mg, 0.696 mmol) de acuerdo con la síntesis en *Synthesis*, **2011**, 18, 2935–2940, cuyo contenido completo se incorpora aquí por referencia en su totalidad para todos los propósitos. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche, y luego se diluyó con acetato de etilo (60 mL). La mezcla se lavó con una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio (50 mL x 3), luego con salmuera (50 mL x 3) y luego se secó sobre sulfato de sodio y se concentró *in vacuo*. El residuo se purificó mediante cromatografía instantánea eluyendo con acetato de etilo al 0–35% en éter de petróleo para producir el compuesto (**6–2**) como un sólido marrón (95 mg, rendimiento del 34%, incluyendo los epímeros 22*R/S* en una relación > 10/1 mediante ^{1}H NMR), y eluyendo adicionalmente con acetato de etilo al 60-70% en éter de petróleo para producir el compuesto (**5-2**) (145 mg, rendimiento del 60%) como un sólido marrón.

[512] Compuesto (**5–2**): ESI m/z: 524 $(M + H)^{+}$. ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 8.09 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.39 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.17 (d, *J* = 10.1 Hz, 1H), 6.31 (dd, *J* = 10.1 Hz, 1.8 Hz, 1H), 6.02 (s, 1H), 4.92 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H), 4.86 (t, *J* = 3.6 Hz, 1H), 4.52–4.39 (m, 2H), 4.28–4.17 (m, 1H), 3.08 (d, *J* = 3.5 Hz, 2H), 2.96 (t, *J* = 4.9 Hz, 1H), 2.53–2.40 (m, 1H), 2.32–2.19 (m, 1H), 2.04–1.95 (m, 1H), 1.95–1.82 (m, 2H), 1.60–1.46 (m, 3H), 1.38 (s, 3H), 1.34 (br s, 1H), 0.91–0.77 (m, 4H), 0.76–0.62 (m, 2H) ppm.

[513] **Etapa 2**: (1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*S*,13*R*)–6–[(4–Aminofenil)metil]–11–hidroxi–8–(2–hidroxiacetil)–9,13–dimetil–5,7–dioxapentaciclo[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]icosa–14,17–dien–16–ona (**7–2*R/S***)

[514] Polvo de hierro (78.0 mg, 1.40 mmol) y cloruro de amonio (75.0 mg, 1.40 mmol) se añadieron simultáneamente a una solución de compuesto (**5-2**) (75.0 mg, 0.143 mmol) en una solución combinada de etanol (4 mL) y agua (0.5 mL). La suspensión se agitó a 80 ºC durante 1.5 horas y se filtró a través de Celita para remover el sólido. El filtrado se concentró *in vacuo* y el residuo se purificó mediante prep-HPLC (método B) para producir el compuesto (**7-2*R/S***) (26 mg, rendimiento del 37%) como un sólido blanco. ESI m/z: 494 $(M + H)^{+}$. ^{1}H NMR ($MeOD_{d4}$, 400 MHz) δ 7.44 (d, *J* = 10.1 Hz, 1H), 6.93 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 6.48 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 6.30 (dd, *J* = 10.1 Hz, 1.9 Hz, 1H), 6.07 (s, 1H), 4.85–4.77 (m, 2H), 4.51 (d, *J* = 19.4 Hz, 1H), 4.35–4.29 (m, 1H), 4.24 (d, *J* = 19.4 Hz, 1H), 2.87–2.72 (m, 2H),

2.62–2.47 (m, 1H), 2.38–2.28 (m, 1H), 2.08–1.93 (m, 1H), 1.90–1.78 (m, 2H), 1.67–1.58 (m, 1H), 1.53–1.37 (m, 5H), 0.91–0.77 (m, 5H), 0.74 (dd, *J* = 11.2 Hz, 3.4 Hz, 1H) ppm.

EJEMPLO 6

[515] Este ejemplo demuestra un método para hacer el compuesto (**8-2*R/S***) en la Tabla 1. Este ejemplo se refiere a la numeración de compuestos en la FIGURA 1.

[516] **Etapa 1**: 2–Metilpropanoato de 2–[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12S,13R)–11–hidroxi–9,13–dimetil–6–[(4–nitrofenil)metil]–16–oxo–5,7–dioxapentaciclo[10.8.0.$0^{2,9}$.$0^{4,8}$.$0^{13,18}$]icosa–14,17–dien–8–il]–2–oxoetilo (**6–2**)

[517] La síntesis del compuesto **6-2** se describió en el EJEMPLO 5 anterior. Compuesto **6–2**: ESI m/z: 594 $(M + H)^+$. ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 8.15 (d, *J* = 8.7 Hz, 0.1H) y 8.09 (d, *J* = 8.7 Hz, 1.9H), 7.40 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.20 (d, *J* = 10.1 Hz, 1H), 6.31 (dd, *J* = 10.1 Hz, 1.8 Hz, 1H), 6.02 (s, 1H), 4.94 (t, *J* = 3.6 Hz, 1H), 4.87 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H), 4.81 (d, *J* = 17.6 Hz, 1H), 4.71 (d, *J* = 17.6 Hz, 1H), 4.46 (s, 1H), 3.09 (d, *J* = 3.5 Hz, 2H), 2.73–2.61 (m, 1H), 2.53–2.41 (m, 1H), 2.31–2.21 (m, 1H), 2.07–1.96 (m, 1H), 1.94–1.84 (m, 2H), 1.84–1.76 (m, 1H), 1.63–1.43 (m, 3H), 1.39 (s, 3H), 1.22 (t, *J* = 7.0 Hz, 6H), 0.92–0.82 (m, 4H), 0.76–0.61 (m, 2H) ppm.

[518] **Etapa 2**: 2–Metilpropanoato de 2–[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*S*,13*R*)–6–[(4–aminofenil)metil]–11–hidroxi–9,13–dimetil–16–oxo–5,7–dioxapentaciclo[10.8.0.$0^{2,9}$.$0^{4,8}$.$0^{13,18}$]icosa–14,17–dien–8–il]–2–oxoetilo (**8–2*R/S***)

[519] A una solución de compuesto **6-2** (65.0 mg, 0.109 mmol) en una solución combinada de etanol (5 mL) y agua (1 mL) se añadieron simultáneamente polvo de hierro (61.0 mg, 1.09 mmol) y cloruro de amonio (58.4 mg, 1.09 mmol). La suspensión se agitó a 80 ºC durante una hora y se filtró a través de Celita para remover el sólido. El filtrado se concentró *in vacuo* y el residuo se purificó mediante prep-HPLC (método B) para producir el compuesto (**8-2*R/S***) (30 mg, rendimiento del 49%) como un sólido blanco. ESI m/z: 564 $(M + H)^+$. ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 7.25 (d, *J* = 10.2 Hz, 1H), 6.95 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 6.44 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 6.31 (dd, *J* = 10.1, 1.8 Hz, 1H), 6.05 (s, 1H), 4.92–4.84 (m, 2H), 4.80 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H), 4.73 (d, *J* = 17.7 Hz, 1H), 4.41 (s, 1H), 3.48 (br s, 1H), 2.85 (d, *J* = 2.7 Hz, 2H), 2.75–2.62 (m, 1H), 2.56–2.41 (m, 1H), 2.31–2.19 (m, 1H), 2.05–1.91 (m, 2H), 1.88–1.80 (m, 1H), 1.77–1.70 (m, 1H), 1.55–1.41 (m, 3H), 1.39 (s, 3H), 1.29–1.18 (m, 8H), 0.91–0.74 (m, 5H) ppm.

EJEMPLO 7

[520] Este ejemplo demuestra un método para hacer el compuesto (**8-3*R/S***) en la

Tabla 1. Este ejemplo se refiere a la numeración de compuestos en la FIGURA 1.

[521] **Etapa 1:** 2–Metilpropanoato de 2–[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*S*,13*R*)–6–(2–{[(9*H*–fluoren–9–ilmetoxi)carbonil]amino}etil)–11–hidroxi–9,13–dimetil–16–oxo–5,7–dioxapentaciclo[10.8.0.$0^{2,9}$.$0^{4,8}$.$0^{13,18}$]icosa–14,17–dien–8–il]–2–oxoetilo (**6–3**)

[522] A una solución de compuesto **3** (240 mg, 0.493 mmol) en nitropropano (5 mL) se añadió ácido perclórico acuoso (70%, 214 mg, 1.49 mmol) a gotas a 0 °C, seguido por la adición de Fmoc–3–amino–1–propanal (**4–3**, 236 mg, 0.799 mmol) de acuerdo con la síntesis en *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128 (12), 4023–4034, cuyo contenido completo se incorpora aquí por referencia en su totalidad para todos los propósitos. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche, y luego se diluyó con acetato de etilo (80 mL). La mezcla se lavó con una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio (50 mL x 3), luego con agua (50 mL x 2) y luego con salmuera (50 mL), y luego se secó sobre sulfato de sodio y se concentró *in vacuo*. El residuo se purificó mediante prep-TLC (gel de sílice, metanol/cloruro de metileno, v/v = 1/25) para producir el compuesto (**6-3**) (200 mg, rendimiento del 56%, epímeros 6*R*/6*S*) como un sólido blanquecino. ESI m/z: 724 $(M + H)^+$. ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 7.76 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.56 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 7.40 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.32–7.20 (m, 3H), 6.28–6.25 (m, 2H), 6.00 (s, 1H), 5.28–5.04 (m, 2H), 4.87–4.76 (m, 1H), 4.46–4.35 (m, 3H), 4.18 (t, *J* = 6.8 Hz, 1H), 3.49 (s, 1H), 3.39–3.24 (m, 2H), 2.77–2.49 (m, 2H), 2.37–2.26 (m, 1H), 2.23–1.96 (m, 3H), 1.96–1.47 (m, 6H), 1.45–1.41 (m, 3H), 1.28–1.06 (m, 10H), 1.02–0.94 (m, 3H) ppm.

[523] **Etapa 2:** 2–Metilpropanoato de 2–[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*S*,13*R*)–6–(2–aminoetil)–11–hidroxi–9,13–dimetil–16–oxo–5,7–dioxapentaciclo[10.8.0.$0^{2,9}$.$0^{4,8}$.$0^{13,18}$]icosa–14,17–dien–8–il]–2–oxoetilo (**8–3*R/S***)

[524] Una solución de compuesto (**6-3**) (40.0 mg, 55.3 µmol) en dietilamina (1 mL) y cloruro de metileno (1 mL) se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Los compuestos volátiles se removieron *in vacuo* y el residuo se purificó mediante prep-HPLC (método B) seguido por prep-TLC (cromatografía en capa fina) (gel de sílice, cloruro de metileno/metanol, v/v = 75/10) para producir el compuesto (**8–3*R/S***) (3 mg, rendimiento del 11%) como un sólido blanquecino. ESI m/z: 502 $(M + H)^+$. ^{1}H NMR ($MeOD_{d4}$, 400 MHz) δ 7.36 (d, *J* = 10.1 Hz, 1H), 6.16 (dd, *J* = 10.1 Hz, 1.8 Hz, 1H), 5.91 (s, 1H), 5.23 (t, *J* = 4.4 Hz, 1H), 5.08–4.90 (m, 1H), 4.75–4.65 (m, 1H), 4.38–4.28 (m, 1H), 2.83–2.50 (m, 2H), 2.33–2.23 (m, 1H), 2.13–2.00 (m, 2H), 1.90–1.46 (m, 6H), 1.39 (s, 3H), 1.24–1.12 (m, 2H), 1.23–0.78 (m, 11H) ppm.

EJEMPLO 8

[525] Este ejemplo demuestra un método para hacer el compuesto **7-4*R*** en la Tabla 1. Este ejemplo se refiere a la numeración de compuestos en la FIGURA 1.

[526] (1*S*,2*S*,4*R*,6*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*S*,13*R*)–11–Hidroxi–8–(2–hidroxiacetil)–9,13–dimetil–6–(piperidin–4–il)–5,7–dioxapentaciclo[10.8.0.00^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]icosa–14,17–dien–16–ona (**7–4*R***).

[527] A una solución de desonida (**1**, 0.10 g, 0.25 mmol) en nitropropano (5 mL) se añadió ácido perclórico acuoso (70%, 0.11 g, 0.75 mmol) a gotas a 0 °C, seguido por la adición de 1–Boc–4–piperidinacarboxaldehído (**4–4**, 64 mg, 0.30 mmol). Después de agitarse a temperatura ambiente durante la noche, la suspensión se concentró *in vacuo*. El residuo se basificó mediante la adición de una solución de amoniaco en metanol (7 M, 10 mL). La mezcla resultante se concentró *in vacuo* y el producto crudo se purificó mediante prep-HPLC dos veces (método B) para producir el compuesto **7-4*R*** (15 mg, rendimiento del 13%) como un sólido blanco. ESI m/z: 472 $(M + H)^+$. ^{1}H NMR ($MeOD_{d4}$, 500 MHz) δ 7.47 (d, J = 10.0 Hz, 1H), 6.27 (dd, J = 10.0 Hz, 2.0 Hz, 1H), 6.03 (s, 1H), 4.90 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 4.50 (d, J = 19.0 Hz, 1H), 4.46–4.43 (m, 1H), 4.41 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 4.29 (d, J = 19.0 Hz, 1H), 3.13–3.09 (m, 2H), 2.71–2.60 (m, 3H), 2.42–2.38 (m, 1H), 2.27–2.13 (m, 2H), 1.99–1.96 (m, 1H), 1.85–1.64 (m, 7H), 1.52 (s, 3H), 1.51–1.38 (m, 2H), 1.14–0.99 (m, 2H), 0.96 (s, 3H) ppm. La configuración R estereoquímica para el compuesto **7-4*R*** se determinó mediante 2D NMR.

EJEMPLO 9

[528] Este ejemplo demuestra un método para hacer el compuesto (**11-1*R/S***) en la Tabla 1. El método se ilustra, generalmente, como se muestra en la FIGURA 2.

[529] **Etapa 1:** Metanosulfonato de 2–[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*S*,13*R*)–11–hidroxi–9,13–dimetil–16–oxo–6–propil–5,7–dioxapentaciclo[10.8. 00^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]icosa–14,17–dien–8–il]–2–oxoetilo (**9**)

[530] **Procedimiento general A** para la síntesis de mesilatos a partir de su alcohol: A una solución del alcohol (1.0 equiv.) en DCM (10 mL por gramo del material de partida) se añadió trietilamina o 4-dimetilaminopiridina (2 equiv.) y cloruro de metanosulfonilo (1.2 equiv.). Después de agitarse a 0 °C durante media hora o hasta que el material de partida se consumiera de acuerdo con la TLC, a la mezcla de reacción se añadió gel de sílice (malla 100-200) y se concentró *in vacuo*. El residuo con gel de sílice se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (acetato de etilo al 0-50% en éter de petróleo)

para dar el producto de mesilato. Alternativamente, la mezcla se lavó con clorhidrato acuoso diluido (1 N) y salmuera, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró. El producto crudo se purificó mediante cromatografía instantánea (MeOH al 0-2% en DCM) para dar el producto de mesilato correspondiente.

[531] Método alternativo para hacer el compuesto **9**: a una solución de Budesonida (0.28 mg, 0.65 mmol) en piridina (5 mL) se añadió 4-dimetilaminopiridina (0.16 g, 1.3 mmol) y luego cloruro de metanosulfonilo (0.11 g, 0.97 mmol) se añadió a gotas a 0 ºC. Después de agitarse a temperatura ambiente durante 2 horas, la mezcla resultante se vertió en acetato de etilo (100 mL). La mezcla se lavó con clorhidrato acuoso diluido (1N) y luego con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró. El producto crudo se purificó mediante cromatografía instantánea (metanol al 0-1% en cloruro de metileno) para producir el compuesto (**9**) (0.26 g, rendimiento del 85%) como un sólido blanco. ESI m/z: 509 $(M + H)^+$. ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) (que epímeros) δ 7.25 y 7.22 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 6.30–6.27 (m, 1H), 6.03–6.02 (m, 1H), 5.17–5.11 (m, 1.5H), 5.06–4.96 (m, 1.5 H), 4.87–4.86 (m, 0.5 H), 4.59 (d, J = 4.5 Hz, 0.5 H), 4.52–4.50 (m, 1 H), 3.24 (s, 3H), 2.60–2.53 (m, 1H), 2.36–2.33 (m, 1H), 2.24–2.00 (m, 3H), 1.86–1.62 (m, 4H), 1.53–1.33 (m, 8H), 1.21–1.09 (m, 2 H), 1.02–0.96 (m, 3H), 0.94–0.91 (m, 3H) ppm.

[532] **Etapa 2:** (1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*S*,13*R*)–8–(2–Aminoacetil)–11–hidroxi–9,13–dimetil–6–propil–5,7–dioxapentaciclo[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]icosa–14,17–dien–16–ona (**11-1*R/S***)

[533] A una solución de amoniaco en MeOH (7 M, 15 mL) a temperatura ambiente se añadió el compuesto **9** (0.10 g, 0.20 mmol). La solución se selló y se agitó a 40 ºC durante la noche. Los compuestos volátiles se removieron *in vacuo* y el producto crudo se purificó mediante prep-HPLC (método B) para producir el compuesto (**11-1*R/S***) (8.0 mg, rendimiento del 9%) como un sólido blanquecino. ESI m/z: 429.9 $(M + H)^+$. 1H NMR ($MeOD_{d4}$, 400 MHz) δ 7.46 (d, J = 10.0 Hz, 1H), 6.26 (d, J = 10.0 Hz, 1H), 6.02 (s, 1H), 5.22–5.15 (m, 1.5 H), 4.88 (m, 0.6H), 4.58 (m, 0.5H), 4.42 (m, 1H), 3.96–3.81 (m, 0.7H), 3.50–3.41 (m, 0.7H), 2.70–2.63 (m, 1H), 2.40–2.37 (m, 1H), 2.22–1.94 (m, 3H), 1.87–1.25 (m, 11H), 1.17–0.80 (8H) ppm. HPLC *Anal.*: > 95%, Tiempo de retención: 7.63 min (método B).

EJEMPLO 10

[534] Este ejemplo demuestra un método para hacer el compuesto **11-2*R/S*** en la Tabla 1. Este ejemplo se refiere a la numeración de compuestos en la FIGURA 2.

[535] (1S,2S,4R,8S,9S,11S,12S,13R)–11–hidroxi–9,13–dimetil–8–[2–(metilamino)acetil]–6–propil–5,7–dioxapentaciclo[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]icosa–14,17–dien–16–ona (**11-2*R/S***)

[536] Una solución de compuesto **9** (51 mg, 0.10 mmol) en metilamina (solución 2 M en THF, 0.5 mL) en un tubo sellado se agitó a 20-25 °C durante 4 horas, y luego se agitó a 40 °C durante la noche. Los compuestos volátiles se removieron *in vacuo* y el residuo se purificó mediante prep-HPLC (método A) y luego mediante prep-HPLC (método B) para producir el compuesto (**11-2*R/S***) (15 mg, rendimiento del 33%) como un sólido blanco. ESI m/z: 444.3 $(M + H)^+$. ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 7.26–7.23 (d, J = 10.8 Hz, 1H), 6.30–6.26 (m, 1H), 6.03–6.02 (m, 1H), 5.20–5.16 (m, 1H), 4.90–4.89 (d, J = 4.8 Hz, 0.5 H), 4.69–4.66 (t, J = 4.8 Hz, 0.5H), 4.49–4.51 (m, 1H), 3.50–3.29 (m, 2H), 2.61–2.52 (m, 1H), 2.37–2.32 (m, 1H), 2.17–2.16 (d, J = 3.6 Hz, 3H), 2.14–2.08 (m, 3H), 1.86–1.74 (m, 3H), 1.59–1.48 (m, 2H), 1.45 (s, 3H), 1.42–0.89 (m, 12H) ppm.

EJEMPLO 11

[537] Este ejemplo demuestra un método para hacer el compuesto **11-3*R/S*** en la Tabla 1. Este ejemplo se refiere a la numeración de compuestos en la FIGURA 2.

[538] (1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*S*,13*R*)–8–[2–(Dimetilamino)acetil]–11–hidroxi–9,13–dimetil–6–propil–5,7–dioxapentaciclo[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]icosa–14,17–dien–16–ona (**11-3*R/S***)

[539] A una solución de compuesto **9** (51 mg, 0.10 mmol) en THF (3 mL) se añadió a gotas una solución de dimetilamina en THF (2 M, 0.75 mL, 1.5 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó a 50 ºC durante la noche. La mezcla de reacción se concentró, y el producto crudo se purificó mediante prep-HPLC (método B) para producir el compuesto **11-3*R/S*** (15 mg, rendimiento del 33%) como un sólido blanco. ESI m/z: 458.2 $(M + H)^+$. ^{1}H NMR ($MeOD_{d4}$, 400 MHz) δ 7.46 (d, J = 10.4 Hz, 1H), 6.26 (d, J = 10.0 Hz, 1H), 6.02 (s, 1H), 5.21 (t, J = 4.8 Hz, 0.6H), 5.17 (d, J = 7.2 Hz, 0.6H), 4.58 (d, J = 4.4 Hz, 0.4H), 4.44–4.41 (m, 1H), 3.80–3.57 (m, 1H), 3.26 (d, J = 18.8 Hz, 0.7H), 3.08–2.91 (m, 0.7H), 2.70–2.61 (m, 1H), 2.49–2.33 (m, 7H), 2.26–2.11 (m, 2H), 2.02–1.95 (m, 1H), 1.85–1.55 (m, 5H), 1.49 (s, 3H), 1.49–1.30 (m, 3H), 1.09–1.00 (m, 2H), 0.98–0.90 (m, 6H) ppm. HPLC *Anal.*: > 95%, Tiempo de retención: 8.34 min (método B).

EJEMPLO 12

[540] Este ejemplo demuestra un método para hacer el compuesto **11-5*R/S*** en la Tabla 1. Este ejemplo se refiere a la numeración de compuestos en la FIGURA 2.

[541] (1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*S*,13*R*)–8–[2–(4–Aminofenoxi)acetil]–11–hidroxi–9,13–dimetil–6–propil–5,7–dioxapentaciclo[10.8. $00^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}$]icosa–14,17–dien–16–ona **(11-5*R/S*)**

[542] **Procedimiento general B** para hacer éter de fenol sustituido a partir de su precursor de mesilato: A acetona o acetonitrilo caliente (60-65 °C) se añadió precursor de mesilato (1 equiv.), fenol sustituido (2.0-2.5 equiv.), y carbonato de potasio o carbonato de cesio (2.0-3.0 equiv.). La suspensión resultante se sometió a reflujo durante 2 a 3 horas, y la reacción se monitoreó mediante LCMS y/o TLC. Después de que la reacción se enfrió a temperatura ambiente, los compuestos volátiles se removieron *in vacuo* y al residuo se añadió agua. La mezcla acuosa se extrajo con acetato de etilo. La solución orgánica combinada se lavó con agua y salmuera, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró *in vacuo*. El producto crudo se utilizó para la siguiente etapa directamente o se purificó mediante cromatografía instantánea o prep-HPLC.

[543] **Etapa 1**: Una mezcla de compuesto **9** (0.13 g, 0.26 mmol), 4-nitrofenol (**10–5**, 72 mg, 0.52 mmol) y carbonato de potasio (72 mg, 0.52 mmol) en acetona (10 mL) se sometió a reflujo (60 °C) durante la noche. Después de la filtración para remover los sólidos, el filtrado se concentró *in vacuo*. El producto crudo se purificó mediante cromatografía instantánea (metanol al 0-1% en cloruro de metileno) para producir un nitro-intermedio (0.11 g, rendimiento del 77%) como un aceite marrón. ESI m/z: 552 $(M + H)^+$. ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) (con epímeros) δ 8.23–8.15 (m, 2.4H), 7.26–7.23 (m, 1H), 6.97–6.91 (m, 2.4H), 6.31–6.28 (m, 1H), 6.05–6.04 (m, 1H), 5.22–5.18 (m, 1.4H), 5.10–5.07 (m, 0.6H), 4.93 (d, *J* = 5.0 Hz, 0.6H), 4.83–4.77 (m, 1H), 4.67 (d, *J* = 5.0 Hz, 0.6H), 4.56–4.53 (m, 1H), 2.62–2.55 (m, 1H), 2.38–2.5 (m, 1H), 2.24–2.07 (m, 3H), 1.88–1.56 (m, 5H), 1.46–1.40 (m, 6H), 1.20–1.13 (m, 2H), 1.05–0.99 (m, 3H), 0.97–0.94 (m, 3H) ppm.

[544] **Etapa 2**: Polvo de hierro (0.10 g, 1.9 mmol) y cloruro de amonio (0.10 g, 1.9 mmol) se añadieron simultáneamente a una solución del nitro-intermedio (0.10 g, 0.19 mmol) en una solución combinada de etanol (20 mL) y agua (2 mL). La suspensión se agitó a 80 ºC durante 2 horas y se filtró a través de Celita para remover las sales inorgánicas. El filtrado se concentró *in vacuo* y el residuo se purificó mediante prep-HPLC (método B) para producir el compuesto (**11-5*R/S***) (50 mg, rendimiento del 50%) como un sólido blanco. ESI m/z: 522 $(M + H)^+$. ^{1}H NMR ($MeOD_{d4}$, 500 MHz) (con epímeros) δ 7.47 (d, *J* = 10.0 Hz, 1H), 6.78–6.70 (m, 4H), 6.29–6.26 (m, 1H), 6.04 (br s, 1H), 5.25 (t, *J* = 5.0 Hz, 0.4H), 5.20 (d, *J* = 7.0 Hz, 0.4H), 5.06 (d, *J* =18.0 Hz, 0.4H), 4.98 (d, *J* =18.0 Hz, 0.6H), 4.90–4.87 (m, 0.6 H),

4.75–4.66 (m, 1.6H), 4.46–4.44 (m, 1H), 2.71–2.64 (m, 1H), 2.42–2.38 (m, 1H), 2.28–2.18 (m, 2H), 2.06–2.00 (m, 1H), 1.87–1.83 (m, 1H), 1.76–1.73 (m, 1H), 1.69–1.61 (m, 3H), 1.55–1.38 (m, 3H), 1.51 (s, 3H), 1.20–1.02 (m, 3H), 0.98–0.92 (m, 5H) ppm.

[545] Una mezcla de dos epímeros del compuesto **11-5*R*** y el compuesto **11-5*S*** de la Tabla 1 (0.30 g, 0.58 mmol) se aisló mediante HPLC quiral (Instrumento: Gilson-281, Columna: OZ-H 20*250 mm, 10um (Dacel), utilizando fase móvil: hexano (DEA al 0.1%)/Etanol (DEA al 0.1%)=70/30 en una tasa de flujo de 60 mL/min, detectado a 214 nm. La solución resultante se concentró para proporcionar el compuesto **11-5*S*** (30 mg, rendimiento del 10%) y el compuesto **11-5*R*** (50 mg, rendimiento del 17%) como sólidos blancos, por separado. Las estructuras del compuesto **11-5*S*** y el compuesto **11-5*R*** se determinaron mediante 2D–NOESY.

[546] (1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*S*,13*R*)–8–[2–(4–Aminofenoxi)acetil]–11–hidroxi–9,13–dimetil–6–propil–5,7–dioxapentaciclo[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]icosa–14,17–dien–16–ona (**11-5*S***): Primer pico en HPLC; ESI m/z: 522 $(M + H)^+$. Tiempo de retención en HPLC (método A): 7.54 min; SFC quiral (CC4): Tiempo de retención 4.71 min, 99.5d.e.%; ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.21 (d, J = 10.1 Hz, 1H), 6.77 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 6.63 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 6.24 (dd, J = 10.1, 1.6 Hz, 1H), 6.02 (s, 1H), 5.20 (d, J = 6.8 Hz, 1H), 5.18 (t, J = 4.8 Hz, 1H), 4.99 (d, J = –17.9 Hz, 1H), 4.61 (d, J = –17.9 Hz, 1H), 4.43 (s, 1H), 3.46 (s, 2H), 2.57 (td, J = 13.2, 4.4 Hz, 1H), 2.34 (dd, J = 13.4, 3.2 Hz, 1H), 2.16–2.01 (m, 4H), 1.85–1.68 (m, 3H), 1.59–1.49 (m, 3H), 1.44 (s, 3H), 1.44–1.26 (m, 2H), 1.18–1.09 (2H), 1.00 (s, 3H), 0.91 (t, J = 7.3 Hz, 3H) ppm. ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 204.0, 186.7, 170.0, 156.3, 151.4, 141.0, 127.9, 122.6, 116.5, 116.4, 108.4, 98.6, 83.2, 72.6, 69.8, 55.3, 53.0, 47.2, 44.2, 41.5, 37.3, 34.1, 33.0, 32.0, 31.1, 21.2, 17.9, 17.7, 14.1 ppm.

[547] (1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*S*,13*R*)–8–[2–(4–Aminofenoxi)acetil]–11–hidroxi–9,13–dimetil–6–propil–5,7–dioxapentaciclo[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]icosa–14,17–dien–16–ona (**11-5*R***): Segundo pico en HPLC; ESI m/z: 522 $(M + H)^+$; Tiempo de retención en HPLC (método A): 7.58 min; SFC quiral (CC4): Tiempo de retención 3.80 min, 98.1d.e.%; ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.23 (d, J = 10.1 Hz, 1H), 6.79 (dd, J = 8.8 Hz, 2H), 6.65 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 6.27 (dd, J = 10.1, 1.7 Hz, 1H), 6.04 (s, 1H), 4.94 (d, J = 4.4 Hz, 1H), 4.89 (d, J = –18.0 Hz, 1H), 4.65 (d, J = –18.0 Hz, 1H), 4.61 (t, J = 4.4 Hz, 1H), 4.48 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 3.51 (s, 2H), 2.58 (td, J = 13.3, 4.9 Hz, 1H), 2.35 (dd, J = 13.4, 2.8 Hz, 1H), 2.23–1.99 (m, 4H), 1.79–1.61 (m, 6H), 1.46–1.38 (m, 2H), 1.44 (s, 3H), 1.23–1.09 (m, 2H), 0.95 (s, 3H), 0.93 (t, J = 7.3 Hz, 3H) ppm. ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 204.9, 186.6, 170.0, 156.2, 151.2, 141.0,

127.9, 122.5, 116.3, 116.3, 104.5, 97.6, 81.9, 72.6, 69.9, 55.1, 49.8, 45.7, 44.0, 41.1, 35.0, 34.0, 33.3, 31.9, 30.3, 21.1, 17.5, 17.1, 14.0 ppm.

EJEMPLO 13

[548] Este ejemplo demuestra un método para hacer los compuestos **11-5*S*** y (**11-5*R***) en la Tabla 1. Este ejemplo se refiere a la numeración de compuestos en la FIGURA 2.

[549] El compuesto **9*R*** se preparó a partir de (*R*)-budesonida y el compuesto **9*S*** se preparó a partir de (*S*)-Budesonida, respectivamente, de acuerdo con el **Procedimiento general A** en el Ejemplo 9. Utilizando el mismo método descrito en el EJEMPLO 12, el compuesto (**11-5*S***) se obtuvo a partir de la reacción del compuesto (**9*S***) con el compuesto (**10-12**), y el compuesto (**11-5*R***) se obtuvo a partir de la reacción del compuesto (**9*R***) con el compuesto (**10-9**), respectivamente. Un procedimiento representativo es el siguiente. A una solución de compuesto (**9*R***) o compuesto (**9*S*** (100 mg) en acetona (10 mL) se añadió simultáneamente el compuesto **10-9** (2 eq.) y Cs_2CO_3 (2 eq.). La mezcla se sometió a reflujo durante 2 horas, y el crudo se procesó removiendo la acetona *in vacuo*, extrayendo el crudo con acetato de etilo, lavando las sales inorgánicas con agua, y purificando el producto resultante mediante cromatografía (acetato de etilo al 0-50% en éter de petróleo) para proporcionar el compuesto **11-5*R*** o el compuesto **11-5*S*** (rendimiento del 25-60%) como un sólido amarillo pálido. ESI m/z: 522 $(M + H)^+$. HPLC *Anal.*: 98%. Los espectros 2D-NOESY del compuesto **11-5*R*** y el compuesto **11-5*S*** se muestran en las FIGURAS 7 y 8.

EJEMPLO 14

[550] Este ejemplo demuestra un método para hacer los compuestos **11-6*S*** y **11-6*R*** de la Tabla 1. Este ejemplo se refiere a la numeración de compuestos en la FIGURA 2.

[551] (1*S*,2*S*,4*R*,6*S*,8*S*,9*S*,11*S*,12*S*,13*R*)–8–[2–(4–Amino–3–fluorofenoxi)acetil]–11–hidroxil–9,13–dimetil–6–propil–5,7–dioxapentaciclo[10.8.0.$0^{2,9}$.$0^{4,8}$.$0^{13,18}$]icosa–14,17–dien–16–ona (**11-6*S***) y (1*S*,2*S*,4*R*,6*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*S*,13*R*)–8–[2–(4–Amino–3–fluorofenoxi)acetil]–11–hidroxil–9,13–dimetil–6–propil–5,7–dioxapentaciclo[10.8.0.$0^{2,9}$.$0^{4,8}$.$0^{13,18}$]icosa–14,17–dien–16–ona (**11-6*R***).

[552] Una mezcla racémica de los compuestos **11-6*R/S*** se preparó de acuerdo con el método establecido en el Ejemplo 12. Los productos racémicos se separaron mediante SFC quiral (véanse los detalles en la Sección 2.3) para producir el compuesto **11-6*S*** (segundo pico) y el compuesto **11-6*R*** (primer pico) como sólidos blanquecinos.

[553] Compuesto **11-6*S*** (30 mg, rendimiento del 7.9%). ESI m/z: 540.2 $(M + H)^+$. ^{1}H NMR (500 MHz, $DMSO_{d6}$) δ 7.32 (d, J = 10.1 Hz, 1H), 6.71–6.62 (m, 2H), 6.49 (dd, J = 8.5,

2.0 Hz, 1H), 6.19–6.16 (m, 1H), 5.93 (s, 1H), 5.21 (t, *J* = 4.8 Hz, 1H), 5.10 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 5.02 (d, *J* = 18.1 Hz, 1H), 4.69 (dd, *J* = 58.9, 28.6 Hz, 4H), 4.31 (s, 1H), 2.56–2.51 (m, 1H), 2.29 (d, *J* = 10.6 Hz, 1H), 2.06–1.97 (m, 3H), 1.89 (s, 2H), 1.79–1.72 (m, 1H), 1.30 (m, 10H), 0.88–0.85 (m, 6H) ppm. Tiempo de retención: 2.94 min, 98% en SFC quiral (AD). HPLC *Anal.*: > 96.94%, Tiempo de retención: 7.94 min (método B).

[554] Compuesto **11-6*R*** (28 mg, rendimiento del 7.4%). ESI m/z: 540.3 $(M + H)^+$. ^1H NMR (500 MHz, $DMSO_{d6}$) *δ* 7.32 (d, *J* = 10.1 Hz, 1H), 6.72–6.68 (m, 2H), 6.52 (dd, *J* = 8.6, 2.1 Hz, 1H), 6.18 (d, *J* = 10.1 Hz, 1H), 5.93 (s, 1H), 5.01 (d, *J* = 18.3 Hz, 1H), 4.77 (dd, *J* = 12.9, 3.3 Hz, 2H), 4.71 (s, 2H), 4.65 (t, *J* = 4.3 Hz, 1H), 4.32 (s, 1H), 3.17 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H), 2.57–2.51 (m, 1H), 2.30 (d, *J* = 10.5 Hz, 1H), 2.10 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 2.01–1.99 (m, 1H), 1.84 (s, 2H), 1.62–1.52 (m, 5H), 1.39–1.33 (m, 5H), 1.23 (s, 1H), 1.02–0.95 (m, 2H), 0.87 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H), 0.83 (s, 3H) ppm. Tiempo de retención: 2.25 min, 100% en SFC quiral (AD). HPLC *Anal.*: > 98.50%, Tiempo de retención: 8.01 min (método B).

EJEMPLO 15

[555] Este ejemplo demuestra un método para hacer el compuesto **11-7*R*** en la Tabla 1. Este ejemplo se refiere a la numeración de compuestos en la FIGURA 2.

[556] (1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*S*,13*R*)-8-[2-(4-Amino-3-fluorofenoxi)acetil]-11-hidroxil-9,13-dimetil-6-propil-5,7-dioxapentaciclo[10.8.0.$0^{2,9}$.$0^{4,8}$.$0^{13,18}$]icosa-14,17-dien-16-ona (**11-7*S*** y **11-7*R***)

[557] Una mezcla racémica de esteroides **11–7–22R/*S*** se preparó de acuerdo con el método establecido en el Ejemplo 12. Los productos racémicos se separaron mediante SFC quiral (véanse los detalles en la Sección 2.3) para producir el compuesto **11-7*S*** (segundo pico) y el compuesto **11-7*R*** (primer pico).

[558] Compuesto **11-7*R***: ESI m/z: 540.2 $(M + H)^+$. ^1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) *δ* 7.25 (d, *J* = 10.1 Hz, 1H), 6.87 (dt, *J* = 15.5, 7.7 Hz, 1H), 6.47 (dd, *J* = 12.8, 2.4 Hz, 1H), 6.37 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 6.29 (dd, *J* = 9.9, 4.4 Hz, 1H), 6.04 (s, 1H), 5.22–4.49 (m, 5H), 3.61 (s, 2H), 2.58 (td, *J* = 13.5, 4.9 Hz, 1H), 2.36 (d, *J* = 10.3 Hz, 1H), 2.19–2.03 (m, 3H), 1.87–1.72 (m, 2H), 1.67–1.55 (m, 3H), 1.51–1.33 (m, 7H), 1.21–1.11 (m, 2H), 1.00–0.90 (m, 6H). HPLC *Anal.*: > 62.24%, 36.49%, Tiempo de retención: 7.78, 7.86 min (método B).

EJEMPLO 16

[559] Este ejemplo demuestra un método para hacer el compuesto **11-8*R*** en la Tabla 1. Este ejemplo se refiere a la numeración de compuestos en la FIGURA 2.

[560] (1*S*,2*S*,4*R*,6*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*S*,13*R*)–11–Hidroxil–9,13–dimetil–8–{2–[4–

(metilamino)fenoxi]acetil}–6–propil–5,7–dioxapentaciclo–[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]icosa–14,17–dien–16–ona **(11-8*R*)**

[561] El esteroide **11-8** se preparó de acuerdo con el método establecido en el Ejemplo 13.

[562] El compuesto (**11-8*R***) se obtuvo como un sólido blanco (14 mg, rendimiento del 54%). ESI m/z: 525.3 $(M + H)^+$. ^{1}H NMR (500 MHz, $MeOD_{d4}$) δ 7.47 (d, *J* = 10.1 Hz, 1H), 6.83–6.80 (m, 2H), 6.65–6.62 (m, 2H), 6.28 (dd, *J* = 10.1, 1.9 Hz, 1H), 6.04 (s, 1H), 4.99 (d, *J* = 18.2 Hz, 1H), 4.90 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H), 4.74 (d, *J* = 18.1 Hz, 1H), 4.66 (t, *J* = 4.5 Hz, 1H), 4.46 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H), 2.75 (s, 3H), 2.67 (td, *J* = 13.6, 5.2 Hz, 1H), 2.40 (dd, *J* = 13.5, 2.7 Hz, 1H), 2.30–2.22 (m, 1H), 2.16–2.12 (m, 1H), 2.02 (dd, *J* = 13.7, 3.3 Hz, 1H), 1.85 (dd, *J* = 13.7, 2.6 Hz, 1H), 1.76 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H), 1.67–1.63 (m, 4H), 1.51 (s, 3H), 1.48–1.44 (m, 2H), 1.17–1.08 (m, 1H), 1.05 (dd, *J* = 11.2, 3.5 Hz, 1H), 0.98–0.94 (m, 6H) ppm. HPLC *Anal.*: 100%, Tiempo de retención: 7.56 min (método A).

EJEMPLO 17

[563] Este ejemplo demuestra un método para hacer el compuesto (**11-10*R/S***), en la Tabla 1. Este ejemplo se refiere a la numeración de compuestos en la FIGURA 2.

[564] (1*S*,2*S*,4*R*,6*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*S*,13*R*)–8–[2–(4–Fluorofenoxi)acetil]–11–hidroxi–9,13–dimetil–6–propil–5,7–dioxapentaciclo[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]icosa–14,17–dien–16–ona **(11-10*R/S*)**.

[565] Los esteroides **11-10*R/S*** se prepararon de acuerdo con el método establecido en el Ejemplo 13.

[566] El compuesto **11-10*R/S*** se obtuvo como un sólido blanco (14 mg, rendimiento del 54%). ESI m/z: 525.2 $(M + H)^+$. ^{1}H NMR (400 MHz, $MeOD_{d4}$) δ 7.47 (d, *J* = 10.1 Hz, 1H), 7.02 (t, *J* = 8.7 Hz, 2H), 6.94–6.90 (m, 2H), 6.27 (dd, *J* = 10.1, 1.8 Hz, 1H), 6.03 (s, 1H), 5.06 (d, *J* = 18.1 Hz, 1H), 4.90–4.88 (m, 1H), 4.82 (d, *J* = 18.1 Hz, 1H), 4.69 (t, *J* = 4.4 Hz, 1H), 4.46 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 2.71–2.63 (m, 1H), 2.42–2.38 (m, 1H), 2.30–2.11 (m, 2H), 2.05–2.01 (m, 1H), 1.89–1.84 (m, 1H), 1.77–1.63 (m, 5H), 1.51–1.41 (m, 5H), 1.18–1.02 (m, 2H), 0.97–0.93 (m, 6H) ppm. HPLC *Anal.*: 100%, Tiempo de retención: 9.94 min (método A).

EJEMPLO 18

[567] Este ejemplo demuestra un método para hacer el compuesto **11-11*R/S*** en la Tabla 1. Este ejemplo se refiere a la numeración de compuestos en la FIGURA 2.

[568] *N*–(4–{2–[(1*S*,2*S*,4*R*,6*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*S*,13*R*)–11–Hidroxi–9,13–dimetil–16–oxo–6–propil–5,7–dioxapentaciclo[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]icosa–14,17–dien–8–il]–2–

oxoetoxi}fenil)acetamida **(11-11*R/S*)**

[569] Los esteroides **11-11*R/S*** se prepararon de acuerdo con el método establecido en el Ejemplo 13.

[570] Los compuestos **11-11*R/S*** se obtuvieron como un sólido blanco (25 mg, rendimiento del 46%). ESI m/z: 564.3 $(M + H)^+$. ^{1}H NMR (500 MHz, $MeOD_{d4}$) δ 7.49–7.45 (m, 3H), 6.89 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 6.28 (d, *J* = 10.2 Hz, 1H), 6.04 (s, 1H), 5.09 (d, *J* = 18.1 Hz, 1H), 4.91–4.89 (m, 1H), 4.83 (d, *J* = 18.1 Hz, 1H), 4.70 (t, *J* = 4.3 Hz, 1H), 4.47 (d, *J* = 3 Hz, 1H), 2.72–2.65 (m, 1H), 2.43–2.39 (m, 1H), 2.30–2.22 (m, 1H), 2.18–2.12 (n, 4H), 2.06–2.03 (m, 1H), 1.90–1.86 (m, 1H), 1.77–1.65 (m, 5H), 1.48 (m, 5H), 1.18–1.09 (m, 1H), 1.07–1.04 (m, 1H), 0.99–0.95 (m, 6H) ppm. HPLC *Anal.*: 100%, Tiempo de retención: 7.33 min (método B).

EJEMPLO 19

[571] Este ejemplo demuestra un método para hacer los compuestos **11-12*R/S*** en la Tabla 1. Este ejemplo se refiere a la numeración de compuestos en la FIGURA 2.

[572] (1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)–8–[2–(4–Aminofenoxi)acetil]–12,19–difluoro–11–hidroxi–9,13–dimetil–6–propil–5,7–dioxapentaciclo[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]icosa–14,17–dien–16–ona (**11-12*R/S***)

[573] **Etapa 1**: El compuesto (**9B**) se preparó de acuerdo con el **Procedimiento general A** en el Ejemplo 9. A una solución de (6S,9R)2F-budesonida (80 mg, 0.17 mmol) en DCM (1 mL) se añadieron a gotas trietilamina (34 mg, 0.34 mmol) y cloruro de metanosulfonilo (30 mg, 0.26 mmol) a 0 °C. La mezcla se agitó a esta temperatura durante media hora hasta que se consumió la (6S,9R)2F-Budesonida, lo cual se monitoreó mediante TLC. La mezcla de reacción se diluyó luego con DCM (100 mL) y se apagó con un cloruro de amonio *ac. sat.* (30 mL). La solución orgánica se lavó con cloruro de amonio *ac. sat.* y salmuera, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró *in vacuo*. El producto crudo se purificó mediante cromatografía instantánea (MeOH al 0-2% en DCM) para dar el producto de mesilato correspondiente (**9B**).

[574] **Etapa 2**: El compuesto **9B** se disolvió en acetona (0.5 mL). A la solución se añadieron 4-aminofenol (**10–9**, 37 mg, 0.34 mmol) y carbonato de cesio (0.11 g, 0.34 mmol). La mezcla de reacción se sometió a reflujo durante 1.5 horas o hasta que el (**9B**) se consumió totalmente de acuerdo con TLC y LCMS. La mezcla se diluyó luego con acetato de etilo y se filtró. El filtrado se concentró in vacuo y el residuo se purificó mediante prep-HPLC (método B) para dar los compuestos **11-12*R/S*** (6.0 mg, rendimiento del 6.3% a partir

de (6S,9R)2F-Budesonida) como un sólido blanco. ESI m/z: 558 $(M + H)^+$. ^{1}H NMR (500 MHz, $MeOD_{d4}$) δ 7.34 (d, *J* = 10.0 Hz, 1H), 6.78–6.71 (m, 4H), 6.37–6.33 (m, 2H), 5.63–5.49 (m, 1H), 5.10–4.99 (m, 1H), 4.77–4.63 (m, 2H), 4.33 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 2.74–2.57 (m, 1H), 2.39–2.13 (m, 3H), 1.98–1.31 (m, 12H), 1.03–0.93 (m, 6H) ppm. HPLC *Anal.*: pureza 97.4%, Tiempo de retención: 7.55 min (método B).

[575] (1*S*,2*S*,4*R*,6*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-8-[2-(4-Aminofenoxi)acetil]-12,19-difluoro-11-hidroxi-9,13-dimetil-6-propil-5,7-dioxapentaciclo[10.8.0.$0^{2,9}$.$0^{4,8}$.$0^{13,18}$]icosa-14,17-dien-16-ona (**11-12*R***)

[576] El compuesto **9B*R*** se preparó de acuerdo con el **Procedimiento general A** en el Ejemplo 9. Una reacción del compuesto **9B*R*** (0.90 g, 1.7 mmol) con 4-aminofenol (0.20 g, 1.8 mmol) y carbonato de cesio (1.1 g, 3.4 mmol) en acetonitrilo (20 mL) proporcionó (**11-12*R***) (0.20 g, rendimiento del 54%) como aceite amarillo después de la purificación mediante cromatografía en columna de gel de sílice (acetato de etilo al 50-80% en éter de petróleo). ESI m/z: 558 $(M/+H)^+$. ^{1}H NMR (500 MHz, $DMSO_{d6}$) δ 7.26 (d, *J* = 10.5 Hz, 1H), 6.64 (d, *J* = 5.0 Hz, 2H), 6.50 (d, *J* = 5.0 Hz, 2H), 6.30 (dd, *J* = 10 Hz, 2 Hz, 1H), 6.11 (s, 1H), 5.72-5.65 (m, 0.5H), 5.62-5.55 (m, 0.5H), 5.52-5.48 (m, 1H), 5.0 (s, 0.5H), 4.95 (s, 0.5H), 4.80-4.78 (m, 1H), 4.75-4.65 (m, 1H), 4.24-4.16 (m, 1H), 2.70-2.52 (m, 1H), 2.30-2.21 (m, 1H), 2.11-2.00 (m, 2H), 1.77 (d, *J* =13.0Hz, 1H), 1.61-1.54 (m, 4H), 1.49 (s, 3H), 1.36 (q, *J* = 7.5 Hz, 3H), 1.23 (s, 1H), 0.87 (d, *J* = 7.5 Hz, 3H), 0.83 (s, 3H) ppm. HPLC *Anal.*: 100%, Tiempo de retención: 8.44 min (método B).

EJEMPLO 20

[577] Este ejemplo demuestra un método para hacer el compuesto **11-13*R*** en la Tabla 1. Este ejemplo se refiere a la numeración de compuestos en la FIGURA 2.

[578] (1S,2S,4R,6R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-8-[2-(3-Aminofenoxi)acetil]-12,19-difluoro-11-hidroxi-9,13-dimetil-6-propil-5,7-dioxapentaciclo[10.8.0.$0^{2,9}$.$0^{4,8}$.$0^{13,18}$]icosa-14,17-dien-16-ona **(11-13R**).

[579] El esteroide **11-13*R*** se preparó de acuerdo con el método establecido en el Ejemplo 19.

[580] El compuesto (**11-13*R***) se obtuvo como un sólido de color naranja claro (9.0 mg, rendimiento del 44%) después de la purificación mediante prep-HPLC (método A). ESI m/z: 558 $(M + H)^+$. ^{1}H NMR (500 MHz, $MeOD_{d4}$) δ 7.35 (dd, *J* = 10.1, 1.3 Hz, 1H), 7.29 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H), 6.76-6.70 (m, 3H), 6.40-6.29 (m, 2H), 5.66-5.48 (m, 1H), 5.14 (d, *J* = 18.1 Hz, 1H), 4.93-4.91 (m, 1H), 4.90-4.87 (m, 1H), 4.77 (t, *J* = 4.3 Hz, 1H), 4.35 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H),

2.76-2.62 (m, 1H), 2.41-2.18 (m, 3H), 1.83-1.56 (m, 9H), 1.50 (dt, *J* = 15.4, 7.6 Hz, 2H), 0.99-0.96 (m, 6H) ppm. HPLC *Anal.*: 100%, Tiempo de retención: 7.77 min (método A).

EJEMPLO 21

[581] Este ejemplo demuestra un método para hacer los compuestos **11-14*R/S*** en la Tabla 1. Este ejemplo se refiere a la numeración de compuestos en la FIGURA 2.

[582] (1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-8-[2-(4-Amino-3-fluorofenoxi)acetil]-12,19-difluoro-11-hidroxi-9,13-dimetil-6-propil-5,7-dioxapentaciclo[10.8.0.0^{2},9.0^{4,8}.0^{13,18}] icosa-14,17-dien-16-ona (**11-14*R/S***).

[583] A una solución de (**9B**) (0.20 g, 0.37 mmol) en DMSO (3 mL) se añadieron 4-amino-3-fluorofenol (**10-14**, 0.25 g, 2.0 mmol) e hidróxido de potasio (0.11 g, 2.0 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla resultante se agitó a 60 ºC durante una hora bajo protección con nitrógeno hasta que se completó la reacción, lo cual se monitoreó mediante TLC y LCMS. Después de enfriarse a temperatura ambiente y filtrarse a través de membrana, la solución de reacción se purificó directamente mediante prep-HPLC (método A) para dar el compuesto **11-14*R/S*** (40 mg, rendimiento del 19%) como un sólido blanquecino. ESI m/z: 576 (M + H)$^{+}$. ^{1}H NMR (500 MHz, MeOD$_{d4}$) δ 7.40-7.31 (m, 1H), 7.20 (td, *J* = 9.1, 1.9 Hz, 1H), 6.91-6.84 (m, 1H), 6.80-6.76 (m, 1H), 6.40-6.30 (m, 2H), 5.57 (ddd, *J* = 48.6, 9.7, 6.8 Hz, 1H), 5.15 (d, *J* = 18.1 Hz, 1H), 4.90-4.79 (m, 2H), 4.75 (t, *J* = 4.3 Hz, 1H), 4.41-4.28 (m, 1H), 2.78-2.57 (m, 1H), 2.40-2.12 (m, 3H), 1.98-1.39 (m, 11H), 1.07-0.92 (m, 6H) ppm. HPLC *Anal.*: 100%, Tiempo de retención: 8.10 min (método A).

EJEMPLO 22

[584] Este ejemplo demuestra un método para hacer los compuestos **11-15*R/S*** en la Tabla 1. Este ejemplo se refiere a la numeración de compuestos en la FIGURA 2.

[585] *N*-[(4-{2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-Difluoro-11-hidroxi-9,13-dimetil-16-oxo-6-propil-5,7-dioxapentaciclo[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]icosa-14,17-dien-8-il]-2-oxoetoxi}fenil)metil]carbamato de *ter*-butilo (*N*-Boc-**11-15*R/S***).

[586] **Etapa 1**: A una solución de 4-(aminometil)fenol (1.2 g, 10 mmol) en metanol (70 mL) y agua (5 mL) se añadió Boc_2O (2.4 g, 11 mmol) a gotas mediante jeringa a temperatura ambiente. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante una hora hasta que se consumió totalmente el 4-(aminometil)fenol, lo cual se monitoreó mediante LCMS y TLC. Los compuestos volátiles se removieron *in vacuo* y el residuo se disolvió en acetato de etilo (150 mL). La solución se lavó con ácido cítrico *ac. sat.* (50 mL x 2) y con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró in vacuo para dar *N*-Boc-

4-aminometilfenol (2.1 g, rendimiento del 94%) como un aceite marrón. ESI m/z: 246 (M + Na)$^+$. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.12 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 6.82-6.71 (m, 2H), 4.84 (s, 1H), 4.23 (d, J = 5.3 Hz, 2H), 1.46 (s, 9H) ppm.

[587] **Etapa 2**: El compuesto (N-Boc-**11-15*R/S***) se preparó de acuerdo con el método establecido en el Ejemplo 19.

[588] (1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-8-{2-[4-(Aminometil)fenoxi]acetil}-12,19-difluoro-11-hidroxi-9,13-dimetil-6-propil-5,7-dioxapentaciclo[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}] icosa-14,17-dien-16-ona **(11-15*R/S***)

[589] A una solución de (N-Boc-**11-15*R/S***) (30 mg, 45 µmol) en DCM (2 mL) se añadió a gotas TFA (0.4 mL) mediante jeringa a 0 °C. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante una hora hasta que se removió totalmente el Boc, lo cual se monitoreó mediante LCMS. Los compuestos volátiles se removieron *in vacuo* y el residuo se purificó mediante prep-HPLC (método A) para dar el compuesto (**11-15*R/S***) (15 mg, rendimiento del 49%) como un sólido blanco. ESI m/z: 572 (M + H)$^+$. ^{1}H NMR (500 MHz, $MeOD_{d4}$) δ 7.45-7.32 (m, 3H), 7.01-6.96 (m, 2H), 6.41-6.30 (m, 2H), 5.57 (ddd, J = 18.2, 10.4, 7.3 Hz, 1H), 5.21 (dd, J = 19.7 Hz, 1H), 4.93-4.91 (m, 1H), 4.85 (d, J = 18.0 Hz, 1H), 4.77 (t, J = 4.3 Hz, 1H), 4.37-4.32 (m, 1H), 4.07 (s, 2H), 2.75-2.58 (m, 1H), 2.40-2.15 (m, 3H), 1.86-1.40 (m, 11H), 1.08-0.92 (m, 6H) ppm. HPLC *Anal.*: 100%, Tiempo de retención: 7.47 min (método A).

EJEMPLO 23

[590] Este ejemplo demuestra un método para hacer los compuestos **11-16*R/S*** en la Tabla 1. Este ejemplo se refiere a la numeración de compuestos en la FIGURA 2.

[591] (1*S*,2*S*,4*R*,6*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*S*,13*R*)-11-Hidroxi-8-[2-(4-hidroxifenoxi)acetil]-9,13-dimetil-6-propil-5,7-dioxapentaciclo[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]icosa-14,17-dien-16-ona (**11-16*R/S***)

[592] Los compuestos **11-16*R/S*** se prepararon de acuerdo con el método establecido en el Ejemplo 12.

[593] Los compuestos **11-16*R/S*** (20 mg, rendimiento del 38%) se obtuvieron como un sólido de color marrón claro después de la purificación mediante prep-HPLC (método A). ESI m/z: 523.2 (M + H)$^+$. ^{1}H NMR (500 MHz, $MeOD_{d4}$) δ 7.47 (d, J = 10.1 Hz, 1H), 6.82-6.77 (m, 2H), 6.75-6.70 (m, 2H), 6.28 (dd, J = 10.1, 1.8 Hz, 1H), 6.04 (s, 1H), 5.00 (d, J = 18.1 Hz, 1H), 4.91-4.89 (m, 1H), 4.75 (d, J = 18.1 Hz, 1H), 4.67 (t, J = 4.5 Hz, 1H), 4.46 (d, J = 3.1 Hz, 1H), 2.68 (td, J = 13.6, 5.8 Hz, 1H), 2.40 (dd, J = 13.5, 2.8 Hz, 1H), 2.31-2.21 (m,

1H), 2.17-2.13 (m, 1H), 2.02 (dd, *J* = 13.7, 3.3 Hz, 1H), 1.86 (dd, *J* = 13.7, 2.6 Hz, 1H), 1.80-1.58 (m, 5H), 1.53-1.40 (m, 5H), 1.18-0.93 (m, 8H) ppm. HPLC *Anal.*: 100%, Tiempo de retención: 8.92 min (método A).

EJEMPLO 24

[594] Este ejemplo demuestra un método para hacer los compuestos **11-17*R/S*** en la Tabla 1. Este ejemplo se refiere a la numeración de compuestos en la FIGURA 2.

[595] (1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-8-{2-[(6-Aminopiridin-2-il)oxi]acetil}-12,19-difluoro-11-hidroxi-9,13-dimetil-6-propil-5,7-dioxapentaciclo[10.8.0.$0^{2,9}$.$0^{4,8}$.$0^{13,18}$] icosa-14,17-dien-16-ona (**11-17*R/S***)

[596] Los compuestos **11-17*R/S*** se prepararon de acuerdo con el método establecido en el Ejemplo 19.

[597] Los compuestos **11-17*Rl*)** (50 mg, rendimiento del 24%) se obtuvieron como un sólido blanco después de la purificación mediante cromatografía instantánea (acetato de etilo al 10-50% en éter de petróleo). ESI: 559 $(M + H)^+$. ^{1}H NMR (500 MHz, $DMSO_{d6}$) δ 7.35-7.31 (m, 2H), 6.31 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H), 6.13 (s, 1H), 6.03 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 5.98 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 5.84-5.82 (m, 1H), 5.68-5.56 (m, 3H), 5.25-4.72 (m, 4H), 4.29 (br s, 1H), 2.66-2.57 (m, 1H), 2.28-2.05 (m, 4H), 1.63-1.58 (m, 4H), 1.50-1.30 (m, 6H), 0.95-0.87 (m, 6H) ppm. HPLC *Anal.*: 100%, Tiempo de retención: 8.65 min (método A).

EJEMPLO 25

[598] Este ejemplo demuestra un método para hacer el compuesto **11-19** en la Tabla 1. Este ejemplo se refiere a la numeración de compuestos en la FIGURA 2.

[599] (1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-8-(2-Azidoacetil)-12,19-difluoro-11-hidroxi-9,13-dimetil-6-propil-5,7-dioxapentaciclo[10.8.0.$0^{2,9}$.$0^{4,8}$.$0^{13,18}$]icosa-14,17-dien-16-ona (**11-19**)

[600] **Etapa 1**: Una suspensión del compuesto **9B** (1.0 g, 1.8 mmol), azida de sodio (1.2 g, 18 mmol) en acetona (15 mL) se agitó a 50 ºC durante la noche, cuando se completó la reacción de acuerdo con LCMS. Después de enfriarse, la mezcla de reacción se vertió en agua fría (80 mL). La mezcla acuosa se extrajo con acetato de etilo (50 mL x 3). La solución orgánica combinada se lavó con salmuera (30 mL), se secó sobre sulfato de sodio y se concentró in vacuo para proporcionar un compuesto crudo precursor azido de (**11-19*R/S***) (0.90 g, rendimiento > 99%) como un sólido amarillo, que se utilizó para la siguiente etapa sin purificación adicional. ESI m/z: 492 $(M + H)^+$.

[601] (1*S*,2*S*,4*R*,6*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-8-(2-Aminoacetil)-12,19-difluoro-11-

hidroxi-9,13-dimetil-6-propil-5,7-dioxapentaciclo[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]icosa-14,17-dien-16-ona; sal del ácido trifluoroacético (**11-19*R/S***)

[602] **Etapa 2**: A una solución del precursor de los **compuestos 11-19*R/S*** (0.85 g, 1.7 mmol) en THF (20 mL) se añadió clorhidrato *ac.* (1 N, 10 mL). La mezcla se agitó a 28-32 °C hasta que se volvió clara, a la cual luego se añadió trifenilfosfina (0.68 g, 2.6 mmol) a esta temperatura. La solución clara amarilla resultante se agitó a 28-32 °C durante 18 horas, cuando la reacción se completó de acuerdo con TLC y LCMS. La mezcla se concentró bajo vacío y el residuo se purificó mediante cromatografía instantánea de fase inversa (acetonitrilo al 0-50% en TFA *ac.* (0.05%)) para dar los compuestos **11-19*R/S*** (0.56 g, rendimiento del 57%, sal de TFA) como un sólido blanquecino. ESI m/z: 466 $(M + H)^+$. ^{1}H NMR (400 MHz, $MeOD_{d4}$) δ 7.33 (d, *J* = 9.9 Hz, 1H), 6.40-6.29 (m, 2H), 5.69-5.45 (m, 1H), 4.93-4.92 (m, 1H), 4.71 (t, *J* = 4.3 Hz, 1H), 4.35-4.27 (m, 2H), 3.90-3.84 (m, 1H), 2.81-2.54 (m, 1H), 2.42-2.06 (m, 3H), 1.82-1.32 (m, 11H), 1.09-0.87 (m, 6H) ppm. ^{19}F NMR (376 MHz, $MeOD_{d4}$) δ -77.01, -166.24, -166.92, -188.81, -188.83 ppm. HPLC *Anal.*: 100%, Tiempo de retención: 6.86 min (método A).

[603] (1*S*,2*S*,4*R*,6*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-8-(2-Aminoacetil)-12,19-difluoro-11-hidroxi-9,13-dimetil-6-propil-5,7-dioxapentaciclo[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]icosa-14,17-dien-16-ona; sal del ácido trifluoroacético **(11-19*R*)**

[604] **Etapa 1**: Utilizando el mismo procedimiento descrito anteriormente, el precursor azido de (**11-19*R***) (0.12 g, rendimiento del 87%) se obtuvo a partir del compuesto (**9B*R***) como un sólido blanco después de la purificación mediante cromatografía instantánea (acetato de etilo al 0-50% en éter de petróleo). ESI m/z: 492 $(M + H)^+$. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.10 (dd, *J* = 10.2, 1.3 Hz, 1H), 6.44 (s, 1H), 6.38 (dd, *J* = 10.2, 1.8 Hz, 1H), 5.48-5.31 (m, 1H), 4.92 (d, *J* = 5.4 Hz, 1H), 4.62 (t, *J* = 4.4 Hz, 1H), 4.43 (dd, *J* = 5.6, 2.7 Hz, 1H), 4.22 (d, *J* = 18.7 Hz, 1H), 3.94 (d, *J* = 18.7 Hz, 1H), 2.56-2.39 (m, 2H), 2.32-2.18 (m, 2H), 1.85-1.71 (m, 3H), 1.67-1.54 (m, 7H), 1.46-1.37 (m, 2H), 0.97-0.90 (m, 6H) ppm.

[605] **Etapa 2**: Utilizando el mismo procedimiento descrito anteriormente, el compuesto **11-19*R*** (30 mg, rendimiento del 66%) se obtuvo como un sólido blanco después de la purificación mediante prep-HPLC (método A). ESI m/z: 466 $(M + H)^+$. ^{1}H NMR (500 MHz, $MeOD_{d4}$) δ 7.34 (d, *J* = 10.0 Hz, 1H), 6.40-6.30 (m, 2H), 5.65-5.46 (m, 1H), 4.94-4.91 (m, 1H), 4.72 (t, *J* = 4.3 Hz, 1H), 4.34-4.28 (m, 2H), 3.88 (d, *J* = 18.8 Hz, 1H), 2.78-2.60 (m, 1H), 2.39-2.34 (m, 1H), 2.33-2.18 (m, 2H), 1.77-1.54 (m, 9H), 1.53-1.40 (m, 2H), 0.99-0.95

(m, 6H) ppm. HPLC *Anal.*: 100%, Tiempo de retención: 6.85 min (método A).

EJEMPLO 26

[606] Este ejemplo demuestra un método para hacer el compuesto **11-20*R/S*** en la Tabla 1. Este ejemplo se refiere a la numeración de compuestos en la FIGURA 2.

[607] (1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-Difluoro-11-hidroxi-8-(2-{[(4-metoxifenil)metil](metil)amino}acetil)-9,13-dimetil-6-propil-5,7-dioxapentaciclo[10.8.0.$0^{2,9}$.$0^{4,8}$.$0^{13,18}$]icosa-14,17-dien-16-ona; ácido trifluoroacético (**11-20*R/S***)

[608] A una solución de compuesto **9B** (0.54 g, 1.0 mmol) en acetonitrilo (10 mL) se añadieron *N*-PMB-metilamina (0.30 g, 2.0 mmol) y carbonato de potasio (0.28 g, 2.0 mmol) a temperatura ambiente sucesivamente. La mezcla de reacción se agitó a 70 ºC durante la noche. Después de enfriarse, la mezcla se diluyó con DCM y se filtró. El filtrado se concentró *in vacuo* y el residuo se purificó mediante cromatografía instantánea (acetato de etilo al 10-90% en éter de petróleo) para proporcionar el compuesto crudo (**11-20*R/S***) (0.20 g, rendimiento del 33%) como un sólido blanco. El producto crudo (30 mg) se purificó adicionalmente mediante prep-HPLC (método A) para proporcionar compuesto puro (**11-20*R/S***) como un sólido blanco (12 mg, rendimiento del 13%). ESI m/z: 600 $(M + H)^+$. ^{1}H NMR (500 MHz, $MeOD_{d4}$) δ 7.50-7.43 (m, 2H), 7.34 (d, *J* = 10.1 Hz, 1H), 7.07 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 6.39-6.30 (m, 2H), 5.56 (ddd, *J* = 48.5, 10.7, 6.5 Hz, 1H), 5.24-5.21 (m, 1H), 4.94-4.92 (m, 1H), 4.64-4.53 (m, 1H), 4.38-4.16 (m, 4H), 3.86 (s, 3H), 2.92-2.91 (m, 3H), 2.76-2.56 (m, 1H), 2.39-2.31 (m, 1H), 2.28-2.09 (m, 2H), 1.97 (td, *J* = 13.2, 7.8 Hz, 1H), 1.78-1.23 (m, 10H), 1.08-0.88 (m, 6H) ppm. HPLC *Anal.*: 100%, Tiempo de retención: 7.81 min (método A).

EJEMPLO 27

[609] Este ejemplo demuestra un método para hacer los compuestos **11-21*R/S*** en la Tabla 1. Este ejemplo se refiere a la numeración de compuestos en la FIGURA 2.

[610] (1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-Difluoro-11-hidroxi-9,13-dimetil-8-[2-(metilamino)acetil]-6-propil-5,7-dioxapentaciclo[10.8.0.$0^{2,9}$.$0^{4,8}$.$0^{13,18}$]icosa-14,17-dien-16-ona; ácido trifluoroacético (**11-21*R/S***)

[611] A los compuestos **11-20*R/S*** (30 mg, 0.053 mmol) en un vial de 4 mL con tapón de rosca, se añadieron carbonocloridato de 1-cloroetilo (1 gota) y cloroformo (0.4 mL). La mezcla se agitó a 70 °C durante 2 horas hasta que el material de partida se consumió mediante TLC. Después de enfriarse a temperatura ambiente, a la mezcla se añadió

metanol (1.5 mL). La mezcla se agitó a 70 °C durante 1 h hasta que se completó la reacción, lo cual se monitoreó mediante TLC y LCMS. Los compuestos volátiles se removieron *in vacuo* y el residuo se purificó mediante prep-HPLC (método A) para proporcionar los compuestos **11-21*R/S*** (8.0 mg, rendimiento del 28%) como un sólido blanco. ESI m/z: 480 $(M + H)^+$. ^{1}H NMR (400 MHz, $MeOD_{d4}$) δ 7.34 (d, J = 10.1 Hz, 1H), 6.41-6.26 (m, 2H), 5.56 (ddd, J = 48.7, 10.0, 6.8 Hz, 1H), 5.28 (t, J = 4.9 Hz, 1H), 5.23 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 4.47-4.41 (m, 1H), 4.34-4.30 (m, 1H), 4.07-4.00 (m, 1H), 2.82-2.54 (m, 4H), 2.43-2.09 (m, 3H), 1.96 (td, J = 13.6, 7.9 Hz, 1H), 1.81-1.34 (m, 10H), 1.10-0.85 (m, 6H) ppm. ^{19}F NMR (376 MHz, $MeOD_{d4}$) δ -76.96, -166.28, -166.95, -188.80, -188.83 ppm. HPLC *Anal.*: 99%, Tiempo de retención: 6.97 min (método A).

EJEMPLO 28

[612] Este ejemplo demuestra un método para hacer el compuesto **14-2** en la Tabla 1. Este ejemplo se refiere a la numeración de compuestos en la FIGURA 3.

[613] Propanoato de (1R,2S,8S,10S,11S,13S,14R,15S,17S)–1,8–difluoro–17–hidroxi–2,13,15–trimetil–14–[2–(metilamino)acetil]–5–oxotetraciclo[8.7.0.0^{2,7}.0^{11,15}]heptadeca–3,6–dien–14–ilo **(14-2)**

[614] La síntesis de mesilato flumetasona (**12**) se reportó en *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2015**, 25, 2837–2843, cuyo contenido completo se incorpora aquí por referencia en su totalidad para todos los propósitos.

[615] Una solución de **12** (82 mg crudo) en metilamina (solución 2M en THF, 1.5 mL, 3.000 mmol) en un tubo sellado se agitó a temperatura ambiente durante la noche, y luego se calentó a 60 °C durante 3 horas hasta que se completó la reacción. La solución se concentró *in vacuo* y el residuo se purificó mediante prep-HPLC (acetonitrilo al 0-80% en agua con NH_4HCO_3 10 mM) para obtener el compuesto **14-2** (8 mg, rendimiento del 11% para dos etapas) como un sólido blanco. ESI m/z: 480.2 (M+H). 1H NMR (DMSO–d6, 400 MHz) δ 7.27–7.25 (d, J=10.4 Hz, 1H), 6.30–6.27 (dd, J=10.4, 2.0 Hz, 1 H), 6.10 (s, 1H), 5.73–5.56 (m, 1H), 5.43–5.32 (m, 2H), 4.62–4.42 (m, 1H), 4.25–4.18 (m, 1H), 4.15 (brs, 1H), 2.87 (s, 2H), 2.70 (s, 1H), 2.60–2.56 (m, 1H), 2.36–1.90 (m, 7H), 1.49–1.35 (m, 5H), 1.10–0.91 (m, 10H).

EJEMPLO 29

[616] Este ejemplo demuestra un método para hacer el compuesto **15-5** Tabla **1**. Este ejemplo se refiere a la numeración de compuestos en la FIGURA 3.

[617] (1*R*,2*S*,8*S*,10*S*,11*S*,13*R*,14*R*,15*S*,17*S*)–14–[2–(4–Aminofenoxi)acetil]–1,8–

difluoro–14,17–dihidroxi–2,13,15–trimetiltetraciclo[8.7.0.0^{2,7}.0^{11,15}]heptadeca–3,6–dien–5–ona **(15-5)**

[618] **Etapa 1**: Una mezcla de compuesto (**12**) (0.16 g, 0.33 mmol), 4–nitrofenol (**10–5**, 92 mg, 0.67 mmol) y carbonato de potasio (92 mg, 0.67 mmol) en acetona (15 mL) se sometió a reflujo (60 ºC) durante 18 horas. Después de enfriarse hasta temperatura ambiente, los compuestos volátiles se removieron *in vacuo*. El residuo se purificó mediante cromatografía instantánea (acetato de etilo al 0-1% en éter de petróleo) para producir un nitro-intermedio (0.14 g, rendimiento del 79%) como un sólido blanco. ESI m/z: 532 (M + H)$^+$. ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 8.20 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.10 (d, J = 10.5 Hz, 1H), 6.94 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 6.43 (br s, 1H), 6.39–6.37 (m, 1H), 5.45–5.32 (m, 1H), 5.26 (d, J = 18.0 Hz, 1H), 4.85 (d, J = 18.0 Hz, 1H), 4.43–4.40 (m, 1H), 3.21–3.16 (m, 1H), 2.60 (s, 1H), 2.52–2.40 (m, 2H), 2.30–2.20 (m, 2H), 2.06–1.99 (m, 1H), 1.86–1.68 (m, 3H), 1.53–1.48 (m, 2H), 1.09 (s, 3H), 0.99 (d, J = 7.0 Hz, 3H) ppm.

[619] **Etapa 2**: A una solución del nitro-intermedio (0.13 g, 0.25 mmol) en una solución combinada de etanol (20 mL) y agua (2 mL) se añadió polvo de hierro (0.14 g, 2.5 mmol) y luego cloruro de amonio (0.14 g, 2.5 mmol). Después de agitar a 80 ºC durante 2 horas, la suspensión se enfrió hasta temperatura ambiente y se filtró a través de Celita para remover las sales inorgánicas. El filtrado se concentró *in vacuo* y el residuo se purificó mediante prep-HPLC (método B) para producir el compuesto **15-5** (90 mg, rendimiento del 70%) como un sólido blanco. ESI m/z: 502 (M + H)$^+$. ^{1}H NMR ($DMSO_{d6}$, 500 MHz) δ 7.27 (d, J = 10.0 Hz, 1H), 6.59 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 6.49 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 6.31–6.28 (m, 1H), 6.11 (s, 1H), 5.77–5.57 (m, 1H), 5.42–5.39 (m, 1H), 5.22 (s, 1H), 5.07 (d, J = 18.5 Hz, 1H), 4.63 (s, 1 H), 4.59 (d, J = 18.5 Hz, 1H), 4.29–4.10 (m, 1H), 2.99–2.91 (m, 1H), 2.55–2.43 (m, 3H), 2.25–2.19 (m, 3H), 1.71–1.64 (m, 1H), 1.56–1.43 (m, 5H), 1.15–1.10 (m, 1H), 0.88 (s, 3H), 0.83 (d, J = 6.0 Hz, 3H) ppm.

EJEMPLO 30

[620] Este ejemplo demuestra un método para hacer el compuesto **16-5** en la Tabla 1. Este ejemplo se refiere a la numeración de compuestos en la FIGURA 4.

[621] (1*R*,2*S*,10*S*,11*S*,13*R*,14*R*,15*S*,17*S*)–14–[2–(4–Aminofenoxi)acetil]–1–fluoro–14,17–dihidroxi–2,13,15–trimetiltetraciclo[8.7.0.0^{2,7}.0^{11,15}]heptadeca–3,6–dien–5–ona **(16-5)**

[622] La síntesis de mesilato dexametasona (**13**) se reportó en *J. Pharmacol*., 172, 1360 (2015), cuyo contenido completo se incorpora aquí por referencia en su totalidad para todos los propósitos.

[623] Una mezcla de mesilato dexametasona (**13**, 94 mg, 0.20 mmol), 4-nitrofenol (**10–5**, 42 mg, 0.30 mmol) y carbonato de potasio (55 mg, 0.40 mmol) en acetona (10 mL) se sometió a reflujo (60 ºC) durante 3 horas y luego se concentró. El producto crudo se concentró *in vacuo* y luego se purificó directamente mediante cromatografía instantánea (acetato de etilo al 0-50% en éter de petróleo) para producir un nitro-intermedio (0.10 g, rendimiento del 97%) como un sólido blanco. ESI m/z: 514 $(M + H)^+$. ^{1}H NMR ($MeOD_{d4}$, 400 MHz) δ 8.23 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.43 (d, J = 10.5 Hz, 1H), 7.04 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 6.31 (dd, J = 10.0 Hz, 2.0 Hz, 1H), 6.11 (br s, 1H), 5.41 (d, J = 18.0 Hz, 1H), 4.96 (d, J = 18.0 Hz, 1H), 4.34–4.30 (m, 1H), 3.13–3.06 (m, 1H), 2.79–2.72 (m, 1H), 2.57–2.41 (m, 3H), 2.32–2.26 (m, 1H), 1.94–1.90 (m, 1H), 1.82–1.75 (m, 1H), 1.62 (s, 3H), 1.62–1.53 (m, 2H), 1.28–1.23 (m, 1H), 1.07 (s, 3H), 0.92 (d, J = 7.0 Hz, 3 H) ppm.

[624] A una solución del nitro-intermedio (es decir, análogo de NO_2 en la FIGURA 4, 60 mg, 0.12 mmol) en una solución combinada de etanol (3 mL) y agua (0.5 mL) se añadieron polvo de hierro (67 mg, 1.2 mmol) y luego cloruro de amonio (64 mg, 1.2 mmol). Después de agitarse a 80 ºC durante 1.5 horas, la suspensión se enfrió hasta temperatura ambiente y se filtró a través de Celita para remover las sales inorgánicas. El filtrado se concentró *in vacuo* y el residuo se purificó mediante prep-HPLC (método B) para producir el compuesto **16-5** (20 mg, rendimiento del 35%) como un sólido blanco. ESI m/z: 484 $(M + H)^+$. ^{1}H NMR ($MeOD_{d4}$, 500 MHz) δ 7.42 (d, J = 10.5 Hz, 1H), 6.78–6.74 (m, 2H), 6.73–6.70 (m, 2H), 6.31 (dd, J = 10.0 Hz, 2.0 Hz, 1H), 6.10 (br s, 1H), 5.08 (d, J = 18.0 Hz, 1H), 4.71 (d, J = 18.0 Hz, 1H), 4.30–4.27 (m, 1H), 3.14–3.09 (m, 1H), 2.78–2.71 (m, 1H), 2.54–2.37 (m, 3H), 2.30–2.24 (m, 1H), 1.94–1.89 (m, 1H), 1.81–1.74 (m, 1H), 1.62 (s, 3H), 1.59–1.52 (m, 2H), 1.26–1.21 (m, 1H), 1.06 (s, 3H), 0.91 (d, J = 7.5 Hz, 3H) ppm.

EJEMPLO 31

[625] Este ejemplo demuestra métodos para separar estereoisómeros de ciertos compuestos aquí descritos.

[626] La tecnología SFC (cromatografía de fluidos supercríticos) se utilizó para la purificación de compuestos moleculares pequeños, que son térmicamente lábiles, incluyendo compuestos quirales. La SFC utilizó dióxido de carbono de fluido supercrítico como una fase móvil y adsorbente sólido unido a polímero orgánico como una fase estacionaria. Con base en el diferente coeficiente de partición de los epímeros en las dos fases, los epímeros mezclados se podrían separar ajustando la densidad de la fase móvil. El instrumento y las condiciones de la columna se describen a continuación: Instrumento:

SFC–80 (Thar, Waters), Columna: AD 20*250mm, 5um (Decial), Temperatura de la columna: 35 °C, Fase móvil: CO_2/EtOH (amoniaco metanol al 1%)= 65/35, Tasa de flujo: 80 g/min, Contrapresión: 100 bar, Longitud de onda de detección: 214 nm, Tiempo de ciclo: 4.5 min, Solución de muestra: 130 mg disueltos en 30 ml de Metanol, Volumen de inyección: 1.5 ml). Utilizando una columna AD–H quiral, se separaron 20 gramos de 22*R/S*-budesonida para producir 8.9 gramos de *R*-budesonida y 8.9 gramos de *S*-budesonida en un total de rendimiento de recuperación de 89%. De modo semejante, dos epímeros del compuesto **11-5*R/S*** también se separaron mediante SFC. Las condiciones de separación detalladas se describen a continuación en la Tabla 5.

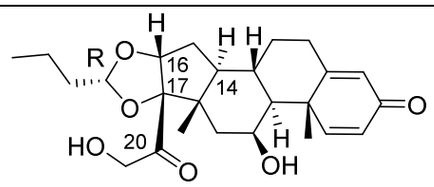
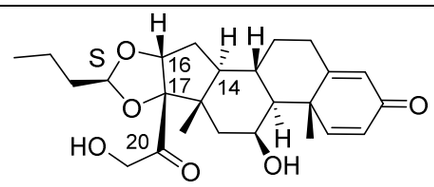
Tabla 5: Condiciones de la separación quiral de la Budesonida y el Compuesto (11-5) en la Tabla 1.

Compuesto	Budesonida	**11-5*R/S***
Instrumento	SFC–200 (Thar, Waters)	SFC–200 (Thar, Waters)
Columna	AD–H 20*250mm, 5um (Dacel)	SC 20*250mm, 5um
Temperatura de la columna	35 ºC	35 ºC
Fase móvil	CO_2 / metanol (NH_4OH al 0.5%) = 70/30	CO_2 / metanol (NH_4OH al 0.5%) = 60/40
Tasa de flujo	120 g/min	140 g/min
Contrapresión	100 bar	100 bar
Longitud de onda de detección	214 nm	214 nm
Tiempo de ciclo	4.0 min	5.0 min
Solución de muestra	20 g disueltos en 130 ml de Metanol	10 g disueltos en 130 ml de Metanol
Volumen de inyección	1.0 ml	0.5 ml

[627] Las estructuras de 22*R/S*-Budesonida se determinaron estereoespecíficamente mediante 2D-NOESY. En comparación con los datos de NMR de protones reportados de la 22*R/S*-Budesonida, se determinó que el primer compuesto de la SFC quiral es el epímero *R*, mientras que se determinó que el segundo es el epímero *S*. La configuración en C^{22} influencia las resonancias magnéticas de los protones vecinos. Un doblete doble con $J_{16\beta H-15\beta H}$ = 5.0 Hz y $J_{16\beta H-15\alpha H}$ = 2.5 Hz se observaron en el espectro *S*, que resultó de una repulsión estérica del sustituyente 22–propilo que desprotege el protón C^{16} en el epímero *S*. Este efecto no se observa en el epímero *R*. El protón C^{22} en el epímero

S también se movió campo abajo en comparación con aquel del epímero R, indicando la desprotección del protón C^{22} en el epímero S debido a una repulsión estérica entre el sustituyente 17β-cetol y la cadena 22β-propilo en el epímero S. De modo semejante, el protón C^{22} en el epímero R fue protegido por efecto de anisotropía del grupo carbonilo C20 en el epímero 22*R*. Los cambios químicos de detalles se describen a continuación en la Tabla 6.

Tabla 6

Protones en	Cambios químicos (ppm) en D–cloroformo			
				
	Epímero *R* reportado	1er compuesto de la SFC quiral	Epímero *S* reportado	2o compuesto de la SFC quiral
C–1	7.26 (d, $J_{1,2}$ = 10.1)	7.26 (d, $J_{1,2}$ = 10.1)	7.23 (d, $J_{1,2}$ = 10.1)	7.26 (d, $J_{1,2}$ = 10.0)
C–2	6.27 (dd, $J_{1,2}$ = 10.1, $J_{2,4}$ = 1.8)	6.28 (dd, $J_{1,2}$ = 10.1, $J_{2,4}$ = 1.7)	6.27 (dd, $J_{1,2}$ = 10.1, $J_{2,4}$ = 1.8)	6.27 (dd, $J_{1,2}$ = 10.1, $J_{2,4}$ = 1.7)
C–4	6.03 (m)	6.03 (s)	6.02 (m)	6.02 (s)
C–11	4.4–4.6 (m)	4.42–4.60 (m)	4.50 (m)	4.50 (br s)
C–16	4.90 (dd, $J_{16\beta H–15\beta H}$ = 4.2)	4.90 (d, $J_{16\beta H–15\beta H}$ = 4.4)	5.16 (dd, $J_{16\beta H–15\beta H}$ = 5.0, $J_{16\beta H–15\alpha H}$ = 2.5)	5.23–5.11 (m)
C–18	0.92 (s)	0.92 (s)	0.99 (s)	0.99 (s)
C–19	1.45 (s)	1.44 (s)	1.45 (s)	1.46 (s)
C–21	4.50 (dd), 4.25 (dd) ($J_{21H,\ H'}$ = –20.2, $J_{21H–21OH}$ = 4.8)	4.50 (m), 4.26 (dd, $J_{21H,\ H'}$ = 20.1, $J_{21H–21OH}$ = 4.3)	4.60 (dd), 4.20 (dd) ($J_{21H,\ H'}$ = –20.2, $J_{21H–21OH}$ = 4.8)	4.62 (d), 4.21 (d) ($J_{21H,\ H'}$ = 19.9)
C–22	4.55 (t, $J_{22,23}$ = 4.2)	4.55 (t, $J_{22,23}$ = 4.6)	5.16 (t, $J_{22,23}$ = 4.6)	5.23–5.11 (m)
C–25	0.92 (t, $J_{24,25}$ = 6.7)	0.92 (t, $J_{24,25}$ = 7.3)	0.91 (t, $J_{24,25}$ = 7.3)	0.91 (t, $J_{24,25}$ = 7.3)

Ejemplo 32

[628] Este ejemplo muestra métodos para hacer enlazadores y enlazador-cargas útiles, en general.

[629] En la FIGURA 9 se muestran tres enfoques genéricos para hacer enlazador-cargas útiles. En la FIGURA 9, R' es un esteroide amina o anilina; R'' es un radical que contiene alquino, tal como el fragmento **A** o **B**, o un radical maleimida, tal como **C**; R_1 es un residuo de aminoácido; P es un grupo protector, tal como Fmoc o Boc; n es un entero desde 0-11; m es un entero desde 2-4; p es un entero desde 0-5. El enfoque I forma una amida (**23**) a partir de una reacción de acoplamiento entre el esteroide amina o anilina (**21**, Q = NH o NR) y un dipéptido (**22**) seguido por la desprotección de N. La amina (**23**) se acopló luego con un ácido o su éster activo (**24**), tal como **V–5**, **V–7**, **V** en la FIGURA 10, **VI–8** y **VI** en la FIGURA 11, y **VII** en la FIGURA 12, para generar los enlazador–cargas útiles (**25**). El enfoque II forma una amida (**28**) a partir de una reacción de acoplamiento entre un ácido o su éster activo (**26**) y VC-pAB (**27**) seguido por la desprotección de N. El compuesto **28** se convirtió luego a su derivado de PNP que reaccionó adicionalmente con **21** para generar el carbamato de enlazador-carga útil (**29**). El enfoque III forma un carbamato (**30**) a partir de dipéptido–pAB–PNP protegido en N (**19**) y el esteroide amina o anilina (**21**), seguido por la desprotección de N; el radical amina en **30** se acopló luego con un ácido o su éster activo (**26**) para generar **29**.

EJEMPLO 33

[630] Este ejemplo demuestra métodos para hacer el enlazador DIBAC–Suc–NHS (**V**). El siguiente ejemplo se refiere a la FIGURA 10.

[631] Véase métodos en *J. Org. Chem*., **2010**, 75, 627–636 que se incorporan por referencia en este documento en su totalidad para todos los propósitos.

[632] **Etapa 1**: *N*–[Triciclo[9.4.0.$0^{3,8}$]pentadeca–1(11),3,5,7,9,12,14–heptaen–2–iliden]hidroxilamina **(V–2):** Una mezcla de dibenzosuberenona (**V–1**) (21 g, 0.10 mol) y clorhidrato de hidroxilamina (9.3 g, 0.14 mol) en una solución combinada de etanol absoluto (100 mL) y piridina (200 mL) se agitó y se sometió a reflujo durante 15 horas. La TLC mostró que el material de partida se consumió (TLC: metanol al 5% en cloruro de metileno). Después de enfriarse a por debajo de 25 °C, la mezcla de reacción se diluyó con cloruro de metileno (500 mL) y la solución resultante se lavó con HCl acuoso (ac.) (1N, 3 x 200 mL) y luego con salmuera (200 mL). La solución orgánica se secó sobre sulfato de sodio y se concentró *in vacuo* para producir **V–2** crudo (22 g, rendimiento crudo del 98%) como un sólido marrón claro. ESI m/z: 222.1 $(M + H)^+$.

[633] **Etapa 2**: 2–Azatriciclo[10.4.0.0$^{4–9}$]hexadeca–1(16),4(9),5,7,10,12,14–hepteno **(V–3)**: A una solución de la oxima (**V–2**) (5.5 g, 25 mmol) en cloruro de metileno seco (aquí también diclorometano o DCM) (150 mL) a –5 °C se añadió DIBAL–H (1 M en tolueno, 250 mL) a gotas mientras se mantenía la temperatura por debajo de –5 °C. Luego, la reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche y luego se apagó con una solución de fluoruro de sodio sólido (38 g, 0.90 mol) en agua (12 mL) a 0 °C. La lechada se agitó a 0 ºC durante otros 30 minutos y se filtró a través de Celita. La Celita se lavó a fondo con cloruro de metileno y la solución orgánica combinada se concentró *in vacuo* para producir **V-3** (4.6 g, rendimiento del 89%) como un sólido amarillo. ESI m/z: 222.1 $(M + H)^+$.

[634] **Etapa 3**: Ácido 4–[2–azatriciclo[10.4.0.0^{4,9}]hexadeca–1(16),4(9),5,7,10,12,14–heptaen–2–il]–4–oxobutanoico **(V–5):** A una solución de (**V–3**) (5.0 g, 24 mmol) en cloruro de metileno (50 mL) se añadieron DIPEA (3.1 g, 24 mmol) y luego anhídrido succínico (**V–4**, 2.9 g, 29 mmol). La mezcla se agitó luego a temperatura ambiente durante 4 horas, se apagó con bisulfato de sodio *ac.* (1N, 100 mL) y se extrajo con cloruro de metileno (3 x 100 mL). La solución orgánica combinada se lavó con agua (100 mL) y luego con salmuera (100 mL), se secó sobre sulfato de sodio y se concentró *in vacuo* para proporcionar (**V-5**) (7.7 g, rendimiento del 95%) como un sólido blanco, que se utilizó sin purificación adicional. ESI m/z: 308.2 $(M + H)^+$.

[635] **Etapa 4**: Ácido 4–{10,11–dibromo–2–azatriciclo[10.4.0.0^{4,9}]hexadeca–1(16),4(9),5,7,12,14–hexaen–2–il}–4–oxobutanoico **(V–6):** Una solución de (**V–5**) (15 g, 49 mmol) en cloruro de metileno (200 mL) se enjuagó con nitrógeno y se enfrió a 0 °C. A la solución se añadió bromo líquido (23 g, 0.14 mol) a gotas a 0 °C mediante jeringa. La reacción se agitó a esta temperatura durante 2 horas y la TLC mostró que la reacción se había completado (TLC: metanol al 10% en cloruro de metileno). La mezcla de reacción se diluyó con cloruro de metileno (50 mL) y se dejó calentar a temperatura ambiente. La solución orgánica se lavó con sulfito de sodio *ac.* saturado (sat.) (3 x 50 mL), agua (50 mL) y luego con salmuera (50 mL), se secó sobre sulfato de sodio y se concentró *in vacuo* para producir (**V–6**) (13 g, rendimiento crudo del 99%) como un sólido blanquecino. ESI m/z: 467.9 $(M + H)^+$. ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 7.71 (d, J = 6.8 Hz, 1H), 7.25–7.01 (m, 6H), 6.94–6.88 (m, 1H), 5.90 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 5.84–5.79 (m, 1H), 5.25–5.25 (m, 1H), 4.24–4.10 (m, 1H), 2.87–2.80 (m, 1H), 2.68–2.47 (m, 3H) ppm.

[636] **Etapa 5**: Ácido 4–{2–azatriciclo[10.4.0.0^{4,9}]hexadeca–1(16),4(9),5,7,12,14–hexaen–10–in–2–il}–4–oxobutanoico **(V–7):** Una solución de (**V–6**) (5.0 g, 11 mmol) en THF

anhidro (50 mL) se enfrió a –40 °C con un baño de hielo seco/acetonitrilo y a la solución se añadió a gotas una solución de *ter*-butanolato de potasio en tetrahidrofurano (1N, 37 mL, 37 mmol) bajo atmósfera de argón. La mezcla de reacción se agitó a esta temperatura durante media hora después de la adición. La TLC mostró que la reacción se había completado (TLC: metanol al 10% en cloruro de metileno). La mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se apagó con bisulfato de sodio *ac.* (1N) a pH 1. La mezcla se extrajo con cloruro de metileno (3 x 50 mL). La solución orgánica combinada se lavó con agua (50 mL) y luego con salmuera (50 mL), se secó sobre sulfato de sodio y se concentró *in vacuo* para producir el compuesto (**V-7**) (2.7 g, rendimiento del 95%) como un sólido blanquecino. ESI m/z: 306.1 $(M + H)^+$. ^{1}H NMR ($DMSO_{d6}$, 500 MHz): δ 11.98 (s, 1H), 7.67–7.29 (m, 8H), 5.02 (d, J = 13.5 Hz, 1H), 3.61 (d, J = 14.5 Hz, 1H), 2.61–2.56 (m, 1H), 2.32–2.27 (m, 1H), 2.21–2.16 (m, 1H), 1.80–1.76 (m, 1H) ppm.

[637] **Etapa 6**: Ácido 4–{2–azatriciclo[10.4.0.0^{4,9}]hexadeca–1(12),4(9),5,7,13,15–hexaen–10–in–2–il}–4–oxobutanoico **(V):** A una solución de ácido (**V–7**) (50 mg, 0.16 mmol) en cloruro de metileno (10 mL) se añadieron subsiguientemente *N*-hidroxisuccinimida (HOSu, 28 mg, 0.24 mmol) y clorhidrato de *N*–(3–dimetilaminopropil)–*N'*–etilcarbodiimida (EDCI, 47 mg, 0.24 mmol). Después de agitarse a temperatura ambiente durante la noche, la mezcla se lavó con agua y luego con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró *in vacuo* para producir el intermedio **V**, que se utilizó para la siguiente etapa directamente. ESI m/z: 403.0 $(M + H)^+$.

EJEMPLO 34

[638] Este ejemplo demuestra métodos para hacer el enlazador DIBAC–Suc–PEG_4–ácido/NHS (**VI**). El siguiente ejemplo se refiere a la FIGURA 11.

[639] **Etapa 1:** Ter–butil-1–hidroxi–3,6,9,12–tetraoxapentadecan–15–oato **(VI–3):** A una solución de tetraetilenglicol (**VI–1**, 58 g, 0.30 mol) en THF seco (200 mL) se añadió sodio (0.12 g) y la mezcla se agitó hasta que se consumió el sodio. A la solución resultante se añadió luego acrilato de *ter*-butilo (**VI–2**, 13 g, 0.10 mol) en THF seco (50 mL) a gotas, y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La reacción se apagó con ácido acético (0.1 mL) primero y luego con agua (0.5 mL), y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante media hora, y luego se extrajo con acetato de etilo (3 x 200 mL). La solución orgánica combinada se lavó con agua (30 mL) y luego con salmuera (3 x 100 mL), se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró para producir el producto (**VI-3**, 26 g, rendimiento del 81%) como aceite incoloro. ESI m/z: 340 $(M + 18)^+$.

[640] **Etapa 2:** 1–(Metanosulfoniloxi)–3,6,9,12–tetraoxapentadecan–15–oato de *ter*–butilo **(VI–4):** A una solución de (**VI–3**) (26 g, 81 mmol), trietilamina (12 mL, 89 mmol) en cloruro de metileno (150 mL) en un baño de hielo-agua se añadió una solución de cloruro de metanosulfonilo (10 g, 89 mmol) en DCM (50 mL) a gotas. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 14 horas, y luego se concentró *in vacuo*. El residuo se mezcló con agua (30 mL) y luego se extrajo con acetato de etilo (3 x 200 mL). La capa orgánica combinada se lavó con salmuera (3 x 100 mL), se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró *in vacuo* para producir el producto deseado (**VI-4**) (31 g, rendimiento del 95%) como aceite amarillo claro. ESI m/z: 418 $(M + 18)^+$.

[641] **Etapa 3:** 1–Azido–3,6,9,12–tetraoxapentadecan–15–oato de *ter*–butilo **(VI–5):** A una solución de (**VI–4**) (27 g, 67 mmol) en DMF (70 mL) se añadió azida de sodio (6.6 g, 0.10 mol), que luego se agitó a 80 ºC durante 4-16 horas. Después de enfriarse a temperatura ambiente, la mezcla se diluyó con acetato de etilo (3 x 150 mL). La solución combinada se lavó con agua (30 mL) y luego con salmuera (3 x 100 mL), se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró *in vacuo*. El producto crudo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (éter de petróleo/acetato de etilo (con metanol al 1% a 2%)= 4/1) para producir (**VI-5**) (18 g, rendimiento del 67%) como aceite incoloro. ESI m/z: 365 $(M + 18)^+$.

[642] **Etapa 4:** 1–Amino–3,6,9,12–tetraoxapentadecan–15–oato de *ter*–butilo **(VI–6):** A una solución de (**VI–5**) (1.5 g, 4.3 mmol) en acetato de etilo (20 mL) se añadió Pd/C húmedo (10%, 0.15 g) bajo nitrógeno. La mezcla se enjuagó luego con hidrógeno y se agitó a temperatura ambiente bajo un globo de hidrógeno durante la noche. La mezcla se filtró luego a través de Celita. El Celita se lavó con acetato de etilo (10 mL). El filtrado combinado se concentró *in vacuo* para producir (**VI–6**) crudo (1.4 g) como un aceite amarillo claro, que se utilizó en la siguiente etapa sin purificación adicional. ESI m/z: 322 $(M + H)^+$.

[643] **Etapa 5:** Ácido 1–amino–3,6,9,12–tetraoxapentadecan–15–oico **(VI–7):** A una solución de (**VI–6**), obtenida anteriormente (1.4 g) en cloruro de metileno (10 mL) se añadió TFA (5 mL). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante una hora. Los compuestos volátiles se removieron *in vacuo* para producir el producto crudo (**VI–7**) como su sal de TFA (1.6 g) como aceite amarillo, que se utilizó para la siguiente etapa sin purificación adicional. ESI m/z: 266 $(M + H)^+$.

[644] **Etapa 6**: Ácido 1–(4–{2–azatriciclo[10.4.0.$0^{4–9}$]hexadeca–1(12),4(9),5,7,13,15–hexano–10–in–2–il}–4–oxobutanamido)–3,6,9,12–tetraoxapentadecan–15–oico **(VI–8):** A

una mezcla de ácido 4–{2–azatriciclo[10.4.0.0^{4,9}]hexadeca–1(12),4(9),5,7,13,15–hexaen–10–in–2–il}–4–oxobutanoico (**V** en la FIGURA 11, 1.0 g, 2.5 mmol) y (**VI–7**) (0.91 g, 2.5 mmol) en DMF (10 mL) se añadió trietilamina (0.50 g, 5.0 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla se purificó directamente mediante cromatografía instantánea de fase inversa (acetonitrilo al 0-100% en agua (NH_4HCO_3 10 mM)) para producir el (**VI-8**) (1.0 g, rendimiento del 74% en 3 etapas a partir de **VI-5**) como aceite marrón. ESI m/z: 553.3 $(M + H)^+$. ^{1}H NMR ($MeOD_{d4}$, 400 MHz): δ 7.65 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 7.64–7.58 (m, 1H), 7.49–7.42 (m, 3H), 7.40–7.30 (m, 2H), 7.28–7.22 (m, 1H), 5.12 (d, J = 13.6 Hz, 1H), 3.75–3.68 (m, 3H), 3.63–3.50 (m, 12H), 3.50–3.39 (m, 2H), 3.25 (t, J = 5.6 Hz, 2H), 2.76–2.66 (m, 1H), 2.52 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 2.41–2.30 (m, 1H), 2.21–2.14 (m, 1H), 2.03–1.93 (m, 1H) ppm.

[645] **Etapa 7:** 1–(4–{2–azatriciclo[10.4.0.0$^{4–9}$]hexadeca–1(12),4(9),5,7,13,15–hexano–10–in–2–il}–4–oxobutanamido)–3,6,9,12–tetraoxapentadecan–15–oato de 2,5–dioxopirrolidin–1–ilo **(VI):** A una solución de (**VI–8**) (40 mg, 72 µmol) en cloruro de metileno (10 mL) se añadió posteriormente HOSu (1–hidroxipirrolidina–2,5–diona, 12 mg, 0.11 mmol) y EDCI (21 mg, 0.11 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche y luego se diluyó con cloruro de metileno (50 mL). La solución orgánica se lavó con agua (50 mL) y luego con salmuera (50 mL), se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró *in vacuo* para generar el intermedio (**VI**), que se utilizó en la siguiente etapa sin purificación adicional. ESI m/z: 650 $(M + H)^+$. ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 7.70 (m, 1H), 7.66 (m, 1H), 7.55–7.47 (m, 3H), 7.38–7.24 (m, 4H), 6.33 (br s, 1H), 5.13 (d, J = 13.6 Hz, 1H), 3.83–3.78 (m, 1H), 3.66–3.60 (m, 13H), 3.47–3.35 (m, 2H), 2.99–2.82 (m, 6H), 2.51–2.43 (m, 2H), 2.20–1.89 (m, 4H) ppm.

EJEMPLO 35

[646] Este ejemplo demuestra métodos para hacer Ácido 1–((1*R*,8*S*,9*s*)–biciclo[6.1.0]non–4–in–9–il)–3–oxo–2,7,10,13,16–pentaoxa–4–azanonadecan–19–oico **(**BCN–PEG_4–Ácido, **VII)**. El siguiente ejemplo se refiere a la FIGURA 12.

[647] A una solución de intermedio **VII–1** (0.10 g, 0.33 mmol) en tetrahidrofurano (THF) (5 mL) se añadieron posteriormente diisopropiletilamina (0.17 g, 1.3 mmol), intermedio (**VI–7**) (89 mg, 0.33 mmol), y 1–hidroxibenzotriazol (HOBt, 43 mg, 0.33 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Después de filtrarse para remover el sólido insoluble y concentrarse *in vacuo*, la mezcla de reacción se purificó directamente mediante prep-HPLC (método B) para producir BCN-PEG_4-ácido (**VII**) (25 mg,

rendimiento del 17%) como aceite incoloro. ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 5.07 (br s, 1H), 4.14 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 3.77 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 3.70–3.55 (m, 14H), 3.40–3.31 (m, 2H), 2.58 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 2.30–2.19 (m, 6H), 1.61–1.52 (m, 2H), 1.43–1.32 (m, 1H), 1.0–0.92 (m, 2H) ppm.

EJEMPLO 36

[648] Este ejemplo demuestra métodos para hacer carbonato de {4–[(2S)–2–[(2S)–2–[1–(4–{2–azatriciclo[10.4.0.0^{4,9}]hexadeca–1(12),4(9),5,7,13,15–hexaen–10–in–2–il}–4–oxobutanamido)–3,6,9,12–tetraoxapentadecan–15–amido]–3–metilbutanamido]–5–(carbamoilamino)pentanamido]fenil}metil 4–nitrofenilo **(**DIBAC–Suc–PEG_4–VC–pAB–PNP, **VIII**). El siguiente ejemplo se refiere a la FIGURA 13.

[649] 1–(4–{2–azatriciclo[10.4.0.0$^{4–9}$]hexadeca–1(12),4(9),5,7,13,15–hexano–10–in–2–il}–4–oxobutanamido)–N–[(1S)–1–{[(1S)–4–(carbamoilamino)–1–{[4–(hidroximetil)fenil]carbamoil}butil]carbamoil}–2–metilpropil]–3,6,9,12–tetraoxapentadecan–15–amida **(VIII–3)**

[650] **Etapa 1**: A una solución de compuesto (**VIII–1**) (300 mg, 0.54 mmol) y compuesto (**VIII–2**, 205 mg, 0.54 mmol) en DMF (10 mL) se añadieron HATU (309 mg, 0.81 mmol) y luego DIEA (140 mg, 1.08 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. Después de filtrarse para remover el sólido insoluble y concentrarse *in vacuo*, la mezcla de reacción se purificó directamente mediante instantánea inversa (NH_4HCO_3 como amortiguador) y se obtuvo un sólido blanco (**VIII-3**) (300 mg, 60%). ESI m/z: 617 (M+1).

[651] Carbonato de {4–[(2S)–2–[(2S)–2–[1–(4–{2–azatriciclo[10.4.0.0$^{4–9}$]hexadeca–1(12),4(9),5,7,13,15–hexano–10–in–2–il}–4–oxobutanamido)–3,6,9,12–tetraoxapentadecan–15–amido]–3–metilbutanamido]–5–(carbamoilamino)pentanamido]fenil}metil 4–nitrofenilo **(VIII)**

[652] **Etapa 2**: A una solución de (**VIII–3**) (150 mg, 0.16 mmol) y (**VIII–4**) (150 mg, 0.49 mmol) en DMF (10 mL) se añadió DIEA (63 mg, 0.49 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. Después de filtrarse para remover el sólido insoluble y concentrarse *in vacuo*, la mezcla de reacción se purificó directamente mediante cromatografía instantánea inversa (NH_4HCO_3 como amortiguador) y se obtuvo (**VIII**) como un sólido amarillo (50 mg, 28%). ESI m/z: 1079 (M+1).

EJEMPLO 37

[653] Este ejemplo demuestra métodos para hacer Enlazador–Carga útil (**LP1**). El

siguiente ejemplo se refiere a la FIGURA 14.

[654] *Ter*–Butil *N*–[(1*S*)–1–({4–[(1*S*,2*S*,4*R*,6*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*S*,13*R*)–11–hidroxi–8–(2–hidroxiacetil)–9,13–dimetil–16–oxo–5,7–dioxapentaciclo[10.8.00^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]icosa–14,17–dien–6–il]fenil}carbamoil)etil]carbamato **(31)**

[655] **Etapa 1**: Una mezcla de Boc-Ala-OH (0.20 g, 0.42 mmol), DIPEA (0.12 g, 0.84 mmol) y HATU (0.24 g, 0.63 mmol) en DMF (5 mL) se agitó a 23 °C durante 30 minutos. A la solución se añadió luego el compuesto **7-1*R*** (87 mg, 0.46 mmol). Después de agitarse a 23 °C durante otras 2 horas, la mezcla se purificó directamente mediante prep-HPLC (método B) para producir el compuesto **31** (0.11 g, rendimiento del 40%) como un sólido blanco. ESI m/z: 651 $(M + H)^+$.

[656] (2*S*)–2–Amino–*N*–{4–[(1*S*,2*S*,4*R*,6*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*S*,13*R*)–11–hidroxi–8–(2–hidroxiacetil)–9,13–dimetil–16–oxo–5,7–dioxapentaciclo[10.8.00^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]icosa–14,17–dien–6–il]fenil}propanamida **(32)**

[657] **Etapa 2**: A una solución de compuesto **31** (0.10 g, 0.15 mmol) en cloruro de metileno (3 mL) se añadió TFA (0.3 mL) a gotas. La mezcla se agitó a 23 ºC durante una hora y los compuestos volátiles se removieron *in vacuo* para producir (**32**) crudo (83 mg) como un aceite, que se utilizó en la siguiente etapa sin purificación adicional. ESI m/z: 551 $(M + H)^+$.

[658] *Ter*–Butil *N*–[(1*S*)–1–{[(1*S*)–1–({4–[(1*S*,2*S*,4*R*,6*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*S*,13*R*)–11–hidroxi–8–(2–hidroxiacetil)–9,13–dimetil–16–oxo–5,7–dioxapentaciclo[10.8.00^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]icosa–14,17–dien–6–il]fenil}carbamoil)etil]carbamoil}–2–metilpropil]carbamato **(33)**

[569] **Etapa 3**: Una mezcla de (**32**) (83 mg, 0.15 mmol), trietilamina (31 mg, 0.31 mmol) y Boc-Val-NHS (58 mg, 0.19 mmol) en DMF (5 mL) se agitó 23 °C durante 4 horas y la mezcla de reacción se purificó directamente mediante prep-HPLC (método B) para producir (**33**) (52 mg, rendimiento del 20% en 2 etapas) como un sólido blanco. ESI m/z: 750 $(M + H)^+$. ^{1}H NMR (500 MHz, $DMSO_{d6}$) δ 10.00 (s, 1H), 8.07 (d, *J* =7.0 Hz, 1H), 7.58 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.40 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.31 (d, *J* = 10.0 Hz, 1H), 6.72 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 6.16 (dd, *J* = 1.5, 10.0 Hz, 1H), 5.91 (s, 1H), 5.38 (s, 1H), 5.08 (t, *J* = 6.5Hz, 1H), 4.92 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H), 4.78 (d, *J* =3.0 Hz, 1H), 4.55–4.46 (m, 1H), 4.42 (t, *J* = 7.0Hz, 1H), 4.29 (s, 1H), 4.21–4.14 (m, 1H), 3.82 (t, *J* = 8.5 Hz, 1H), 2.65–2.52 (m, 1H), 2.37–2.25 (m, 1H), 2.18–2.06 (m, 1H), 2.04–1.88 (m, 2H), 1.85–1.57 (m, 5H), 1.40 (s, 3H), 1.37 (s, 9H), 1.29 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H), 1.15–0.98 (m, 2H), 0.96–0.76 (m, 9H) ppm.

[660] (2*S*)–2–Amino–*N*–[(1*S*)–1–({4–[(1*S*,2*S*,4*R*,6*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*S*,13*R*)–11–hidroxi–8–(2–hidroxiacetil)–9,13–dimetil–16–oxo–5,7–dioxapentaciclo[10.8.00^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]icosa–14,17–dien–6–il]fenil}carbamoil)etil]–3–metilbutanamida **(34g)**

[661] **Etapa 4**: A una solución de compuesto **33** (50 mg, 67 µmol) en cloruro de metileno (3 mL) se añadió TFA (0.3 mL) a gotas, que luego se agitó a 23 °C durante una hora. Los compuestos volátiles se removieron *in vacuo* para producir el compuesto **34g** crudo (42 mg) como un aceite, que se utilizó en la siguiente etapa sin purificación adicional. ESI m/z: 650 $(M + H)^+$.

[662] 1–(4–{2–Azatriciclo[10.4.0.0$^{4,9]}$hexadeca–1(12),4(9),5,7,13,15–hexano–10–in–2–il}–4–oxobutanamido)–*N*–[(1*S*)–1–{[(1*S*)–1–({4–[(1*S*,2*S*,4*R*,6*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*S*,13*R*)–11–hidroxi–8–(2–hidroxiacetil)–9,13–dimetil–16–oxo–5,7–dioxapentaciclo[10.8.00^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]icosa–14,17–dien–6–il]fenil}carbamoil)etil]carbamoil}–2–metilpropil]–3,6,9,12–tetraoxapentadecan–15–amida **(LP1)**

[663] **Etapa 5**: Una solución de DIBAC–suc–PEG_4–OH (**VI–8**, 41 mg, 74 µmol), DIPEA (24 mg, 0.19 mmol) y HATU (47 mg, 0.12 mmol) en DMF (5 mL) se agitó a 23 °C durante 30 minutos, y luego se añadió (**34g**) (40 mg, 62 µmol). Después de agitarse a 23 °C durante otras 2 horas, la mezcla de reacción se purificó directamente mediante prep-HPLC (método B) para producir **LP1** (33 mg, rendimiento del 44% en 2 etapas) como un sólido blanco. ESI m/z: 1185 $(M + H)^+$. ^{1}H NMR (500 MHz, $DMSO_{d6}$) δ 9.97 (s, 1H), 8.18 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H), 7.87 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.75 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H), 7.67 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H), 7.63–7.56 (m, 3H), 7.53–7.41 (m, 3H), 7.42 7.27 (m, 6H), 6.19–6.14 (m, 1H), 5.93 (s, 1H), 5.38 (s, 1H), 5.08 (t, *J* = 6.5 Hz, 1H), 5.03 (d, *J* = 14.0 Hz, 1H), 4.92 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H), 4.78 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H), 4.55–4.46 (m, 1H), 4.42 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H), 4.29 (s, 1H), 4.21–4.14 (m, 2H), 3.63–3.55 (m, 3H), 3.50–3.40 (m, 12H), 3.32–3.26 (m, 2H), 3.10–3.05 (m, 2H), 2.65–2.52 (m, 2H), 2.48–2.48 (m, 2H), 2.40–2.25 (m, 3H), 2.18–2.06 (m, 1H), 2.04–1.88 (m, 3H), 1.85–1.57 (m, 5H), 1.40 (s, 3H), 1.28 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H), 1.15–0.98 (m, 2H), 0.96–0.84 (m, 6H), 0.84–0.80 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H) ppm.

EJEMPLO 38

[664] El ejemplo demuestra un método para hacer el Enlazador–Carga útil (**LP2**). El siguiente ejemplo se refiere a la FIGURA 15.

[665] *N*–[(1*S*)–1–{[(1*S*)–4–(Carbamoilamino)–1–[(4–{2–[(1*R*,2*S*,8*S*,10*S*,11*S*,13*R*,14*R*,15*S*,17*S*)–1,8–difluoro–14,17–dihidroxi–2,13,15–trimetil–5–

oxotetraciclo[8.7.0.$0^{2,7}$.$0^{11,15}$]heptadeca–3,6–dien–14–il]–2–oxoetoxi}fenil)carbamoil]butil]carbamoil}–2–metilpropil]carbamato de *ter*–butilo **(34e)**

[666] **Procedimiento general C**: A una solución de Boc-Val-Ala-OH o Boc-Val-Cit-OH (1.0 equiv.) en un solvente orgánico (tal como DCM o DMF) se añadieron una base (tal como DIPEA) (2.0 equiv.) y HATU (1.2 equiv.) a 20-25 °C. La mezcla se agitó a 20-25 °C durante 30 minutos, seguido por la adición de una anilina (1.1 equiv.). La mezcla se agitó adicionalmente durante 16 horas hasta que el péptido se consumió de acuerdo con LCMS. A la mezcla de reacción se añadió luego TFA (0.05 mL por 10 mg de péptido). La mezcla se agitó a 20-25 °C durante otra hora. Los compuestos volátiles se removieron bajo presión reducida y el residuo se purificó directamente mediante prep-HPLC (método B).

[667] **Etapa 1**: A una solución de Boc-VC (VC es Val-Cit) (67 mg, 0.18 mmol) en DMF (3 mL) se añadieron HATU (68 mg, 0.18 mmol) y NMM (30 mg, 0.30 mmol), y la solución resultante se agitó a 23 °C durante 10 minutos. A la mezcla de reacción se añadió luego el compuesto **15-5** (75 mg, 0.15 mmol). Después de agitarse a 23 ºC durante la noche, la mezcla de reacción se vertió en acetato de etilo (80 mL), se lavó con salmuera y luego se secó sobre sulfato de sodio anhidro. La solución orgánica combinada se concentró *in vacuo* y el residuo se purificó mediante cromatografía instantánea (metanol al 0-10% en cloruro de metileno) para producir (**34e**) (0.12 g, rendimiento del 89%) como un sólido blanco. ESI m/z: 858 $(M + H)^+$. ^{1}H NMR ($MeOD_{d4}$, 500 MHz) δ 7.54–7.47 (m, 2H), 7.36 (d, J = 10.0 Hz, 1H), 6.90–6.87 (m, 2H), 6.34 (dd, J = 10.0, 1.5 Hz, 1H), 6.31 (s, 1H), 5.63–5.50 (m, 1H), 5.20 (d, J = 18.0 Hz, 1H), 4.80 (d, J = 18.0 Hz, 1H), 4.54–4.47 (m, 1H), 4.32–4.30 (m, 1H), 3.92–3.81 (m, 1H), 3.23–3.11 (m, 3H), 2.65–2.52 (m, 1H), 2.43–2.32 (m, 3H), 2.11–1.99 (m, 1H), 1.79–1.58 (m, 9H), 1.46–1.24 (m, 11H), 1.06 (s, 3H), 1.00–0.92 (m, 9H) ppm.

[668] Biciclo[6.1.0]non–4–in–9–ilmetil *N*–(14–{[(1*S*)–1–{[(1*S*)–4–(carbamoilamino)–1–[(4–{2–[(1*R*,2*S*,8*S*,10*S*,11*S*,13*R*,14*R*,15*S*,17*S*)–1,8–difluoro–14,17–dihidroxi–2,13,15–trimetil–5–oxotetraciclo[8.7.0.$0^{2,7}$.$0^{11,15}$]heptadeca–3,6–dien–14–il]–2–oxoetoxi}fenil)carbamoil]butil]carbamoil}–2–metilpropil]carbamoil}–3,6,9,12–tetraoxatetradecan–1–il)carbamato **(LP2)**

[669] **Etapa 2**: A una solución de compuesto intermedio **34e** (25 mg, 29 µmol) en cloruro de metileno (2 mL) se añadió TFA (1 mL) y la mezcla resultante se agitó a 23 °C durante una hora. Los compuestos volátiles se removieron *in vacuo* para producir un residuo (25 mg, ESI m/z: 758.3 $(M + H)^+$) como residuo de aceite marrón.

[670] A una solución de BCN-PEG_4-ácido (**VII** en la **FIGURA 12**, 18 mg, 41 µmol) en

DMF (2 mL) se añadieron HATU (15 mg, 41 µmol) y NMM (6.9 mg, 41 µmol), y la solución resultante se agitó a 23 °C durante media hora. A la solución de reacción se añadió luego una solución del residuo de aceite marrón obtenido anteriormente en DMF (1 mL). Después de agitarse a 23 ºC durante la noche, la mezcla se procesó y se purificó directamente mediante prep-HPLC (método B) para producir **LP2** (15 mg, rendimiento del 37%) como un sólido blanco. ESI m/z: 1181.4 $(M + H)^+$. ^{1}H NMR ($DMSO_{d6}$, 400 MHz) (rotámero) δ 9.82 y 9.37 (s, 1H), 8.39 (d, *J* = 8.0 Hz, 0.4H), 8.09 (d, *J* = 7.2 Hz, 0.6H), 8.00 (d, *J* = 8.0 Hz, 0.4H), 7.88 (d, *J* = 8.8 Hz, 0.6H), 7.55 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.49 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.27 (d, *J* = 10.0 Hz, 1H), 7.10 (br s, 1H), 6.80 (m, 2H), 6.29 (dd, *J* = 10.0, 1.0 Hz, 1H), 6.11 (s, 1H), 5.99–5.94 (m, 1H), 5.72–5.56 (m, 1H), 5.43–5.41 (m, 3H), 5.31 (s, 1H), 5.22 (d, *J* = 18.0 Hz, 1H), 4.71 (d, *J* = 18.0 Hz, 1H), 4.37–4.31 (m, 1H), 4.24–4.14 (m, 2H), 4.04 (s, 1H), 4.02 (s, 1H), 3.62–3.56 (m, 2H), 3.50–3.45 (m, 12H), 3.40–3.37 (m, 2H), 3.13–3.08 (m, 2H), 3.00–2.92 (m, 3H), 2.54–2.33 (m, 2H), 2.25–2.08 (m, 8H), 2.09–1.90 (m, 1H), 1.78–1.23 (m, 15H), 1.14–1.09 (m, 1H), 0.89–0.82 (m, 14H) ppm.

EJEMPLO 39

[671] El ejemplo demuestra un método para hacer el Enlazador–Carga útil (**LP3**). El siguiente ejemplo se refiere a la FIGURA 15.

[672] {4–[(2*S*)–2–[(2*S*)–2–Amino–3–metilbutanamido]–5–(carbamoilamino) pentanamido]fenil} metil *N*–(4–{2–[(1*R*,2*S*,8*S*,10*S*,11*S*,13*R*,14*R*,15*S*,17*S*)–1,8–difluoro–14,17–dihidroxi–2,13,15–trimetil–5–oxotetraciclo[8.7.0.0^{2,7}0^{11,15}]heptadeca–3,6–dien–14–il]–2–oxoetoxi}fenil) carbamato **(34f)**

[673] **Procedimiento general D**: **Etapa 1**: A una solución de carga útil una anilina (1.0 equiv.) en DMF se añadieron Fmoc-vcPAB-PNP (1.1 equiv.), HOBt (1.5 equiv.) y DIPEA (2.0 equiv.) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó a temperatura ambiente (18-30 °C) hasta que el material de partida se consumió de acuerdo con LCMS. **Etapa 2**: A la mezcla de reacción se añadió piperidina (0.03 mL por 10 mg de carga útil), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente (18-30 °C) durante una hora hasta que se removió el Fmoc monitoreado mediante LCMS. Después de filtrarse a través de membrana, la solución de reacción se purificó directamente mediante cromatografía instantánea de fase inversa o prep-HPLC para generar el carbonato de vcPAB.

[674] Cuando se utilizó *N*-Boc-vcPAB-PNP para reemplazar Fmoc-vcPAB-PNP en la reacción de la Etapa 1, el carbonato de *N*-Boc vcPAB se obtuvo a partir de la Etapa 1. Después de la purificación, el carbonato de *N*-Boc vcPAB se volvió a disolver en DCM, y se

trató con TFA (concentración de TFA < 25%) a 0 °C hasta que el Boc se removió monitoreado mediante LCMS. La mezcla de reacción se concentró para remover los compuestos volátiles y el residuo resultante se purificó mediante cromatografía o prep-HPLC para generar el carbonato de vcPAB.

[675] A una solución de Fmoc–vcPAB–PNP (73 mg, 96 µmol) en DMF (1 mL) se añadieron el compuesto **15-5** (40 mg, 80 µmol), DMAP (20 mg, 0.16 mmol), HOBt (23 mg, 0.16 mmol) y DIPEA (55 mg, 0.40 mmol) sucesivamente a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante media hora hasta que (**15-5**) se consumió totalmente de acuerdo con LCMS. (ESI: 565.3 $(M + H)^+$). A la mezcla resultante se añadió luego piperidina (34 mg, 0.40 mmol) a temperatura ambiente. Después de agitarse a temperatura ambiente durante 30 minutos más, lo cual se monitoreó mediante LCMS, la mezcla resultante se purificó directamente mediante cromatografía instantánea de fase inversa (acetonitrilo al 0-30% en agua) a (**34f**) (50 mg, rendimiento del 69%) como un sólido amarillo pálido. ESI: 907 $(M + H)^+$

[676] *N*–(14–{[(1*S*)–1–{[(1*S*)–4–(carbamoilamino)–1–{[4–({[(4–{2–[(1*R*,2*S*,8*S*,10*S*,11*S*,13*R*,14*R*,15*S*,17*S*)–1,8–difluoro–14,17–dihidroxi–2,13,15–trimetil–5–oxotetraciclo[8.7.0.$0^{2,7}$.$0^{11,15}$]heptadeca–3,6–dien–14–il]–2–oxoetoxi}fenil)carbamoil]oxi}metil)fenil]carbamoil}butil]carbamoil}–2–metilpropil]carbamoil}–3,6,9,12–tetraoxatetradecan–1–il)carbamato de biciclo[6.1.0]non–4–in–9–ilmetilo **(LP3)**

[677] **Etapa 3**: A una solución de BCN-PEG_4-ácido (60 mg, 67 µmol) en DMF (3.6 mL) se añadieron HATU (27 mg, 70 µmol) y DIPEA (20 mg, 0.15 mmol) sucesivamente a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante media hora seguido por la adición del compuesto (**34f**) (50 mg, 60 µmol) en porciones. La mezcla de reacción se agitó luego a temperatura ambiente durante 2 horas hasta que el compuesto **34f** se consumió totalmente de acuerdo con LCMS. Después, la mezcla de reacción se purificó directamente mediante prep-HPLC (método B) para producir el compuesto **LP3** (36 mg, rendimiento del 54%) como un sólido blanco. ESI: 1330 $(M + H)^+$. ^{1}H NMR (400 MHz, $DMSO_{d6}$) δ 10.02 (s, 1H), 9.56 (s, 1H), 8.14 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.89 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.62 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.35 (d, *J* = 8.4 Hz, 4H), 7.27 (d, *J* = 10.4 Hz, 1H), 7.11 (t, *J* = 4.4 Hz, 1H), 6.78 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.33–6.26 (m, 1H), 6.10 (s, 1H), 5.98 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H), 5.75–5.52 (m, 1H), 5.42 (s, 3H), 5.30 (s, 1H), 5.20 (d, *J* = 18.4 Hz, 1H), 5.05 (s, 2H), 4.70 (d, *J* = 18.4 Hz, 1H), 4.43–4.35 (m, 1H), 4.26–4.15 (m, 2H), 4.02 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 3.64–3.55 (m, 2H), 3.49 (s, 11H), 3.38 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.11 (dd, *J* = 11.8, 5.9 Hz,

2H), 3.05–2.88 (m, 3H), 2.44–2.31 (m, 2H), 2.28–2.08 (m, 9H), 2.02–1.90 (m, 1H), 1.76–1.10 (m, 16H), 0.91–0.77 (m, 14H) ppm. pureza de HPLC: >99%, tiempo de retención: 7.03 min.

EJEMPLO 40

[678] El ejemplo demuestra un método para hacer el Enlazador–Carga útil (**LP4**). El siguiente ejemplo se refiere a la FIGURA 16.

[679] (2*S*)–2–Amino–*N*–[(1*S*)–1–[(4–{2–[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*S*,13*R*)–11–hidroxi–9,13–dimetil–16–oxo–6–propil–5,7–dioxapentaciclo[10.8.0.$0^{2,9}$.$0^{4,8}$.$0^{13,18}$]icosa–14,17–dien–8–il]–2–oxoetoxi}fenil)carbamoil]etil]–3–metilbutanamida **(34a)**

[680] **Procedimiento general E**: A una solución de Fmoc-Val-Ala-OH (1.2 equiv.) en DMF (0.2 mL por 10 mg de péptido) se añadieron DIPEA (3.0 equiv.) y HATU (1.4 equiv.) a 20-25 °C. La mezcla se agitó a 20-25 °C durante 5 minutos, seguido por la adición de anilina (1.0 equiv.). La mezcla se agitó durante 2 horas adicionales hasta que el péptido se consumió totalmente, de acuerdo con LCMS. A la mezcla de reacción se añadió entonces piperidina (5.0 equiv.). La mezcla se agitó a 20-25 °C durante 2 horas. Después de filtrarse a través de membrana, la solución de reacción se purificó directamente mediante cromatografía instantánea de fase inversa (acetonitrilo al 0-100% en bicarbonato de amonio *ac.* (10 mM)) o prep-HPLC (método B). El compuesto (**34a**) se obtuvo siguiendo este Procedimiento general.

[681] Alternativamente, el compuesto (**34a**) se obtuvo de acuerdo con el **Procedimiento general C**. A una solución de Boc-Val-Ala-OH (0.29 g, 1.0 mmol) en cloruro de metileno (5 mL) se añadieron DIPEA (0.26 g, 2.0 mmol) y HATU (0.46 g, 1.2 mmol), y la mezcla se agitó a 23 ºC durante 30 minutos y luego a la mezcla de reacción se añadió el compuesto (**11-5**) (0.57 g, 1.1 mmol). Después de agitarse a 23 °C durante 16 horas adicionales, a la mezcla de reacción se añadió TFA (1.5 mL) y la mezcla resultante se agitó a 23 °C durante otra hora. Los compuestos volátiles se removieron bajo presión reducida y el residuo se purificó directamente mediante prep-HPLC (método B) para producir **34a** (0.17 g, rendimiento del 25% en 2 etapas) como un sólido blanco. ESI m/z: 692 $(M + H)^+$. ^{1}H NMR (500 MHz, $DMSO_{d6}$) δ 10.00 (s, 1H), 8.47 (d, J = 6.5 Hz, 1H), 7.57–7.47 (m, 2H), 7.33 (d, J = 10 Hz, 1H), 6.87–6.82 (m, 2H), 6.18 (d, J = 10 Hz, 1H), 5.93 (s, 3H), 5.25–5.11 (m, 1H), 5.09 (d, J = 6.5 Hz, 1H), 4.92–4.65 (m, 3H), 4.55–4.40 (m, 1H), 4.40–4.30 (m, 1H), 2.32–2.22 (m, 1H), 2.18–1.80 (m, 5H), 1.65–1.45 (m, 5H), 1.45–1.25 (m, 9H), 1.25–0.98 (m, 2H), 0.96–0.76 (m, 13H) ppm.

[682] *N*–(14–{[(1*S*)–1–{[(1*S*)–1–[(4–{2–[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*S*,13*R*)–11–Hidroxi–9,13–dimetil–16–oxo–6–propil–5,7–dioxapentaciclo[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]icosa–14,17–dien–8–il]–2–oxoetoxi}fenil)carbamoil]etil]carbamoil}–2–metilpropil]carbamoil}–3,6,9,12–tetraoxatetradecan–1–il)carbamato de biciclo[6.1.0]non–4–in–9–ilmetilo **(LP4)**

[683] **Procedimiento general F**: A una solución de un BCN–PEG$_4$–ácido o su NHS-éster en DMF se añadieron HATU (1 eq.) y DIPEA (2.5 eq.). La mezcla se agitó a 25 ºC durante 30 minutos, seguido por la adición de una solución de una amina. Después de agitarse a 25 ºC durante 2 horas monitoreado mediante LC-MS, los materiales de partida se consumieron y la mezcla se purificó directamente mediante prep-HPLC para producir la amida deseada.

[684] A una solución de BCN–PEG$_4$–ácido (**IX**, 70 mg, 0.16 mmol) en DMF (8 mL) se añadieron HATU (66 mg, 0.17 mmol) y DIPEA (56 mg, 0.43 mmol) sucesivamente. La mezcla se agitó a 25 ºC durante 30 minutos, seguido por la adición de una solución de **34a** (0.10 g, 0.15 mmol). Después de agitarse a 25 °C durante 2 horas, la mezcla se purificó directamente mediante prep-HPLC (método B) para producir **LP4** (25 mg, rendimiento del 16%) como un sólido blanco. ESI m/z = 1116 $(M + H)^+$.

[685] Utilizando el compuesto quiral **11-5R** como el material de partida, se obtuvo **(*R*)-LP4** quiral como un sólido blanco (24 mg, rendimiento del 31%) de acuerdo con el **Procedimiento general F**. ESI m/z: 1115 $(M + H)^+$. ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO$_{d6}$) (rotámeros) δ 9.78 (s, 0.5H), 9.69 (s, 0.5H), 8.40 (d, *J* = 7.5 Hz, 0.5H), 8.15 (d, *J* = 7.0 Hz, 0.5H), 8.01 (d, *J* = 8.0 Hz, 0.5H), 7.89 (d, *J* = 9.0 Hz, 0.5H), 7.57 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.51 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.32 (d, *J* = 10.1 Hz, 1H), 7.09 (s, 1H), 6.85 (d, *J* = 9.1 Hz, 2H), 6.18 (d, *J* = 11.4 Hz, 1H), 5.93 (s, 1H), 5.10 (d, *J* = 18.5 Hz, 1H), 4.86–4.67 (m, 4H), 4.45–4.36 (m, 1H), 4.33 (s, 1H), 4.20 (t, *J* = 7.5 Hz, 0.5H), 4.10 (t, *J* = 7.8 Hz, 0.5H), 4.03 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 3.59 (d, *J* = 6.6 Hz, 2H), 3.49–3.45 (m, 11H), 3.39 (s, 2H), 3.30 (s, 2H), 3.11 (dd, *J* = 11.4, 5.9 Hz, 2H), 2.47–2.43 (m, 1H), 2.38–2.12 (m, 8H), 2.03–1.83 (s, 5H), 1.62–1.51 (m, 6H), 1.42–1.24 (m, 10H), 1.02–0.94 (m, 2H), 0.90–0.82 (m, 14H) ppm. HPLC *Anal.*: 100%, Tiempo de retención: 9.49 min (método A).

EJEMPLO 41

[686] El ejemplo demuestra un método para hacer el Enlazador–Carga útil (**LP5**). El siguiente ejemplo se refiere a la FIGURA 16.

[687] (2*S*)–2–[(2*S*)–2–Amino–3–metilbutanamido]–5–(carbamoilamino)–*N*–(4–{2–[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*S*,13*R*)–11–hidroxi–9,13–dimetil–16–oxo–6–propil–5,7–

dioxapentaciclo[10.8.0.$0^{2,9}$.$0^{4,8}$.$0^{13,18}$]icosa–14,17–dien–8–il]–2–oxoetoxi}fenil)pentanamida **(34c)**

[688] El compuesto **34c** se obtuvo siguiendo el **Procedimiento general C**. Una mezcla de Boc-vc (0.26 g, 0.50 mmol), DIPEA (0.19 g, 0.60 mmol) y HATU (0.23 g, 0.60 mmol) en DMF (10 mL) se agitó a 23 °C durante 30 minutos y luego se añadió a la mezcla **11-5** (0.28 g, 0.55 mmol). Después de agitarse a 23 °C durante 16 horas, la mezcla de reacción se purificó directamente mediante cromatografía instantánea de fase inversa (acetonitrilo al 0–50% en agua) para producir un crudo (ESI m/z 878 $(M + H)^+$), que se disolvió en cloruro de metileno (8 mL) y se trató con TFA (3 mL). La mezcla resultante se agitó a 23 °C durante una hora. Los compuestos volátiles se removieron bajo presión reducida y el residuo se purificó directamente mediante prep-HPLC (método B) para producir el compuesto **34c** (0.12 g, rendimiento del 31% en 2 etapas) como un sólido blanco. ESI m/z: 778 $(M + H)^+$. ^{1}H NMR (500 MHz, $DMSO_{d6}$) δ 9.97 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H), 8.10 (m, 1H), 7.51 (d, *J* = 6.5 Hz, 2H), 7.32 (dd, *J* = 10.1, 2.5 Hz, 1H), 6.83 (dd, *J* = 15.9, 9.0 Hz, 2H), 6.17 (d, *J* = 10.0 Hz, 1H), 5.97 (t, *J* = 5.0 Hz ,1H), 5.93 (s, 1H), 5.40 (s, 2H), 5.22 (t, *J* = 4.8 Hz, 1H), 5.12 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H), 5.09 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H), 4.83–4.67 (m, 3H), 4.47–4.37 (m, 1H), 4.35 – 4.29 (m, 1H), 3.05 –2.90 (m, 3H), 2.57–2.51(m, 1H), 2.30 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H), 2.13–1.74 (m, 7H), 1.70– 1.46 (m, 7H), 1.45–1.29 (m, 7H), 1.17–0.93 (m, 2H), 0.91– 0.82 (m, 9H), 0.77 (dd, *J* = 6.7, 2.7 Hz, 3H) ppm.

[689] *N*–(14–{[(1*S*)–1–{[(1*S*)–4–(Carbamoilamino)–1–[(4–{2–[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*S*,13*R*)–11–hidroxi–9,13–dimetil–16–oxo–6–propil–5,7–dioxapentaciclo[10.8.0.$0^{2,9}$.$0^{4,8}$.$0^{13,18}$]icosa–14,17–dien–8–il]–2–oxoetoxi}fenil)carbamoil]butil]carbamoil}–2–metilpropil]carbamoil}–3,6,9,12–tetraoxatetradecan–1–il)carbamato de biciclo[6.1.0]non–4–in–9–ilmetilo **(LP5)**

[690] El **LP5** se obtuvo siguiendo el **Procedimiento general F**. Una solución de BCN-PEG4-ácido (**IX** en la FIGURA 15, 0.28 g) en cloruro de metileno (6 mL) se añadió a una mezcla de HATU (59 mg, 0.15 mmol) y DIPEA (50 mg, 0.39 mmol) en DMF (5 mL). La mezcla de reacción se agitó a 25 ºC durante 30 minutos y se añadió el compuesto **34c** (0.10 g, 0.13 mmol) en una porción. La mezcla resultante se agitó a 25 ºC durante la noche y se purificó directamente mediante prep-HPLC (método B) para producir **LP5** (35 mg, rendimiento del 23%) como un sólido amarillo pálido. ESI m/z =1202 $(M + H)^+$. ^{1}H NMR (400 MHz, $MeOD_{d4}$) δ 7.61–7.43 (m, 3H), 6.87 (t, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.26 (d, *J* = 10.0 Hz, 1H), 6.02 (s, 1H), 5.29–5.02 (m, 2H), 4.84–4.65 (m, 2H), 4.51–4.44 (s, 2H), 4.22–4.05 (m, 3H), 3.80–

3.68 (m, 2H), 3.67–3.45 (m, 14H), 3.22–3.08 (m, 2H), 2.72–2.50 (m, 3H), 2.45–2.33 (m, 1H), 2.30–2.02 (m, 10H), 1.99–1.82 (m, 2H), 1.81–1.32 (m, 17H), 1.26–0.85 (m, 17H) ppm.

EJEMPLO 42

[691] El ejemplo demuestra un método para hacer el Enlazador–Carga útil (**LP6**). El siguiente ejemplo se refiere a la FIGURA 16.

[692] *N*–(4–{2–[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*S*,13*R*)–11–Hidroxi–9,13–dimetil–16–oxo–6–propil–5,7–dioxapentaciclo[10.8.0.$0^{2,9}$.$0^{4,8}$.$0^{13,18}$]icosa–14,17–dien–8–il]–2–oxoetoxi}fenil)carbamato de {4–[(2*S*)–2–[(2*S*)–2–amino–3–metilbutanamido]–5–(carbamoilamino)pentanamido]fenil}metilo **(34d)**

[693] El compuesto **34d** se preparó de acuerdo con el **Procedimiento general D**.

[694] **Etapa 1**: A una solución de compuesto (**11-5**) de la Tabla **1** (66 mg, 0.10 mmol) en DMF (3.5 mL) se añadieron sucesivamente Boc–vcPAB–PNP (64 mg, 0.12 mmol), HOBt (14 mg, 0.10 mmol) y DIPEA (13.0 mg, 0.10 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 13 °C durante la noche y se purificó directamente mediante prep-HPLC (método B) para producir el intermedio **Boc-34d** (61 mg, rendimiento del 58%) como un sólido blanco. ESI m/z: 1027.3 $(M + H)^+$. ^{1}H NMR ($MeOD_{d4}$, 400 MHz) δ 7.60 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.46 (d, J = 10.4 Hz, 1H), 7.38–7.33 (m, 4H), 6.87–6.83 (m, 2H), 6.26 (dt, J = 10.0, 2.0 Hz, 1H), 6.02 (s, 1H), 5.26–5.03 (m, 4.2H), 4.82–4.67 (m, 1.8H), 4.54–4.51 (m, 1H), 4.48–4.43 (m, 1H), 3.91 (d, J = 6.4 Hz, 1H), 3.31–3.18 (m, 1H), 3.14–3.08 (m, 1H), 2.70–2.63 (m, 1H), 2.40–2.37 (m, 1H), 2.26–2.00 (m, 4H), 1.94–1.72 (m, 4H), 1.68–1.35 (m, 20H), 1.22–0.92 (m, 14H) ppm.

[695] **Etapa 2**: A una solución de **Boc-34d** (59 mg, 58 µmol) en DCM (2 mL) y MeOH (1 mL) se añadió a gotas HCl en dioxano (4 N, 1.5 mL) a 0 °C. La mezcla se agitó luego a temperatura ambiente (14 °C) durante 4 horas. Los compuestos volátiles se removieron *in vacuo* para producir **34d** (60 mg, crudo) como aceite marrón, que se utilizó directamente para la siguiente etapa. ESI m/z: 927 $(M + H)^+$.

[696] *N*–(14–{[(1*S*)–1–{[(1*S*)–4–(Carbamoilamino)–1–{[4–({[(4–{2–[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*S*,13*R*)–11–hidroxi–9,13–dimetil–16–oxo–6–propil–5,7–dioxapentaciclo[10.8.0.$0^{2,9}$.$0^{4,8}$.$0^{13,18}$]icosa–14,17–dien–8–il]–2–oxoetoxi}fenil)carbamoil]oxi}metil)fenil]carbamoil}butil]carbamoil}–2–metilpropil]carbamoil}–3,6,9,12–tetraoxatetradecan–1–il)carbamato de biciclo[6.1.0]non–4–in–9–ilmetilo **(LP6)**

[697] El **LP6** se obtuvo como un sólido blanco (24 mg, rendimiento del 31%) siguiendo el **Procedimiento general F**. ESI m/z: 1350.5 $(M + H)^+$. ^{1}H NMR ($DMSO_{d6}$, 400 MHz) δ 10.02 (s, 1H), 9.58 (s, 1H), 8.13 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.88 (d, J =8.4 Hz, 1H), 7.61 (d,

J = 8.4 Hz, 2H), 7.36–7.30 (m, 5H), 7.11 (t, *J* =4.8 Hz, 1H), 6.84–6.78 (m, 2H), 6.19–6.16 (m, 1H), 5.98 (t, *J* =5.2 Hz, 1H), 5.93 (s, 1H), 5.42 (s, 2H), 5.23–5.06 (m, 4H), 4.80–4.67 (m, 3H), 4.39–4.31 (m, 2H), 4.23 (t, *J* =7.2 Hz, 1H), 4.02 (d, *J* =8.0 Hz, 2H), 3.64–3.55 (m, 2H), 3.49 (m, 12H), 3.42–3.27 (m, 3H), 3.13–2.89 (m, 4H), 2.41–2.12 (m, 9H), 2.03–1.95 (m, 2H), 1.91–1.82 (m, 2H), 1.75–1.68 (m, 1H), 1.61–1.20 (m, 16H), 1.15–0.95 (m, 2H), 0.92–0.81 (m, 15H) ppm. HPLC *Anal.*: 69%+31%=100%, Tiempo de retención: 8.86 min y 8.92 min (método B).

EJEMPLO 43

[698] El ejemplo demuestra un método para hacer el Enlazador–Carga útil **LP7**. El siguiente ejemplo se refiere a la FIGURA 16.

[699] *N*-(14-{[(1*S*)-1-{[(1*S*)-1-[(4-{2-[(1*S*,2*S*,4*R*, 6*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*S*,13*R*)-11-Hidroxi-9,13-dimetil-16-oxo-6-propil-5,7-dioxapentaciclo [10.8.0.$0^{2,9}$.$0^{4,8}$.$0^{13,18}$]icosa-14,17-dien-8-il]-2-oxoetoxi}fenil)carbamoil]etil]carbamoil}-2-metilpropil]carbamoil}-3,6,9,12-tetraoxatetradecan-1-il)carbamato de (biciclo[6.1.0]non-4-in-9-ilmetilo (**LP7**)

[700] El **LP7** (24 mg, rendimiento del 31% en 3 etapas a partir de **34a**) se obtuvo como un sólido blanco de acuerdo con el **Procedimiento general F**. ESI m/z: 1115 $(M + H)^+$. ^{1}H NMR (500 MHz, $DMSO_{d6}$) (rotámeros) δ 9.78 (s, 0.5H), 9.69 (s, 0.5H), 8.40 (d, *J* = 7.5 Hz, 0.5H), 8.15 (d, *J* = 7.0 Hz, 0.5H), 8.01 (d, *J* = 8.0 Hz, 0.5H), 7.89 (d, *J* = 9.0 Hz, 0.5H), 7.57 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.51 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.32 (d, *J* = 10.1 Hz, 1H), 7.09 (s, 1H), 6.85 (d, *J* = 9.1 Hz, 2H), 6.18 (d, *J* = 11.4 Hz, 1H), 5.93 (s, 1H), 5.10 (d, *J* = 18.5 Hz, 1H), 4.86-4.67 (m, 4H), 4.45-4.36 (m, 1H), 4.33 (s, 1H), 4.20 (t, *J* = 7.5 Hz, 0.5H), 4.10 (t, *J* = 7.8 Hz, 0.5H), 4.03 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 3.59 (d, *J* = 6.6 Hz, 2H), 3.49-3.45 (m, 11H), 3.39 (s, 2H), 3.30 (s, 2H), 3.11 (dd, *J* = 11.4, 5.9 Hz, 2H), 2.47-2.43 (m, 1H), 2.38-2.12 (m, 8H), 2.03-1.83 (s, 5H), 1.62-1.51 (m, 6H), 1.42-1.24 (m, 10H), 1.02-0.94 (m, 2H), 0.90-0.82 (m, 14H) ppm. HPLC *Anal.*: 100%, Tiempo de retención: 9.47 min (método A).

EJEMPLO 44

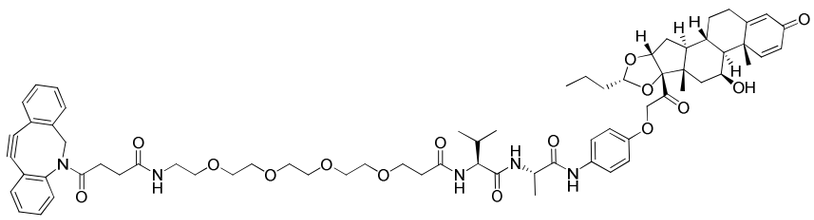
[701] El ejemplo también demuestra un método para hacer el Enlazador–Carga útil (**LP7**). El siguiente ejemplo se refiere a la FIGURA 26. Se utilizaron las siguientes condiciones de reacción:

Amina mg (µmol)		**Ácido mg (µmol)**		**Etapa 1**					**mg % Rendi-miento**	**MS m/z**
				HATU mg (µmol)	**DIPEA mg (µmol)**	**DMF (mL)**	**Temp. (°C)**	**Tiempo (h)**		
26	30	**VI-**	48	40	17	1	25	16	30	1227.6

b	(43)	**8**	(87)	(105)	(132)				56%	$(M+H)^+$

[702] A una solución de ácido (**VI-8**) (1.0-2.5 equiv.) en DMF (o DCM/DMF) se añadieron DIPEA (1.5-10 equiv.) y HATU (2.5-4.0 equiv.) a temperatura ambiente sucesivamente. La mezcla resultante se agitó a esta temperatura durante 0.5-1 horas antes de agregar la amina (**26b**) (1.0 equiv.). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2-16 horas hasta que la amina se consumió totalmente, según se monitoreó mediante LCMS. La mezcla de reacción se filtró a través de una membrana y el filtrado se concentró y luego se separó mediante prep-HPLC (método B) para dar el compuesto del ejemplo **LP7** (rendimiento del 20-69%) como un sólido blanco.

1-(4-{2-azatriciclo[10.4.0.0^{4,9}]hexadeca-1(12),4(9),5,7,13,15-hexaen-10-in-2-il}-4-oxobutanamido)-*N*-[(1*S*)-1-{[(1*S*)-1-[(4-{2-[(1*S*,2*S*,4*R*,6*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*S*,13*R*)-11-hidroxi-9,13-dimetil-16-oxo-6-propil-5,7-dioxapentaciclo[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]icosa-14,17-dien-8-il]-2-oxoetoxi}fenil)carbamoil]etil]carbamoil}-2-metilpropil]-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-amida (LP7)



ESI m/z: 1227.6 $(M + H)^+$.

^{1}H NMR (500 MHz, $DMSO_{d6}$) (rotámeros) δ 9.79 (s, 0.5H), 9.70 (s, 0.5H), 8.41 (d, *J* = 7.5 Hz, 0.5H), 8.17 (d, *J* = 7.0 Hz, 0.5H), 8.02 (d, *J* = 8.0 Hz, 0.5H), 7.89 (d, *J* = 8.6 Hz, 0.5H), 7.77 (t, *J* = 4.8 Hz, 1H), 7.68 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.62 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.58 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.53-7.43 (m, 4H), 7.40-7.28 (m, 4H), 6.88-6.82 (m, 2H), 6.18 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 5.93 (s, 1H), 5.10 (d, *J* = 18.4 Hz, 1H), 5.03 (d, *J* = 14.0 Hz, 1H), 4.83-4.67 (m, 4H), 4.45-4.29 (m, 2H), 4.23-4.17 (m, 0.5H), 4.11 (t, *J* = 7.7 Hz, 0.5H), 3.64-3.40 (m, 15H), 3.31-3.26 (m, 2H), 3.13-3.03 (m, 2H), 2.65-2.52 (m, 2H), 2.47-1.26 (m, 24H), 1.06-0.93 (m, 2H), 0.90-0.80 (m, 12H) ppm.

[703] HPLC *Anal.*: 99%, Tiempo de retención: 8.55 min (método B).

[704] Solubilidad: <0.1 mg/mL de agua; 0.06 mg/mL de DMSO al 20% en agua; 0.07 mg/mL de DMSO al 30% en agua.

EJEMPLO 45

[705] Este ejemplo demuestra un método para hacer el Enlazador–Carga útil (**LP15**). El siguiente Ejemplo se refiere a las FIGURAS 27-28. Nótese que en la FIGURA 27, el compuesto 11b es idéntico al compuesto 11-5 en la FIGURA 2.

Etapa 1: Hacer el compuesto (13b), con referencia a la FIGURA 27.

[706] A una solución de ácido Fmoc-Val-Ala-OH (**12b**) en DMF se añadieron HATU (1.0-2.8 equiv.) y TEA (2.0-5.0 equiv.) a 25 °C. Después de que la mezcla se agitó a 25 °C durante 30 minutos, se añadió mediante jeringa una solución de amina (**11b**, es decir, carga útil, 1.0 equiv.) en DMF (1 mL). La mezcla resultante se agitó a 25 °C durante 2-24 horas hasta que la amina se consumió en su mayor parte de acuerdo con LCMS. Luego, a la mezcla se añadió piperidina o dietilamina (exceso), y la mezcla se agitó a 25 °C durante 1-16 horas hasta que se removió totalmente el Fmoc, según se monitoreó mediante LCMS. La mezcla de reacción se filtró a través de una membrana y el filtrado se concentró y se purificó directamente mediante prep-HPLC (método B) o cromatografía instantánea de fase inversa para dar el compuesto **13b** (rendimiento del 23-64%) como un sólido blanco. Específicamente, se utilizaron las siguientes condiciones:

Amina mg (mmoL)		**Ácido mg (mmoL)**		**Etapa 1**				**Etapa 2**		**Purificación***	**% Rendimiento mg**	**m/z** (M+1)$^+$
				HATU mg (mmol)	**DIPEA mg (mmol)**	**DMF (mL)**	**Tiempo(h)**	**Et_2NH (mL)**	**Tiempo (h)**			
11b	85 (0.076)	**12b**	69 (0.088)	69 (0.18)	TEA 18 (0.18)	3	2	0.5	16	RP	17, 43%	832.2 $(M/2 + H)^+$

Etapa 2: Hacer el compuesto (17a), con referencia a la FIGURA 27.

[707] A una solución de compuesto **13b** en DMF se añadieron HATU (1.0-2.8 equiv.) y DIPEA o TEA (2.0-5.0 equiv.) a 25 °C. Después de que se agitó la mezcla a 25 °C durante 30 minutos, se añadió mediante jeringa una solución de Fmoc-Lys-(PEG)4-COT (**13c**, 1.0 equiv.) en DMF (1 mL). La mezcla resultante se agitó a 25 °C durante 2-24 horas hasta que la amina (**13b**) se consumió en su mayor parte de acuerdo con LCMS. Luego, a la mezcla se añadió piperidina o dietilamina (exceso), y la mezcla se agitó a 25 °C durante 1-16 horas hasta que se removió totalmente el Fmoc, según se monitoreó mediante LCMS. La mezcla de reacción se filtró a través de una membrana y el filtrado se concentró y se purificó directamente mediante prep-HPLC (método B) o cromatografía instantánea de fase inversa para proporcionar el compuesto (**17a**) (rendimiento del 23-64%) como un sólido blanco.

Etapa 3: Hacer el compuesto (27b), con referencia a la FIGURA 27.

[708] A una solución de alquino (**17a**) (1.0 equiv.) en DMF o DMSO se añadió α-ciclodextrin-azida (**16a**) (Véase *Synth. Commun.*, **2002**, 32(21), 3367-3372; *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, 134(46), 19108-19117; *J. Med. Chem.*, **1997**, 40(17), 2755-2761; *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, todo el contenido de cada una de estas publicaciones se incorpora aquí por referencia en su totalidad para todos los propósitos, 115(12), 5035-5040) (1.5-3.0 equiv.). La mezcla resultante se agitó luego a 20-30 °C durante 16 horas a 3 días hasta que el compuesto **16a** se consumió en su mayor parte y se detectó la masa intermedia deseada, según se monitoreó mediante LCMS. Después de la filtración, la mezcla resultante se purificó directamente mediante prep-HPLC (o se utilizó directamente) para dar el compuesto **27b** (rendimiento del 25-58%) como un sólido blanco (con regioisómeros de triazol). Específicamente, se utilizaron las siguientes condiciones.

Alquino mg (mmol)	**16a mg (mmol)**	**Solvente (mL)**	**Temp. (°C)**	**Tiempo (h)**	**Purifi-cación**	**Rendi-miento**	**m/z**
50 (0.030)	60 (0.06)	DMSO (2)	25	48	RP-B	46 mg, 58%	887.9 $(M/3 + H)^+$.

Etapa 4: Hacer el compuesto (LP15), con referencia a la FIGURA 28.

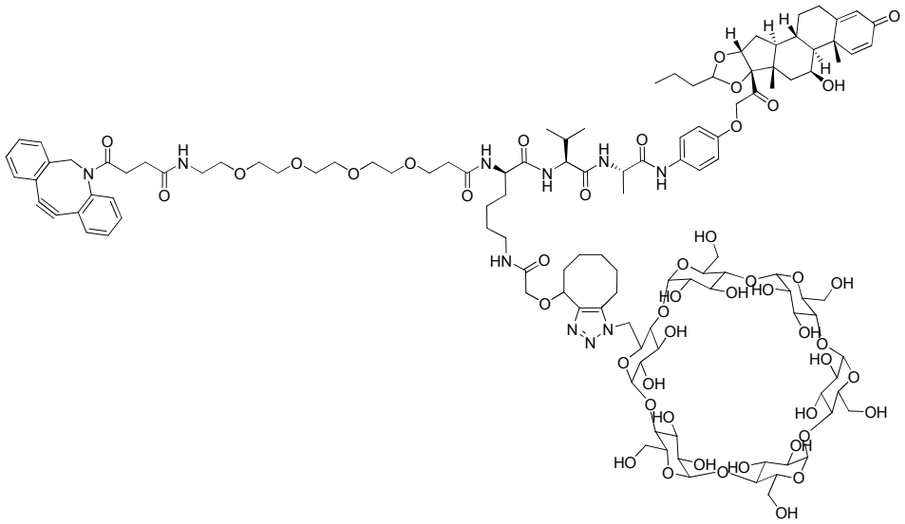
[709] Se utilizaron las siguientes condiciones de reacción:

Amina mg (µmol)		**Ácido mg (µmol)**		**HATU mg (µmol)**	**DIPEA mg (µmol)**	**DMF (mL)**	**Temp. (°C)**	**Tiem-po (h)**	**mg % Rendi-miento**	**MS m/z**
27b	13 (6.0)	**VI-8**	20 (36)	15 (39)	4.0 (31)	2	25	2	6.0 36%	1259.1 $(M/2+H)^+$

[710] A una solución de ácido (**VI-8**) (1.0-2.5 equiv.) en DMF (o DCM/DMF) se añadieron DIPEA (1.5-10 equiv.) y HATU (2.5-4.0 equiv.) a temperatura ambiente sucesivamente. La mezcla resultante se agitó a esta temperatura durante 0.5-1 horas antes de agregar la amina (**27b**) (1.0 equiv.). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 a 16 horas hasta que la amina (**27b**) se consumió totalmente, según se

monitoreó mediante LCMS. La mezcla de reacción se filtró a través de una membrana, el filtrado se concentró y luego se separó mediante prep-HPLC (método B) para dar el compuesto del ejemplo (rendimiento del 20-69%) como un sólido blanco.

1-(4-{2-Azatriciclo[10.4.0.0^{4,9}]hexadeca-1(12),4(9),5,7,13,15-hexaen-10-in-2-il}-4-oxobutanamido)-*N*-[(1*R*)-5-{2-[(1-{[31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42-dodecahidroxi-10,15,20,25,30-pentaquis(hidroximetil)-2,4,7,9,12,14,17,19,22,24,27,29-dodecaoxaheptaciclo[26.2.2.2^{3,6}.2^{8,11}.2^{13,16}.2^{18,21}.2^{23,26}]dotetracontan-5-il]metil}-1*H*,4*H*,5*H*,6*H*,7*H*,8*H*,9*H*-ciclooctа[d][1,2,3]triazol-4-il)oxi]acetamido}-1-{[(1*S*)-1-{[(1*S*)-1-[(4-{2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*S*,13*R*)-11-hidroxi-9,13-dimetil-16-oxo-6-propil-5,7-dioxapentaciclo[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]icosa-14,17-dien-8-il]-2-oxoetoxi}fenil)carbamoil]etil]carbamoil}-2-metilpropil]carbamoil}pentil]-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-amida (LP15)



ESI m/z: 1259.1 $(M/2 + H)^+$.

^{1}H NMR (500 MHz, $DMSO_{d6}$) (rotámeros) δ 9.84 (s, 1H), 8.34 (s, 0.5H), 8.15 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 8.04 (d, J = 6.6 Hz, 1H), 7.90-7.84 (m, 1H), 7.81-7.74 (m, 1.5H), 7.72-7.56 (m, 4H), 7.56-7.27 (m, 11H), 6.89-6.79 (m, 2H), 6.17 (d, J = 10.0 Hz, 1H), 5.93 (s, 1H), 5.64-5.44 (m, 12H), 5.24-5.00 (m, 5H), 4.86-4.51 (m, 16H), 4.40-4.16 (m, 5H), 4.05-3.96 (m, 1H), 3.86-3.73 (m, 10H), 3.67-2.88 (m, 35H), 2.80-2.69 (m, 1H), 2.62-2.55 (m, 1H), 2.41-2.20 (m, 6H), 2.10-1.71 (m, 10H), 1.66-1.07 (m, 26H), 1.05-0.79 (m, 17H) ppm.

HPLC *Anal.*: 97%, Tiempo de retención: 6.62 y 6.67 min (método B). Los tiempos de retención son de dos regioisómeros de triazol.

EJEMPLO 46

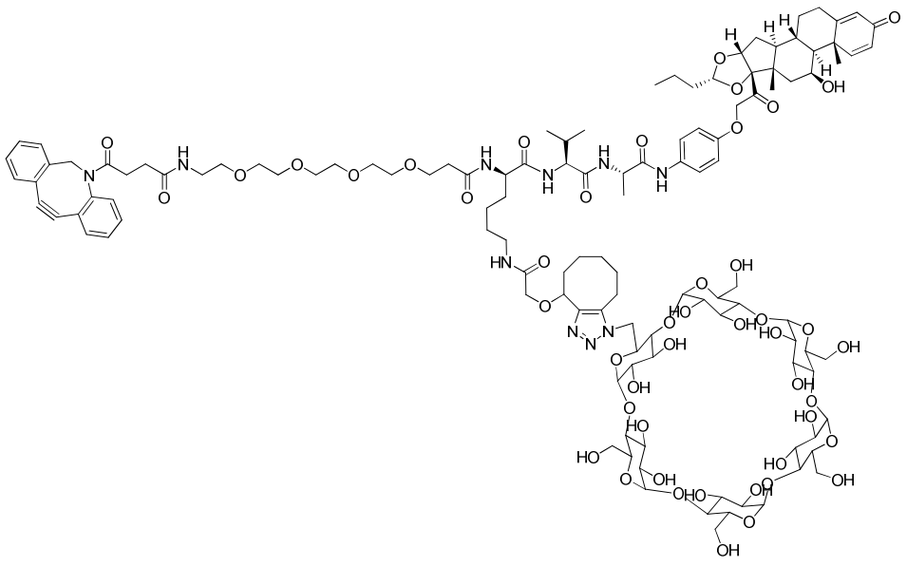
[711] Este ejemplo demuestra un método para hacer el Enlazador–Carga útil (**LP16**). El siguiente ejemplo se refiere a las FIGURAS 27-28. El método para hacer LP16 fue el

mismo que el método para hacer LP15, en el Ejemplo 45 de este documento, excepto que se utilizó una carga útil diferente, como se muestra en las FIGURAS 27-28. Se utilizaron las siguientes condiciones de reacción:

Amina mg (µmol)		**Ácido mg (µmol)**		**Etapa 1**					**purificación**	**mg % Rendimiento**	**MS m/z**
				HATU mg (µmol)	**DIPEA mg (µmol)**	**DMF (mL)**	**Temp. (°C)**	**Tiempo (h)**			
27b	30 (15)	**VI-8**	10 (18)	8.0 (21)	6.0 (47)	1	15-20	16	B	18 47%	1259.1 $(M/2+H)^+$

[712] A una solución de ácido **VI-8** (1.0-2.5 equiv.) en DMF (o DCM/DMF) se añadieron DIPEA (1.5-10 equiv.) y HATU (2.5-4.0 equiv.) a temperatura ambiente sucesivamente. La mezcla resultante se agitó a esta temperatura durante 0.5-1 horas antes de agregar la amina (**27b**) (1.0 equiv.). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 a 16 horas hasta que la amina (**27b**) se consumió totalmente, según se monitoreó mediante LCMS. La mezcla de reacción se filtró a través de una membrana y el filtrado se concentró y luego se separó mediante prep-HPLC (método B) para dar el compuesto del ejemplo (rendimiento del 20-69%) como un sólido blanco.

1-(4-{2-Azatriciclo[10.4.0.0^{4,9}]hexadeca-1(12),4(9),5,7,13,15-hexaen-10-in-2-il}-4-oxobutanamido)-*N*-[(1*R*)-5-{2-[(1-{[31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42-dodecahidroxi-10,15,20,25,30-pentaquis(hidroximetil)-2,4,7,9,12,14,17,19,22,24,27,29-dodecaoxaheptaciclo[26.2.2.2^{3,6}.2^{8,11}.2^{13,16}.2^{18,21}.2^{23,26}]dotetracontan-5-il]metil}-1*H*,4*H*,5*H*,6*H*,7*H*,8*H*,9*H*-ciclooocta[d][1,2,3]triazol-4-il)oxi]acetamido}-1-{[(1*S*)-1-{[(1*S*)-1-[(4-{2-[(1*S*,2*S*,4*R*,6*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*S*,13*R*)-11-hidroxi-9,13-dimetil-16-oxo-6-propil-5,7-dioxapentaciclo[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]icosa-14,17-dien-8-il]-2-oxoetoxi}fenil)carbamoil]etil]carbamoil}-2-metilpropil]carbamoil}pentil]-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-amida (LP16)



ESI m/z: 839.5 $(M/3 + H)^+$, 1259.1 $(M/2 + H)^+$ (60%).

^{1}H NMR (500 MHz, $DMSO_{d6}$) (con regioisómero de triazol) δ 9.77-9.42 (m, 1H), 8.27-8.20 (m, 0.5H), 8.17-8.01 (m, 2H), 7.86-7.74 (m, 2.5H), 7.70-7.60 (m, 4H), 7.57-7.43 (m, 7H), 7.39-7.28 (m, 6H), 6.88-6.81 (m, 2H), 6.21-6.14 (m, 1H), 5.93 (s, 1H), 5.61-5.42 (m, 10H), 5.16-4.97 (m, 4H), 4.89-4.48 (m, 17H), 4.40-4.28 (m, 4H), 4.16-4.10 (m, 1H), 4.04-3.94 (m, 1H), 3.83-3.74 (m, 7H), 3.65-3.56 (m, 9H), 3.48-3.21 (m, 23H), 3.15-3.06 (m, 4H), 2.97-2.89 (m, 1H), 2.81-2.69 (m, 1H), 2.61-2.53 (m, 2H), 2.40-2.20 (m, 6H), 2.14-2.06 (m, 2H), 2.03-1.95 (m, 4H), 1.91-1.70 (m, 5H), 1.64-1.52 (m, 9H), 1.49-1.25 (m, 14H), 1.13-0.81 (m, 19H) ppm.

HPLC *Anal.*: 98%, Tiempo de retención: 6.61(59%) y 6.73 (39%) min (método B). Los tiempos de retención son de dos regioisómeros de triazol.

Solubilidad: 0.1 mg/mL de DMSO al 10% en agua.

EJEMPLO 47

[713] El ejemplo demuestra un método para hacer el Enlazador–Carga útil (**LP8**). El siguiente ejemplo se refiere a la FIGURA 16.

[714] (2*S*)-2-[(2*S*)-2-Amino-3-metilbutanamido]-5-(carbamoilamino)-*N*-(4-{2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*S*,13*R*)-11-hidroxi-9,13-dimetil-16-oxo-6-propil-5,7-dioxapentaciclo[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]icosa-14,17-dien-8-il]-2-oxoetoxi}fenil)pentanamida (**34h**)

[715] El compuesto (**34h**) como un sólido blanco se preparó de acuerdo con el **Procedimiento general C** después de la purificación mediante prep-HPLC (método B). ESI m/z: 778 $(M + H)^+$. ^{1}H NMR (500 MHz, $DMSO_{d6}$) δ 9.97 (d, J = 12.0 Hz, 1H), 8.10 (m, 1H), 7.51 (d, J = 6.5 Hz, 2H), 7.32 (dd, J = 10.1, 2.5 Hz, 1H), 6.83 (dd, J = 15.9, 9.0 Hz, 2H), 6.17 (d, J = 10.0 Hz, 1H), 5.97 (t, J = 5.0 Hz ,1H), 5.93 (s, 1H), 5.40 (s, 2H), 5.22 (t, J = 4.8 Hz,

1H), 5.12 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H), 5.09 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H), 4.83-4.67 (m, 3H), 4.47-4.37 (m, 1H), 4.35-4.29 (m, 1H), 3.05-2.90 (m, 3H), 2.57-2.51(m, 1H), 2.30 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H), 2.13-1.74 (m, 7H), 1.70- 1.46 (m, 7H), 1.45-1.29 (m, 7H), 1.17-0.93 (m, 2H), 0.91- 0.82 (m, 9H), 0.77 (dd, *J* = 6.7, 2.7 Hz, 3H) ppm.

[716] 1-(4-{2-Azatriciclo[10.4.0.0^{4,9}]hexadeca-1(12),4(9),5,7,13,15-hexaen-10-in-2-il}-4-oxobutanamido)-*N*-[(1*S*)-1-{[(1*S*)-1-[(4-{2-[(1*S*,2*S*,4*R*,6*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-difluoro-11-hidroxi-9,13-dimetil-16-oxo-6-propil-5,7-dioxapentaciclo[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}] icosa-14,17-dien-8-il]-2-oxoetoxi}fenil)carbamoil]etil]carbamoil}-2-metilpropil]-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-amida (**LP8**)

[717] El compuesto **LP8** (25 mg, rendimiento del 20%) se obtuvo como un sólido blanco de acuerdo con el **Procedimiento general F**. ESI m/z: 1263 (M/+H)$^+$. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO$_{d6}$) δ 9.79 (s, 0.7H), 9.69 (s, 0.3H),8.41 (d, *J* = 8.0 Hz, 0.3H), 8.16 (d, *J* = 8.0 Hz, 0.7H), 8.01 (d, *J* = 7.6 Hz, 0.3H), 7.89 (d, *J* = 7.6 Hz, 0.7H), 7.77 (t, *J* = 5.2 Hz, 1H), 7.70-7.66 (m, 1H), 7.64-7.60 (m, 1H), 7.60-7.54 (m, 1H), 7.54-7.44 (m, 4H), 7.40-7.24 (m, 4H), 6.90-6.82 (m, 2H), 6.30 (dd, *J* = 10 Hz, 1.2 Hz, 1H), 6.11 (s, 1H), 5.72-5.55 (m, 1H), 5.52-5.48 (m, 1H), 5.16-5.08 (m, 1H), 5.06-5.00 (m, 1H), 4.88-4.80 (m, 1H), 4.80-4.76 (m, 1H), 4.74 (t, *J* = 4.0 Hz, 1H), 4.42-4.33 (m, 1H), 4.26-4.06 (m, 2H), 3.64-3.54 (m, 3H), 3.50-3.40 (m, 12H), 3.12-3.02 (m, 2H), 2.70-2.55 (m, 2H), 2.40-2.20 (m, 4H), 2.12-1.90 (m, 4H), 1.86-1.70 (m, 2H), 1.64-1.54 (m, 4H), 1.49 (s, 4H), 1.46-1.34 (m, 3H), 1.29 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H), 0.90-0.80 (m, 13H) ppm. HPLC *Anal.*: 100%, Tiempo de retención: 8.26 min (método B).

EJEMPLO 48

[718] El ejemplo demuestra un método para hacer el Enlazador–Carga útil (**LP9**). El siguiente ejemplo se refiere a la FIGURA 16.

[719] *N*-(4-{2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*, 12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-Difluoro-11-hidroxi-9,13-dimetil-16-oxo-6-propil-5,7-dioxapenta ciclo[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]icosa-14,17-dien-8-il]-2-oxoetoxi}fenil)carbamato de {4-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-[1-(4-{2-azatriciclo[10.4.0.0^{4,9}]hexadeca-1(12),4(9),5,7,13, 15-hexaen-10-in-2-il}-4-oxobutanamido)-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-amido]-3-metil butanamido]-5-(carbamoilamino)pentanamido]fenil}metilo (**LP9**)

[720] El compuesto (**34i**) como un sólido blanco se preparó de acuerdo con el **Procedimiento general D**.

[721] El compuesto **LP9** (20 mg, rendimiento del 22%) se obtuvo de acuerdo con el **Procedimiento general F**. ESI m/z: 1499 (M + H)$^+$. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO$_{d6}$) δ 10.02 (s, 1H), 9.59 (s, 1H),8.14 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.88 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.80-7.75 (m, 1H), 7.70-

7.66 (m, 1H), 7.65-7.60 (m, 3H), 7.53-7.45 (m, 3H), 7.40-7.28 (m, 7H), 6.84 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 6.30 (dd, *J* = 10.4 Hz, *J* = 1.6 Hz, 1H), 6.11 (s, 1H), 6.10-6.0 (m, 1H), 5.72-5.55 (m,1H), 5.52 (s, 1H), 5.43 (s, 2H), 5.16-5.05 (m, 4H), 4.88-4.70 (m, 3H), 4.43-4.33 (m, 1H), 4.25-4.20 (m, 2H), 3.65-3.55 (m, 3H), 3.50-3.40 (m, 12H), 3.30-3.25 (m, 2H), 3.12-2.90 (m, 4H), 2.70-2.55 (m, 2H), 2.48-2.43 (m, 1H), 2.40-2.35 (m, 1H), 2.30-2.20 (m, 2H), 2.15-1.95 (m, 4H), 1.86-1.75 (m, 2H), 1.64-1.54 (m, 5H), 1.49 (s, 4H), 1.46-1.34 (m, 4H), 1.23 (s, 2H), 0.90-0.80 (m, 12H) ppm. HPLC *Anal.*: 100%, Tiempo de retención: 7.83 min (método B).

EJEMPLO 49

[722] El ejemplo demuestra un método para hacer el Enlazador–Carga útil (**LP10**). El siguiente ejemplo se refiere a la FIGURA 16.

[723] (1*S*,2*S*,4*R*,6*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-8-(2-Aminoacetil)-12,19-difluoro-11-hidroxi-9,13-dimetil-6-propil-5,7-dioxapentaciclo[10.8.0.$0^{2,9}$.$0^{4,8}$.$0^{13,18}$]icosa-14,17-dien-16-ona (**34j**)

[724] El compuesto **34j** (80 mg, rendimiento del 64%) se obtuvo a partir del compuesto **1-19** de acuerdo con el **Procedimiento general D**. ESI m/z: 871 $(M + H)^+$.

***N*-(4-{2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*, 12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-Difluoro-11-hidroxi-9,13-dimetil-16-oxo-6-propil-5,7-dioxapenta ciclo[10.8.0.$0^{2,9}$.$0^{4,8}$.$0^{13,18}$]icosa-14,17-dien-8-il]-2-oxoetoxi}fenil)carbamato de {4-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-[1-(4-{2-azatriciclo[10.4.0.$0^{4,9}$]hexadeca-1(12),4(9),5,7,13, 15-hexaen-10-in-2-il}-4-oxobutanamido)-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-amido]-3-metil butanamido]-5-(carbamoilamino)pentanamido]fenil}metilo (LP10)**

[725] Siguiendo el **Procedimiento general F**, el compuesto (**LP10**) (20 mg, rendimiento del 22%) se obtuvo a partir de la reacción de **34j** (43 mg, 50 µmol) con DIBAC-suc-PEG_4-NHS éster (**VI**), después de la purificación mediante prep-HPLC (método B). ESI m/z: 1406 $(M+H)^+$. ^{1}H NMR ($DMSO_{d6}$, 500 MHz) δ 9.99 (s, 1H), 8.11 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.88 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.80-7.75 (m, 1H), 7.70-7.66 (m, 1H), 7.65-7.60 (m, 3H), 7.53-7.33 (m, 6H), 7.33-7.28 (m, 3H), 6.30 (dd, *J* = 10.0 Hz y 1.5 Hz, 1H), 6.11 (s, 1H), 6.10-6.00 (m, 1H), 5.72-5.55 (m, 2H), 5.41 (s, 2H), 5.05-5.01 (m, 1H), 4.97 (s, 2H), 4.80-4.72 (m, 1H), 4.60-4.58 (m, 1H), 4.43-4.33 (m, 1H), 4.25-4.10 (m, 3H), 3.88-3.80 (m, 1H), 3.65-3.55 (m, 3H), 3.50-3.40 (m, 12H), 3.30-3.25 (m, 2H), 3.12-2.90 (m, 4H), 2.70-2.55 (m, 2H), 2.48-2.35 (m, 2H), 2.30-2.20 (m, 2H), 2.15-1.95 (m, 4H), 1.86-1.65 (m, 3H), 1.64-1.54 (m, 5H), 1.49 (s, 4H), 1.46-1.34 (m, 5H), 0.90-0.80 (m, 12H) ppm. HPLC *Anal.*: 100%, Tiempo de retención: 7.40 min (método B).

EJEMPLO 50

[726] El ejemplo demuestra un método para hacer el Enlazador–Carga útil **LP11**. El siguiente ejemplo se refiere a la FIGURA 16.

***N*-[(4-{2-[(1*S*,2*S*,4*R*,6*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-Difluoro-11-hidroxi-9,13-dimetil-16-oxo-6-propil-5,7-dioxapentaciclo[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]icosa-14,17-dien-8-il]-2-oxoetoxi}fenil)metil]carbamato de {4-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-[1-(4-{2-azatriciclo[10.4.0.0^{4,9}]hexadeca-1(12),4(9),5,7,13,15-hexaen-10-in-2-il}-4-oxobutanamido)-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-amido]-3-metilbutanamido]-5-(carbamoilamino)pentanamido]fenil}metilo (LP11)**

[727] El compuesto **34k** (80 mg, rendimiento del 64%) se obtuvo a partir de (**11-19**) de acuerdo con el **Procedimiento general D**.

[728] Siguiendo el **Procedimiento general C**, el compuesto (**LP11**) (18 mg, rendimiento del 31%) como un sólido blanco se obtuvo a partir de la reacción del compuesto (**34k**). ESI m/z: 756.5 $(M/2 + H)^+$. ^{1}H NMR (500 MHz, $DMSO_{d6}$) δ 10.02 (s, 1H), 8.14 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.88 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.76(t, *J* = 5.5 Hz, 1H), 7.72(t, *J* = 5.5 Hz, 1H), 7.70-7.66 (m, 1H), 7.65-7.60 (m, 3H), 7.53-7.45 (m, 3H), 7.40-7.31 (m, 2H), 7.31-7.25 (m, 4H), 7.20-7.15 (m, 2H), 6.86-6.80 (m, 2H), 6.30 (dd, *J* = 10.4Hz, 1.6 Hz, 1H), 6.11 (s, 1H), 6.10-6.00 (m, 1H), 5.72-5.55 (m, 1H), 5.52 (s, 1H), 5.43 (s, 2H), 5.16-5.10 (m, 1H), 5.06-5.00 (m, 1H), 5.00-4.93 (m, 2H), 4.90-4.76 (m, 2H), 4.75 (t, *J* = 4.0 Hz, 1H), 4.43-4.33 (m, 1H), 4.25-4.20 (m, 2H), 4.12 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.65-3.55 (m, 3H), 3.50-3.40 (m, 12H), 3.30-3.25 (m, 2H), 3.12-2.90 (m, 4H), 2.70-2.55 (m, 2H), 2.48-2.43 (m, 1H), 2.40-2.35 (m, 1H), 2.30-2.20 (m, 2H), 2.15-1.95 (m, 4H), 1.86-1.70 (m, 3H), 1.64-1.54 (m, 5H), 1.49 (s, 4H), 1.46-1.34 (m, 4H), 0.90-0.80 (m, 12H) ppm. HPLC *Anal.*: 99%, Tiempo de retención: 7.89 min (método B).

EJEMPLO 51

[729] El ejemplo demuestra un método para hacer el Enlazador–Carga útil **LP12**. El siguiente ejemplo se refiere a la FIGURA 17.

[730] Acetato de [(2*R*,3*R*,4*S*,5*R*,6*S*)–3,4,5–tris(acetiloxi)–6–[4–formil–3–(prop–2–in–1–iloxi)fenoxi]oxan–2–il]metilo **(45)**

[731] **Etapa 1**: La síntesis de acetato de [(2*R*,3*R*,4*S*,5*R*,6*S*)–3,4,5–tris(acetiloxi)–6–(4–formil–3–hidroxifenoxi)oxan–2–il]metilo (**43**) se reportó en *Carbohydrate Research,* 1986, 146*,* 241–249, cuyo contenido completo se incorpora aquí por referencia en su totalidad. A una solución de compuesto intermedio **43** (2.8 g, 6.0 mmol) en acetona (40 mL) se añadió simultáneamente carbonato de potasio (1.7 g, 12 mmol) y 3-bromoprop-1-ino (**44**, 3.5 g, 30

mmol), y la mezcla resultante se sometió a reflujo durante la noche. La mezcla se concentró luego *in vacuo* y el residuo se purificó mediante cromatografía instantánea (acetato de etilo al 0-33% en éter de petróleo) para producir el compuesto **45** (1.9 g, rendimiento del 63%) como un sólido marrón. ESI m/z: 507 $(M + H)^+$. ^{1}H NMR ($MeOD_{d4}$, 500 MHz) δ 10.26 (s, 1H), 7.78 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 6.87 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 6.77 (dd, J = 8.5, 2.0 Hz, 1H), 5.51 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 5.41 (t, J = 9.5 Hz, 1H), 4.93 (t, J = 2.5 Hz, 2H), 5.23–5.19 (m, 1H), 5.14 (t, J = 9.5 Hz, 1H), 4.34–4.30 (m, 1H), 4.22–4.15 (m, 2H), 3.11 (t, J = 2.0 Hz, 1H), 2.05–1.99 (m, 12H) ppm.

Acetato de [(2*R*,3*R*,4*S*,5*R*,6*S*)–3,4,5–tris(acetiloxi)–6–[4–(hidroximetil)–3–(prop–2–in–1–iloxi)fenoxi]oxan–2–il]metilo **(46)**

[732] **Etapa 2**: A una solución de compuesto **45** (0.83 g, 1.6 mmol) en isopropanol (50 mL) se añadió borohidruro de sodio (31 mg, 0.82 mmol). La mezcla se agitó a 23 ºC durante 2 horas y luego se concentró *in vacuo*. El residuo se diluyó con acetato de etilo y se lavó con salmuera. La solución orgánica se secó sobre sulfato de sodio y se concentró para proporcionar el compuesto **46** (0.70 g, rendimiento del 84%) como aceite marrón. ESI m/z: 526.1 $(M + H_2O)^+$. ^{1}H NMR ($MeOD_{d4}$, 500 MHz) δ 7.32 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 6.78 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 6.67 (dd, J = 8.0, 2.0 Hz, 1H), 5.40 (t, J = 9.0 Hz, 1H), 5.33 (dd, J = 7.5 Hz, 1H), 5.20–5.11 (m, 2H), 4.78 (t, J = 2.5 Hz, 2H), 4.59 (s, 2H), 4.32 (d, J = 12.5, 5.0 Hz, 1H), 4.21 (dd, J = 12.5, 2.5 Hz, 1H), 4.12–4.08 (m, 1H), 3.02 (t, J = 2.0 Hz, 1H), 2.07–2.0

[733] Acetato de [(2*R*,3*R*,4*S*,5*R*,6*S*)–3,4,5–tris(acetiloxi)–6–(4–{[(4–nitrofenoxicarbonil) oxi]metil}–3–(prop–2–in–1–iloxi)fenoxi)oxan–2–il]metilo **(48)**

[734] **Etapa 3**: A una solución de compuesto **46** (0.40 g, 0.79 mmol) en cloruro de metileno (30 mL) se añadió carbonocloridato de 4-nitrofenilo (**47**, 0.24 g, 1.2 mmol), 4-dimetilaminopiridina (0.19 g, 1.6 mmol) y diisopropiletilamina (0.20 g, 1.6 mmol). La mezcla se agitó a 23 ºC durante la noche y se diluyó con cloruro de metileno (50 mL). La solución orgánica se lavó con solución de cloruro de amonio acuoso saturado (50 mL) y luego con salmuera (50 mL), se secó sobre sulfato de sodio y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía instantánea (acetato de etilo al 0–33% en éter de petróleo) para proporcionar el compuesto **48** (0.30 g, rendimiento del 57%) como un sólido blanquecino. ESI m/z: 691.0 $(M + H_2O)^+$. ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ 8.27 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.38 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.35 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 6.75 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 6.64 (dd, J = 9.0, 2.5 Hz, 1H), 5.33–5.26 (m, 4H), 5.21–5.17 (m, 1H), 4.76 (t, J = 2.0 Hz, 2H), 4.28 (dd, J = 12.5, 5.0 Hz, 1H), 4.20 (dd, J = 12.5, 2.5 Hz, 1H), 3.89–3.88 (m, 1H), 2.56 (t, J = 7.0 Hz, 1H), 2.08–

2.04 (m, 12H) ppm.

Acetato de [(2R,3R,4S,5R,6S)–3,4,5–tris(acetiloxi)–6–[4–({[(4–{2–[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12S,13R)–11–hidroxi–9,13–dimetil–16–oxo–6–propil–5,7–dioxapentaciclo[10.8.002,9.04,8.013,18]icosa–14,17–dien–8–il]–2–oxoetoxi}fenil)carbamoil]oxi}metil)–3–(prop–2–in–1–iloxi)fenoxi]oxan–2–il]metilo (49)

[735] **Etapa 4**: A una solución de compuesto **48** (0.15 g, 0.22 mmol) en DMF (5 mL) se añadieron **11-5** (0.14 g, 0.26 mmol), HOBt (59 mg, 0.44 mmol) y diisopropiletilamina (57 mg, 0.44 mmol) sucesivamente. La mezcla se agitó a 23 ºC durante la noche y luego se purificó mediante prep-HPLC (método B) para producir el compuesto **49** (0.14 g, rendimiento del 62%) como un sólido blanco. ESI m/z: 1056.3 (M + H)+. 1H NMR (MeODd4, 400 MHz) δ 7.46 (d, J = 10.4 Hz, 1H), 7.35–7.26 (m, 3H), 6.87–6.80 (m, 3H), 6.67 (dd, J = 8.0, 2.4 Hz, 1H), 6.26 (dt, J = 10.0, 2.4 Hz, 1H), 6.03 (br s, 1H), 5.42–5.34 (m, 2.5H), 5.26–5.03 (m, 5.5H), 4.88–4.64 (m, 4H), 4.46–4.43 (m, 1H), 4.34–4.30 (m, 1H), 4.21–4.18 (m, 1H), 4.12–4.08 (m, 1H), 3.03 (t, J = 2.0 Hz, 1H), 2.71–2.62 (m, 1H), 2.41–2.38 (m, 1H), 2.28–2.15 (m, 2H), 2.06–2.04 (m, 12H), 1.90–1.39 (m, 12H), 1.20–0.89 (m, 8H) ppm.

[736] N–(4–{2–[(1S,2S,4S,8R,9S,11S,12S,13R)–11–Hidroxi–4,9,13–trimetil–16–oxo–6–propil–7–oxapentaciclo[10.8. 002,9.04,8.013,18]icosa–14,17–dien–8–il]–2–oxoetoxi}fenil)carbamato de [2–(prop–2–in–1–iloxi)–4–{[(2S,3R,4S,5S,6R)–3,4,5–trihidroxi–6–(hidroximetil)oxan–2–il]oxi}fenil]metilo **(LP12)**

[737] **Etapa 5**: A una solución de compuesto **49** (35 mg, 33 µmol) en metanol (3 mL) se añadió otra solución de LiOH en H_2O (14 mg, 0.33 mmol) en agua (1 mL). La mezcla se agitó a 23 ºC durante 1.5 horas y se apagó con HOAc (20 mg). La mezcla se concentró *in vacuo* y el residuo se purificó mediante prep-HPLC (método B) para producir el enlazador-carga útil **LP12** (26 mg, rendimiento del 88%) como un sólido blanco. ESI m/z: 888 (M + H)+. 1H NMR (MeODd4, 400 MHz) δ 7.46 (d, J = 10.0 Hz, 1H), 7.35–7.30 (m, 3H), 6.91 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 6.87–6.83 (m, 2H), 6.74 (dd, J = 8.0, 2.0 Hz, 1H), 6.27 (dt, J = 10.0, 2.0 Hz, 1H), 6.03 (s, 1H), 5.25 (t, J = 4.8 Hz, 0.5H), 5.19 (d, J = 7.2 Hz, 0.5H), 5.13–5.03 (m, 3H), 4.94–4.91 (m, 1H), 4.82–4.75 (m, 3H), 4.71–4.67 (m, 1H), 4.46–4.43 (m, 1H), 3.91 (dd, J = 12.0, 2.0 Hz, 1H), 3.70 (dd, J = 12.0, 5.2 Hz, 1H), 3.48–3.36 (m, 4H), 2.99 (t, J = 2.4 Hz, 1H), 2.71–2.62 (m, 1H), 2.40–2.37 (m, 1H), 2.26–2.12 (m, 2H), 2.07–2.00 (m, 1H), 1.88–1.61 (m, 5H), 1.56–1.35 (m, 6H), 1.20–0.92 (m, 8H) ppm.

EJEMPLO 52

[738] El ejemplo demuestra un método para hacer el Enlazador–Carga útil **LP13**. El

siguiente ejemplo se refiere a la FIGURA 18.

N–(2–{[({4–[(2S)–5–(Carbamoilamino)–2–[(2S)–2–[6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)hexanamido]–3–metilbutanamido]pentanamido]fenil}metoxi)carbonil](metil)amino}etil)–N–metilcarbamato de 2–[(1S,2S,4S,8S,9S,11S,12S,13R)–11–hidroxi–9,13–dimetil–16–oxo–6–propil–5,7–dioxapentaciclo[10.8.0.0^{2},^{9}.0^{4,8}.0^{13},^{18}]icosa–14,17–dien–8–il]–2–oxoetilo (LP13)

[739] A una solución de Budesonida-DME carbonato (20 mg, 0.037 mmol) en DMF (1 mL) se agregó posteriormente MC–VC–PAB–PNP (22 mg, 0.03 mmol), DIPEA (12 mg, 0.09 mmol), y HOBt (6 mg, 0.05 mmol). Esta mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 12 horas, luego se realizó prep-HPLC para obtener dos epímeros: Epímero 1: 3.3 mg (rendimiento del 10%) y Epímero 2: 4.1 mg (rendimiento del 12%).

[740] Epímero 1: ESI m/z: 1143.4 (M+1). 1H NMR (400 MHz, MeOD) δ 7.63–7.62 (m, 2H), 7.50–7.49 (m, 1H), 7.37–7.35 (m, 2H), 6.81 (s, 1H), 6.29–6.27 (m, 1H), 6.03 (brs, 1H), 5.37–5.08 (m, 5H), 4.83–4.79 (m, 3H), 4.53–4.46 (m, 2H), 4.18–4.15 (m, 1H), 3.69–3.37 (m, 6H), 3.25–3.13 (m, 3H), 3.12–2.96 (m, 5H), 2.90–2.86 (m, 2H), 2.68–2.64 (m, 1H), 2.41–2.40 (m, 1H), 2.31–2.28 (m, 2H), 2.26–1.95 (m, 7H), 1.93–1.77 (m, 11H), 1.51 (s, 3H), 1.42–1.30 (m, 10H), 1.25–0.89 (m, 15H)

[741] Epímero 2: ESI m/z: 1143.4 (M+1). 1H NMR (400 MHz, MeOD) δ 7.62–7.34 (m, 5H), 6.81 (brs, 1H), 6.29–6.23 (m, 1H), 6.05–6.00 (m, 1H), 5.27–5.17 (m, 4H), 4.92–4.79 (m, 2H), 3.75–3.37 (m, 7H), 3.03–2.86 (m, 5H), 2.72–2.63 (m, 1H), 2.41–2.28 (m, 3H), 2.23–2.04 (m, 7H), 1.91–1.32 (m, 31H), 1.19–0.90 (m, 14H).

EJEMPLO 53

[742] El ejemplo demuestra un método para hacer el Enlazador–Carga útil **LP14**. El siguiente ejemplo se refiere a la FIGURA 18.

[743] *N*-[(1*S*)-1-{[(1*S*)-1-[(4-{2-[(1*S*,2*S*,4*R*,6*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-Difluoro-11-hidroxi-9,13-dimetil-16-oxo-6-propil-5,7-dioxapentaciclo[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]icosa-14,17-dien-8-il]-2-oxoetoxi}fenil)carbamoil]etil]carbamoil}-2-metilpropil]-1-{2-[4-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)fenil]acetamido}-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-amida **(LP14)**

[744] El compuesto **34h-2** (0.18 g, rendimiento del 74% en 2 etapas) se obtuvo de acuerdo con el **Procedimiento general F**. ESI m/z: 728 $(M + H)^{+}$.

[745] El compuesto **LP14** (20 mg, rendimiento del 14% en 3 etapas a partir de **34h**) se obtuvo como un sólido blanco. ESI: 1189 $(M + H)^{+}$. ^{1}H NMR (500 MHz, $DMSO_{d6}$) δ 9.81-

9.67 (m, 1H), 8.43-8.13 (m, 2H), 8.03-7.84 (m, 1H), 7.61-7.47 (m, 2H), 7.35 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.29-7.21 (m, 3H), 7.17 (s, 2H), 6.88-6.81 (m, 2H), 6.33-6.28 (dd, *J* = 10.1, 1.8 Hz, 1H), 6.11 (s, 1H), 5.71-5.56 (m, 1H), 5.51 (s, 1H), 5.12 (d, *J* = 18.5 Hz, 1H), 4.84 (d, *J* = 18.5 Hz, 1H), 4.79-4.76 (m, 1H), 4.74 (t, *J* = 4.3 Hz, 2H), 4.38-4.33 (m, 1H), 4.25-4.17 (m, 2H), 3.63-3.55 (m, 2H), 3.52-3.44 (m, 14H), 3.42 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H), 3.21 (q, *J* = 5.7 Hz, 1H), 2.69-2.55 (m, 1H), 2.47-2.41 (m, 1H), 2.41-2.34 (m, 1H), 2.29-2.23 (m, 1H), 2.14-2.02 (m, 2H), 1.99-1.90 (m, 1H), 1.82 (d, *J* = 13.0 Hz, 1H), 1.65-1.53 (m, 4H), 1.49 (s, 3H), 1.47-1.41 (m, 1H), 1.40-1.33 (m, 2H), 1.29 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H), 0.90-0.80 (m, 12H) ppm. HPLC *Anal.*: 100%, Tiempo de retención: 8.45 min (método A).

[746] La siguiente **Tabla 7** resume ciertas propiedades físicas de LP1–LP16.

Tabla 7: Propiedades físicas de ciertos Enlazador–Cargas útiles

LP No.	MF	MW	Pureza (%)	MS m/z (100%)	m/z más alta	HPLC RT (min)
LP1	$C_{66}H_{81}N_5O_{15}$	1184.4	98	593 (M/2+H)	1185 (M+H, 20%)	6.53 (B)
LP2	$C_{61}H_{86}F_2N6O_{15}$	1181.4	100	1181.4 (M+H)	1181.4 (M+H)	7.83 (B)
LP3	$C_{70}H_{94}F_2N_6O_{17}$	1329.5	100	1330.4 (M+H)	1330.4 (M+H)	7.03 (B)
LP4	$C_{61}H_{86}N_4O_{15}$	1115.4	100	1115 [M+H]	1115 [M+H]	8.17 (A) 8.24 (B)
LP5	$C_{64}H_{92}N_6O_{16}$	1201.5	100	1201 [M+H]	1201 [M+H]	7.34 (A) 7.44 (B)
LP6	$C_{72}H_{99}N_7O_{18}$	1350.6	100	1350.5 (M+H)	1350.5 (M+H)	8.87 (A)
LP7	$C_{61}H_{86}N_4O_{15}$	1226.5	100	1227.8 (M+H)	1227.8 (M+H)	9.47 (A)
LP8	$C_{69}H_{85}F_2N_5O_{15}$	1262.4	100	1262.4 (M+H)	1262.4 (M+H)	8.26 (B)
LP9	$C_{80}H_{98}F_2N_8O_{18}$	1497.7	100	749.5 (M/2+H)	1497.7 (M+H)	7.99 (B)
LP10	$C_{74}H_{94}F_2N_8O_{17}$	1405.6	100	703.5 (M/2+H)	1405.7 (M+H) (5%)	7.40 (B)
LP11	$C_{81}H_{100}F_2N_8O_{18}$	1511.7	99.3	756.5 (M/2+H)	756.5 (M/2+H)	7.89 (B)
LP12	$C_{48}H_{57}NO_{15}$	888.0	100	566.2(M-glucosa-PAB)	889.1 (M+H, 25%)	8.02 (A) 8.08 (B)
LP13	$C_{72}H_{99}N_7O_{18}$	1350.6	100	1350.5 (M+H)	1350.5 (M+H)	8.87 (A)
LP14	$C_{62}H_{79}F_2N_5O_{16}$	1188.31	100	594.8 (M/2+H)	1188.5 (M+H, 40%)	7.99 (B)
LP15	$C_{121}H_{170}N_{10}O_{47}$	2516.71	97	1259 (M/2 +H)	1259.1 $(M/2 + H)^{+}$.	6.62 y 6.67 (B)

LP16	$C_{121}H_{170}N_{10}O_{47}$	2516.71	98	1258 (M/2+H)	1259.1 (M/2+H,60 %)	6.61(59%) y 6.73 (39%) (B)

EJEMPLO 54

[747] Este ejemplo demuestra un método para la conjugación específica al sitio, generalmente, de una carga útil a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo. Este ejemplo se refiere a la FIGURA 19.

[748] En un ejemplo, conjugados específicos al sitio se produjeron a través de conjugación de dos etapas con transglutaminasa microbiana (MTG EC 2.3.2.13, Zedira, Darmstadt, Alemania) (aquí, "basada en MTG") de un anticuerpo mutado N297Q o N297D. En la primera etapa, el anticuerpo mutado se funcionalizó con azido-PEG_3-amina mediante una reacción enzimática basada en MTG. Véase, por ejemplo, la Solicitud de Patente PCT Internacional No. PCT/US17/19537, presentada el 24 de Febrero de 2017, titulada OPTIMIZED TRANSGLUTAMINASE SITE-SPECIFIC ANTIBODY CONJUGATION, incorporada aquí por referencia en su totalidad para todos los propósitos. En la segunda etapa, un enlazador-carga útil funcionalizado con alquino se unió al anticuerpo funcionalizado con azido mediante reacción de cicloadición [2+3] 1, 3–dipolar (véase, por ejemplo, la FIGURA 19, que representa un enlazador-carga útil funcionalizado con DIBAC conjugado con un anticuerpo funcionalizado con azido derivado por medio de ciclización [2+3]). Este proceso proporcionó conjugados estequiométricos y específicos al sitio en aproximadamente 50 a 80% de rendimiento aislado.

EJEMPLO 55

[749] Este Ejemplo demuestra procedimientos específicos para la conjugación específica al sitio de un alquino-enlazador-carga útil al anticuerpo.

[750] Este ejemplo se refiere a los compuestos representados en la FIGURA 29.

[751] En este ejemplo, los conjugados específicos al sitio se produjeron en dos etapas. La primera etapa es la unión enzimática basada en transglutaminasa microbiana (MTG) de una molécula pequeña, tal como azida-PEG_3-amina (supra), al anticuerpo que tiene una etiqueta Q (referencias para la Qetiqueta) (en adelante, conjugación “basada en MTG”). La segunda etapa empleó la unión de un enlazador-carga útil al anticuerpo funcionalizado con azido a través de una cicloadición [2+3], por ejemplo, la cicloadición 1,3-dipolar entre las azidas y los ciclooctinos (también conocida como química clic libre de cobre). Véase, *Baskin, J. M.; Prescher, J. A.; Laughlin, S. T.; Agard, N. J.; Chang, P. V.; Miller, I. A.; Lo, A.; Codelli, J. A.; Bertozzi, C. R. PNAS* ***2007***, *104 (43), 16793–7,* cuyo

contenido completo se incorpora aquí por referencia en su totalidad para todos los propósitos. En la FIGURA 28 se muestra un ejemplo de un enlazador-carga útil que tiene un radical DIBAC conjugado con un anticuerpo funcionalizado con azido mediante una cicloadición [2+3]. Este proceso proporcionó los conjugados estequiométricos y específicos al sitio en aproximadamente 50 a 80% de rendimiento aislado.

[752] Conjugación ADC mediante reacción clic [2+3].

[753] Etapa 1: Preparación de un anticuerpo funcionalizado con azido.

[754] El anticuerpo IgG humano aglicosilado (IgG1, IgG4, etc.) o un isotipo de IgG1 humano con mutación N297Q, en PBS (pH 6.5–8.0) se mezcló con ≥200 equivalentes molares de azido–dPEG$_3$–amina (MW= 218.26 g/mol). La solución resultante se mezcló con MTG (EC 2.3.2.13 de Zedira, Darmstadt, Alemania, o Modernist Pantry [L# 210115A] - ACTIVA TI contiene Maltodextrina de Ajinomoto, Japón) (25 U/mL; 5U MTG por mg de anticuerpo) resultando en una concentración final del anticuerpo en 0.5–5 mg/mL, y la solución se incubó luego a 37 °C durante 4–24 h mientras se agitaba suavemente. La reacción se monitoreó mediante ESI-MS. Al completarse la reacción, el exceso de amina y MTG se removió mediante cromatografía en columna de proteína A o SEC, para generar el anticuerpo funcionalizado con azido. Este producto se caracterizó mediante SDS–PAGE y ESI–MS. La azido–dPEG$_3$–amina agregada a dos sitios del anticuerpo que resulta en un aumento de 204 Da para el conjugado anticuerpo 2DAR–PEG$_3$–azida.

[755] En un experimento específico, el anticuerpo de etiqueta Q N-terminal (24 mg) en 7 mL de amortiguador PBS libre de potasio (pH 7.3) se incubó con > 200 equivalentes molares de la azido-PEG$_3$-amina (MW 218.26) en la presencia de MTG (0.350 mL, 35 U, mTGasa, Zedira, Darmstadt, Alemania). La reacción se incubó a 37 °C durante la noche mientras se mezclaba suavemente. El exceso de azido-PEG$_3$-amina y mTGasa se removió mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC, Superdex 200 PG, GE Healthcare).

[756] **Etapa 2**: Preparación de conjugados específicos al sitio de un fármaco a un anticuerpo utilizando reacciones de química clic.

[757] Los conjugados anticuerpo fármaco específicos al sitio con un IgG humano (IgG1, IgG4, etc.) en la Tabla 10 se prepararon mediante una reacción clic [2+3] entre anticuerpos funcionalizados con azido y un alquino que contenía enlazador-carga útil. A continuación se detalla el procedimiento de conjugación. Un conjugado de anticuerpo específico al sitio con enlazador-carga útil (**LP**) se preparó incubando **mAb–PEG$_3$–N$_3$** (1–3 mg/mL) en un medio acuoso (por ejemplo, PBS, PBS que contenía glicerol al 5%, HBS) con

≥ 6 equivalentes molares de un **LP** disuelto en un solvente orgánico adecuado, tal como DMSO, DMF o DMA (es decir, la mezcla de reacción contiene solvente orgánico al 5-20%, v/v) en 24 °C a 37 °C durante más de 6 h. El progreso de la reacción se monitoreó mediante ESI–MS y la ausencia de **mAb–PEG$_3$–N$_3$** indicó la completación de la conjugación. La cantidad excedente del **LP** y el solvente orgánico se removieron mediante SEC por medio de elución con PBS, o por medio de cromatografía en columna de proteína A por medio de elución con amortiguador ácido seguido por neutralización con Tris (pH 8.0).

[758] En un ejemplo específico, el anticuerpo funcionalizado con azido (1 mg) en 0.800 mL de PBSg (PBS, glicerol al 5%, pH 7.4) se trató con seis equivalentes molares de DIBAC-PEG$_4$-D-Lys (COT-∝-CD)-VC-PABC-carga útil (conc. 10 mg/mL en DMSO) durante 6-12 horas a temperatura ambiente y el exceso del enlazador carga útil (LP) se removió mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC, Superdex 200 HR, GE Healthcare).

[759] El producto final se concentró por ultra centrifugación y se caracterizó mediante UV, SEC, SDS-PAGE y ESI-MS.

EJEMPLO 56

[760] Este ejemplo demuestra un método para hacer un conjugado anticuerpo funcionalizado con azido fármaco.

[761] El anticuerpo aglicosilado con un isotipo IgG1 humano en BupH^{TM} (pH 7.6–7.8) se mezcló con ≥ 200 equivalentes molares de azido–dPEG$_3$–amina (MW. 218.26 g/mol). La solución resultante se mezcló con transglutaminasa (25 U/mL; 5U MTG por mg de anticuerpo, Zedira, Darmstadt, Alemania) resultando en una concentración final del anticuerpo en 0.5–3 mg/mL, y la solución se incubó luego a 37 °C durante 4–24 horas mientras se agitaba suavemente. La reacción se monitoreó mediante SDS–PAGE o ESI–MS. Tras la completación, el exceso de amina y MTG se removió mediante cromatografía de exclusión por tamaño (véase la FIGURA 21) para generar el anticuerpo funcionalizado con azido. Este producto se analizó en SDS–PAGE (véase la FIGURA 20) y ESI–MS (véase la FIGURA 22). La azido–dPEG$_3$–amina agregada a dos sitios –Q295 y Q297– del anticuerpo que resulta en un aumento de 804 Da para el conjugado anticuerpo aglicosilado 4DAR–PEG$_3$–azida. Los sitios de conjugación se identificaron y confirmaron en EEQ^{Enlazador}YQ^{Enlazador}STYR para el anticuerpo funcionalizado con azido 4DAR por medio de mapeo de secuencias de péptidos de cadenas pesadas digeridas con tripsina.

EJEMPLO 57

[762] Este ejemplo demuestra un método para hacer conjugaciones específicas al

sitio de un fármaco a un anticuerpo utilizando reacciones de química clic.

[763] Los conjugados anticuerpo aglicosilado específico al sitio fármaco con un IgG1 humano que contiene una mutación N297Q en la Tabla 8 descrita a continuación se prepararon mediante una reacción clic [2+3] entre anticuerpos funcionalizados con azido con un alquino que contiene un enlazador-carga útil. Como se muestra en la Tabla 8, Anti Her2–PEG_3–N_3 se conjugó a los compuestos **LP1**, **LP2**, **LP3**, **LP4**, **LP5**, **LP6**, **LP7**, **LP8**, **LP9**, **LP10**, y **LP11**. Como se muestra en la Tabla 8, Anti PRLR– PEG_3–N_3 se conjugó a **LP1 LP2**, **LP3**, **LP4**, **LP5**, **LP6**, **LP7**, **LP8**, **LP9**, **LP10**, **LP11, LP15, y LP16**. Como se muestra en la Tabla 8, Anti–IL2Rg–PEG_3–N_3 se conjugó a **LP4** y **LP7**. Como se muestra en la Tabla 8, Anti–Fel d 1–PEG_3–N_3 se conjugó a **LP4**.

[764] Para la conjugación, un anticuerpo IgG1 humano aglicosilado funcionalizado con azido (**mAb–PEG_3–N_3**) y un conjugado enlazador–carga útil (**LP**) se preparó incubando **mAb–PEG_3–N_3** (1–3 mg/mL) en un medio acuoso (por ejemplo, PBS, PBS que contenía glicerol al 5%, HBS) con ≥ 6 equivalentes molares de un **LP** disuelto en un solvente orgánico adecuado, tal como DMSO, DMF o DMA (la mezcla de reacción contiene 10 - 20% de solvente orgánico, v/v) en 24 °C a 37 °C durante más de 6 horas. El progreso de la reacción se monitoreó mediante ESI-MS. La reacción se monitoreó mediante ESI-MS, y la ausencia de **mAb–PEG_3–N_3** indicó la completación de la conjugación. La cantidad excedente del **LP** y el solvente orgánico se removieron mediante SEC eluyendo con PBS. Los conjugados purificados se analizaron mediante SEC, SDS–PAGE, y ESI–MS. En la Tabla 8 se muestra una lista de conjugados esteroide no tóxico anticuerpo (ncADCs) a partir de los LPs correspondientes, sus pesos moleculares y valores ESI-DAR. En la Tabla 8, Ab se refiere a un anticuerpo, Ab-N_3 se refiere al anticuerpo funcionalizado con azida, y ncADC se refiere a un conjugado fármaco anticuerpo no citotóxico.

Tabla 8

	Ab, Ab–N_3, o ncADC	MS m/z (ncADC)	LP #	M.W. (LP)	DAR (ESI–MS)
1	Anti Her2 mAb	145126			
2	Anti Her2–PEG_3–N_3	145930	NH_2–PEG_3–N_3	218.3	4
3	Anti Her2–LP1	150683	LP1	1184.4	4

4	Anti Her2–LP2	150671	LP2	1181.4	4
5	Anti Her2–LP3	151274	LP3	1330.5	4
6	Anti Her2–LP4	150406	LP4	1115.4	4
7	Anti Her2–LP5	150726	LP5	1201.5	4
8	Anti Her2–LP6	151358	LP6	1350.6	4
9	Anti Her2–LP7	151297	LP7	1226.5	4
10	Anti Her2–LP8	152239	LP8	1262.4	4
11	Anti Her2–LP9	151868	LP9	1497.7	4
12	Anti Her2–LP10	152293	LP10	1405.6	4
13	Anti Her2–LP11	145430	LP11	1511.7	4
14	Anti PRLR mAb	144579			
15	Anti PRLR– PEG_3–N_3	145373	NH_2–PEG_3–N_3	218.3	4
16	Anti PRLR–LP1	150110	LP1	1184.4	4
17	Anti PRLR–LP2	150101	LP2	1181.4	4
18	Anti PRLR–LP3	150721	LP3	1330.5	4
19	Anti PRLR–LP4	149836	LP4	1115.4	4
20	Anti PRLR–LP5	150181	LP5	1201.5	4
21	Anti PRLR–LP6	150795	LP6	1350.6	4
22	Anti PRLR–LP7	150311	LP7	1226.5	4
23	Anti PRLR–LP8	150444	LP8	1262.4	4
24	Anti PRLR–LP9	151386	LP9	1497.7	4
25	Anti PRLR–LP10	151015	LP10	1405.6	4
26	Anti PRLR–LP11	151447	LP11	1511.7	4
27	Anti–IL2Rg mAb	144960			
28	Anti–IL2Rg–PEG_3–N_3	145768	NH_2–PEG_3–N_3	218.26	4
29A	Anti–IL2Rg–LP4	150237	LP4	1115.37	4
29B	Anti-IL2Rg-LP7	150670	LP7	1226.5	4
30	Anti–Fel d 1 mAb	145430			
31	Anti–Fel d 1–PEG_3–N_3	146235	NH_2–PEG_3–N_3	218.26	4
32	Anti Fel d 1–LP4	150705	LP4	1115.37	4
33	Anti-PRLR-LP15	155460	LP15	2515.1	4
34	Anti-PRLR-LP16	155486	LP16	2515.1	4

EJEMPLO 58

[765] Este ejemplo demuestra un método para hacer una conjugación no específica al sitio de un fármaco a un anticuerpo utilizando una reacción de tiol-maleimida.

[766] La conjugación a través de cisteínas de anticuerpos se realizó en dos etapas utilizando los métodos descritos similares a aquellos descritos en *Mol Pharm*. Junio de 2015 1;12(6):1863-71.

[767] Un anticuerpo monoclonal (mAb, 10 mg/ml en HEPES 50 mM, NaCl 150 mM) en pH 7.5 se redujo con ditiotreitol 1 mM (0.006 mg por mg de anticuerpo) o TCEP (2.5 equivalentes molares a anticuerpo) a 37 °C durante 30 minutos. Después de la filtración en gel (G-25, acetato de sodio pH 4.5), el compuesto **LP13** en DMSO (10 mg/mL) se añadió al anticuerpo reducido, y la mezcla se ajustó a pH 7.0 con HEPES 1 M (pH 7.4). La reacción se dejó reaccionar durante 3 a 14 horas. El conjugado resultante se purificó mediante SEC. Los valores DAR (UV) se determinaron utilizando las absorbancias medidas del ncADC y los coeficientes de extinción del anticuerpo y **LP13**.

EJEMPLO 59

[768] Este ejemplo demuestra métodos para caracterizar anticuerpo y conjugados anticuerpo no citotóxico fármaco (ncADC).

[769] El anticuerpo y ncADC se caracterizaron mediante SDS–PAGE, SEC, y MS (ESI). El conjugado anti–PRLR–LP4 en la Tabla 8 generado a partir del anticuerpo anti-PRLR por medio de su anticuerpo funcionalizado con azido (anti–PRLR–PEG_3–N_3) se caracterizó mediante SDS-PAGE realizada bajo condiciones de reducción y no reducción (FIGURA 20), SEC (FIGURA 21) y ESI-MS (FIGURA 22), y demostró la completación de la formación de ncADC.

[770] La SDS–PAGE se utilizó para analizar la integridad y la pureza de los ADCs.

[771] En un método, las condiciones de ejecución de SDS–PAGE incluyeron muestras no reducidas y reducidas (2–4 µg) junto con escalera de proteína pre-teñida de punto de referencia (Invitrogen, cat# 10748–010; L# 1671922.) se cargaron por carril en (1.0 mm x 10 pozo) Novex 4 – 20% Tris–Glicina Gel y se corrió a 180 V, 300 mA, durante 80 minutos. Una muestra analítica se preparó utilizando amortiguador Glicina SDS-Novex Tris (2X) (Invitrogen, Cat# LC2676) y la muestra de reducción se preparó con amortiguador de muestra SDS (2X) que contenía 2-mecaptoetanol al 10%.

[772] En la FIGURA 20 se muestran los pesos moleculares de los anticuerpos y ncADCs en la SDS–PAGE realizada bajo condiciones de reducción y no reducción. Los cambios de masa no fueron evidentes bajo condiciones de no reducción debido a los porcentajes relativamente pequeños de los cambios de masa. Sin embargo, las masas de las cadenas pesadas se incrementaron de los anticuerpos desnudos a los anticuerpos

funcionalizados con azido, y adicionalmente al conjugado ncADC. No había material reticulado detectable.

[773] Como se muestra en la FIGURA 20, los carriles de SDS–PAGE incluyeron las siguientes especies con base en las siguientes etiquetas de carril en la Tabla 9.

Tabla 9

Carril	Muestra
1	Estándares (Punto de referencia 10 µL)
2	**anticuerpo anti–PRLR**
3	**anticuerpo anti–PRLR**–NH–PEG_3–N_3
4	**anticuerpo anti–PRLR**–LP4
8	**anticuerpo anti–PRLR** (reducido)
9	**anticuerpo anti–PRLR** NH–PEG_3–N_3 (reducido)
10	**anticuerpo anti–PRLR**–LP4 (reducido)
~ 2 µg de muestra/carril **no–reducida/reducida**.	

[774] Los ADC se analizaron para determinar la pureza mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC)

[775] Para determinar la pureza de los conjugados anticuerpo fármaco, se realizó la cromatografía de exclusión por tamaño. Los experimentos de SEC analíticos se realizaron utilizando un instrumento Waters 600, en una columna Superdex 200 (1.0 x 30 cm) HR, en una tasa de flujo de 0.80 mL/min utilizando PBS pH 7.4, y se monitorizaron a λ280 nm utilizando un PDA Waters 2998. Una muestra analítica estaba compuesta de 200 µL de PBS (pH 7.4) con 30–100 µL de muestra de prueba. Las purificaciones de SEC preparativa se realizaron utilizando un instrumento AKTA de GE Healthcare, en columna Superdex 200 PG (2.6x60 cm), en una tasa de flujo de 2 mL/min eluyendo con PBSg en pH 7.4, y se monitorearon a λ280 nm. Los resultados de la SEC en la FIGURA 21 indicaron el tiempo de retención típico para mAb monomérico y sus conjugados y no hubo agregación o degradación detectable.

[776] El anticuerpo y ADC se analizaron mediante análisis de masa intacta mediante LC–ESI–MS.

[777] La medición de la masa de intacta de las muestras de ncADC mediante LC–ESI–MS se realizó para determinar el perfil de distribución del fármaco-carga útil y para

calcular el DAR promedio de las formas de ADC intactas. Cada muestra de prueba (20–50 ng, 5 uL) se cargó en una columna Acquity UPLC Protein BEH C4 (10K psi, 300 Å, 1.7 µm, 75µm × 100 mm; No. de cat. 186003810). Después de 3 minutos de desalinización, la proteína se eluyó y los espectros de masas se adquirieron mediante un espectrómetro de masas Waters Synapt G2-Si (Waters).

[778] Como se muestra en la FIGURA 22, los espectros de masas desconvolucionados mostraron un pico predominante para el anticuerpo anti-PRLR aglicosilado con peso molecular de 144579.0 Da, y un pico predominante para su anticuerpo anti-PRLR funcionalizado con azido con peso molecular de 145373.0 Da, indicando un aumento de 794.0 Da en comparación con su anticuerpo precursor aglicosilado (correspondiente a la conjugación de 4 amino-PEG_3-azida a cada anticuerpo aglicosilado). Además, el pico predominante para el conjugado anti-PRLR-LP4 tuvo un peso molecular de 149836.0 Da, indicando un aumento de 4463 Da en comparación con su anticuerpo precursor aglicosilado (correspondiente a la conjugación de 4 LP4 a cada anticuerpo aglicosilado). Como se resume en la Tabla 8, la mayoría de los ADCs específicos al sitio en este documento tienen 4DAR.

[779] Para los conjugados anticuerpo no específico al sitio fármaco, los valores DAR se determinaron con base en el análisis de masas ESI Q-TOF. Los espectros de masas ESI Q-TOF se desconvolucionaron a espectros de masas de carga cero utilizando un algoritmo de entropía máxima (MassLynx). Los espectros de masas resultantes demostraron la distribución de cada anticuerpo conjugado con fármaco(s). El porcentaje de área de un pico representa la distribución relativa de la especie de anticuerpo cargado con fármaco particular. El DAR promedio se calculó utilizando la información de área de pico porcentual y los números de carga de fármaco en el anticuerpo.

EJEMPLO 60

[780] Este ejemplo demuestra, utilizando el ensayo de unión competitiva a GR LanthaScreen TR–FRET, que los esteroides de carga útil aquí establecidos se unen al receptor de glucocorticoides (GR).

[781] Para evaluar la capacidad de los nuevos esteroides para unirse al receptor de glucocorticoides (GR), se realizó un ensayo de unión libre de células utilizando un kit de ensayo de unión competitiva a GR LanthaScreen TR–FRET (Life Technologies, Cat# A15901). El ensayo se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La budesonida es un esteroide de GR comercial y se utilizó como control de referencia en el

ensayo de unión y otros ensayos basados en células descritos más adelante en el documento. En resumen, una dilución serial de tres veces de budesonida y los compuestos derivados indicados a continuación se prepararon en DMSO al 100% iniciando en 100 nM (100X de final). Las diluciones seriales se diluyeron adicionalmente 50 veces en amortiguador F de receptor nuclear con DTT 5 mM y péptido estabilizante 0.1 mM, y se transfirieron a una placa de ensayo de 384 pozos. Luego, Fluormona GS1 Verde, GR–LBD (GST) y anticuerpo anti–GST Tb se añadieron secuencialmente a la placa de ensayo de 384 pozos. La placa se incubó luego a temperatura ambiente durante 2.5 horas mientras estaba protegida de la luz. La placa se analizó en un lector de placas multietiqueta Envision (PerkinElmer) con excitación establecida a 340 nm y filtros de emisión en 520 nm y 486 nm. La relación FRET se calculó como 520 nm/486 nm. Los valores de IC_{50} se determinaron utilizando una ecuación logística de cuatro parámetros sobre una curva de respuesta de 12 puntos (Prism de GraphPad).

[782] Como se muestra en la Tabla 10, la Budesonida compitió en la unión de Fluormona GS1 Verde en el ensayo de GR con un valor de IC_{50} entre 10 y 100 nM. Los *N*-análogos de Budesonida similarmente compitieron en la unión con valores de IC_{50} que van desde menos de 10 nM hasta más de 100 nM. Los nuevos esteroides aquí probados demostraron ser comparables o mejores (valores más bajos de IC_{50}) en este ensayo y un desplazamiento similar para el ligando de GR en comparación con la Budesonida. Los isómeros 22R en general son más potentes que los isómeros 22S o al menos idénticos a los isómeros 22S.

Tabla 10: Unión libre de células y actividad funcional basada en células

	Números de los compuestos	**Células altas HEK293/9xUAS-Luc2P/pBind-GR/PRLR-HA EC_{50} (nM)**		**Ensayo de unión competitiva de GR IC50 (nM)**
1	Budesonida	+++	Activación completa	++
2	Diflorasona	+++	Activación completa	++
3	7-1 S	+	Activación parcial	+++
4	7-1 R	+++	Activación completa	++
5	7-2S/R	+++	Sin activación	+++
6	7-4 S/R	+	Sin activación	+++
7	8-1 R	++	activación completa	NT
8	8-2 S/R	+	Sin activación	+++

9	8-3 S/R	+	Sin activación	+++
10	11-1 S/R	+++	Activación completa	++
11	11-2 S/R	+	Activación completa	++
12	11-3 S/R	++	Activación parcial	+++
13	11-5 S/R	+++	Activación completa	++
14	11-5 S	+++	Activación completa	++
15	11-5 R	+++	Activación completa	++
16	11-6 S	+++	Activación completa	++
17	11-6 S/R	++	Activación completa	++
18	11-7 R	++	Activación completa	++
19	11-8 R	+++	Activación completa	++
20	11-10 S/R	+	Sin activación	+++
21	11-11 S/R	+	Sin activación	+++
22	11-12 S/R	+++	Activación completa	++
23	11-13 R	+++	Activación completa	+++
24	11-14 S/R	+++	Activación completa	+++
25	11-15 S/R	++	Activación parcial	+++
26	11-17 S/R	++	Activación completa	+++
28	11-19 S/R	+++	Activación completa	+++
29	11-20 S/R	+	sin activación	+++
30	11-21 S/R	++	Activación parcial	+++
31	14-2	+	Sin activación	+++
32	15-5	++	Activación completa	++
33	16-5	++	Activación completa	++

+++: ≤ 10 nM; ++: ≤100 nM> 10 nM; +: > 100 nM; NT: No probado.

Activación completa: > 75% de la activación de doblez inducida por la Budesonida. Activación parcial: (20%, 75%) de la activación de doblez inducida por la Budesonida. Sin activación: <20% de la activación de doblez inducida por la Budesonida. El ensayo libre de células se utiliza para evaluar la unión directa de los compuestos al GR LBD recombinante independientemente de su permeabilidad. El ensayo basado en células se utiliza para medir cómo los compuestos activan la transcripción mediada por GR intracelular después de pasar a través de la membrana plasmática, de esta manera la permeabilidad de membrana

del compuesto es un prerequisito para la actividad.

EJEMPLO 61

[783] Este ejemplo demuestra que el PRLR–ncADC está internalizado en las células HEK293/PRLR.

[784] La internalización de un anticuerpo anti-PRLR y un anticuerpo de control de isotipo se evaluaron en células HEK293 diseñadas para expresar PRLR humano de longitud completa (aminoácidos 1 a 622 del número de acceso NP_000940.1 con una mutación K2E; HEK293/PRLR). Las células precursores HEK293 también se evaluaron como control negativo. Las células se colocaron en placas en 20,000 células/pozo en medio completo y se incubaron durante la noche a 37 ºC. Al día siguiente, los pozos se lavaron con PBS, y se colocaron en hielo. Diluciones seriales de anticuerpo de 0.1–100 nM se añadieron a los pozos apropiados en FBS al 2% en PBS y se incubaron en hielo durante 30 minutos. Las células se lavaron dos veces con PBS, y luego se incubaron en hielo durante 30 minutos con anti–hIgG de cabra de fragmento Fab conjugado con Alexa 488 (Jackson Immunoresearch, Cat # 109–547–003). Las células se lavaron dos veces con PBS y luego ya sea se fijaron en formaldehído al 3.7% en PBS (condición de control de 4 °C) o se incubaron a 37 °C durante 3 horas para permitir la internalización. Después de la incubación de 3 horas, las células se fijaron en formaldehído al 3.7% en PBS durante 15 minutos, se lavaron con PBS, y se les tomaron imágenes en un ImagExpress MicroXL de Molecular Devices.

[785] El anti–PRLR–ncADC y el anticuerpo PRLR precursor se internalizaron en las células HEK293/PRLR, mientras que el ncADC de control de isotipo y el anticuerpo precursor de control de isotipo no se internalizaron ya que no se unen a una proteína encontrada en las líneas celulares probadas. No se observó ninguna internalización en las células precursoras HEK293 para ninguna de las muestras probadas.

EJEMPLO 62

[786] Los bioensayos aquí descritos se utilizaron para evaluar la eficacia de los esteroides libres y anti–PRLR–ncADCs. En un ejemplo, el bioensayo evaluó la actividad de los esteroides, después de la internalización de un ADC anti–PRLR específico al sitio–esteroide de GC en las células, para unirse a pBIND-GR y la posterior activación del reportero de luciferasa. Para este ensayo, se diseñó una línea celular 293 para expresar PRLR de longitud completa humano. Luego, tal línea celular estable se transfectó adicionalmente con un receptor quimérico que consistía en un dominio de unión a ligando

de GR fusionado al dominio de unión a Gal4 DNA de levadura (pBind-GR, Promega Cat# E1581), y una secuencia activadora ascendente de Gal4 (9xGal4UAS-Luc2P) que acciona la expresión del gen de luciferasa. Tal formato de ensayo ofrece alta sensibilidad y baja reactividad cruzada con otros receptores nucleares. Debido a que los dos vectores juntos como un todo se utilizan para monitorear la unión a ligando de GR y la transactivación, la línea celular estable resultante se refiere aquí como 293/PRLR/GRE–Luc por simplicidad (véase Ensayos de reportero de luciferasa dual mejorados para receptores nucleares, *Current Chem Genomics*, 2010; 4: 43-49; Aileen Paguio, Pete Stecha, Keith V Wood, y Frank Fan).

[787] En un segundo ejemplo, un bioensayo evaluó tanto la eficacia de los esteroides libres como cualquier actividad no específica por anti–PRLR–ncADCs. Para este ensayo, una línea celular 293 se transfectó con el vector pGL4.36[Luc2P/MMTV/Hygro] (Cat# E1360, Promega). La línea celular resultante se refiere aquí como 293/MMTV–Luc.

EJEMPLO 63

[788] Un ensayo basado en células de reportero de luciferasa co-activador del receptor de glucocorticoides (GR) se utilizó para analizar la activación de GR por Budesonida y los esteroides descritos aquí como una función del tiempo.

[789] La actividad de los esteroides en las células 293/PRLR/GRE–Luc se estudió a las 72 horas de incubación. Para este ensayo, se sembraron 20,000 células en placas de 96 pozos en medios que contenían DMEM suplementado con FBS al 10% y pencilina/estreptomicina (medios completos) y se cultivaron durante la noche a 37 °C en CO_2 al 5%. Para las curvas de respuesta a la dosis de ncADC o fármaco libre, reactivos serialmente diluidos que variaban de 100 nM a 5.1 pM se añadieron a las células y se incubaron durante 72 horas a 37 °C. La actividad de la luciferasa se determinó mediante la adición del reactivo One-Glo™ (Promega, Cat#E6130) y las unidades relativas de luz (RLUs) se midieron en un luminómetro Victor (Perkin Elmer). Los valores de EC_{50} se determinaron a partir de una ecuación logística de cuatro parámetros sobre una curva de respuesta de 10 puntos utilizando Prism de GraphPad. La entrega de los esteroides dará como resultado una activación del reportero de Luc en las células 293/PRLR/GRE–Luc.

[790] Como se muestra en la Tabla 11, en el punto de tiempo de 72 horas, La **Budesonida** activó las células 293/PRLR/GRE-Luc con un valor de IC_{50} entre 10 a 100 nM. Los *N*-análogos de Budesonida activaron las células 293/PRLR/GRE-Luc con activación de doblez similar y valores de IC_{50} que variaban desde menos de 10 nM hasta más de 100 nM.

EJEMPLO 64

[791] Activación de GR selectiva mediante ADCs en líneas celulares que se tienen como objetivo

[792] La actividad de los esteroides y los ncADCs de esteroides, después de la internalización en la línea celular 293/PRLR/GRE-Luc así como en las células 293/MMTV-Luc, que no expresan PRLR como se describe en el Ejemplo 61, y las células 293/PRLR, que no expresan el reportero de luciferasa descrito en el Ejemplo 62, se estudiaron en concentraciones 100 nM a 5.1 pM utilizando los procedimientos de ensayo esbozados en el Ejemplo 63 a las 72 horas de incubación.

[793] El conjugado PRLR-**LP4** (en la Tabla 8) y su conjugado de control de isotipo, así como las cargas útiles libres y los anticuerpos no conjugados se estudiaron en dos tipos de líneas celulares. El conjugado PRLR–**LP4** (Anti PRLR–**LP4** en la Tabla 8) demostró activación selectiva de la línea celular 293/PRLR/GRE–Luc (FIGURA 23A), y ninguna activación de GR (FIGURA 23B) en las células 293/MMTV–Luc, que no expresan PRLR.

[794] Como se muestra en la FIGURA 23A, en las células 293/PRLR/GRE-Luc, el anticuerpo anti-PRLR conjugado específicamente al sitio con **LP4** (Anti PRLR–**LP4** en la Tabla 8) indujo una activación de GRE-Luc completa con un valor de EC_{50} < 10 nM. El anticuerpo de control de isotipo conjugado con **LP4** (Anti Her2–**LP4** en la Tabla 8) no indujo activación de GRE–Luc significativa. El anticuerpo de control de isotipo no conjugado no indujo activación de GRE-Luc significativa. La carga útil libre **11-5** en la Tabla 1 (carga útil de LP4) indujo una activación de GRE-Luc completa con una EC_{50} < 10 nM. El control de referencia, **Budesonida**, indujo una activación de GRE–Luc completa con una EC_{50} < 10 nM. Como se muestra en la FIGURA 23B, en células 293/MMTV–Luc, solo la carga útil libre **11-5** en la Tabla 1 (carga útil de LP4) y el control de referencia, **Budesonida**, indujeron activación de GRE–Luc: **11-5** en la Tabla 1 (carga útil de LP4) indujo una activación de GRE–Luc completa con un valor de EC_{50} entre 10 a 100 nM, y la **Budesonida** indujo una activación de GRE–Luc completa con un valor de EC_{50} entre 10 a 100 nM.

[795] Los Ejemplos aquí demuestran que Anti PRLR-LP4 en la Tabla 8 activa específicamente células 293/PRLR/GRE-Luc que expresan tanto el PRLR objetivo como el reportero de luciferasa de GRE inducido por esteroides, pero no tiene efecto sobre la línea celular 293-MMTV-Luc sensible a esteroides o línea celular 293–PRLR de expresión objetivo.

EJEMPLO 65

[796] En este ejemplo, se examinó la contribución del enlazador y la carga útil a la activación de GR de los ncADCs.

[797] La actividad de los esteroides libres y sus ncADCs correspondientes después de la internalización en la línea celular 293/PRLR/GRE-Luc se estudiaron en concentraciones de 100 nM a 5.1 pM utilizando los procedimientos de ensayo esbozados en el Ejemplo 63 a las 72 horas de incubación.

[798] Como se muestra en la Tabla 11 y también se muestra en la FIGURA 24, en las células 293/PRLR/GRE-Luc, el anticuerpo anti-PRLR conjugado específicamente al sitio con **LP4** (Anti PRLR-LP4 en la Tabla 8) indujo una activación de GRE-Luc completa con una EC_{50} < 10 nM a las 72 horas. El anticuerpo de control de isotipo conjugado con **LP4** (Anti Her2-LP4 en la Tabla 8) no indujo activación de GRE-Luc significativa. La carga útil libre, **11-5** en la Tabla 1 (carga útil de LP4), indujo una activación de GRE-Luc completa con una EC_{50} < 10 nM.

[799] El anticuerpo anti-PRLR conjugado específicamente al sitio con **LP2** (Anti PRLR-LP2 en la Tabla 8) indujo una activación de GRE-Luc completa con una EC_{50} < 10 nM. El anticuerpo de control de isotipo conjugado con **LP2** (Anti Her2-LP2 en la Tabla 8) no indujo activación de GRE-Luc significativa. La carga útil libre **16-5** en la Tabla 1 (carga útil de LP2) indujo una activación de GRE–Luc completa con una EC_{50} < 10 nM. Finalmente, el anticuerpo anti-PRLR conjugado específicamente al sitio con **LP1** (Anti PRLR-LP1 en la Tabla 8) indujo una activación de GRE-Luc completa con una EC_{50} entre 10-100 nM. El anticuerpo de control de isotipo conjugado con **LP1** (Anti Her2-LP1 en la Tabla 8) no indujo activación de GRE-Luc significativa. La carga útil libre **7-1*R*** en la Tabla 1 (carga útil de LP1) indujo una activación de GRE-Luc completa con una EC_{50} entre 10-00 nM.

[800] Este ejemplo demuestra que con el mismo anticuerpo y enlazador, la potencia de la carga útil **11-5** en la Tabla 1 (carga útil de LP4) es mayor que la carga útil **16-5** en la Tabla 1 (carga útil de LP2) que es mayor que **7-1*R*** en la Tabla 1 (carga útil de LP1). El Anti PRLR-LP4 en la Tabla 8 tuvo una potencia más alta que el Anti PRLR-LP2 en la Tabla 8, que tuvo una potencia más alta que Anti PRLR-LP1 en la Tabla 8.

Tabla 11: Contribución del enlazador–carga útil en la activación de GR de ncADC de esteroides según se ensaya en células 293/PRLR/GRE–Luc

Muestra ensayada	Activación de doblez	EC_{50} (nM)

Anti PRLR–LP1	Completa	++
Anti PRLR–LP2	Completa	+++
Anti PRLR–LP4	Completa	+++
Anti Her2–LP1	NA	NA
Anti Her2–LP2	NA	NA
Anti Her2–LP4	NA	NA
7-2 (carga útil de LP1)	Completa	++
16-5 (carga útil de LP2)	Completa	+++
11-5 (carga útil de LP4)	Completa	+++
Budesonida	Completa	+++

NA= no aplicable; +++: ≤ 10 nM; ++: 10 – 100 nM, +: > 100 nM.

EJEMPLO 66

[801] Bioensayo de IL2Rγ–ncADC con células HEK293/MMTV–luc/IL2Rγ/IL7R.

[802] La cadena γ del receptor de citocina común, también conocida como IL2Rγ y CD132, es un receptor de citocina de tipo I que es común para las trayectorias de señalización para la interleucina–2 (IL–2), IL–4, IL–7, IL–9, IL–15, e IL–21 y desempeña un papel importante en la formación y regulación de los sistemas inmunes (Rochman et al. 2009). La IL2Rγ se expresa principalmente en células inmunitarias y, por consiguiente, puede ser un objetivo útil para entregar fármacos inmunosupresores tales como los esteroides por medio del conjugado anticuerpo no citotóxico-fármaco (ncADC) y suprimir la actividad de las células inmunitarias, al tiempo que evitan los efectos secundarios fuera de objetivo asociados con la administración sistémica de esteroides.

[803] El ensayo basado en células aquí descrito se utilizó para detectar la activación transcripcional del receptor de glucocorticoides (GR) mediante ncADC con la región de repetición de terminal larga del virus de tumor mamario murino (MMTV LTR) que se ha utilizado para estudiar la activación de GR (Deroo et al. al. 2001). La línea celular HEK293 se generó primero para expresar de manera estable un reportero de luciferasa pGL4.36[*luc2P*/MMTV/Hygro] (Promega, # E136A), referido aquí como HEK293/MMTV–luc, y se mantuvo en DMEM que contenía FBS al 10%, NEAA, penicilina/estreptomicina/L-glutamina, y 100 µg/mL de higromicina (medios completos). La línea celular estable de HEK293/MMTV–luc precursora se transfectó luego con un plásmido que codifica la IL2Rγ humana de longitud completa (que expresa los aminoácidos 1 a 369 del número de acceso NP_000197.1) y se transdujo con un plásmido que codifica la IL7Rα de longitud completa (que expresa los aminoácidos 1 a 459 del número de acceso NP_002176.2) y se clasificó

para la alta expresión de IL2Rγ e IL7Rα mediante citometría de flujo. La línea celular resultante referida aquí como, HEK293/MMTV–luc/IL–2Rγ/IL7R, se mantuvo en medios completos suplementados con 1 µg/mL de puromicina, y 500 µg/mL de sulfato de G418.

[804] Para el bioensayo, se sembraron células HEK293/MMTV–luc o HEK293/MMTV–luc/IL2Rγ/IL7R en placas de ensayo de 96 pozos en 10,000 células/pozo en medios completos y se incubaron a 37 ºC en CO2 al 5% durante la noche. A la mañana siguiente, para ensayar la activación de GR, la budesonida, el compuesto **11-5** en la Tabla 1 (carga útil de LP4) y el compuesto **16-5** en la Tabla 1 (carga útil de LP2), el conjugado anti–IL2Rg–LP4 (en la Tabla 8), el anticuerpo de control (control de isotipo en la Tabla 8) y los anticuerpos desnudos se diluyeron serialmente en 1:3 desde 200nM–1µM hasta 0.002–0.01n, y se añadieron a las células. Las concentraciones se ajustaron de acuerdo con la relación de fármaco a anticuerpo para los ncADCs y otras técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Un pozo sin ningún artículo de prueba también se incluyó como un control.

[805] La actividad de la luciferasa se midió después de 6, 24, 48, y 72 horas de incubación en 37 °C en CO2 al 5% en un instrumento Victor X (Perkin Elmer). Los resultados se analizaron utilizando regresión no lineal (logística de 4 parámetros) con el software Prism 6 (GraphPad) para producir valores de EC_{50}. La activación de doblez se calculó determinando la relación de la actividad de la luciferasa de cada muestra a aquella observada sin ningún artículo de prueba añadido.

[806] Como se muestra en la Tabla 12, después de 6, 24 y 48 horas de incubación, la budesonida demostró la activación de GR más alta con activaciones completas; **16-5** en la Tabla 1 (carga útil de LP2) y **11-5** en la Tabla 1 (carga útil de LP4) mostraron activación parcial. En tiempos de incubación más largos de 72 horas, **16-5** en la Tabla 1 (carga útil de LP2) y **11-5** en la Tabla 1 (carga útil de LP4) mostraron similar nivel de activación de GR a Budesonida con activaciones completas. Estos resultados demuestran que la Budesonida, **16-5** (carga útil de LP2) y **11-5** (carga útil de LP4) en la Tabla 1 activan el GR con EC_{50}s entre 10-100 nM.

Tabla 12: Activación del receptor de glucocorticoides en células HEK293/MMTV–luc/IL–2Rγ/IL7R mediante budesonida, 11-5 en la Tabla 1 o 16-5 en la Tabla 1 a las 6, 24, 48 o 72 horas

Puntos de tiempo	**6 horas**		**24 horas**		**48 horas**		**72 horas**	
Fármaco	Activación de doblez	EC_{50} [nM]	Activación de doblez	EC_{50} [nM]	Activación de doblez	EC_{50} [nM]	Activación de doblez	EC_{50} [nM]
Budesonida	Activación completa	++	Activación completa	++	Activación completa	++	Activación completa	++
Compuesto **11-5** en la Tabla 1	Activación parcial	+	Activación parcial	+	Activación parcial	++	Activación completa	++
Compuesto **16-5 en** la Tabla 1	Activación parcial	+	Activación parcial	+	Activación parcial	++	Activación completa	++

+++: ≤ 10 nM; ++: 10 – 100 nM, +: > 100 nM.

[807] La budesonida, el enlazador-carga útil **LP4** (carga útil **11-5**) y el enlazador-carga útil **LP7** (carga útil ***R*-11-5**), la anti-IL2Rγ, anti-IL2Rγ mAbs-ncADCs con **LP4** y **LP7** (referidos como anti-IL2Rγ-LP4 y anti-IL2Rγ-LP7), así como un Control mAb-**LP7** y el anti-IL2Rγ mAb no conjugado se añadieron a ya sea células HEK293/MMTV-Luc/IL2Rγ/IL7R y se incubaron durante 24 horas (FIGURA 25A), durante 48 horas (FIGURA 25B), durante 72 horas (FIGURA 25C) o células HEK293/MMTV-Luc durante 72 horas (FIGURA 25D) con concentración máxima en 200 nM (RLU, unidad relativa de luz) en las FIGURAS 25A a 25D y la Tabla 13.

[808] Como se muestra en la Tabla 13 y las FIGURAS 25A a 25D, después de 24 horas de incubación, la budesonida mostró la activación de doblez máxima en las células HEK293/MMTV-Luc/IL2Rγ/IL7R, y **11-5** y ***R*-11-5** mostraron niveles relativamente más bajos de activación en comparación con la budesonida (FIGURA 25A). Con tiempos de incubación más largos de 48 y 72 horas, **11-5** y ***R*-11-5** mostraron similar nivel de activación a budesonida (FIGURA 25B y FIGURA 25C).

[809] El anti-IL2Rγ-LP4 y el anti-IL2Rγ-LP7 mostraron poca a ninguna activación en las células HEK293/MMTV-Luc/IL2Rγ/IL7R después de 24 horas de incubación (FIGURA 25A), pero mostraron mayores niveles de activación con un periodo de incubación más largo de 48 horas y 72 horas (FIGURAS 25B y 25C). Los anti-IL2Rγ-ncADCs, anti-IL2Rγ-LP4 y anti-IL2Rγ-LP7, no demostraron ninguna activación en las células HEK293/MMTV-Luc (FIGURA 25D) indicando que la entrega de ncADC de los esteroides es dependiente de la unión al antígeno de IL2Rγ en la superficie celular y la posterior internalización. En contraste, el anticuerpo anti-IL2Rγ no conjugado, los anticuerpos de control de isotipo conjugados y no conjugados no mostraron ninguna activación significativa en ninguna

condición. La budesonida, **11-5** y ***R*-11-5** mostraron activación en HEK293/MMTV-Luc a las 72 horas de incubación, indicando la activación de GR mediante los fármacos libres (FIGURA 25D).

[810] **Tabla 13: Activación del receptor de glucocorticoides en HEK293/MMTV-Luc/IL-2Rγ/IL7R mediante cargas útiles de esteroides y ADCs anti-IL2Rγ-esteroides y ADC de control**

Tratamiento	Activación de doblez máx.		
	a las 24 horas	a las 48 horas	a las 72 horas
Anti-IL2Rγ-LP4	**NA**	**+**	**++**
Anti-IL2Rγ-LP7	**NA**	**+**	**++**
Caga útil LP4 (11-5)	**+**	**++**	**+++**
Caga útil LP7 (*R*-11-5)	**+**	**++**	**+++**
Budesonida	**+++**	**+++**	**+++**
Ab-LP7 de control	**NA**	**NA**	**NA**

+++: ≤ 10 nM; ++: 10 – 100 nM; +: > 100 nM.

EJEMPLO 67

[811] Este Ejemplo muestra la bioactividad de los ADCs citotóxicos con y sin enlazadores de ciclodextrina (FIGURA 30).

[812] Para evaluar la comparabilidad de los ADCs con y sin CDs que contienen cargas útiles citotóxicas, se realizó un ensayo de citotoxicidad utilizando células SKBR3. Las células SKBR3 han sido comúnmente utilizadas para evaluar la actividad del ADC anti-Her2. Un ADC anti-PRLR ha sido utilizado como un ADC mAb de control en el ensayo de citotoxicidad de SKBR3. Para el ensayo, se evaluó la citotoxicidad *in vitro* de los ADCs anti-PRLR utilizando el kit de ensayo CellTiter-Glo (Promega, Cat# G7573), en el que la cantidad de ATP presente se utiliza para determinar el número de células viables en el cultivo. Para el ensayo, se sembraron células SKBR3 en 6000 células/pozo en placas de 96 pozos blancas Nunclon en medio de crecimiento completo y se cultivaron durante la noche a 37 ºC en CO2 al 5%. Para las curvas de viabilidad celular, ADCs serialmente diluidos 1:4 o carga útil libre se añadieron a las células en concentraciones comenzando en 100 nM incluyendo un control sin tratamiento, y luego se incubaron durante 5 días. Después de la incubación de 5 días, las células se incubaron a temperatura ambiente con 100 µL de reactivos CellTiter-Glo durante 5 minutos. Las unidades de luminiscencia relativa (RLU) se determinaron en un lector de placas Victor (PerkinElmer). Los valores de IC_{50} se determinaron a partir de una ecuación logística de cuatro parámetros sobre una curva de respuesta de 10 puntos (Prism de GraphPad). Todas las curvas y los valores de EC_{50} se corrigieron para equivalentes de carga útil. Todas las IC_{50}s se expresan en concentración

de nM y el porcentaje de células matadas (% de matanza) se reporta para la concentración más alta probada.

[813] La bioactividad de los ADCs de esteroides con y sin enlazadores de ciclodextrina se muestra en la FIGURA 30.

[814] Para probar la comparabilidad de los ADCs con y sin CDs que contienen cargas útiles de esteroides, su actividad en las células 293/PRLR/GRE-Luc se estudió a las 72 horas de incubación. Para este ensayo, se sembraron 20,000 células en placas de 96 pozos en medios que contenían DMEM suplementado con FBS al 10% y pencilina/estreptomicina (medios completos) y se cultivaron durante la noche a 37 °C en CO_2 al 5%. Para las curvas de respuesta a la dosis de ADC o fármaco libre, reactivos serialmente diluidos que variaban desde 100 nM hasta 5.1 pM se añadieron a las células y se incubaron durante 72 horas a 37 °C. La actividad de la luciferasa se determinó mediante la adición de un reactivo One-Glo™ (Promega, Cat#E6130) y las unidades relativas de luz (RLUs) se midieron en un luminómetro Victor (Perkin Elmer). Los valores de EC_{50} se determinaron a partir de una ecuación logística de cuatro parámetros sobre una curva de respuesta de 10 puntos utilizando Prism de GraphPad. La entrega de los esteroides dará como resultado una activación del reportero de Luc en las células 293/PRLR/GRE-Luc. La activación completa en este ensayo se define entre 90 y 100% de la activación máxima medida con la carga útil libre. La activación parcial en este ensayo se define como la activación que está entre 10% y 90% de la activación máxima medida con la carga útil libre. La activación mínima en este ensayo se define como menos del 10% de la activación máxima medida con la carga útil libre.

[815] Como se muestra en la Tabla 13 y la FIGURA 30, los ADCs de anti-PRLR Ab que contienen CD (Anti-PRLR Ab-Ej46) tienen similar eficacia y potencia en la activación del reportero de GRE-Luc en células 293/PRLR/GRE-Luc que el ADC de anti-PRLR Ab que no contienen CD (Anti-PRLR Ab-Ej44). En este ensayo, los ADCs de control de isotipo, independientemente de si contienen CD o no, así como el anticuerpo no conjugado no demostraron ningún efecto significativo en este ensayo.

TABLA 13: ACTIVACIÓN DE GR DE LOS ADCS DE ESTEROIDES CON O SIN ENLAZADORES DE CICLODEXTRINA EN CÉLULAS 293/PRLR/GRE-LUC

Molécula probada	Activación máxima	EC_{50} (nM)
Anti-PRLR Ab-Ej46	Parcial	8.6

Molécula probada	Activación máxima	EC_{50} (nM)
Ab de control de isotipo-Ej46	Mínima	NA

Anti-PRLR Ab-Ej45	Parcial	9.5
Carga útil libre (compuesto 1c)	Completa	8.4

Ab de control de isotipo-Ej45	Mínima	NA
Anti-PRLR Ab	Mínima	NA

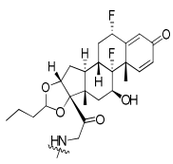
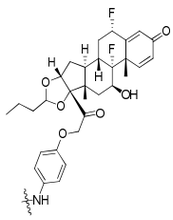
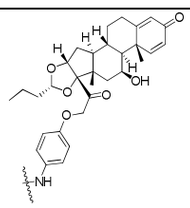
NA= no aplicable

TABLA 14. PROPIEDAD QUÍMICAS-FÍSICAS DE LOS ENLAZADOR-ESTEROIDES

Entrada	MF	MW	cLogP	Pureza de HPLC (%)	HPLC RT (min)	MS (m/z) 100%	Pico m/z más alto
LP101	$C_{60}H_{84}F_2N_8O_{13}$	1163.35	4.04	100	7.07 (B)	1163.6 (M+H)	1163.6 (M+H)
LP102	$C_{55}H_{75}F_2N_5O_{11}$	1020.21	5.41	> 99	8.44 (A) 8.47 (B)	510.8 (M/2+H)	1020.3 (M+H) (33%)
LP103	$C_{66}H_{88}F_2N_8O_{14}$	1255.45	5.9	> 99	8.46 (A)	1255.5 (M+H)	1255.5 (M+H)
LP104	$C_{126}H_{177}F_2N_{13}O_{49}$	2695.81	-5.09	> 99	6.23 (B)	899.2 (M/3+H)	1348.6 (M/2+H) (40%)
LP105	$C_{118}H_{176}F_2N_{12}O_{49}$	2584.71	-5.21	> 99	7.37 (A) 7.41 (B)	1293.6 (M/2+H)	1293.6 (M/2+H)
LP108	$C_{121}H_{168}F_2N_{10}O_{47}$	2552.66	-3.72	> 99	7.76 (B)	851.4 (M/3+H)	1276.8 (M/2+H) (83%)
LP110	$C_{132}H_{181}F_2N_{13}O_{50}$	2787.9	-3.23	> 99	7.94(A) 8.02 (B)	930.3 (M/3+H)	1394.2 (M/2+H) (33%)
LP112	$C_{74}H_{94}F_2N_8O_{17}$	1405.60	4.39	> 99	7.40 (B)	703.5 (M/2+H)	703.5 (M/2+H)

LP113	$C_{54}H_{74}N_4O_{15}$	1019.18	3.46	100	7.46 (B)	510.3 (M/2+H)	1041.3 (M+Na) (10%)
LP114	$C_{70}H_{87}F_2N_5O_{16}$	1292.46	5.61	99	9.18 (A) 9.22 (B)	1292.1 (M+H)	1292.1 (M+H)
LP115	$C_{69}H_{84}F_3N_5O_{15}$	1280.42	5.91	100	8.34 (B)	1279.6 (M+H)	1279.6 (M+H)
LP116	$C_{80}H_{98}F_2N_8O_{18}$	1497.70	6.25	99	7.99 (B)	1498.7 (M/2+H)	1498.7 (M+H) (10%)

TABLA 15. PROPIEDAD FÍSICA DE LOS ENLAZADOR-ESTEROIDES

LP #	Estructura				cLogP	MW
	Carga útil	Enlazador				
	Estructura	Pieza de escisión L3	Pieza hidrofílica L2	Enlazador de conjugación L1		
LP112		vcPAB	/	Lk-DIBAC	4.39	1405.58
LP101		vcPAB	/	LkCCK	4.04	1163.35
LP104		vcPAB	aCDCCK	Lk-DIBAC	-5.09	2695.81
LP105		vcPAB	aCDCCK	Lk-BCN	-5.21	2584.71
LP102		VA	/	Lk-CCK	5.41	1020.2
LP108		VA	aCDCCK	Lk-DIBAC	-3.72	2552.66
LP116		vcPAB	/	Lk-DIBAC	6.25	1497.67
LP103		vcPAB	/	LkCCK	5.90	1255.5
LP110		vcPAB	aCDCCK	Lk-DIBAC	-3.23	2787.9
LP113		VA	/	Lk-MAL	3.46	1019.18

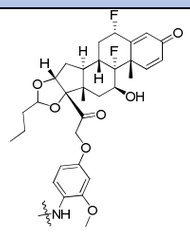
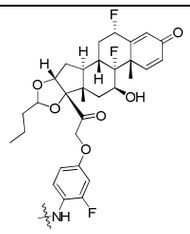
LP #	Estructura				cLogP	MW
	Carga útil	Enlazador				
	Estructura	Pieza de escisión L3	Pieza hidrofílica L2	Enlazador de conjugación L1		
LP114		VA	/	Lk-DIBAC	5.61	1292.46
LP115		VA	/	Lk-DIBAC	5.91	1280.42

TABLA 16. LISTA DE CONJUGADOS ESTEROIDE-ANTICUERPO ESPECÍFICOS AL SITIO

LP		Ab, Ab–N3, o conjugados Ab-Esteroide		
EX	**MS m/z**	**Nombre**	**MW (Da)**	**DAR**
		Anti-PRLR Ab	144602	4.0
PEG_3-N_3	218.3	**Anti PRLR-Ab-N_3**	145385	3.9
LP112	1405.6	**Anti-PRLR Ab–LP12z**	151015	4.0
LP104	2695.9	**Anti-PRLR Ab–LP4z**	156198	4.0
LP116	1497.7	**Anti-PRLR Ab–LP16z**	151015	4.0
		Anti-Fel D1 Ab		
PEG_3-N_3	218.3	**Anti-Fel D1 Ab-N3z**	146251	4
LP112	1405.6	**Anti-Fel D1 Ab-LP12z**	151871	3.9
LP116	1497.7	**Anti-Fel D1 Ab-LP16z**	152235	3.9

EJEMPLO 68

[816] Este ejemplo se refiere a los compuestos en la Tabla 2 y la FIGURA 31.

[817] Esteroides comerciales incluyendo acetónido de fluocinolona (**1a**), dexametasona (**1c**), flumetasona (**1d**), triamcinolona (**1e**) y metilprednisolona (**1f**) y acetónido de triamcinolona (**1g**) se utilizaron como materiales de partida. El compuesto **1b**

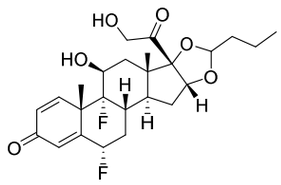
se obtuvo a partir de **1a** mediante intercambio de cetal con butiraldehído en presencia de ácido perclórico, y sus dos isómeros quirales se obtuvieron a partir de separación de SFC quiral. Tomando el mismo enfoque, el compuesto **1h** se obtuvo a partir de **1g**. Los compuestos **1b-f** y **1h** se convirtieron a los correspondientes derivados de mesilato (**2b-f**, **2h**), seguido por el reemplazo del grupo mesilato con un radical azida para formar los compuestos **3b-f** y **3h** que se redujeron adicionalmente a las aminas (**4b-f**, **4h**). El radical mesilato en el compuesto **2b** también se reemplazó por unas anilinas para proporcionar **5-Iz**, se reemplazó por una alquilamina para proporcionar **5-II**, y se reemplazó por fenoles para proporcionar **6-I** a **6-III**. El compuesto **6-VI** se obtuvo a partir del reemplazo del mesilato de budesonida con un 4-amino-fenol, y el **6-VII** se obtuvo a partir del reemplazo del mesilato en **2f** con 4-amino-fenol.

EJEMPLO 69

[818] Síntesis del compuesto **1b, R-1b**, **S-1b**, y **1h**.

[819] Este ejemplo se refiere a los compuestos en la Tabla 2 y la FIGURA 31.

[820] **(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-Difluoro-11-hidroxi-8-(2-hidroxiacetil)-9,13-dimetil-6-propil-5,7-dioxapentaciclo[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]icosa-14,17-dien-16-ona (1b)**

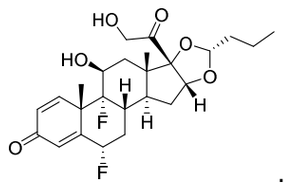


[821] A una mezcla de acetónido de fluocinolona (**1a**, 0.90 g, 2.0 mmol) y gel de sílice (18 g) en heptanos (90 mL) se añadió butiraldehído (0.27 mL, 3.0 mmol) a 10 °C y la suspensión se agitó a 10-20 °C durante 10 minutos. A la mezcla se añadió ácido perclórico (70%, 0.68 mL, 8.3 mmol) a gotas a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó luego a 10-20 °C durante la noche. La mayor parte del compuesto **1a** se consumió de acuerdo con TLC y LCMS. La mezcla de reacción se diluyó con éter de petróleo y se apagó con carbonato de sodio *sat.* acuoso. La suspensión se filtró y el sólido se lavó con DCM/metanol (v/v = 1). El filtrado combinado se concentró *in vacuo*. El residuo se purificó mediante cromatografía instantánea (acetato de etilo al 0-100% en éter de petróleo) para dar el compuesto **1b** (0.15 g, rendimiento del 16%) como un sólido blanco. ESI m/z: 467.1 $(M + H)^+$. El compuesto **1b** fue purificación adicional mediante prep-HPLC (método B) dio el compuesto ***R*-1b** (40 mg, rendimiento del 39%) y ***S*-1b** (10 mg, rendimiento del 9%) como sólidos blancos. ESI m/z: 467 $(M + H)^+$.

[822] **(1*S*,2*S*,4*R*,6*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-Difluoro-11-hidroxi-8-(2-hidroxiacetil)-9,13-dimetil-6-propil-5,7-dioxapentaciclo[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]icosa-14,17-dien-16-ona (*R*-1b)**

[823] Se emplearon ciertos métodos y/o intermedios en EP0262108A1, cuyo contenido completo se incorpora aquí por referencia en su totalidad para todos los propósitos:

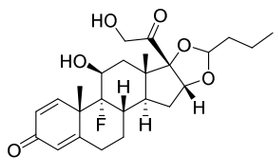
[824] El compuesto R-1b es



.

[825] ^{1}H NMR (400 MHz, MeOD$_{d4}$) δ 7.34 (dd, *J* = 10.1, 1.3 Hz, 1H), 6.37-6.32 (m, 2H), 5.65-5.48 (m, 1H), 4.63 (t, *J* = 4.3 Hz, 1H), 4.55 (d, *J* = 19.4 Hz, 1H), 4.33-4.28 (m, 2H), 2.74-2.59 (m, 1H), 2.38-2.32 (m, 1H), 2.26-2.16 (m, 2H), 1.70-1.41 (m, 12H), 0.97-0.93 (m, 6H) ppm. HPLC *Anal.*: >99.9%, Tiempo de retención: 8.05 min (método A).

[826] **(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*)-12-Fluoro-11-hidroxi-8-(2-hidroxiacetil)-9,13-dimetil-6-propil-5,7-dioxapentaciclo[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]icosa-14,17-dien-16-ona (1h)**



[827] Siguiendo el procedimiento para hacer el compuesto **1b**, el compuesto **1g** (1.3 g, 3.0 mmol) se convirtió al compuesto **1h** (1.1 g, rendimiento del 85%) como un sólido blanco. ESI m/z: 449 (M+1)$^+$.

EJEMPLO 70

[828] **Procedimiento general A para la síntesis de mesilatos (Ms) 2 en la FIGURA 31:**

[829] Este ejemplo se refiere a los compuestos en la Tabla 2 y la FIGURA 31.

[830] A una solución de compuesto **1** (**1c, 1d, 1e, 1f**, o **1h**, 1 eq.) en piridina (10 mL por gramo de **1**) se añadieron 4-dimetilaminopiridina (2 eq.) y cloruro de metanosulfonilo (1.5 eq.) a gotas a 0 °C. Después de agitarse a temperatura ambiente durante 2 horas y monitorear la reacción mediante LCMS hasta que el compuesto **1** (**1c, 1d, 1e, 1f**, o **1h**, 1 eq.) se consumió totalmente, la mezcla resultante se vertió en acetato de etilo (100 mL). La

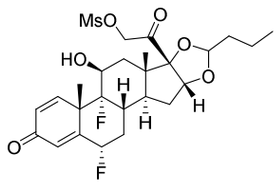
mezcla se lavó con clorhidrato acuoso diluido (1N) a pH= 7 y con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró. El producto crudo se purificó mediante cromatografía instantánea (MeOH al 0-2% en DCM) para dar el compuesto **2** (**2c, 2d, 2e, 2f**, o **2h**, 1 eq.).

EJEMPLO 71

[831] Este ejemplo se refiere a los compuestos en la Tabla 2 y la FIGURA 31.

[832] **Metanosulfonato de 2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-difluoro-11-hidroxi-9,13-dimetil-16-oxo-6-propil-5,7-dioxapentaciclo[10.8.0.0^{2},^{9}.0^{4},^{8}.0^{13},^{18}]icosa-14,17-dien-8-il]-2-oxoetilo (2b)**

[833] Este ejemplo se refiere a los compuestos en la Tabla 2 y la FIGURA 31.



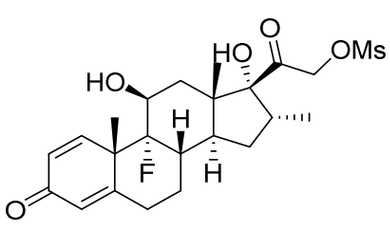
[834] A una solución de compuesto **1b** (0.28 g, 0.65 mmol)) en DCM (3 mL) se añadió trietilamina (0.13 g, 1.3 mmol) y cloruro de metanosulfonilo (89 mg, 0.78 mmol). Después de agitarse a 0 ºC durante media hora hasta que el compuesto **1b** se consumió de acuerdo con TLC, la mezcla de reacción se concentró *in vacuo*. El residuo en gel de sílice se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (acetato de etilo al 0-50% en éter de petróleo) para dar el compuesto **2b** (0.26 g, rendimiento > 99%) como un sólido blanco. ESI m/z: 545 $(M + H)^{+}$.

EJEMPLO 72

[835] Este ejemplo se refiere a los compuestos en la Tabla 2 y la FIGURA 31.

[836] **Metanosulfonato de 2-[(1*R*,2*S*,10*S*,11*S*,13*R*,14*R*,15*S*,17*S*)-1-fluoro-14,17-dihidroxi-2,13,15-trimetil-5-oxotetraciclo[8.7.0.0^{2,7}.0^{11,15}]heptadeca-3,6-dien-14-il]-2-oxoetilo (2c)**

[837] Se emplearon ciertos métodos y/o intermedios en WO2015/71657 A1, cuyo contenido completo se incorpora aquí por referencia en su totalidad para todos los propósitos:



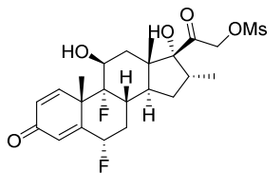
[838] Siguiendo el Procedimiento general A, se obtuvo el compuesto **2c** (0.32 g,

rendimiento del 50%) como un sólido blanco a partir de dexametasona (**1c**, 0.53 g, 1.4 mmol). ESI m/z: 471 $(M + H)^+$. ^1H NMR ($MeOD_{d4}$, 500 MHz) δ 7.42 (d, J = 10.0 Hz, 1H), 6.31 (dd, J = 10.0, 2.0 Hz, 1H), 6.10 (s, 1H), 5.27 (d, J = 18.0 Hz, 1H), 5.04 (d, J = 18.0 Hz, 1H), 4.30-4.27 (m, 1H), 3.21 (s, 3H), 3.10-3.05 (m, 1H), 2.78-2.71 (m, 1H), 2.55-2.40 (m, 1H), 2.36-2.32 (m, 1H), 2.27-2.21 (m, 1H), 1.93-1.88 (m, 1H), 1.82-1.74 (m, 1H), 1.61 (s, 3H), 1.58-1.51 (m, 2H), 1.25-1.20 (m, 1H), 1.06 (s, 3H), 0.89 (d, J = 7.5 Hz, 3H) ppm.

EJEMPLO 73

[839] Este ejemplo se refiere a los compuestos en la Tabla 2 y la FIGURA 31.

[840] **Metanosulfonato de 2-[(1*R*,2*S*,8*S*,10*S*,11*S*,13*R*,14*R*,15*S*,17*S*)-1,8-difluoro-14,17-dihidroxi-2,13,15-trimetil-5-oxotetraciclo[8.7.0.0^{2,7}.0^{11,15}]heptadeca-3,6-dien-14-il]-2-oxoetilo (2d)**



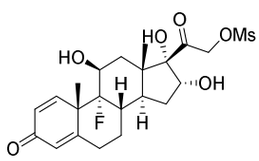
[841] Se emplearon ciertos métodos y/o intermedios en *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2015**, 25, 2837-2843, cuyo contenido completo se incorpora aquí por referencia en su totalidad para todos los propósitos:

[842] Siguiendo el Procedimiento general A, el compuesto **2d** (0.17 g, rendimiento del 71%) se obtuvo como un sólido blanco a partir de flumetasona (**1d**, 0.20 g, 0.49 mmol). ESI m/z: 489 $(M + H)^+$.

EJEMPLO 74

[843] Este ejemplo se refiere a los compuestos en la Tabla 2 y la FIGURA 31.

[844] **Metanosulfonato de 2-((8*S*,9*R*,10*S*,11*S*,13*S*,14*S*,16*R*,17*S*)-9-fluoro-11,16,17-trihidroxi-10,13-dimetil-3-oxo-6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-dodecahidro-3*H*-ciclopenta[a]fenantren-17-il)-2-oxoetilo (2e)**

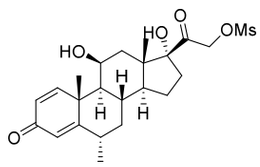


[845] Siguiendo el Procedimiento general A, se obtuvo el compuesto **2e** (0.38 g, rendimiento del 81%) como un sólido blanco a partir de triamcinolona (**1e**, 0.39 g, 1.0 mmol). ESI m/z: 473 $(M + H)^+$.

EJEMPLO 75

[846] Este ejemplo se refiere a los compuestos en la Tabla 2 y la FIGURA 31.

[847] **Metanosulfonato de 2-((6*S*,8*S*,9*S*,10*R*,11*S*,13*S*,14*S*,17*R*)-11,17-dihidroxi-6,10,13-trimetil-3-oxo-6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-dodecahidro-3*H*-ciclopenta[a]fenantren-17-il)-2-oxoetilo (2f)**

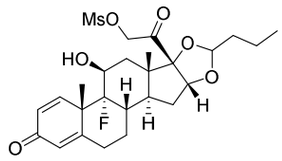


[848] Siguiendo el Procedimiento general A, se obtuvo el compuesto **2f** (0.16 g, rendimiento del 35%) como un sólido blanco a partir de metilprednisolona (**1f**, 0.38 g, 1.0 mmol). ESI m/z: 453 $(M + H)^+$.

EJEMPLO 76

[849] Este ejemplo se refiere a los compuestos en la Tabla 2 y la FIGURA 31.

[850] **Metanosulfonato de 2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*)-12-fluoro-11-hidroxi-9,13-dimetil-16-oxo-6-propil-5,7-dioxapentaciclo[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]icosa-14,17-dien-8-il]-2-oxoetilo (2h)**



[851] Este ejemplo se refiere a los compuestos en la Tabla 2 y la FIGURA 31.

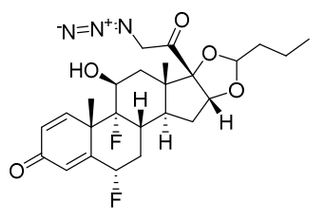
[852] Siguiendo el Procedimiento general A, se obtuvo el compuesto **2h** (0.45 g, rendimiento del 85%) como un sólido blanco a partir de metilprednisolona (**1h**, 0.39 g, 1.0 mmol). ESI m/z: 528 $(M + H)^+$.

EJEMPLO 77

[853] Este ejemplo se refiere a los compuestos en la Tabla 2 y la FIGURA 31.

[854] Síntesis de la carga útil de esteroides **4b**.

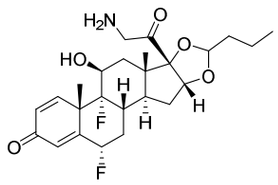
[855] **(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-8-(2-Azidoacetil)-12,19-difluoro-11-hidroxi-9,13-dimetil-6-propil-5,7-dioxapentaciclo[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]icosa-14,17-dien-16-ona (3b)**



[856] Una suspensión del compuesto **2b** (1.0 g, 1.8 mmol) y azida de sodio (1.2 g,

18 mmol) en acetona (15 mL) se agitó a 50 ºC durante la noche, momento en el que la reacción se completó de acuerdo con el análisis de LCMS. Después de enfriar la suspensión, la mezcla de reacción se vertió en agua fría (80 mL). La mezcla acuosa se extrajo con acetato de etilo (50 mL x 3). La solución orgánica combinada se lavó mediante salmuera (30 mL), se secó sobre sulfato de sodio y se concentró *in vacuo* para proporcionar el compuesto **3b** crudo (0.90 g, rendimiento > 99%) como un sólido amarillo, que se utilizó para la siguiente etapa sin purificación adicional. ESI m/z: 492 $(M + H)^+$.

[857] **(1*S*,2*S*,4*R*,6*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-8-(2-Aminoacetil)-12,19-difluoro-11-hidroxi-9,13-dimetil-6-propil-5,7-dioxapentaciclo[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]icosa-14,17-dien-16-ona; sal del ácido trifluoroacético (4b)**

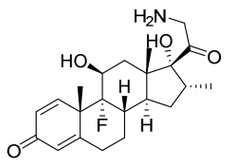


[858] A un matraz de fondo redondo de 100 mL se añadió el compuesto **3b** (0.85 g, 1.7 mmol), seguido por la adición de THF (20 mL) y clorhidrato *ac.* (1 N, 10 mL). La mezcla se agitó a 28-32 °C hasta que se volvió clara, a la cual luego se añadió trifenilfosfina (0.68 g, 2.6 mmol) a esta temperatura. La solución clara amarilla resultante se agitó a 28-32 °C durante 18 horas, cuando la reacción se completó de acuerdo con TLC y LCMS. La mezcla se concentró bajo vacío y el residuo se purificó mediante cromatografía instantánea de fase inversa (acetonitrilo al 0-50% en TFA acuoso (0.05%)) para dar el compuesto del título **4b** (0.56 g, rendimiento del 57%, sal de TFA) como un sólido blanquecino. ESI m/z: 466 $(M + H)^+$. ^{1}H NMR (400 MHz, $MeOD_{d4}$) δ 7.33 (d, J = 9.9 Hz, 1H), 6.40-6.29 (m, 2H), 5.69-5.45 (m, 1H), 4.93-4.92 (m, 1H), 4.71 (t, J = 4.3 Hz, 1H), 4.35-4.27 (m, 2H), 3.90-3.84 (m, 1H), 2.81-2.54 (m, 1H), 2.42-2.06 (m, 3H), 1.82-1.32 (m, 11H), 1.09-0.87 (m, 6H) ppm. ^{19}F NMR (376 MHz, $MeOD_{d4}$) δ -77.01, -166.24, -166.92, -188.81, -188.83 ppm. HPLC *Anal.*: 100%, Tiempo de retención: 6.86 min (método A).

EJEMPLO 78

[859] Este ejemplo se refiere a los compuestos en la Tabla 2 y la FIGURA 31.

[860] **Trifluoroacetato de (1*R*,2*S*,10*S*,11*S*,13*R*,14*R*,15*S*,17*S*)-14-(2-aminoacetil)-1-fluoro-14,17-dihidroxi-2,13,15-trimetiltetraciclo [8.7.0.0^{2,7}.0^{11,15}]heptadeca-3,6-dien-5-ona (4c)**

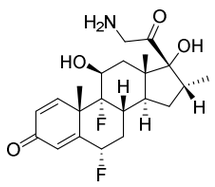


[861] Siguiendo el procedimiento en el Ejemplo 77 para hacer el compuesto **4b**, excepto la sustitución del compuesto **2c** por el compuesto **2d**, el compuesto **4c** como la sal de TFA se obtuvo (0.50 g, rendimiento del 53% en 2 etapas) como un sólido blanco. ESI m/z: 392 $(M + H)^+$. ^{1}H NMR (400 MHz, $DMSO_{d6}$) δ 8.22 (s, 3H), 7.35 (d, *J* = 10.0 Hz, 1H), 6.19 (d, *J* = 10.0 Hz, 1H), 5.98 (s, 1H), 5.60 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H), 5.38 (s, 1H), 4.30-4.10 (m, 2H), 3.62 (d, *J* = 18.8 Hz, 1H), 2.98-2.83 (m, 1H), 2.65-2.50 (m ,1H), 2.50-2.22 (m, 2H), 2.20-2.01 (m, 2H), 1.80-1.72 (m, 1H), 1.72-1.58 (m, 1H), 1.46 (s, 3H), 1.46-1.25 (m, 2H), 1.13-1.01 (m, 1H), 0.89 (s, 3H), 0.78 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H) ppm. ^{19}F NMR (376 MHz, $DMSO_{d6}$) δ -73.79, -164.32 ppm. HPLC *Anal.*: > 99%, Tiempo de retención: 6.34 min (método A).

EJEMPLO 79

[862] Este ejemplo se refiere a los compuestos en la Tabla 2 y la FIGURA 31.

[863] **Trifluoroacetato de (1*R*,2*S*,8*S*,10*S*,11*S*,13*R*,14*R*,15*S*,17*S*)-14-(2-aminoacetil)-1,8-difluoro-14,17-dihidroxi-2,13,15-trimetiltetraciclo [8.7.0.0^{2,7}.0^{11,15}]heptadeca-3,6-dien-5-ona (4d)**



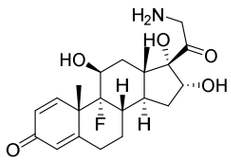
[864] Siguiendo el procedimiento en el Ejemplo 77 para hacer el compuesto **4b**, excepto la sustitución del compuesto **2d** por el compuesto **2b**, se obtuvo el compuesto **4d** como sal de TFA (0.18 g, rendimiento del 21% en 2 etapas) como un sólido blanco. ESI m/z: 410 $(M + H)^+$. ^{1}H NMR (400 MHz, $DMSO_{d6}$) δ 8.17 (s, 3H), 7.36 (d, *J* = 10.3 Hz, 1H), 6.29 (dd, *J* = 10.2, 1.7 Hz, 1H), 6.11 (s, 1H), 5.74-5.54 (m, 2H), 5.42 (s, 1H), 4.28-4.10 (m, 2H), 3.70-3.59 (m, 1H), 3.02-2.89 (m, 1H), 2.58-2.40 (m, 1H), 2.31-2.12 (m, 3H), 2.08 (s, 1H), 1.77-1.64 (m, 1H), 1.51-1.44 (m, 4H), 1.16-1.06 (m, 1H), 0.91 (s, 3H), 0.82 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H).ppm. ^{19}F NMR (376 MHz, $DMSO_{d6}$) δ -73.65, -163.75, -186.04 ppm. HPLC *Anal.*: > 99%, Tiempo de retención: 6.36 min (método A).

EJEMPLO 80

[865] Este ejemplo se refiere a los compuestos en la Tabla 2 y la FIGURA 31.

[866] **Triluoroacetato de (8*S*,9*R*,10*S*,11*S*,13*S*,14*S*,16*R*,17*S*)-17-(2-aminoacetil)-9-fluoro-11,16,17-trihidroxi-10,13-dimetil-7,8,11,12,13,15,16,17-octahidro-6*H*-**

ciclopenta[a]fenantren-3(9*H*,10*H*,14*H*)-ona (4e)

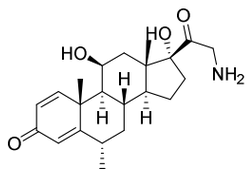


[867] Siguiendo el procedimiento en el Ejemplo 77 para hacer el compuesto **4b**, excepto la sustitución del compuesto **2e** por el compuesto **2b**, se obtuvo el compuesto **4e** como sal de TFA (28 mg, rendimiento del 21% en 2 etapas) como un sólido blanco. ESI m/z: 394 $(M + H)^+$. ^{1}H NMR (500 MHz, $DMSO_{d6}$) δ 8.04 (s, 3H), 7.33 (d, J = 10 Hz, 1H), 6.24 (dd, J = 10 Hz, 1.0 Hz, 1H), 6.02 (s, 1H), 5.53 (d, J = 5.5 Hz, 1H), 5.50-5.45 (m, 1H), 5.04 (s, 1H), 4.76-4.70 (m, 1H), 4.20-4.12 (m, 2H), 3.68 (d, J = 20 Hz, 1H), 2.66-2.57 (m, 1H), 2.40-2.20 (m, 3H), 2.20-2.10 (m, 1H), 1.90-1.70 (m, 2H), 1.50-1.20 (m, 6H), 0.89 (s, 3H)ppm. HPLC *Anal.*: > 99%, Tiempo de retención: 5.79 min (método A).

EJEMPLO 81

[868] Este ejemplo se refiere a los compuestos en la Tabla 2 y la FIGURA 31.

[869] **(6*S*,8*S*,9*S*,10*R*,11*S*,13*S*,14*S*,17*R*)-17-(2-Aminoacetil)-11,17-dihidroxi-6,10,13-trimetil-6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-dodecahidro-3*H*-ciclopenta[a]fenantren-3-ona (4f)**

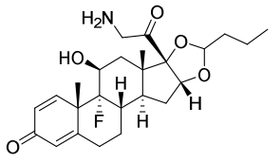


[870] Siguiendo el procedimiento en el Ejemplo 77 para hacer el compuesto **4b**, excepto reemplazar **2b** con **2f** y agitar a 60 °C, no 28~32 °C, en la 2ª etapa, se obtuvo el compuesto **4f** (10 mg, rendimiento del 14% en 2 etapas) como un sólido amarillo después de la purificación mediante prep-HPLC (método B). ESI m/z: 466 $(M + H)^+$. ^{1}H NMR (400 MHz, $MeOD_{d4}$) δ 8.50 (s, 1H), 7.50 (d, J = 10.0 Hz, 1H), 6.27 (dd, J = 1.6 Hz, 10.0 Hz, 1H), 6.02 (s, 1H), 4.43-4.42 (m, 1H), 4.32-4.27 (m, 1H), 3.80-3.76 (m, 1H), 2.79-2.73 (m, 2H), 2.29-2.15 (m, 3H), 1.83-1.50 (m, 7H), 1.10-0.80 (m, 8H) ppm.

EJEMPLO 82

[871] Este ejemplo se refiere a los compuestos en la Tabla 2 y la FIGURA 31.

[872] **(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*)-8-(2-Aminoacetil)-12-fluoro-11-hidroxi-9,13-dimetil-6-propil-5,7-dioxapentaciclo[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]icosa-14,17-dien-16-ona (4h) con isómeros 22*R*/*S* (relación 2:1)**

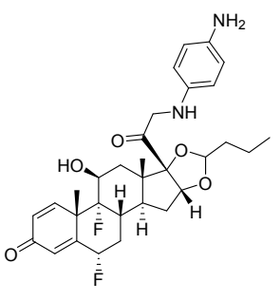


[873] Siguiendo el procedimiento en el Ejemplo 77 para hacer el compuesto **4b**, excepto la sustitución del compuesto **2h** (0.26 g, 0.5 mmol) por el compuesto **2b**, se obtuvo el compuesto **4h** (5 mg, rendimiento del 6% en 2 etapas) como un sólido amarillo después de la purificación mediante prep-HPLC (método A) dos veces. ESI m/z: 448 $(M + H)^+$. ^{1}H NMR (500MHz, $DMSO_{d6}$) δ 8.04 (s, 3H), 7.95-7.70 (m, 1H), 7.32 (d, J = 10 Hz, 1H), 6.24 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 6.02 (s, 1H), 5.65-5.55 (m, 1H), 5.18 (t, J = 4 Hz, 0.24H), 5.12 (d, J = 5 Hz, 0.24H), 4.77 (d, J = 5.0 Hz, 0.76H), 4.66 (t, J = 4 Hz, 0.76H), 4.25-4.10 (m, 2H), 3.80-3.70 (m, 1H), 2.65-2.55 (m, 1H), 2.36-2.30 (m, 1H), 2.05-1.95 (m, 2H), 1.85-1.75 (m, 1H), 1.70-1.55 (m, 4H), 1.48 (s, 3H), 1.40-1.30 (m, 3H), 1.25-1.20 (m, 1H), 0.90-0.80 (m, 6H) ppm. ^{19}F NMR (376 MHz, $DMSO_{d6}$) δ -73.51 (3F), -164.50 (0.3F), -165.27 (0.7F) ppm.

EJEMPLO 83

[874] Este ejemplo se refiere a los compuestos en la Tabla 2 y la FIGURA 31.

[875] **Trifluoroacetato de (1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-8-{2-[(4-aminofenil)amino]acetil}-12,19-difluoro-11-hidroxi-9,13-dimetil-6-propil-5,7-dioxapentaciclo[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]icosa-14,17-dien-16-ona (5-l)**



[876] Al compuesto **2b** (0.10 g, 0.18 mmol) en DMF (2 mL) en un tubo con tapón de rosca se añadieron 4-hidroxianilina (0.10 mg, 0.92 mmol), trietilamina (0.20 g, 2.0 mmol) y yoduro de sodio (0.10 g, 0.67 mmol). La mezcla se agitó a 70 °C durante 5 horas, lo cual se monitoreó mediante LCMS. La mezcla de reacción se purificó directamente dos veces mediante prep-HPLC (método A) para dar el compuesto **5-l** (10 mg, rendimiento del 8%) como un sólido blanco. ESI m/z: 557 $(M + H)^+$. ^{1}H NMR (500 MHz, $DMSO_{d6}$) δ 9.59 (br s, 3H), 7.50-5.96 (m, 8H), 5.76-3.81 (m, 7H), 2.73-2.55 (m, 1H), 2.28 (s, 1H), 2.20-1.99 (m, 2H), 1.86-1.79 (m, 1H), 1.70-1.27 (m, 10H), 0.93-0.76 (m, 6H) ppm. ^{19}F NMR (376 MHz, $DMSO_{d6}$) δ -73.90, -164.22, -165.02, -186.37 ppm. HPLC *Anal.*: > 99%, Tiempo de retención: 7.55 min (método A).

EJEMPLO 84

[877] Este ejemplo se refiere a los compuestos en la Tabla 2 y la FIGURA 31.

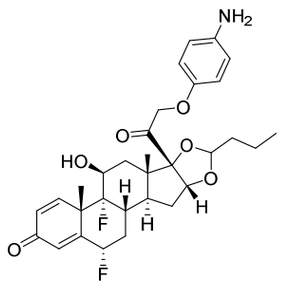
Procedimiento general B para hacer el compuesto 6 sustituyendo el compuesto 2 con fenol:

[878] A acetona o acetonitrilo caliente (60-65 °C) se añadieron el compuesto **2** (1 eq.), el fenol correspondiente (2.0-2.5 eq.) y carbonato de potasio o carbonato de cesio (2.0-3.0 eq.). La suspensión resultante se sometió a reflujo durante 2-3 horas, se monitoreó mediante LCMS y TLC. Después de enfriarse a temperatura ambiente, los compuestos volátiles se removieron *in vacuo* y al residuo se añadió agua. La mezcla acuosa se extrajo con acetato de etilo. La solución orgánica combinada se lavó con agua y salmuera, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró *in vacuo*. El producto crudo se utilizó para la siguiente etapa directamente o se purificó mediante cromatografía instantánea o prep-HPLC para dar aril éster **6** puro.

EJEMPLO 85

[879] Este ejemplo se refiere a los compuestos en la Tabla 2 y la FIGURA 31.

[880] **(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-8-[2-(4-Aminofenoxi)acetil]-12,19-difluoro-11-hidroxi-9,13-dimetil-6-propil-5,7-dioxapentaciclo[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]icosa-14,17-dien-16-ona (6-l)**

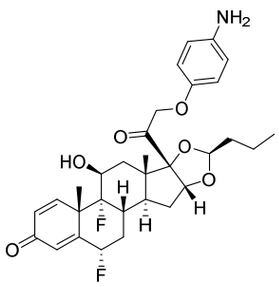


[881] Siguiendo el procedimiento general B en una reacción de **2b** (calc. como 0.17 mmol) con 4-aminofenol (37 mg, 0.34 mmol) y carbonato de cesio (0.11 g, 0.34 mmol) en acetona (0.5 mL), el compuesto del título **6-l** (6.0 mg, rendimiento del 6.3% a partir de **1b**) se obtuvo como un sólido blanco después de la purificación mediante prep-HPLC (método B). ESI m/z: 298 $(M/2 + H)^+$, 558 $(M + H)^+$ (10%). ^{1}H NMR (500 MHz, $MeOD_{d4}$) δ 7.34 (d, J = 10.0 Hz, 1H), 6.78-6.71 (m, 4H), 6.37-6.33 (m, 2H), 5.63-5.49 (m, 1H), 5.10-4.99 (m, 1H), 4.77-4.63 (m, 2H), 4.33 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 2.74-2.57 (m, 1H), 2.39-2.13 (m, 3H), 1.98-1.31 (m, 12H), 1.03-0.93 (m, 6H) ppm. HPLC *Anal.*: pureza 97.4%, Tiempo de retención: 7.55 min (método B).

EJEMPLO 86

[882] Este ejemplo se refiere a los compuestos en la Tabla 2 y la FIGURA 31.

[883] **(1*S*,2*S*,4*R*,6*S*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-8-[2-(4-Aminofenoxi)acetil]-12,19-difluoro-11-hidroxi-9,13-dimetil-6-propil-5,7-dioxapentaciclo[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]icosa-14,17-dien-16-ona (*S*-6-I)**



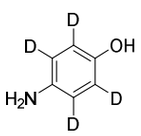
[884] Siguiendo el procedimiento general B, excepto reemplazar **2b** con ***S*-2b**, el compuesto ***S*-6-I** (19 mg, rendimiento del 19% en 2 etapas a partir de ***S*-2b**) se obtuvo como un sólido blanco. ESI m/z: 558 $(M + H)^+$. ^{1}H NMR (400 MHz, $DMSO_{d6}$) δ 7.26 (dd, *J* = 10.2, 1.0 Hz, 1H), 6.65-6.55 (m, 2H), 6.51-6.44 (m, 2H), 6.30 (dd, *J* = 10.2, 1.9 Hz, 1H), 6.11 (s, 1H), 5.74-5.46 (m, 2H), 5.23 (t, *J* = 4.9 Hz, 1H), 5.14 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 4.99 (d, *J* = 18.2 Hz, 1H), 4.74-4.55 (m, 3H), 4.26-4.12 (m, 1H), 2.65-2.53 (m, 1H), 2.29-2.19 (m, 1H), 2.13-1.94 (m, 2H), 1.86-1.22 (m, 11H), 0.92-0.78 (m, 6H) ppm. ^{19}F NMR (376 MHz, $DMSO_{d6}$) δ -164.26, -186.38 ppm. HPLC *Anal.*: > 99%, Tiempo de retención: 7.34 min (método B).

EJEMPLO 87

[885] Este ejemplo se refiere a los compuestos en la Tabla 2 y la FIGURA 31.

[886] Se emplearon ciertos métodos en *Org. Biomol. Chem.*, **2014**, 12, 7551–7560, cuyo contenido completo se incorpora aquí por referencia en su totalidad para todos los propósitos.

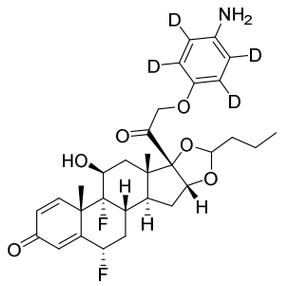
[887] **Etapa uno**: 4-Amino($^2H_4$)fenol:



[888] En un tubo de microondas de 20 mL se cargó 4-hidroxianilina (0.97 g, 8.9 mmol), óxido de deuterio (D_2O, 10 mL) y cloruro de deuterio *conc.* (DCl, 125 uL) para dar una suspensión. El tubo se llenó con atmósfera de nitrógeno, se selló y se irradió con microondas (CEM Discover SP) a 180 °C durante 2.5 horas, lo cual se monitoreó mediante LCMS. La mezcla se enfrió luego a temperatura ambiente (28-32 °C) y se mantuvo a esta

temperatura durante 18 horas. Los compuestos volátiles se removieron *in vacuo* para dar residuo marrón, que se suspendió en óxido de deuterio (10 mL) en un tubo de microondas de 20 mL. El tubo se llenó con nitrógeno, se selló y se irradió con microondas a 180 °C durante 5.5 horas. Después de enfriarse a temperatura ambiente (28-32 °C), la mezcla se mantuvo a esta temperatura durante 16 horas. Los compuestos volátiles se removieron *in vacuo* y el residuo se purificó mediante cromatografía instantánea (acetato de etilo al 10-60% en éter de petróleo) para proporcionar 4-Amino($^2H_4$)fenol (0.50 g, rendimiento del 50%) como un sólido marrón. ^{1}H NMR (500 MHz, $DMSO_{d6}$) δ 8.31 (s, 1H), 4.36 (s, 2H) ppm.

[889] **(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-8-{2-[4-Amino(2,3,5,6-$^2H_4$)fenoxi]acetil}-12,19-difluoro-11-hidroxi-9,13-dimetil-6-propil-5,7-dioxapentaciclo[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]icosa-14,17-dien-16-ona (6-I D)**



[890] **Etapa dos**: A una mezcla de 4-Amino($^2H_4$)fenol (0.10 g, 0.88 mmol) en DMSO (3 mL) se añadió hidróxido de potasio (45 mg, 0.80 mmol). Después de agitarse a 28-32 °C durante 2 minutos y luego agitar a 60 °C, a la mezcla se añadió compuesto **2b** (0.20 g, 0.40 mmol) en una porción y se agitó bajo protección con nitrógeno a 60 °C durante una hora. Después de enfriarse a temperatura ambiente, la mezcla se purificó directamente mediante prep-HPLC (método A) y luego mediante prep-HPLC (método B) para proporcionar **6-II** (10 mg, rendimiento del 4.4%) como un sólido blanquecino. ESI m/z: 562 $(M + H)^+$. ^{1}H NMR (400 MHz, $DMSO_{d6}$) δ 7.27 (d, J = 10.1 Hz, 1H), 6.30 (dd, J = 10.1, 1.7 Hz, 1H), 6.12 (s, 1H), 5.74-5.45 (m, 2H), 5.03-4.93 (m, 1H), 4.82-4.58 (m, 4H), 4.27-4.14 (m, 1H), 3.33 (s, 1H), 2.70-2.53 (m, 1H), 2.31-2.20 (m, 1H), 2.14-1.93 (m, 2H), 1.86-1.70 (m, 1H), 1.67-1.24 (m, 10H), 0.92-0.73 (m, 6H) ppm. ^{19}F NMR (376 MHz, $DMSO_{d6}$) δ -164.24, -165.05, -186.35 ppm. HPLC *Anal.*: 98.41%, Tiempo de retención: 7.34 min (método B)

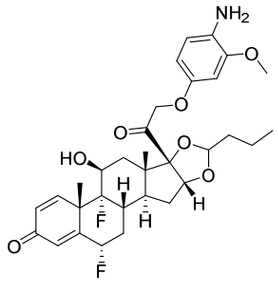
[891] El compuesto 6-I D es útil, por ejemplo, para métodos analíticos.

EJEMPLO 88

[892] Este ejemplo se refiere a los compuestos en la Tabla 2 y la FIGURA 31.

[893] **Trifluoroacetato de (1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-8-[2-(4-amino-3-metoxifenoxi)acetil]-12,19-difluoro-11-hidroxi-9,13-dimetil-6-propil-5,7-**

dioxapentaciclo[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]icosa-14,17-dien-16-ona (6-II)



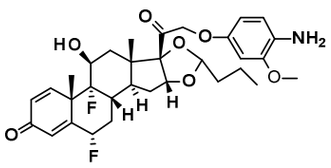
[894] Siguiendo el procedimiento general **B**, haciendo reaccionar el compuesto **2b** (0.50 g, 0.92 mmol) con 4-amino-3-metoxifenol (0.32 g, 2.3 mmol) y carbonato de cesio (0.60 g, 1.8 mmol) en acetonitrilo (20 mL), el compuesto **6-II** (0.25 g, rendimiento del 47%) se obtuvo como un sólido blanco. ESI m/z: 588 $(M + H)^+$. ^{1}H NMR (400 MHz, $DMSO_{d6}$) δ 9.00 (s, 2H), 7.33-7.23 (m, 1H), 7.16-7.08 (m, 1H), 6.77-6.68 (m, 1H), 6.52-6.41 (m, 1H), 6.35-6.27 (m, 1H), 6.12 (s, 1H), 5.74-5.51 (m, 2H), 5.31-5.11 (m, 2H), 4.98-4.68 (m, 3H), 4.28-4.15 (m, 1H), 3.90-3.83 (m, 3H), 2.74-2.55 (m, 1H), 2.35-2.21 (m, 1H), 2.17-1.97 (m, 2H), 1.88-1.75 (m, 1H), 1.67-1.28 (m, 10H), 0.93-0.78 (m, 6H) ppm. HPLC *Anal.*: > 99%, Tiempo de retención: 7.68 y 7.72 min (método A).

EJEMPLO 89

[895] Este ejemplo se refiere a los compuestos en la Tabla 2 y la FIGURA 31.

[896] Preparación del compuesto **6-III**

[897] (1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-8-[2-(4-Amino-3-fluorofenoxi)acetil]-12,19-difluoro-11-hidroxi-9,13-dimetil-6-propil-5,7-dioxapentaciclo[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]icosa-14,17-dien-16-ona **(6-III)**



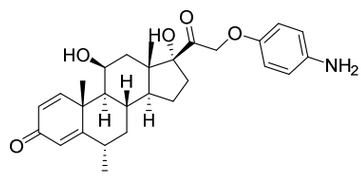
[898] A una botella de fondo redondo se añadieron el compuesto **2e** (0.20 g, 0.37 mmol), 4-amino-3-fluorofenol (0.25 g, 2.0 mmol), hidróxido de potasio (0.11 g, 2.0 mmol) y DMSO (3 mL) a temperatura ambiente. La mezcla resultante se agitó a 60 ºC durante una hora bajo protección con nitrógeno hasta que se completó la reacción, lo cual se monitoreó mediante TLC y LCMS. Después de enfriarse a temperatura ambiente y filtrarse a través de membrana, la solución de reacción se purificó directamente mediante prep-HPLC (método A) para dar el compuesto del título **6-III** (40 mg, rendimiento del 19%) como un sólido blanquecino. ESI m/z: 576 $(M + H)^+$. ^{1}H NMR (500 MHz, $MeOD_{d4}$) δ 7.40-7.31 (m, 1H), 7.20 (td, *J* = 9.1, 1.9 Hz, 1H), 6.91-6.84 (m, 1H), 6.80-6.76 (m, 1H), 6.40-6.30 (m, 2H), 5.57 (ddd,

J = 48.6, 9.7, 6.8 Hz, 1H), 5.15 (d, *J* = 18.1 Hz, 1H), 4.90-4.79 (m, 2H), 4.75 (t, *J* = 4.3 Hz, 1H), 4.41-4.28 (m, 1H), 2.78-2.57 (m, 1H), 2.40-2.12 (m, 3H), 1.98-1.39 (m, 11H), 1.07-0.92 (m, 6H) ppm. HPLC *Anal.*: 100%, Tiempo de retención: 8.10 min (método A).

EJEMPLO 90

[899] Este ejemplo se refiere a los compuestos en la Tabla 2 y la FIGURA 31.

[900] **(6*S*,8*S*,9*S*,10*R*,11*S*,13*S*,14*S*,17*R*)-17-(2-(4-Aminofenoxi)acetil)-11,17-dihidroxi-6,10,13-trimetil-6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-dodecahidro-3*H*-ciclopenta[a]fenantren-3-ona (6-VI)**



[901] A una solución de compuesto **2f** (60 mg, 0.13 mmol) en DMF (3 mL) se añadieron carbonato de cesio (86 mg, 0.26 mmol) y *N*-Boc-4-aminofenol (28 mg, 0.13 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas, lo cual se monitoreó mediante LCMS. La mezcla se diluyó con acetato de etilo (10 mL). La solución orgánica se lavó con agua (10 mL), se secó sobre sulfato de sodio y se concentró. El residuo blanco (50 mg, ESI m/z: 566 $(M + H)^+$) se disolvió en DCM (5 mL) y a la solución se añadió TFA (0.5 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas hasta que se removió totalmente el Boc de acuerdo con LCMS. Los compuestos volátiles se removieron *in vacuo*. Y el residuo se purificó mediante cromatografía instantánea de fase inversa (acetonitrilo al 0-25% en agua) para dar **6-VI** (10 mg, rendimiento del 7.5%) como un sólido blanco. ESI m/z: 466 $(M + H)^+$. ^{1}H NMR (400 MHz, $DMSO_{d6}$) δ 7.32 (d, *J* = 10.0 Hz, 1H), 6.61-6.58 (m, 2H), 6.51-6.47 (m, 2H), 6.19 (dd, *J* = 10.0, 1.6 Hz, 1H), 5.82 (t, *J* = 1.6 Hz, 1H), 5.39 (s, 1H), 5.04-5.01 (m, 3H), 4.66 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 4.58 (d, *J* = 18.0 Hz, 1H), 4.30 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 2.67-2.50 (m, 2H), 2.13-2.01 (m, 2H), 1.93-1.89 (m, 1H), 1.67-1.61 (m, 3H), 1.45-1.30 (m, 5H), 1.01 (d, *J* = 3.2 Hz, 3H), 0.95-0.71 (m, 5H) ppm.

EJEMPLO 91

[902] Este ejemplo demuestra los procedimientos sintéticos generales para hacer intermedios de Enlazador-Cargas útiles en la Tabla 4.

[903] Este ejemplo se refiere a los compuestos en la Tabla 4 y las FIGURAS 31 y 33.

[904] La síntesis de los Enlazador-Cargas útiles (**LP1-LP16**) comenzó haciendo

carbonatos **L4** a partir de las reacciones de aminas (**4**) o anilinas (**6**) con Val-Cit-PAB-PNP protegido (**L2a** o **L2b**) seguido por la desprotección de N, o a partir de la generación de las amidas **L4** entre anilinas (**6**) con Val-Cit-OH o Fmoc-Val-Ala-OH protegidos con Boc o Fmoc (**L3a-c**) seguido por desprotección de N. Luego, los compuestos **L4** se acoplaron directamente con **L9** o **L10** para generar los enlazador-esteroides finales **LP1**, **LP2, LP3, LP13**, **LP14**, **LP15** y **LP16**. Los compuestos **L4** también se acoplaron con Fmoc-*D*-Lys-COT **L5** seguido por de-Fmoc para producir **L6**, que se sometieron a cicloadiciones [3+2] con azido-ciclodextrina (**7a**) o azido sulfonatos (**7b** o **7c**) para generar **L8**. Finalmente, se utilizaron reacciones de acoplamiento de **L8** con ácido PEG_4 o NHS éster (**L9** o **L10**) para producir el enlazador-carga útil **LP5, LP8, LP10**, y **LP12**.

[905] **Procedimiento general C para la síntesis del intermedio L4:**

[906] A una solución de carga útil **4** o **6** (1.0 eq.) y Boc-vcPAB-PNP (1.1 eq.) en DMF (1 mL por 10 mg de carga útil) se añadieron HOBt (1.0 eq.) y DIPEA (2.0 eq.) a temperatura ambiente. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente (18-30 °C) durante la noche hasta que se consumió la carga útil, lo cual se monitoreó mediante LCMS. Después de filtrarse a través de una membrana, la solución de reacción se purificó directamente mediante prep-HPLC para dar **Boc-L4** (rendimiento del 52%) como un sólido blanco, que se disolvió en DCM (0.6 mL por mg de **Boc-L4**). A esta solución se añadió a gotas TFA (0.2 mL por mg de **Boc-L4**) a 0 °C. La mezcla se agitó a temperatura ambiente (18-30 °C) durante una hora hasta que se removió el Boc, lo cual se monitoreó mediante LCMS. Los compuestos volátiles se removieron *in vacuo* para dar el compuesto **L4**, que se utilizó para la siguiente etapa sin purificación adicional.

[907] **Procedimiento general D para la síntesis del intermedio L4:**

[908] A una solución de carga útil **4** o **6** (1.0 eq.) en DMF (0.3 mL por 10 mg de carga útil) se añadieron Fmoc-vcPAB-PNP (1.1 eq.), HOBt (1.5 eq.) y DIPEA (2.0 eq.) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó a temperatura ambiente (18-30 °C) durante 3 horas hasta que se consumió totalmente la carga útil, lo cual se monitoreó mediante LCMS. A la mezcla de reacción se añadió piperidina (0.03 mL por 10 mg de carga útil) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente (18-30 °C) durante una hora hasta que se removió el Fmoc, lo cual se monitoreó mediante LCMS. Después de filtrarse a través de membrana, la solución de reacción se purificó directamente mediante cromatografía instantánea de fase inversa o prep-HPLC para dar el compuesto **L4**.

[909] **Procedimiento general E para la síntesis del intermedio L4:**

[910] A una solución de Boc-Val-Ala-OH o Boc-Val-Cit-OH (1.0 eq.) en DCM (0.2 mL por 10 mg de péptido) se añadieron DIPEA (2.0 eq.) y HATU (1.2 eq.) a 20-25 °C. La mezcla se agitó a 20-25 °C durante 30 minutos, seguido por la adición de anilina (1.1 eq.) y se agitó adicionalmente durante 16 horas hasta que el péptido se consumió totalmente, lo cual se monitoreó mediante LCMS. A la mezcla de reacción se añadió luego TFA (0.05 mL por 10 mg de péptido). La mezcla se agitó a 20-25 °C durante otra hora. Los compuestos volátiles se removieron bajo presión reducida y el residuo se purificó directamente mediante prep-HPLC (método B) para dar el compuesto **L4**.

[911] **Procedimiento general F para la síntesis del intermedio L4:**

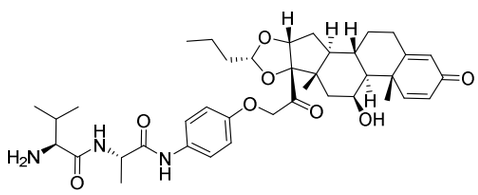
[912] A una solución de Fmoc-Val-Ala-OH (1.2 eq.) en DMF (0.2 mL por 10 mg de péptido) se añadieron DIPEA (3.0 eq.) y HATU (1.4 eq.) a 20-25 °C. La mezcla se agitó a 20-25 °C durante 5 minutos, seguido por la adición de anilina (1.0 eq.) y la mezcla resultante se agitó adicionalmente durante 2 horas hasta que el péptido se consumió totalmente, lo cual se monitoreó mediante LCMS. A la mezcla de reacción se añadió luego piperidina (5.0 eq.). La mezcla se agitó a 20-25 °C durante 2 horas. Después de filtrarse a través de membrana, la solución de reacción se purificó directamente mediante cromatografía instantánea de fase inversa (acetonitrilo al 0-100% en bicarbonato de amonio acuoso (10 mM)) o prep-HPLC (método B) para dar el compuesto **L4**.

EJEMPLO 92

[913] Este ejemplo se refiere a los compuestos en la Tabla 4 y la FIGURA 33.

[914] Preparación del compuesto **L4a**, **VA-*R*-6-VI**

[915] **(2*S*)-2-Amino-*N*-[(1*S*)-1-[(4-{2-[(1*S*,2*S*,4*R*,6*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*S*,13*R*)-11-hidroxi-9,13-dimetil-16-oxo-6-propil-5,7-dioxapentaciclo[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]icosa-14,17-dien-8-il]-2-oxoetoxi}fenil)carbamoil]etil]-3-metilbutanamida**



[916] Siguiendo el Procedimiento general E (rendimiento del 65%) o F (rendimiento del 53%) a partir de ***R*-6-VI**, el compuesto **L4a** se obtuvo como un sólido blanco. ESI m/z: 692 $(M + H)^+$. ^{1}H NMR (500 MHz, $DMSO_{d6}$) δ 9.95 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 8.19-8.09 (m, 1H), 7.54-7.47 (m, 2H), 7.33 (d, J = 10.1 Hz, 1H), 6.85 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 6.22-6.13 (m, 1H), 5.93 (s, 1H), 5.14-5.04 (m, 1H), 4.86-4.77 (m, 2H), 4.75 (d, J = 4.2 Hz, 1H), 4.70 (t, J = 4.3 Hz, 1H), 4.48-4.38 (m, 1H), 4.34 (s, 1H), 3.01 (t, J = 5.0 Hz, 1H), 2.58-2.52 (m, 1H), 2.33-

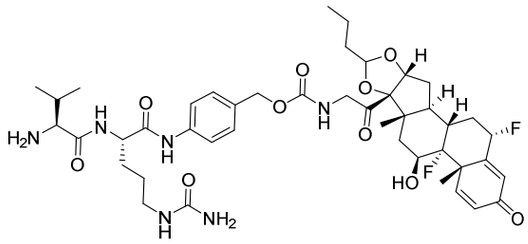
2.25 (m, 1H), 2.13-2.06 (m, 1H), 2.03-2.00 (m, 1H), 1.95-1.89 (m, 1H), 1.88-1.84 (m, 2H), 1.63-1.53 (m, 5H), 1.45-1.33 (m, 6H), 1.32-1.26 (m, 3H), 1.06-0.93 (m, 2H), 0.92-0.82 (m, 10H), 0.80-0.75 (m, 3H) ppm.

EJEMPLO 93

[917] Este ejemplo se refiere a los compuestos en la Tabla 4 y la FIGURA 33.

[918] Preparación del compuesto **L4b, vcPAB-4b**

[919] ***N*-{2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-Difluoro-11-hidroxi-9,13-dimetil-16-oxo-6-propil-5,7-dioxapentaciclo[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]icosa-14,17-dien-8-il]-2-oxoetil}carbamato de {4-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-amino-3-metilbutanamido]-5-(carbamoilamino)pentanamido]fenil}metilo**



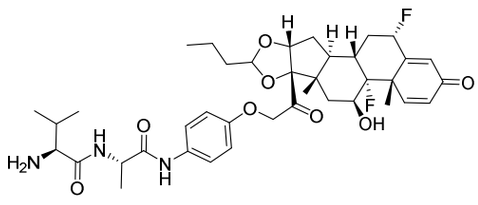
[920] Siguiendo el Procedimiento general D a partir del compuesto **4b**, (93 mg, 0.20 mmol), el compuesto **vcPAB-4b** (0.13 g, rendimiento del 73%) se obtuvo después de la purificación mediante cromatografía instantánea de fase inversa (acetonitrilo al 50-80% en bicarbonato de amonio acuoso (10 mM) como un sólido blanco. ESI m/z: 871 $(M + H)^+$.

EJEMPLO 94

[921] Este ejemplo se refiere a los compuestos en la Tabla 4 y la FIGURA 33.

[922] Preparación del compuesto **L4c, VA-6-I**

[923] **(2*S*)-2-Amino-*N*-[(1*S*)-1-[(4-{2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-difluoro-11-hidroxi-9,13-dimetil-16-oxo-6-propil-5,7-dioxapentaciclo[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]icosa-14,17-dien-8-il]-2-oxoetoxi}fenil)carbamoil]etil]-3-metilbutanamida**



[924] Siguiendo el Procedimiento general E a partir del compuesto **6-I**, (0.50 g, 0.90 mmol) con Boc-Val-Ala-OH, el compuesto crudo **L4c** (0.69 g, rendimiento del 72% en 2

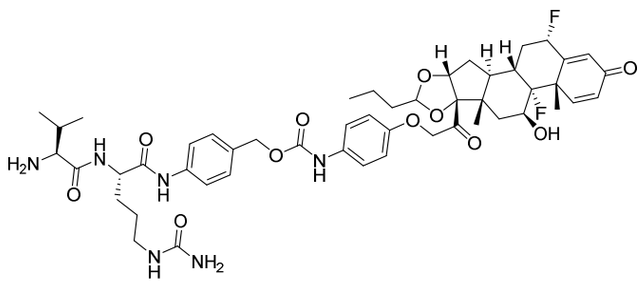
etapas) se obtuvo sin purificación como aceite amarillo, que se utilizó directamente para la siguiente etapa. ESI m/z: 728 $(M + H)^+$.

EJEMPLO 95

[925] Este ejemplo se refiere a los compuestos en la Tabla 4 y la FIGURA 33.

[926] Preparación del compuesto **L4d, VC-PAB-6-I**

[927] ***N*-(4-{2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-Difluoro-11-hidroxi-9,13-dimetil-16-oxo-6-propil-5,7-dioxapentaciclo[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]icosa-14,17-dien-8-il]-2-oxoetoxi}fenil)carbamato de {4-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-amino-3-metilbutanamido]-5-(carbamoilamino)pentanamido]fenil}metilo**



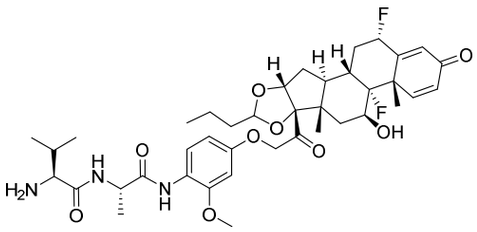
[928] Siguiendo el Procedimiento general E a partir del compuesto **6-I**, (87 mg, 0.15 mmol), el compuesto **L4d** (80 mg, rendimiento del 64%) se obtuvo como un sólido blanco después de la purificación mediante prep-HPLC (método B). ESI m/z: 963 $(M + H)^+$. ^{1}H NMR (500 MHz, $DMSO_{d6}$) δ 10.22 (s, 1H), 9.57 (s, 1H), 8.69 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 8.08 (s, 3H), 7.61 (d, J = 6.8 Hz, 2H), 7.36 (d, J = 6.8 Hz, 3H),7.27 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.22-7.0 (m, 1H), 6.84 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 6.30 (dd, J = 8.0 Hz, J = 1.6 Hz, 1H), 6.11 (s, 1H), 6.10-6.0 (m, 1H), 5.72-5.55 (m, 1H), 5.52 (s, 1H), 5.48 (s, 1H), 5.16-5.05 (m, 3H), 4.88-4.80 (m, 1H), 4.80-4.76 (m, 1H), 4.75-4.70 (m, 1H), 4.55-4.48 (m, 1H), 4.25-4.20 (m, 1H), 3.70-3.60 (m, 1H), 3.12-2.90 (m, 2H), 2.70-2.55 (m, 1H), 2.40-2.20 (m, 1H), 2.15-2.0 (m, 3H), 1.86-1.75 (m, 1H), 1.75-1.65 (m, 1H), 1.64-1.54 (m, 5H), 1.49 (s, 4H), 1.46-1.34 (m, 4H), 0.97-0.91 (m,5H), 0.90-0.85 (m, 4H), 0.85-0.80 (m, 3H) ppm.

EJEMPLO 96

[929] Este ejemplo se refiere a los compuestos en la Tabla 4 y la FIGURA 33.

[930] Preparación del compuesto **L4e, VA-6-II**

[931] **(2*S*)-2-Amino-*N*-[(1*S*)-1-[(4-{2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-difluoro-11-hidroxi-9,13-dimetil-16-oxo-6-propil-5,7-dioxapentaciclo[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]icosa-14,17-dien-8-il]-2-oxoetoxi}-2-metoxifenil)carbamoil]etil]-3-metilbutanamida**



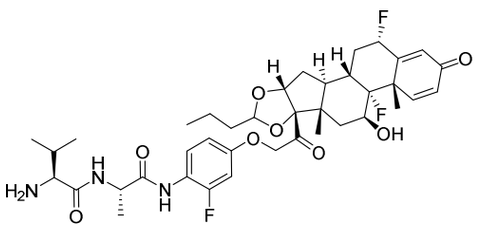
[932] Siguiendo el Procedimiento general F a partir del compuesto **6-III**, (0.10 g, 0.17 mmol), se obtuvo el compuesto crudo **L4e** (0.12 g, rendimiento del 82% en 2 etapas) que se utilizó para la siguiente etapa sin purificación adicional. ESI m/z: 758 $(M + H)^+$.

EJEMPLO 97

[933] Este ejemplo se refiere a los compuestos en la Tabla 4 y la FIGURA 33.

[934] Preparación del compuesto **L4f, VA-6-III**

[935] **(2*S*)-2-Amino-*N*-[(1*S*)-1-[(4-{2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-difluoro-11-hidroxi-9,13-dimetil-16-oxo-6-propil-5,7-dioxapentaciclo[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]icosa-14,17-dien-8-il]-2-oxoetoxi}-2-fluorofenil)carbamoil]etil]-3-metilbutanamida**



[936] Siguiendo el Procedimiento general F a partir del compuesto **L4f**, (95 mg, 0.17 mmol), se obtuvo el compuesto del título crudo **L4f** (0.10 g, rendimiento del 66% en 2 etapas) que se utilizó para la siguiente etapa sin purificación adicional. ESI m/z: 746 $(M + H)^+$.

EJEMPLO 98

[937] Este ejemplo se refiere a los compuestos en la Tabla 4 y la FIGURA 33.

[938] Síntesis de intermedios de Enlazador-Cargas útiles L6

[939] Procedimiento general: A una solución de compuesto **L5** (1.2 eq.) en DMF (0.2 mL por 10 mg de **L5**) se añadieron HATU (1.4 eq.) y DIPEA (3 eq.) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 5 minutos antes de la adición del compuesto **L4** (1.0 eq.). La mezcla de reacción se agitó luego a temperatura ambiente durante 2 horas hasta que el compuesto **L4** se consumió totalmente, lo cual se monitoreó mediante LCMS. Después de filtrarse a través de membrana, la solución de reacción se purificó directamente mediante prep-HPLC para dar el ciclooctino **L6**.

EJEMPLO 99

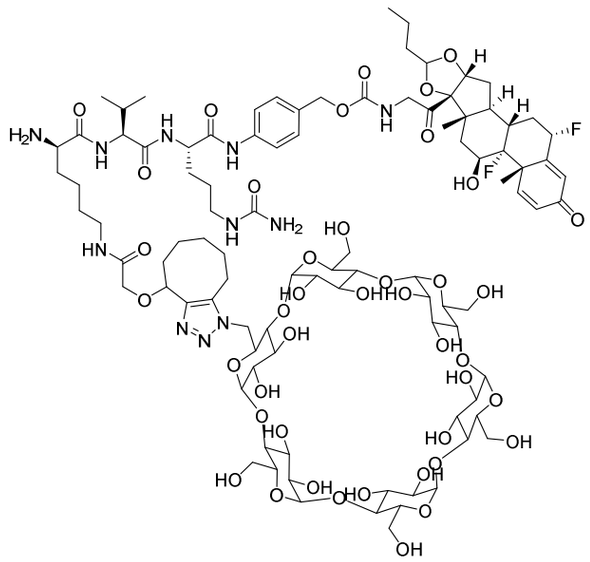
[940] Procedimiento general H para hacer intermedios 8

[941] A una solución de **L6** en DMF (0.5 mL por 10 mg de **L6**) se añadieron compuesto azido (**L7a** (CD-N_3), **L7b** (N_3-PEG_4-sulfonato) o **L7c** (N_3-dualsulfonato), 1.5 eq. vs **L6**) y DIPEA (0.1 mL por 10 mg de **L6**) a temperatura ambiente. Después de agitar a 30 °C durante 24 horas, la mayoría de los materiales de partida se consumieron, lo cual se monitoreó mediante LCMS. La mezcla de reacción se purificó directamente mediante prep-HPLC para dar el compuesto **L8** como un sólido blanco.

EJEMPLO 100

[942] Preparación del compuesto L8a, **aCDCCK-vcPAB-4b**

[943] ***N*-{2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-Difluoro-11-hidroxi-9,13-dimetil-16-oxo-6-propil-5,7-dioxapentaciclo[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]icosa-14,17-dien-8-il]-2-oxoetil}carbamato de {4-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-[(2*R*)-2-amino-6-{2-[(1-{[31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42-dodecahidroxi-10,15,20,25,30-pentaquis(hidroximetil)-2,4,7,9,12,14,17,19,22,24,27,29-dodecaoxaheptaciclo[26.2.2.2^{3,6}.2^{8,11}.2^{13,16}.2^{18,21}.2^{23,26}]dotetracontan-5-il]metil}-1*H*,4*H*,5*H*,6*H*,7*H*,8*H*,9*H*-ciclooctа[d][1,2,3]triazol-4-il)oxi]acetamido}hexanamido]-3-metilbutanamido]-5-(carbamoilamino)pentanamido]fenil}metilo (L8a)**



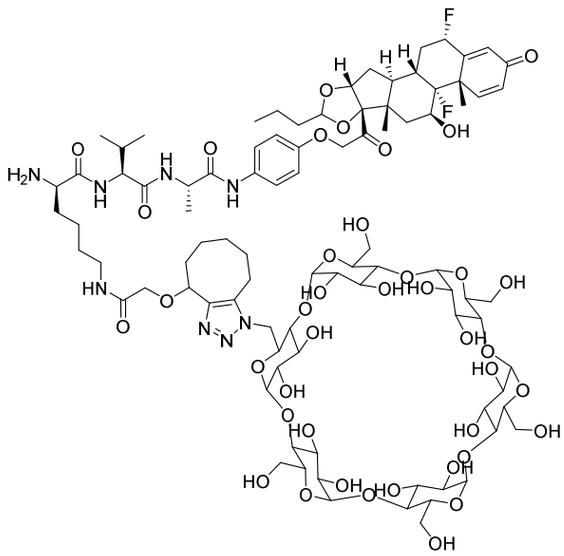
[944] Siguiendo el Procedimiento general H para hacer el compuesto **L6a** (0.12 g, 0.10 mmol) con **L7a**, el compuesto **L8a** (0.11 g, rendimiento del 51%) se obtuvo como un sólido blanco. ESI m/z: 1081 $(M/2 + H)^+$. ^{1}H NMR (400 MHz, $DMSO_{d6}$) δ 10.05 (s, 1H), 8.30-7.80 (m, 3H), 7.80-7.55 (m, 2H), 7.50-7.40 (m, 1H), 7.40-7.25 (m, 3H), 6.30 (d, *J* = 12.5 Hz, 1H), 6.11 (s, 1H), 6.0 (s, 1H), 5.80-5.35 (m, 16H), 5.25-5.05 (m, 1H), 4.97 (s, 2H), 4.90-4.50

(m, 13H), 4.50-4.00 (m, 5H), 3.95-3.55 (m, 22H), 3.30-3.20 (m, 8H), 3.20-3.00 (m, 4H), 3.00-2.85 (m, 5H), 2.25-2.20 (m, 2H), 2.10-1.95 (m, 4H), 1.80-1.00 (m, 30H), 1.00-0.90 (m, 4H),0.90-0.80 (m, 14H) ppm.

EJEMPLO 101

[945] Preparación del compuesto **L8d**, **aCDCCK-VA-2168**

[946] **(2*R*)-2-Amino-*N*-[(1*S*)-1-{[(1*S*)-1-[(4-{2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-difluoro-11-hidroxi-9,13-dimetil-16-oxo-6-propil-5,7-dioxapentaciclo[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]icosa-14,17-dien-8-il]-2-oxoetoxi}fenil)carbamoil]etil]carbamoil}-2-metilpropil]-6-{2-[(1-{[31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42-dodecahidroxi-10,15,20,25,30-pentaquis(hidroximetil)-2,4,7,9,12,14,17,19,22,24,27,29-dodecaoxaheptaciclo [26.2.2.2^{3,6}.2^{8,11}.2^{13,16}.2^{18,21}.2^{23,26}]dotetracontan-5-il]metil}-1*H*,4*H*,5*H*,6*H*,7*H*,8*H*,9*H*-ciclooctа[d][1,2,3]triazol-4-il)oxi]acetamido}hexanamida (L8d)**



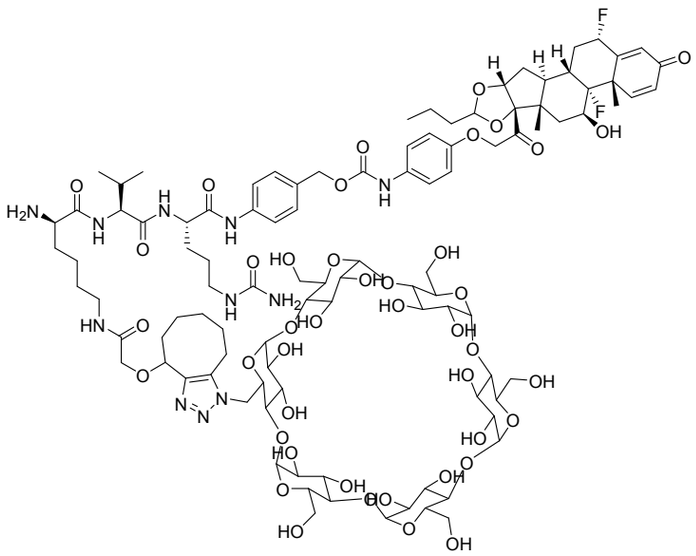
[947] Siguiendo el Procedimiento general H a partir de **L6b** (60 mg, 59 µmol) con **L7a**, el compuesto **L8d** (40 mg, rendimiento del 34%) se obtuvo como un sólido blanco. ESI m/z: 1009.5 $(M/2 + H)^+$.

EJEMPLO 102

[948] Preparación del compuesto L8f, aCDCCK-vcPAB-6-I

[949] *N*-(4-{2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-Difluoro-11-hidroxi-9,13-dimetil-16-oxo-6-propil-5,7-dioxapentaciclo[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]icosa-14,17-dien-8-il]-2-oxoetoxi}fenil)carbamato de {4-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-[(2*R*)-2-amino-6-{2-[(1-{[31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42-dodecahidroxi-10,15,20,25,30-pentaquis(hidroximetil)-2,4,7,9,12,14,17,19,22,24,27,29-

dodecaoxaheptaciclo[26.2.2.2^{3,6}.2^{8,11}.2^{13,16}.2^{18,21}.2^{23,26}]dotetracontan-5-il]metil}-1*H*,4*H*,5*H*,6*H*,7*H*,8*H*,9*H*-ciclooctа[d][1,2,3]triazol-4-il)oxi]acetamido}hexanamido]-3-metilbutanamido]-5-(carbamoilamino)pentanamido]fenil}metilo



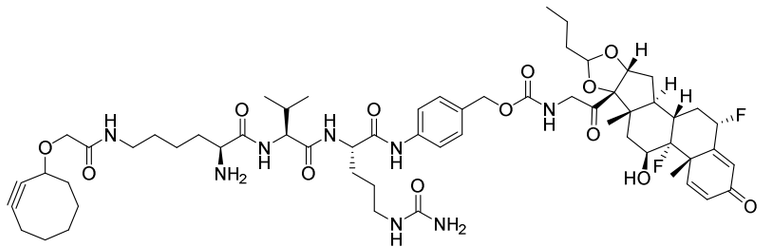
[950] Siguiendo el Procedimiento general H a partir de **L6c** (0.10 g, 80 µmol) con **L7a**, el compuesto **L8f** (0.11 g, rendimiento del 58%) se obtuvo como un sólido blanco. ESI m/z: 751 $(M/3 + H)^+$.

EJEMPLO 103

[951] Preparación de los Enlazador-Cargas útiles **LP101** a **LP116**

[952] Preparación del compuesto LP1: L6a (COT-dLys-vcPAB-4b)

[953] *N*-{2-[(1*S*,2*S*,4*R*, 8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-Difluoro-11-hidroxi-9,13-dimetil-16-oxo-6-propil-5,7-dioxapentaciclo[10.8.0.0^{2,9}-12^{,8}-12,^{,18}]icosa-14,17-dien-8-il]-2-oxoetil}carbamato de {4-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-[(2*R*)-2-amino-6-[2-(ciclooct-2-in-1-iloxi)acetamido]hexanamido]-3-metilbutanamido]-5-(carbamoilamino)pentanamido]fenil}metilo



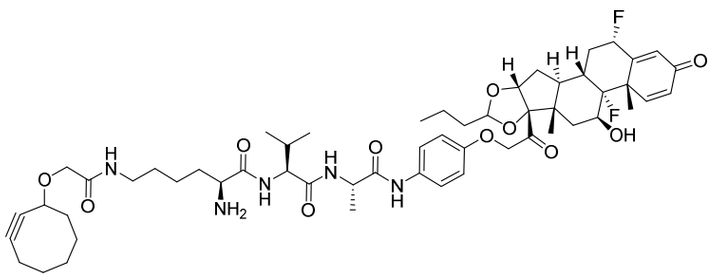
[954] Siguiendo el Procedimiento general G para hacer el compuesto **L4b** (0.20 g, 0.23 mmol), el compuesto **L6a** (0.12 g, rendimiento del 45%) se obtuvo como un sólido blanco después de la prep-HPLC (método B). ESI m/z: 1385 $(M + H)^+$. ^{1}H NMR (400 MHz, $MeOD_{d4}$) δ 7.65-7.55 (m, 2H), 7.40-7.26 (m, 3H), 6.39-6.27 (m, 2H), 5.65-5.45 (m, 1H), 5.13-5.01 (m, 2H), 4.71-4.50 (m, 2H), 4.40-4.14 (m, 4H), 4.11-3.82 (m, 3H), 3.46-3.39 (m, 1H),

3.29-3.09 (m, 4H), 2.76-2.54 (m, 1H), 2.41-2.10 (m, 7H), 2.09-1.99 (m, 1H), 1.96-1.80 (m, 5H), 1.78-1.21 (m, 23H), 1.06-0.82 (m, 12H) ppm.

EJEMPLO 104

[955] Preparación del compuesto **LP102: L6b (COT-dLys-VA-6-I)**

[956] **(2*R*)-2-Amino-6-[2-(ciclooct-2-in-1-iloxi)acetamido]-*N*-[(1*S*)-1-{[(1*S*)-1-[(4-{2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-difluoro-11-hidroxi-9,13-dimetil-16-oxo-6-propil-5,7-dioxapentaciclo[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]icosa-14,17-dien-8-il]-2-oxoetoxi}fenil)carbamoil]etil]carbamoil}-2-metilpropil]hexanamida**

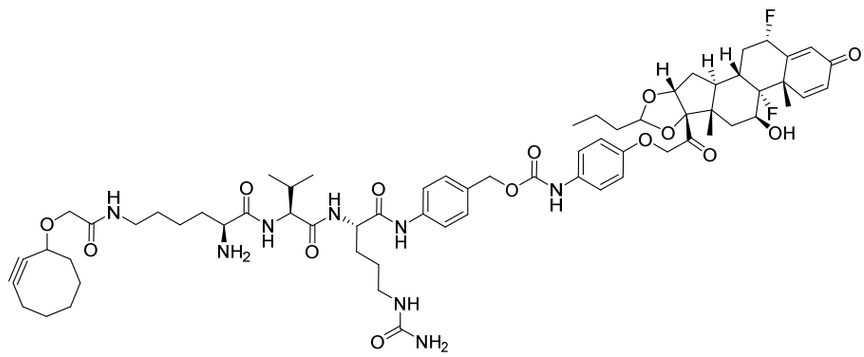


[957] Siguiendo el Procedimiento general G para hacer **L4c** (0.28 g, 0.38 mmol), el compuesto **L6b** (0.21 g, rendimiento del 46%) se obtuvo como un sólido blanco después de prep-HPLC (método B). ESI m/z: 1021.5 $(M + H)^+$. ^{1}H NMR (400 MHz, $MeOD_{d4}$) δ 7.33-7.60 (m, 3H), 6.87-6.91 (m ,2H), 6.32-6.37 (m, 2H), 5.47-5.65 (m, 1H), 5.07-5.30 (m, 1H), 4.72-4.86 (m, 3H), 4.34-4.51 (m, 3H), 3.83-4.20 (m, 3H), 3.33-3.49 (m, 1H), 3.14-3.27 (m, 3H), 2.59-2.75 (m, 1H), 1.31-2.39 (m, 33 H), 0.93-1.05 (m, 12H) ppm.

EJEMPLO 105

[958] Preparación del compuesto **LP103: L6c (COT-dLys-vcPAB-6-I)**

[959] ***N*-(4-{2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-Difluoro-11-hidroxi-9,13-dimetil-16-oxo-6-propil-5,7-dioxapentaciclo[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]icosa-14,17-dien-8-il]-2-oxoetoxi}fenil)carbamato de {4-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-[(2*R*)-2-amino-6-[2-(ciclooct-2-in-1-iloxi)acetamido]hexanamido]-3-metilbutanamido]-5-(carbamoilamino)pentanamido]fenil}metilo**



[960] Siguiendo el Procedimiento general G para hacer el compuesto **L4d** (0.14 g, 0.15 mmol), el compuesto **L6c** (0.10 g, rendimiento del 57%) se obtuvo como un sólido blanco después de la prep-HPLC (método B). ESI m/z: 1255.5 $(M + H)^+$. ^{1}H NMR (400 MHz, $MeOD_{d4}$) δ 7.61 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.32-7.39 (m, 4H), 6.84-6.88 (m, 2H), 6.31-6.36 (m, 2H), 5.43-5.63 (m, 1H), 5.05-5.16 (m, 3H), 4.71-4.83 (m ,1H), 4.50-4.54 (m,1H), 4.18-4.33 (m 3H), 3.00-2.85 (m, 2H), 3.40-3.51 (m, 1H), 3.00-3.29 (m, 6H), 1.31-2.35 (m, 34 H), 1.29 (t, J =7.2 Hz, 2H), 0.93-1.02 (m ,12H) ppm.

EJEMPLO 106

[961] Procedimiento general I para **LP104 a LP116:**

[962] A una solución de PEG_4-ácido **L9** (1.2-1.3 eq.) en DMF (1 mL por 10 mg de **L9**) se añadieron HATU (1.3 eq.) y DIPEA (5.0 eq.) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó a temperatura ambiente (19 °C) durante media hora, seguido por la adición de una solución de compuesto **L4** o **L8** (1.0 eq.) en DMF (0.6 mg por 10 mg de **L4** o **L8**). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas hasta que se consumió el compuesto **L4** o **L8**, lo cual se monitoreó mediante LCMS. Después de filtrarse a través de membrana, el filtrado se purificó directamente mediante prep-HPLC para dar el compuesto **L1**. (**L9a**: BCN-PEG_4-ácido, **L9b**: DIBAC-PEG_4-ácido, **L9c**: MAL-PEG_4-ácido)

[963] **Procedimiento general J para LP104 a LP116**

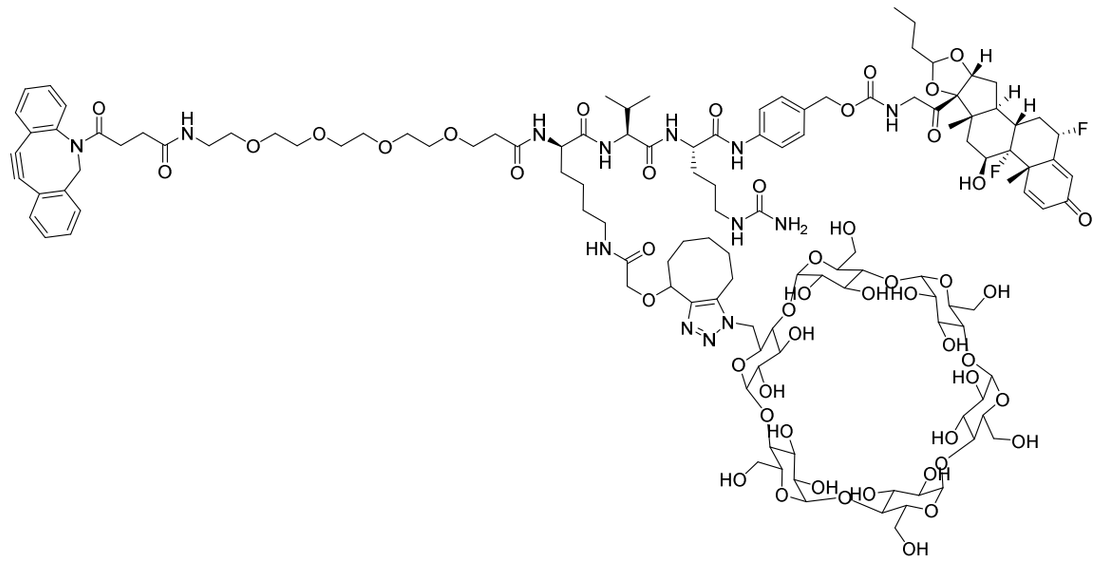
[964] A una solución de compuesto **L4** o **L8** (1.0 eq.) en DMF (1 mL por 50 mg) se añadieron compuesto DIBAC-PEG_4-NHS **L10b** (1.1-1.2 eq.) y DIPEA (5.0 eq.) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas, lo cual se monitoreó mediante LCMS. La mezcla de reacción se purificó directamente mediante prep-HPLC (método B) para dar el compuesto **L1**.

EJEMPLO 107

[965] Preparación del compuesto **LP104: L11a (DIBAC-PEG4-aCDCCK-vcPAB-4b**

[966] ***N*-{2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-Difluoro-11-hidroxi-9,13-dimetil-16-oxo-6-propil-5,7-dioxapentaciclo[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]icosa-14,17-dien-8-il]-2-**

oxoetil}carbamato de {4-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-[(2*R*)-2-[1-(4-{2-azatriciclo[10.4.0.0^{4,9}]hexadeca-1(12),4(9),5,7,13,15-hexaen-10-in-2-il}-4-oxobutanamido)-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-amido]-6-{2-[(1-{[31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42-dodecahidroxi-10,15,20,25,30-pentaquis(hidroximetil)-2,4,7,9,12,14,17,19,22,24,27,29-dodecaoxaheptaciclo[26.2.2.2^{3,6}.2^{8,11}.2^{13,16}.2^{18,21}.2^{23,26}]dotetracontan-5-il]metil}-1*H*,4*H*,5*H*,6*H*,7*H*,8*H*,9*H*-ciclooctа[d][1,2,3]triazol-4-il)oxi]acetamido}hexanamido]-3-metilbutanamido]-5-(carbamoilamino)pentanamido]fenil}metilo



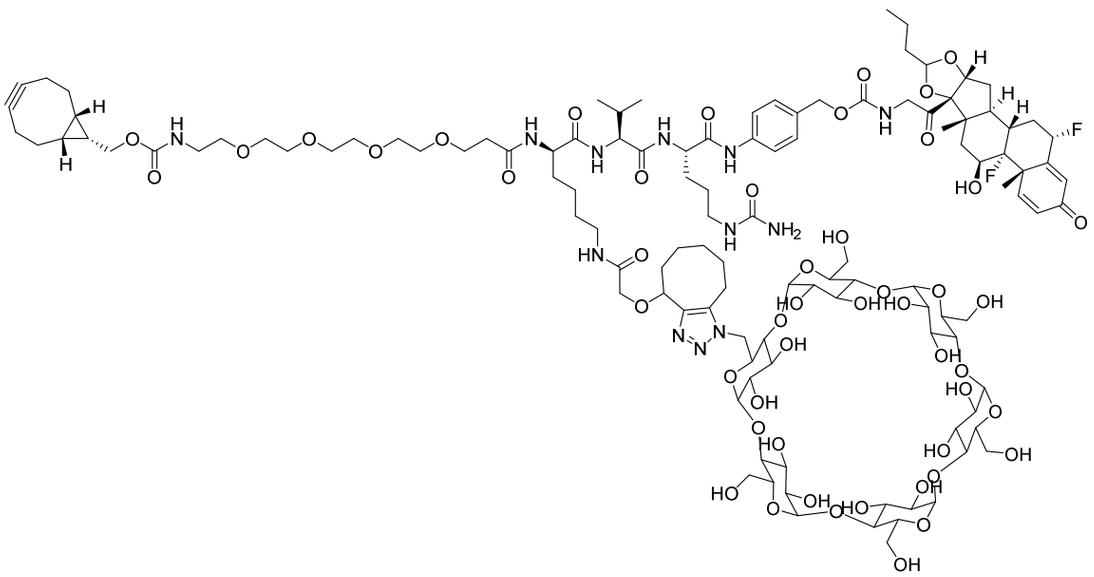
[967] Siguiendo el Procedimiento general I a partir del compuesto **L8a** (0.10 g, 46 µmol) con **L9b**, el compuesto **L1a** (26 mg, rendimiento del 22%) se obtuvo como un sólido blanco. ESI m/z: 1349 $(M/2 + H)^+$. ^{1}H NMR (500 MHz, $DMSO_{d6}$) δ 9.71 (s, 1H), 8.30-8.00 (m, 3H), 8.00-7.74 (m, 2H), 7.70-7.58 (m, 5H), 7.52-7.20 (m, 12H), 6.35-6.20 (m, 2H), 6.15-5.85 (m, 3H), 5.80-5.35 (m, 18H), 5.25-4.90 (m, 6H), 4.90-4.50 (m, 14H), 4.40-4.25 (m, 4H), 4.25-4.10 (m, 3H), 4.10-3.95 (m, 2H), 3.95-3.55 (m, 22H), 3.55-3.40 (m, 22H), 3.20-3.00 (m, 6H), 3.00-2.85 (m, 3H), 2.65-2.55 (m, 1H), 2.25-2.20 (m, 4H), 2.10-1.95 (m, 6H), 1.80-1.70 (m, 5H), 1.70-1.50 (m, 10H), 1.50-1.45 (m, 9H), 0.90-0.80 (m, 14H) ppm. HPLC *Anal.*: > 99%, Tiempo de retención: 6.23 min (método B).

EJEMPLO 108

[968] Preparación del compuesto **LP105: L11b (BCN-PEG4-aCDCCK-vcPAB-4b**

[969] **N-(14-{[(1R)-1-{[(1S)-1-{[(1S)-4-(Carbamoilamino)-1-[(4-{[({2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-difluoro-11-hidroxi-9,13-dimetil-16-oxo-6-propil-5,7-dioxapentaciclo[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]icosa-14,17-dien-8-il]-2-oxoetil}carbamoil)oxi]metil}fenil)carbamoil]butil]carbamoil}-2-metilpropil]carbamoil}-5-{2-[(1-{[31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42-dodecahidroxi-10,15,20,25,30-**

pentaquis(hidroximetil)-2,4,7,9,12,14,17,19,22,24,27,29-dodecaoxaheptaciclo[26.2.2.2^{3,6}.2^{8,11}.2^{13,16}.2^{18,21}.2^{23,26}]dotetracontan-5-il]metil}-1*H*,4*H*,5*H*,6*H*,7*H*,8*H*,9*H*-ciclooctа[d][1,2,3]triazol-4-il)oxi]acetamido}pentil]carbamoil}-3,6,9,12-tetraoxatetradecan-1-il)carbamato de (1R,8S,9S)-biciclo[6.1.0]non-4-in-9-ilmetilo

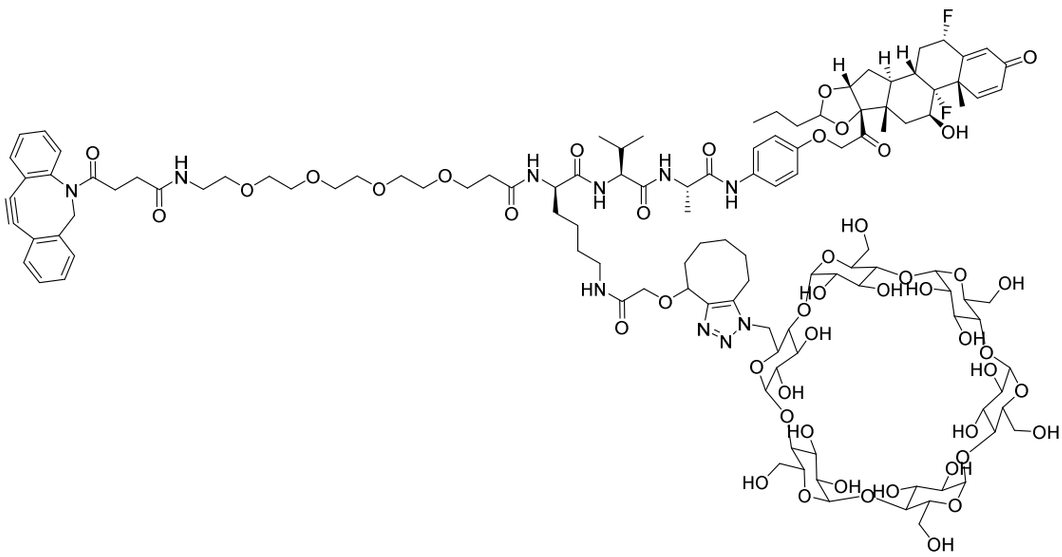


[970] Siguiendo el Procedimiento general I a partir del compuesto **L8a** (22 mg, 10 µmol) con BCN-PEG$_4$-ácido **L9a**, el compuesto **L1b** (10 mg, rendimiento del 38%) se obtuvo como un sólido blanco. ESI m/z: 1293 $(M/2 + H)^+$. ^{1}H NMR (500 MHz, $DMSO_{d6}$) δ 9.68 (s, 1H), 8.14-7.08 (m, 11H), 6.30 (d, *J* = 10.0 Hz, 1H), 6.11 (s, 1H), 5.99 (s, 1H), 5.67-5.31 (m, 15H), 5.21-3.33 (m, 61H), 3.13-2.60 (m, 22H), 2.30-1.96 (m, 46H), 0.95-0.80 (m, 17H) ppm. HPLC *Anal.*: Tiempo de retención: 7.31 min (48%) y 7.41 (52%) (método B).

EJEMPLO 109

[971] Preparación del compuesto **LP108: L11e (DIBAC-PEG4-aCDCCK-VA-6-I**

[972] **1-(4-{2-Azatriciclo[10.4.0.0^{4,9}]hexadeca-1(12),4(9),5,7,13,15-hexaen-10-in-2-il}-4-oxobutanamido)-*N*-[(1*R*)-1-{[(1*S*)-1-{[(1*S*)-1-[(4-{2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-difluoro-11-hidroxi-9,13-dimetil-16-oxo-6-propil-5,7-dioxapentaciclo[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]icosa-14,17-dien-8-il]-2-oxoetoxi}fenil)carbamoil]etil]carbamoil}-2-metilpropil]carbamoil}-5-{2-[(1-{[31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42-dodecahidroxi-10,15,20,25,30-pentaquis(hidroximetil)-2,4,7,9,12,14,17,19,22,24,27,29-dodecaoxaheptaciclo[26.2.2.2^{3,6}.2^{8,11}.2^{13,16}.2^{18,21}.2^{23,26}]dotetracontan-5-il]metil}-1*H*,4*H*,5*H*,6*H*,7*H*,8*H*,9*H*-ciclooctа[d][1,2,3]triazol-4-il)oxi]acetamido}pentil]-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-amida**

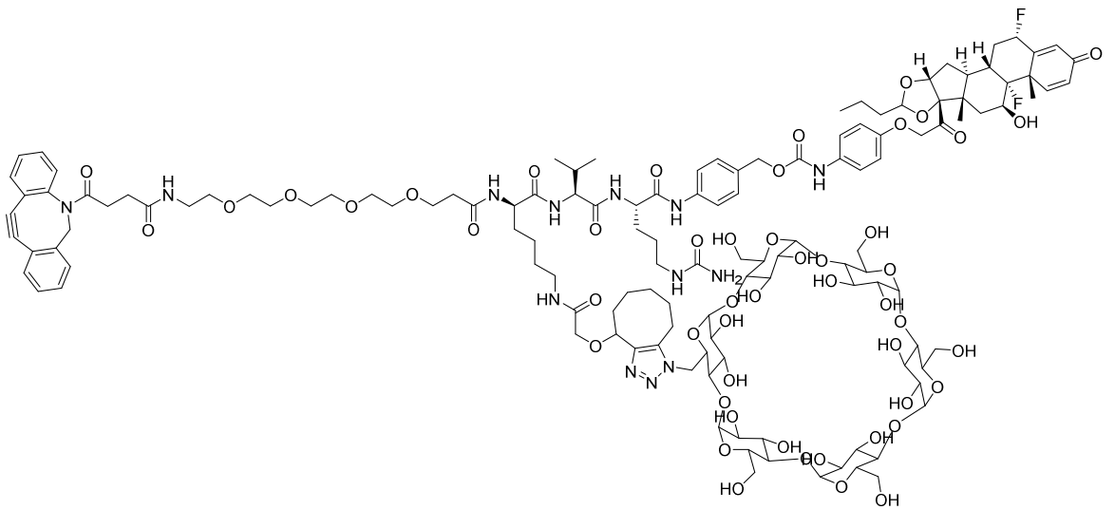


[973] Siguiendo el Procedimiento general J a partir del compuesto **L8d** (19 mg, 9.4 µmol) con DIBAC-PEG$_4$-NHS **L10b**, el compuesto **L1e** (7.0 mg, rendimiento del 29%) se obtuvo como un sólido blanco. ESI m/z: 1276.8 $(M/2 + H)^+$. ^{1}H NMR (400 MHz, $DMSO_{d6}$) δ 9.80-9.47 (m, 1H), 8.23-7.91 (m, 3H), 7.83-7.11 (m, 13H), 6.87-6.66 (m, 2H), 6.32-6.11 (m, 2H), 5.85-5.23 (m, 14H), 5.14-5.01 (m, 3H), 4.86-3.99 (m, 19H), 3.85-3.40 (m, 38H), 3.27-2.87 (m, 13H), 2.76-2.55 (m, 3H), 2.33-2.20 (m, 4H), 2.12-1.91 (m, 6H), 1.83-1.72 (m, 4H), 1.59-0.98 (m, 31H), 0.89-0.84 (m, 12H) ppm. HPLC *Anal.*: 100%, Tiempo de retención: 7.76 min (método B).

EJEMPLO 110

[974] Preparación del compuesto **LP110: L11g (DIBAC-PEG4-aCDCCK-vcPAB-6-I**

[975] ***N*-(4-{2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-Difluoro-11-hidroxi-9,13-dimetil-16-oxo-6-propil-5,7-dioxapentaciclo[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]icosa-14,17-dien-8-il]-2-oxoetoxi}fenil)carbamato de {4-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-[(2*R*)-2-[1-(4-{2-azatriciclo[10.4.0.0^{4,9}]hexadeca-1(12),4(9),5,7,13,15-hexaen-10-in-2-il}-4-oxobutanamido)-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-amido]-6-{2-[(1-{[31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42-dodecahidroxi-10,15,20,25,30-pentaquis(hidroximetil)-2,4,7,9,12,14,17,19,22,24,27,29-dodecaoxaheptaciclo[26.2.2.2^{3,6}.2^{8,11}.2^{13,16}.2^{18,21}.2^{23,26}]dotetracontan-5-il]metil}-1*H*,4*H*,5*H*,6*H*,7*H*,8*H*,9*H*-ciclooctа[d][1,2,3]triazol-4-il)oxi]acetamido}hexanamido]-3-metilbutanamido]-5-(carbamoilamino)pentanamido]fenil}metilo**

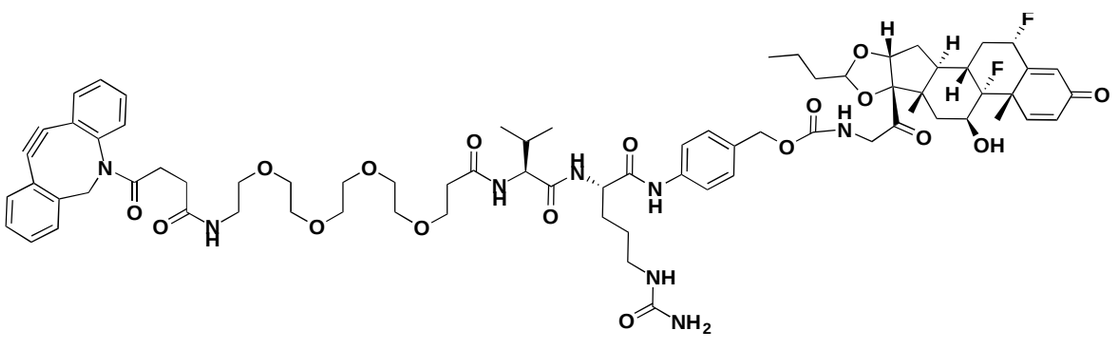


[976] Siguiendo el Procedimiento general I a partir del compuesto **L8d** (0.10 g, 44 µmol) con DIBAC-PEG$_4$-ácido **L9b**, el compuesto **L1g** (29 mg, rendimiento del 24%) se obtuvo como un sólido blanco. ESI m/z: 1394 $(M/2 + H)^+$. ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO$_{d4}$) δ 9.67 (s, 1H), 9.56 (s, 1H), 8.20-8.05 (m, 2H), 7.85-7.70 (m, 2H), 7.70-7.60 (m, 4H), 7.50-7.25 (m, 12H), 6.90-6.80 (m, 2H), 6.30 (d, *J* = 12.5 Hz, 1H), 6.11 (s, 1H), 6.0 (s, 1H), 5.80-5.35 (m, 16H), 5.25-5.00 (m, 6H), 4.90-4.65 (m, 10H), 4.65-4.45 (m, 4H), 4.40-4.00 (m, 6H), 3.95-3.55 (m, 22H), 3.50-3.30 (m, 22H), 3.20-2.85 (m, 12H), 2.65-2.55 (m, 2H), 2.45-2.35 (m, 2H), 2.35-2.20 (m, 3H), 2.15-1.95 (m,5H), 1.90-1.70 (m, 4H), 1.70-1.50 (m, 10H),1.50-1.00 (m, 18H), 0.90-0.80 (m, 12H) ppm. HPLC *Anal.*: Tiempo de retención: 7.93 (82%) y 8.02 (18%) min (método B).

EJEMPLO 111

[977] Preparación del compuesto **LP112: (DIBAC-PEG$_4$-aCDCCK-vcPAB-4b**

[978] ***N*-{2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-Difluoro-11-hidroxi-9,13-dimetil-16-oxo-6-propil-5,7-dioxapentaciclo[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]icosa-14,17-dien-8-il]-2-oxoetil}carbamato de {4-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-[1-(4-{2-azatriciclo[10.4.0.0^{4,9}]hexadeca-1(12),4(9),5,7,13,15-hexaen-10-in-2-il}-4-oxobutanamido)-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-amido]-3-metilbutanamido]-5-(carbamoilamino)pentanamido]fenil}metilo**



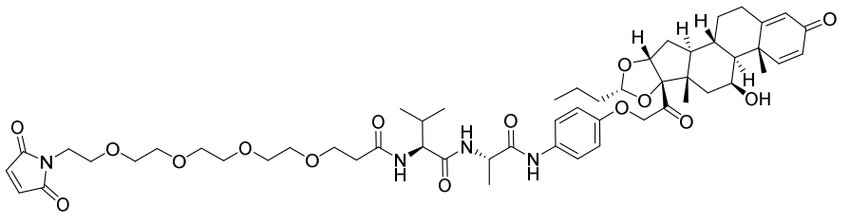
[979] Siguiendo el Procedimiento general J a partir del compuesto **L4b** (43 mg, 50

µmol) con DIBAC-suc-PEG_4-ácido (**L9b**), el compuesto del título **L12** (16 mg, rendimiento del 23%) se obtuvo después de la purificación mediante prep-HPLC (método B) como un sólido blanco. ESI m/z: 1406 $(M+H)^+$. ^1H NMR ($DMSO_{d6}$, 500 MHz) δ 9.99 (s, 1H), 8.11 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.88 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.80-7.75 (m, 1H), 7.70-7.66 (m, 1H), 7.65-7.60 (m, 3H), 7.53-7.33 (m, 6H), 7.33-7.28 (m, 3H), 6.30 (dd, *J* = 10.0 Hz y 1.5 Hz, 1H), 6.11 (s, 1H), 6.10-6.00 (m, 1H), 5.72-5.55 (m, 2H), 5.41 (s, 2H), 5.05-5.01 (m, 1H), 4.97 (s, 2H), 4.80-4.72 (m, 1H), 4.60-4.58 (m, 1H), 4.43-4.33 (m, 1H), 4.25-4.10 (m, 3H), 3.88-3.80 (m, 1H), 3.65-3.55 (m, 3H), 3.50-3.40 (m, 12H), 3.30-3.25 (m, 2H), 3.12-2.90 (m, 4H), 2.70-2.55 (m, 2H), 2.48-2.35 (m, 2H), 2.30-2.20 (m, 2H), 2.15-1.95 (m, 4H), 1.86-1.65 (m, 3H), 1.64-1.54 (m, 5H), 1.49 (s, 4H), 1.46-1.34 (m, 5H), 0.90-0.80 (m, 12H) ppm. HPLC *Anal.*: 100%, Tiempo de retención: 7.40 min (método B).

EJEMPLO 112

[980] Preparación del compuesto **LP113: MAL-PEG4-VA-*R*-11-5**

[981] **1-(2,5-Dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)-*N*-[(1*S*)-1-{[(1*S*)-1-[(4-{2-[(1*S*,2*S*,4*R*,6*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*S*,13*R*)-11-hidroxi-9,13-dimetil-16-oxo-6-propil-5,7-dioxapentaciclo[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]icosa-14,17-dien-8-il]-2-oxoetoxi}fenil)carbamoil]etil]carbamoil}-2-metilpropil]-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-amida**



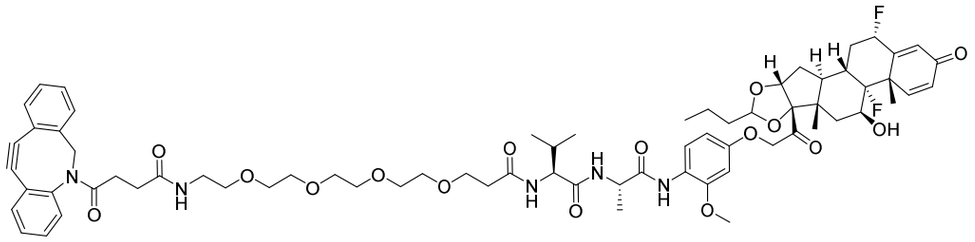
[982] Siguiendo el Procedimiento general J a partir del compuesto **L4a** (20 mg, 25 µmol) con MAL-PEG_4-NHS **L10c**, el compuesto **LP113** (7 mg, rendimiento del 27%) se obtuvo como un sólido blanco. ESI m/z: 1119 $(M + H)^+$. ^1H NMR (400 MHz, $DMSO_{d6}$) δ 9.89-9.60 (m, 1H), 8.51-6.73 (m, 10H), 6.18 (dd, *J* = 10.1, 1.7 Hz, 1H), 5.93 (s, 1H), 5.17-4.05 (m, 9H), 4.02-3.52 (m, 13H), 2.71-2.54 (m, 1H), 2.46-2.20 (m, 5H), 2.15-1.77 (m, 5H), 1.63-1.53 (m, 5H), 1.47-1.20 (m, 9H), 1.10-0.94 (m, 2H), 0.95-0.65 (m, 12H) ppm. HPLC *Anal.*: 100%, Tiempo de retención: 7.46 min (método B).

EJEMPLO 113

[983] Preparación del compuesto **LP114: L11j (DIBAC-PEG4-VA-6-II**

[984] **1-(4-{2-Azatriciclo[10.4.0.0^{4,9}]hexadeca-1(16),4(9),5,7,12,14-hexaen-10-in-2-il}-4-oxobutanamido)-*N*-[(1*S*)-1-{[(1*S*)-1-[(4-{2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-**

12,19-difluoro-11-hidroxi-9,13-dimetil-16-oxo-6-propil-5,7-dioxapentaciclo[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]icosa-14,17-dien-8-il]-2-oxoetoxi}-2-metoxifenil)carbamoil]etil]carbamoil}-2-metilpropil]-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-amida

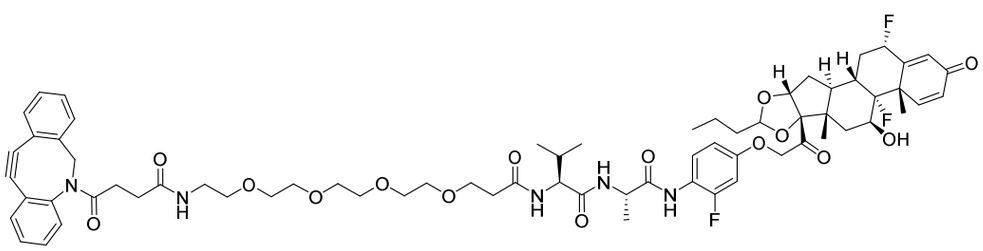


[985] Siguiendo el Procedimiento general I a partir de **L4e** (40 mg, 47 µmol) con DIBAC-suc-PEG$_4$-ácido **L9b**, el compuesto **L1j** (25 mg, rendimiento del 41%) como un sólido blanco. ESI m/z: 1293 $(M + H)^+$. ^{1}H NMR (400 MHz, $DMSO_{d6}$) δ 8.98-8.86 (m, 1H), 8.37-8.30 (m, 1H), 7.94-7.88 (m, 1H), 7.87-7.72 (m, 2H), 7.70-7.57 (m, 2H), 7.52-7.42 (m, 3H), 7.41-7.22 (m, 4H), 6.65-6.59 (m, 1H), 6.44-6.34 (m, 1H), 6.33-6.27 (m, 1H), 6.12 (s, 1H), 5.77-5.49 (m, 2H), 5.18-5.11 (m, 1H), 5.07-4.98 (m, 1H), 4.91-4.70 (m, 3H), 4.54-4.43 (m, 1H), 4.29-4.16 (m, 2H), 3.79 (s, 3H), 3.65-3.53 (m, 3H), 3.51-3.38 (m, 12H), 3.30-3.22 (m, 2H), 3.13-3.03 (m, 2H), 2.72-2.54 (m, 2H), 2.47-2.18 (m, 4H), 2.13-1.91 (m, 4H), 1.85-1.72 (m, 2H), 1.64-1.55 (m, 3H), 1.52-1.33 (m, 6H), 1.31-1.23 (m, 3H), 0.99-0.77 (m, 13H) ppm. HPLC *Anal.*: 99%, Tiempo de retención: 9.18 y 9.22 min (método B).

EJEMPLO 114

[986] Preparación del compuesto **LP115: L11k-(DIBAC-PEG4-VA-6-III**

[987] **1-(4-{2-Azatriciclo[10.4.0.0^{4,9}]hexadeca-1(12),4(9),5,7,13,15-hexaen-10-in-2-il}-4-oxobutanamido)-*N*-[(1*S*)-1-{[(1*S*)-1-[(4-{2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-difluoro-11-hidroxi-9,13-dimetil-16-oxo-6-propil-5,7-dioxapentaciclo[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]icosa-14,17-dien-8-il]-2-oxoetoxi}-2-fluorofenil)carbamoil]etil]carbamoil}-2-metilpropil]-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-amida**



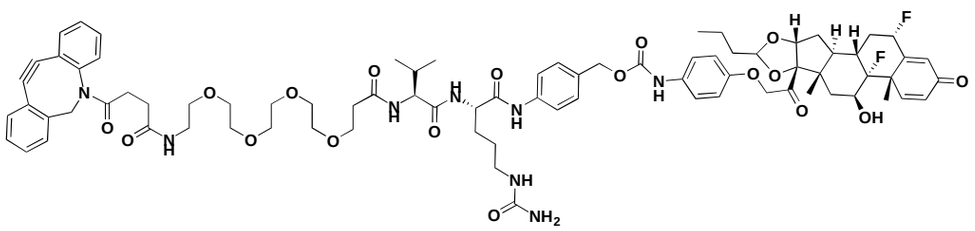
[988] Siguiendo el Procedimiento general I a partir de **L4f** (82 mg, 0.11 mmol) con DIBAC-suc-PEG$_4$-ácido **L9b**, el compuesto **L1k** (50 mg, rendimiento del 35%) como un

sólido blanco. ESI m/z: 1280 $(M + H)^+$. ^{1}H NMR (500 MHz, $DMSO_{d6}$) δ 9.54 (s, 1H), 8.41-8.15 (m, 1H), 8.01-7.17 (m, 12H), 6.90 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H), 6.73 (s, 1H), 6.31 (d, *J* = 9.9 Hz, 1H), 6.12 (s, 1H), 5.77-5.46 (m, 2H), 5.28-4.65 (m, 5H), 4.58-4.42 (m, 1H), 4.29-4.11 (m, 2H), 3.71-3.43 (m, 15H), 3.29 (s, 2H), 3.08 (s, 2H), 2.71-2.54 (m, 2H), 2.47-2.17 (m, 4H), 2.16-1.88 (m, 4H), 1.88-1.69 (m, 2H), 1.69-1.19 (m, 13H), 0.95-0.80 (m, 12H) ppm. ^{19}F NMR (376 MHz, DMSO) δ -121.11 y -121.92, -165.13 y -165.14, -186.38 y -186.40 ppm. HPLC *Anal.*: >99%, Tiempo de retención: 8.32 min (método B).

EJEMPLO 115

[989] Preparación del compuesto **LP116: L11k-(DIBAC-PEG4-VC-PAB-4b)**

[990] ***N*-(4-{2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-Difluoro-11-hidroxi-9,13-dimetil-16-oxo-6-propil-5,7-dioxapentaciclo[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]icosa-14,17-dien-8-il]-2-oxoetoxi}fenil)carbamato de {4-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-[1-(4-{2-azatriciclo[10.4.0.0^{4,9}]hexadeca-1(12),4(9),5,7,13,15-hexaen-10-in-2-il}-4-oxobutanamido)-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-amido]-3-metilbutanamido]-5-(carbamoilamino)pentanamido]fenil}metilo**



[991] Siguiendo el Procedimiento general I a partir del compuesto **L4k** (58 mg, 60 µmol) con DIBAC-suc-PEG_4-ácido **L9b**, el compuesto del título **L1v** (20 mg, rendimiento del 22%) se obtuvo como un sólido blanco. ESI m/z: 1499 $(M + H)^+$. ^{1}H NMR (400 MHz, $DMSO_{d6}$) δ 10.02 (s, 1H), 9.59 (s, 1H),8.14 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.88 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.80-7.75 (m, 1H), 7.70-7.66 (m, 1H), 7.65-7.60 (m, 3H), 7.53-7.45 (m, 3H), 7.40-7.28 (m, 7H), 6.84 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 6.30 (dd, *J* = 10.4 Hz, *J* = 1.6 Hz, 1H), 6.11 (s, 1H), 6.10-6.0 (m, 1H), 5.72-5.55 (m,1H), 5.52 (s, 1H), 5.43 (s, 2H), 5.16-5.05 (m, 4H), 4.88-4.70 (m, 3H), 4.43-4.33 (m, 1H), 4.25-4.20 (m, 2H), 3.65-3.55 (m, 3H), 3.50-3.40 (m, 12H), 3.30-3.25 (m, 2H), 3.12-2.90 (m, 4H), 2.70-2.55 (m, 2H), 2.48-2.43 (m, 1H), 2.40-2.35 (m, 1H), 2.30-2.20 (m, 2H), 2.15-1.95 (m, 4H), 1.86-1.75 (m, 2H), 1.64-1.54 (m, 5H), 1.49 (s, 4H), 1.46-1.34 (m, 4H), 1.23 (s, 2H), 0.90-0.80 (m, 12H) ppm. HPLC *Anal.*: 100%, Tiempo de retención: 7.83 min (método B).

EJEMPLO 116

[992] Conjugación ADC

[993] Las conjugaciones esteroide anticuerpo se esbozaron en la FIGURA 33. En un

ejemplo, los conjugados específicos al sitio se produjeron por medio de la conjugación en dos etapas de transglutaminasa microbiana (MTG EC 2.3.2.13, Zedira, Darmstadt, Alemania) (aquí, “basada en MTG”) de un anticuerpo mutado N297Q o N297D. En la primera etapa, el anticuerpo mutado N297Q se funcionalizó con azdio-PEG_3-amina mediante reacción enzimática basada en MTG. Véase, por ejemplo, la Solicitud de Patente PCT Internacional No. PCT/US17/19537 presentada el 24 de Febrero de 2017, incorporada aquí por referencia en su totalidad para todos los propósitos. En la segunda etapa, un enlazador-carga útil funcionalizado con alquino se unió al anticuerpo funcionalizado con azido mediante reacción de cicloadición [2+3] 1,3–dipolar (la FIGURA 33 representa un enlazador-carga útil funcionalizado con DIBAC (**LP112**) conjugado con un anticuerpo funcionalizado con azido derivado por medio de ciclización [2+3]). Este proceso proporcionó conjugados estequiométricos y específicos al sitio en aproximadamente 50 a 80% de rendimiento aislado.

[994] Conjugados esteroide-anticuerpo preparados en la FIGURA 33

[995] Este ejemplo demuestra un método para la conjugación específica al sitio, generalmente, de una carga útil a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo. Este ejemplo se refiere a la FIGURA 33.

[996] El siguiente ejemplo demuestra un método para hacer un conjugado anticuerpo funcionalizado con azido fármaco listado en la Tabla 16.

[997] Anticuerpo aglicosilado con un isotipo de IgG1 humano en BupH™ (anticuerpo pH 7.6lated con un isotipo de IgG1 humano en BupHonalized $_3$-amina (MW. 218.26 g/mol). La solución resultante se mezcló con transglutaminasa (25 U/mL; 5U MTG por mg de anticuerpo) dando como resultado una concentración final del anticuerpo en 0.5–3 mg/mL, y la solución se incubó luego a 37 °C durante 4–24 horas mientras se agitaba suavemente. La reacción se monitoreó mediante SDS–PAGE o ESI–MS. Tras la completación, el exceso de amina y MTG se removió mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) para generar el anticuerpo funcionalizado con azido. Este producto se analizó en SDS–PAGE y ESI–MS. La azido–$dPEG_3$–amina agregada a dos sitios -Q295 y Q297– del anticuerpo que resulta en un aumento de 804 Da para el conjugado anticuerpo aglicosilado 4DAR-PEG_3–azida. Los sitios de conjugación se identificaron y confirmaron en $EEQ^{Enlazador}YQ^{Enlazador}STYR$ para el anticuerpo funcionalizado con azido 4DAR mediante mapeo de secuencias de péptidos de cadenas pesadas digeridas con tripsina.

[998] El siguiente ejemplo demuestra un método para hacer unas conjugaciones

específicas al sitio de un fármaco a un anticuerpo utilizando reacciones de química clic.

[999] Los conjugados anticuerpo aglicosilado fármaco específicos al sitio con un IgG1 humano que contiene una mutación N297Q en la Tabla 16 descrita a continuación se prepararon mediante una reacción clic [2+3] entre anticuerpos funcionalizados con azido con un alquino que contiene enlazador-carga útil. Como se muestra en la Tabla 16, anti PRLR Ab–PEG_3–N_3 se conjugó con **LP112**, **LP104**, y **LP116**; y anti Fel D1 Ab–PEG_3–N_3 se conjugó a **LP112**, y **LP116**.

[1000] A continuación se detalla el procedimiento de conjugación. Un conjugado de anticuerpo específico al sitio con enlazador-carga útil (**LP**) se preparó incubando **mAb–PEG_3–N_3** (1–3 mg/mL) en un medio acuoso (por ejemplo, PBS, PBS que contenía glicerol al 5%, HBS) con ≥ 6 equivalentes molares de un **LP** disuelto en un solvente orgánico adecuado, tal como DMSO, DMF o DMA (es decir, la mezcla de reacción contiene solvente orgánico al 5-20%, v/v) en 24 °C a 37 °C durante más de 6 h. El progreso de la reacción se monitoreó mediante ESI-MS y la ausencia de **mAb–PEG_3–N_3** indicó la completación de la conjugación. La cantidad excedente del **LP** y el solvente orgánico se removieron mediante SEC por medio de elución con PBS, o por medio de cromatografía en columna de proteína A por medio de elución con amortiguador ácido seguido por neutralización con Tris (pH 8.0). Los conjugados purificados se analizaron mediante SEC, SDS–PAGE, y ESI–MS. En la Tabla 16 se muestra una lista de los conjugados esteroide anticuerpo a partir de los LPs correspondientes, sus pesos moleculares y valores ESI-DAR

[1001] En un ejemplo específico, el anticuerpo funcionalizado con azido (1 mg) en 0.800 mL de PBSg (PBS, glicerol al 5%, pH 7.4) se trató con seis equivalentes molares de DIBAC-PEG_4-D-Lys (COT-∝-CD)-VC-PABC-carga útil (conc. 10 mg/mL en DMSO) durante 6 -12 horas a temperatura ambiente y el enlazador carga útil (LP) excedente se removió mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC, Superdex 200 HR, GE Healthcare). El producto final se concentró mediante ultracentrifugación y se caracterizó mediante UV, SEC, SDS-PAGE y ESI-MS.

EJEMPLO 117

[1002] Caracterización de ADC mediante LC–ESI–MS

[1003] La medición de la masa intacta para las muestras de ADC mediante LC–ESI–MS se realizó para determinar el perfil de distribución de fármaco-carga útil y para calcular el DAR promedio. Cada muestra de prueba (20-50 ng, 5 uL) se cargó en una columna Acquity UPLC Protein BEH C4 (10K psi, 300 Å, 1.7 µm, 75µm × 100 mm; Cat No.

186003810). Después de 3 minutos de desalinización, la proteína se eluyó y los espectros de masas se adquirieron mediante un espectrómetro de masas Waters Synapt G2-Si.

[1004] Como se muestra en la siguiente FIGURA 34, los espectros de masas desconvolucionados mostraron un pico predominante para el anticuerpo anti-PRLR aglicosilado con un peso molecular de 144602 Da, y un pico predominante para el anticuerpo anti-PRLR funcionalizado con azido con un peso molecular de 145385 Da, indicando un aumento de 783 Da en comparación con su anticuerpo precursor aglicosilado (es decir, correspondiente a conjugaciones 4 amino-PEG_3-azida a cada anticuerpo aglicosilado). Además, el pico predominante para el conjugado **anti-PRLR-LP12** tuvo un peso molecular de 151015 Da, indicando un aumento de 5630 Da en comparación con su anticuerpo funcionalizado con azido (es decir, correspondiente a conjugaciones de 4 LPs (MW = 1405.6 Da) a cada anticuerpo aglicosilado). Del mismo modo, otros anti-PRLR-ADCs específicos al sitio tuvieron 3.9- 4DAR.

[1005] Como se muestra en la siguiente FIGURA 35, los espectros de masas desconvolucionados exhibieron un pico predominante para el anticuerpo anti-Fel D1 aglicosilado con un peso molecular de 145441 Da, y un pico predominante para el anticuerpo anti-Fel d1 funcionalizado con azido con un peso molecular de 146235 Da, indicando un aumento de 794 Da en comparación con su anticuerpo precursor aglicosilado (es decir, correspondiente a conjugaciones 4 amino-PEG_3-azida a cada anticuerpo aglicosilado). Además, el pico predominante para el conjugado **anti-Fel d1-LP12** tuvo un peso molecular de 151871.0 Da, indicando un aumento de 5635 Da en comparación con su anticuerpo funcionalizado con azido (es decir, correspondiente a conjugaciones de 4 LPs (MW = 1405.6 Da) a cada anticuerpo aglicosilado). De modo semejante, otros anti-Fel d1-ADCs específicos al sitio tuvieron 3.9-4DAR.

[1006] En la Tabla 16 se muestra una lista de conjugados esteroide anticuerpo no citotóxicos (ncADCs) a partir de los **LPs** correspondientes, sus pesos moleculares de los anticuerpos desnudos, los anticuerpos funcionalizado con azido, los LPs, y los ADCs de esteroides, así como los valores ESI-DAR. En la Tabla, Ab se refiere a un anticuerpo, Ab-N_3 se refiere a un anticuerpo funcionalizado con azido, y ncADC se refiere a un conjugado esteroide anticuerpo no citotóxico.

EJEMPLO 118

[1007] Ensayo enzimático *in vitro*

[1008] Escisión de enlazador-carga útil en ensayo de Catepsina B

[1009] Los enlazador-cargas útiles se probaron en un ensayo de Catepsina B. Después de 4 horas de incubación en Catepsina B (CapB) con y sin inhibidor de CapB (VA074), tanto los enlazador-cargas útiles como la carga útil libre se evaluaron utilizando LC-MS/MS. Los resultados indicaron que los enlazador-cargas útiles hidrofílicos (**LP104**) podrían ser escindidos mediante CapB y liberaron más carga útil (**4b**) en comparación con los enlazador-cargas útiles no hidrofílicos (**LP12**).

[1010] El procedimiento del ensayo de CapB es el siguiente: Solución madre de enlazador- carga útil (10 mM en DMSO) se añadió a amortiguador de incubación (NaOAc 100 mM, ditiotreitol 10 mM, pH 5) para producir una solución de sustrato 50 µM. 4 µL de 0.47 µg/µL de catepsina B de hígado humano (Athens Research & Technology, Athens, GA) en NaOAc 50 mM, EDTA 1 mM, pH 5 se añadió a 196 µL de solución de sustrato 50 µM. La mezcla de reacción se incubó a 37 °C durante 4 h. Luego, 5µL de ácido acético y 150µL de acetonitrilo (que contenía osalmida como estándar interno) se añadieron a 50*µ*L de alícuotas de la mezcla de reacción. Después de agitación en vórtex, las muestras apagadas se congelaron en un congelador profundo a -70 °C, seguido por descongelación y centrifugación a 14,000 rpm. Luego se diluyeron alícuotas de 50 µL de los sobrenadantes resultantes con igual volumen de agua y se analizaron mediante LC-ESI-MS/MS para determinar la carga útil liberada.

TABLA 17. RESULTADOS DE LA ESCISIÓN DE CATEPSINA B

Compuesto	**Carga útil**	**Enlazador**			**Con o sin CA074**		**Tasa de conversión (%)**
		Pieza escindida	Enlazador hidrofílico	Pieza conjugada			
LP101	**4b**	vcPAB	/	Lk-CCK	Sin	Media	**48.20**
						RSD	
					Con	Media	<1.00
						RSD	
LP112	**4b**	vcPAB	/	Lk-DIBAC	Sin	Media	**20.8**
						RSD	
					Con	Media	<1.00
						RSD	
LP104	**4b**	vcPAB	aCDCCK	Lk-DIBAC	Sin	Media	**29.0**
						RSD	
					Con	Media	<1.00
						RSD	
LP102	**6-I**	Val-Ala	/	Lk-CCK	Sin	Media	**22.72**
						RSD	
					Con	Media	<1.00
						RSD	

LP108	**6-I**	Val-Ala	aCDCCK	Lk-DIBAC	Sin	Media	
						RSD	
					Con	Media	
						RSD	
LP116	**6-I**	vcPAB	/	Lk-DIBAC	Sin	Media	
						RSD	
					Con	Media	
						RSD	<1.00
LP103	**6-I**	vcPAB	/	Lk-CCK	Sin	Media	**29.0**
						RSD	
					Con	Media	<1.00
						RSD	

[1011] El experimento de ensayo de CapB incluyó el siguiente procedimiento.

1. Precalentar amortiguador de ensayo: NaOAc 0.1 M/DTT 0.01 M (pH 5.0)

2. Soluciones de enriquecimiento para compuestos de prueba: Soluciones de enriquecimiento 25μM para compuestos de prueba: Agregar 2μL de solución madre 5 mM en 398 μL de amortiguador NaOAc 0.1 M/DTT 0.01 M (pH 5.0).

3. Preparar 0.47 μg/μL de Catepsina B en NaOAc 50 mM/EDTA 1 mM (pH 5.0). Poner en hielo

4. Muestras sin CA074: Agregar 4μL de 0.47 μg/μL de Catepsina B en 196 μL de soluciones de enriquecimiento 25 μM (de la etapa 2), incubar los tubos a 37 °C.

5. Muestras con CA074: Agregar 4μL de 0.47 μg/μL de Catepsina B con 4μL de Inhibidor 10 mM (CA074) en 196 μL de soluciones de enriquecimiento 25μM (de la etapa 2), incubar los tubos a 37 °C.

6. Después de 4 horas, se tomaron alícuotas de 5μL (con CA074 y sin CA074) para la prueba de actividad enzimática (etapa 15-17). Mientras tanto, se tomaron alícuotas de 50 μL en el punto de tiempo (4 h), agregando 5 μL de ácido acético, y luego agregar 150 μL de ACN (IS) para detener la reacción.

7. Después del apagado, agitar la placa y centrifugarla a 14000 rpm.

8. Transferir 50μL del sobrenadante de cada pozo a una placa de muestra de 96 pozos que contiene 50μL de agua ultra pura (Millipore, ZMQS50F01) para el análisis de LC/MS.

[1012] El experimento de ensayo de CapB incluyó los compuestos de referencia y el siguiente procedimiento.

9. Precalentar el amortiguador de ensayo: fosfato de Na/K 100 mM, pH 6.0, con EDTA 1.33 mM y DTT 2 mM.

10. Preparar 0.024 μg/μL de Catepsina B: Agregar 1 μL de 0.47 μg/μL de reserva de

Catepsina B en 19 µL de amortiguador de ensayo (de la etapa 11).

11. Agregar 2 µL de 0.024 µg/µL de Catepsina B (de la etapa 12) a una placa de 96 pozos opaca.

12. Agregar 96 µL de amortiguador de ensayo a cada muestra.

13. Agregar 2µL del sustrato 10 mM Z-RR-MNA (concentración final 200 µM).

Para el control negativo (con inhibidor), agregar 2µL de Inhibidor 10 mM (CA074).

14. Leer inmediatamente las muestras en un modo cinético en excitación de 340 nm/emisión de 425 nm (Leer la placa cada 30 segundos durante 3 minutos).

Estabilidad de la Catepsina B en las muestras de inclusión:

15. Tomar 5 µL de muestras de incubación en 93 µL de amortiguador de ensayo (de la etapa 11), y luego agregar 2 µL de sustrato 10 mM (Z-RR-MNA).

16. Incubar las muestras a 37 ℃ durante 2 min.

17. Leer las muestras en excitación de 340 nm/emisión de 425 nm.

EJEMPLO 119

[1013] Actividad libre de células y basada en células in vitro.

[1014] Unión libre de células al receptor de glucocorticoides (GR) en el ensayo de unión competitiva a GR LanthaScreen TR–FRET

[1015] Para evaluar la habilidad de los nuevos esteroides para unirse al receptor de glucocorticoides (GR), se realizó un ensayo de unión libre de células utilizando un kit de ensayo de unión competitiva a GR LanthaScreen TR–FRET (Life Technologies, Cat# A15901). El ensayo se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La budesonida es un esteroide de GR comercial y se utilizó como un control de referencia en el ensayo de unión y otros ensayos basados en células descritos más adelante en el documento. En resumen, una dilución serial de tres veces de budesonida y los compuestos derivados indicados a continuación se prepararon en DMSO al 100% comenzando en 100 nM (100X de final). Diluciones seriales se diluyeron adicionalmente 50 veces en amortiguador F de receptor nuclear con DTT 5 mM y péptido estabilizante 0.1 mM, y se transfirieron a una placa de ensayo de 384 pozos. Luego, Fluormona GS1 Verde, GR-LBD (GST) y anticuerpo anti-GST de Tb se añadieron secuencialmente a la placa de ensayo de 384 pozos. La placa se analizó en un lector de placas multietiqueta Envision (PerkinElmer) con excitación establecida en 340 nm y filtros de emisión en 520 nm y 486 nm. La relación FRET se calculó como 520 nm/486 nm. Los valores de IC_{50} se determinaron utilizando una ecuación logística de cuatro parámetros sobre una curva de respuesta de 12 puntos (Prism

de GraphPad).

[1016] Como se muestra en la Tabla 18, la Budesonida compitió en la unión de Fluormona GS1 Verde en el ensayo de GR con un valor de IC_{50} entre 10 a 100 nM. Los *N*-análogos de Budesonida similarmente compitieron en la unión con valores de IC_{50} que van desde menos de 10 nM hasta más de 100 nM. Los nuevos esteroides aquí probados demostraron ser comparables o mejores (valores más bajos de IC_{50}) en este ensayo y desplazamiento similar para el ligando de GR en comparación con la Budesonida.

TABLA 18: UNIÓN LIBRE DE CÉLULAS Y ACTIVIDAD FUNCIONAL BASADA EN CÉLULAS

Compuesto #	**Células altas HEK293/9xUAS-Luc2P/pBind-GR/PRLR-HA EC_{50} (nM)**		**Ensayo de unión competitiva a GR IC50 (nM)**
Budesonida	+++	Activación completa	++
4b	+++	Activación completa	+++
4d	++	Activación parcial	++
4h	+++	Activación completa	++
5-I	+++	Activación completa	NT
6-I	+++	Activación completa	NT
***R*-6-I**	+++	Activación completa	+++
***S*-6-I**	+++	Activación completa	+++
6-I D	+++	Activación completa	+++
6-II	+++	Activación completa	+++
6-III	+++	Activación completa	NT
6-VI	+++	Activación completa	NT
6-VII	NA	Sin activación	+++

[1017] En la Tabla 18: +++ < 10 nM; 10 nM ≤ ++ < 50 nM; 50 nM ≤ +; NT = no

probado; NA = sin activación. Activación completa: > 75% de la activación de doblez inducida por la Budesonida. Activación parcial: (20%, 75%) de la activación de doblez inducida por la Budesonida. Sin activación: < 20% de la activación de doblez inducida por la Budesonida. El ensayo libre de células se utiliza para evaluar la unión directa de los compuestos al GR LBD recombinante independientemente de su permeabilidad. El ensayo basado en células se utiliza para medir cómo los compuestos activan la transcripción mediada por GR intracelular después de pasar a través de la membrana plasmática, por lo que la permeabilidad de membrana del compuesto es un prerequisito para la actividad.

EJEMPLO 120

[1018] Ensayo basado en células de reportero de luciferasa co-activador del receptor de glucocorticoides (GR)

[1019] Ensayo de activación de glucocorticoides

[1020] La actividad de los esteroide cargas útiles y los ncADCs anti-PRLR esteroide se estudiaron utilizando un ensayo basado en células de reportero de luciferasa utilizando la línea celular 293/PRLR/GRE-Luc descrita en el Ejemplo 62 así como una línea celular 293 negativa a antígeno que contiene un receptor quimérico que consiste en un dominio de unión a ligando de GR fusionado al dominio de unión a CAL4 DNA de levadura (pBind-GR, Promega no. de catálogo E1581), y una secuencia activadora ascendente de Gal4 (9XGal4 UAS-Luc) que acciona la expresión de la luciferasa. La línea celular resultante se refiere como 293/GRE-Luc.

[1021] El bioensayo se realizó utilizando estas dos líneas celulares, tesgin anti-PRLR-LP112, dexametasona, budesonida, compuesto 4b, Ab-LP112 de control, así como anti-PRLR Ab solo, utilizando un ensayo configurado como se describe en el Ejemplo 63.

[1022] Como se muestra en la FIGURA 36A y la siguiente Tabla, después de 72 horas de incubación, el anti-PRLR-LP112 mostró el doblez más alto en la línea celular 293/PRLR/GRE-Luc, mientras que la carga útil de LP112 (4b) mostró un mejor valor de IC_{50} que la Budesonida y la Dexametasona. El Ab-LP112 de control y el anti-PRLR mAb no conjugado no mostraron actividad en esta línea celular.

[1023] Como se muestra en la FIGURA 36B y la siguiente Tabla, después de 72 horas de incubación, el anti-PRLR-LP112 no mostró activación en la línea celular 293/PRLR/GRE-Luc que no expresa PRLR, indicando que la entrega de esteroides mediante anti-PRLR-ncADCs es dependiente del antígeno. La carga útil LP112 (4b) nuevamente mostró un mejor valor de IC_{50} que la Budesonida y la Dexametasona. El Ab-

LP112 de control y el anti-PRLR Ab no conjugado no demostraron ninguna actividad en esta línea celular.

[1024] La siguiente tabla se refiere a las FIGURAS 36A y 36B.

	EC_{50} en 293/PRLR/GRE-Luc (M)	**EC_{50} en 293/GRE-Luc (M)**
Anti-PRLR Ab-LP112	+++	+
Ab-LP112 de control	+	+
Anti-PRLR Ab	NA	NA
4b (carga útil de LP112)	+++	+++
Budesonida	++	+++
Dexametasona	+++	+++

En la tabla, +++<5 nM, 5nM<++<10nM, 10nM<+.

EJEMPLO 121

[1025] Este ejemplo describe un modelo de ratón de liberación de citocina inducida por LPS

[1026] El objetivo de este estudio es evaluar los compuestos de prueba, **4b** y **6-l**, sobre la inhibición de la liberación de citocina inducida por LPS en ratones. Los compuestos de prueba se administraron 48 horas, 24 horas y 2 horas antes del desafío de LPS, los niveles de citocina en las muestras de sangre que incluían TNF-α e IL6 se midieron en los puntos de tiempo de 2 horas y 4 horas después del desafío de LPS.

[1027] Materiales y Reactivos

[1028] El lipopolisacárido (LPS) derivado a partir de E. Coli K12 se adquirió a partir de Invivogen (San Diego, California, EE. UU., cat# Tlrl-eklps), la Dexametasona se adquirió a partir de ADAMAS (Emeryville, CA, EE. UU., Cat#50-02-2). El kit ELISA de TNF-α de ratón fue de ebioscience (ThermoFisher Scientific, Cat#88-7324). El kit ELISA de IL6 de ratón fue de ebioscience (ThermoFisher Scientific, Cat#88-7064).

[1029] Métodos experimentales.

[1030] Cría de animales:

[1031] En este estudio se utilizaron un total de 18 ratones C57BL/6j naive. Los animales eran machos, con un peso corporal de 18-20 g al inicio del estudio. Los animales se adquirieron en el centro de animales de laboratorio de Shanghai, CAS (SLAC), y se alojaron en el vivero de animales de ChemPartner en un entorno SPF. Después de la llegada, los animales fueron revisados para detectar condiciones de la salud, incluyendo el pelaje, las extremidades, orificios y signos anormales en la postura o los movimientos, y se

aclimataron al ambiente durante más de 7 días.

[1032] Los animales se alojaron 3 ratones por jaula en jaulas de cajas de zapatos de policarbonato de IVC en un entorno SPF; los controles ambientales para el alojamiento de los animales se establecieron para mantener una temperatura de 20-26 °C, una humedad del 40-70%, y un ciclo de luz de 12 horas/oscuridad de 12 horas.

[1033] A lo largo del periodo de estudio, se proporcionaron *ad libitum* comida estándar (SLAC-M01, del centro de animales de laboratorio de Shanghai) y agua purificada (calidad de agua municipal, filtrada).

[1034] Procedimientos experimentales.

[1035] Agrupación: los animales se asignaron aleatoriamente a 6 grupos (A-F) antes del inicio del estudio. Cada grupo incluyó 3 ratones. El Grupo A sirvió como control naive; el Grupo B recibió dexametasona y sirvió como control positivo; el Grupo C se trató con 4b y el Grupo D-F se trató con 6-I.

[1036] Procedimiento experimental

[1037] Todos los ratones recibieron LPS disuelto en PBS en una dosis de 0.5mpk mediante inyección intraperitoneal. Los ratones en el grupo A recibieron PBS, los ratones en el grupo B recibieron Dex (5mpk) y los ratones en el grupo C recibieron 4b (5mpk) mediante inyección intraperitoneal, 2 horas antes del desafío de LPS; los ratones en el grupo D, E y F recibieron en una dosis de 5mpk mediante inyección intraperitoneal, 2 horas, 24 horas y 48 horas antes del desafío de LPS, respectivamente.

[1038] Se colectaron muestras de sangre en los puntos de tiempo de 2 horas y 4 horas después del desafío de LPS, en tubos que contenían heparina. Las muestras de sangre se centrifugaron, y muestras de plasma se colectaron y se almacenaron a -80oC antes del análisis.

[1039] Los niveles de TNFα en plasma se midieron con kits ELISA siguiendo los procedimientos estándar recomendados por el fabricante.

[1040] Los resultados de PK se proporcionan en la FIGURA 37A y la Tabla 20

TABLA 20. PARÁMETROS DE PK SUMARIOS DE 4B Y 6-I)

Pará-metros de PK	Unidad	Dexametasona (IP, 1mg/Kg en ratones C57BL/6 macho)			**4b** (IP, 1mg/Kg en ratones C57BL/6 macho)			**6-l** (IP, 1mg/Kg en ratones C57BL/6 macho)		
		Media	SD	CV(%)	Media	SD	CV(%)	Media	SD	CV(%)
$T_{máx}$	h	0.625	0.433	69.3	0.438	0.375	85.7	0.250	0.00	0.00
$C_{máx}$	ng/mL	231	7.97	3.45	39.4	1.75	4.43	44.8	4.77	10.6
$t_{1/2}$ terminal	h	1.64	0.187	11.4	1.69	0.620	36.7	1.91	0.210	11.0
$AUC_{última}$	h*ng/mL	545	60.6	11.1	84.6	7.71	9.12	107	13.6	12.7
AUC_{INF}	h*ng/mL	562	67.2	11.9	89.2	8.20	9.19	113	14.1	12.5

[1041] Resultados de PD

[1042] El desafío de LPS indujo la liberación de TNF-α en este modelo farmacodinámico, observado en el punto de tiempo de muestreo de 2 horas. Los resultados fueron consistentes con la cinética reportada de la liberación de citocina en el modelo de desafío de LPS en ratones, los niveles de TNF-α declinaron en el punto de tiempo de 4 horas. Por consiguiente, el efecto de los compuestos de prueba no podrá ser medido, en congruencia con esto, no se observaron significancias entre los grupos en el punto de tiempo de 4 horas.

[1043] Se colectaron muestras de sangre a las 2 y 4 horas después del desafío de LPS; se midieron los niveles de TNF-α en plasma. Los datos se expresaron como media±SEM, *p<0.05, **p<0.01 vs Grupo A, mediante Una vía

[1044] En la FIGURA 37A se muestra, en el punto de tiempo de 2 horas, 4b en una dosis de 5mpk inhibió significativamente la producción de TNF-α; 6-l demostró una inhibición dependiente del tiempo, y se inhibió la producción significativa de TNF-α cuando se dosificó 2 horas antes del desafío de LPS. DEX fue capaz de inhibir significativamente TNF-α en el punto de tiempo de muestreo de 2 horas.

[1045] Se colectan muestras de sangre a las 2 y 4 horas posteriores al desafío de LPS; se midieron los niveles de TNF-α en plasma. Los datos se expresaron como

media±SEM, *p<0.05, **p <0.01 vs Grupo A, mediante análisis ANOVA de una vía.

[1046] El análisis ANOVA se proporciona en la FIGURA 37B y la Tabla 21

TABLA 21. DATOS CRUDOS DE TNF-α

TNF-a (pg/ml)	A:PBS	B: DEX 5MPK (-2h)	C:**4b** 5MPK (-2h)	D: **6-I** 5MPK(-2h)	E) **6-I** 5MPK(-24h)	F) **6-I** 5MPK (-48h)
2h	840.2	644.3	56.5	110.6	23.1	1280.1
	1293.6	508.5	10.4	30.8	997.3	1149.4
	968.6	487.1	274.8	240.8	55.4	750.0

EJEMPLO 122

[1047] *Células dendríticas de ratón*

[1048] Para determinar el efecto del Compuesto 4b sobre las respuestas inmunes inflamatorias inducidas por LPS *ex vivo*, células dendríticas (DC) $CD11c^+$ se aislaron a partir de los bazos de ratones C57Bl/6 de tipo salvaje (Jackon Labs, Protocol #426.0). DCs de bazo se aislaron utilizando una digestión de Colagenasa D (400U/mL de colagenasa D (Roche Cat #11088858001), 20µg/mL de DNasa I (Roche Cat #10104159001), FCS al 2% en RPMI-1640 amortiguado con HEPES) y se incubaron a 37 °C durante 25 minutos. Después de la incubación, el tejido de bazo se lavó con RPMI-1640 y se filtró a través de un filtro de 70 µm, luego se realizó la lisis de los glóbulos rojos utilizando un amortiguador de lisis ACK (Gibco Cat #A1049201) durante 1 minuto. La suspensión celular se lavó posteriormente dos veces utilizando RPMI-1640. Las DCs clásicas se aislaron a partir de la suspensión celular mononuclear utilizando microcuentas magnéticas CD11c (Milteny Biotec Cat #130108338). En resumen, la suspensión celular se lavó dos veces con amortiguador de ejecución autoMACS (Milteny Biotec Cat#130091221) antes de una incubación de 30 minutos a 4 °C con microcuentas $CD11c^+$, según los protocolos establecidos de Milteny Biotec. Las células $CD11c^+$ se aislaron mediante selección positiva, se lavaron, se suspendieron en RPMI completo [RPMI-1640 (ThermoFisher Scientific, Cat #15140122) que contenía 10% de FBS (ThermoFisher Scientific, Cat #10082147) y 1% de penicilina-estreptomicina (ThermoFisher Scientific, Cat #11875093)], y se contaron antes del cultivo en $2x10^5$ células por pozo. RPMI completo de control, RMPI completo tratado con Compuesto 4b (a 10 nM y 100 nM) o RMPI completo tratado con Dexametasona (Sigma, Cat#D4902-25MG) (a 10 nM y 100 nM) se añadió a las células en una placa de cultivo de

96 pozos. Las células tratadas con DC/Control, Compuesto 4b o Dexametasona se incubaron durante 24 horas a 37 °C antes de la estimulación con 10 ng/mL de LPS durante 24 horas.

[1049] *Células dendríticas humanas*:

[1050] Para determinar el efecto del Compuesto 4b sobre las respuestas inmunes inflamatorias inducidas por LPS *ex vivo* en células inmunes innatas humanas, se aislaron monocitos $CD14^+$ (Lonza Cat #2W-400C) y se cultivaron en presencia de RPMI completo [RPMI-1640 (ThermoFisher Scientific, Cat #15140122) que contenía 10% de FBS (ThermoFisher Scientific, Cat #10082147) y 1% de penicilina-estreptomicina (ThermoFisher Scientific, Cat #11875093)] suplementado con IL4 humana (50 ng/mL) (Milteny Biotec, Cat #130-093-922) y GM-CSF humano (100 ng/mL) (Milteny Biotec, Cat #130093866) durante 7 días. El RPMI completo con IL4 y GM-CSF se cambió cada tres días. Se desarrollaron dos condiciones de cultivo específicas: Condición 1: Incubación de monocitos $CD14^+$ con RPMI completo de control, RMPI completo tratado con Compuesto 4b (a 10 nM y 100 nM) o RMPI completo tratado con Dexametasona (Sigma) (a 10 nM y 100 nM) para el cultivo completo de 7 días o Condición 2: Incubación de monocitos $CD14^+$ con RPMI completo de control durante 5 días antes de la incubación con RMPI completo de control, RMPI completo tratado con compuesto 4b (a 10 nM y 100 nM) o RMPI completo tratado con Dexametasona (Sigma, Cat#D4902-25MG) (a 10 nM y 100 nM) hasta el día 7. El día 7, los diversos grupos experimentales se estimularon con 10 ng/mL de LPS durante 24 horas.

[1051] *Medición de citocinas en los sobrenadantes 24 horas después del desafío de LPS ex vivo:*

[1052] Los sobrenadantes se colectaron en placas de cultivo de tejido de fondo redondo de 96 pozos 24 horas después del desafío de LPS y se almacenaron a -20 °C hasta su análisis adicional. Las concentraciones de citocina en los sobrenadantes se midieron utilizando un kit de inmunoensayo multiplex Pro-inflamatorio Panel 1 (ratón) (MesoScale Discovery, Cat #K15048D) de acuerdo con las instrucciones del fabricante o un kit de inmunoensayo multiplex Pro-inflamatorio Panel 1 (humano) (MesoScale Discovery, Cat #K15049D). En resumen, 50 µL/pozo de calibradores y muestras (diluidas en Diluyente 1:2) se añadieron a las placas previamente recubiertas con anticuerpos de captura y se incubaron a temperatura ambiente mientras se agitaban a 700 rpm durante 2 horas. Luego, las placas se lavaron 3 veces con 1xPBS que contenía Tween-20 al 0.05% (p/v), seguido por la adición de 25 µL de solución de anticuerpo de detección diluida en diluyente 45.

Después de 2 horas de incubación a temperatura ambiente mientras se agitaban, las placas se lavaron 3 veces, y se añadieron 150µL de amortiguador de lectura 2x a cada pozo. La electroquimioluminiscencia se leyó inmediatamente en un instrumento MSD Spector®. El análisis de los datos se realizó con el software Prism™ de GraphPad. La significancia estadística dentro de los grupos se determinó mediante Anova de una vía con múltiple comparación de Turkey posterior a la prueba y el error estándar de la media (SEM±) calculado.

[1053] *Resumen de resultados y conclusiones*:

[1054] Como se muestra en la Tabla 22, el desafío de LPS *ex vivo* indujo robusta producción de IL12p70, IL1β, IL6, KC-GRO y TNF-α mediante DCs $CD11c^+$ de bazo. Por el contrario, la administración *in vitro* de Dexametasona y Compuesto 4b en dosis escaladoras durante 24 horas redujo significativamente las respuestas de citocina inducidas por LPS en DCs $CD11c^+$.

[1055] **Tabla 22**: El compuesto 4b y la Dexametasona (Sigma) inhiben la producción de citocina inducida por LPS en DCs de bazo $CD11c^+$.

Citocina	**Control**	**Control +LPS**	**Dexametasona (10nM)**	**Dexametasona (10nM) +LPS**	**Dexametasona (100nM)**	**Dexametasona (100nM) +LPS**
IL-12p70	17.43±2.72	77.02±4.40	8.55±1.08	30.41±3.22	6.05±1.13	9.29±3.28
IL-1b	9.53±0.26	162.48±5.69	6.299±0.33	34.76±4.33	5.25±0.12	10.58±0.88
IL-6	144.49±16.69	1492.12±66.47	98.93±8.98	714.89±77.13	55.07±1.76	303.48±11.37
KC-GRO	111.69±10.96	536.47±49.90	75.75±8.03	399.40±49.75	65.99±2.75	233.49±18.48
TNF-a	0±0	8644.14±74.73	0±0	2496.27±415.75	0±0	405.49±70.23
	4b (10nM)	**4b (10nM) +LPS**	**4b (100nM)**	**4b (100nM) +LPS**		
IL-12p70	5.24±1.12	3.84±2.88	6.43±0.67	8.21±2.79		
IL-1b	5.22±0.11	6.32±0.83	5.65±0.18	4.80±0.99		
IL-6	47.90±4.55	184.54±21.59	63.87±4.78	201.10±20.96		
KC-GRO	62.85±6.51	186.57±15.71	84.30±6.06	211.96±25.23		
TNF-a	0±0	146.46±18.66	0±0	193.29±25.56		

[1056] Como se muestra en la Tabla 23, el desafío de LPS *ex vivo* indujo robusta expresión de IL12p70, IL1β, IL6, y TNF-α mediante DCs derivadas de monocitos humanos. En contraste, los monocitos cultivados durante todo el periodo de acondicionamiento de 7 días (Condición 1) con Compuesto 4b y Dexametasona (Sigma) dieron como resultado una producción de citocina proinflamatoria significativamente reducida. Además, el acondicionamiento de las DCs derivadas de monocitos maduros con Compuesto 4b y Dexametasona (Sigma) también disminuyó significativamente la producción de IL12p70, IL6 y TNF-α en comparación con la estimulación de DC LPS de control.

[1057] **Tabla 23**: El compuesto 4b y la Dexametasona (Sigma) inhiben la producción de citocina inducida por LPS en DC derivada de monocitos humanos.

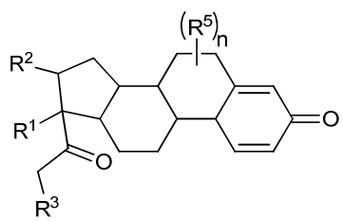
Condición 1				
Citocina	**Control**	**Control +LPS**	**Dexametasona (10nM)**	**Dexametasona (10nM) +LPS**
IL-12p70	0.79±0.04	994.23±19.89	0.65±0.02	4.83±0.05
IL-1b	0.80±0.001	12.97±0.186	0.625±0.006	1.77±0.11
IL-6	8.71±0.23	5669.2±266.12	2.68±0.03	687.45±2.17
IL-8	850.50±0.89	1677.86±20.06	174.59±0.68	8789.98±126.98
TNF-a	44.20±1.08	7476.12±177.0	2.32±0.098	242.34±10.75
	4b (10nM)	**4b (10nM) + LPS**	**4b (100nM)**	**4b (100nM) +LPS**
IL-12p70	0.58±0.002	1.05±0.08	0.66±0.03	0.50±0.19
IL-1b	0.61±0.007	1.18±0.11	0.641±0.15	1.01±0.07
IL-6	2.23±0.002	325.46±2.12	3.45±0.13	159.32±7.31
IL-8	166.99±2.	8670.27±26	136.50±0.8	8461.59±52

	01	8.97	7	2.77
TNF-a	1.28±0.087	117.75±6.63	1.46±0.10	123.31±0.11
Condición 2				
Citocina	**Control**	**Control +LPS**	**Dexametasona (10nM)**	**Dexametasona (10nM) +LPS**
IL-12p70	5.83±2.55	49.64±2.05	0.64±0.03	6.32±1.69
IL-1b	3.13±0.05	13.03±1.26	0.611±0.003	37.88±1.90
IL-6	37.74±1.50	6679.97±173.8	14.76±0.267	5747.37±234.08
IL-8	1541.04±82.6	1958.27±5.35	288.23±6.02	3314.0±37.86
TNF-a	61.49±4.82	2690.61±164.5	1.73±0.02	994.92±73.66
IL-12p70	**4b (10nM)**	**4b (10nM) +LPS**	**4b (100nM)**	**4b (100nM) +LPS**
IL-1b	0.60±0.01	4.81±0.63	0.61±0.02	2.03±0.16
IL-6	0.59±0.005	30.10±0.93	0.59±0.03	18.20±1.04
IL-8	12.87±0.312	5124.75±114.8	11.25±0.82	4680.03±104.90
TNF-a	274.75±1.75	3003.52±212.16	317.46±14.83	2735.36±87.88
	2.03±0.14	874.18±30.46	1.37±0.251	696.26±75.10

[1058] Las modalidades y ejemplos descritos anteriormente pretenden ser meramente ilustrativos y no limitativos. Aquellos expertos en la técnica reconocerán o podrán determinar utilizando no más que la experimentación de rutina, numerosos equivalentes de los compuestos, materiales, y procedimientos específicos. Todos tales equivalentes se consideran dentro del alcance y están abarcados por las reivindicaciones anexas.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de Fórmula (**A**):



(**A**);

o una sal, solvato, estereoisómero, o derivado farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

R^1 y R^2 son, independientemente, -H, alquilo, alquil-C(O)-O-, -OH, o halo; o

R^1 y R^2 conjuntamente forman  ,

en donde R^4 es alquilo, arilo, arilalquilo, o un heterocicloalquilo que contiene N,

en donde el alquilo, arilo, arilalquilo, y heterocicloalquilo que contiene N están, independientemente en cada caso, opcionalmente sustituidos con -NR^aR^b;

R^3 es -OH, R^Z-C(O)-X-, heteroalquilo, piperidinilo, -NR^aR^b, -oxiaril-NR^aR^b, o -Z-A$(R^P)_t$,

R^5 es, independientemente en cada caso, -OH, halo, alquilo, o arilalquilo;

R^Z es alquilo;

X es O o NR^a;

Z es S, S(O), $S(O)_2$, SO_2NR^a, O, $C(O)NR^a$, C(O), o NR^a;

A es arilo o heteroarilo;

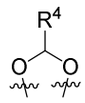
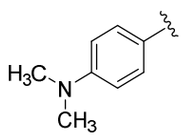
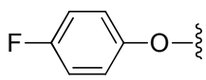
R^P es, independientemente en cada caso, halo, alquilo opcionalmente sustituido, -OH, o $-NR^aR^b$;

R^a y R^b son, independientemente en cada caso, -H, alquilo opcionalmente sustituido, o arilo opcionalmente sustituido;

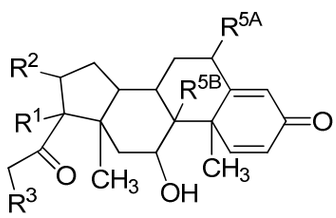
n es un entero desde 0-19; y

t es un entero desde 1-3;

con la condición de que:

(1) R^3 no es –OH (a) cuando R^1 es –OH o (b) cuando R^1 y R^2 conjuntamente forman  , en donde R^4 es C_{1-9}alquilo o  y (2) R^3 no es  .

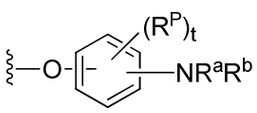
2. El compuesto de la reivindicación 1, en donde el compuesto de Fórmula (**A**) tiene la estructura de la Fórmula (**A^1**):



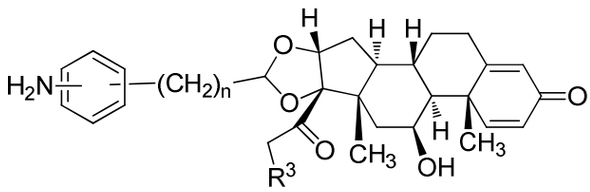
(**A^1**)

en donde R^1-R^3 son según se define anteriormente y R^{5A} y R^{5B} son cada una, independientemente, halo o un átomo de hidrógeno.

3. El compuesto de la reivindicación 2, en donde R^1 y R^2 conjuntamente forman  , en donde R^4 es arilo, arilalquilo, o alquilo, en donde el arilo, arilalquilo, y alquilo están opcionalmente sustituidos con $-NR^aR^b$.

4. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde R^3 es -OH, $-NR^aR^b$, R^Z-C(O)-X–, o  , en donde R^P es halo, t es un entero desde 0 hasta 2, R^a es H, R^b es H o alquilo, X es O o NH, y R^Z es alquilo.

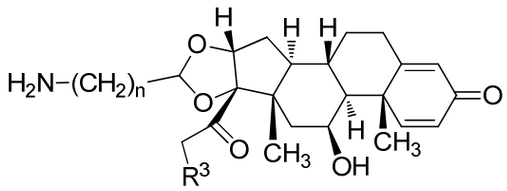
5. El compuesto de la reivindicación 1 de acuerdo con la Fórmula (**A^2**)



(**A^2**)

en donde n es un entero desde 0 hasta 4 y R^3 es –OH o R^Z-C(O)-O–; en donde R^Z es alquilo.

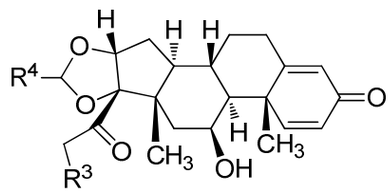
6. El compuesto de la reivindicación 1 de acuerdo con la Fórmula (**A^3**):



(**A^3**)

en donde n es un entero desde 1-4 y R^3 es –OH o R^Z-C(O)-O–; en donde R^Z es alquilo.

7. El compuesto de la reivindicación 1 de acuerdo con la Fórmula (**A^4**):



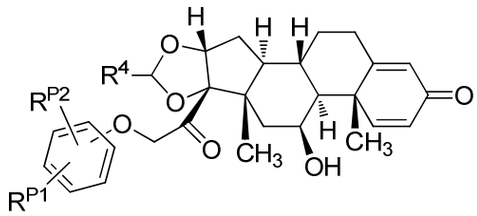
(**A^4**)

en donde R^3 es $–NR^aR^b$ y R^4 es alquilo, en donde R^a y R^b son cada una, independientemente, un átomo de hidrógeno o alquilo, o R^a y R^b, tomadas conjuntamente forman un anillo de 3-7 miembros.

8. El compuesto de la reivindicación 7, en donde R^4 es alquilo de C_{1-4}.

9. El compuesto de la reivindicación 7 u 8, en donde R^3 es $-NH_2$, $-NHCH_3$, o $-N(CH_3)_2$.

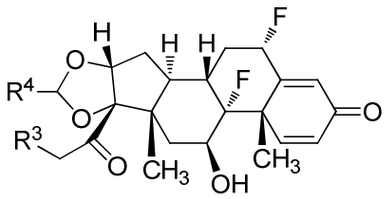
10. El compuesto de la reivindicación 1 de acuerdo con la Fórmula (**A^5**):



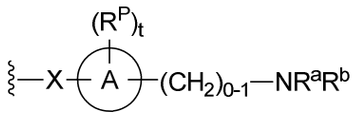
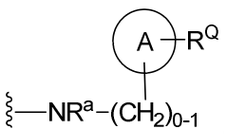
(**A^5**)

en donde R^4 es alquilo, R^{P1} es halo o un átomo de hidrógeno, y R^{P2} es $–NR^aR^b$ u –OH, en donde R^a y R^b son cada una, independientemente, un átomo de hidrógeno o alquilo.

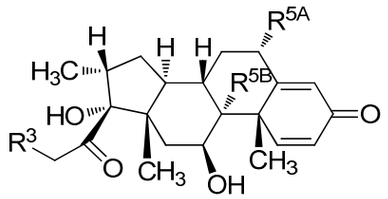
11. El compuesto de la reivindicación 1 de acuerdo con la Fórmula (**A^6**):



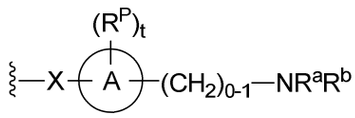
(**A^6**)

en donde R^3 es  , $R^ZC(O)X$-,  , o NR^aR^b, en donde X es O o NR^a,  es arilo o heteroarilo, R^P es halo, t es un entero desde 0-2, R^a y R^b son cada una, independientemente, un átomo de hidrógeno o alquilo, R^Z es alquilo, y R^Q es alcoxi, y R^4 es alquilo

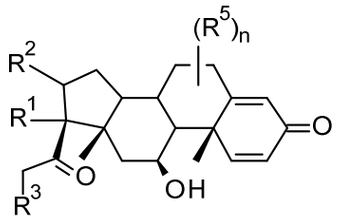
12. El compuesto de la reivindicación 1 de acuerdo con la Fórmula (**A^7**)



(**A^7**)

en donde R^3 es  , en donde X es O o NR^a,  es arilo o heteroarilo, R^P es halo, t es un entero desde 0-2, R^a y R^b son cada una, independientemente, un átomo de hidrógeno o alquilo, R^{5A} es un átomo de hidrógeno o fluoro, y R^{5B} es fluoro.

13. El compuesto de la reivindicación 1 de acuerdo con la Fórmula **1000**:



1000

o una sal, solvato, o estereoisómero farmacéuticamente aceptable del mismo,

en donde:

R^1 y R^2 se seleccionan, independientemente, a partir del grupo que consiste en -H, -OH, alquilo, -O-C(O)-alquilo, y halo; o

R^1 y R^2 conjuntamente forman  ,

ya sea (a), o (b), o (c):

(a) R^3 se selecciona a partir del grupo que consiste en -alquilen-NR^aR^b, -X-arilen-Y-NR^aR^b, -X-heteroarilen-Y-NR^aR^b, y heterocicloalquilo que contiene N; en donde X está ausente, -N-, -CH_2-, u -O-; en donde Y está ausente o -CH_2-; y

R^4 se selecciona a partir del grupo que consiste en alquilo, arilo, alquilarilo, arilalquilo, heteroarilo, -alquilen-NR^aR^b, -X-arilen-Y-NR^aR^b, -X-heteroarilen-Y-NR^aR^b, y heterocicloalquilo que contiene N; en donde X está ausente, -N-, -CH_2-, u -O-; en donde Y está ausente o -CH_2-;

o

(b) R^3 se selecciona a partir del grupo que consiste en -OH, -O-C(O)-alquilo, -O-arilo, -NR^aR^b, -alquilen-NR^aR^b, -X-arilen-Y-NR^aR^b, -X-heteroarilen-Y-NR^aR^b, y heterocicloalquilo que contiene N; en donde X está ausente, -N-, -CH_2-, u -O-; en donde Y está ausente o -CH_2-; y

R^4 se selecciona a partir del grupo que consiste en -alquilen-NR^aR^b, -X-arilen-Y-NR^aR^b, -X-heteroarilen-Y-NR^aR^b, y heterocicloalquilo que contiene N; en donde X está ausente, -N-, -CH_2-, u -O-; en donde Y está ausente o -CH_2-;

o

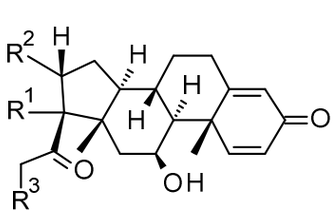
(c) R^3 es -NR^aR^b; y

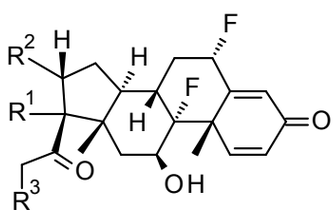
R^4 es alquilo;

R^5 se selecciona, independientemente en cada caso, a partir de un sustituyente en el grupo que consiste en –OH, halo, y alquilo; n es un entero desde 0-19; y cada R^5 se posiciona en cualquier átomo de anillo;

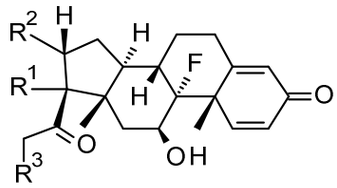
R^a y R^b se seleccionan, independientemente en cada caso, a partir del grupo que consiste en -H y alquilo; o R^a y R^b se ciclizan para formar cicloheteroalquilo con tres a seis átomos de anillo, incluyendo un heteroátomo, que es el N al cual se unen.

14. El compuesto de la reivindicación 13 de acuerdo con la Fórmula **1010**, **1020**, **1030**, o **1040**:

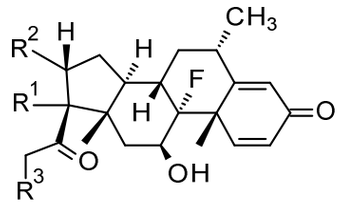




1010



1020



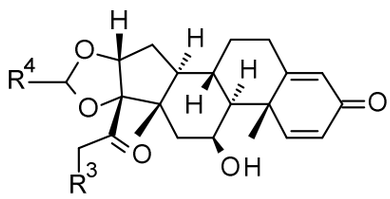
1030

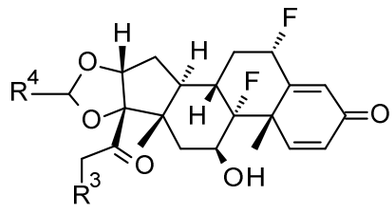
1040

o una sal, solvato, o estereoisómero farmacéuticamente aceptable de los mismos.

15. El compuesto de la reivindicación 14 en donde R^1 es -OH; R^2 es -H, $-CH_3$ o -OH; y R^3 es $-NH_2$.

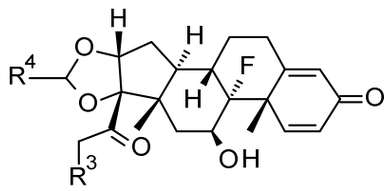
16. El compuesto de la reivindicación 13 de acuerdo con la Fórmula **1110, 1120, 1130**, o **1140**:

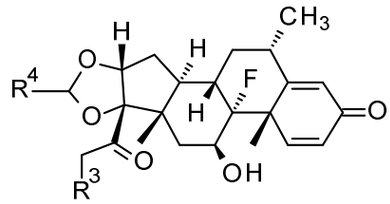




1110

1120





1130

1140

o una sal, solvato, o estereoisómero farmacéuticamente aceptable de los mismos.

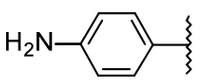
17. El compuesto de la reivindicación 16 en donde

R^3 es $-NR^aR^b$; y

R^4 es n-propilo.

18. El compuesto de la reivindicación 17 de acuerdo con la Fórmula **1120**.

19. El compuesto de la reivindicación 16 en donde R^4 es $H_2NCH_2CH_2$- o

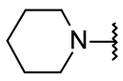


.

20. El compuesto de la reivindicación 16 en donde

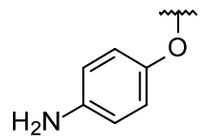
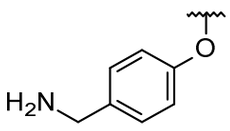
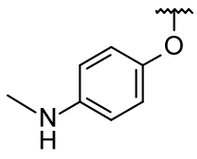
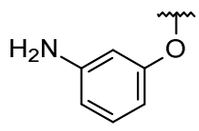
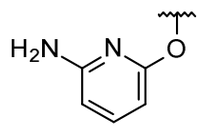
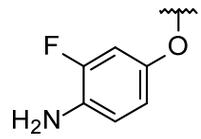
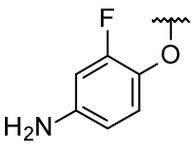
R^3 es $-NR^aR^b$, -alquilen-NR^aR^b, -X-arilen-Y-NR^aR^b, -X-heteroarilen-Y-NR^aR^b, o heterocicloalquilo que contiene N; en donde X está ausente, -N-, $-CH_2$-, u -O-; en donde Y está ausente o $-CH_2$-; y

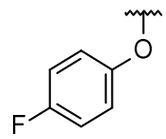
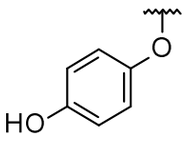
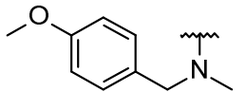
R^4 es alquilo, arilo, alquilarilo, o arilalquilo.

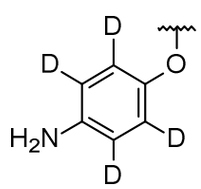
21. El compuesto de la reivindicación 20 en donde R^3 es $-NH_2$, $-N(H)CH_3$, $-N(CH_3)_2$, o  .

22. El compuesto de la reivindicación 20 en donde R^3 es -O-arilen-NR^aR^b, -O-heteroarilen-NR^aR^b; en donde arilo o heteroarilo opcionalmente está sustituido con halógeno, deuterio, hidroxilo, o metoxilo.

23. El compuesto de la reivindicación 20 en donde R^3 es -O-fenil-NR^aR^b, -O-heteroarilen-NR^aR^b; en donde fenilo o heteroarilo opcionalmente está sustituido con halógeno o deuterio.

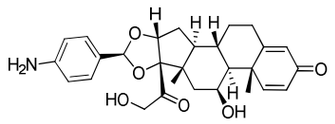
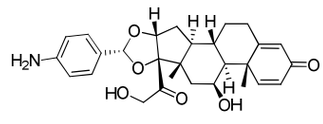
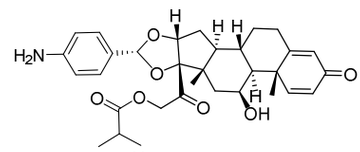
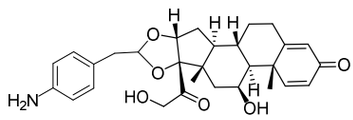
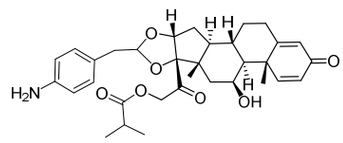
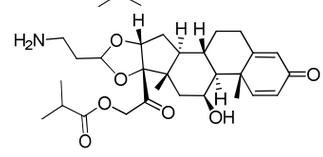
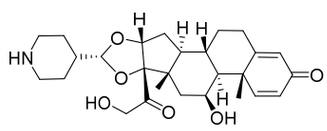
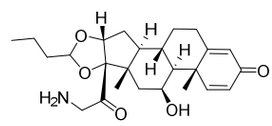
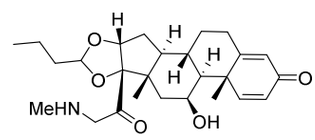
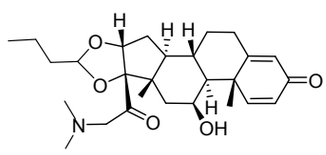
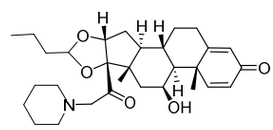
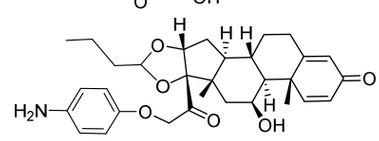
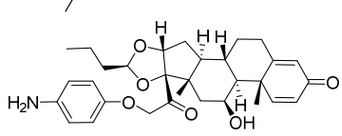
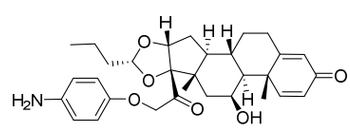
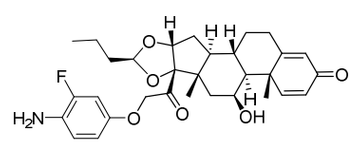
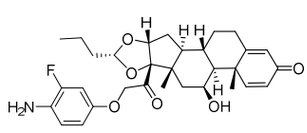
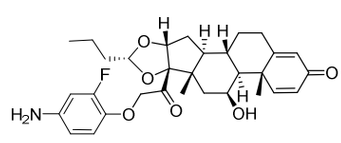
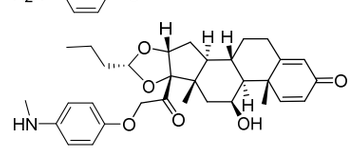
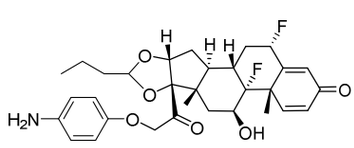
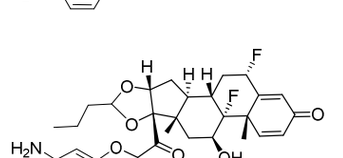
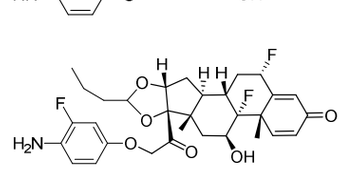
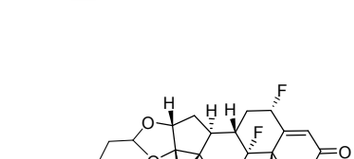
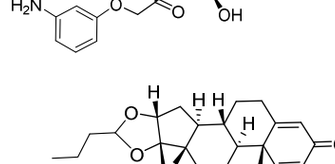
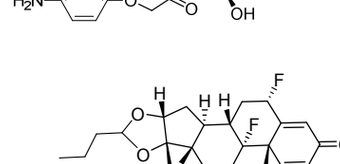
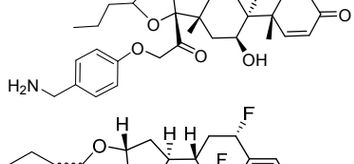
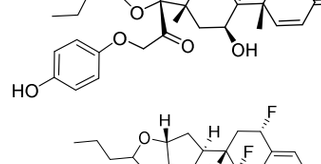
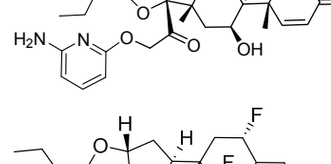
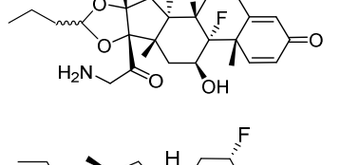
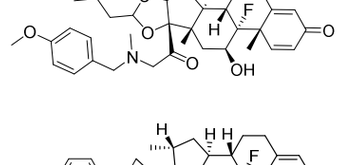
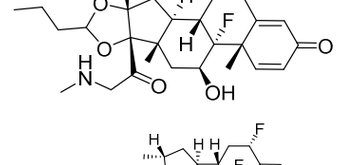
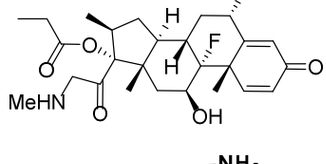
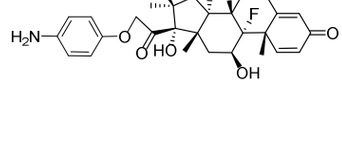
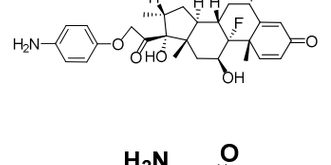
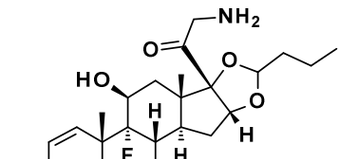
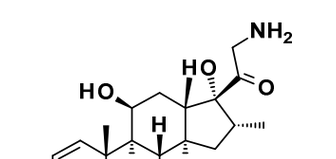
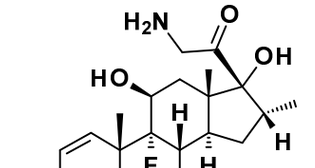
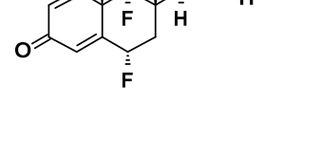
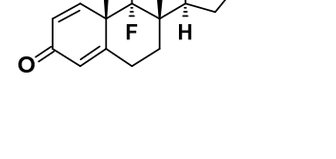
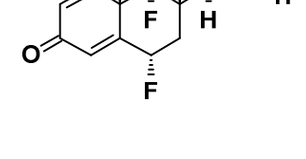
24. El compuesto de la reivindicación 20 en donde R^3 es  ,  ,  ,  ,  ,  , ,  , o .

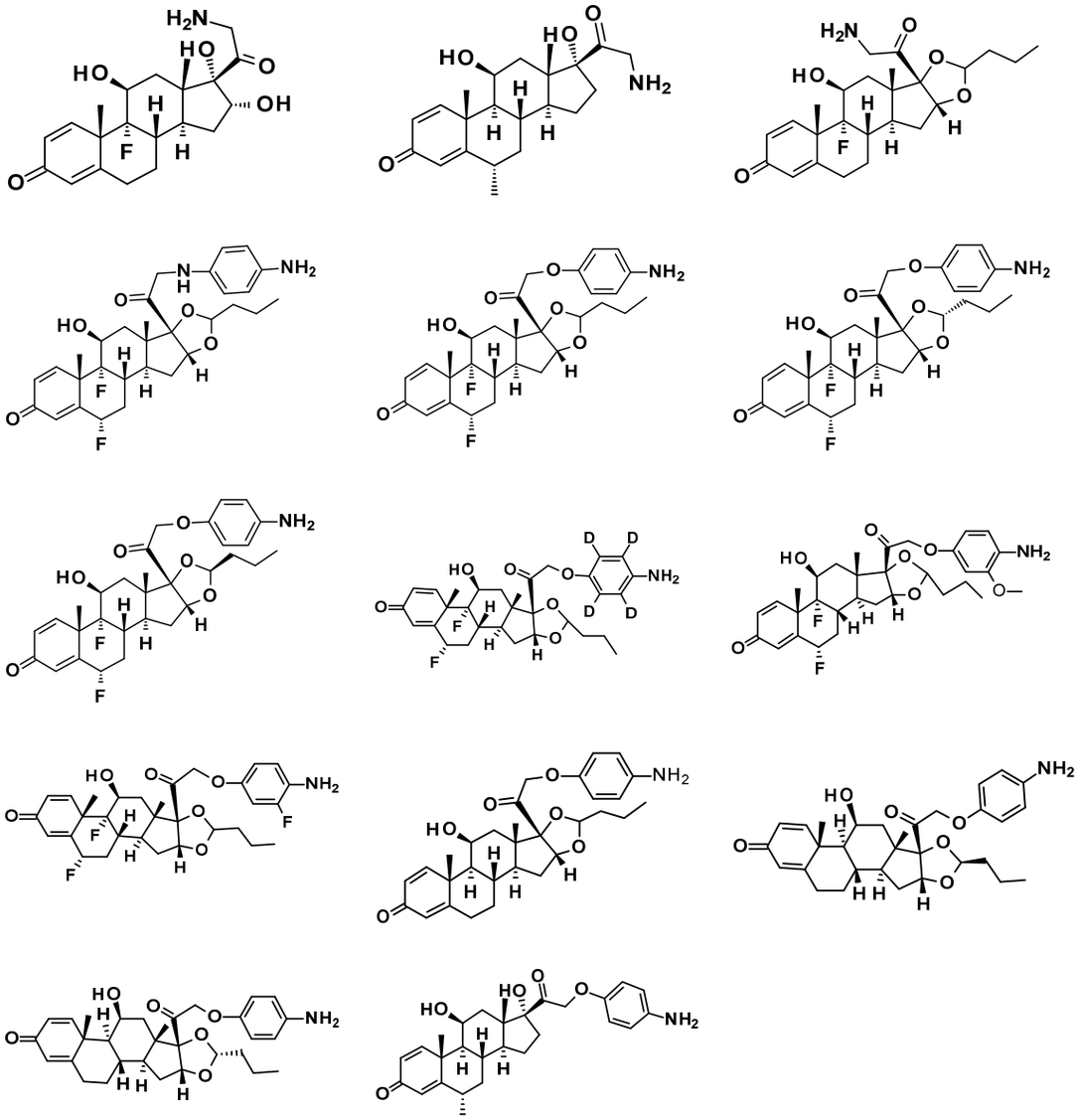
25. El compuesto de la reivindicación 20 en donde R^3 es  ,  , o  .

26. El compuesto de la reivindicación 20 en donde R^3 es  .

27. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 20-26 en donde R^4 es n-propilo.

28. El compuesto de la reivindicación 1, en donde el compuesto es:

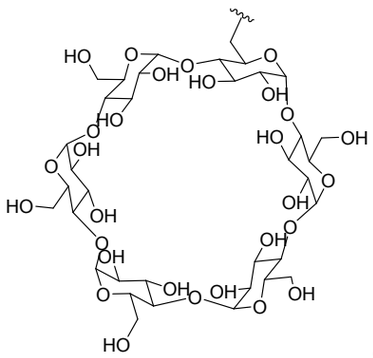
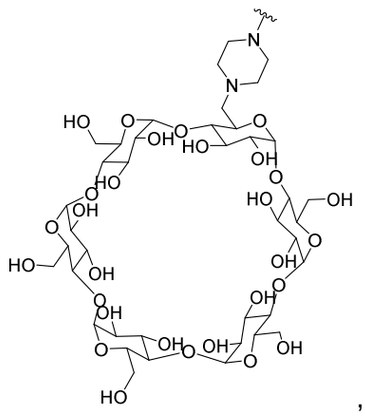
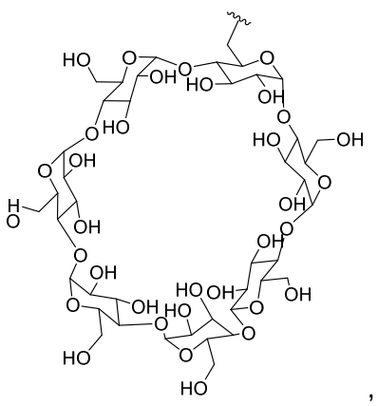
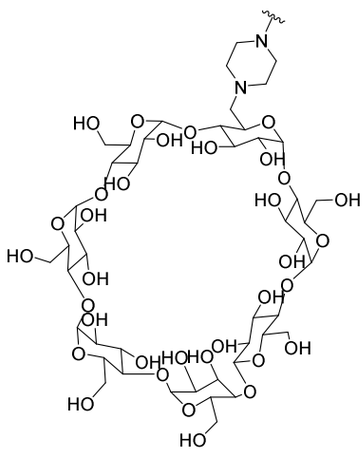
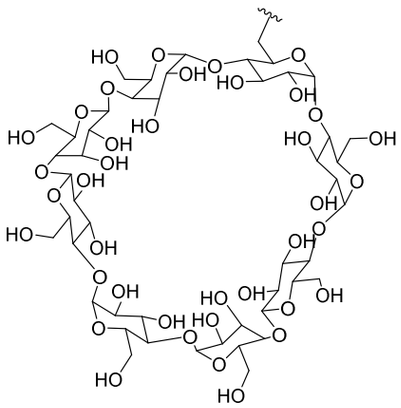
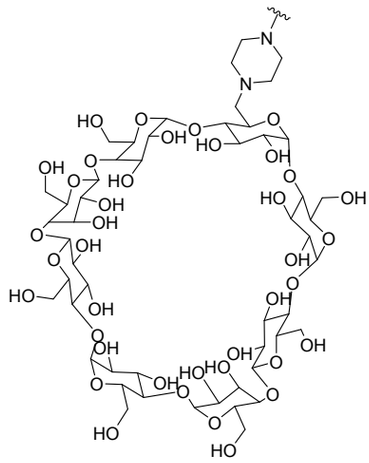


o una sal, solvato, o estereoisómero farmacéuticamente aceptable de los mismos.

29. Un compuesto que comprende un agente de unión conjugado a un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-28.

30. Un compuesto que comprende un agente de unión conjugado a un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-29 y una ciclodextrina (**CD**).

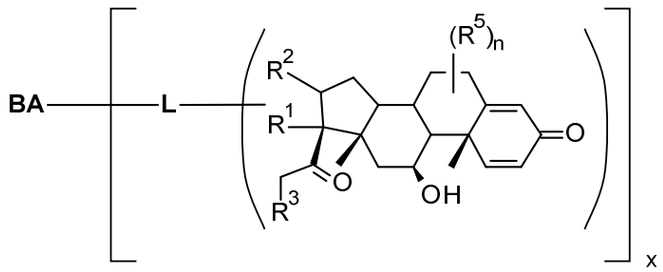
31. El compuesto de la reivindicación 30, en donde la **CD** se selecciona a partir del grupo que consiste en


,

,

,

,

, y

, en donde ~ indica el enlace a través del cual la CD se une al conjugado proteína-esteroide.

32. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 29 a 31, en donde el agente de unión es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo.

33. El compuesto de la reivindicación 29, en donde el agente de unión es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo

34. El compuesto de la reivindicación 29, de acuerdo con la Fórmula 1200:

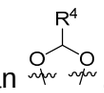


1200

o una sal, solvato, o estereoisómero farmacéuticamente aceptable del mismo,

en donde:

R^1 y R^2 se seleccionan, independientemente, a partir del grupo que consiste en -H, -OH, alquilo, -O-C(O)-alquilo, y halo; o

R^1 y R^2 conjuntamente forman  ,

ya sea (a), o (b), o (c):

(a) R^3 se selecciona a partir del grupo que consiste en -alquilen-NR^aR^b, -X-arilen-Y-NR^aR^b, -X-heteroarilen-Y-NR^aR^b, y heterocicloalquilo que contiene N; en donde X está ausente, -N-, -CH_2-, u -O-; en donde Y está ausente o -CH_2-; y

R^4 se selecciona a partir del grupo que consiste en alquilo, arilo, alquilarilo, arilalquilo, heteroarilo, -alquilen-NR^aR^b, -X-arilen-Y-NR^aR^b, -X-heteroarilen-Y-NR^aR^b, y heterocicloalquilo que contiene N; en donde X está ausente, -N-, -CH_2-, u -O-; en donde Y está ausente o -CH_2-;

o

(b) R^3 se selecciona a partir del grupo que consiste en -OH, -O-C(O)-alquilo, -O-arilo, -NR^aR^b, -alquilen-NR^aR^b, -X-arilen-Y-NR^aR^b, -X-heteroarilen-Y-NR^aR^b, y heterocicloalquilo que contiene N; en donde X está ausente, -N-, -CH_2-, u -O-; en donde Y está ausente o -CH_2-; y

R^4 se selecciona a partir del grupo que consiste en -alquilen-NR^aR^b, -X-arilen-Y-NR^aR^b, -X-heteroarilen-Y-NR^aR^b, y heterocicloalquilo que contiene N; en donde X está ausente, -N-, -CH_2-, u -O-; en donde Y está ausente o -CH_2-;

o

(c) R^3 es -NR^aR^b; y

R^4 es alquilo;

R^5 se selecciona, independientemente en cada caso, a partir de un sustituyente en el grupo que consiste en –OH, halo, y alquilo; n es un entero desde 0-19; y cada R^5 se

posiciona en cualquier átomo de anillo;

R^a y R^b se seleccionan, independientemente en cada caso, a partir del grupo que consiste en -H y alquilo; o R^a y R^b se ciclizan para formar cicloheteroalquilo con tres a seis átomos de anillo, incluyendo un heteroátomo, que es el N al cual se unen;

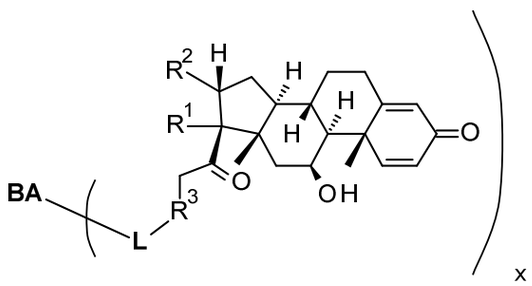
BA es un agente de unión;

cada L es un enlazador opcional;

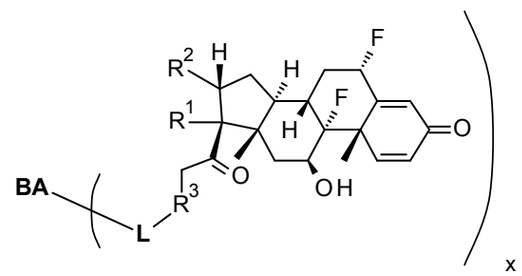
BA o L se une covelentemente a R^3 o R^4; y

x es un entero desde 1 hasta 30.

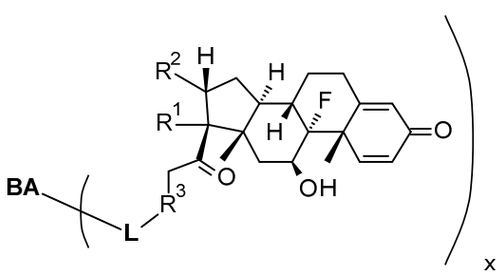
35. El compuesto de la reivindicación 34 de acuerdo con la Fórmula **1210, 1220, 1230**, o **1240**:



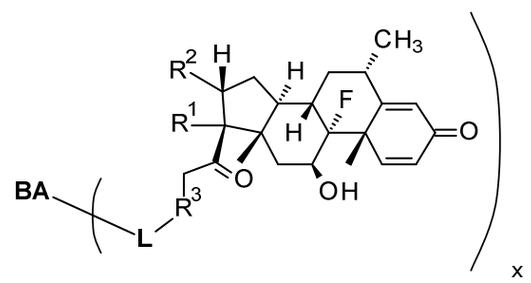
1210



1220



1230

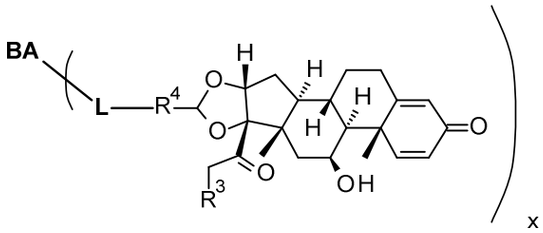


1240

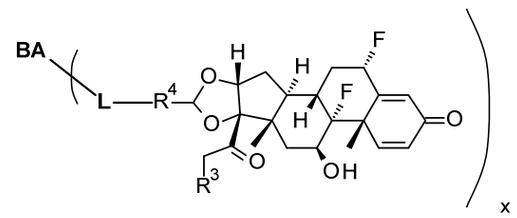
o una sal, solvato, o estereoisómero farmacéuticamente aceptable de los mismos;

en donde R^3 se une covelentemente a L o BA.

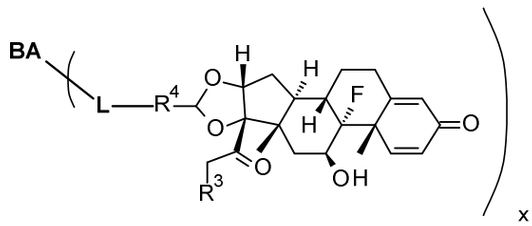
36. El compuesto de la reivindicación 34 de acuerdo con la Fórmula **1310, 1320, 1330**, o **1340**:



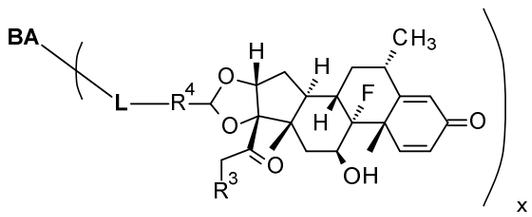
1310



1320



1330

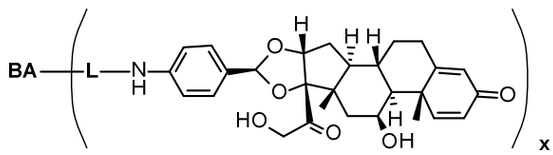


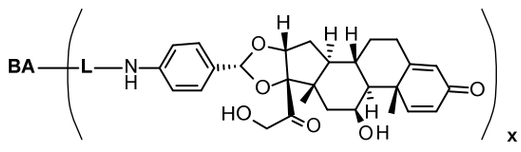
1340

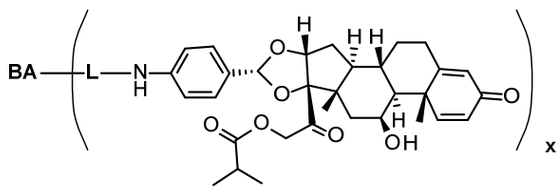
o una sal, solvato, o estereoisómero farmacéuticamente aceptable de los mismos;

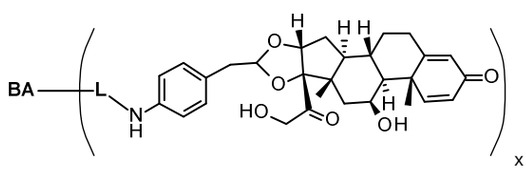
en donde R^4 se une covelentemente a L o BA.

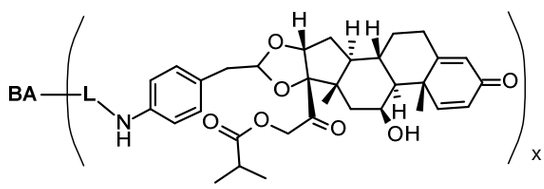
37. El compuesto de la reivindicación 29 seleccionado a partir del grupo que consiste en:

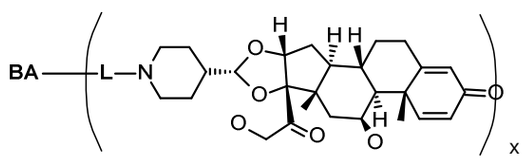


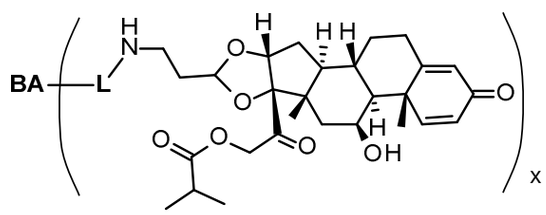


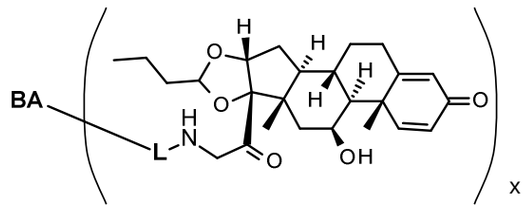


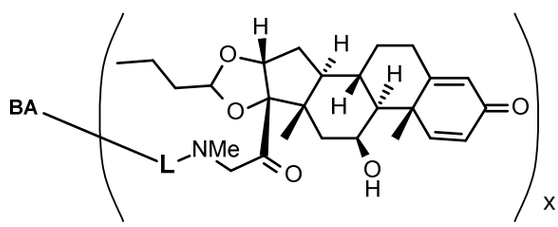


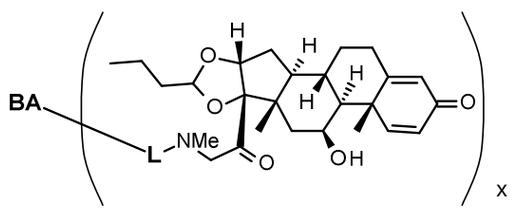


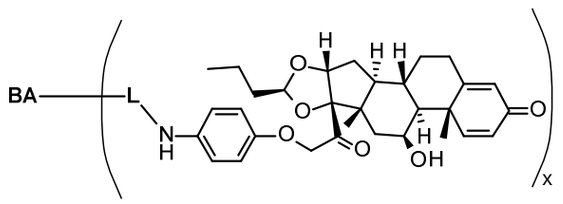


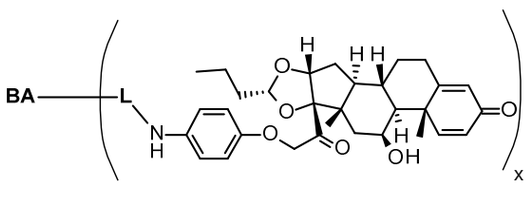


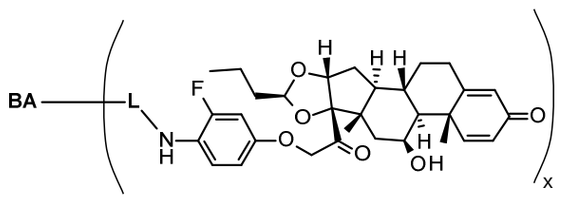


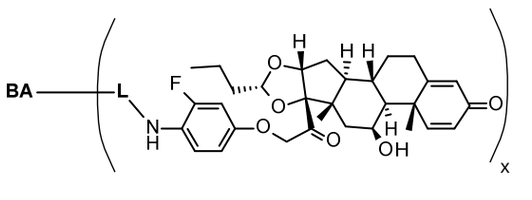


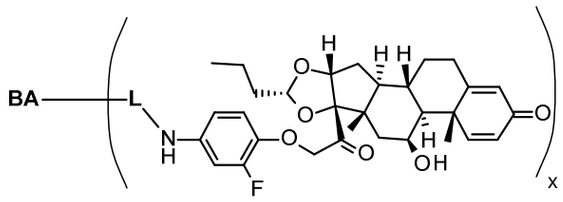


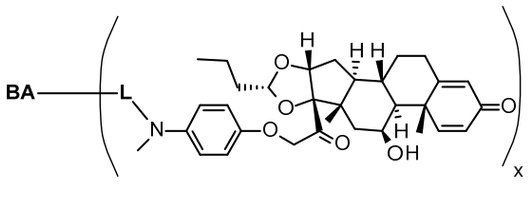


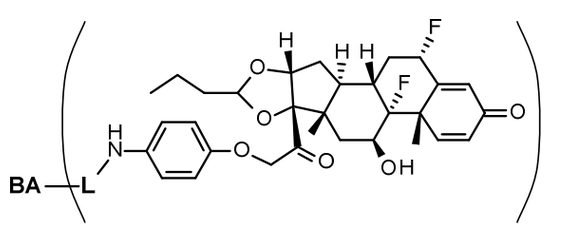


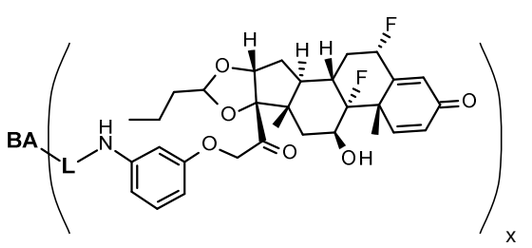


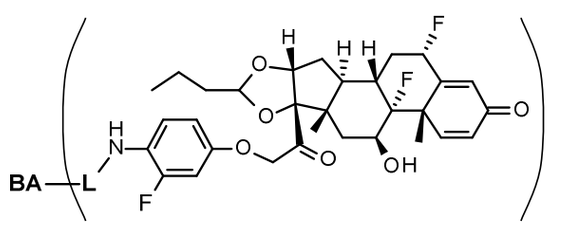


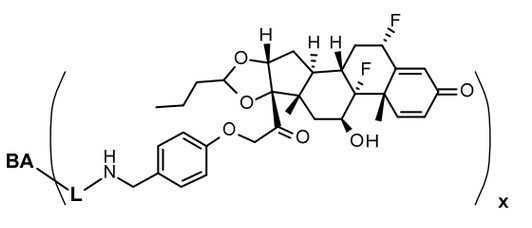


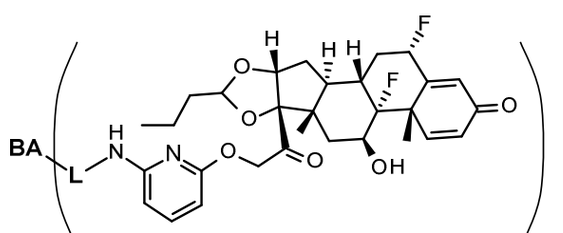


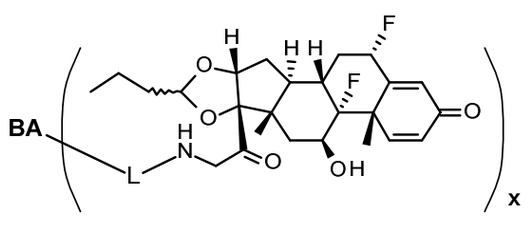


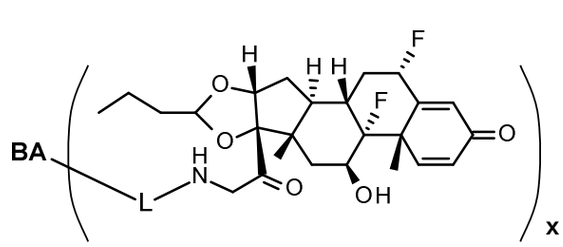


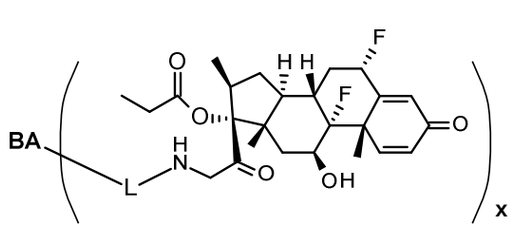


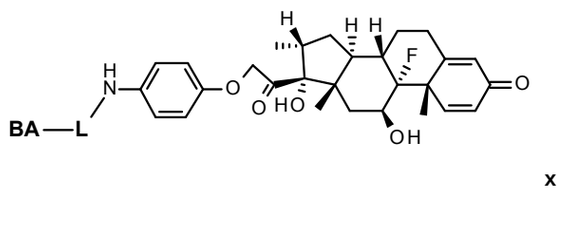


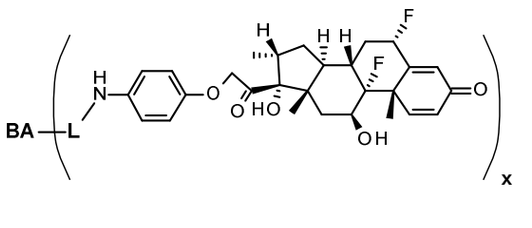


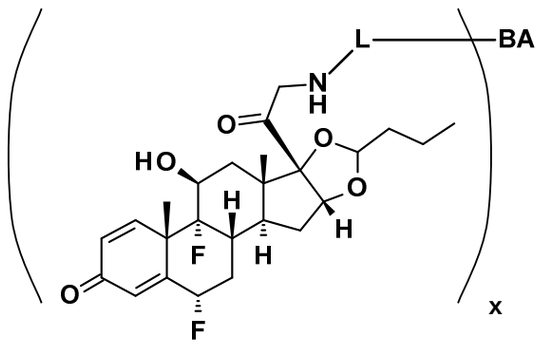


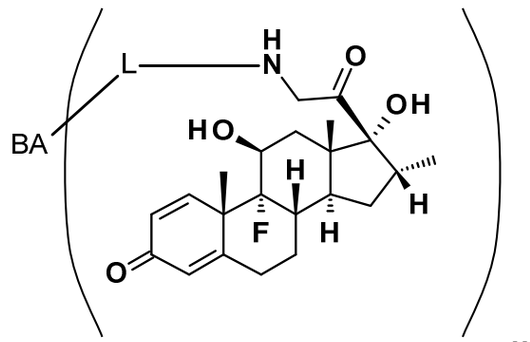


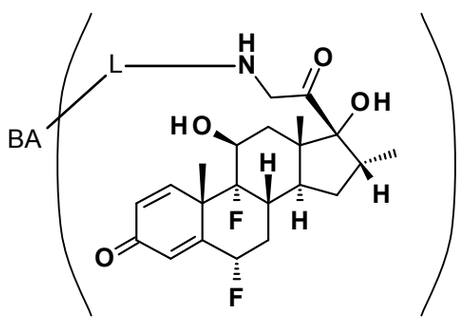


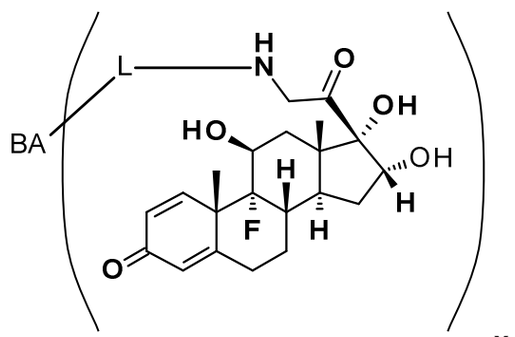


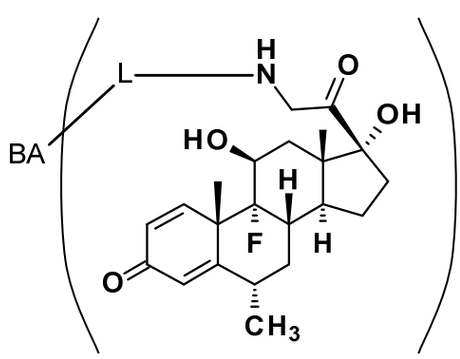


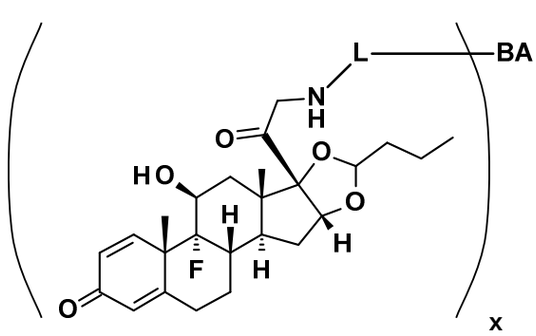


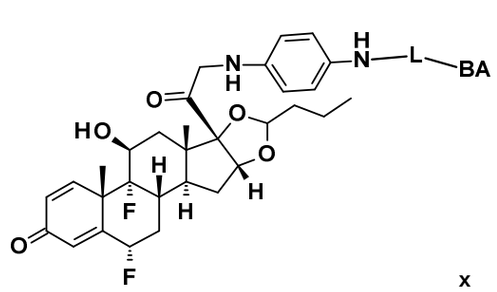


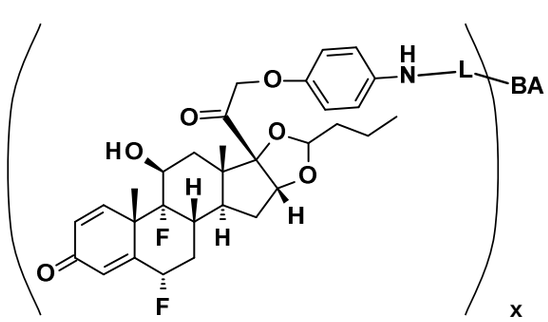


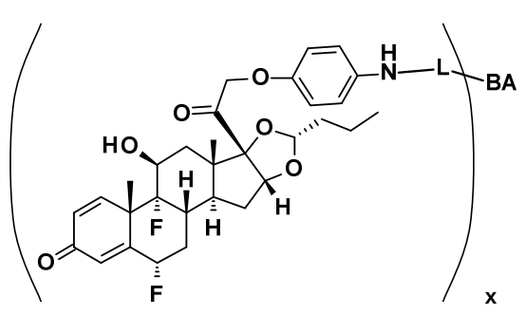


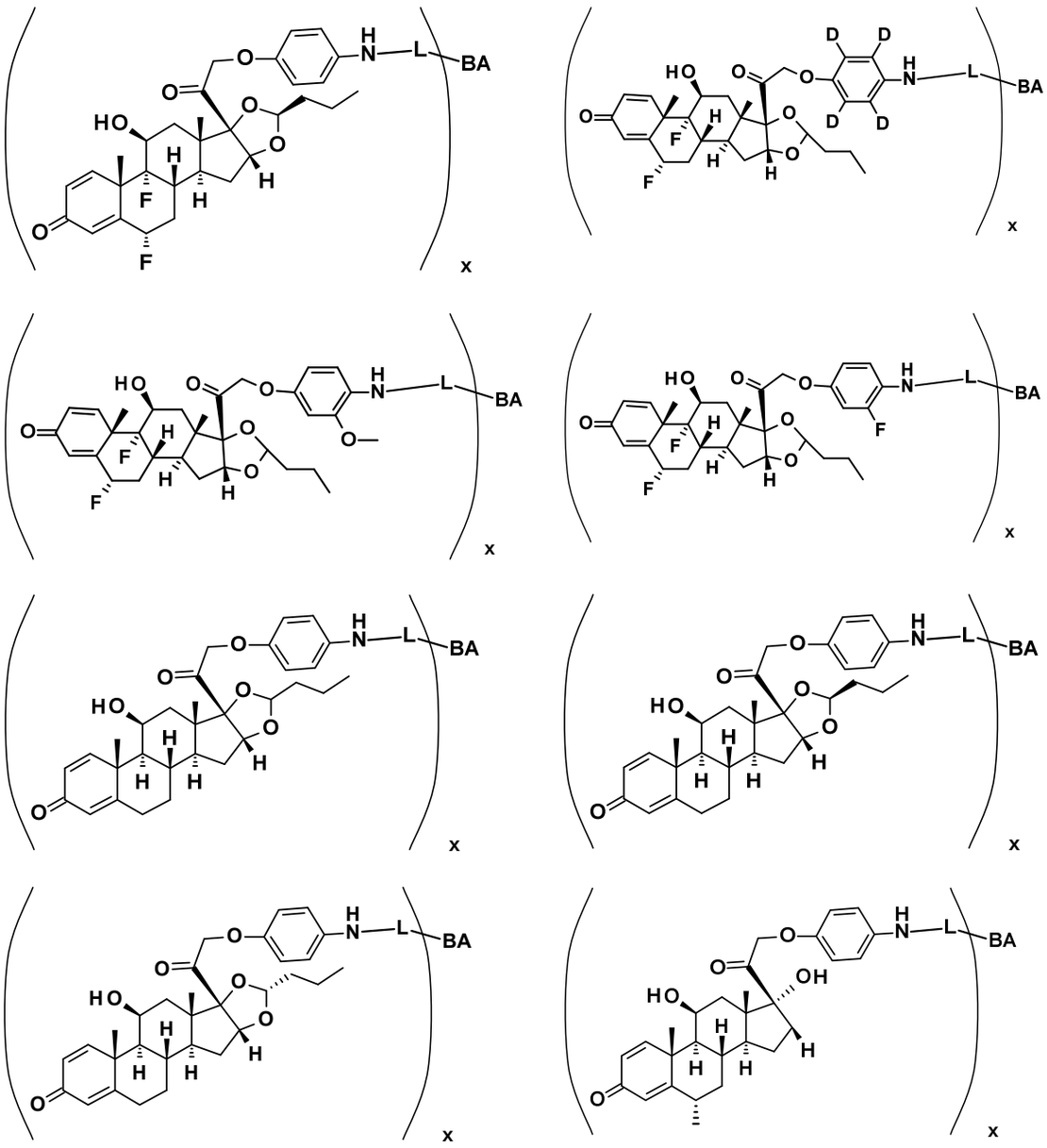












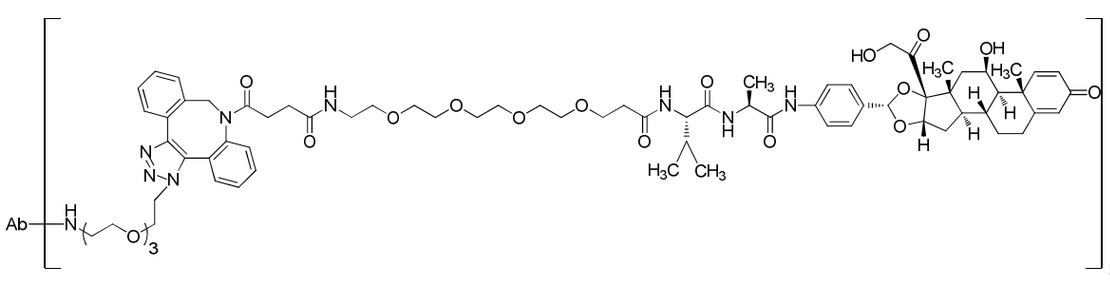
y sales, solvatos, y estereoisómeros farmacéuticamente aceptables de los mismos;

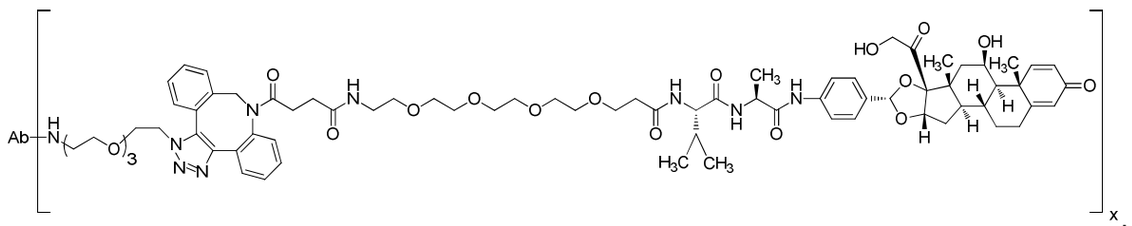
en donde cada L es un enlazador opcional;

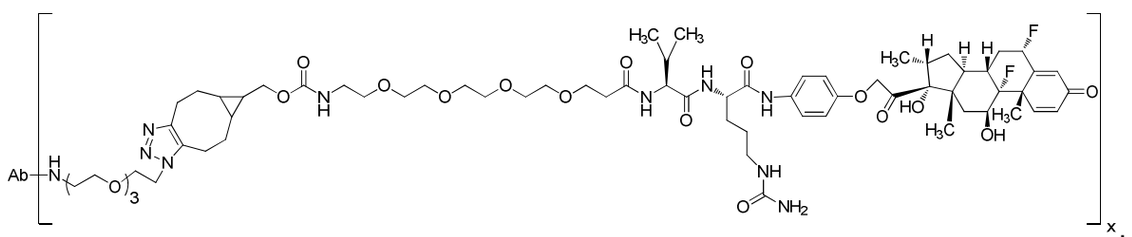
cada BA es un agente de unión; y

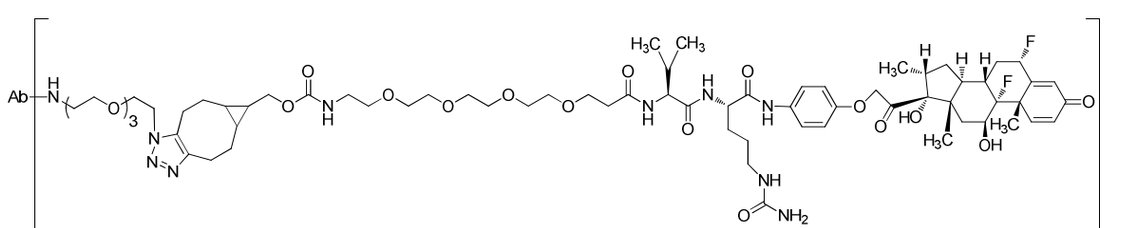
cada x es un entero desde 1 hasta 30.

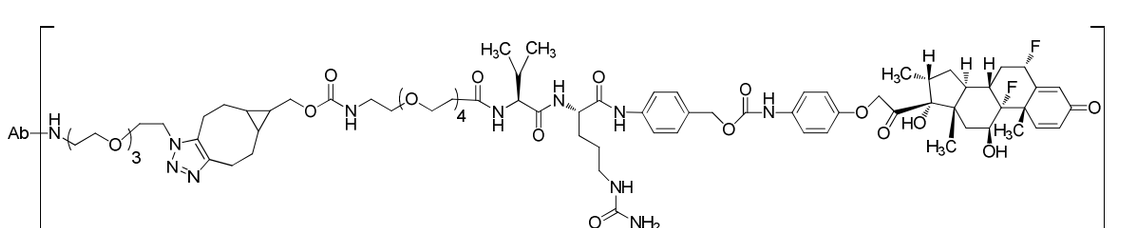
38. El compuesto de la reivindicación 29 seleccionado a partir del grupo que consiste en:

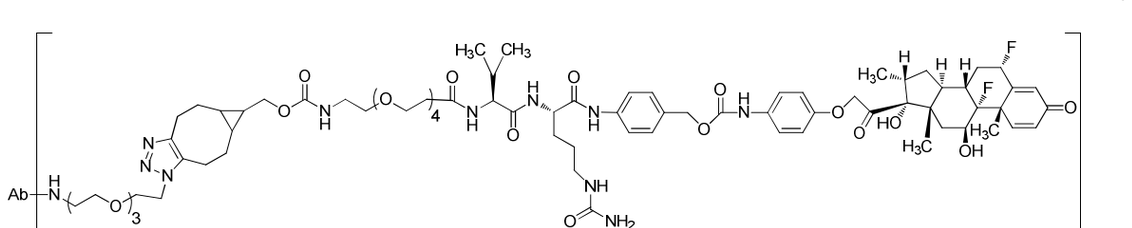




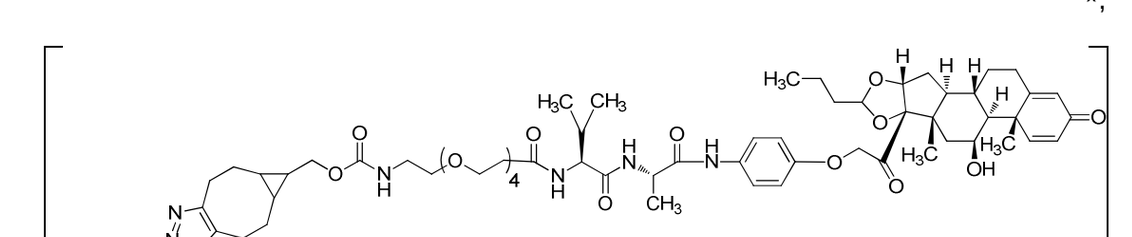


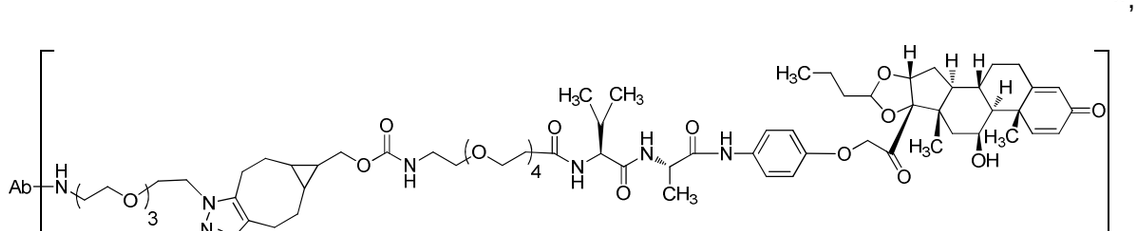


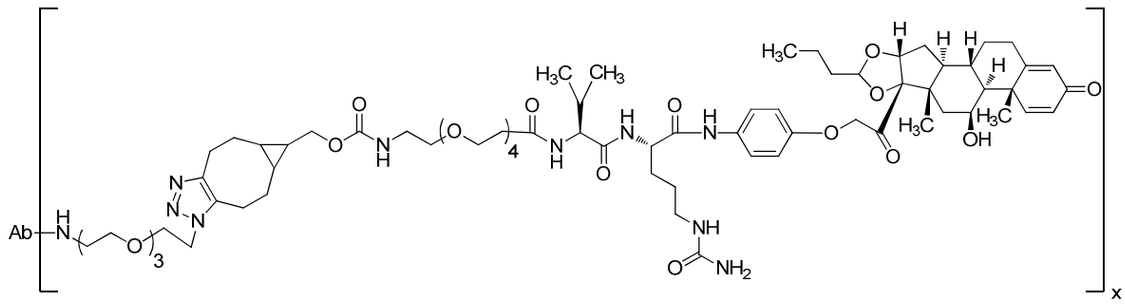


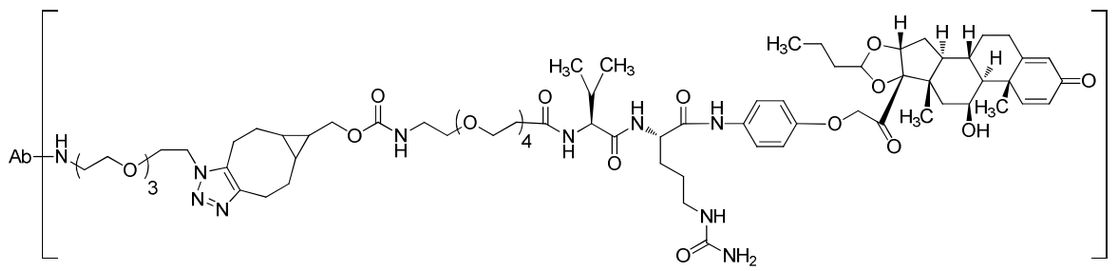


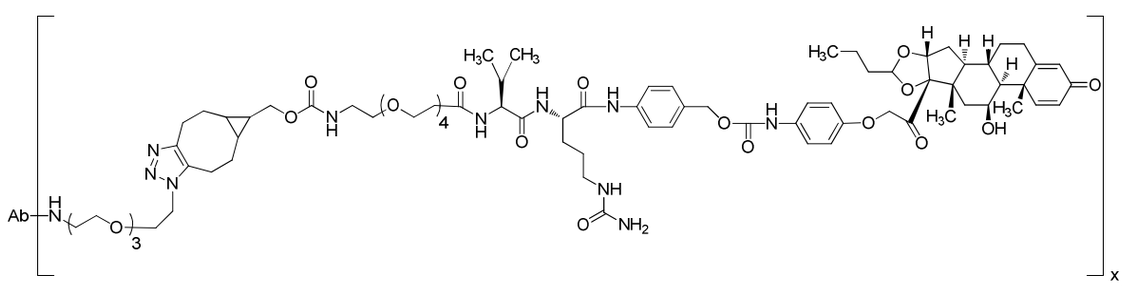
5

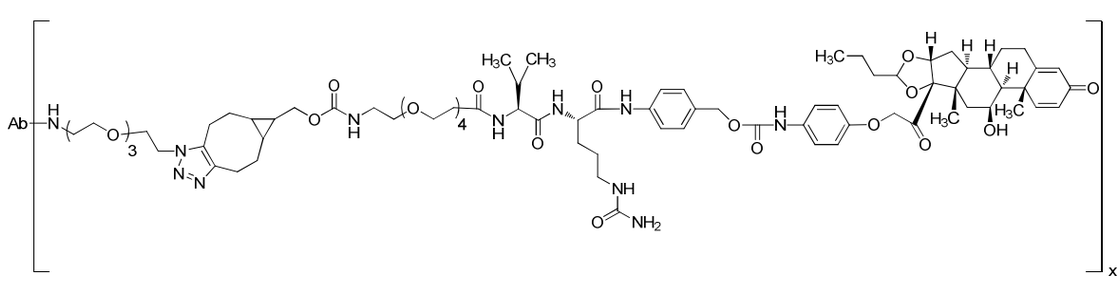


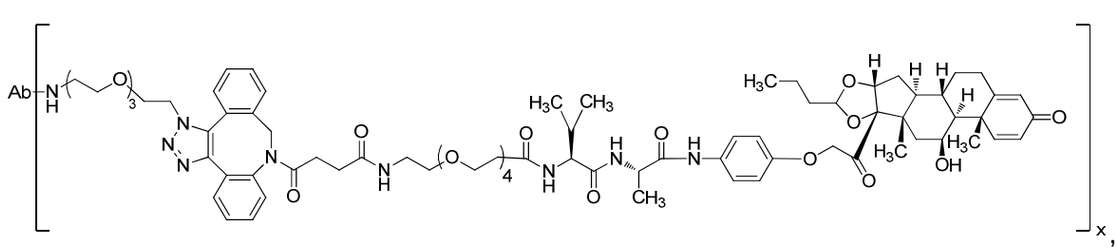


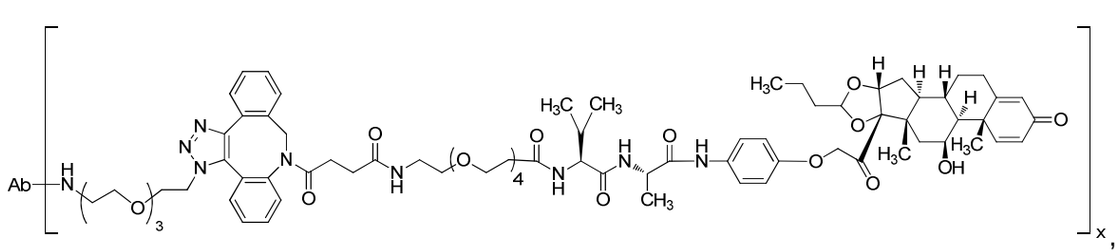


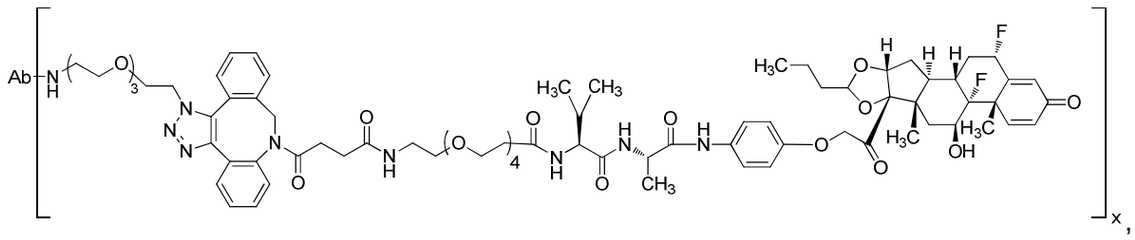


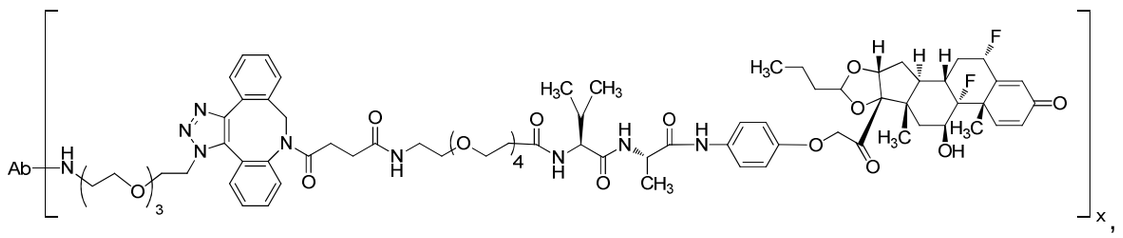


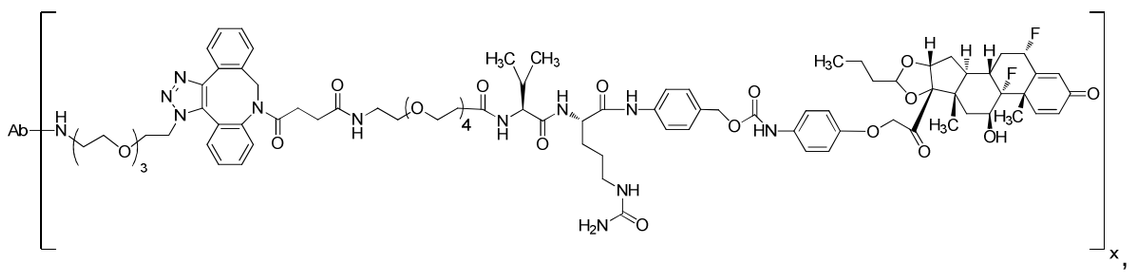


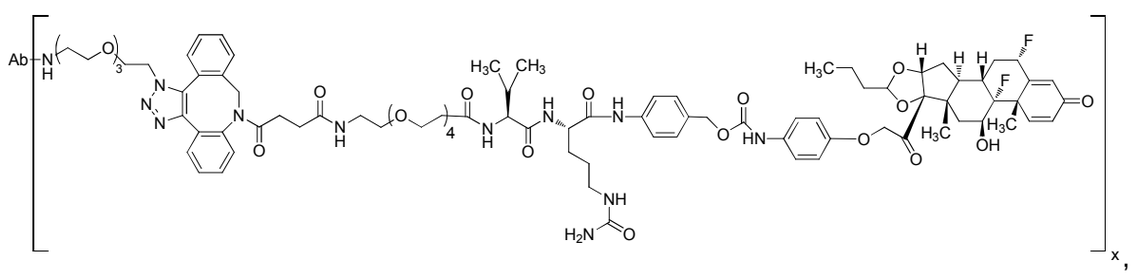


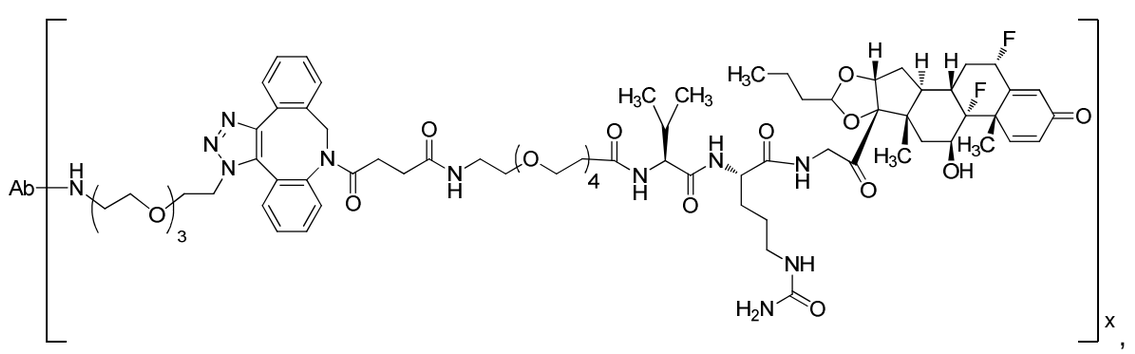


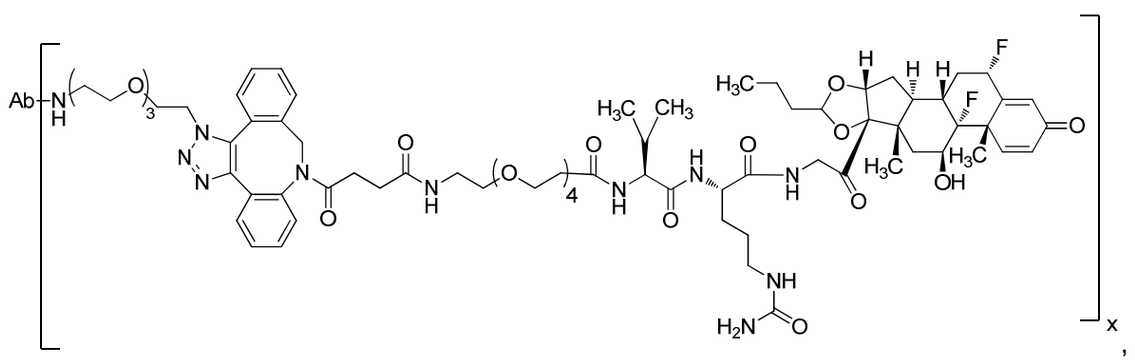


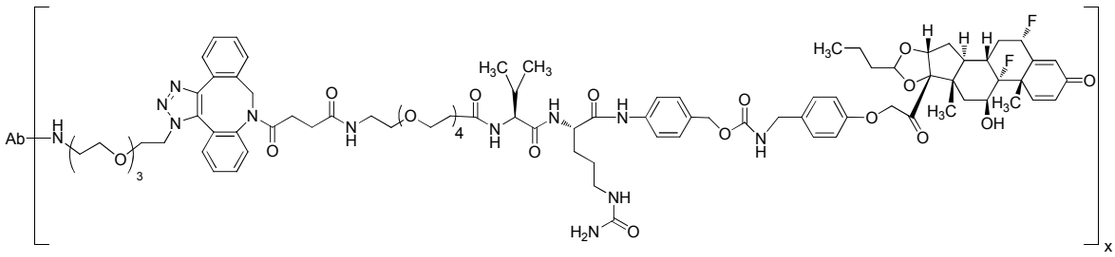




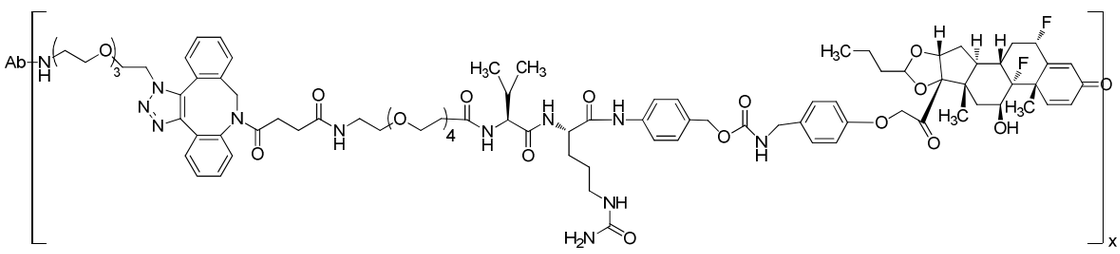




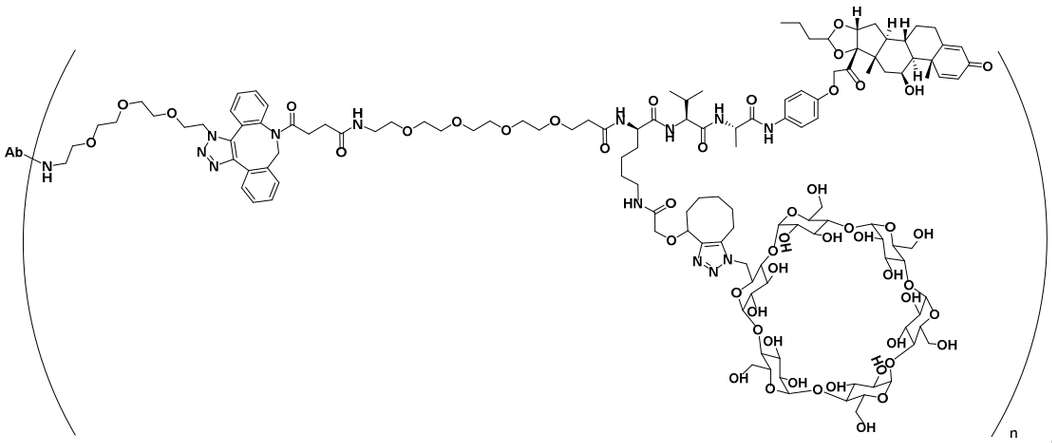




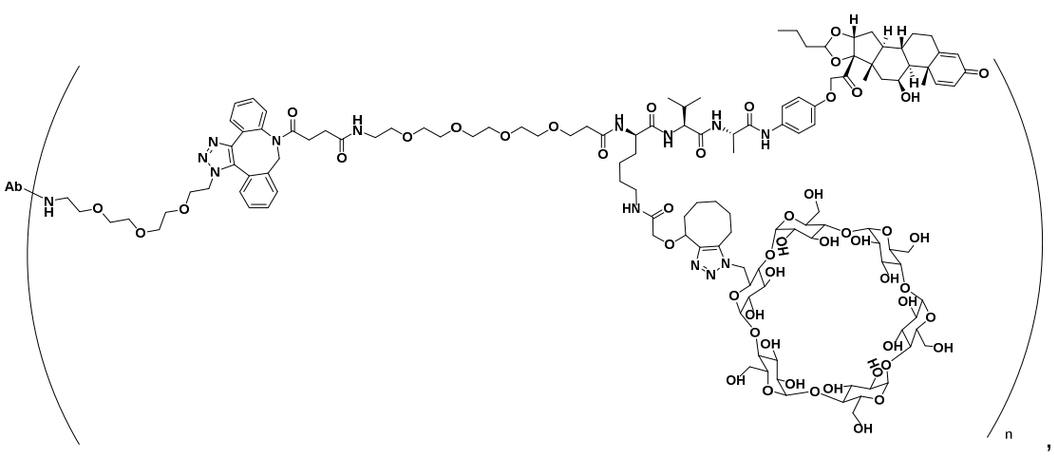
,



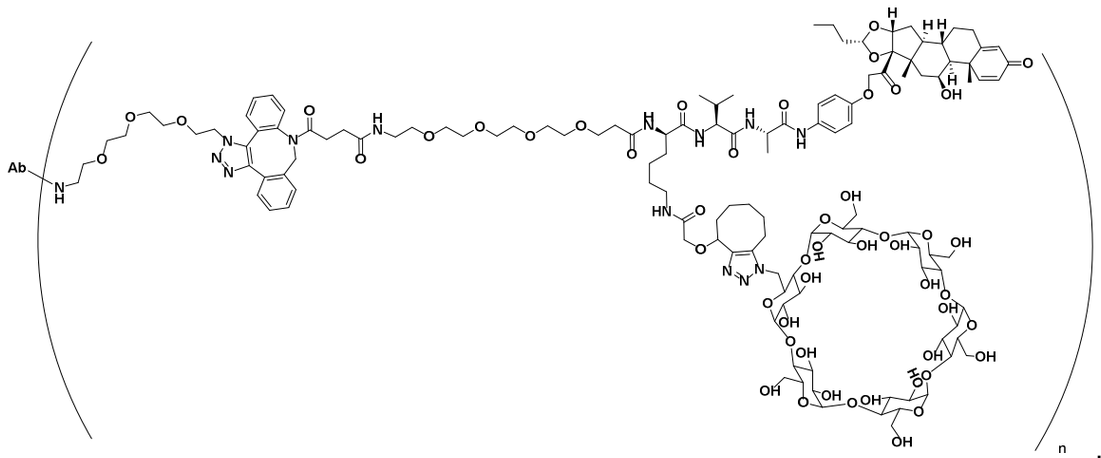
,

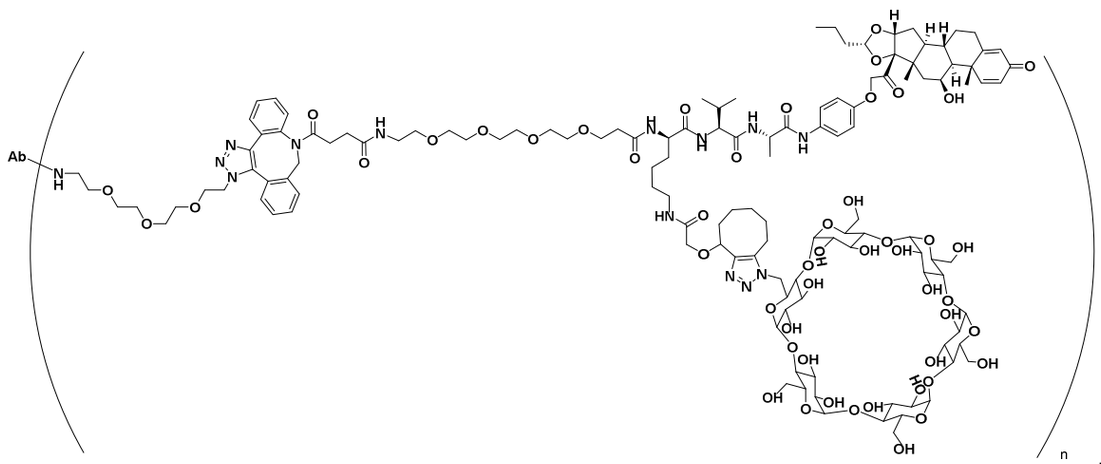


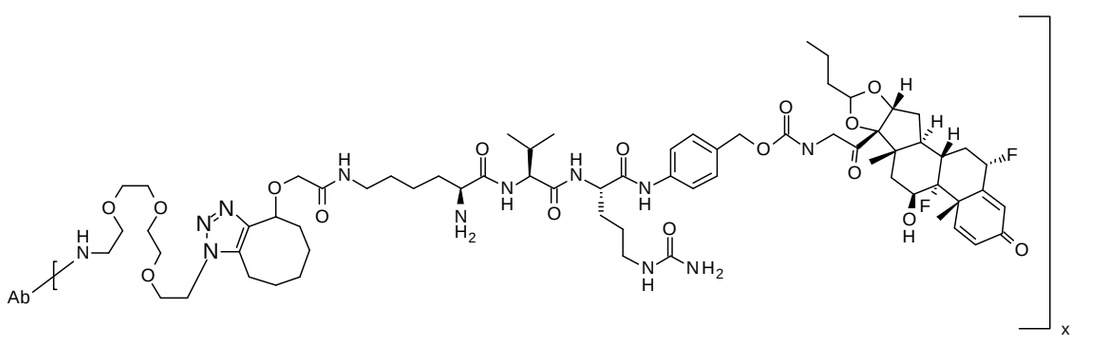
,

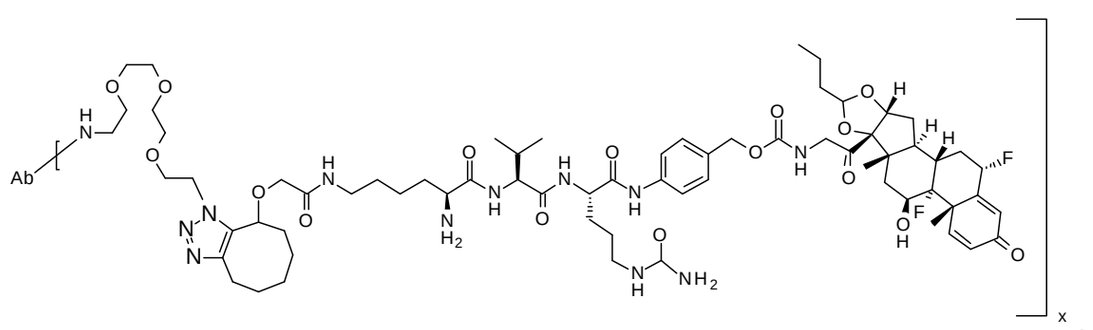


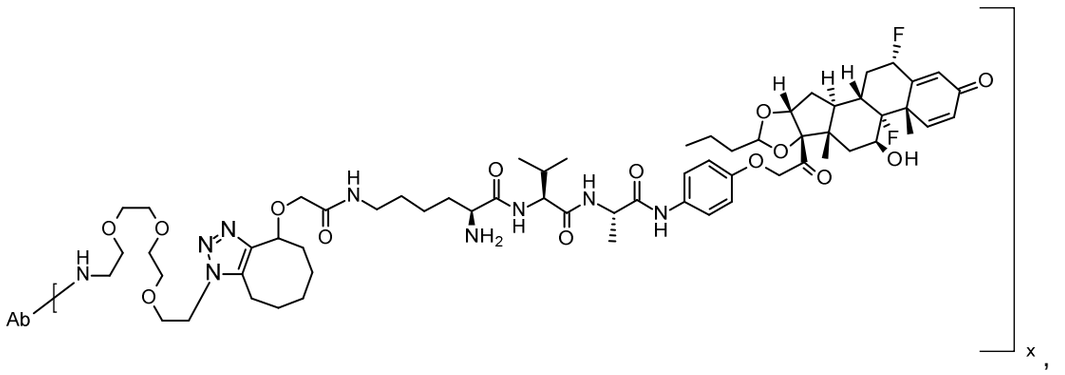
,

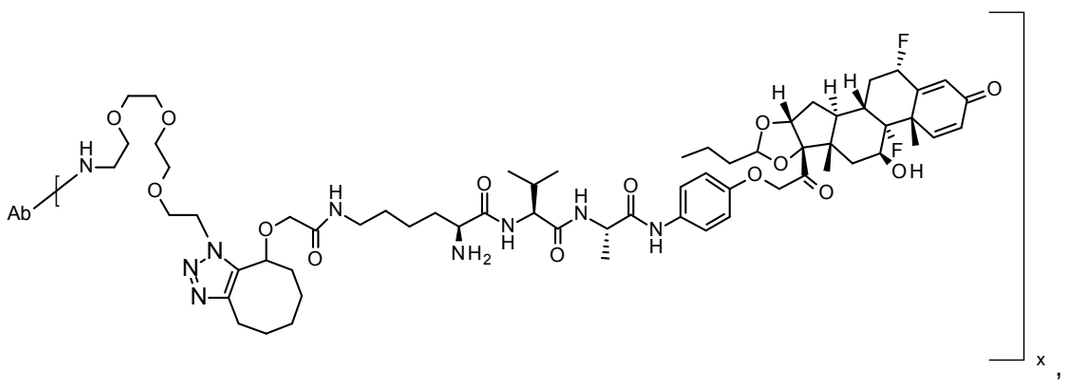


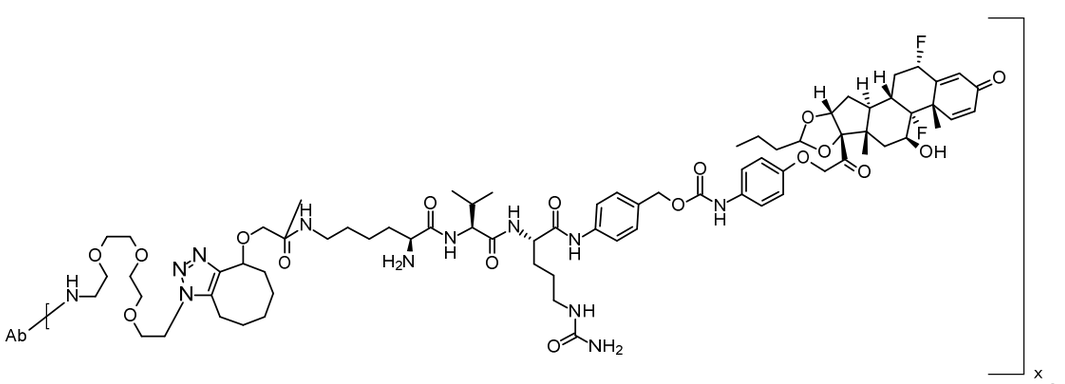


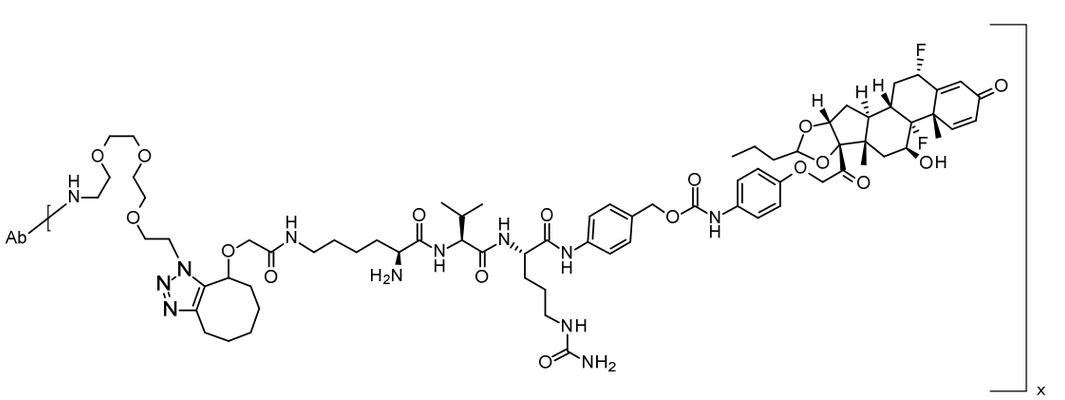


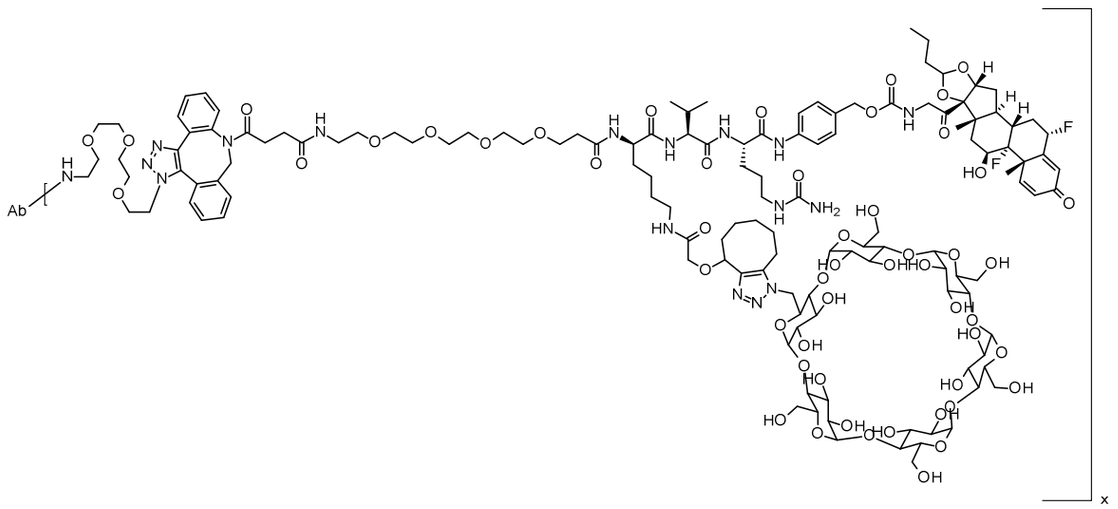


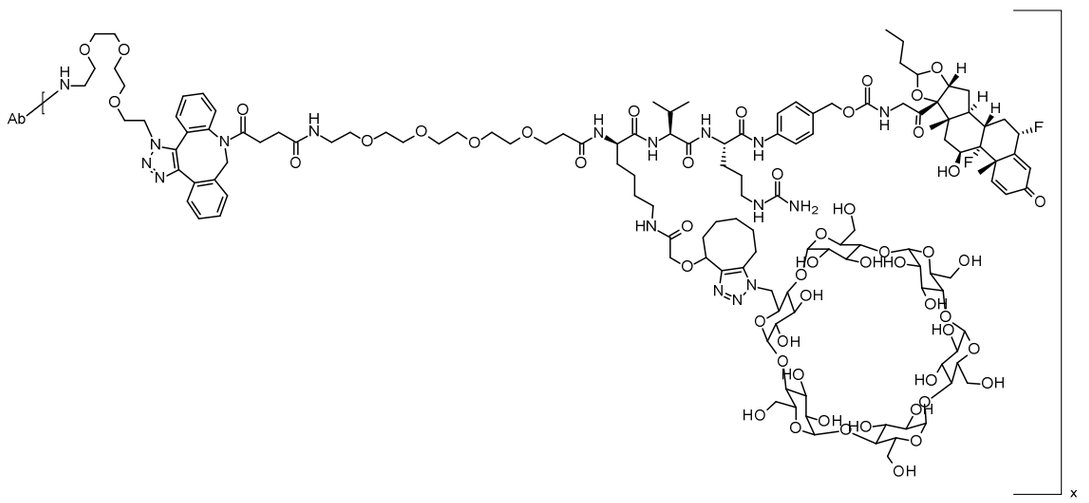


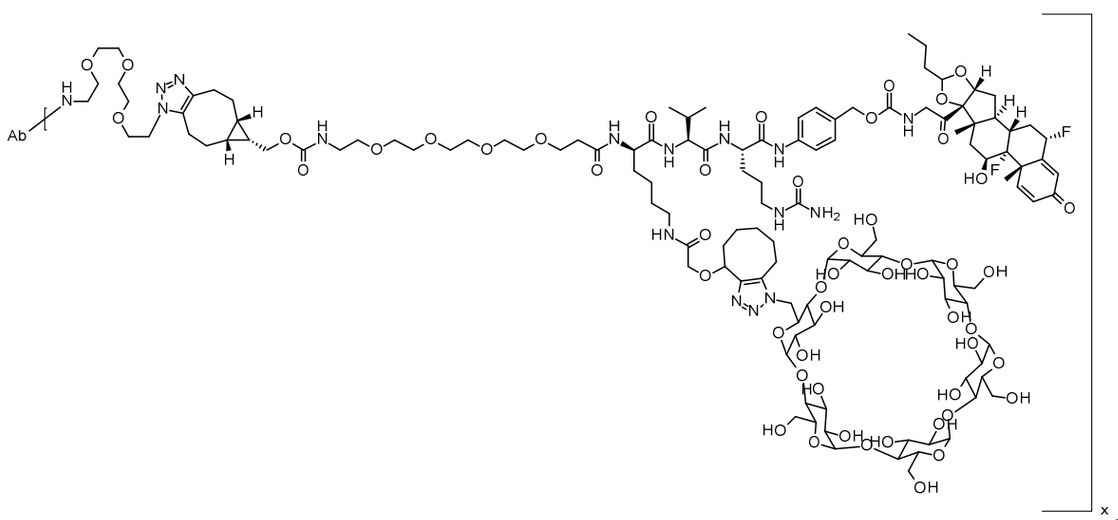


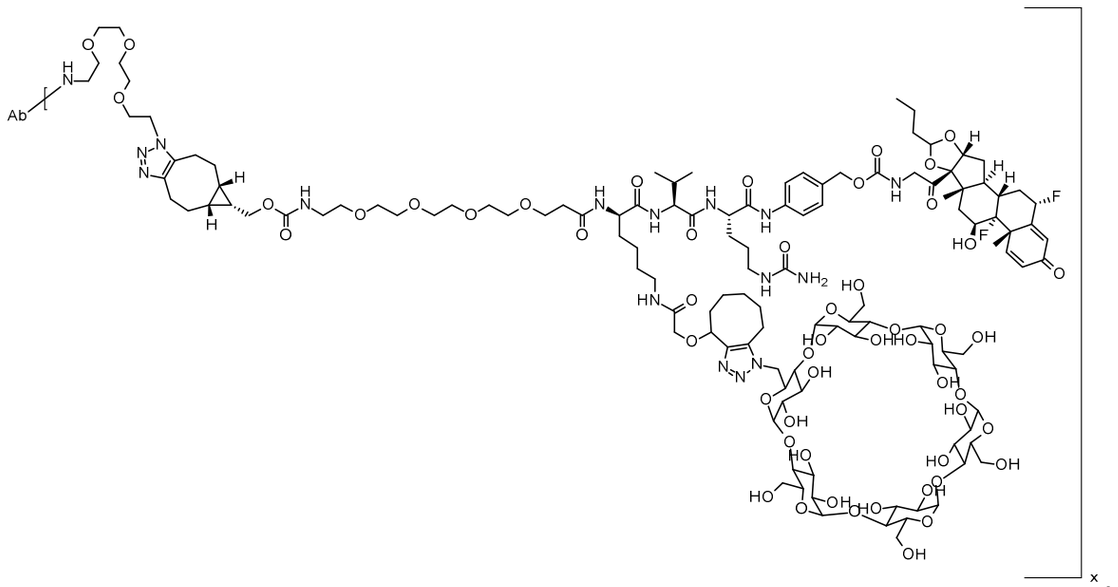


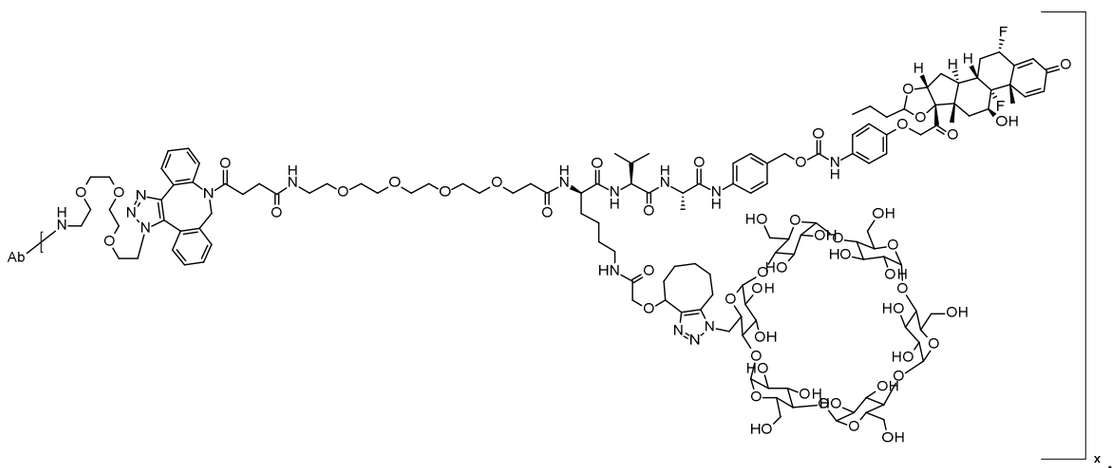


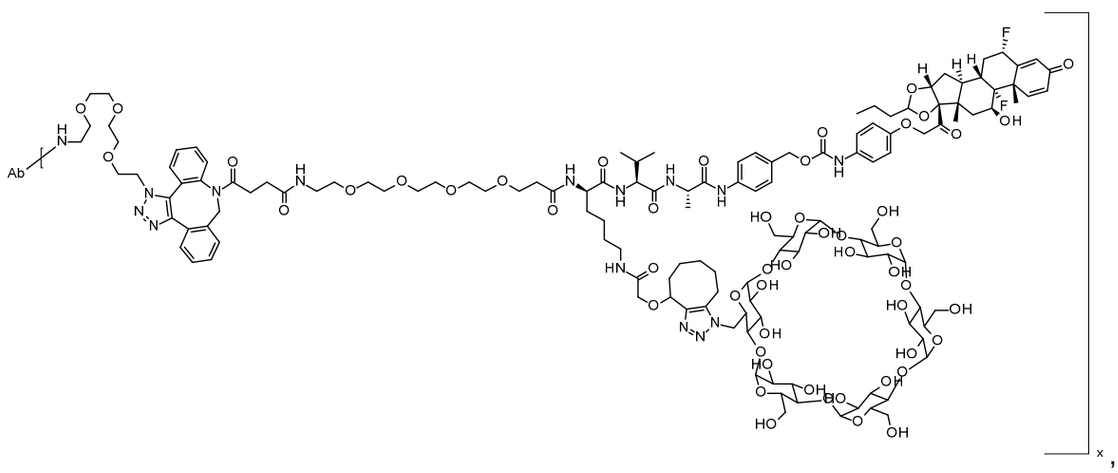


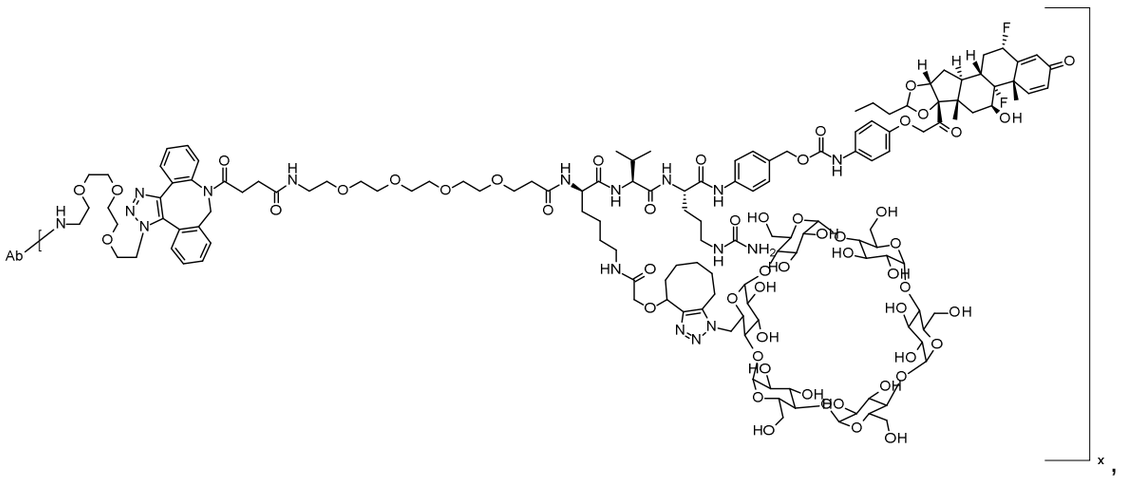


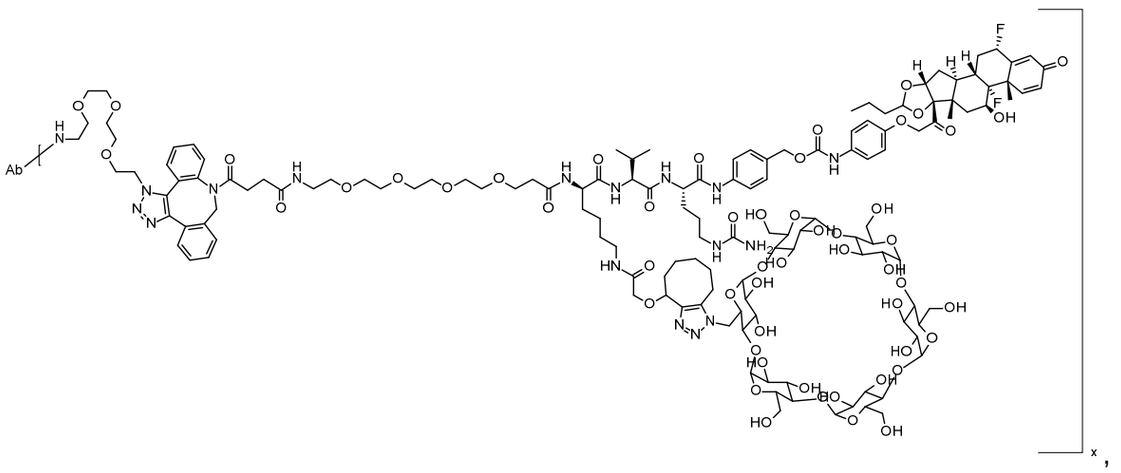


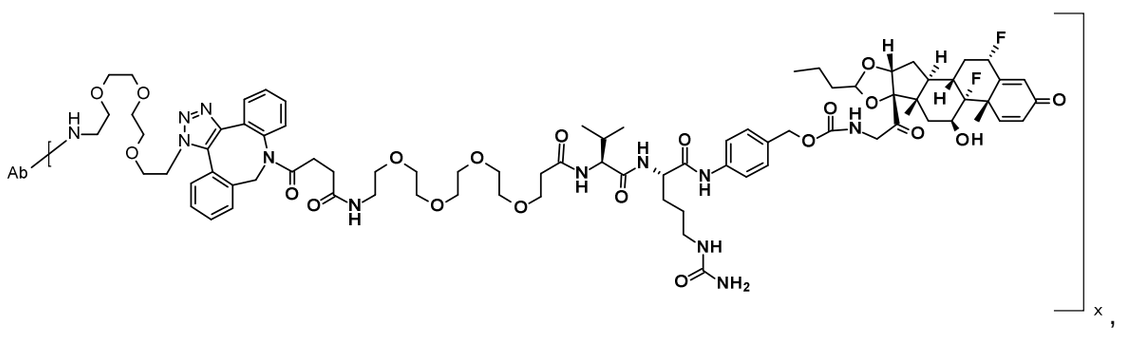


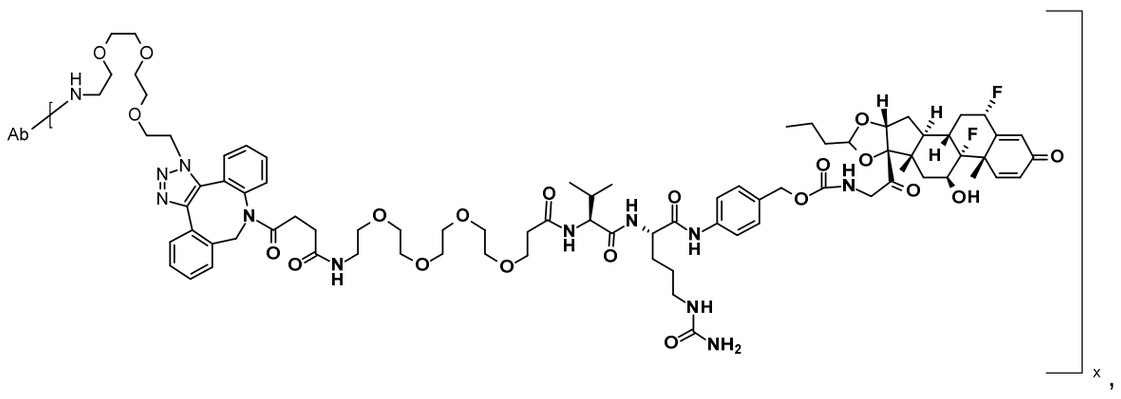


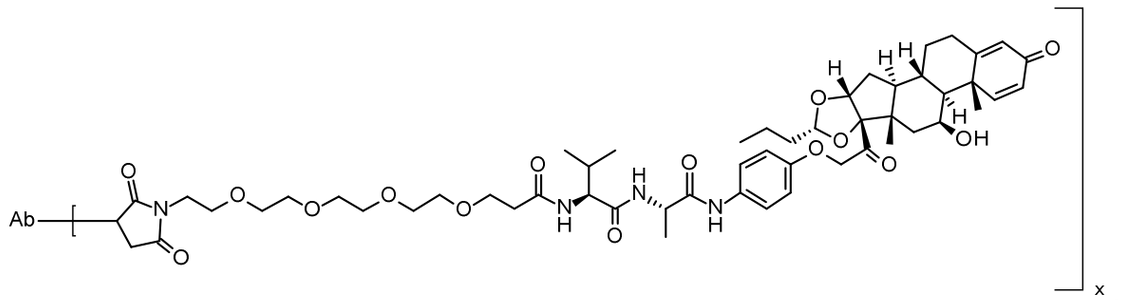


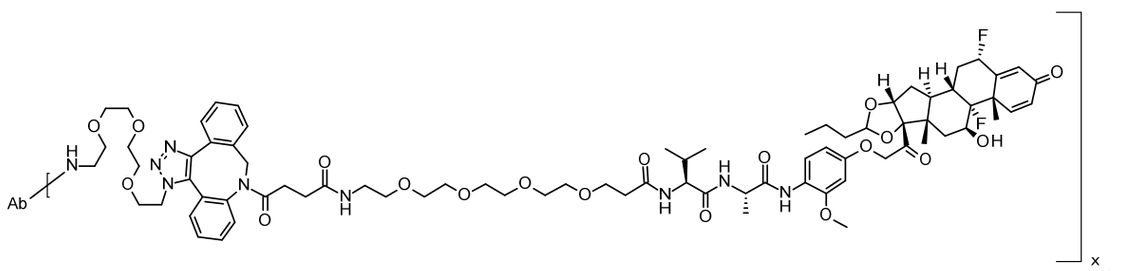


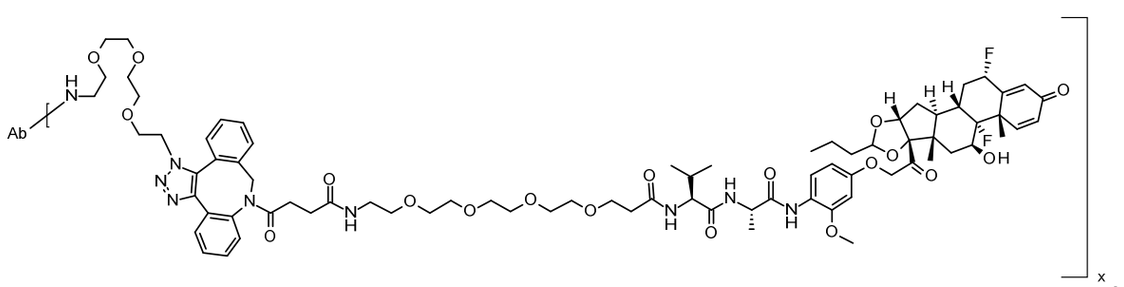


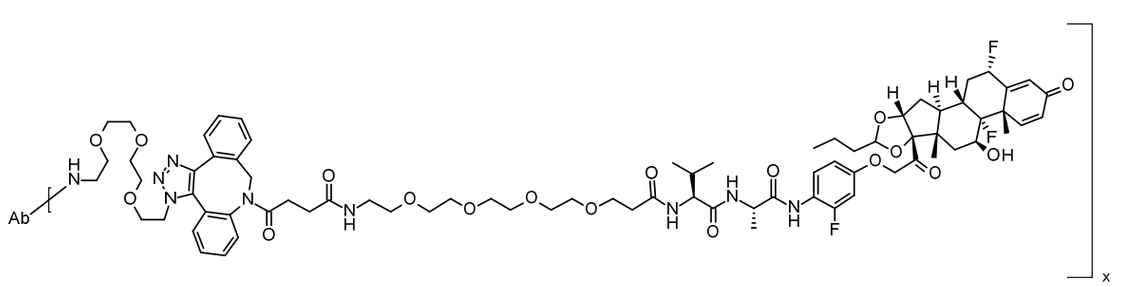


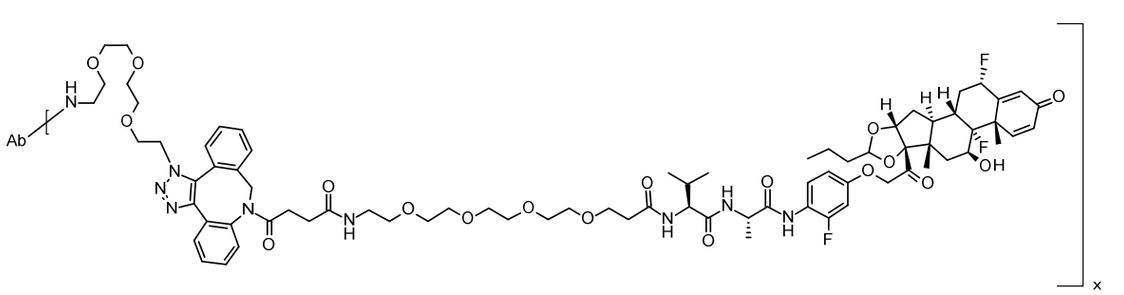


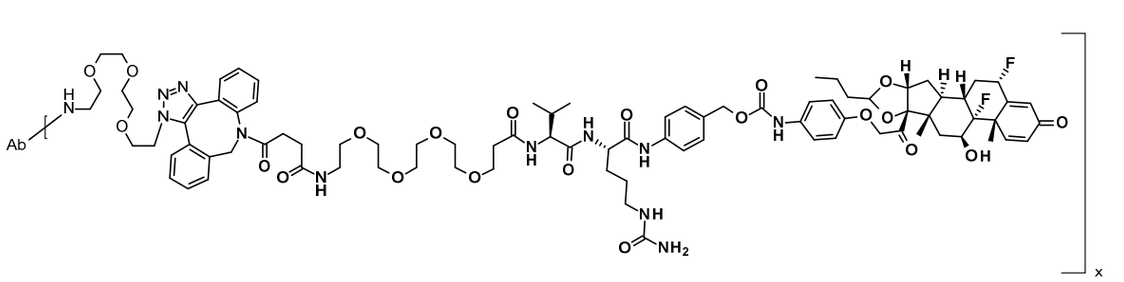


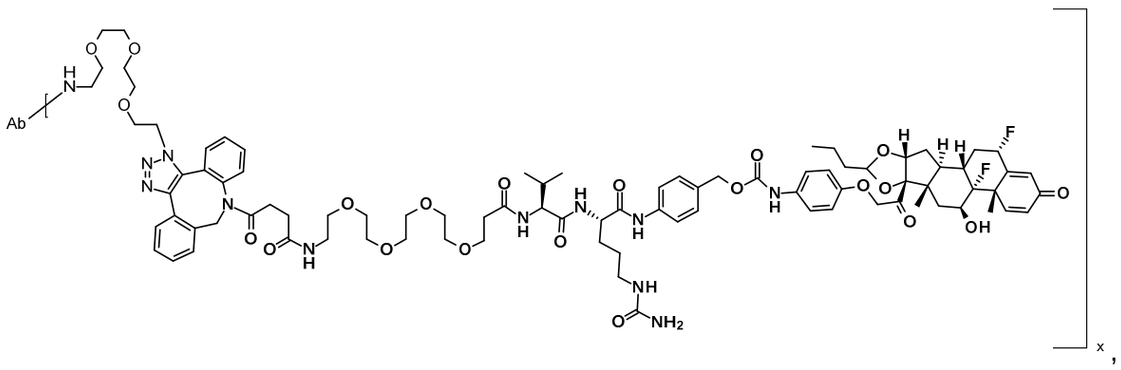












en donde x es un entero desde 1 hasta 30; y n es un entero desde 1 hasta 30;

o una sal, solvato, o estereoisómero farmacéuticamente aceptable de los mismos.

39. Un método para tratar un padecimiento, desorden, o condición asociada con la señalización del receptor de glucocorticoides que comprende administrar a un paciente que tiene dicho padecimiento, desorden, o condición una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-28 o un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 29-38.

40. El método de la reivindicación 39, en donde el padecimiento, desorden, o condición es un padecimiento, desorden, o condición inflamatoria.

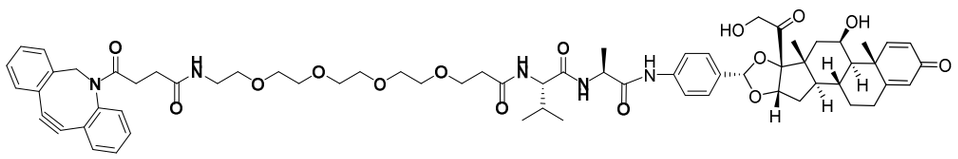
41. El método de la reivindicación 40, en donde se administra un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 14-18.

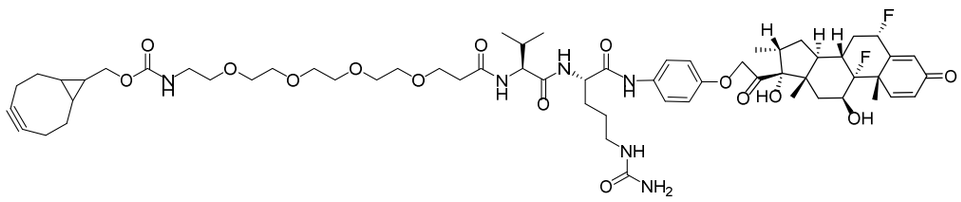
42. El método de la reivindicación 41, en donde se reducen los efectos secundarios asociados con la administración de la carga útil de esteroides no conjugados de dicho compuesto.

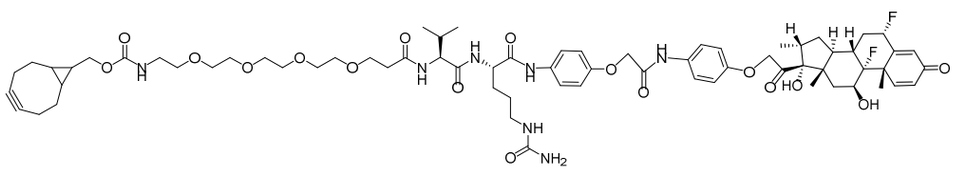
43. Un método de entrega de un compuesto de la reivindicación 1 a una célula que comprende poner en contacto dicha célula con un conjugado de esteroide de proteína de dicho compuesto, en donde dicho conjugado de proteína comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a un antígeno de superficie de dicha célula.

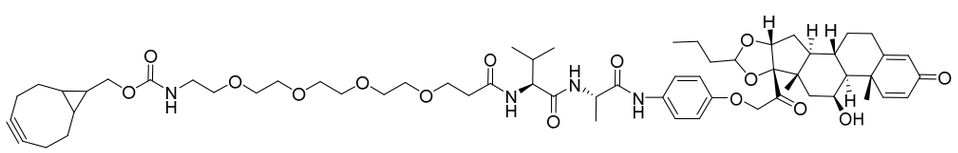
44. Un enlazador-carga útil que comprende el compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-28 unido a un grupo reactivo, opcionalmente a través de un enlazador.

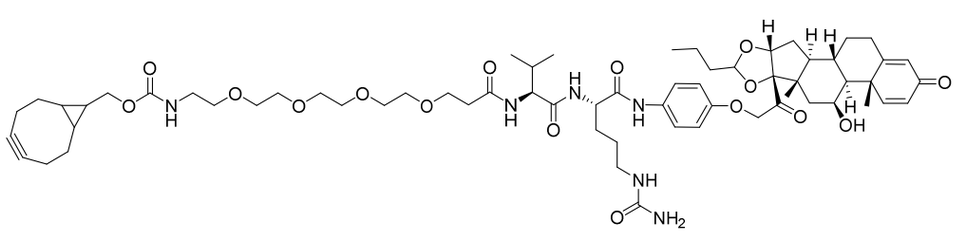
45. El enlazador-carga útil de la reivindicación 44 seleccionado a partir del grupo que consiste en:

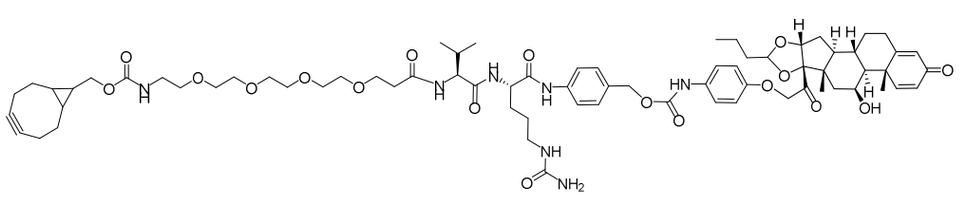


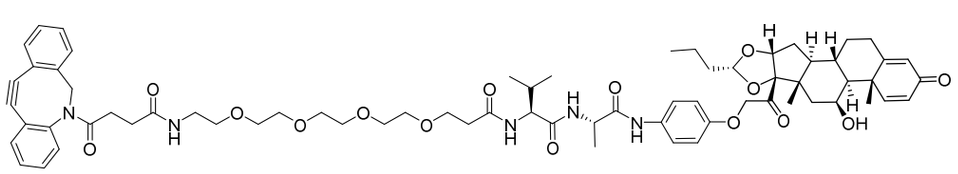


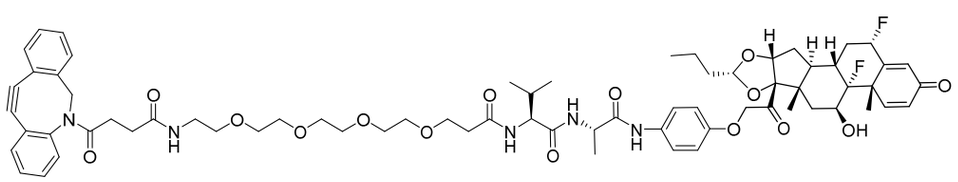


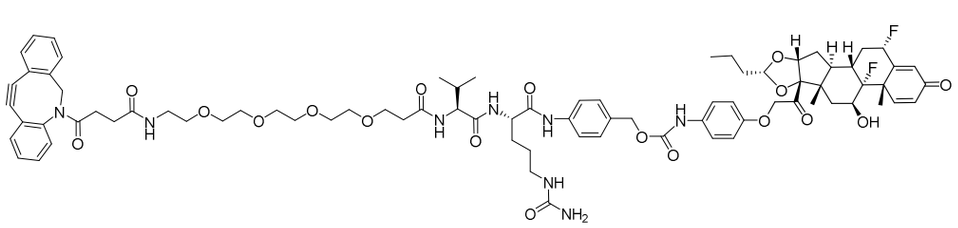


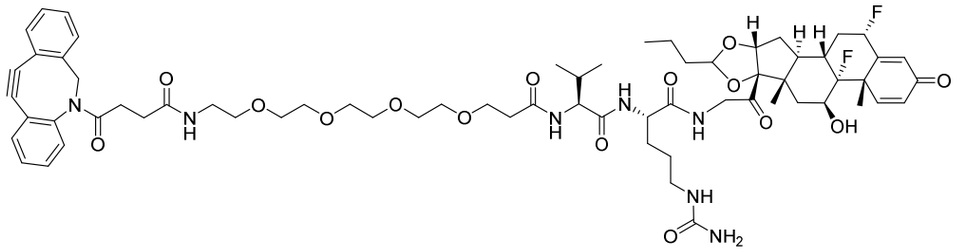


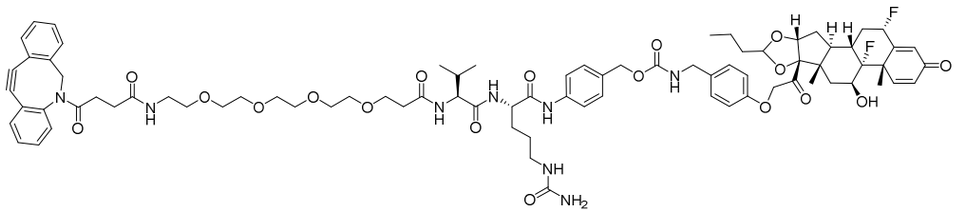


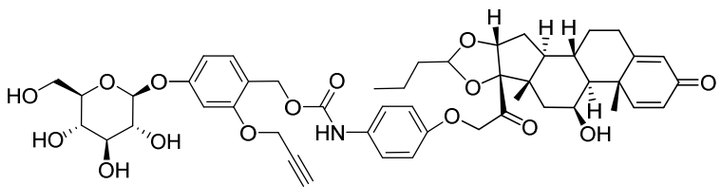


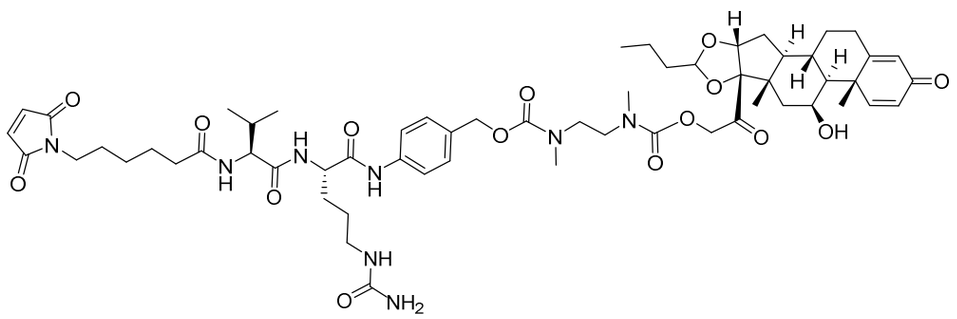


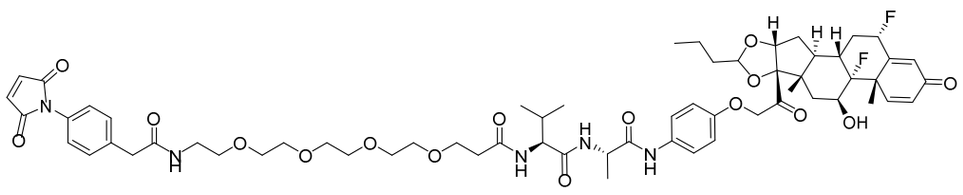


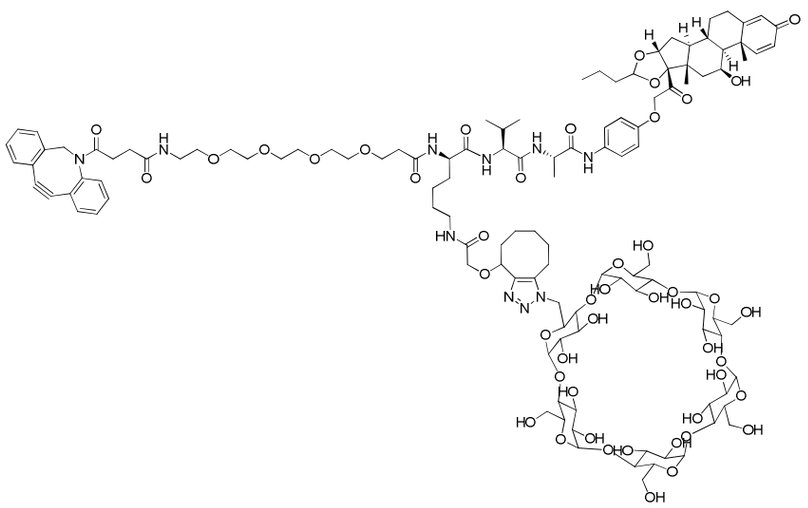


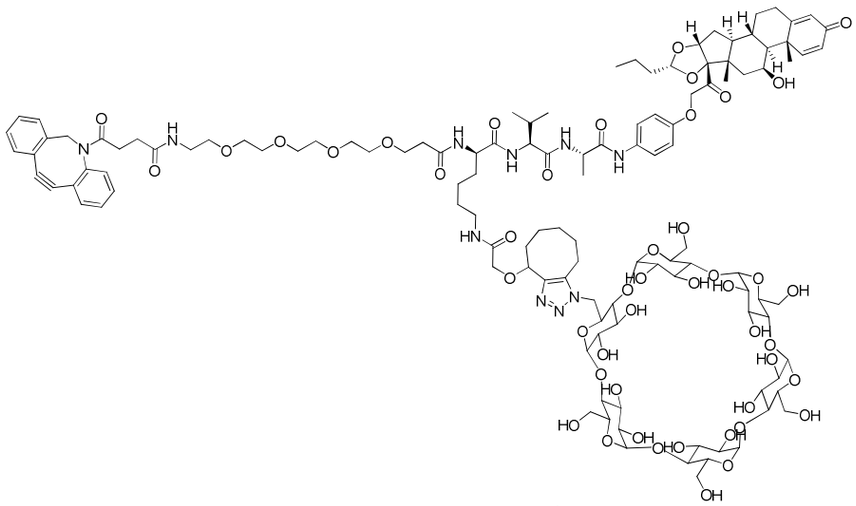


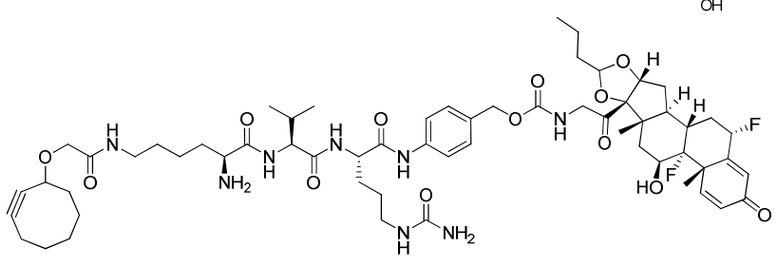


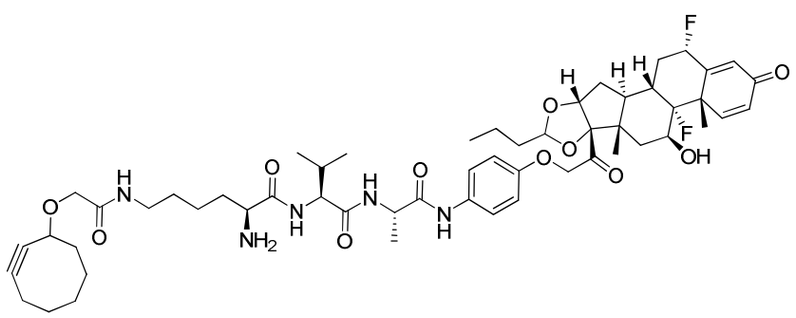


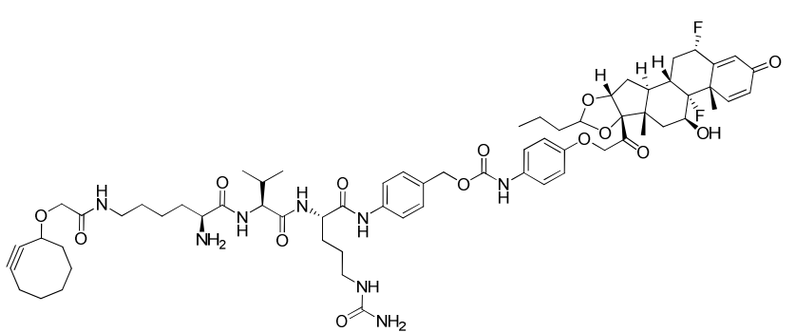


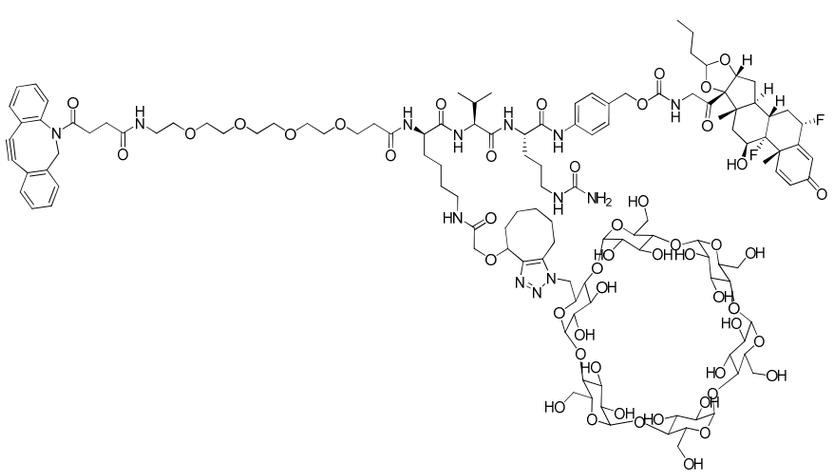


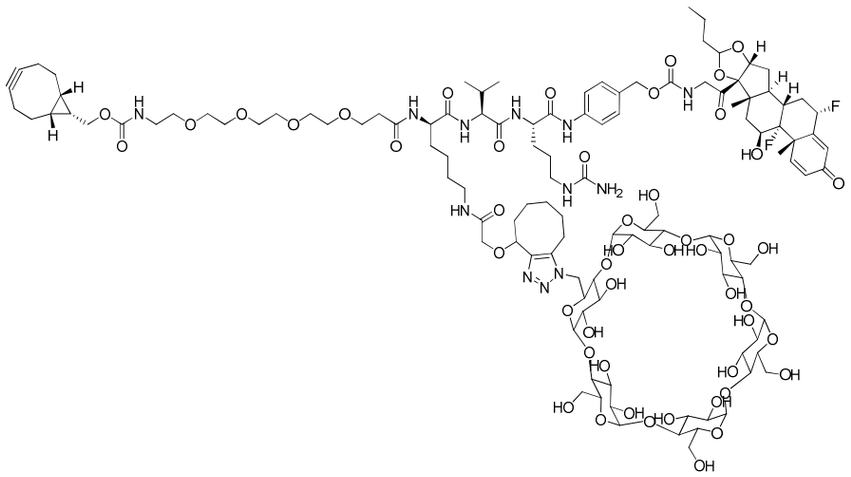


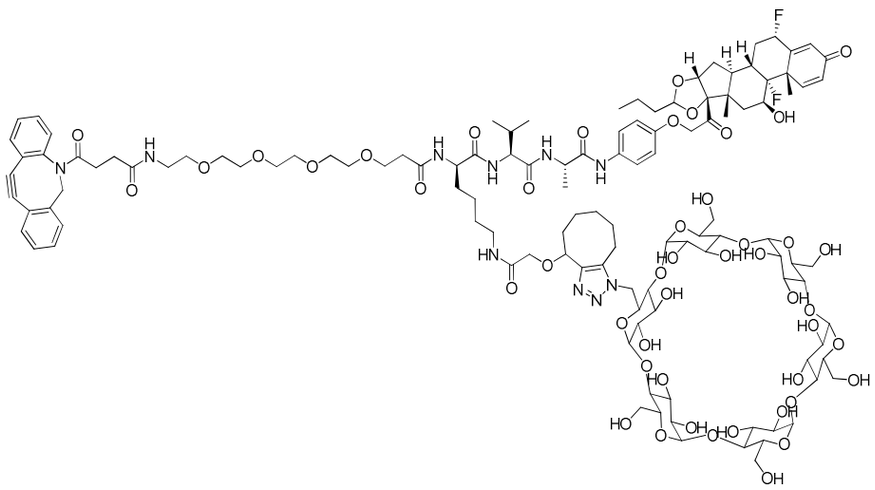


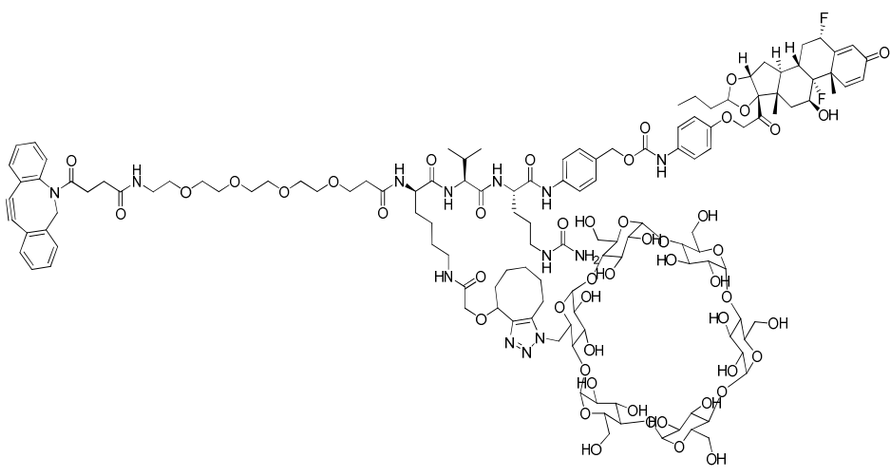


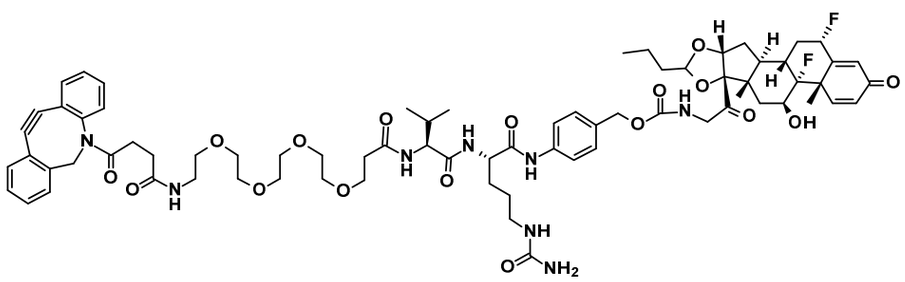


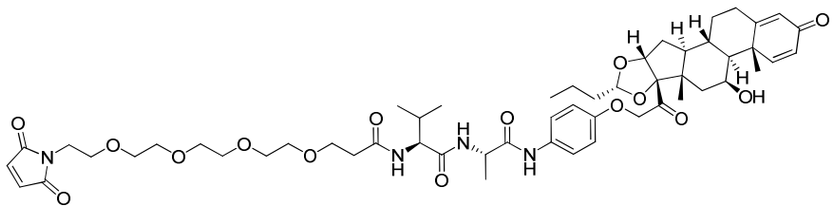


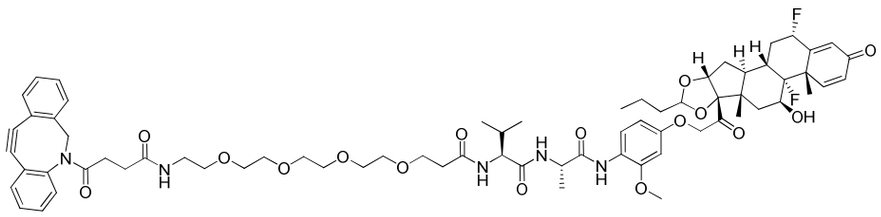


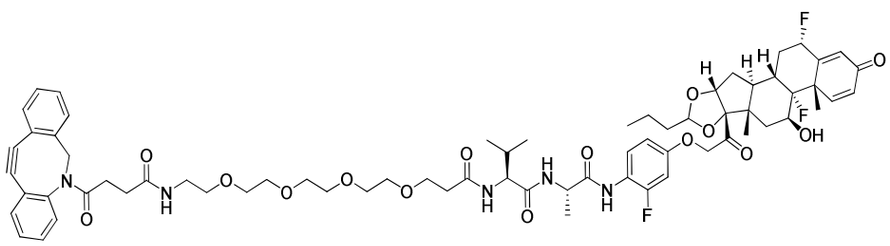




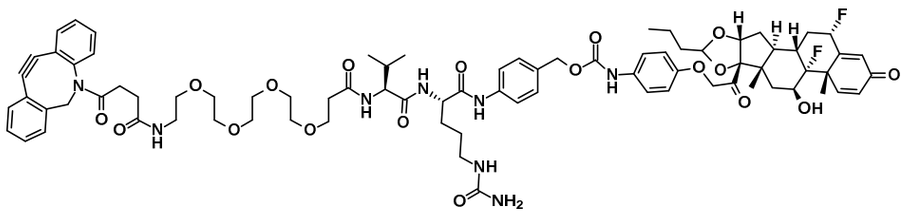








y



.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

Se describen aquí conjugados de esteroide de proteína que son útiles, por ejemplo, para la entrega específica a objetivo de glucocorticoides (GCs) a las células.

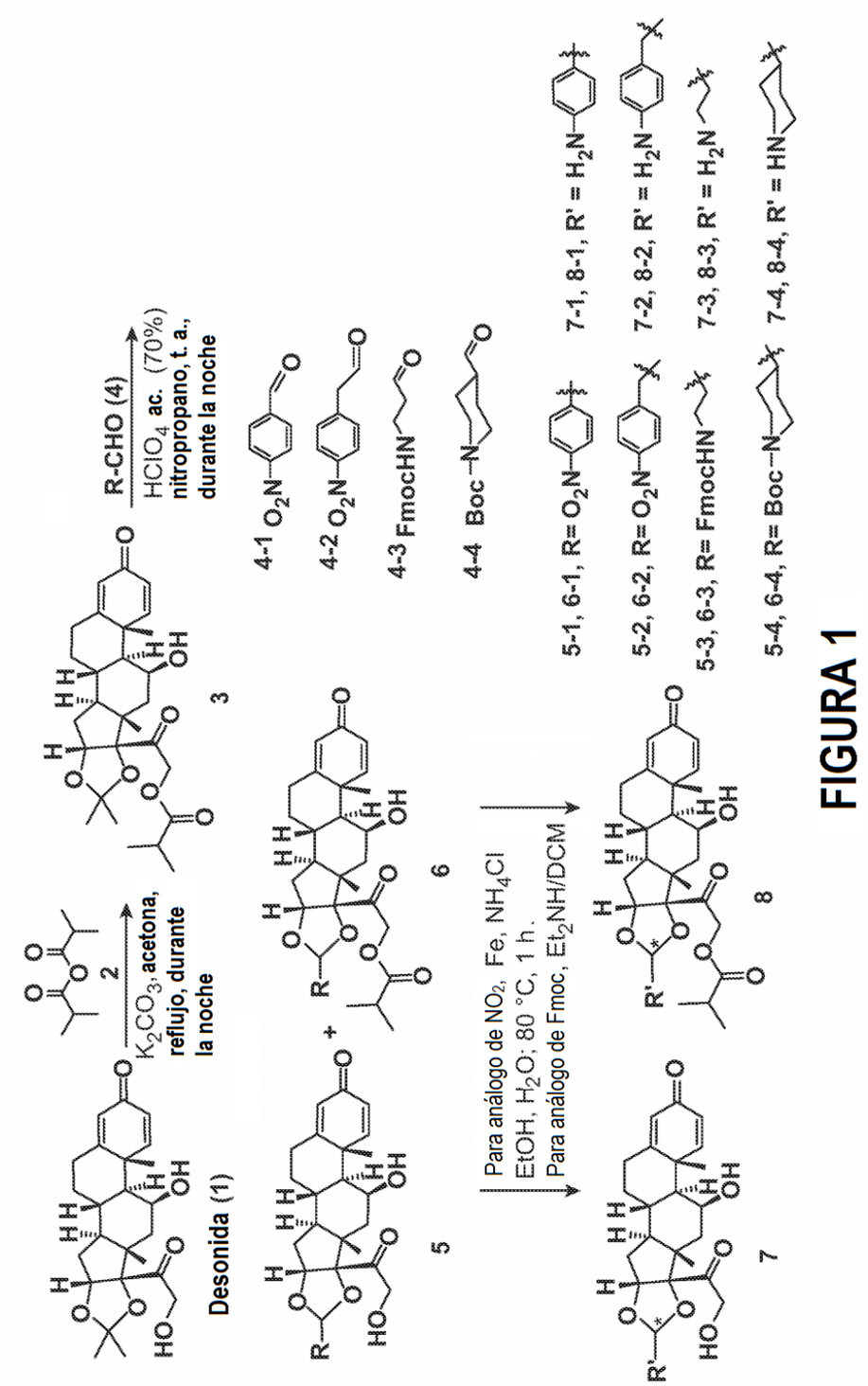

Desonida (1)
2
K_2CO_3, acetona, reflujo, durante la noche
3
R-CHO (4)
$HClO_4$ ac. (70%)
nitropropano, t. a., durante la noche
4-1 O_2N
4-2 O_2N
4-3 FmocHN
4-4 Boc–N
5
6
Para análogo de NO_2, Fe, NH_4Cl
EtOH, H_2O; 80 °C, 1 h.
Para análogo de Fmoc, Et_2NH/DCM
7
8
5-1, 6-1, R= O_2N
7-1, 8-1, R' = H_2N
5-2, 6-2, R= O_2N
7-2, 8-2, R' = H_2N
5-3, 6-3, R= FmocHN
7-3, 8-3, R' = H_2N
5-4, 6-4, R= Boc–N
7-4, 8-4, R' = HN

FIGURA 1

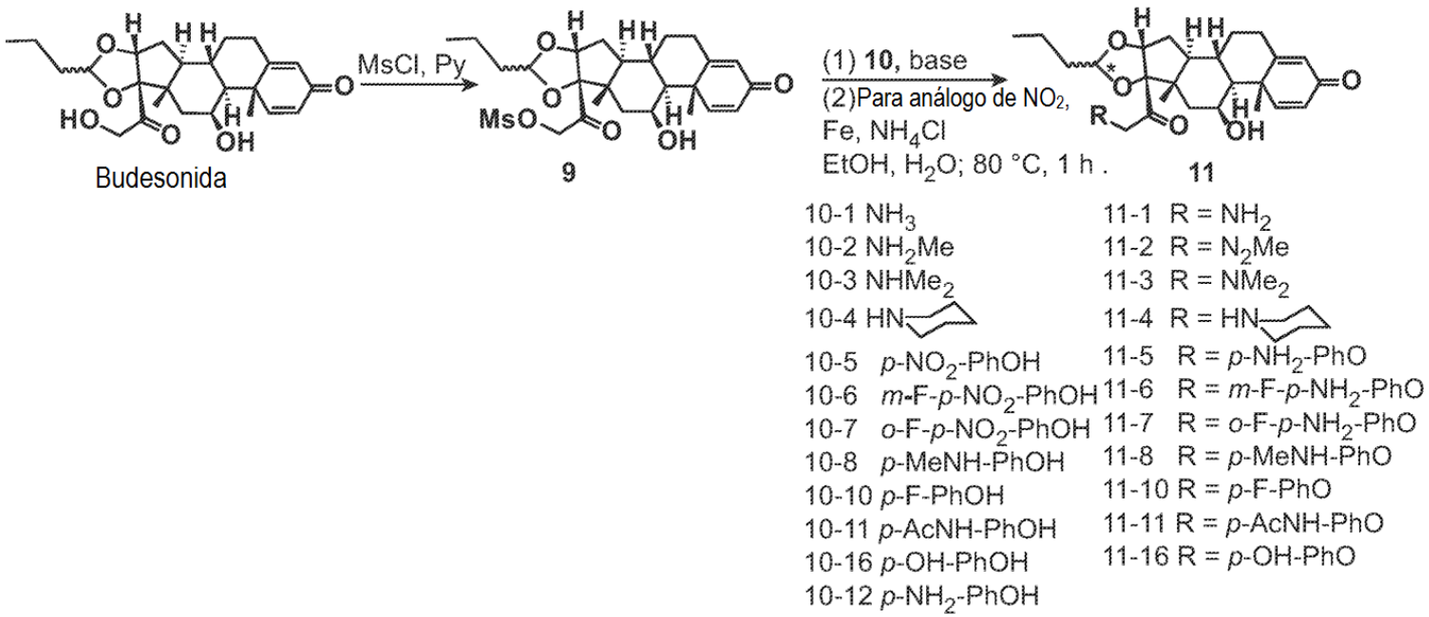

MsCl, Py
(1) 10, base
(2)Para análogo de NO2,
Fe, NH4Cl
EtOH, H2O; 80 °C, 1 h .
Budesonida
9
11
10-1 NH3
10-2 NH2Me
10-3 NHMe2
10-4 HN
10-5 p-NO2-PhOH
10-6 m-F-p-NO2-PhOH
10-7 o-F-p-NO2-PhOH
10-8 p-MeNH-PhOH
10-10 p-F-PhOH
10-11 p-AcNH-PhOH
10-16 p-OH-PhOH
10-12 p-NH2-PhOH
11-1 R = NH2
11-2 R = N2Me
11-3 R = NMe2
11-4 R = HN
11-5 R = p-NH2-PhO
11-6 R = m-F-p-NH2-PhO
11-7 R = o-F-p-NH2-PhO
11-8 R = p-MeNH-PhO
11-10 R = p-F-PhO
11-11 R = p-AcNH-PhO
11-16 R = p-OH-PhO

FIGURA 2

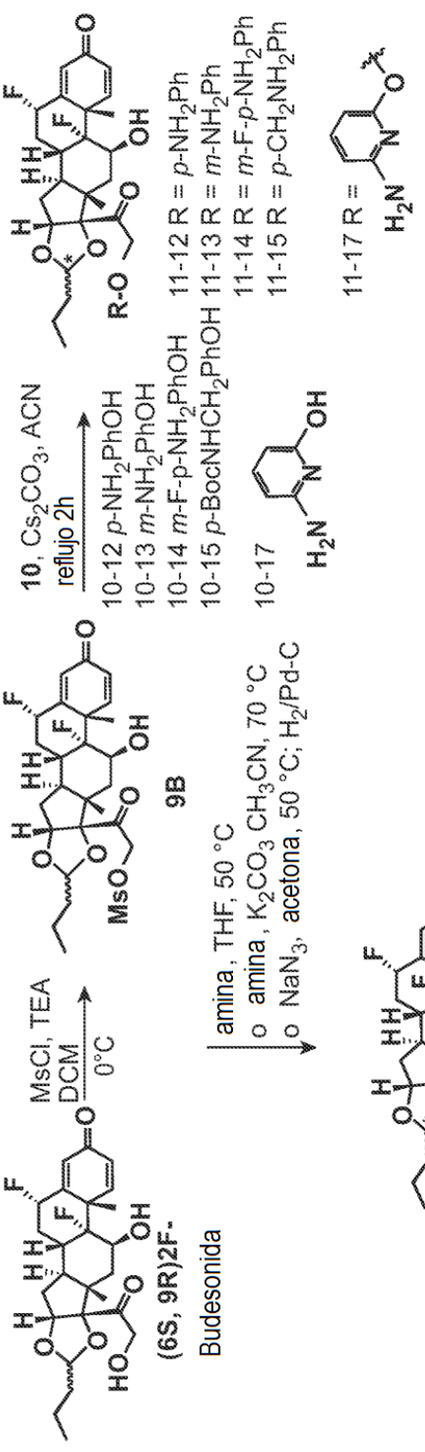


FIGURA 2 (Cont.)

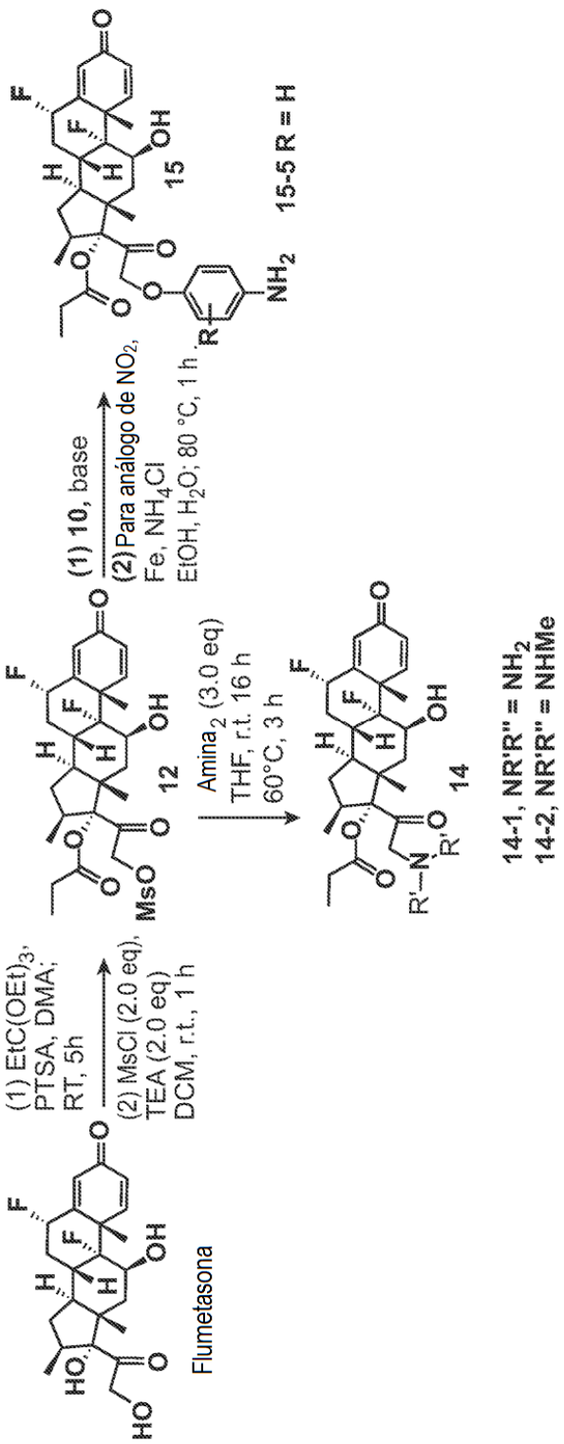

Flumetasona
(1) EtC(OEt)3, PTSA, DMA; RT, 5h
(2) MsCl (2.0 eq), TEA (2.0 eq) DCM, r.t., 1 h
12
Amina2 (3.0 eq) THF, r.t. 16 h 60°C, 3 h
14
14-1, NR'R'' = NH2
14-2, NR'R'' = NHMe
(1) 10, base
(2) Para análogo de NO2, Fe, NH4Cl EtOH, H2O; 80 °C, 1 h
15
15-5 R = H

FIGURA 3

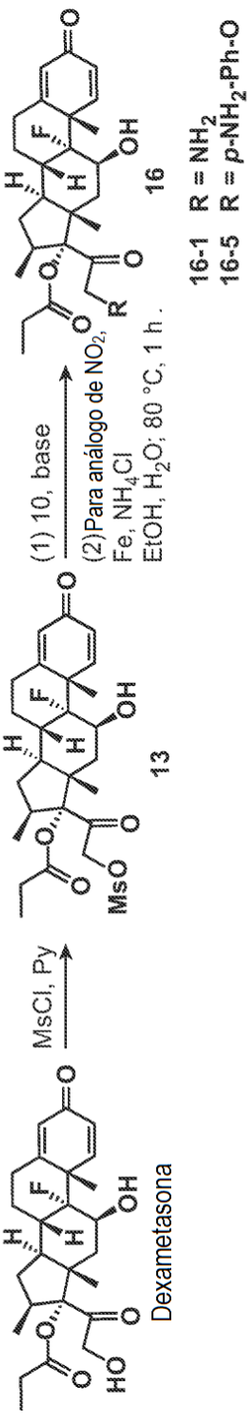

Dexametasona
MsCl, Py
13
(1) 10, base
(2) Para análogo de NO2,
Fe, NH4Cl
EtOH, H2O; 80 °C, 1 h.
16
16-1 R = NH2
16-5 R = p-NH2-Ph-O

FIGURA 4

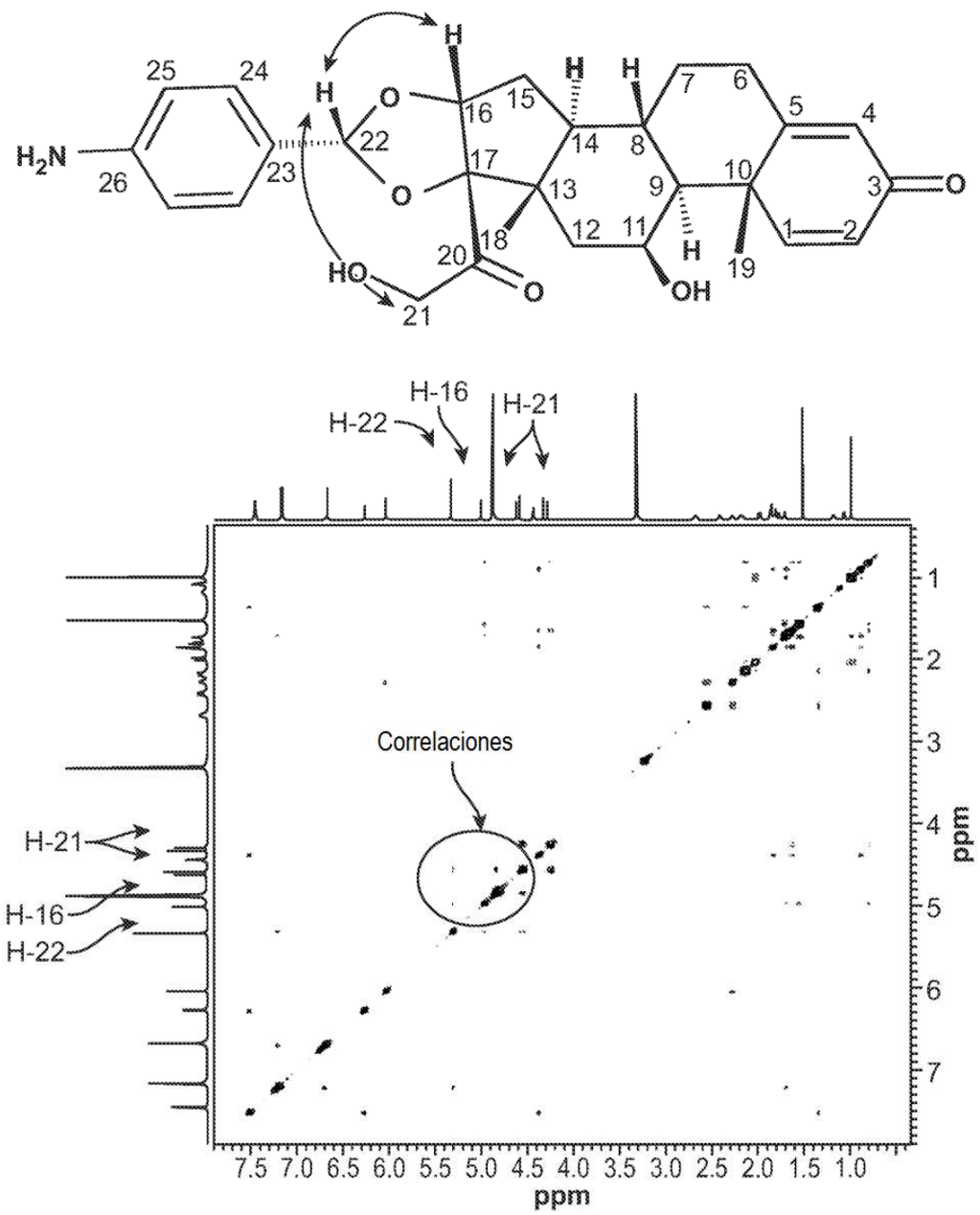

H-16
H-21
H-22
Correlaciones
H-21
H-16
H-22
ppm
7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0
ppm

FIGURA 5

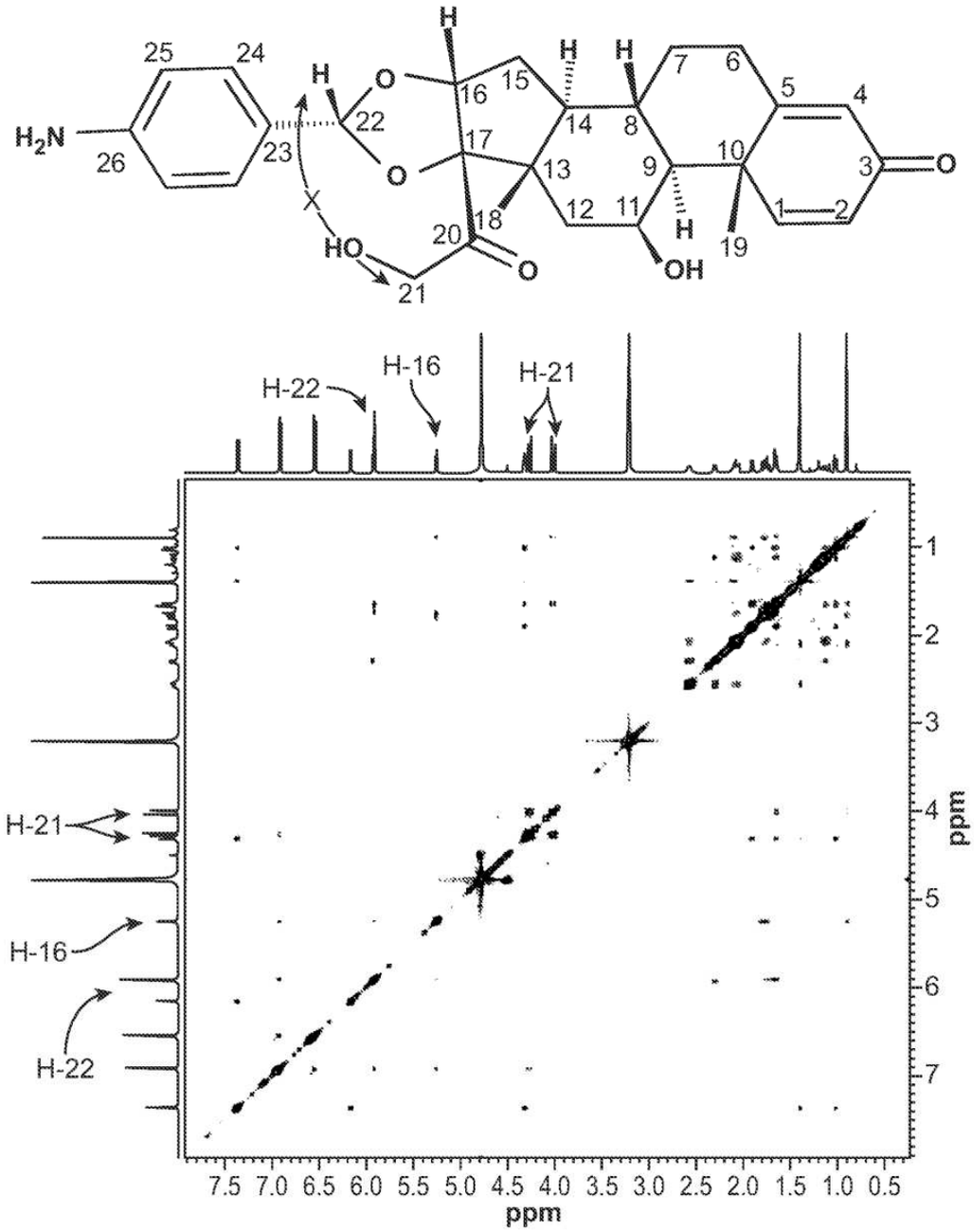


FIGURA 6

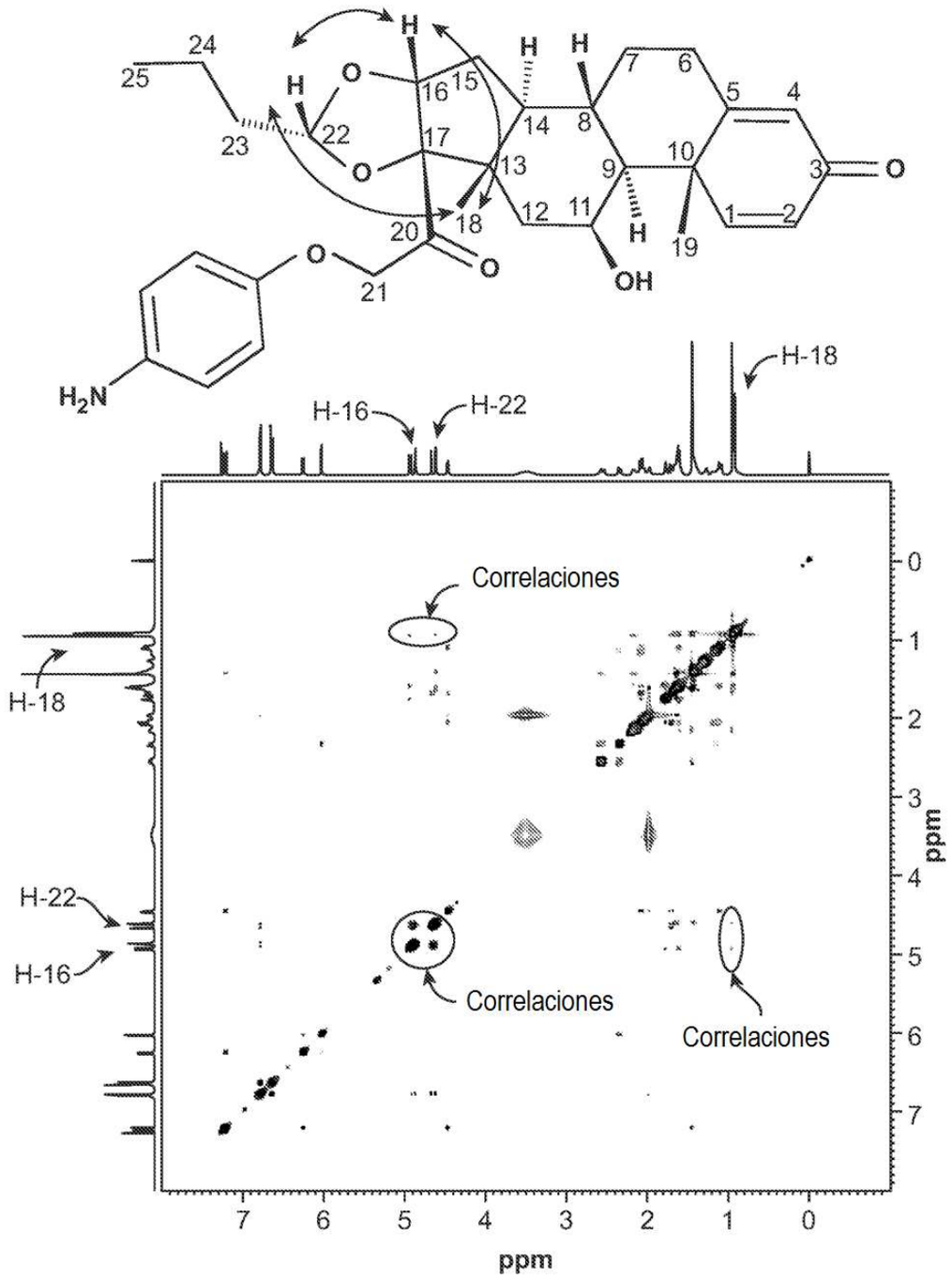

H-18
H-16
H-22
Correlaciones
H-18
H-22
H-16
Correlaciones
Correlaciones
ppm
ppm

FIGURA 7

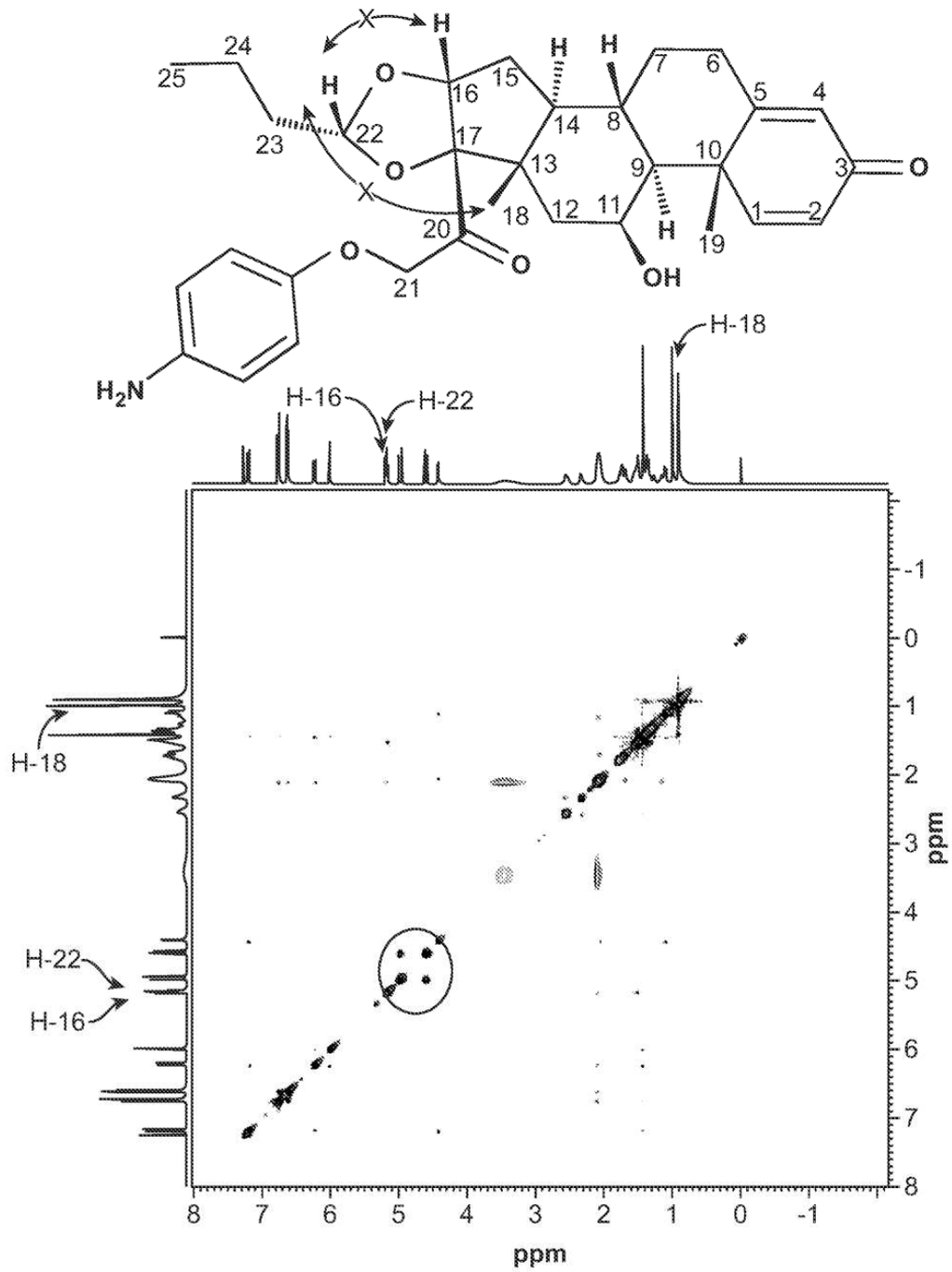


FIGURA 8

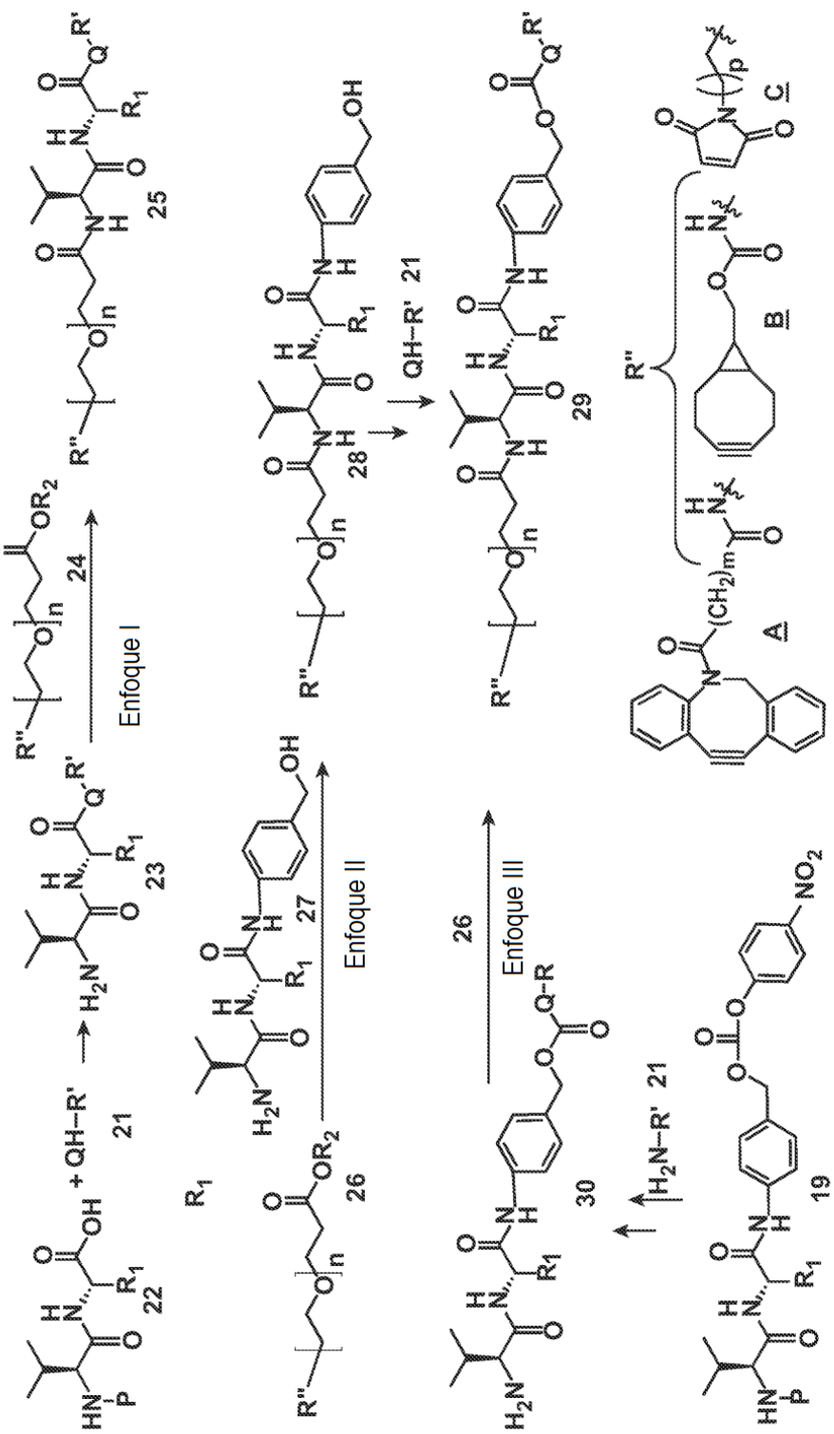

Enfoque I
Enfoque II
Enfoque III
QH–R' 21
H2N–R' 21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
19
A
B
C

FIGURA 9

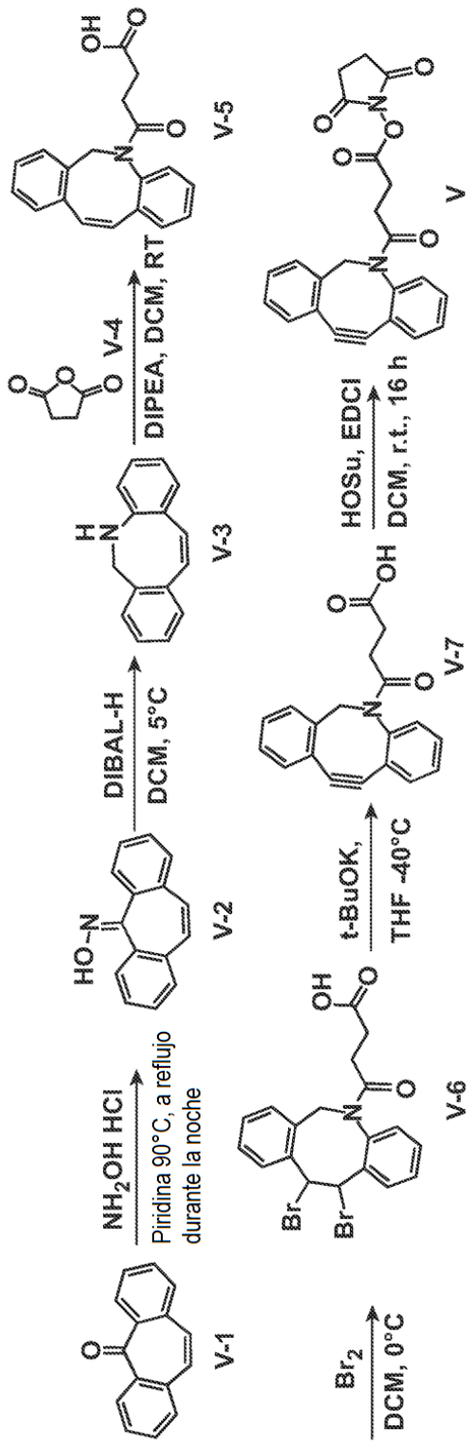

V-1
NH2OH HCl
Piridina 90°C, a reflujo
durante la noche
V-2
DIBAL-H
DCM, 5°C
V-3
V-4
DIPEA, DCM, RT
V-5
Br2
DCM, 0°C
V-6
t-BuOK,
THF -40°C
V-7
HOSu, EDCI
DCM, r.t., 16 h
V

FIGURA 10

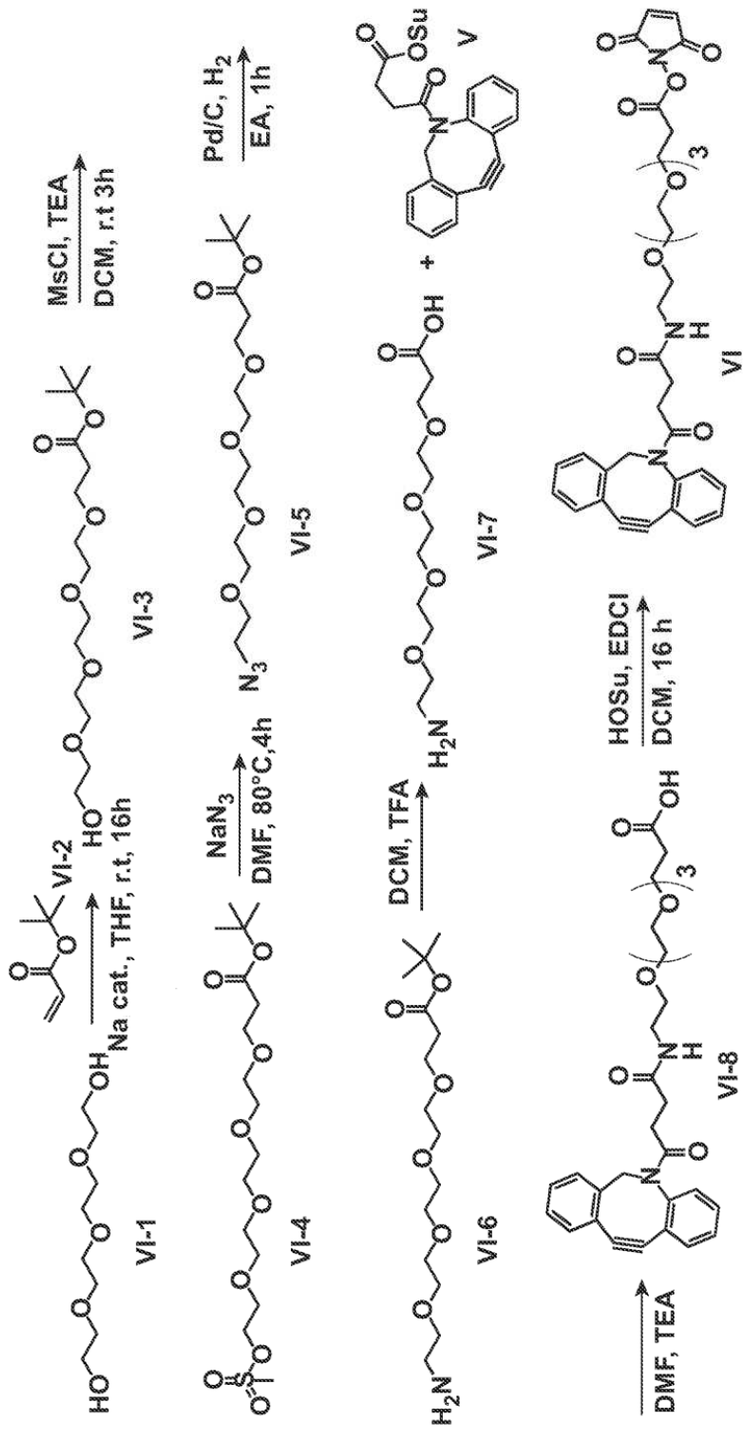

Na cat., THF, r.t, 16h
VI-1
VI-2
VI-3
MsCl, TEA
DCM, r.t 3h
NaN3
DMF, 80°C,4h
VI-4
VI-5
Pd/C, H2
EA, 1h
DCM, TFA
VI-6
VI-7
V
HOSu, EDCI
DCM, 16 h
DMF, TEA
VI-8
VI

FIGURA 11

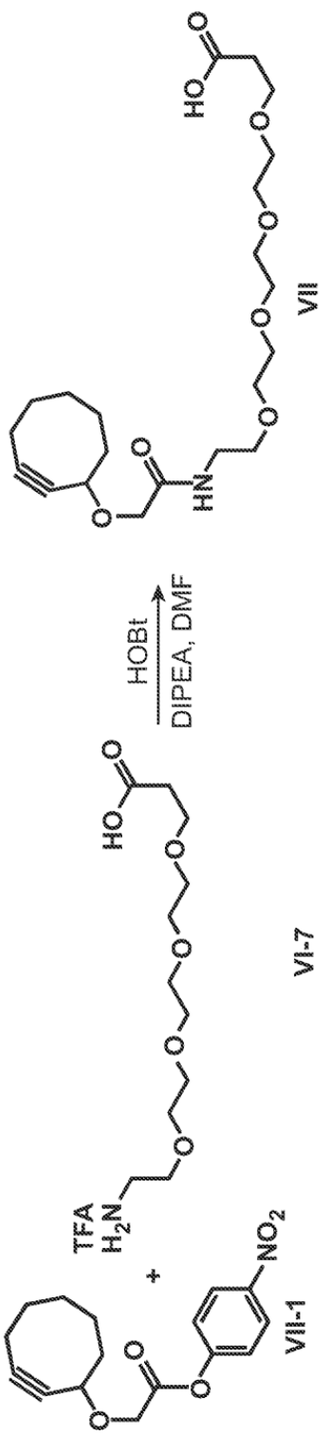


FIGURA 12

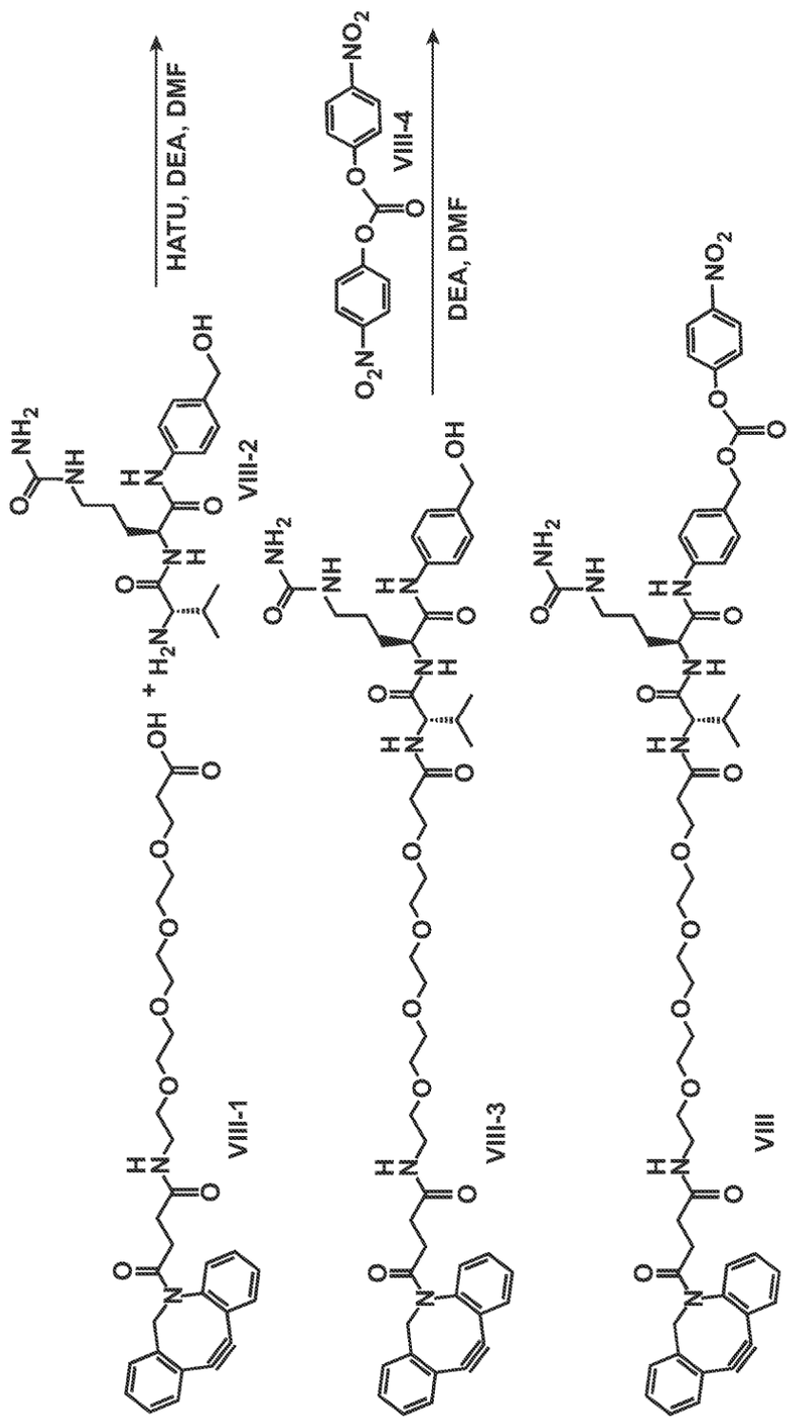


FIGURA 13

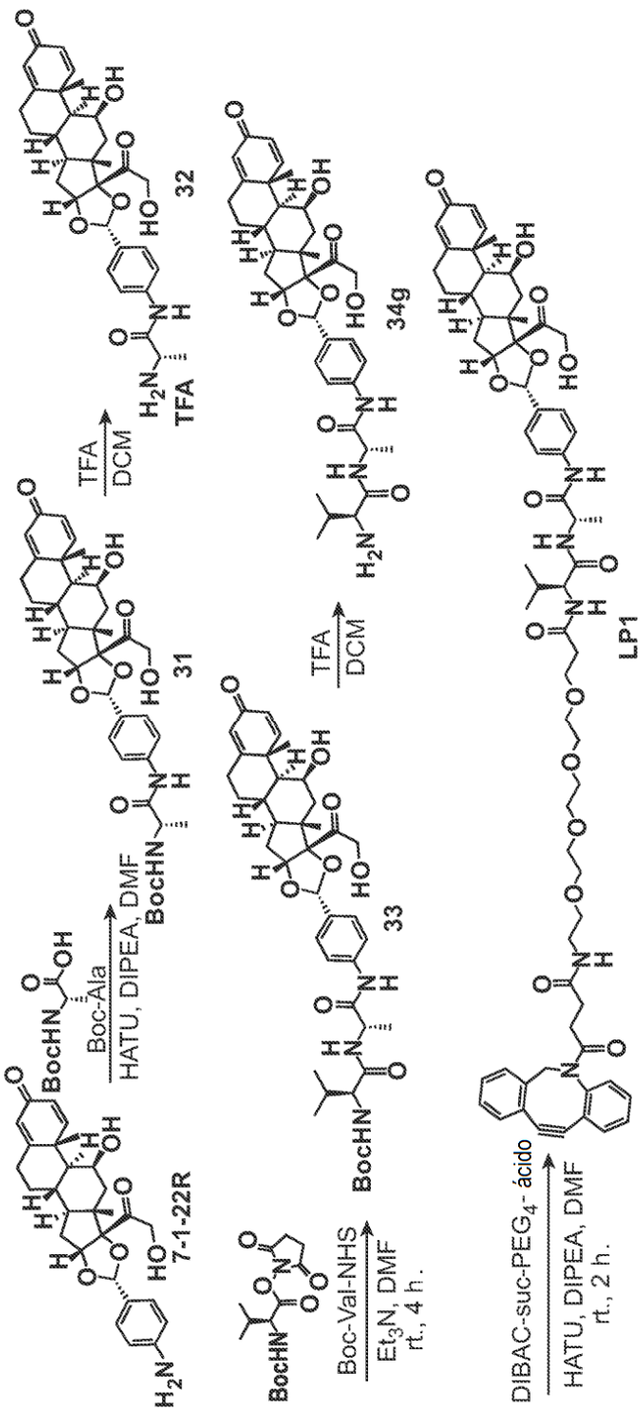

7-1-22R
Boc-Ala
HATU, DIPEA, DMF
31
TFA
DCM
32
Boc-Val-NHS
Et3N, DMF
rt., 4 h.
33
34g
DIBAC-suc-PEG4-ácido
HATU, DIPEA, DMF
rt., 2 h.
LP1

FIGURA 14

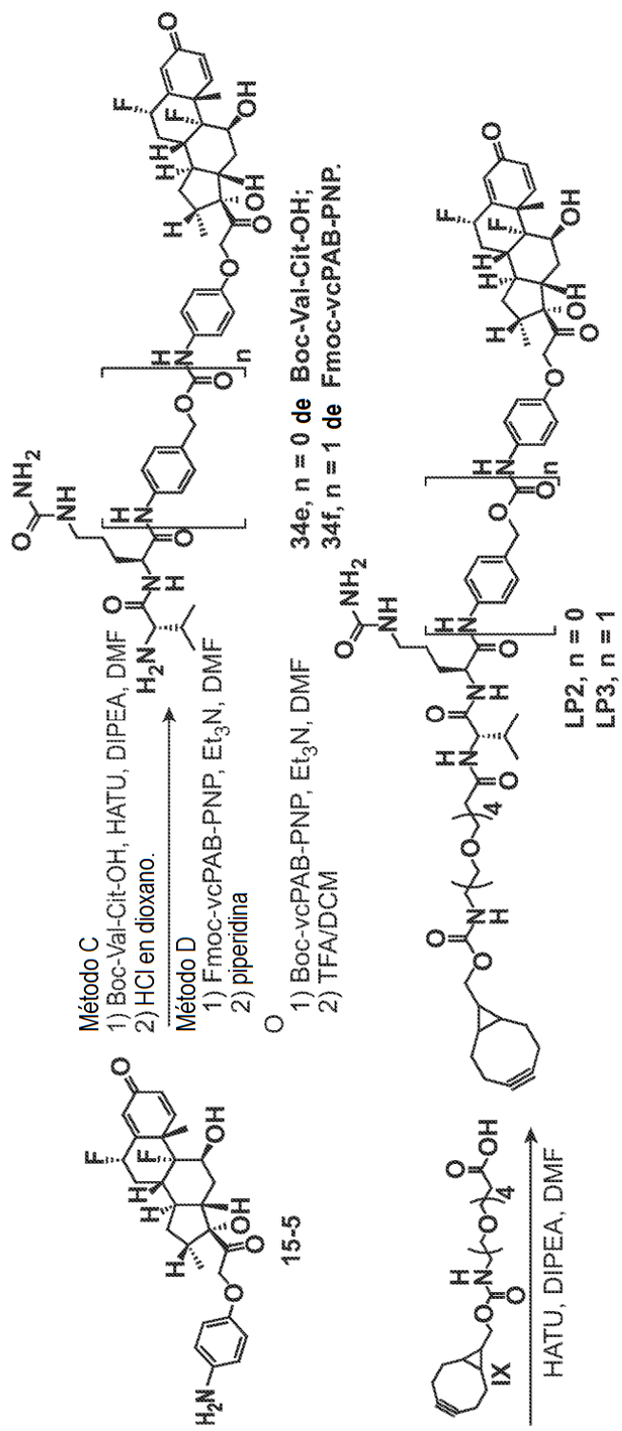

Método C
1) Boc-Val-Cit-OH, HATU, DIPEA, DMF
2) HCl en dioxano.
Método D
1) Fmoc-vcPAB-PNP, Et3N, DMF
2) piperidina
1) Boc-vcPAB-PNP, Et3N, DMF
2) TFA/DCM
15-5
34e, n = 0 de Boc-Val-Cit-OH;
34f, n = 1 de Fmoc-vcPAB-PNP.
LP2, n = 0
LP3, n = 1
IX
HATU, DIPEA, DMF

FIGURA 15

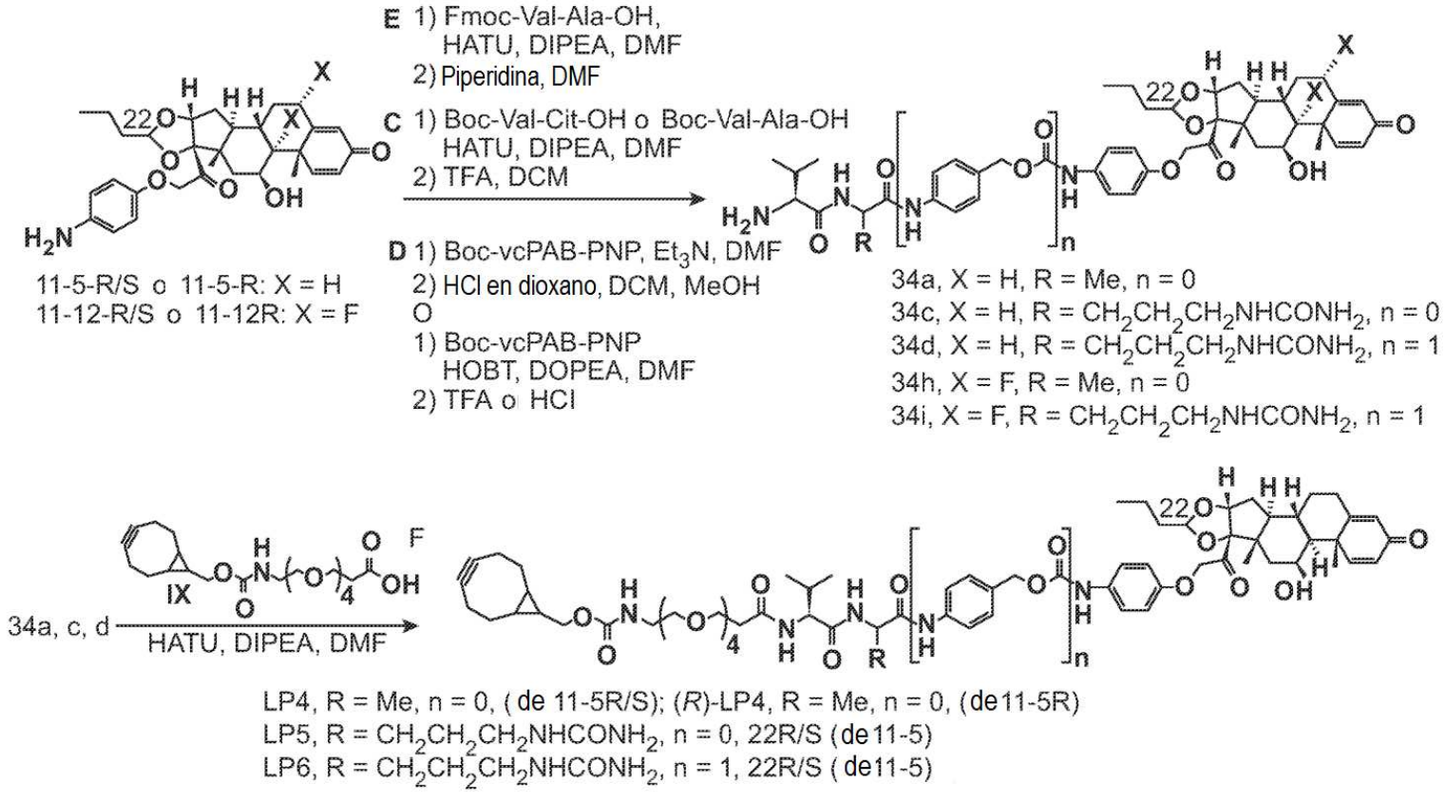

E 1) Fmoc-Val-Ala-OH, HATU, DIPEA, DMF 2) Piperidina, DMF
C 1) Boc-Val-Cit-OH o Boc-Val-Ala-OH HATU, DIPEA, DMF 2) TFA, DCM
D 1) Boc-vcPAB-PNP, Et3N, DMF 2) HCl en dioxano, DCM, MeOH
O 1) Boc-vcPAB-PNP HOBT, DOPEA, DMF 2) TFA o HCl
11-5-R/S o 11-5-R: X = H
11-12-R/S o 11-12R: X = F
34a, X = H, R = Me, n = 0
34c, X = H, R = CH2CH2CH2NHCONH2, n = 0
34d, X = H, R = CH2CH2CH2NHCONH2, n = 1
34h, X = F, R = Me, n = 0
34i, X = F, R = CH2CH2CH2NHCONH2, n = 1
34a, c, d
HATU, DIPEA, DMF
LP4, R = Me, n = 0, (de 11-5R/S); (R)-LP4, R = Me, n = 0, (de11-5R)
LP5, R = CH2CH2CH2NHCONH2, n = 0, 22R/S (de11-5)
LP6, R = CH2CH2CH2NHCONH2, n = 1, 22R/S (de11-5)

FIGURA 16

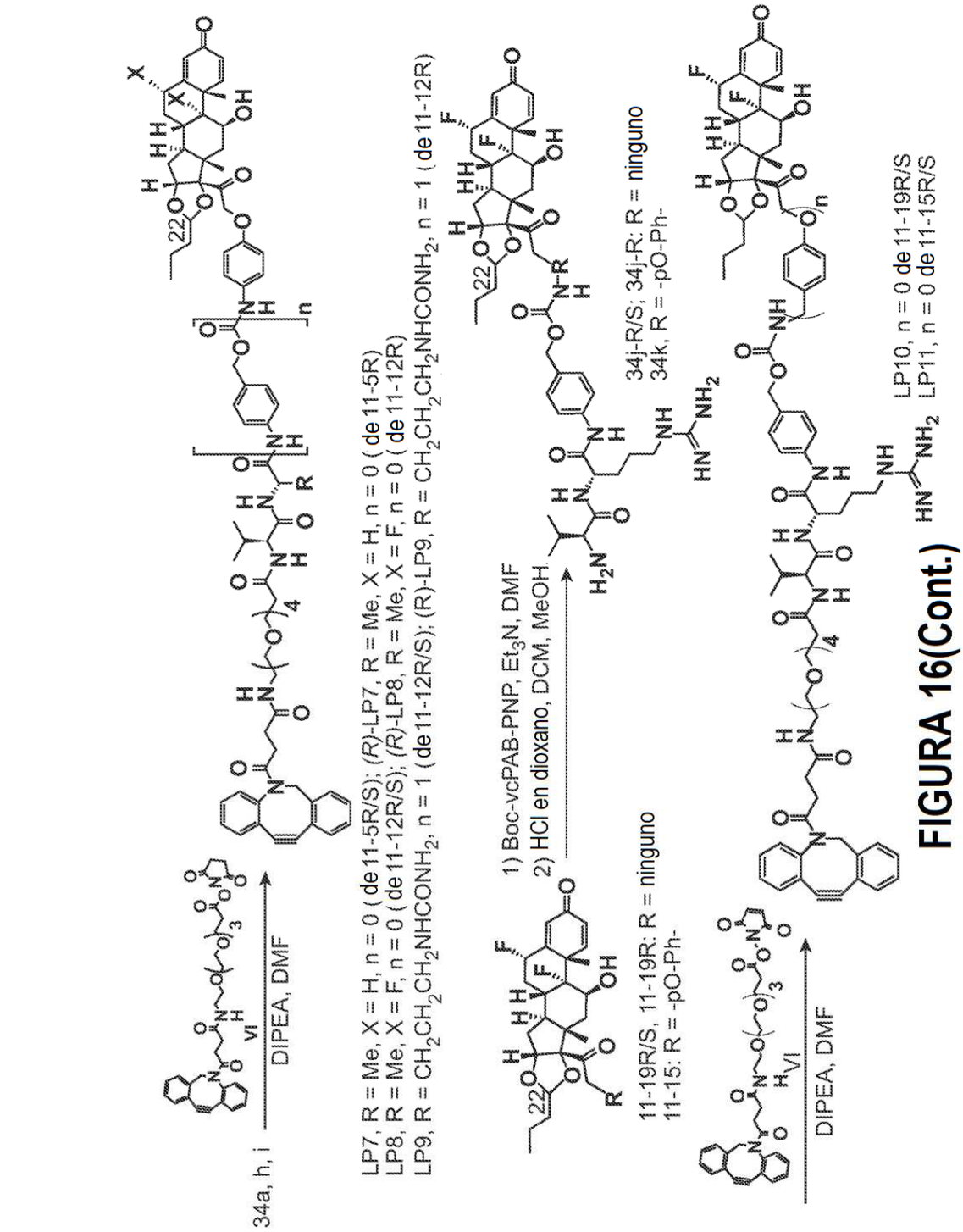


FIGURA 16(Cont.)

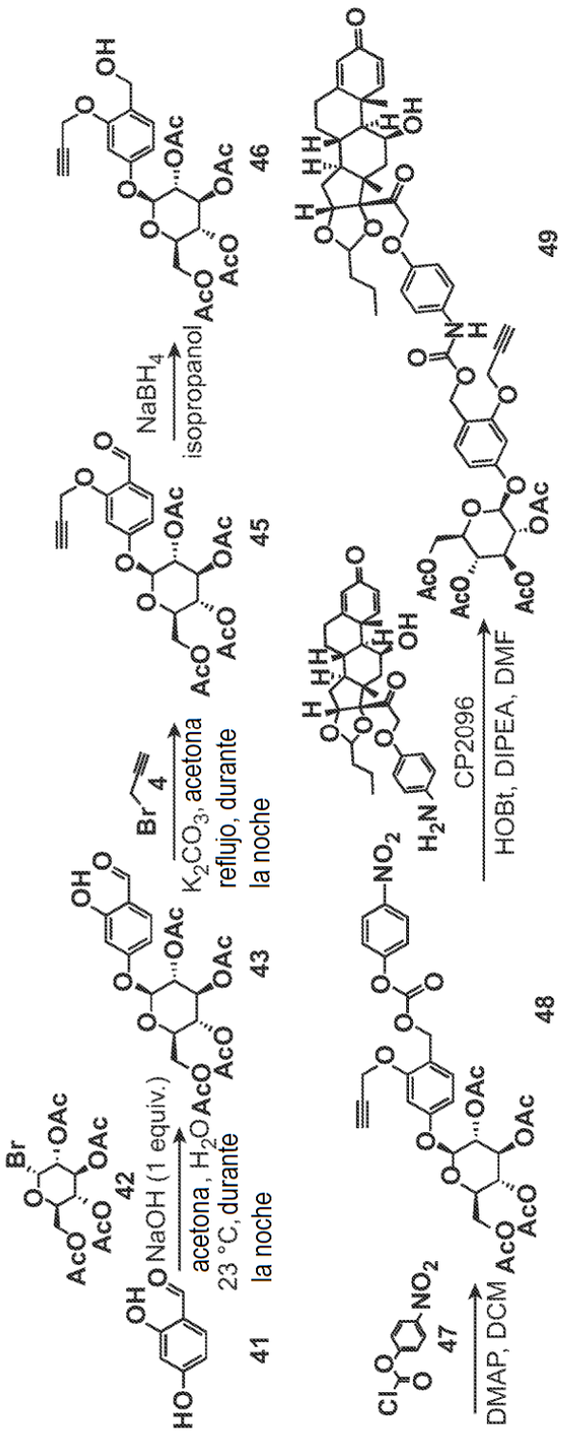

NaOH (1 equiv.)
acetona, H2O
23 °C, durante
la noche
K2CO3, acetona
reflujo, durante
la noche
NaBH4
isopropanol
DMAP, DCM
CP2096
HOBt, DIPEA, DMF
LiOH
MeOH, H2O
41
42
43
45
46
47
48
49
LP12

FIGURA 17

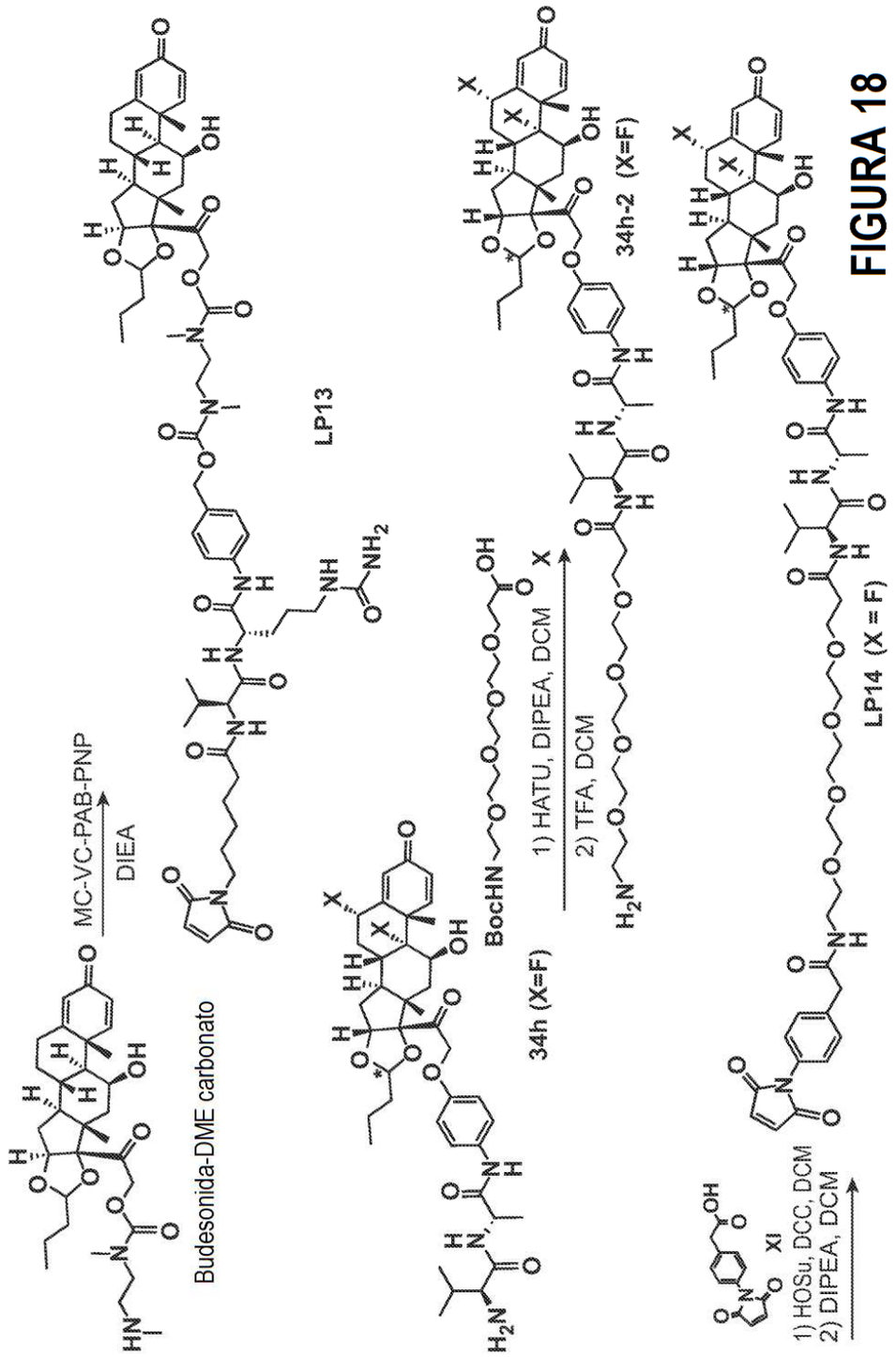

MC-VC-PAB-PNP
DIEA
Budesonida-DME carbonato
LP13
34h (X=F)
BocHN
1) HATU, DIPEA, DCM
2) TFA, DCM
34h-2 (X=F)
1) HOSu, DCC, DCM
2) DIPEA, DCM
XI
LP14 (X = F)

FIGURA 18

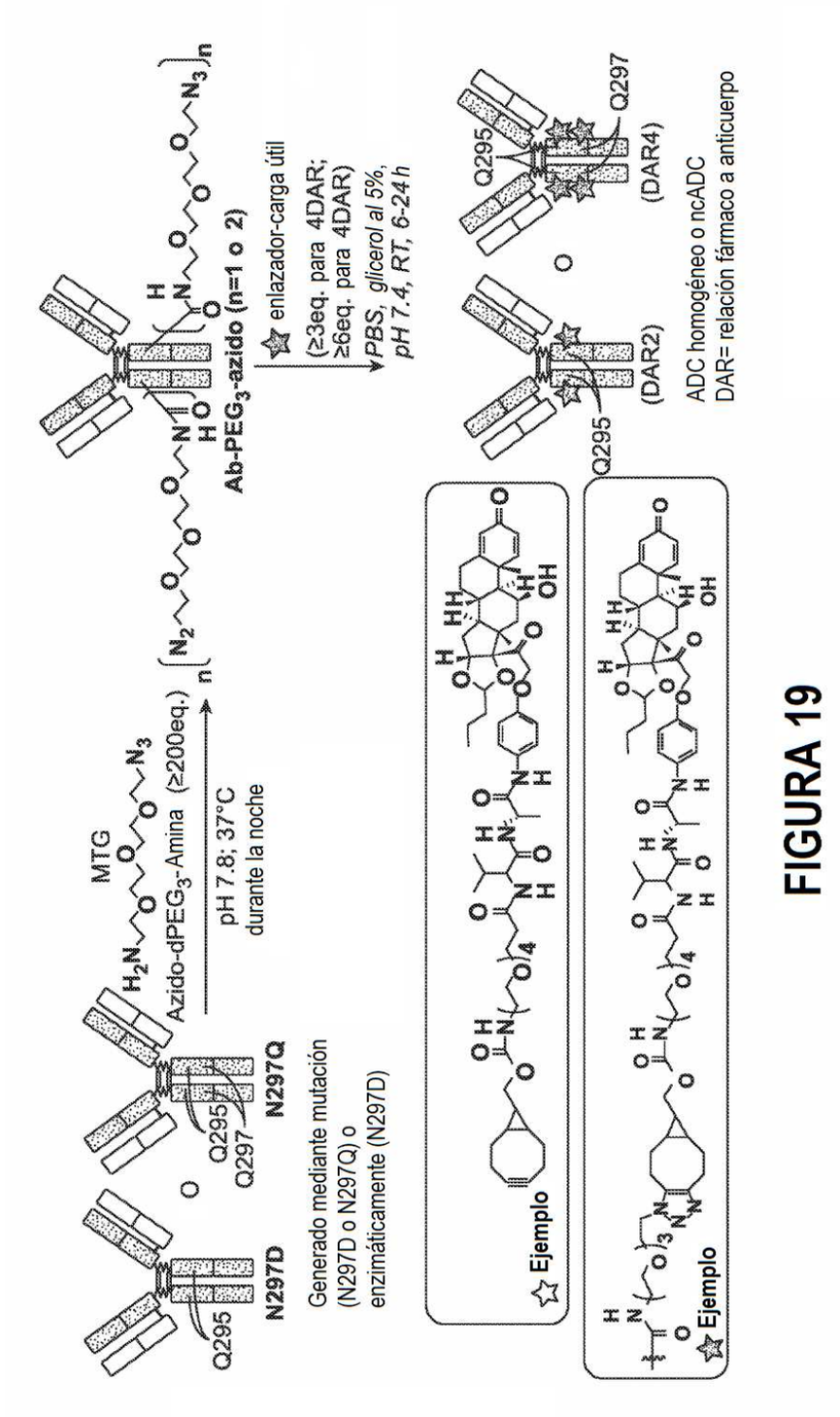

MTG
Azido-dPEG3-Amina (≥200eq.)
pH 7.8; 37°C
durante la noche
Q295
Q297
N297D
N297Q
Generado mediante mutación (N297D o N297Q) o enzimáticamente (N297D)
Ab-PEG3-azido (n=1 o 2)
enlazador-carga útil
(≥3eq. para 4DAR; ≥6eq. para 4DAR)
PBS, glicerol al 5%, pH 7.4, RT, 6-24 h
Ejemplo
Ejemplo
Q295
Q297
(DAR2)
(DAR4)
ADC homogéneo o ncADC
DAR= relación fármaco a anticuerpo

FIGURA 19

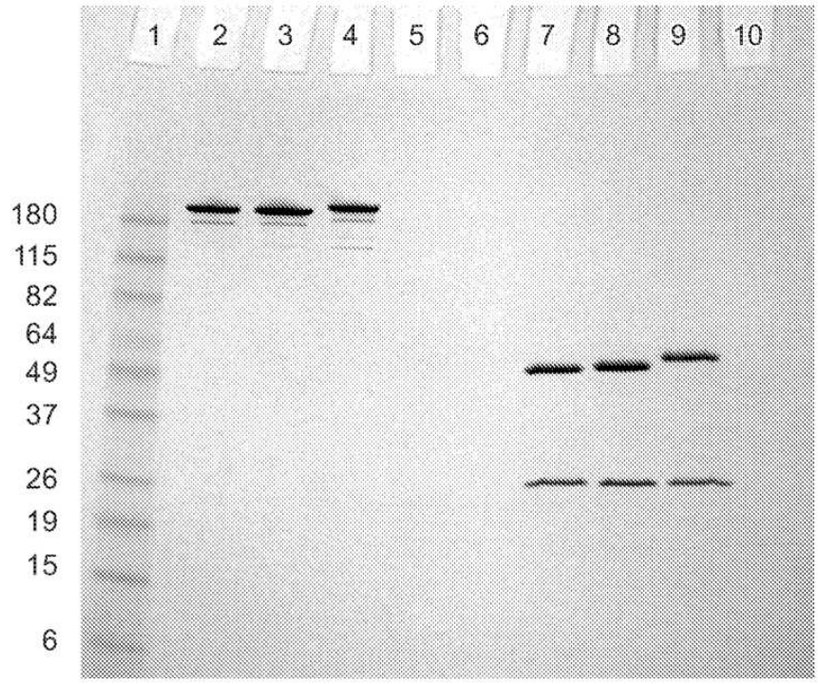


FIGURA 20

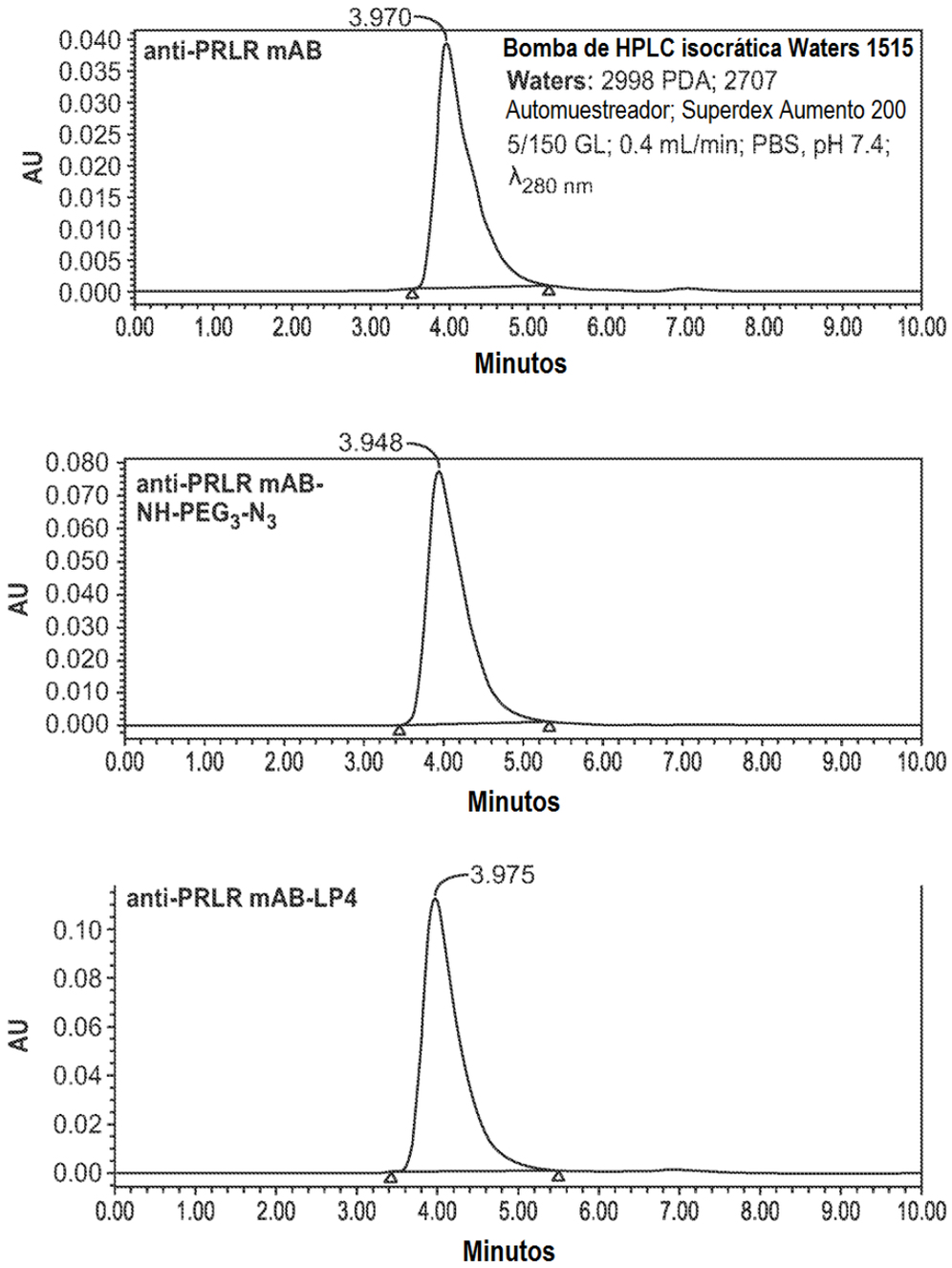

3.970
anti-PRLR mAB
Bomba de HPLC isocrática Waters 1515
Waters: 2998 PDA; 2707
Automuestreador; Superdex Aumento 200
5/150 GL; 0.4 mL/min; PBS, pH 7.4;
λ280 nm
AU
Minutos
3.948
anti-PRLR mAB-
NH-PEG3-N3
AU
Minutos
3.975
anti-PRLR mAB-LP4
AU
Minutos

FIGURA 21

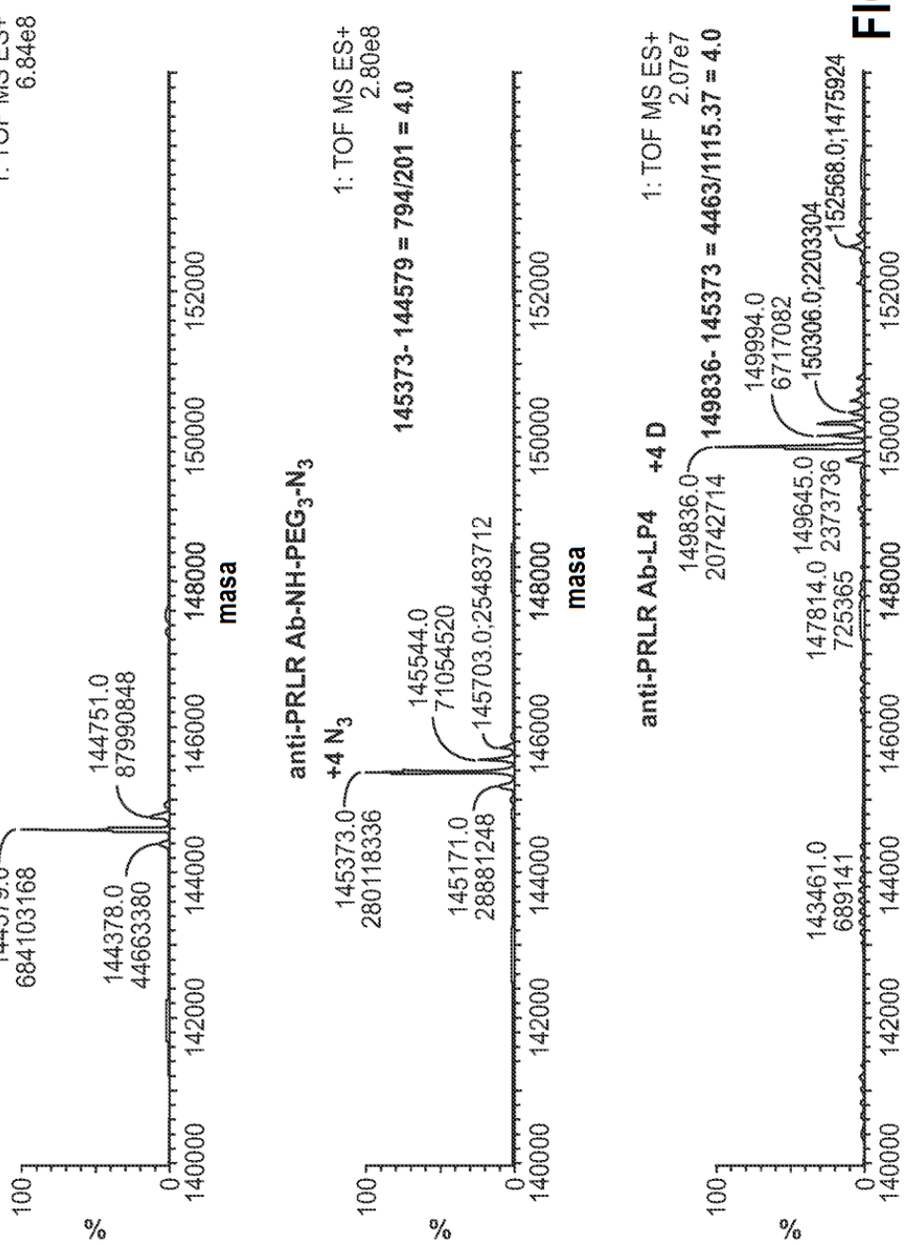

anti-PRLR Ab
1: TOF MS ES+
6.84e8
144579.0
684103168
144751.0
87990848
144378.0
44663380
100
%
0
140000
142000
144000
146000
148000
150000
152000
masa
anti-PRLR Ab-NH-PEG3-N3
+4 N3
1: TOF MS ES+
2.80e8
145373- 144579 = 794/201 = 4.0
145373.0
280118336
145544.0
71054520
145703.0;25483712
145171.0
28881248
100
%
0
140000
142000
144000
146000
148000
150000
152000
masa
anti-PRLR Ab-LP4
+4 D
1: TOF MS ES+
2.07e7
149836- 145373 = 4463/1115.37 = 4.0
149836.0
20742714
149994.0
6717082
150306.0;2203304
152568.0;1475924
149645.0
2373736
147814.0
725365
143461.0
689141
100
%
0
140000
142000
144000
146000
148000
150000
152000
masa

FIGURA 22

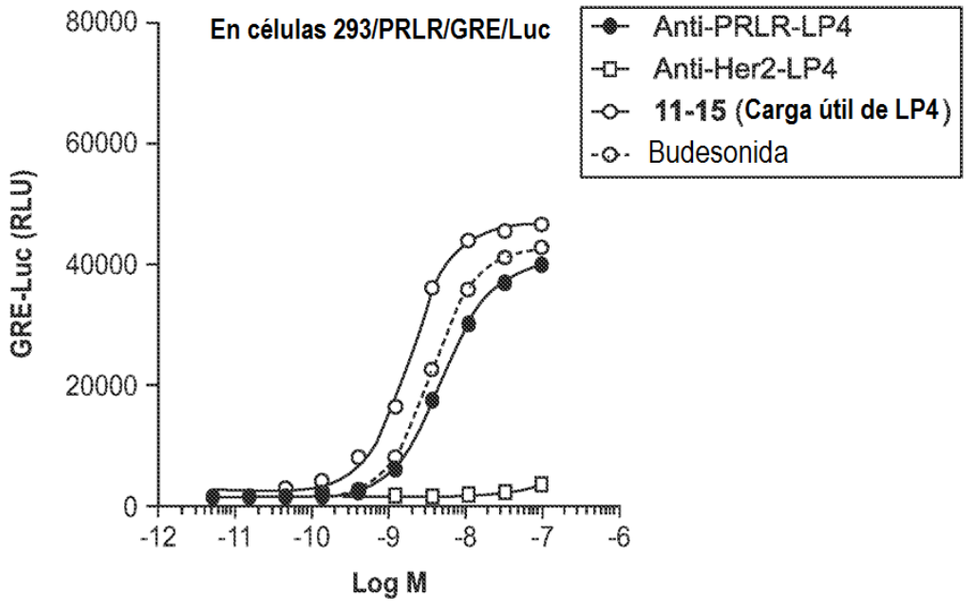


FIGURA 23A

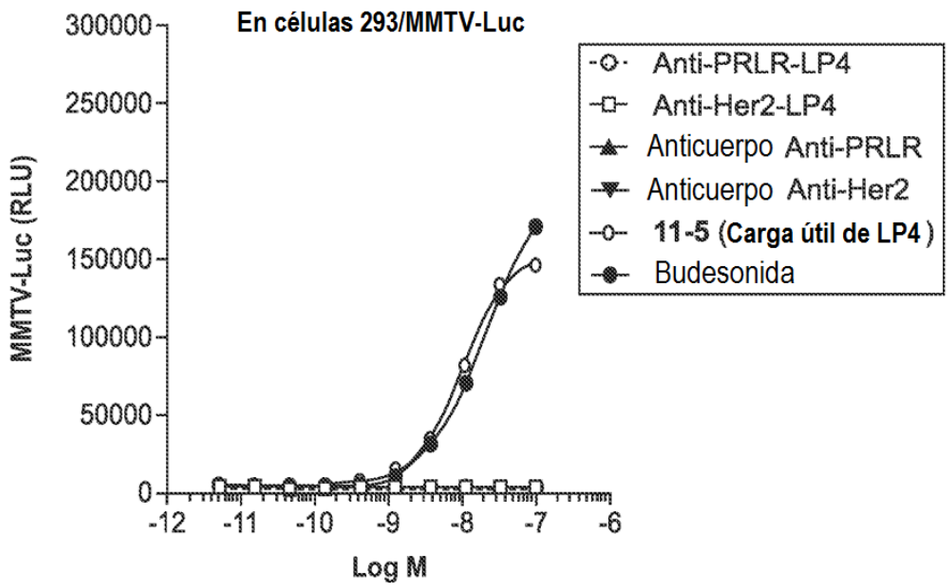


FIGURA 23B

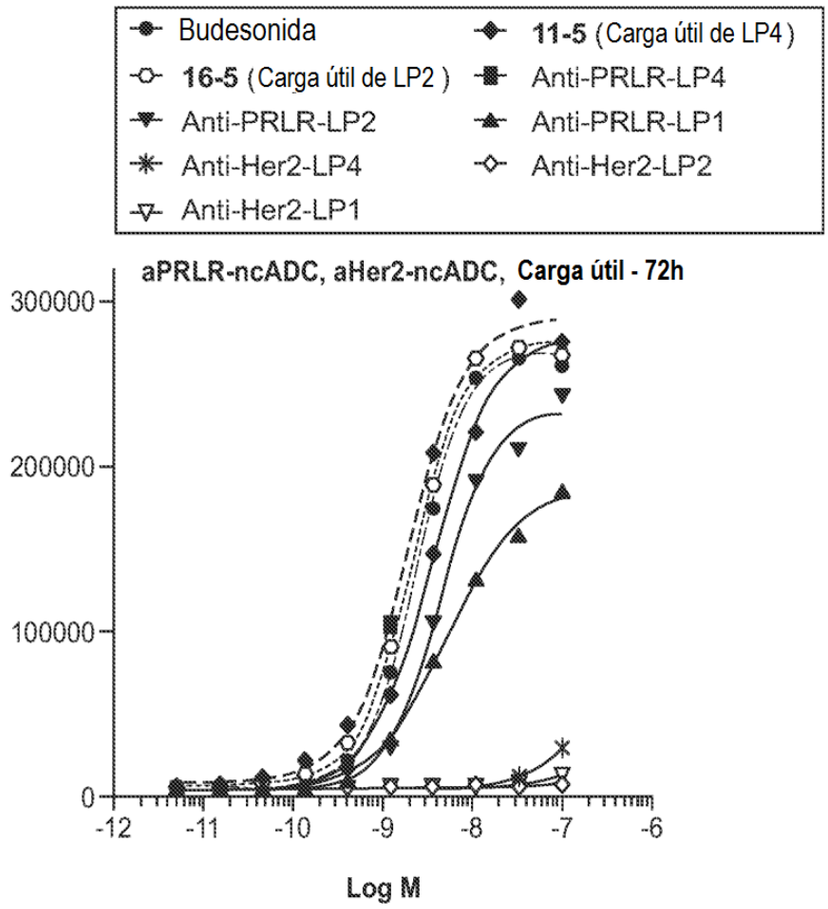

Budesonida
16-5 (Carga útil de LP2)
Anti-PRLR-LP2
Anti-Her2-LP4
Anti-Her2-LP1
11-5 (Carga útil de LP4)
Anti-PRLR-LP4
Anti-PRLR-LP1
Anti-Her2-LP2
aPRLR-ncADC, aHer2-ncADC, Carga útil - 72h
300000
200000
100000
0
-12
-11
-10
-9
-8
-7
-6
Log M

FIGURA 24

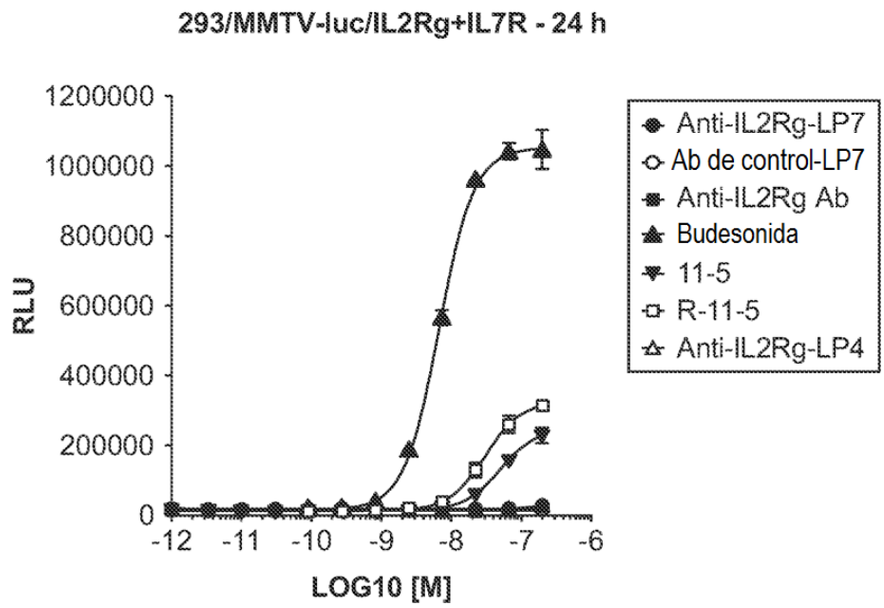


FIGURA 25A

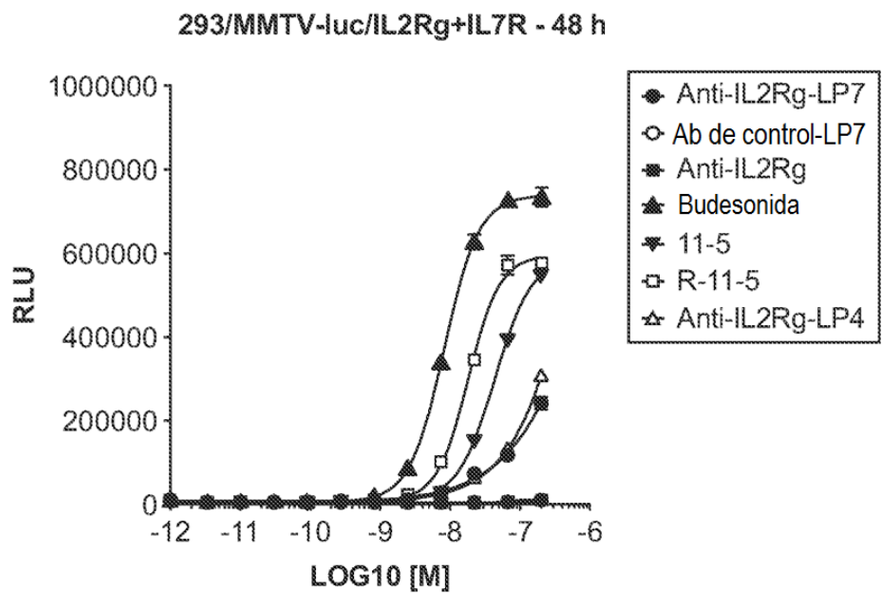


FIGURA 25B

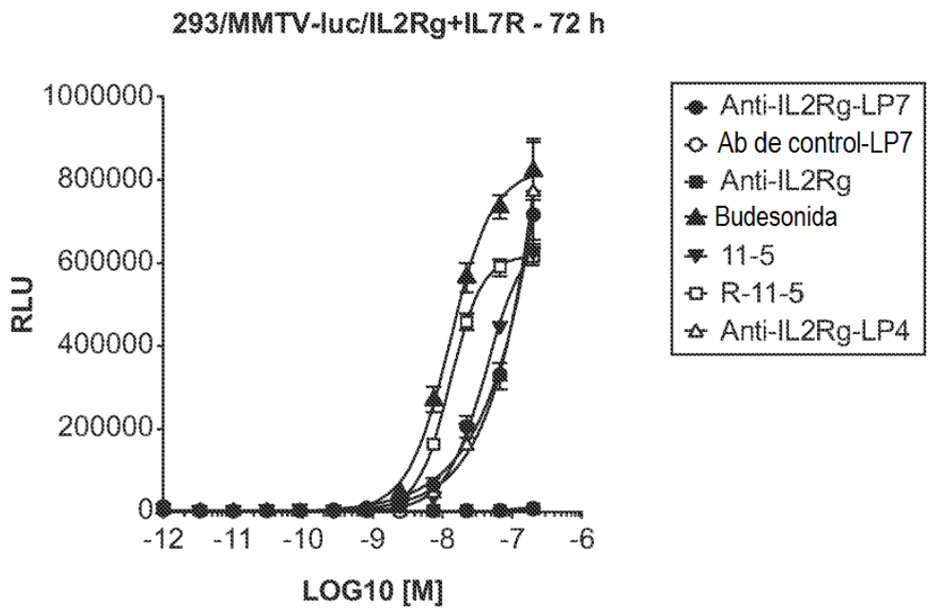


FIGURA 25C

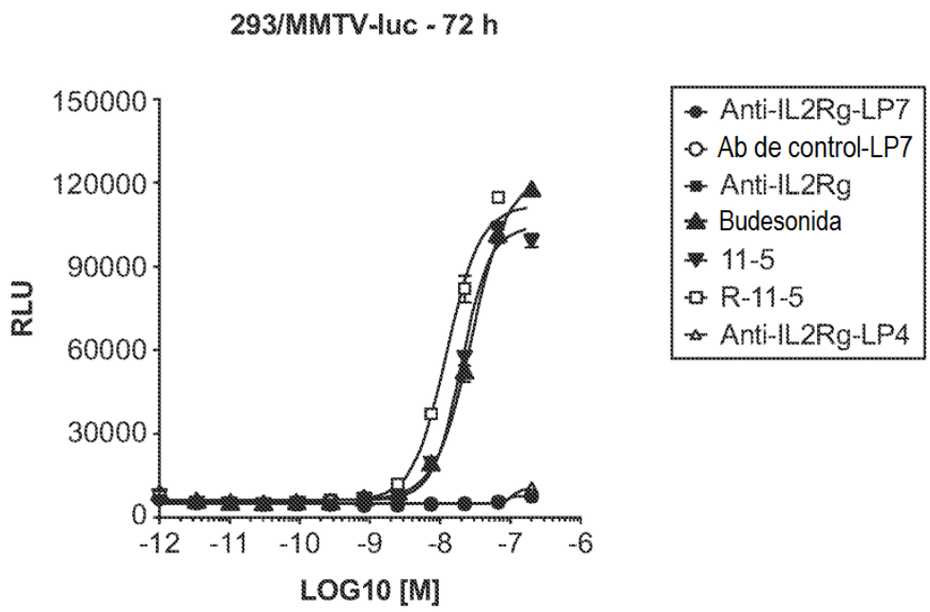
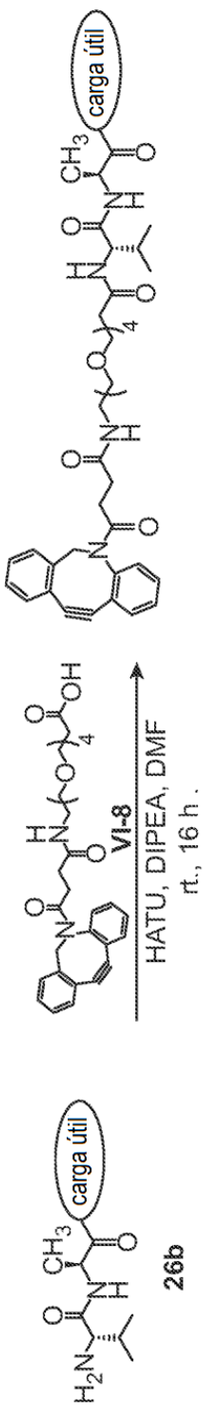


FIGURA 25D



Ejemplo 44, la carga útil es

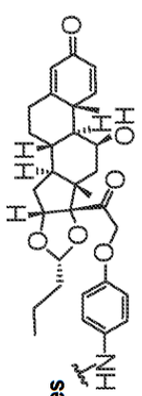
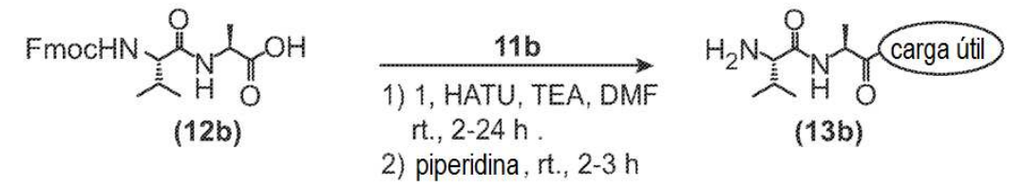


FIGURA 26


FmocHN
OH
(12b)
11b
1) 1, HATU, TEA, DMF
rt., 2-24 h .
2) piperidina , rt., 2-3 h
H2N
carga útil
(13b)

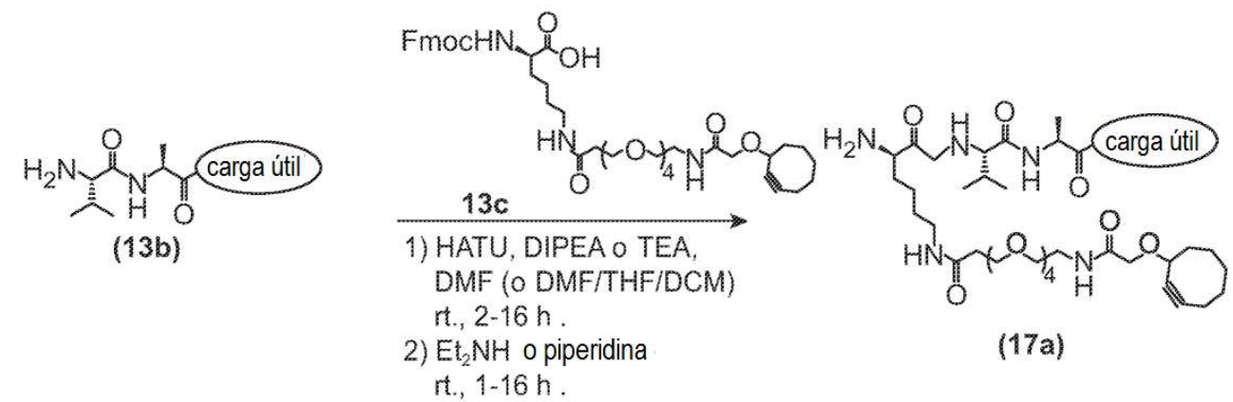
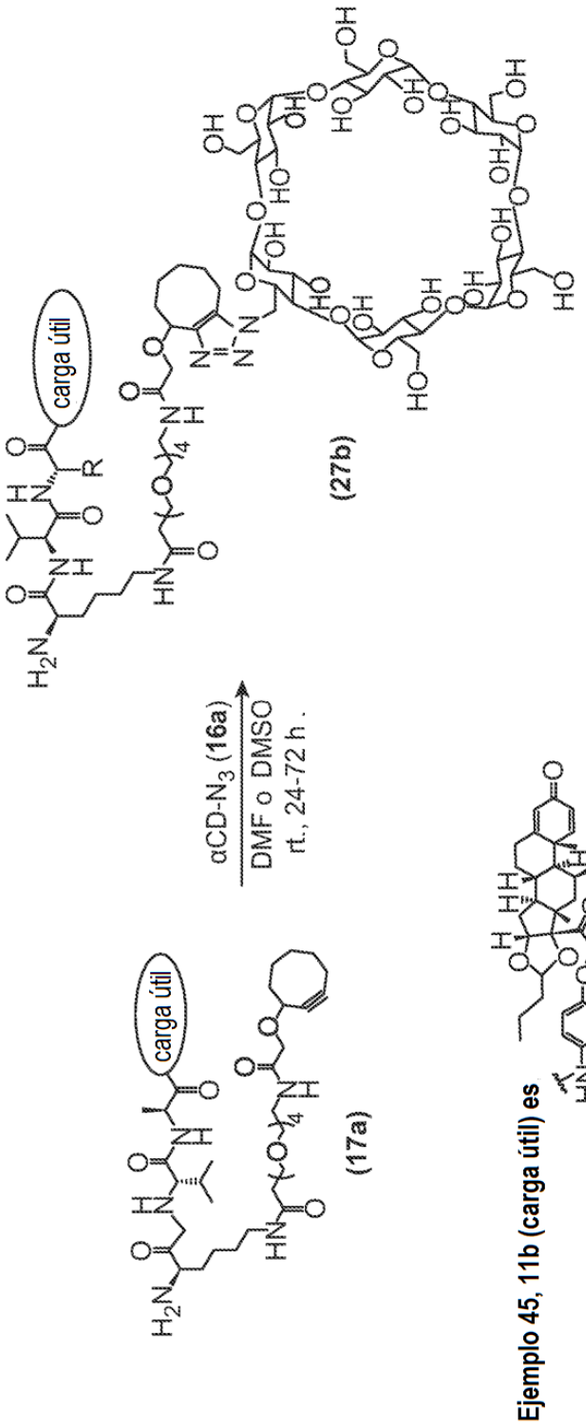
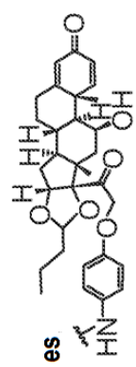

H2N
carga útil
(13b)
FmocHN
OH
HN
O
4
13c
1) HATU, DIPEA o TEA,
DMF (o DMF/THF/DCM)
rt., 2-16 h .
2) Et2NH o piperidina
rt., 1-16 h .
(17a)

FIGURA 27



Ejemplo 45, 11b (carga útil) es



Ejemplo 46, 11b (carga útil) es

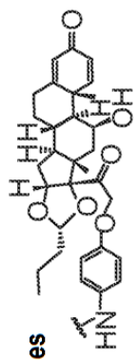


FIGURA 27 (Cont.)

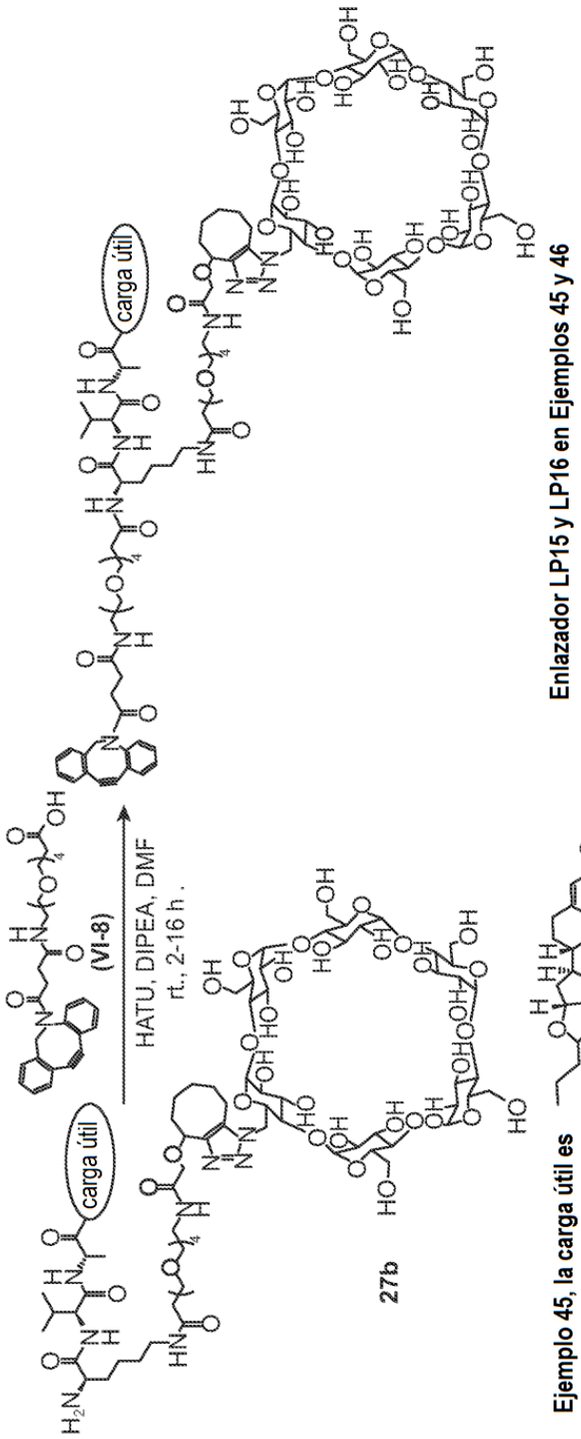

carga útil
(VI-8)
HATU, DIPEA, DMF
rt., 2-16 h .
carga útil
27b
Enlazador LP15 y LP16 en Ejemplos 45 y 46
Ejemplo 45, la carga útil es
Ejemplo 46, la carga útil es

FIGURA 28

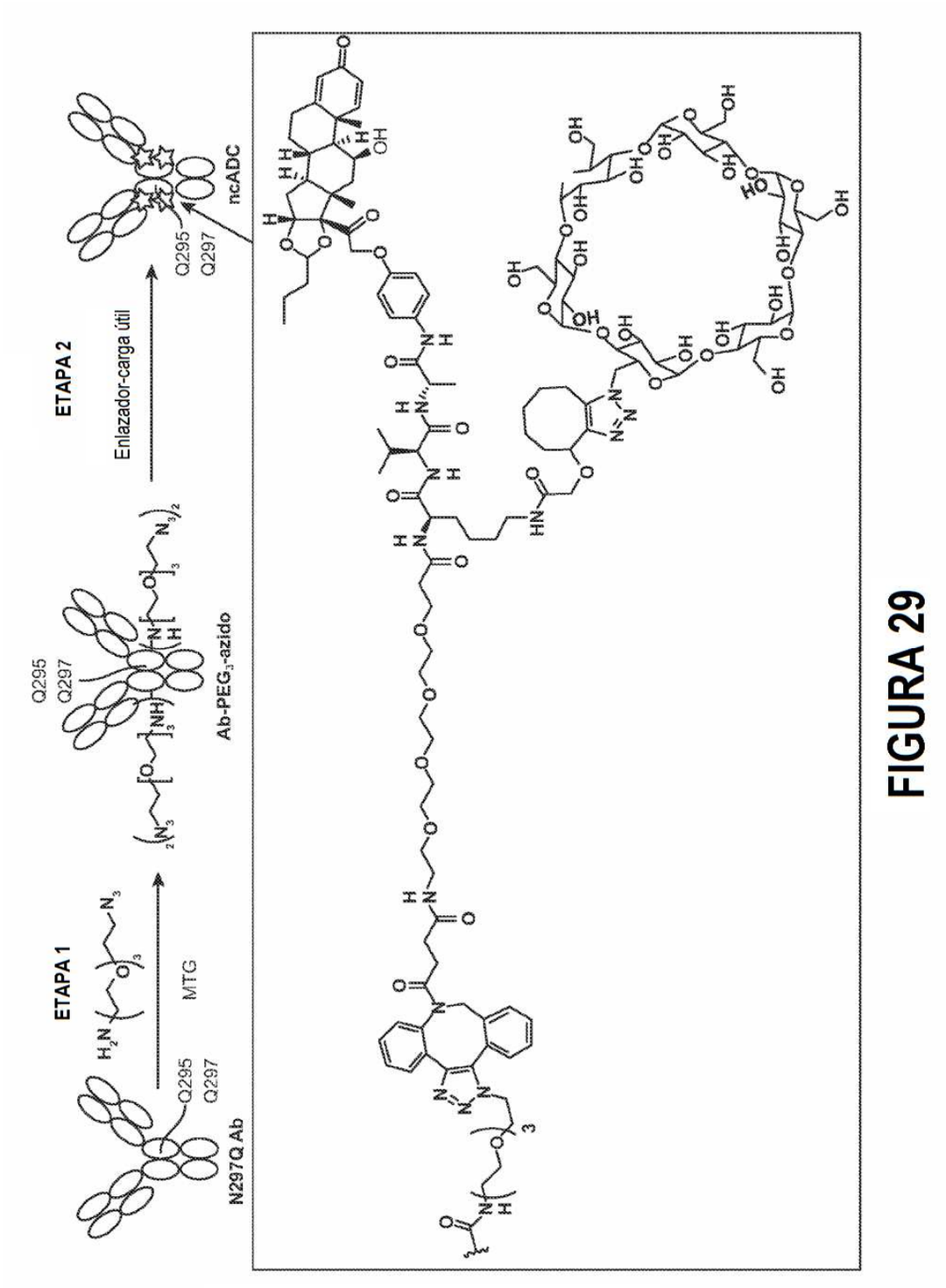

ETAPA 1
MTG
N297Q Ab
Q295
Q297
ETAPA 2
Enlazador-carga útil
Ab-PEG3-azido
ncADC
Q295
Q297

FIGURA 29

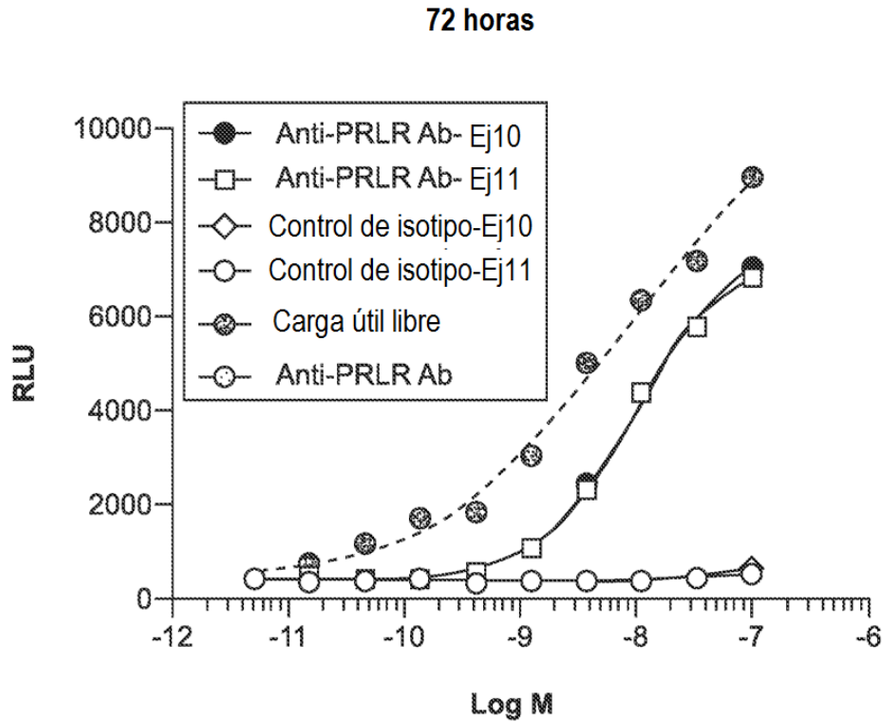

72 horas
10000
8000
6000
4000
2000
0
RLU
-12
-11
-10
-9
-8
-7
-6
Log M
Anti-PRLR Ab- Ej10
Anti-PRLR Ab- Ej11
Control de isotipo-Ej10
Control de isotipo-Ej11
Carga útil libre
Anti-PRLR Ab

FIGURA 30

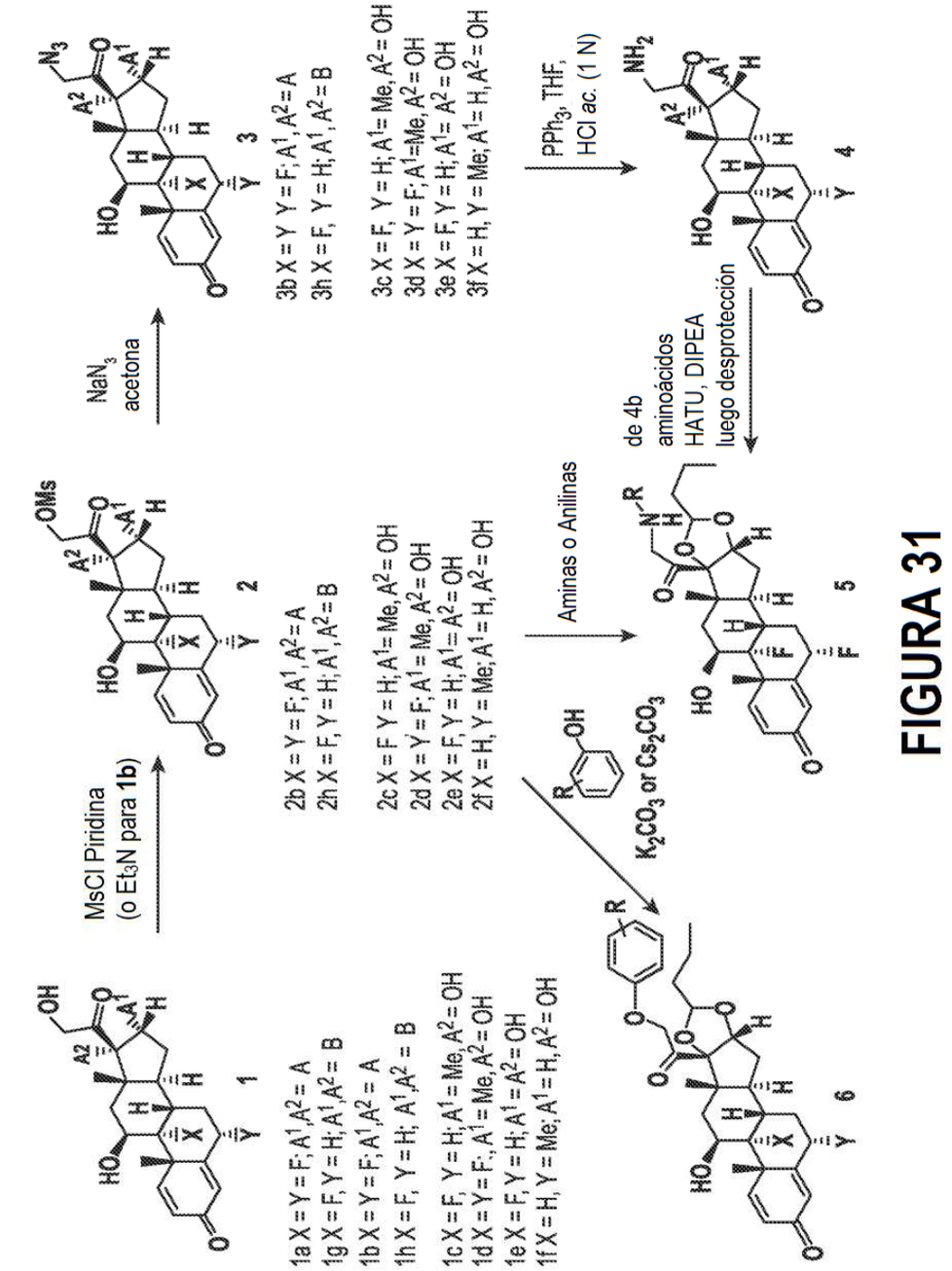

MsCl Piridina
(o Et3N para 1b)
NaN3
acetona
Aminas o Anilinas
K2CO3 or Cs2CO3
de 4b
aminoácidos
HATU, DIPEA
luego desprotección
PPh3, THF,
HCl ac. (1 N)
1a X = Y = F; A1,A2 = A
1g X = F, Y = H; A1,A2 = B
1b X = Y = F; A1,A2 = A
1h X = F, Y = H; A1,A2 = B
1c X = F, Y = H; A1 = Me, A2 = OH
1d X = Y = F; A1 = Me, A2 = OH
1e X = F, Y = H; A1 = A2 = OH
1f X = H, Y = Me; A1 = H, A2 = OH
2b X = Y = F; A1, A2 = A
2h X = F, Y = H; A1, A2 = B
2c X = F Y = H; A1 = Me, A2 = OH
2d X = Y = F; A1 = Me, A2 = OH
2e X = F, Y = H; A1 = A2 = OH
2f X = H, Y = Me; A1 = H, A2 = OH
3b X = Y Y = F; A1, A2 = A
3h X = F, Y = H; A1, A2 = B
3c X = F, Y = H; A1 = Me, A2 = OH
3d X = Y = F; A1=Me, A2 = OH
3e X = F, Y = H; A1 = A2 = OH
3f X = H, Y = Me; A1 = H, A2 = OH

FIGURA 31

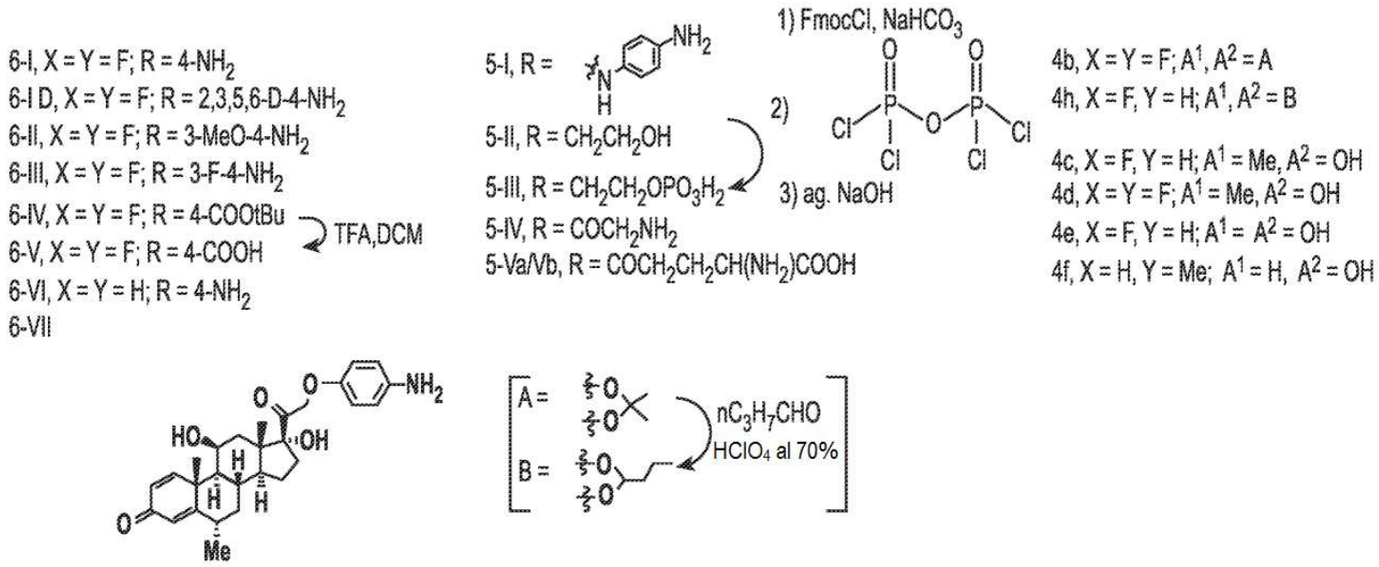


FIGURA 31 (Cont.)

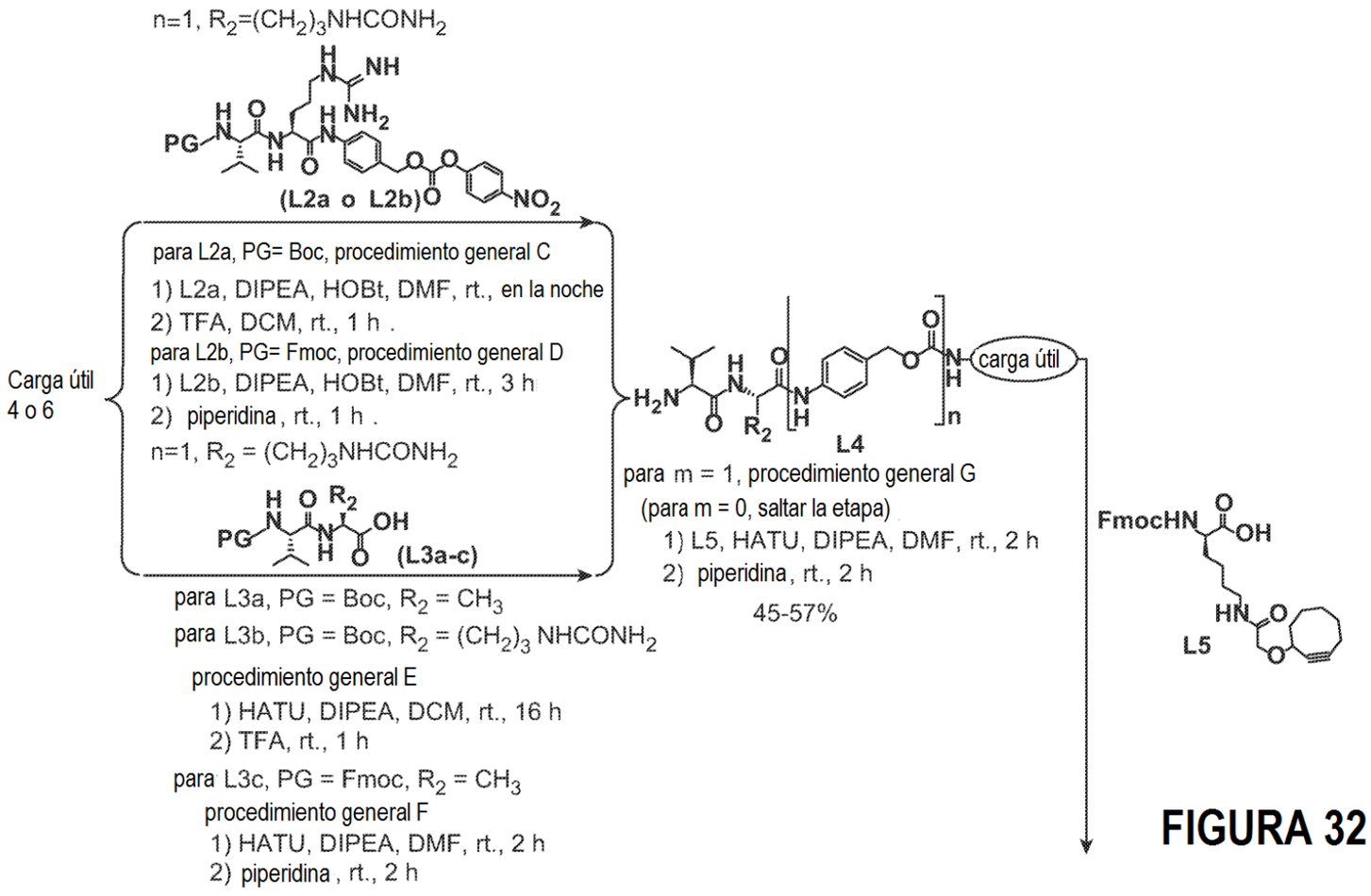

n=1, R2=(CH2)3NHCONH2
(L2a o L2b)
NO2
Carga útil
4 o 6
para L2a, PG= Boc, procedimiento general C
1) L2a, DIPEA, HOBt, DMF, rt., en la noche
2) TFA, DCM, rt., 1 h .
para L2b, PG= Fmoc, procedimiento general D
1) L2b, DIPEA, HOBt, DMF, rt., 3 h
2) piperidina , rt., 1 h .
n=1, R2 = (CH2)3NHCONH2
(L3a-c)
para L3a, PG = Boc, R2 = CH3
para L3b, PG = Boc, R2 = (CH2)3 NHCONH2
procedimiento general E
1) HATU, DIPEA, DCM, rt., 16 h
2) TFA, rt., 1 h
para L3c, PG = Fmoc, R2 = CH3
procedimiento general F
1) HATU, DIPEA, DMF, rt., 2 h
2) piperidina , rt., 2 h
carga útil
L4
para m = 1, procedimiento general G
(para m = 0, saltar la etapa)
1) L5, HATU, DIPEA, DMF, rt., 2 h
2) piperidina , rt., 2 h
45-57%
FmocHN
L5

FIGURA 32

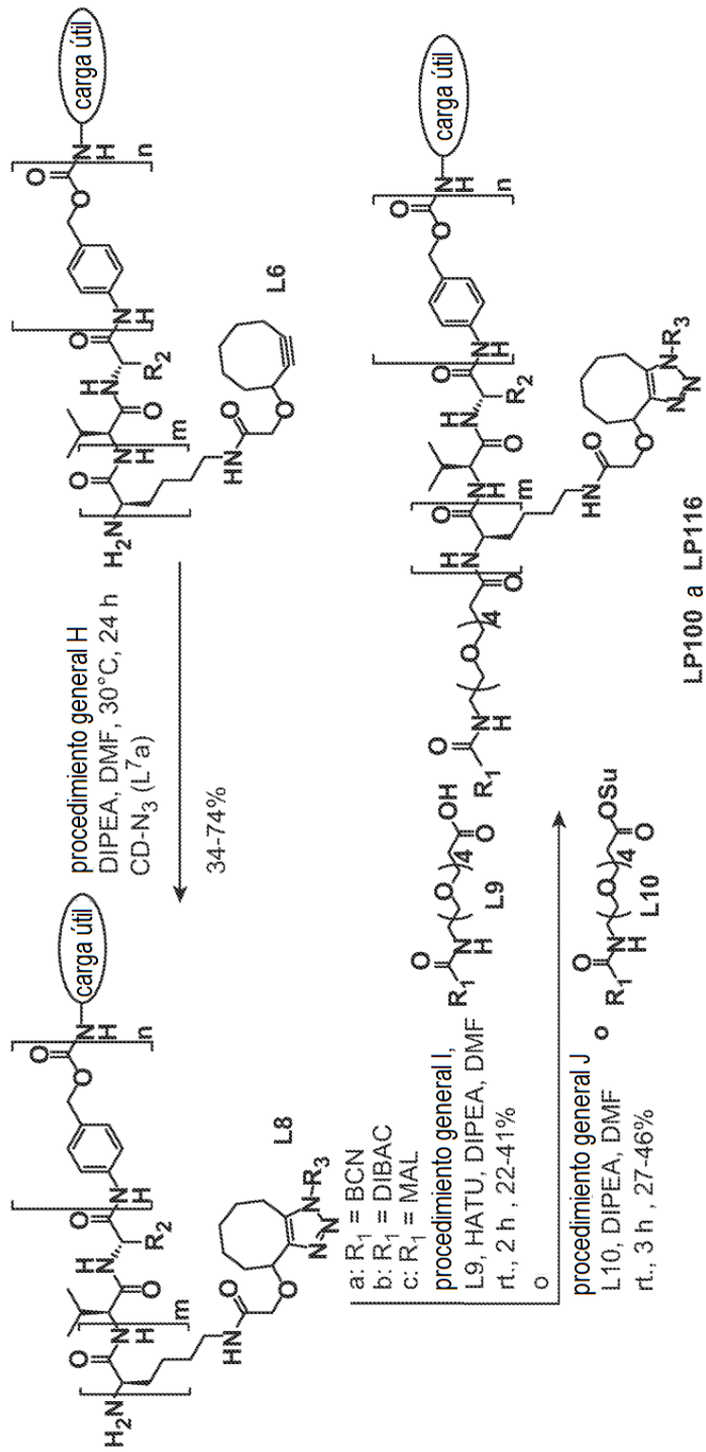


FIGURA 32 (Cont.)

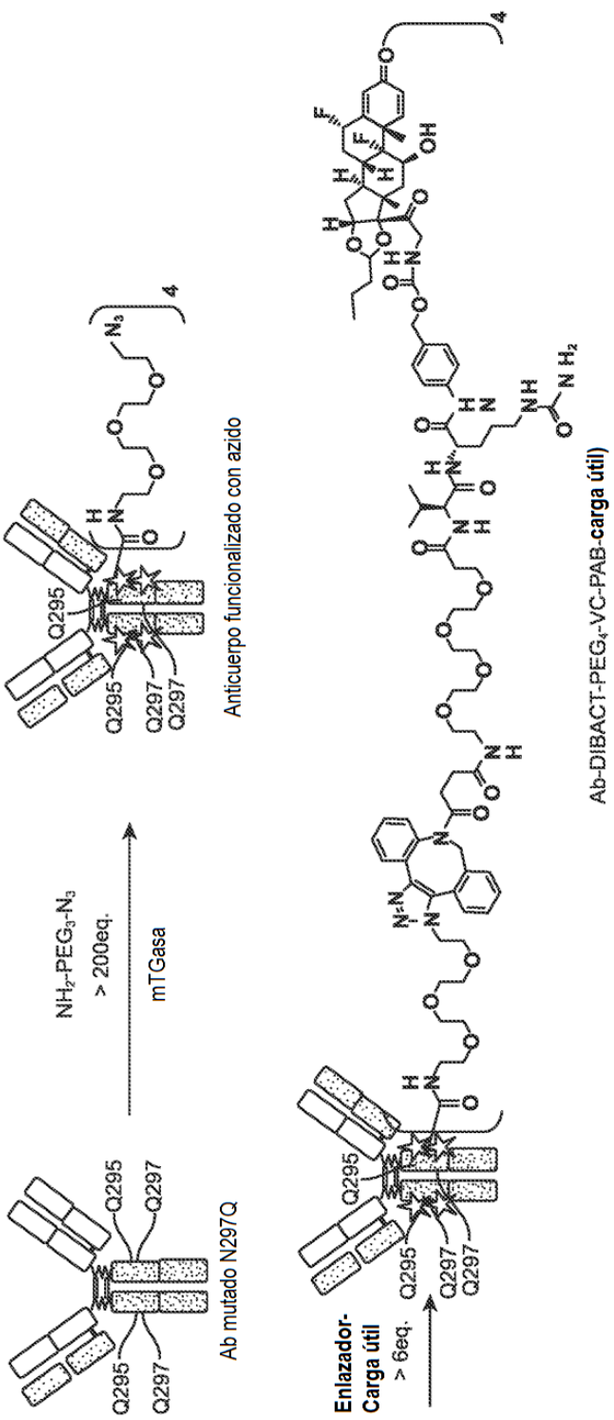

Ab mutado N297Q
Q295
Q297
Q295
Q297
NH2-PEG3-N3
> 200eq.
mTGasa
Anticuerpo funcionalizado con azido
Q295
Q295
Q297
Q297
Enlazador-
Carga útil
> 6eq.
Ab-DIBACT-PEG4-VC-PAB-carga útil)

FIGURA 33

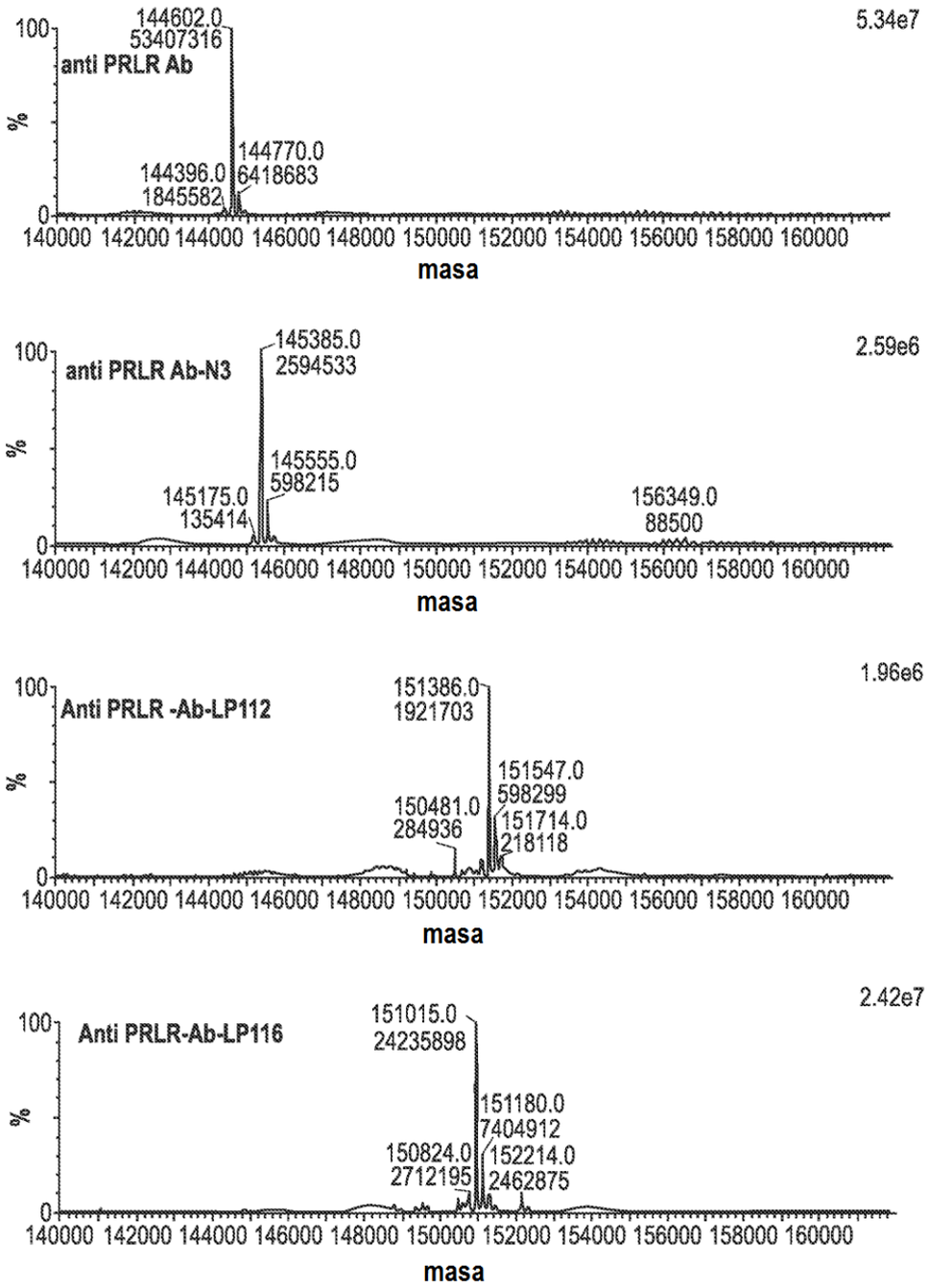

anti PRLR Ab
144602.0
53407316
144770.0
6418683
144396.0
1845582
5.34e7
anti PRLR Ab-N3
145385.0
2594533
145555.0
598215
145175.0
135414
156349.0
88500
2.59e6
Anti PRLR -Ab-LP112
151386.0
1921703
151547.0
598299
150481.0
284936
151714.0
218118
1.96e6
Anti PRLR-Ab-LP116
151015.0
24235898
151180.0
7404912
150824.0
2712195
152214.0
2462875
2.42e7
%
100
0
140000 142000 144000 146000 148000 150000 152000 154000 156000 158000 160000
masa

FIGURA 34

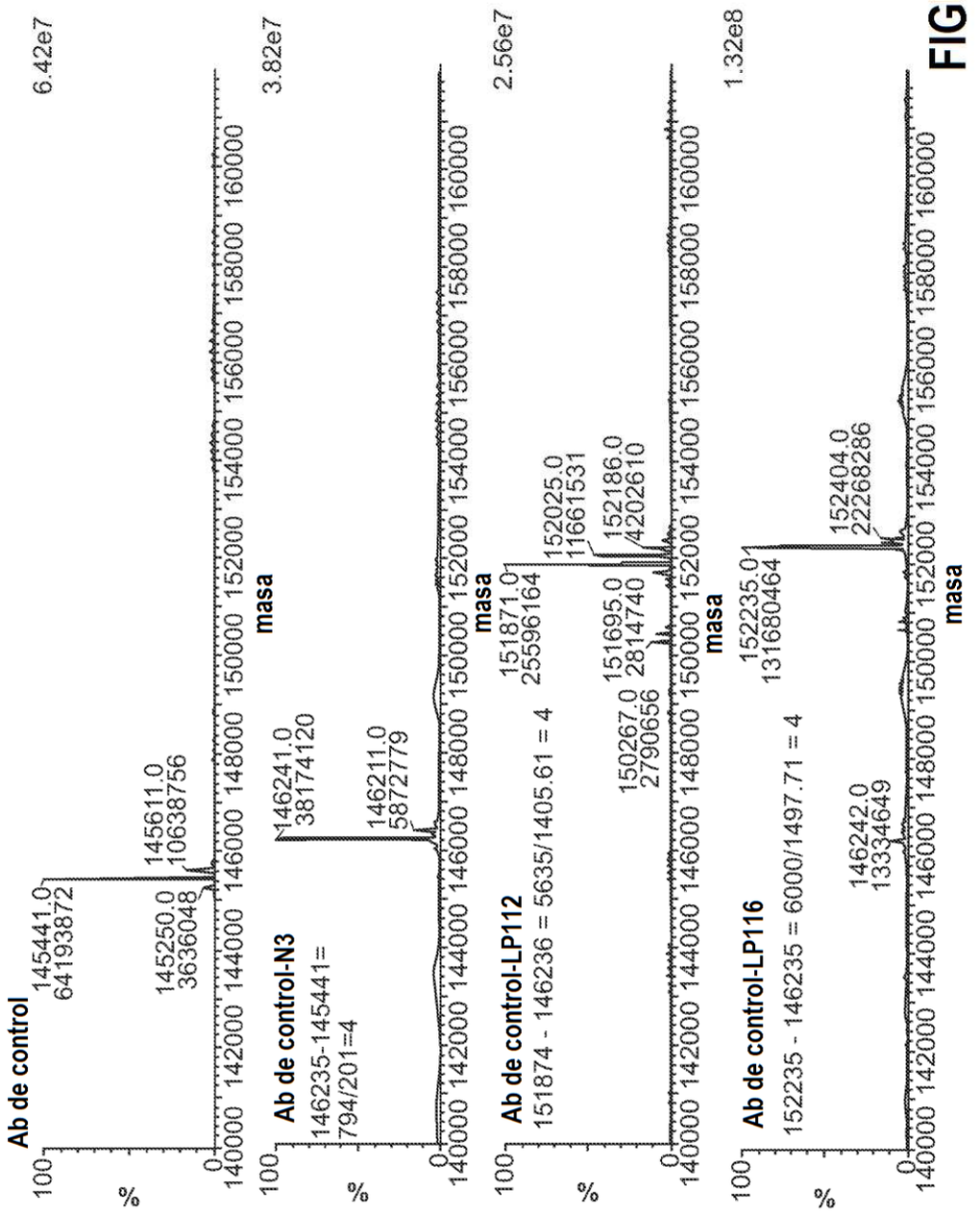

Ab de control
6.42e7
145441.0
64193872
145611.0
10638756
145250.0
3636048
100
%
0
140000 142000 144000 146000 148000 150000 152000 154000 156000 158000 160000
masa
Ab de control-N3
3.82e7
146241.0
38174120
146235-145441=
794/201=4
146211.0
5872779
Ab de control-LP112
2.56e7
151871.01
25596164
151874 - 146236 = 5635/1405.61 = 4
152025.0
11661531
152186.0
4202610
151695.0
2814740
150267.0
2790656
Ab de control-LP116
1.32e8
152235.01
131680464
152235 - 146235 = 6000/1497.71 = 4
152404.0
22268286
146242.0
13334649

FIGURA 35

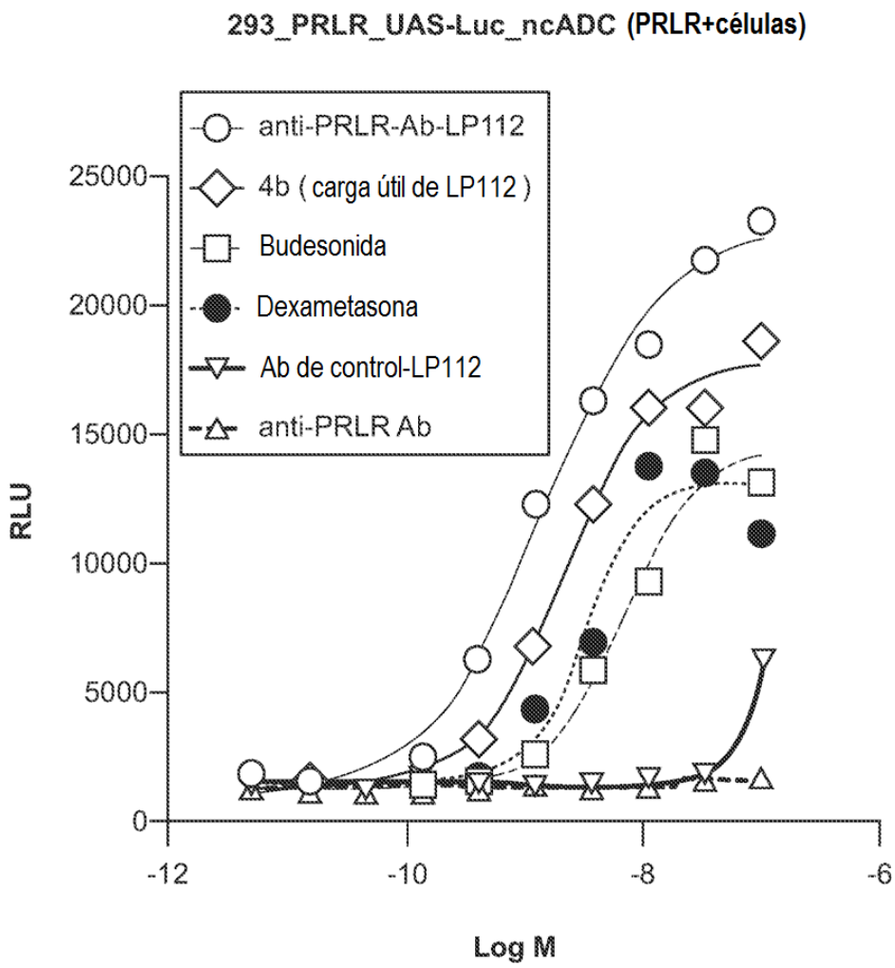

293_PRLR_UAS-Luc_ncADC (PRLR+células)
anti-PRLR-Ab-LP112
4b (carga útil de LP112)
Budesonida
Dexametasona
Ab de control-LP112
anti-PRLR Ab
RLU
25000
20000
15000
10000
5000
0
-12
-10
-8
-6
Log M

FIGURA 36A

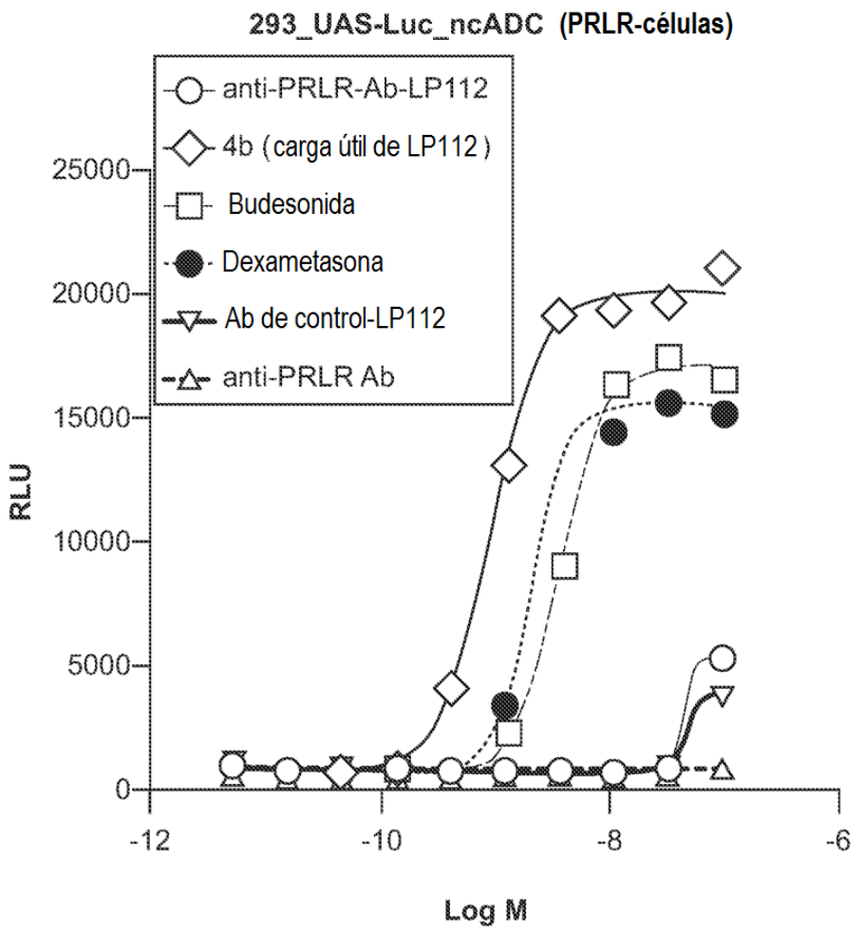
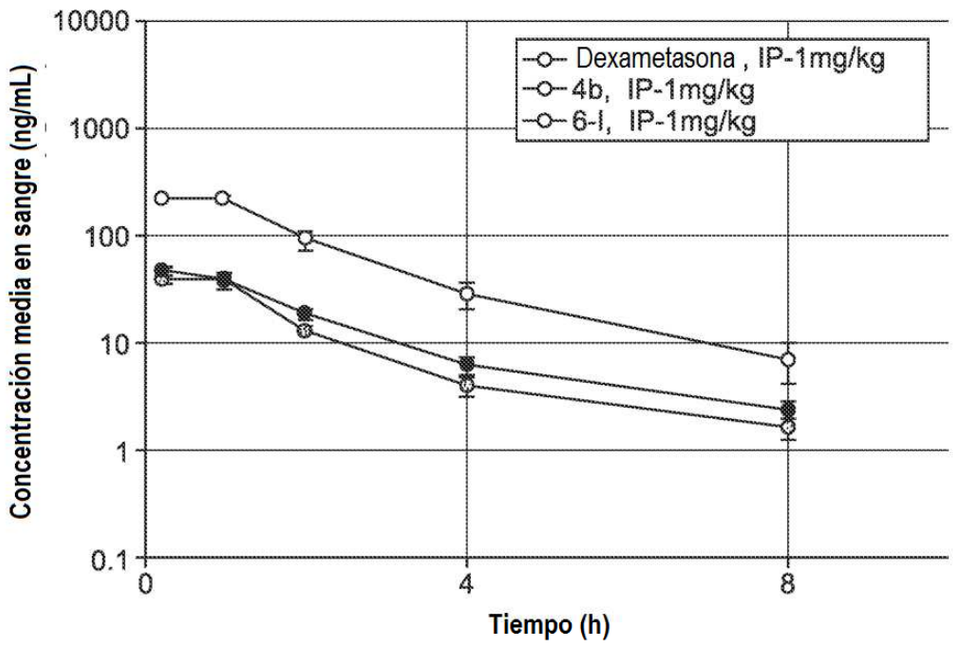

293_UAS-Luc_ncADC (PRLR-células)
anti-PRLR-Ab-LP112
4b (carga útil de LP112)
Budesonida
Dexametasona
Ab de control-LP112
anti-PRLR Ab
25000
20000
15000
10000
5000
0
RLU
-12
-10
-8
-6
Log M

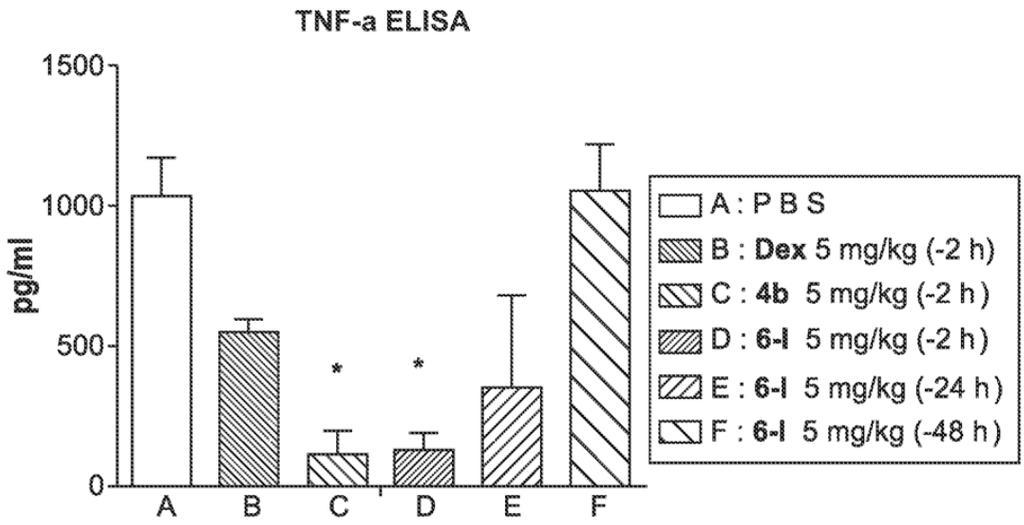
FIGURA 36B

Perfiles de concentración media en sangre-tiempo de las muestras de prueba en 1 mg/kg en ratones C57BL/6 macho (N=4)



Parámetros de PK	Unidad	Dexametasona (IP, 1mg/Kg en ratones C57BL/6 macho)			**4b** (IP, 1mg/Kg en ratones C57BL/6 macho)			**6-l** (IP, 1mg/Kg en ratones C57BL/6 macho)		
		Media	SD	CV(%)	Media	SD	CV(%)	Media	SD	CV(%)
$T_{máx}$	h	0.625	0.433	69.3	0.438	0.375	85.7	0.250	0.00	0.00
$C_{máx}$	ng/mL	231	7.97	3.45	39.4	1.75	4.43	44.8	4.77	10.6
$t_{1/2}$ terminal	h	1.64	0.187	11.4	1.69	0.620	36.7	1.91	0.210	11.0
$AUC_{última}$	h*ng/mL	545	60.6	11.1	84.6	7.71	9.12	107	13.6	12.7
AUC_{INF}	h*ng/mL	562	67.2	11.9	89.2	8.20	9.19	113	14.1	12.5

FIGURA 37A



TNF-a (pg/ml)	A:PBS	B: DEX 5MPK (-2h)	C:**4b** 5MPK (-2h)	D:**6-l** 5MPK (-2h)	E:**6-l** 5MPK (-24h)	F:**6-l** 5MPK (-48h)
2h	840.2	644.3	56.5	110.6	23.1	1280.1
	1293.6	508.5	10.4	30.8	997.3	1149.4
	968.6	487.1	274.8	240.8	55.4	750.0

FIGURA 37B