

CONJUGADOS ANTICUERPO ANTI-CD40-FÁRMACO

SOLICITUDES RELACIONADAS

[0001] La presente solicitud reivindica la prioridad a la solicitud provisional estadounidense N.º 62/593.807, presentada el 1 de diciembre de 2017, y la solicitud provisional estadounidense N.º 62/595.045, presentada el 5 de diciembre de 2017, cuyos contenidos completos se incorporan en la presente por referencia.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0002] [0000] La presente solicitud contiene un Listado de secuencias que se presentó electrónicamente en formato ASCII y que se incorpora en la presente por referencia en su totalidad. Dicha copia ASCII, creada el 29 de noviembre de 2018, se denomina A103017_1480WO_SL.txt y tiene un tamaño de 13.520 bytes.

ANTECEDENTES

[0003] CD40 es una proteína transmembrana tipo I de 48 kDa (van Kooten, J Leukoc Biol. Enero de 2000; 67(1):2-17) que se expresa en una amplia gama de tipos hematopoyéticos (linfocitos, monocitos, dendríticos) y no hematopoyéticos (epitelio, endotelio, fibroblastos) de células. CD40 es un miembro de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF) que cumple una función importante en el desarrollo de linfocitos B, la activación de linfocitos y la función de la célula presentadora de antígenos (APC).

[0004] La vía de señalización de CD40/CD40L se ha visto implicada en la patogénesis de muchas enfermedades autoinmunitarias, que incluyen lupus eritematoso sistémico (SLE), enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), esclerosis múltiple, artritis reumatoide y síndrome de Sjogren (Law y Grewal, Adv Exp Med Biol. 2009;647:8-36). La expresión de CD40 es elevada en macrófagos, endotelio, epitelio y linfocitos B en tejidos dañados por autoinmunidad crónica, los cuales incluyen riñón, intestino y articulaciones (Borcherding, Am J Pathol. Abril de 2010; 176(4):1816-27; Sawada-Hase, Am J Gastroenterol. Junio de 2000; 95(6):1516-23). CD40L soluble es elevada en sujetos que padecen SLE, IBD y síndrome de Sjogren, lo cual resulta consistente con la carga inflamatoria en estos sujetos.

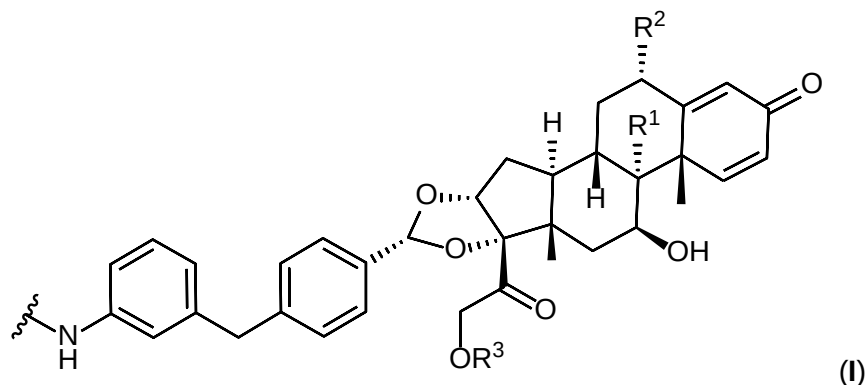
[0005] Parte de la evidencia temprana refleja que la vía de CD40/CD40L en la inflamación intestinal crónica provino de modelos preclínicos en los que los mA b anti-CD40L protegieron a roedores de la colitis experimental (de Jong, Gastroenterology. Septiembre de 2000; 119(3):715-23; Liu, J Immunol. 1 de junio de 2000; 164(11):6005-

14; Stuber, J Exp Med. 1 de febrero de 1996, 183(2):693-8). La reducción en las puntuaciones de actividad de la enfermedad se asoció con una producción reducida de citocinas proinflamatorias en el intestino y la protección contra la pérdida crónica de peso corporal. Se observaron resultados similares en animales que tenían una deficiencia genética de CD40 o CD40L (de Jong, Gastroenterology. Septiembre de 2000; 119(3):715-23). El tratamiento de ratones con mAb anti-CD40L después del inicio de la enfermedad sigue siendo eficaz para reducir la actividad de la enfermedad, lo que sugiere que esta vía es fundamental para el mantenimiento de la enfermedad inflamatoria crónica. Además, los anticuerpos agonistas de CD40 son suficientes para impulsar la inflamación intestinal en ratones que carecen de linfocitos (Uhlig, Immunity. Agosto de 2006; 25(2):309-18). Los datos más recientes que utilizan siARN de CD40 también apuntan a una función importante de la señalización de CD40 en la colitis (Arranz, J Control Release. 10 de febrero de 2013; 165(3):163-72). En la enfermedad de Crohn, el epitelio y los monocitos de lámina propia expresan altos niveles de CD40 y los monocitos CD40+ están enriquecidos en sangre periférica. Además, los polimorfismos en el locus *CD40* se han ligado con una mayor susceptibilidad a IBD. En los sujetos con enfermedad de Crohn tratados con anticuerpos anti-TNF, la generación transcripcional de perfiles indica que los niveles de mRNA de CD40 disminuyen en los sujetos con una respuesta adecuada al tratamiento farmacológico. Sin embargo, en los sujetos con una respuesta deficiente a los inhibidores de TNF, los niveles de mRNA de CD40 no cambian, lo que sugiere que las vías dependientes de CD40 e independientes de TNF pueden promover la inflamación en estos sujetos. Los estudios sugieren que la inhibición de la señalización mediada por CD40 es importante en la patogénesis de IBD, así como otras enfermedades autoinmunitarias.

[0006] Sin embargo, sigue existiendo la necesidad de nuevos antagonistas de CD40 que sean útiles en el tratamiento de diversas afecciones inflamatorias y autoinmunitarias.

SÍNTESIS

[0007] En un aspecto, la presente divulgación proporciona un conjugado anticuerpo-fármaco que comprende: (a) un anticuerpo anti-CD40 que comprende regiones determinantes de la complementariedad (CDR) establecidas como SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12; y (b) un radical de un agonista del receptor de glucocorticoides de la Fórmula (I):



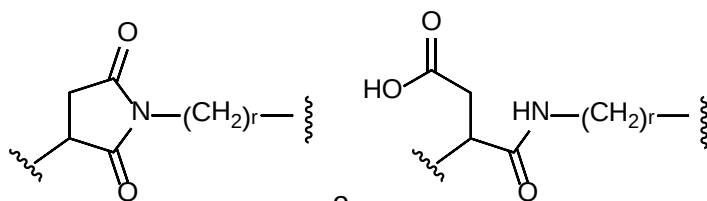
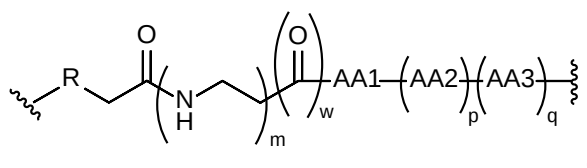
en donde:

R¹ es hidrógeno o fluoro;

R² es hidrógeno o fluoro; y

R³ es hidrógeno o -P(=O)(OH)₂;

además, en donde el anticuerpo está conjugado con el agonista del receptor de glucocorticoides a través de un ligador representado por la siguiente fórmula:



en donde R es un enlace,

, o

y r es

0 o 1;

AA1, AA2 y AA3 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en alanina (Ala), glicina (Gly), isoleucina (Ile), leucina (Leu), prolina (Pro), valina (Val), fenilalanina (Phe), triptófano (Trp), tirosina (Tyr), ácido aspártico (Asp), ácido glutámico (Glu), arginina (Arg), histidina (His), lisina (Lys), serina (Ser), treonina (Thr), cisteína (Cys), metionina (Met), asparagina (Asn) y glutamina (Gln);

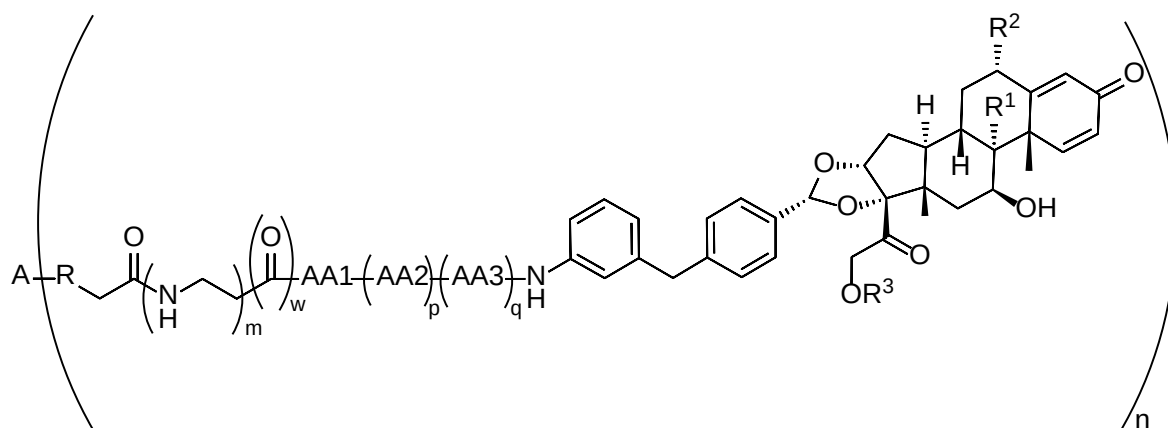
m es 0 o 1;

w es 0 o 1;

p es 0 o 1; y

q es 0 o 1.

[0008] En otra forma de realización, la presente divulgación proporciona un conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con la Fórmula (II):



(II)

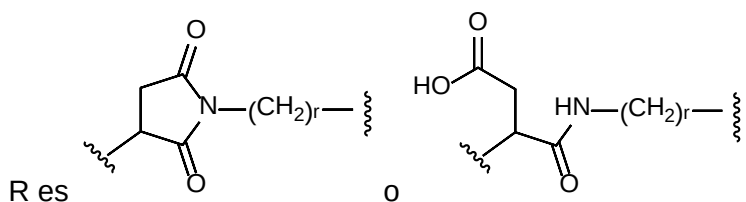
en donde A es el anticuerpo anti-CD40 y n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10.

[0009] En ciertas formas de realización, n es 2, 4, 6 u 8. En ciertas formas de realización, n es 2. En ciertas formas de realización, n es 4.

[0010] En una forma de realización, la presente divulgación proporciona un conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde R^1 es hidrógeno y R^2 es hidrógeno. En una forma de realización, la presente divulgación proporciona un conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde R^1 es fluoro y R^2 es hidrógeno. En una forma de realización, la presente divulgación proporciona un conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde R^1 es fluoro y R^2 es fluoro. En una forma de realización, la presente divulgación proporciona un conjugado anticuerpo-fármaco, en donde R^3 es $-P(=O)(OH)_2$. En otra forma de realización, la presente divulgación proporciona un conjugado anticuerpo-fármaco en el que R^3 es hidrógeno.

[0011] En una forma de realización, la presente divulgación proporciona un conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde $-AA1-(AA2)_p-(AA3)_q-$ se selecciona del grupo que consiste en: $-Gly-Glu-$; $-Ala-Ala-$; $-Glu-Ala-Ala-$; $-Gly-Lys-$; $-Glu-$; $-Glu-Ser-Lys-$; y $-Gly-Ser-Lys-$. En ciertas formas de realización, $AA1-(AA2)_p-(AA3)_q$ se selecciona del grupo que consiste en $-Gly-Glu-$; $-Gly-Lys-$; $-Glu-Ser-Lys-$; y $-Gly-Ser-Lys-$. En ciertas formas de realización, $AA1-(AA2)_p-(AA3)_q$ es $-Gly-Glu-$ o $-Gly-Lys-$. En ciertas formas de realización, $AA1-(AA2)_p-(AA3)_q$ es $-Glu-Ser-Lys-$ o $-Gly-Ser-Lys-$.

[0012] En una forma de realización, la presente divulgación proporciona un conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde m es 0; q es 0; y



[0013] En una forma de realización, la presente divulgación proporciona un conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde m es 0 o 1; p es 1; y R es un enlace.

[0014] En una forma de realización, la presente divulgación proporciona un conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde m es 1; w es 1; y q es 0.

[0015] En una forma de realización, la presente divulgación proporciona un conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde m es 0.

[0016] En ciertas formas de realización, la presente divulgación proporciona un conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde R es un enlace, p es 1, m es 0, w es 0 y q es 0. En ciertas formas de realización, la presente divulgación proporciona un conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde R es un enlace, p es 1, m es 0, w es 0 y q es 1.

[0017] En una forma de realización, la presente divulgación proporciona un conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, seleccionado del grupo que consiste en compuestos enumerados en la Tabla 5, en donde n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. En ciertas formas de realización, n es 2, 4, 6 u 8. En ciertas formas de realización, n es 2. En ciertas formas de realización, n es 4.

[0018] En una forma de realización, la presente divulgación proporciona un conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, seleccionado del grupo que consiste en el Ejemplo 4-conjugado, el Ejemplo 28-conjugado y el Ejemplo 47-conjugado. En ciertas formas de realización, la presente divulgación proporciona un conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde el conjugado anticuerpo-fármaco es el Ejemplo 47-conjugado, y en donde n es 2. En ciertas formas de realización, la presente divulgación proporciona un conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde el conjugado anticuerpo-fármaco es el Ejemplo 47-conjugado, y en donde n es 4. En ciertas formas de realización, la presente divulgación proporciona un conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con cualquier

forma de realización anterior, en donde el conjugado anticuerpo-fármaco es el Ejemplo 28-conjugado, y en donde n es 2. En ciertas formas de realización, la presente divulgación proporciona un conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, en donde el conjugado anticuerpo-fármaco es el Ejemplo 28-conjugado, y en donde n es 4.

[0019] En una forma de realización, la presente divulgación proporciona un conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, seleccionado del grupo que consiste en compuestos enumerados en la Tabla 6A o 6B, en donde n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. En ciertas formas de realización, n es 2, 4, 6 u 8. En ciertas formas de realización, n es 2. En ciertas formas de realización, n es 4.

[0020] En una forma de realización, la presente divulgación proporciona un conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, seleccionado del grupo que consiste en el Ejemplo 6-conjugado, el Ejemplo 6-hidrolizado, el Ejemplo 7-conjugado, el Ejemplo 7-hidrolizado, el Ejemplo 12-conjugado, el Ejemplo 12-hidrolizado, el Ejemplo 13-conjugado y el Ejemplo 13-hidrolizado.

[0021] En una forma de realización, la presente divulgación proporciona un conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con cualquier forma de realización anterior, seleccionado del grupo que consiste en el Ejemplo 12-hidrolizado y el Ejemplo 13-hidrolizado.

[0022] En ciertas formas de realización, el anticuerpo del conjugado anticuerpo-fármaco comprende una región variable de la cadena pesada establecida como SEQ ID NO: 5 y una región variable de la cadena liviana establecida como SEQ ID NO: 6.

[0023] En ciertas formas de realización, el anticuerpo del conjugado anticuerpo-fármaco comprende una cadena pesada establecida como SEQ ID NO: 3. En ciertas formas de realización, el anticuerpo del conjugado anticuerpo-fármaco comprende una cadena liviana establecida como SEQ ID NO: 4. En ciertas formas de realización, el anticuerpo del conjugado anticuerpo-fármaco comprende una cadena pesada establecida como SEQ ID NO: 3 y una cadena liviana establecida como SEQ ID NO: 4.

[0024] En una forma de realización, la presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende el conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con cualquier forma de realización anterior y un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico.

[0025] En una forma de realización, la presente divulgación proporciona un método para tratar una afección seleccionada del grupo que consiste en enfermedad

inflamatoria intestinal (IBD), lupus eritematoso sistémico (SLE), esclerosis múltiple, artritis reumatoide, síndrome de Sjogren, e hidradenitis supurativa (HS), en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz del conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con cualquier forma de realización anterior o la composición farmacéutica de acuerdo con cualquier forma de realización anterior.

[0026] En una forma de realización, la presente divulgación proporciona un kit que comprende: (a) un recipiente que comprende el conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con cualquier forma de realización anterior o la composición farmacéutica de acuerdo con cualquier forma de realización anterior; y (b) una etiqueta o prospecto sobre o asociado con uno o más recipientes, en donde la etiqueta o el prospecto indica que el conjugado anticuerpo-fármaco o la composición farmacéutica se usa para tratar una afección seleccionada del grupo que consiste en enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), lupus eritematoso sistémico (SLE), esclerosis múltiple, artritis reumatoide, síndrome de Sjogren, e hidradenitis supurativa (HS).

[0027] En cualquiera de las formas de realización anteriores, la IBD es colitis ulcerosa (CU) o enfermedad de Crohn.

[0028] En una forma de realización, la presente divulgación proporciona un método para administrar un agonista del receptor de glucocorticoides a una célula que expresa CD40, que comprende la etapa de poner en contacto la célula con el conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con cualquier forma de realización anterior.

[0029] En una forma de realización, la presente divulgación proporciona un método para determinar la actividad antiinflamatoria de un conjugado anticuerpo-fármaco que comprende: (a) poner en contacto una célula que expresa CD40 con el conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con cualquier forma de realización anterior; y (b) determinar la liberación reducida de citocinas proinflamatorias de la célula en comparación con una célula de control.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0030] La **Figura 1A** representa los datos de espectroscopía de masas deconvolucionados como se proporcionan en el Ejemplo 2 de ADC, del Ejemplo 4-conjugado (humano) (n = 4). El pico de 25140,73 corresponde a la cadena liviana (SEQ ID NO: 4) con una molécula de fármaco ligador conjugada. El pico de 50917,59 corresponde a la cadena pesada (SEQ ID NO: 3) con una molécula de fármaco ligador conjugada.

[0031] La **Figura 1B** representa datos de cromatografía de intercambio aniónico (AEC) como se proporcionan en el Ejemplo 2 de ADC al respecto del Ejemplo 28-

conjugado (humano) (n = 2), con un tiempo de retención de alrededor de 7,5 minutos.

[0032] La **Figura 1C** representa los datos de espectroscopía de masas deconvolucionados como se proporcionan en el Ejemplo 2 de ADC, del Ejemplo 4-conjugado (humano) (n = 2). El pico de 25176,72 corresponde a la cadena liviana (SEQ ID NO: 2) con una molécula de fármaco ligador conjugada. El pico de 50954,63 corresponde a la cadena pesada (SEQ ID NO: 1) con una molécula de fármaco ligador conjugada.

[0033] La **Figura 1D** representa datos de cromatografía de intercambio aniónico (AEC) como se proporcionan en el Ejemplo 2 de ADC al respecto del Ejemplo 28-conjugado (humano) (n = 4), con un tiempo de retención de alrededor de 13 minutos.

[0034] La **Figura 1E** representa los datos de espectroscopía de masas deconvolucionados como se proporcionan en el Ejemplo 2 de ADC, del Ejemplo 4-conjugado (humano) (n = 4). El pico de 25176,88 corresponde a la cadena liviana (SEQ ID NO: 2) con una molécula de fármaco ligador conjugada. El pico de 50954,80 corresponde a la cadena pesada (SEQ ID NO: 1) con una molécula de fármaco ligador conjugada.

[0035] La **Figura 2** representa la actividad *in vitro* de ADC anti-CD40 humana en un ensayo de MoDC humanas estimuladas con CD40L y LPS como se describe en el Ejemplo C. Los datos en la Figura 2 demuestran que la capacidad máxima para inhibir la activación de células inmunitarias por parte de cualquiera de los compuestos de ADC evaluados excede la inhibición proporcionada por el anticuerpo antagonista parental.

[0036] La **Figura 3** representa la actividad *in vitro* de ADC anti-CD40 de ratón en un ensayo de BMDC murinas estimuladas con CD40L y LPS como se describe en el Ejemplo D. Los resultados mostrados en la Figura 3 demuestran que la capacidad máxima para inhibir la activación de células inmunitarias por parte del Ejemplo 6-hidrolizado (ratón) excede la inhibición proporcionada por el anticuerpo antagonista parental.

[0037] La **Figura 4** representa la actividad *in vivo* del Ejemplo 6-hidrolizado (ratón) (n = 4) en la inflamación aguda inducida por LPS, como se describe en el Ejemplo E. Los resultados mostrados en la Figura 4 demuestran que el ADC contra CD40 exhibe mayor eficacia en la inhibición de la activación de DC *in vivo* que el anticuerpo antagonista parental o el ADC de isotipo.

[0038] La **Figura 5A** representa la actividad *in vivo* de un ADC anti-CD40 de ratón (Ejemplo 12-hidrolizado (ratón)) en la respuesta de DTH, y la **Figura 5B** representa la

actividad *in vivo* de un ADC anti-CD40 de ratón (Ejemplo 28-conjugado (ratón)) en la respuesta de DTH, como se describe en el Ejemplo F. Los datos en las Figuras 5A y 5B demuestran la eficacia mejorada de ADC contra CD40 para inhibir con mayor potencia la inflamación mediada por linfocitos T *in vivo* en comparación con el anticuerpo antagonista parental o el ADC no dirigido solo.

[0039] La **Figura 6** representa la actividad *in vivo* de ADC anti-CD40 de ratón en la artritis inducida por colágeno (CIA) de ratón, como se describe en el Ejemplo H. Los datos en la Figura 6 demuestran que una sola dosis de ADC esteroide anti-CD40 de ratón puede exhibir una duración de acción prolongada mediante la mejora de la hinchazón de las patas durante ~6 semanas en comparación con los Controles 1 y 2.

DEFINICIONES

[0040] Las expresiones “CD40 humana” y “CD40 humana de tipo silvestre” (abreviadas en la presente como hCD40, hCD40wt), como se usan en la presente, se refieren a una proteína transmembrana tipo I. En una forma de realización, la expresión CD40 humana pretende incluir CD40 humana recombinante (rhCD40), que puede prepararse mediante métodos de expresión recombinante estándar. La Tabla 1 proporciona la secuencia de aminoácidos de CD40 humana (es decir, SEQ ID NO: 1) y el dominio extracelular de esta (es decir, SEQ ID NO: 2).

Tabla 1. Secuencia de CD40 humana	
Proteína	Secuencia
CD40 humana	MVRLPLQCVLWGCLLTAVHPEPPTACREKQYLINSQCCSLCQPGQKL VSDCTEFTETECLPCGESEFLDTWNRETHCHQHXYCDPNLGLRVQK GTSETDTICTCEEGWHCTSEACESCVLHRSCSPGFGVKQIATGVSDTI CEPCPVGFFSNVSSAFEKCHPWTSCTKDLVVQQAGTNKTDVVCGPQ DRLRALVVIPIIFGILFAILLVLVFIKKVAKKPTNKAPHPKQEPQEINFPDDL PGSNTAAPVQETLHGCGPVTQEDGKESRISVQERQ (SEQ ID NO: 1)
Dominio extracelular de CD40 humana	EPPTACREKQYLINSQCCSLCQPGQKLVDCTEFTETECLPCGESEFL DTWNRETHCHQHXYCDPNLGLRVQKGTSETDTICTCEEGWHCTSE ACESCV (SEQ ID NO: 2)

[0041] El término “anticuerpo”, como se usa en la presente, pretende referirse a moléculas de inmunoglobulina que comprenden cuatro cadenas de polipéptidos, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas livianas (L) interconectadas mediante puentes disulfuro. Cada cadena pesada comprende una región variable de la cadena pesada (abreviada en la presente como HCVR o VH) y una región constante de la cadena pesada. La región constante de la cadena pesada comprende tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena liviana comprende una región variable de la cadena liviana (abreviada en la presente como LCVR o VL) y una región constante de la cadena liviana. La región constante de la cadena liviana comprende un dominio, CL. Las

regiones VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada VH y VL está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el terminal amino hasta el terminal carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

[0042] La expresión “porción de fijación al antígeno” de un anticuerpo (o simplemente “porción de anticuerpo”), como se usa en la presente, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de fijarse específicamente a un antígeno (por ejemplo, $\text{TNF}\alpha$). Se ha demostrado que la función de fijación al antígeno de un anticuerpo puede ser realizada por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de fijación comprendidos por la expresión “porción de fijación al antígeno” de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')_2 , un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab ligados por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341:544-546), que consiste en un dominio VH; y (vi) una región determinante de la complementariedad (CDR) aislada. Además, si bien los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, pueden unirse, con métodos recombinantes, mediante un ligador sintético que les permite formarse como una única cadena proteica en la que las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv monocatenario (scFv); ver, por ejemplo, Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; y Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 85:5879-5883). Se pretende que tales anticuerpos monocatenarios también estén comprendidos dentro de la expresión “porción de fijación al antígeno” de un anticuerpo. También están comprendidas otras formas de anticuerpos monocatenarios, tales como los diacuerpos. Los diacuerpos son anticuerpos bivalentes biespecíficos en los que los dominios VH y VL se expresan en una única cadena de polipéptidos, pero mediante un ligador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento de los dos dominios en la misma cadena, lo que obliga a los dominios a emparejarse con dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de fijación al antígeno (ver, por ejemplo, Holliger, P., *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448; Poljak, R. J., *et al.* (1994) *Structure* 2:1121-1123).

[0043] Una “región variable” de un anticuerpo se refiere a la región variable de la cadena liviana del anticuerpo o la región variable de la cadena pesada del anticuerpo, ya sea sola o en combinación. Cada una de las regiones variables de las cadenas pesada y liviana tiene cuatro regiones marco (FR) y tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR), también conocidas como regiones hipervariables. Las CDR contribuyen a la formación del sitio de fijación al antígeno de los anticuerpos. Existen al menos dos técnicas para determinar CDR: (1) un enfoque basado en la variabilidad de secuencia entre especies (por ejemplo, Kabat *et al.* Sequences of Proteins of Immunological Interest, (5.^a ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda Md.)); y (2) un enfoque basado en estudios cristalográficos de complejos antígeno-anticuerpo (Al-lazikani *et al.* (1997) *J. Molec. Biol.* 273:927-948)). Además, en la técnica a veces se usan combinaciones de estos dos enfoques para determinar CDR.

[0044] Los términos “idéntico” o porcentaje de “identidad”, en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o polipéptidos, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o que tienen un porcentaje específico de nucleótidos o residuos de aminoácidos que son iguales, cuando se comparan y alinean (introduciendo espacios, de ser necesario) para una correspondencia máxima, sin considerar sustitución conservadora de aminoácidos alguna como parte de la identidad de secuencia. El porcentaje de identidad puede medirse con *software* o algoritmos de comparación de secuencias o mediante inspección visual. En la técnica se conocen diversos algoritmos y *software* que pueden usarse para obtener alineaciones de secuencias de aminoácidos o nucleótidos. Un ejemplo no limitativo tal de un algoritmo de alineación de secuencia es el algoritmo descrito en Karlin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87:2264-2268 (1990), según su modificación en Karlin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90:5873-5877 (1993), e incorporado en los programas NBLAST y XBLAST (Altschul *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 25:3389-3402 (1991)). En ciertas formas de realización, el porcentaje de identidad “X” de una primera secuencia de aminoácidos con respecto a una segunda secuencia de aminoácidos se calcula como $100 \times (Y/Z)$, donde Y es la cantidad de residuos de aminoácidos calificados como coincidencias idénticas en la alineación de las secuencias primera y segunda (alineadas mediante inspección visual o un programa de alineación de secuencias particular) y Z es la cantidad total de residuos en la segunda secuencia. Si la longitud de una primera secuencia es mayor que la de la segunda secuencia, el porcentaje de identidad de la primera secuencia con respecto a la segunda secuencia será mayor que el porcentaje de identidad de la

segunda secuencia con respecto a la primera secuencia.

[0045] Como un ejemplo no limitativo, si un polinucleótido particular tiene un cierto porcentaje de identidad de secuencia (por ejemplo, es al menos 80% idéntico, al menos 85% idéntico, al menos 90% idéntico y, en algunas formas de realización, al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntico) con una secuencia de referencia puede determinarse, en ciertas formas de realización, con el programa Bestfit (Wisconsin Sequence Analysis Package, versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711). Bestfit utiliza el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (*Advances in Applied Mathematics* 2: 482-489 (1981)) para encontrar el mejor segmento de homología entre dos secuencias. Cuando se utiliza Bestfit o cualquier otro programa de alineación de secuencias para determinar si una secuencia particular es, por ejemplo, 95% idéntica a una secuencia de referencia de acuerdo con la presente divulgación, los parámetros se establecen de modo que el porcentaje de identidad se calcule sobre la longitud completa de la secuencia de nucleótidos de referencia y de modo que se permitan espacios en la homología de hasta 5% de la cantidad total de nucleótidos en la secuencia de referencia.

[0046] En algunas formas de realización, dos ácidos nucleicos o polipéptidos son sustancialmente idénticos, lo que significa que tienen al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, y, en algunas formas de realización, al menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de identidad de nucleótidos o residuos de aminoácidos, cuando se comparan y se alinean para una correspondencia máxima, según se mide con un algoritmo de comparación de secuencias o mediante inspección visual. Puede existir identidad en una región de las secuencias que tiene al menos alrededor de 10, alrededor de 20, alrededor de 40-60 residuos de longitud o cualquier valor integral entre ellos, y puede haber identidad en una región más larga que 60-80 residuos, por ejemplo, al menos alrededor de 90-100 residuos, y, en algunas formas de realización, las secuencias son sustancialmente idénticas en la longitud completa de las secuencias que se comparan, tales como la región codificante de una secuencia de nucleótidos, por ejemplo.

[0047] Una "sustitución conservadora de aminoácidos" es aquella en la que un residuo de aminoácido se reemplaza con otro residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. En la técnica se han definido familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares, que incluyen cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido

aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por ejemplo, la sustitución de una fenilalanina por una tirosina es una sustitución conservadora. En algunas formas de realización, las sustituciones conservadoras en las secuencias de los polipéptidos y los anticuerpos de la divulgación no anulan la fijación del anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos a los antígenos, por ejemplo, la CD40 a la que se fija el anticuerpo. Los métodos para identificar sustituciones conservadoras de nucleótidos y aminoácidos que no eliminan la fijación al antígeno son bien conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Brummell *et al.*, *Biochem.* 32: 1180-1 187 (1993); Kobayashi *et al.*, *Protein Eng.* 12(10):879-884 (1999); y Burks *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:412-417 (1997)).

[0048] La “afinidad de fijación” se refiere en general a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un único sitio de fijación de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo o una porción de fijación al antígeno de este) y su componente de fijación (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique lo contrario, como se usa en la presente, “afinidad de fijación” se refiere a la afinidad de fijación intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre miembros de un par de fijación (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X con su componente de fijación Y puede representarse por lo general mediante la constante de disociación (K_d). Se puede medir la afinidad mediante métodos comunes conocidos en la técnica. Los anticuerpos de baja afinidad generalmente se fijan al antígeno lentamente y tienden a disociarse fácilmente, mientras que los anticuerpos de alta afinidad generalmente se fijan al antígeno más rápidamente y tienden a permanecer fijados por más tiempo. En la técnica se conocen diversos métodos para medir la afinidad de fijación.

[0049] El término “antagonista”, como se usa en la presente, se refiere a un anticuerpo o una porción de fijación al antígeno de este que bloquea o reduce la actividad biológica o inmunológica de CD40 humana (hCD40). Un anticuerpo antagonista, o una porción de fijación al antígeno de este, de hCD40 puede, por ejemplo, inhibir la regulación ascendente de CD86 de linfocitos B humanos primarios que se cultivan con (o se exponen a) CD40L (tal como cultivar los linfocitos B con linfocitos T humanos que expresan CD40L). En una forma de realización, un anticuerpo anti-CD40

antagonista, o una porción de fijación al antígeno de este, que está sustancialmente libre de actividad agonista, se define como que tiene un nivel de actividad que es equivalente a, o está dentro de, una desviación estándar de un control negativo en un ensayo de agonista, tal como el ensayo de monocitos agonistas descrito en el Ejemplo 7 de la publicación PCT N.º WO 2016/196314. La actividad agonista y antagonista también puede evaluarse con métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante el uso de una línea celular indicadora que expresa CD40 que expresa CD40 humana ligada a fosfatasa alcalina (AP) mediada por NFκB o un ensayo de linfocitos B.

[0050] Un “radical de un glucocorticosteroide” se deriva de la eliminación de un átomo de hidrógeno de un grupo amino de un glucocorticosteroide parental. La eliminación del átomo de hidrógeno facilita la unión del glucocorticosteroide parental a un ligador.

[0051] Las expresiones “carga de fármaco” y “relación de fármaco con respecto a anticuerpo” (DAR) se usan indistintamente en la presente, y se refieren a la cantidad de radicales de glucocorticosteroides conectados, mediante un conector, a un anticuerpo. La “carga de fármaco” o “relación de fármaco con respecto a anticuerpo” (DAR) de un conjugado anticuerpo-fármaco que comprende un radical de la Fórmula (I), o un conjugado anticuerpo-fármaco de la Fórmula (II), por ejemplo, y que representa un ADC individual, se refiere a la cantidad de moléculas de glucocorticosteroides ligadas al anticuerpo individual (por ejemplo, carga de fármaco de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, o la variable n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, respectivamente) (“DAR del compuesto”). Además, la relación de fármaco con respecto a anticuerpo (DAR) de una población de conjugados anticuerpo-fármaco (por ejemplo, proporcionada en una composición o fracción recolectada) se refiere a una cantidad promedio de moléculas de glucocorticosteroides ligadas a un anticuerpo en la población dada, por ejemplo, carga de fármaco o n como un número entero o una fracción de 1 a $10 \pm 0,5$, $\pm 0,4$, $\pm 0,3$, $\pm 0,2$ o $\pm 0,1$ (“DAR de la población”).

[0052] El término “sujeto” se refiere a cualquier animal (por ejemplo, un mamífero), que incluye, entre otros, seres humanos, primates no humanos, roedores y similares, que recibirá un tratamiento particular.

[0053] Una “cantidad eficaz” de un conjugado anticuerpo-fármaco como se divulga en la presente es una cantidad suficiente para llevar a cabo un propósito establecido específicamente. Se puede determinar una “cantidad eficaz” en relación con el propósito establecido.

[0054] La expresión “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad de un conjugado anticuerpo-fármaco eficaz para “tratar” una enfermedad o un trastorno en

un sujeto o mamífero. Una “cantidad profilácticamente eficaz” se refiere a una cantidad eficaz para lograr el resultado profiláctico deseado.

[0055] Términos como “tratar”, “tratamiento” o “aliviar” se refieren a medidas terapéuticas que curan, ralentizan, disminuyen uno o más síntomas de, y/o retrasan o detienen la progresión de, una afección o trastorno patológico diagnosticado (“tratamiento terapéutico”). Por lo tanto, aquellos que necesitan tratamiento terapéutico incluyen aquellos ya diagnosticados con el trastorno o que se sospecha que lo tienen. Las medidas profilácticas o preventivas se refieren a medidas que previenen el desarrollo de una afección o un trastorno patológico al que se dirigen las medidas (“tratamiento profiláctico”). Por lo tanto, aquellos que necesitan tratamiento profiláctico incluyen aquellos que son propensos a tener el trastorno y aquellos en quienes se ha de prevenir el trastorno.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0056] La presente divulgación proporciona conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) que comprenden un agonista del receptor de glucocorticoides ligado a un anticuerpo anti-CD40.

[0057] En las enfermedades inflamatorias intestinales, tales como la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa, la pérdida de integridad de la barrera intestinal permite que las bacterias comensales invadan la mucosa intestinal. La correspondiente respuesta inmunitaria del huésped da como resultado una inflamación exacerbada. La activación microbiana de las células inmunitarias puede ocurrir independientemente de la señalización de CD40 y, por lo tanto, no se vería afectada por el tratamiento con un antagonista anti-CD40, tal como Ab-102, lo que limita su eficacia. Sin embargo, un agonista del receptor de glucocorticoides ligado al anticuerpo anti-CD40 no solo bloquearía la activación mediada por CD40 sino que, tras la internalización y liberación de su carga útil de agonista del receptor de glucocorticoides, también inhibiría la señalización inflamatoria de moléculas derivadas de microbios a través de receptores tipo Toll (TLR). Este mecanismo dual exhibiría una respuesta inhibitoria máxima hacia las células inflamatorias activadas, lo que da como resultado una mayor eficacia en comparación con un antagonista anti-CD40 solo.

[0058] Los datos del Ejemplo C, y como se proporcionan en la Figura 2 y la Tabla 18, confirman esta hipótesis. Las células dendríticas derivadas de monocitos semiadherentes (derivadas de células mononucleares de sangre periférica humanas primarias) se preestimularon con lipopolisacárido (LPS) para inducir una regulación ascendente de la expresión de CD40 en la superficie celular. Después del lavado y el

pretratamiento con anticuerpo anti-CD40 solo (Control 1) en comparación con una selección de ADC anti-CD40 humana, las células se activaron con LPS y/o CD40L y se cuantificó la secreción de la citocina proinflamatoria IL-6. Los datos demuestran que mientras que el anticuerpo anti-CD40 solo (Control 1) inhibe parcialmente la señalización inflamatoria, los ADC anti-CD40 humana evaluados suprimen por completo la señalización independiente de CD40 inflamatoria adicional (es decir, hasta un nivel anterior a la preestimulación con LPS (línea punteada)).

I. Anticuerpo anti-CD40

[0059] Las expresiones “anticuerpo anti-CD40” y “porción de fijación al antígeno anti-CD40” se refieren a un anticuerpo de longitud completa y una porción de fijación al antígeno, respectivamente, que son antagonistas de CD40 humana. La secuencia de aminoácidos de longitud completa para CD40 humana se proporciona en la Tabla 1, SEQ ID NO: 1. El dominio extracelular de CD40 humana contiene aminoácidos y se proporciona en la Tabla 1, SEQ ID NO: 2.

[0060] En una forma de realización, el anticuerpo, o la porción de fijación al antígeno de este, es un anticuerpo antagonista, o una porción de fijación al antígeno de este, que causa una disminución en la actividad o función de CD40 en comparación con la actividad o función de CD40 en ausencia del anticuerpo, o la porción de fijación al antígeno de este. En formas de realización particulares, el anticuerpo, o la porción de fijación al antígeno de este, está sustancialmente libre de actividad agonista, es decir, el anticuerpo, o la porción de fijación al antígeno de este, no causa un aumento en la magnitud de la actividad o función de CD40 en comparación con la actividad o función de CD40 en ausencia del anticuerpo, o la porción de fijación al antígeno de este. En ciertas formas de realización, el anticuerpo anti-CD40 es un anticuerpo policlonal, anticuerpo monoclonal, anticuerpo quimérico, anticuerpo humanizado, anticuerpo humano o una porción de fijación al antígeno de este.

[0061] En ciertas formas de realización, el anticuerpo anti-CD40 es lucatumumab (Novartis; como se describe en la patente estadounidense N.º 8277810); anticuerpos 5D12, 3A8 y 3C6, o versiones humanizadas de estos (Novartis; como se describe en la patente estadounidense N.º 5874082); anticuerpo 15B8 (Novartis; como se describe en la patente estadounidense N.º 7445780); anticuerpo 4D11 (Kyowa Hakko Kirin; como se describe en la patente estadounidense N.º 7193064); temeliximab (Bristol Myers Squibb; como se describe en la patente estadounidense N.º 6051228); anticuerpo PG102 (PanGenetics; como se describe en la patente estadounidense N.º 8669352); anticuerpo 2C10 (Primatepe; publicación de solicitud de patente

estadounidense N.º 20140093497); anticuerpos anti-CD40 descritos en las patentes estadounidenses N.º 8591900 y 8778345 (Boehringer Ingelheim); anticuerpos anti-CD40 descritos en la patente estadounidense N.º 5801227 (Amgen); o APX005 (Boehringer Ingelheim; como se describe en la publicación de solicitud de patente estadounidense N.º 20120301488).

[0062] En ciertas formas de realización, el anticuerpo anti-CD40 comprende regiones determinantes de la complementariedad (CDR) establecidas como SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, y SEQ ID NO: 12.

[0063] En ciertas formas de realización, el anticuerpo anti-CD40 comprende una región variable de la cadena pesada establecida como SEQ ID NO: 5. En ciertas formas de realización, el anticuerpo anti-CD40 comprende una región variable de la cadena liviana establecida como SEQ ID NO: 6. En ciertas formas de realización, el anticuerpo anti-CD40 comprende una región variable de la cadena pesada establecida como SEQ ID NO: 5 y una región variable de la cadena liviana establecida como SEQ ID NO: 6.

[0064] En ciertas formas de realización, el anticuerpo anti-CD40 comprende una cadena pesada establecida como SEQ ID NO: 3. En ciertas formas de realización, el anticuerpo anti-CD40 comprende una cadena liviana establecida como SEQ ID NO: 4. En ciertas formas de realización, el anticuerpo anti-CD40 es el anticuerpo de longitud completa, Ab102, descrito en la publicación estadounidense N.º 2016/0347850 y que comprende una cadena pesada establecida como SEQ ID NO: 3 y una cadena liviana establecida como SEQ ID NO: 4 (regiones CDR en negrita; regiones constantes subrayadas).

Tabla 3: secuencia de anticuerpo anti-CD40 (Ab102)	
Región de anticuerpo	Secuencia de aminoácidos
Ab102-HC humano (Cadena pesada)	EVQLVESGGGLV ~~PK~~ PGGSLRLS ~~CAAS~~ GFTFSDYGMN WVRQAPGK ~~GLEW~~ IA Y ISSGRGNIYYADTVKGR FTISRDN ~~AKNSLYLQMNSL~~ RAEDTAVYYCARS SWG YFDV WGQGT ~~TVTVSS~~ ASTK ~~GPSVFPLAPSSK~~ STSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV ~~TV~~ PSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDQLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKL TVDKSRWQOQGNVFSCSVLHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 3)
Ab102-LC humano (Cadena liviana)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCK KSSQSL LN RGNQK NYLTWFQKPGQPPK LLIY WASTRES GV ~~PDRFSGSGSGTDFTLT~~ ISSLQAEDVAVYYC QNDYTYPLT FGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN ~~NFY~~ PREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDS ~~TYLSSTLT~~ LSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 4)
Región variable de la cadena pesada	EVQLVESGGGLV ~~PK~~ PGGSLRLS ~~CAAS~~ GFTFSDYGMN WVRQAPGK ~~GLEW~~ IA Y ISSGRGNIYYADTVKGR FTISRDN ~~AKNSLYLQMNSL~~ RAEDTAVYYCARS SWG YFDV WGQGT ~~TVTVSS~~ (SEQ ID NO: 5)
Región variable de la cadena liviana	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCK KSSQSL LN RGNQK NYLTWFQKPGQPPK LLIY WASTRES GV ~~PDRFSGSGSGTDFTLT~~ ISSLQAEDVAVYYC QNDYTYPLT FGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 6)
VH-CDR1	GFTFSDYGMN (SEQ ID NO: 7)
VH-CDR2	YISSGRGNIYYADTVKG (SEQ ID NO: 8)
VH-CDR3	SWG ~~YFDV~~ (SEQ ID NO: 9)
VL-CDR1	KSSQSLN RGNQK NYLT (SEQ ID NO: 10)
VL-CDR2	WASTRES (SEQ ID NO: 11)
VL-CDR3	QNDYTYPLT (SEQ ID NO: 12)

[0065] Se observará que el anticuerpo anti-CD40 puede proporcionarse mediante la sustitución o eliminación parcial de algunos aminoácidos o de incluso uno solo. Por ejemplo, la mutación de un solo aminoácido en áreas seleccionadas del dominio CH2 puede ser suficiente para reducir sustancialmente la fijación de Fc. De manera similar, puede ser deseable simplemente eliminar esa parte de uno o más dominios de la región constante que controlan la función efectora (por ejemplo, la fijación del complemento C1q) a modular. Tales eliminaciones parciales de las regiones constantes pueden mejorar las características seleccionadas del anticuerpo (semivida en suero) mientras dejan intactas otras funciones deseables asociadas con el dominio de la región constante del sujeto. Además, las regiones constantes de los anticuerpos divulgados pueden modificarse a través de la mutación o sustitución de uno o más aminoácidos que mejora el perfil del constructo resultante. En este sentido, puede ser posible interrumpir la actividad proporcionada por un sitio de fijación conservado (por ejemplo, fijación de Fc) mientras se mantiene sustancialmente la configuración y el perfil inmunogénico de los anticuerpos. Ciertas formas de realización pueden

comprender la adición de uno o más aminoácidos a la región constante para mejorar las características deseables, tal como disminuir o aumentar la función efectora o proporcionar más unión al agonista del receptor de glucocorticoides. En tales formas de realización, puede ser deseable insertar o replicar secuencias específicas derivadas de dominios seleccionados de la región constante.

[0066] La presente divulgación abarca además variantes y equivalentes que son sustancialmente homólogos al anticuerpo anti-CD40 establecido en la presente. Estos pueden contener, por ejemplo, mutaciones de sustitución conservadora, es decir, la sustitución de uno o más aminoácidos con aminoácidos similares. Por ejemplo, sustitución conservadora se refiere a la sustitución de un aminoácido con otro dentro de la misma clase general, tal como, por ejemplo, un aminoácido ácido con otro aminoácido ácido, un aminoácido básico con otro aminoácido básico o un aminoácido neutro con otro aminoácido neutro. En la técnica se sabe lo que se pretende decir con sustitución conservadora de aminoácidos.

[0067] El anticuerpo anti-CD40 puede ser polipéptidos recombinantes, polipéptidos naturales o polipéptidos sintéticos de un anticuerpo. Se reconocerá en la técnica que algunas secuencias de aminoácidos de la divulgación pueden variarse sin efecto significativo sobre la estructura o la función de la proteína. Por lo tanto, la divulgación incluye además variaciones de los polipéptidos que muestran actividad sustancial o que incluyen regiones de un anticuerpo. Tales mutantes incluyen eliminaciones, inserciones, inversiones, repeticiones y sustituciones de tipo.

[0068] Los anticuerpos anti-CD40 descritos en la presente pueden producirse mediante cualquier método conocido en la técnica adecuado. Tales métodos van desde métodos de síntesis de proteínas directos hasta la construcción de una secuencia de ADN que codifica secuencias de polipéptidos aisladas y que expresa esas secuencias en un huésped transformado adecuado. En algunas formas de realización, se construye una secuencia de ADN con tecnología recombinante al aislar o sintetizar una secuencia de ADN que codifica una proteína de tipo silvestre de interés. Opcionalmente, la secuencia puede mutagenizarse mediante mutagénesis específica de sitio para proporcionar análogos funcionales de aquella. Ver, por ejemplo, Zoeller *et al.*, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 81:5662-5066 (1984) y la patente estadounidense N.º 4.588.585.

[0069] En algunas formas de realización, una secuencia de ADN que codifica un anticuerpo anti-CD40 se construiría mediante síntesis química con un sintetizador de oligonucleótidos. Tales oligonucleótidos pueden diseñarse en función de la secuencia

de aminoácidos del polipéptido deseado y al seleccionar aquellos codones que están favorecidos en la célula huésped en la que se producirá el polipéptido recombinante de interés. Se pueden aplicar métodos estándar para sintetizar una secuencia de polinucleótidos aislada que codifica un polipéptido de interés aislado.

[0070] En ciertas formas de realización, se usan vectores de expresión recombinantes para amplificar y expresar ADN que codifica anticuerpos anti-CD40. Se puede emplear una amplia variedad de combinaciones de huésped/vector de expresión. Los vectores de expresión útiles para huéspedes eucariotas incluyen, por ejemplo, vectores que comprenden secuencias de control de expresión de SV40, virus del papiloma bovino, adenovirus y citomegalovirus. Los vectores de expresión útiles para huéspedes bacterianos incluyen plásmidos bacterianos conocidos, tales como plásmidos de *Escherichia coli*, que incluyen pCR 1, pBR322, pMB9 y sus derivados, plásmidos de rango de huésped más amplio, tales como M13 y fagos de ADN monocatenario filamentosos.

[0071] Las células huésped adecuadas para la expresión de anticuerpos anti-CD40 incluyen células procariotas, levaduras, células de insectos o células eucariotas superiores bajo el control de promotores adecuados. Las células procariotas incluyen organismos gram negativos o gram positivos, por ejemplo, *E. coli* o bacilos. Las células eucariotas superiores incluyen líneas celulares establecidas de origen mamífero. También se podrían emplear sistemas de traducción libres de células. En Pouwels *et al.* (Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, N.Y., 1985) se describen vectores de clonación y expresión adecuados para su uso con huéspedes celulares bacterianos, fúngicos, de levadura y de mamíferos. Se puede encontrar información adicional sobre los métodos de producción de proteínas, que incluye la producción de anticuerpos, en, por ejemplo, la publicación de patente estadounidense N.º 2008/0187954, las patentes estadounidenses N.º 6.413.746 y 6.660.501, y la publicación de patente internacional N.º WO 04009823.

[0072] Diversos sistemas de cultivo de células de mamíferos o insectos también se usan ventajosamente para expresar una proteína recombinante. La expresión de proteínas recombinantes en células de mamífero puede realizarse porque tales proteínas generalmente están plegadas de manera correcta, están modificadas de manera adecuada y son completamente funcionales. Los ejemplos de líneas de células huésped de mamífero adecuadas incluyen HEK-293 y HEK-293T, las líneas COS-7 de células de riñón de mono, descritas por Gluzman (Cell 23:175, 1981), y otras líneas celulares que incluyen, por ejemplo, las líneas celulares de linfocitos I,

C127, 3T3, ovario de hámster chino (CHO), HeLa y BHK. Los vectores de expresión en mamíferos pueden comprender elementos no transcritos, tales como un origen de replicación, un promotor y potenciador adecuados ligados al gen que se va a expresar, y otras secuencias no transcritas flanqueantes 5' o 3', y secuencias no traducidas 5' o 3', tales como sitios de fijación a ribosomas, un sitio de poliadenilación, sitios donantes y aceptores de empalmes, y secuencias de terminación de la transcripción que sean necesarios. En Luckow y Summers, Bio/Technology 6:47 (1988) se puede encontrar una reseña de sistemas de baculovirus para la producción de proteínas heterólogas en células de insectos.

[0073] Las proteínas producidas por un huésped transformado pueden purificarse de acuerdo con cualquier método adecuado. Tales métodos estándar incluyen cromatografía (por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, en columna de tamaño y de afinidad), centrifugación, solubilidad diferencial, o cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas. Se pueden unir etiquetas de afinidad, tales como hexahistidina, dominio de fijación a la maltosa, secuencia de la cápside de influenza y glutatión-S-transferasa, a la proteína para permitir una fácil purificación mediante el paso por una columna de afinidad adecuada. Las proteínas aisladas también pueden caracterizarse físicamente con técnicas tales como proteólisis, resonancia magnética nuclear y cristalografía de rayos X.

[0074] La proteína recombinante producida en cultivo bacteriano puede aislarse, por ejemplo, mediante la extracción inicial de pélets celulares, seguida de una o más etapas de concentración, remoción de sales, cromatografía de intercambio iónico acuoso o cromatografía de exclusión por tamaño. Se puede emplear cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) para las etapas finales de purificación. Las células microbianas empleadas en la expresión de una proteína recombinante pueden alterarse mediante cualquier método conveniente, que incluye un ciclo de congelación-descongelación, ultrasonido, alteración mecánica o el uso de agentes de lisis celular.

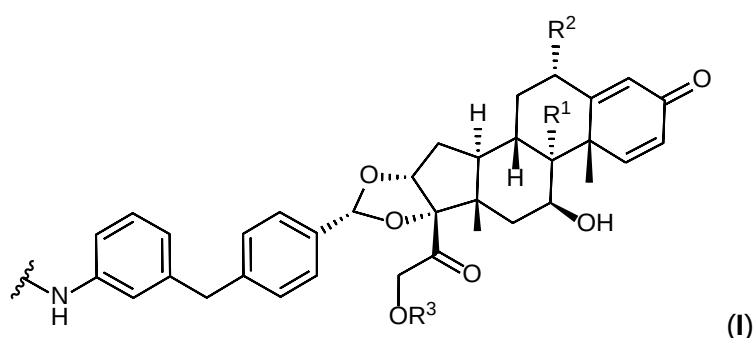
[0075] Los métodos para purificar anticuerpos incluyen, por ejemplo, los descritos en las publicaciones de patentes estadounidenses N.º 2008/0312425, 2008/0177048 y 2009/0187005.

II. Anticuerpo anti-CD40 ligado a un agonista del receptor de glucocorticoides

[0076] En la presente se proporcionan conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) que comprenden un agonista del receptor de glucocorticoides ligado a un anticuerpo anti-CD40. En algunas formas de realización, el ADC se fija al receptor Fc gamma. En

algunas formas de realización, el ADC está activo en un ensayo indicador de células Jurkat. En algunas formas de realización, el ADC está activo en un ensayo indicador de CD40L. En algunas formas de realización, el ADC muestra inmunogenicidad reducida (respuesta inmunitaria antifármaco (ADA) reducida) en comparación con el anticuerpo anti-CD40 solo.

[0077] En una forma de realización, se proporciona un conjugado anticuerpo-fármaco que comprende: (a) un anticuerpo anti-CD40; y (b) un radical de un agonista del receptor de glucocorticoides de la Fórmula (I):



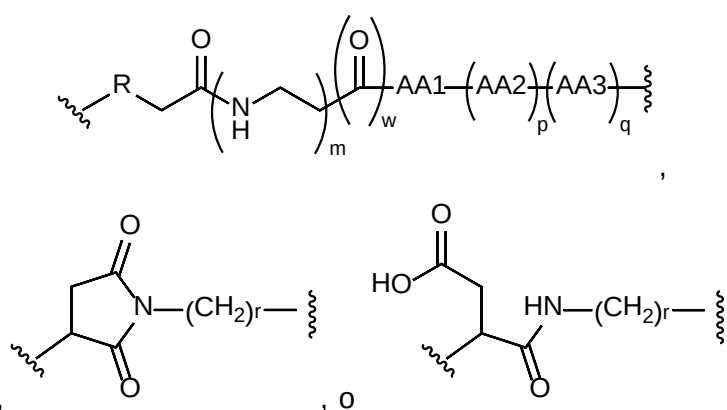
en donde:

R¹ es hidrógeno o fluoro;

R² es hidrógeno o fluoro; y

R³ es hidrógeno o -P(=O)(OH)₂; y

además, en donde el anticuerpo está conjugado con el agonista del receptor de glucocorticoides mediante un ligador de la fórmula:



R es un enlace,

, o

en donde r es

0 o 1;

AA1, AA2 y AA3 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en alanina (Ala), glicina (Gly), isoleucina (Ile), leucina (Leu), prolina (Pro), valina (Val), fenilalanina (Phe), triptófano (Trp), tirosina (Tyr), ácido aspártico (Asp), ácido glutámico (Glu), arginina (Arg), histidina (His), lisina (Lys), serina (Ser), treonina (Thr), cisteína (Cys), metionina (Met), asparagina (Asn) y glutamina (Gln);

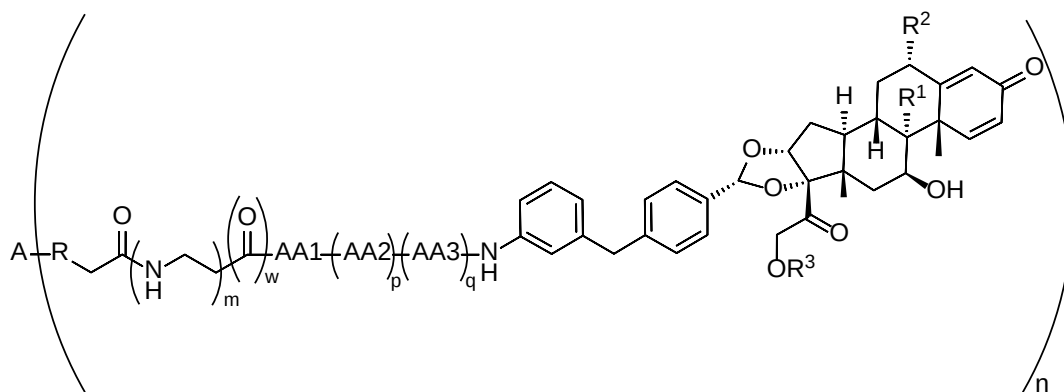
m es 0 o 1;

w es 0 o 1;

p es 0 o 1; y

q es 0 o 1.

[0078] En otra forma de realización, se proporciona un conjugado anticuerpo-fármaco de la Fórmula (II):



(II)

en donde:

A es un anticuerpo anti-CD40; y

n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10.

[0079] En ciertas formas de realización, el anticuerpo anti-CD40 comprende regiones determinantes de la complementariedad (CDR) establecidas como SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, y SEQ ID NO: 12. En ciertas formas de realización, el anticuerpo anti-CD40 comprende una región variable de la cadena pesada establecida como SEQ ID NO: 5 y una región variable de la cadena liviana establecida como SEQ ID NO: 6. En ciertas formas de realización, el anticuerpo anti-CD40 comprende una cadena pesada establecida como SEQ ID NO: 3 y una cadena liviana establecida como SEQ ID NO: 4.

[0080] El anticuerpo puede estar ligado a la variable R mediante cualquier porción en el anticuerpo que tenga un grupo nucleófilo, por ejemplo, tal como un grupo OH (para proporcionar un grupo -O-, cuando está ligado), un grupo -SH (para proporcionar un grupo -S-, cuando está ligado), o un grupo -NH₂ (para proporcionar un grupo -NH-, cuando está ligado). En ciertas formas de realización, el punto de unión del anticuerpo a la variable R es a través de un grupo SH de un residuo de cisteína del anticuerpo (para proporcionar un grupo -S-, cuando está ligado).

[0081] En ciertas formas de realización, R¹ es hidrógeno y R² es hidrógeno.

[0082] En ciertas formas de realización, R¹ es fluoro y R² es hidrógeno.

[0083] En ciertas formas de realización, R^1 es fluoro y R^2 es fluoro.

[0084] En ciertas formas de realización, R^3 es hidrógeno.

[0085] En ciertas formas de realización, R^3 es $-P(=O)(OH)_2$.

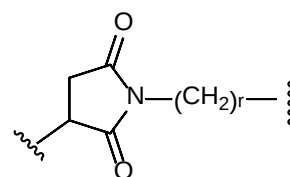
[0086] En ciertas formas de realización preferidas, al menos uno de R^1 y R^2 es fluoro y R^3 es $-P(=O)(OH)_2$.

[0087] En ciertas formas de realización, $-AA1-(AA2)_p-(AA3)_q-$ se selecciona del grupo que consiste en:

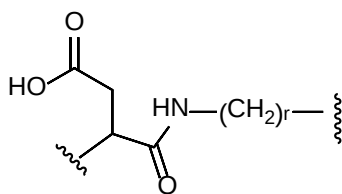
$-Gly-Glu-$; $-Ala-Ala-$; $-Glu-Ala-Ala-$; $-Gly-Lys-$; $-Glu-$; $-Glu-Ser-Lys-$; y $-Gly-Ser-Lys-$. Debe entenderse que este listado de aminoácidos debe leerse de izquierda a derecha, en donde el aminoácido más a la izquierda corresponde a AA1, y el aminoácido más a la derecha corresponde a AA2 (cuando q es 0) o AA3 (cuando q es 1).

[0088] En ciertas formas de realización preferidas, la porción ligadora comprende 1, 2 o 3 aminoácidos hidrófilos $-AA1-(AA2)_p-(AA3)_q-$, por ejemplo, en donde la cadena lateral de AA1, AA2 y/o AA3 comprende un grupo puente de hidrógeno tal como $=O$ y/o un grupo donador de hidrógeno tal como $-OH$, $-NH_2$ o $-SH$. El aumento de la hidrofiliidad del ligador puede conducir a la estabilidad y el almacenamiento a largo plazo del ADC. Por ejemplo, en ciertas formas de realización preferidas, $-AA1-(AA2)_p-(AA3)_q-$ se selecciona del grupo que consiste en $-Gly-Glu-$; $-Gly-Lys-$; $-Glu-Ser-Lys-$; y $-Gly-Ser-Lys-$.

[0089] En ciertas formas de realización, en donde m es 0, entonces w es 0. En ciertas formas de realización, en donde m es 1, entonces w es 1.

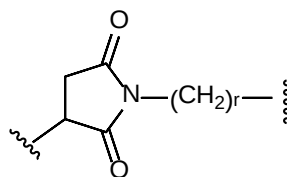


[0090] En ciertas formas de realización, m es 0; q es 0; y R es

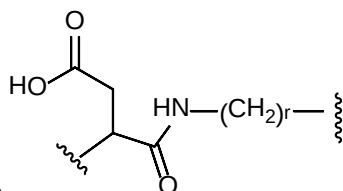


o , en donde r es 0 o 1. En ciertas formas de realización, w es 0. En ciertas formas de realización, r es 0. En ciertas formas de realización, r es 1.

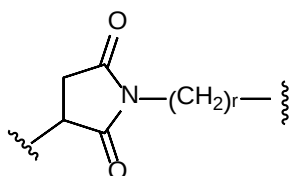
[0091] En ciertas formas de realización preferidas, R es un enlace. Los ADC que



comprenden un grupo R de la fórmula  pueden ser inestables *in vivo*. Los ADC que comprenden un grupo R de anillo abierto de la



fórmula  pueden cerrar su anillo a un grupo de la fórmula



tras un almacenamiento prolongado en excipientes líquidos.

Además, preparar el ADC de anillo abierto a partir del ADC de anillo cerrado puede requerir condiciones básicas de pH durante un período prolongado de tiempo, lo que puede conducir a mayores tiempos de producción y mayores costos de fabricación, así como a una descomposición indeseable del ADC debido al alto pH.

[0092] En ciertas formas de realización, m es 0 o 1; p es 1; y R es un enlace. En ciertas formas de realización, w es 0. En ciertas formas de realización, q es 0. En ciertas formas de realización, q es 1.

[0093] En ciertas formas de realización, m es 1; y q es 0. En ciertas formas de realización, w es 1. En ciertas formas de realización, m es 1; y w es 1. En ciertas formas de realización, m es 1; w es 1; y q es 0.

[0094] En ciertas formas de realización, m es 0.

[0095] En ciertas formas de realización preferidas, p es 1. En ciertas formas de realización preferidas, p es 1 y m es 0. En ciertas formas de realización preferidas, p es 1, m es 0 y w es 0. En ciertas formas de realización preferidas, p es 1, m es 0, w es 0, q es 0 y R es un enlace. En ciertas formas de realización preferidas alternativas, p es 1, m es 0, w es 0, q es 1 y R es un enlace.

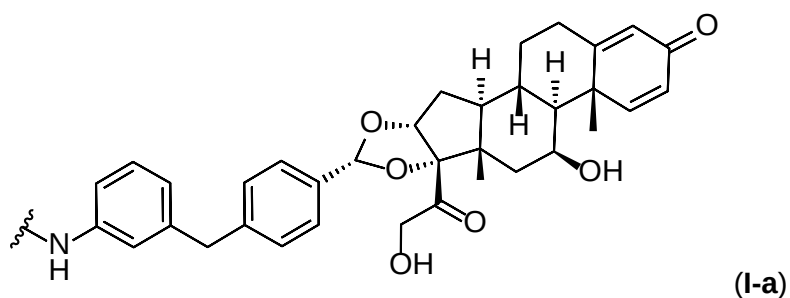
[0096] En ciertas formas de realización, el conjugado anticuerpo-fármaco que comprende un radical de la Fórmula (I), la carga de fármaco es de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. En ciertas formas de realización, la carga de fármaco es de 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8. En otra forma de realización, la carga de fármaco es de 1, 2, 3, 4 o 5. En otra forma de realización, la carga de fármaco es de 2, 3, 4 o 5. En otra forma de realización, la carga de fármaco es de 2, 4, 6 u 8. En otra forma de realización, la carga de fármaco

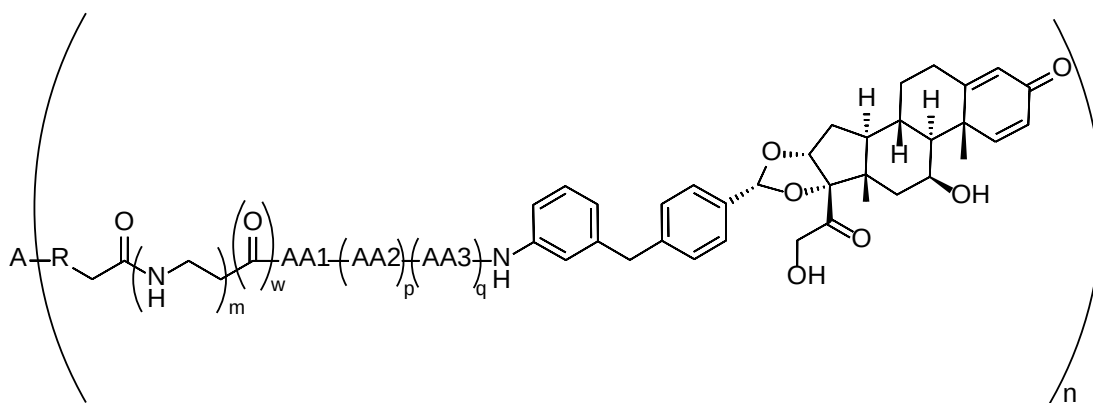
es de 1. En otra forma de realización, la carga de fármaco es de 2. En otra forma de realización, la carga de fármaco es de 3. En otra forma de realización, la carga de fármaco es de 4. En otra forma de realización, la carga de fármaco es de 5. En otra forma de realización, la carga de fármaco es de 6. En otra forma de realización, la carga de fármaco es de 7. En otra forma de realización, la carga de fármaco es de 8. En una forma de realización preferida, la carga de fármaco es de 2 o 4.

[0097] En ciertas formas de realización de la Fórmula (II), n es 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8. En ciertas formas de realización de la Fórmula (II), n es 1, 2, 3, 4 o 5. En ciertas formas de realización de la Fórmula (II), n es 2, 3, 4 o 5. En ciertas formas de realización de la Fórmula (II), n es 2, 4, 6 u 8. En ciertas formas de realización de la Fórmula (II), n es 1. En ciertas formas de realización de la Fórmula (II), n es 2. En ciertas formas de realización de la Fórmula (II), n es 3. En ciertas formas de realización de la Fórmula (II), n es 4. En ciertas formas de realización de la Fórmula (II), n es 5. En ciertas formas de realización de la Fórmula (II), n es 6. En ciertas formas de realización de la Fórmula (II), n es 7. En ciertas formas de realización de la Fórmula (II), n es 8. En una forma de realización preferida de la Fórmula (II), n es 2 o 4.

[0098] Diversas combinaciones de las formas de realización descritas anteriormente se contemplan adicionalmente en la presente.

[0099] Por ejemplo, en ciertas formas de realización, en donde R¹ es hidrógeno, R² es hidrógeno y R³ es hidrógeno, se proporciona un conjugado anticuerpo-fármaco que comprende un radical de la Fórmula (I-a), o un conjugado anticuerpo-fármaco de la Fórmula (II-a):





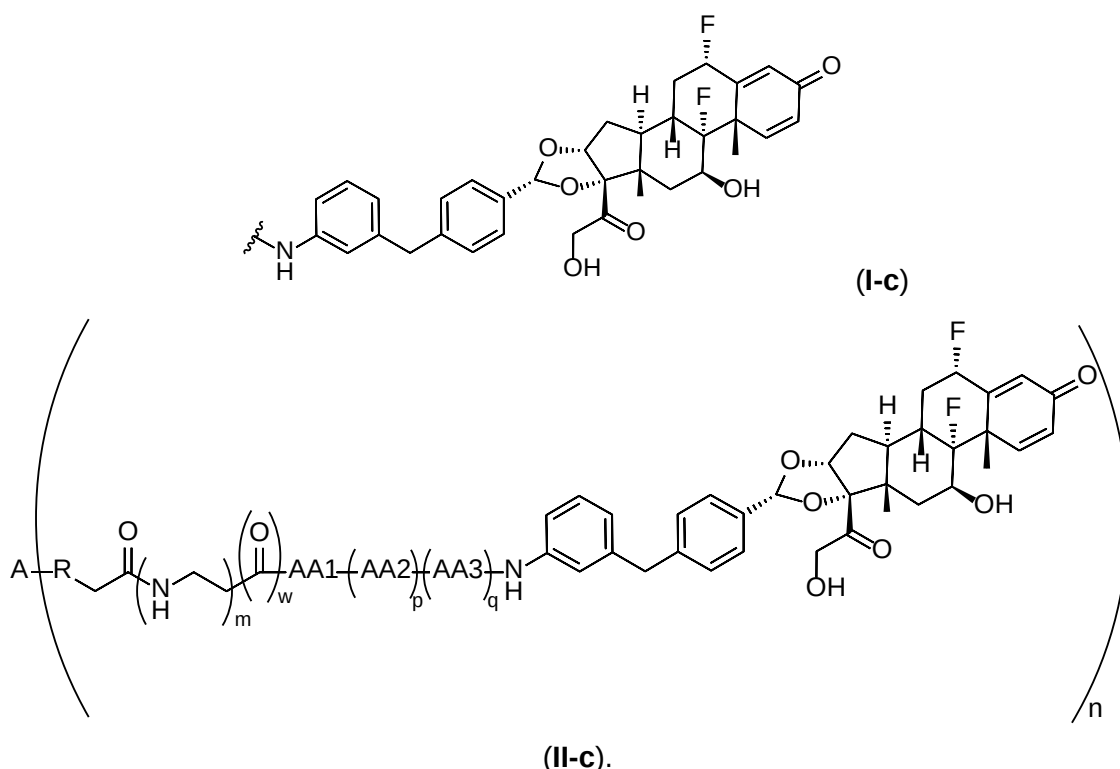
(II-a).

[00100] En ciertas formas de realización, R es un enlace. En ciertas formas de realización, R es un enlace, m es 1, p es 1 y q es 0. En ciertas formas de realización, R es un enlace, m es 1, p es 1, q es 0 y -AA1-(AA2)_p-(AA3)_q- se selecciona del grupo que consiste en: -Gly-Glu-; -Ala-Ala-; y -Gly-Lys-. En ciertas formas de realización, R es un enlace, m es 0, p es 1 y q es 0 o 1. En ciertas formas de realización, R es un enlace, m es 0, p es 1, q es 0 o 1, y -AA1-(AA2)_p-(AA3)_q- se selecciona del grupo que consiste en: -Gly-Glu-; -Ala-Ala-; -Glu-Ala-Ala-; -Gly-Lys-; -Glu-Ser-Lys-; y -Gly-Ser-Lys-. Sin embargo, en ciertas formas de realización, -Ala-Ala- y -Glu-Ala-Ala- están excluidos. En ciertas formas de realización, R es un enlace, m es 0, p es 1, q es 0 y -AA1-(AA2)_p-(AA3)_q- es -Gly-Glu- o -Gly-Lys-. En ciertas formas de realización, R es un enlace, m es 0, p es 1, q es 1 y -AA1-(AA2)_p-(AA3)_q- es -Glu-Ser-Lys-; y -Gly-Ser-Lys-. En ciertas formas de realización, en donde m es 0, entonces w es 0. En ciertas formas de realización, en donde m es 1, entonces w es 1. En ciertas formas de realización, el anticuerpo anti-CD40 comprende regiones determinantes de la complementariedad (CDR) establecidas como SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, y SEQ ID NO: 12. En ciertas formas de realización, el anticuerpo anti-CD40 comprende una región variable de la cadena pesada establecida como SEQ ID NO: 5 y una región variable de la cadena liviana establecida como SEQ ID NO: 6. En ciertas formas de realización, el anticuerpo anti-CD40 comprende una cadena pesada establecida como SEQ ID NO: 3 y una cadena liviana establecida como SEQ ID NO: 4. En ciertas formas de realización, n es 2. En ciertas formas de realización, n es 4.

[00101] En ciertas formas de realización, en donde R¹ es hidrógeno, R² es hidrógeno y R³ es -P(=O)(OH)₂, se proporciona un conjugado anticuerpo-fármaco que comprende un radical de la Fórmula (I-b), o un conjugado anticuerpo-fármaco de la Fórmula (II-b):

pesada establecida como SEQ ID NO: 5 y una región variable de la cadena liviana establecida como SEQ ID NO: 6. En ciertas formas de realización, el anticuerpo anti-CD40 comprende una cadena pesada establecida como SEQ ID NO: 3 y una cadena liviana establecida como SEQ ID NO: 4. En ciertas formas de realización, n es 2. En ciertas formas de realización, n es 4.

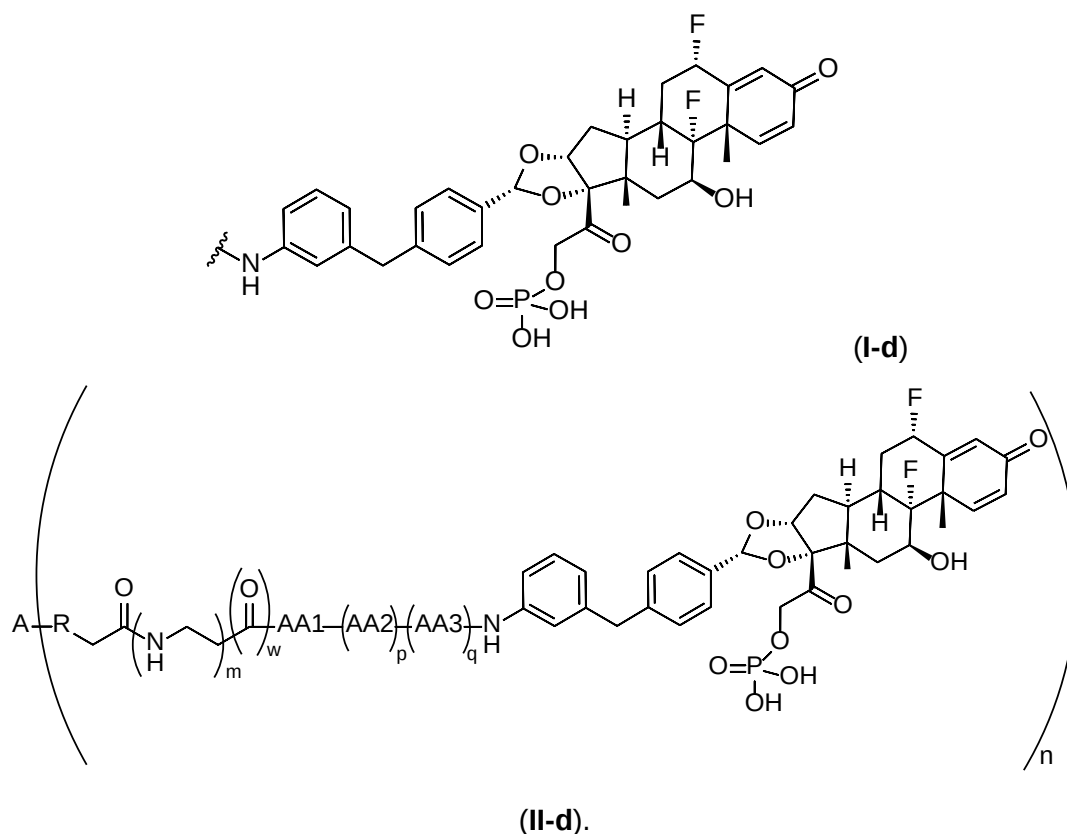
[00103] En ciertas formas de realización, en donde R¹ es fluoro, R² es fluoro y R³ es hidrógeno, se proporciona un conjugado anticuerpo-fármaco que comprende un radical de la Fórmula (I-c), o un conjugado anticuerpo-fármaco de la Fórmula (II-c):



[00104] En ciertas formas de realización, R es un enlace. En ciertas formas de realización, R es un enlace, m es 1, p es 1 y q es 0. En ciertas formas de realización, R es un enlace, m es 1, p es 1, q es 0 y -AA1-(AA2)_p-(AA3)_q- se selecciona del grupo que consiste en: -Gly-Glu-; -Ala-Ala-; y -Gly-Lys-. En ciertas formas de realización, R es un enlace, m es 0, p es 1 y q es 0 o 1. En ciertas formas de realización, R es un enlace, m es 0, p es 1, q es 0 o 1, y -AA1-(AA2)_p-(AA3)_q- se selecciona del grupo que consiste en: -Gly-Glu-; -Ala-Ala-; -Glu-Ala-Ala-; -Gly-Lys-; -Glu-Ser-Lys-; y -Gly-Ser-Lys-. Sin embargo, en ciertas formas de realización, -Ala-Ala- y -Glu-Ala-Ala- están excluidos. En ciertas formas de realización, R es un enlace, m es 0, p es 1, q es 0 y -AA1-(AA2)_p-(AA3)_q- es -Gly-Glu- o -Gly-Lys-. En ciertas formas de realización, R es un enlace, m es 0, p es 1, q es 1 y -AA1-(AA2)_p-(AA3)_q- es -Glu-Ser-Lys-; y -Gly-Ser-Lys-. En ciertas formas de realización, en donde m es 0, entonces w es 0.

En ciertas formas de realización, en donde m es 1, entonces w es 1. En ciertas formas de realización, el anticuerpo anti-CD40 comprende regiones determinantes de la complementariedad (CDR) establecidas como SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, y SEQ ID NO: 12. En ciertas formas de realización, el anticuerpo anti-CD40 comprende una región variable de la cadena pesada establecida como SEQ ID NO: 5 y una región variable de la cadena liviana establecida como SEQ ID NO: 6. En ciertas formas de realización, el anticuerpo anti-CD40 comprende una cadena pesada establecida como SEQ ID NO: 3 y una cadena liviana establecida como SEQ ID NO: 4. En ciertas formas de realización, n es 2. En ciertas formas de realización, n es 4.

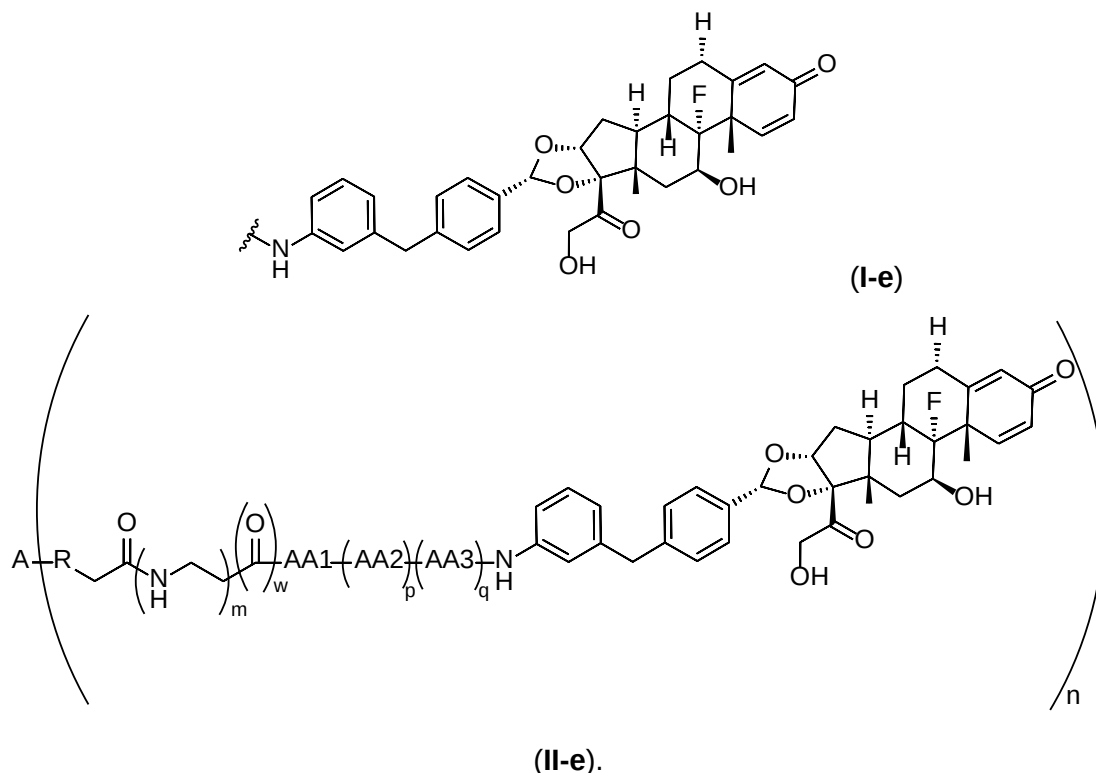
[00105] En ciertas formas de realización, en donde R¹ es fluoro, R² es fluoro y R³ es -P(=O)(OH)₂, se proporciona un conjugado anticuerpo-fármaco que comprende un radical de la Fórmula (I-d), o un conjugado anticuerpo-fármaco de la Fórmula (II-d):



[00106] En ciertas formas de realización, R es un enlace. En ciertas formas de realización, R es un enlace, m es 1, p es 1 y q es 0. En ciertas formas de realización, R es un enlace, m es 1, p es 1, q es 0 y -AA1-(AA2)_p-(AA3)_q- se selecciona del grupo que consiste en: -Gly-Glu-; -Ala-Ala-; y -Gly-Lys-. En ciertas formas de realización, R es un enlace, m es 0, p es 1 y q es 0 o 1. En ciertas formas de realización, R es un enlace, m es 0, p es 1, q es 0 o 1, y -AA1-(AA2)_p-(AA3)_q- se selecciona del grupo que

consiste en: –Gly–Glu–; –Ala–Ala–; –Glu–Ala–Ala–; –Gly–Lys–; –Glu–Ser–Lys–; y –Gly–Ser–Lys–. Sin embargo, en ciertas formas de realización, –Ala–Ala– y –Glu–Ala–Ala– están excluidos. En ciertas formas de realización, R es un enlace, m es 0, p es 1, q es 0 y –AA1–(AA2)_p–(AA3)_q– es –Gly–Glu– o –Gly–Lys–. En ciertas formas de realización, R es un enlace, m es 0, p es 1, q es 1 y –AA1–(AA2)_p–(AA3)_q– es –Glu–Ser–Lys–; y –Gly–Ser–Lys–. . En ciertas formas de realización, en donde m es 0, entonces w es 0. En ciertas formas de realización, en donde m es 1, entonces w es 1. En ciertas formas de realización, el anticuerpo anti-CD40 comprende regiones determinantes de la complementariedad (CDR) establecidas como SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, y SEQ ID NO: 12. En ciertas formas de realización, el anticuerpo anti-CD40 comprende una región variable de la cadena pesada establecida como SEQ ID NO: 5 y una región variable de la cadena liviana establecida como SEQ ID NO: 6. En ciertas formas de realización, el anticuerpo anti-CD40 comprende una cadena pesada establecida como SEQ ID NO: 3 y una cadena liviana establecida como SEQ ID NO: 4. En ciertas formas de realización, n es 2. En ciertas formas de realización, n es 4.

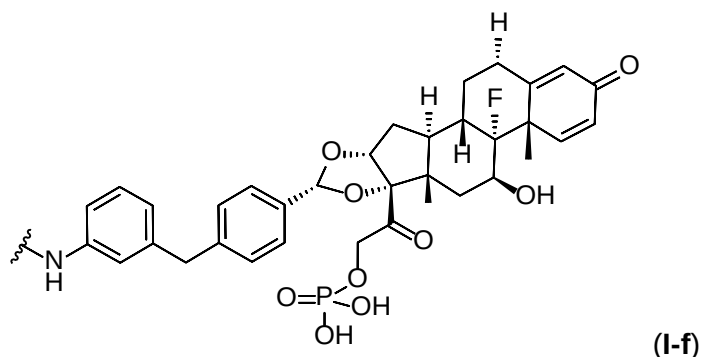
[00107] En ciertas formas de realización, en donde R¹ es fluoro, R² es hidrógeno y R³ es hidrógeno, se proporciona un conjugado anticuerpo-fármaco que comprende un radical de la Fórmula (I-e), o un conjugado anticuerpo-fármaco de la Fórmula (II-e):

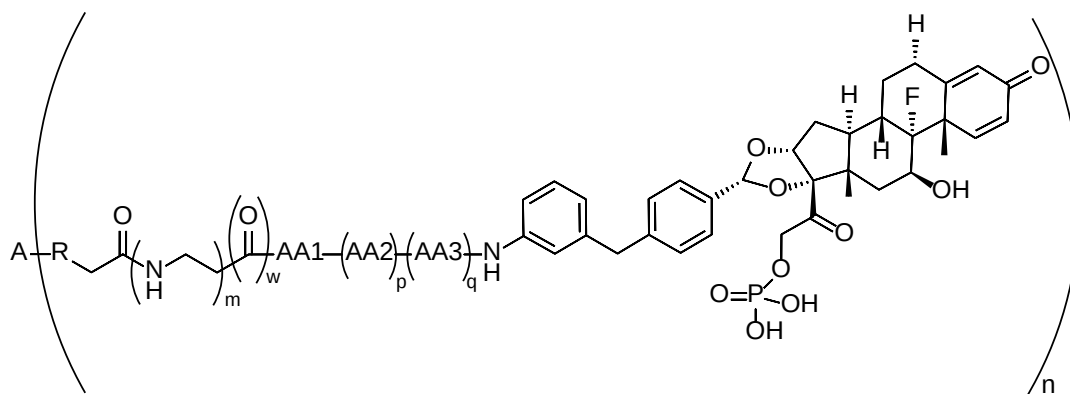


[00108] En ciertas formas de realización, R es un enlace. En ciertas formas de

realización, R es un enlace, m es 1, p es 1 y q es 0. En ciertas formas de realización, R es un enlace, m es 1, p es 1, q es 0 y -AA1-(AA2)_p-(AA3)_q- se selecciona del grupo que consiste en: -Gly-Glu-; -Ala-Ala-; y -Gly-Lys-. En ciertas formas de realización, R es un enlace, m es 0, p es 1 y q es 0 o 1. En ciertas formas de realización, R es un enlace, m es 0, p es 1, q es 0 o 1, y -AA1-(AA2)_p-(AA3)_q- se selecciona del grupo que consiste en: -Gly-Glu-; -Ala-Ala-; -Glu-Ala-Ala-; -Gly-Lys-; -Glu-Ser-Lys-; y -Gly-Ser-Lys-. Sin embargo, en ciertas formas de realización, -Ala-Ala- y -Glu-Ala-Ala- están excluidos. En ciertas formas de realización, R es un enlace, m es 0, p es 1, q es 0 y -AA1-(AA2)_p-(AA3)_q- es -Gly-Glu- o -Gly-Lys-. En ciertas formas de realización, R es un enlace, m es 0, p es 1, q es 1 y -AA1-(AA2)_p-(AA3)_q- es -Glu-Ser-Lys-; y -Gly-Ser-Lys-. En ciertas formas de realización, en donde m es 0, entonces w es 0. En ciertas formas de realización, en donde m es 1, entonces w es 1. En ciertas formas de realización, el anticuerpo anti-CD40 comprende regiones determinantes de la complementariedad (CDR) establecidas como SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, y SEQ ID NO: 12. En ciertas formas de realización, el anticuerpo anti-CD40 comprende una región variable de la cadena pesada establecida como SEQ ID NO: 5 y una región variable de la cadena liviana establecida como SEQ ID NO: 6. En ciertas formas de realización, el anticuerpo anti-CD40 comprende una cadena pesada establecida como SEQ ID NO: 3 y una cadena liviana establecida como SEQ ID NO: 4. En ciertas formas de realización, n es 2. En ciertas formas de realización, n es 4.

[00109] En ciertas formas de realización, en donde R¹ es fluoro, R² es hidrógeno y R³ es -P(=O)(OH)₂, se proporciona un conjugado anticuerpo-fármaco que comprende un radical de la Fórmula (I-f), o un conjugado anticuerpo-fármaco de la Fórmula (II-f):



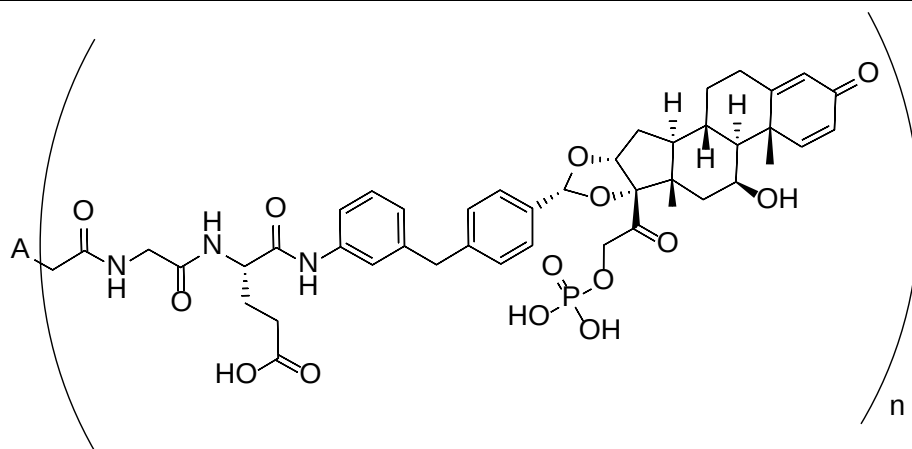


(II-f).

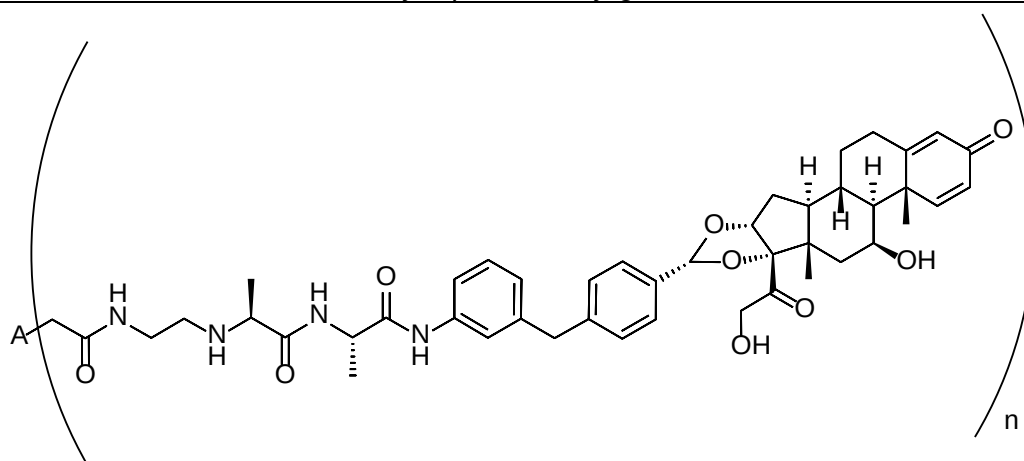
[00110] En ciertas formas de realización, R es un enlace. En ciertas formas de realización, R es un enlace, m es 1, p es 1 y q es 0. En ciertas formas de realización, R es un enlace, m es 1, p es 1, q es 0 y -AA1-(AA2)_p-(AA3)_q- se selecciona del grupo que consiste en: -Gly-Glu-; -Ala-Ala-; y -Gly-Lys-. En ciertas formas de realización, R es un enlace, m es 0, p es 1 y q es 0 o 1. En ciertas formas de realización, R es un enlace, m es 0, p es 1, q es 0 o 1, y -AA1-(AA2)_p-(AA3)_q- se selecciona del grupo que consiste en: -Gly-Glu-; -Ala-Ala-; -Glu-Ala-Ala-; -Gly-Lys-; -Glu-Ser-Lys-; y -Gly-Ser-Lys-. Sin embargo, en ciertas formas de realización, -Ala-Ala- y -Glu-Ala-Ala- están excluidos. En ciertas formas de realización, R es un enlace, m es 0, p es 1, q es 0 y -AA1-(AA2)_p-(AA3)_q- es -Gly-Glu- o -Gly-Lys-. En ciertas formas de realización, R es un enlace, m es 0, p es 1, q es 1 y -AA1-(AA2)_p-(AA3)_q- es -Glu-Ser-Lys-; y -Gly-Ser-Lys-. En ciertas formas de realización, en donde m es 0, entonces w es 0. En ciertas formas de realización, en donde m es 1, entonces w es 1. En ciertas formas de realización, el anticuerpo anti-CD40 comprende regiones determinantes de la complementariedad (CDR) establecidas como SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, y SEQ ID NO: 12. En ciertas formas de realización, el anticuerpo anti-CD40 comprende una región variable de la cadena pesada establecida como SEQ ID NO: 5 y una región variable de la cadena liviana establecida como SEQ ID NO: 6. En ciertas formas de realización, el anticuerpo anti-CD40 comprende una cadena pesada establecida como SEQ ID NO: 3 y una cadena liviana establecida como SEQ ID NO: 4. En ciertas formas de realización, n es 2. En ciertas formas de realización, n es 4.

[00111] Los conjugados anticuerpo-fármaco de ejemplo que comprenden un radical de la Fórmula (I), y los conjugados anticuerpo-fármaco de la Fórmula (II), incluyen conjugados anticuerpo-fármaco enumerados en las Tablas 5, 6A y 6B, en donde n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, y A es un anticuerpo anti-CD40.

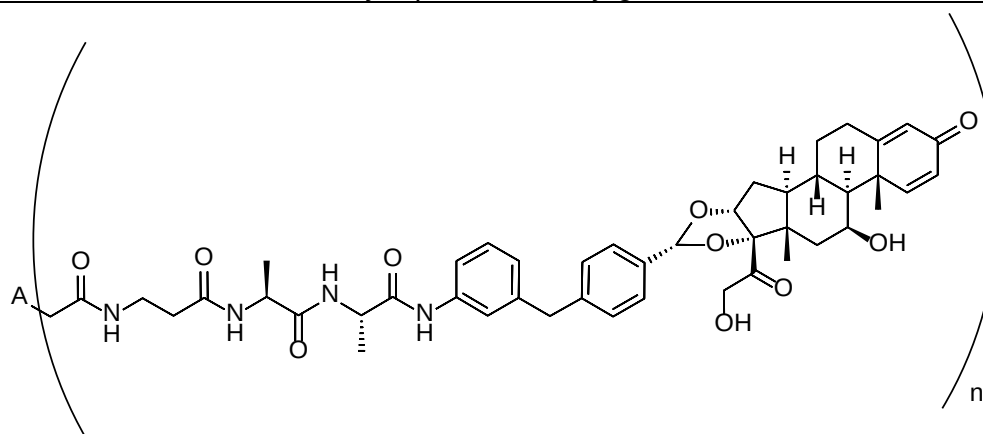
Tabla 5. ADC conjugado



Ejemplo 4 – conjugado

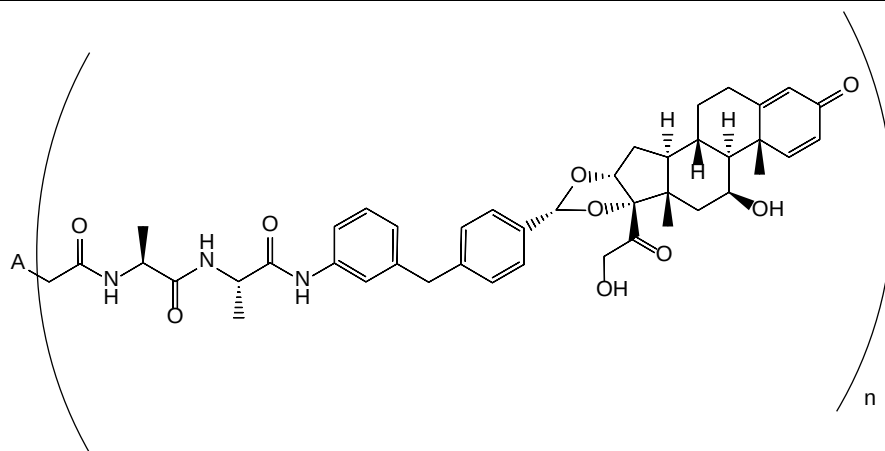


Ejemplo 14A – conjugado

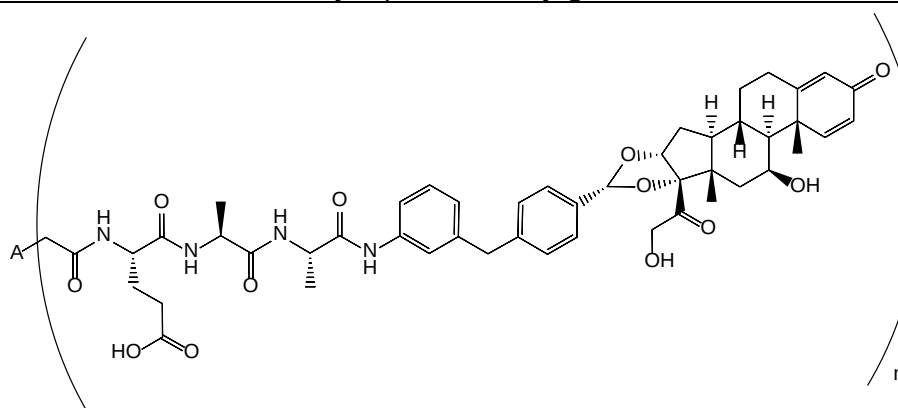


Ejemplo 14B – conjugado

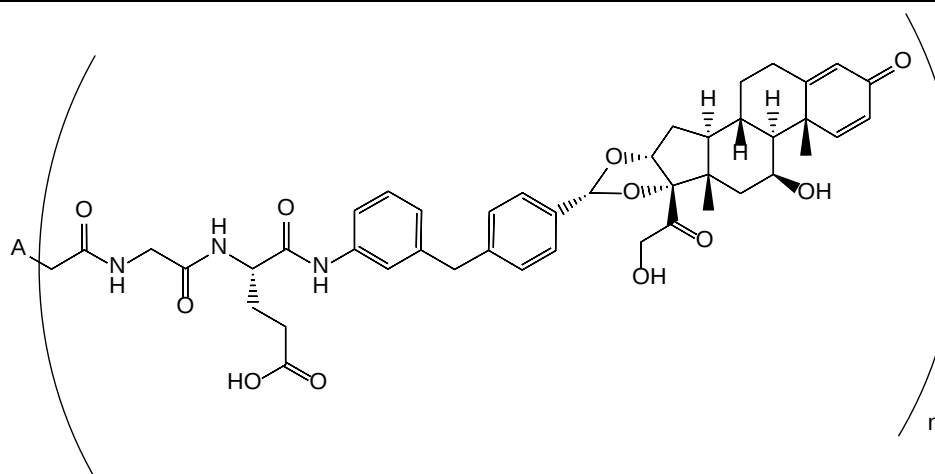
Tabla 5. ADC conjugado



Ejemplo 15 – conjugado

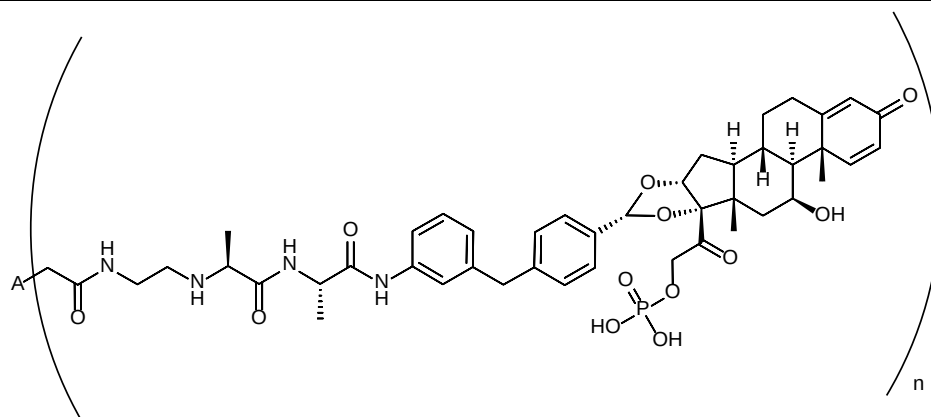


Ejemplo 16 – conjugado

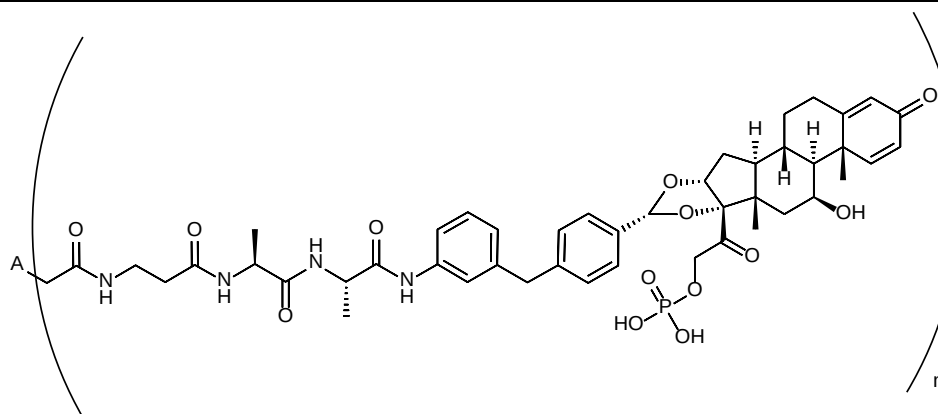


Ejemplo 17 – conjugado

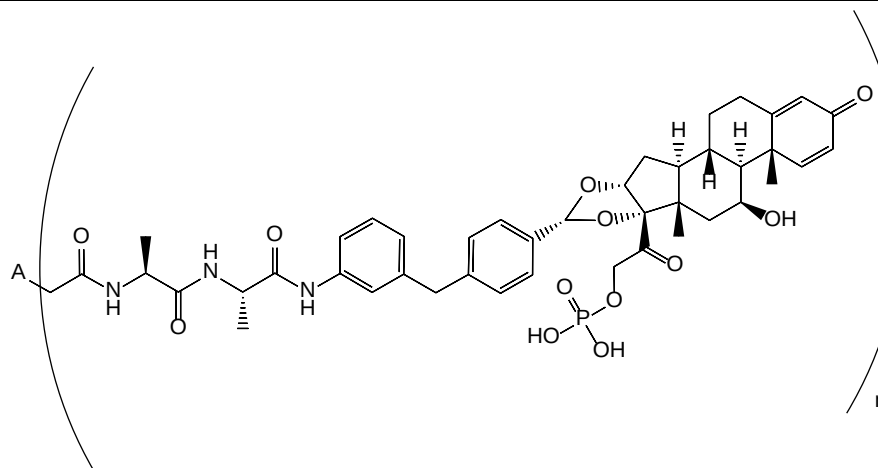
Tabla 5. ADC conjugado



Ejemplo 18A – conjugado

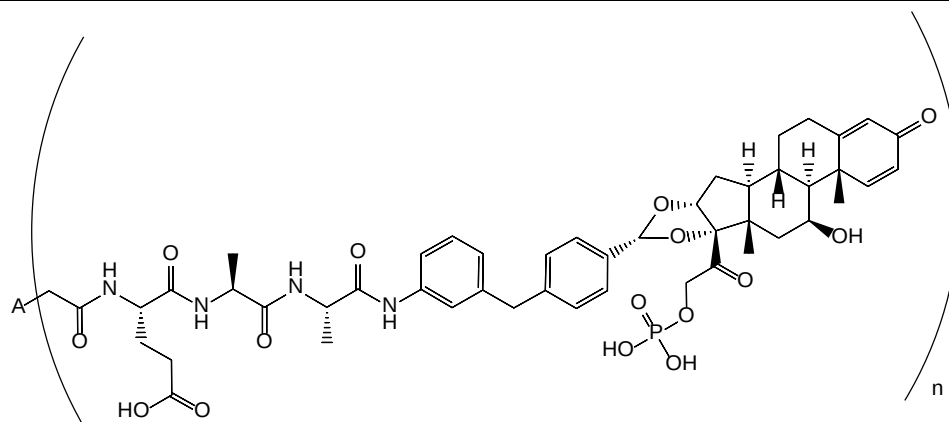


Ejemplo 18B – conjugado

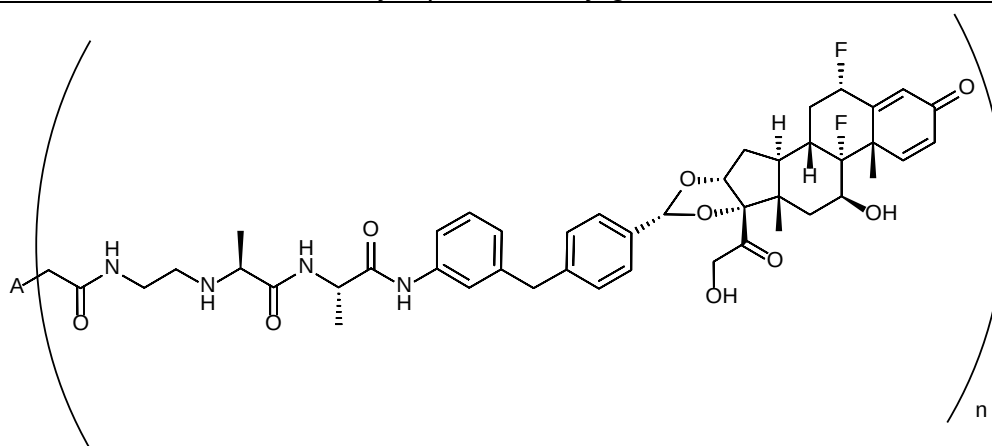


Ejemplo 19 – conjugado

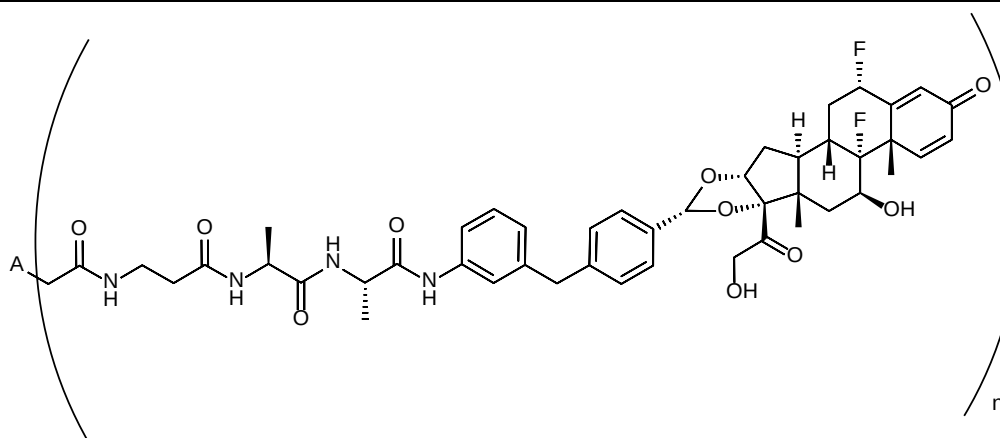
Tabla 5. ADC conjugado



Ejemplo 20 – conjugado

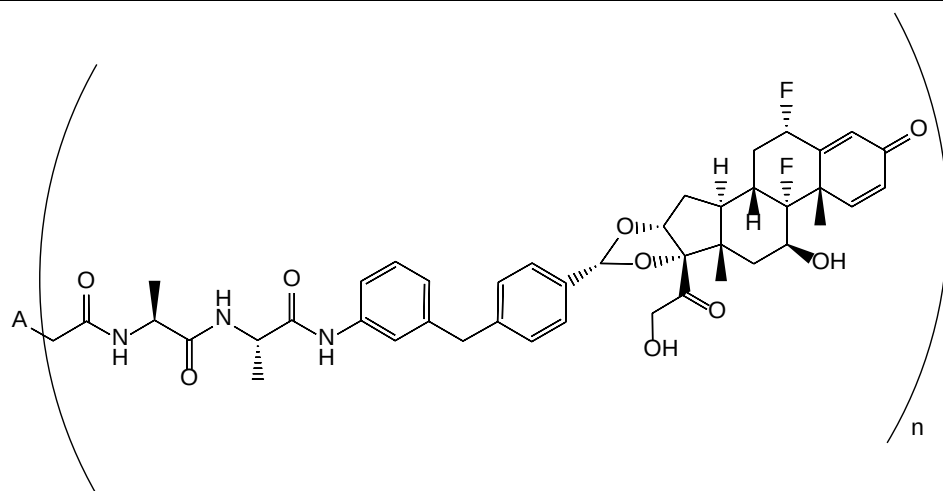


Ejemplo 21A – conjugado

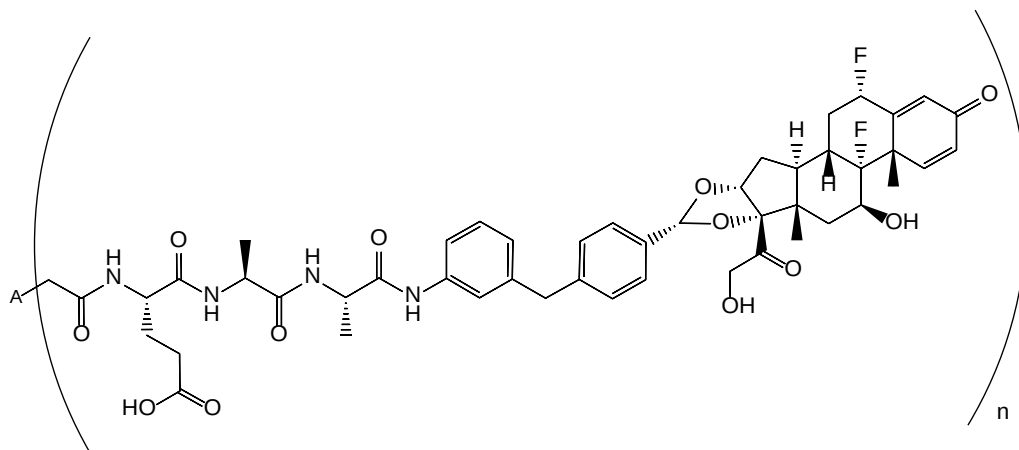


Ejemplo 21B – conjugado

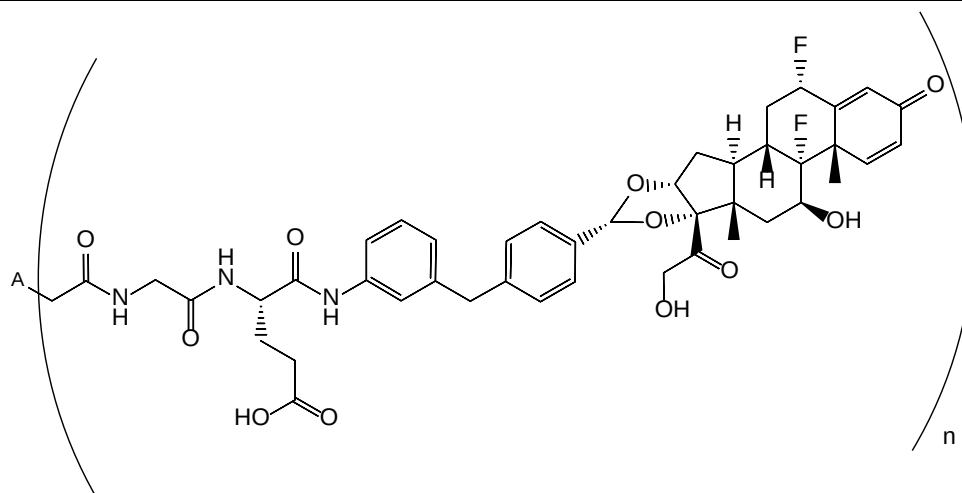
Tabla 5. ADC conjugado



Ejemplo 22 – conjugado

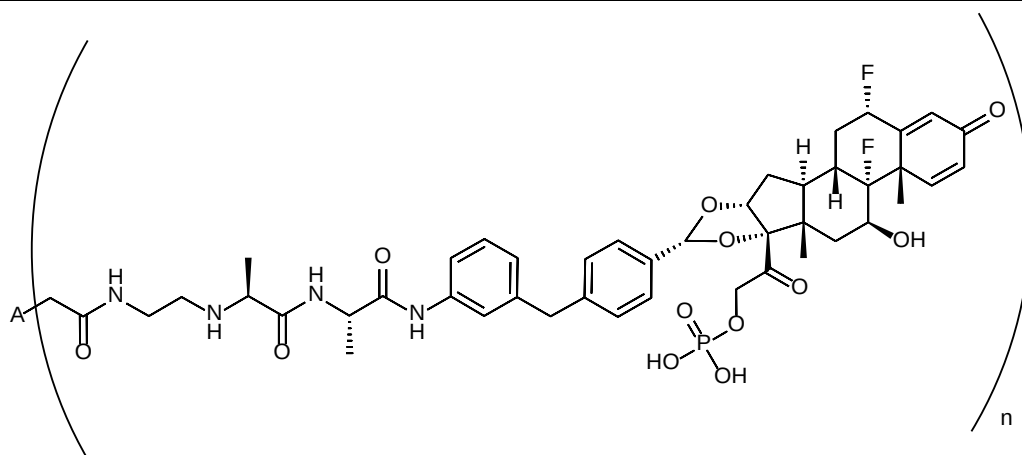


Ejemplo 23 – conjugado

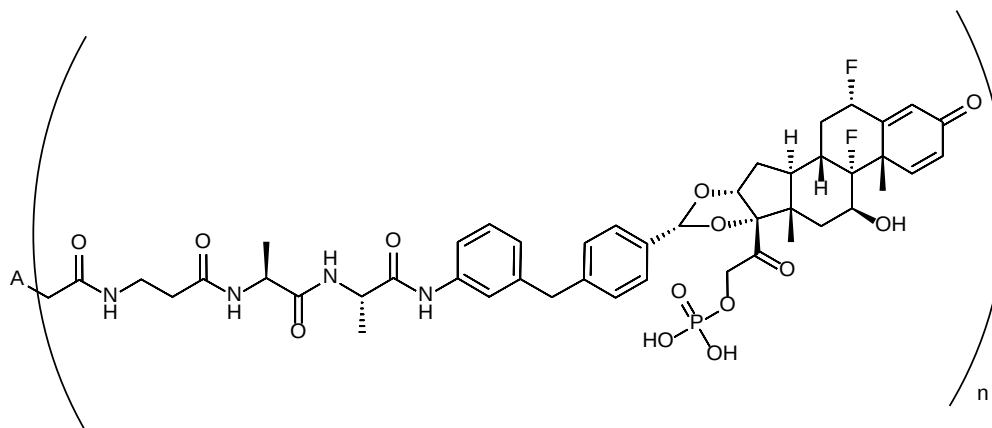


Ejemplo 24 – conjugado

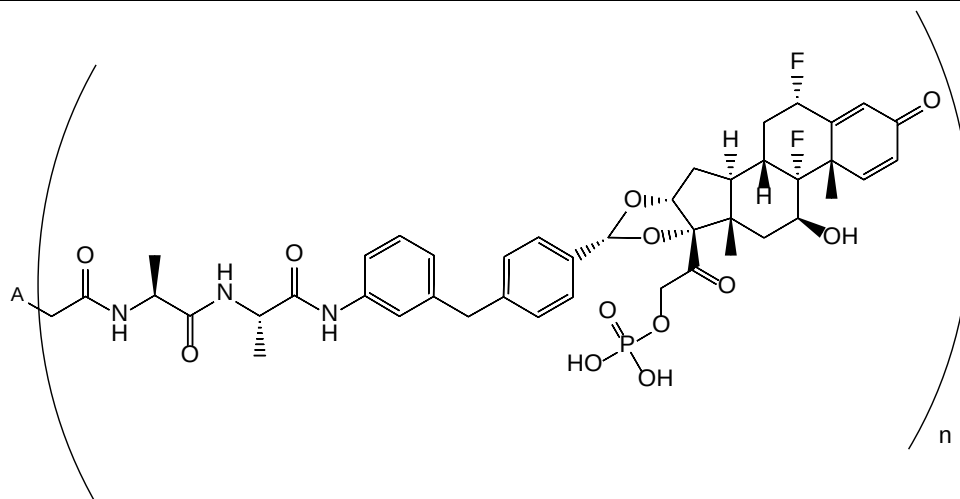
Tabla 5. ADC conjugado



Ejemplo 25A – conjugado

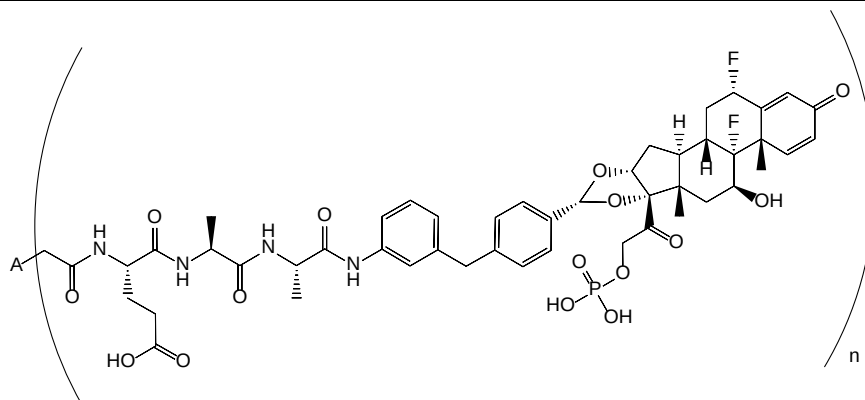


Ejemplo 25B – conjugado

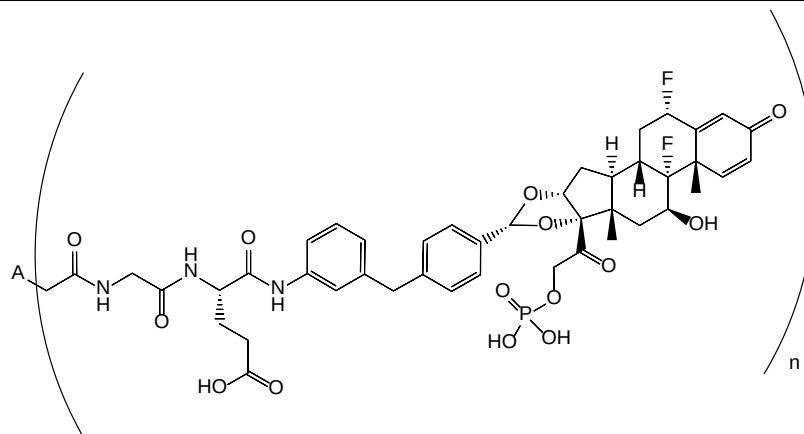


Ejemplo 26 – conjugado

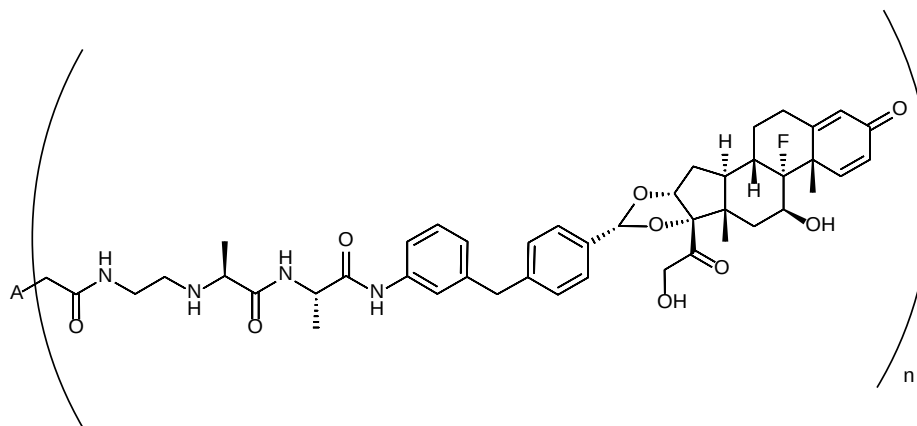
Tabla 5. ADC conjugado



Ejemplo 27 – conjugado

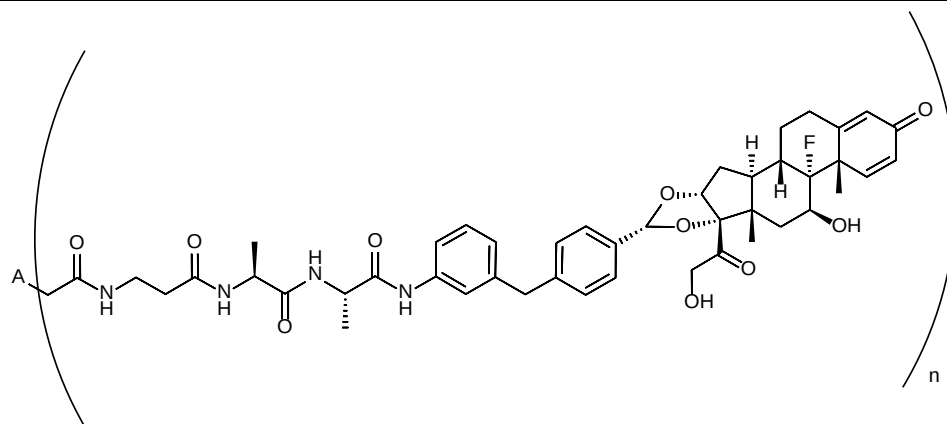


Ejemplo 28 – conjugado

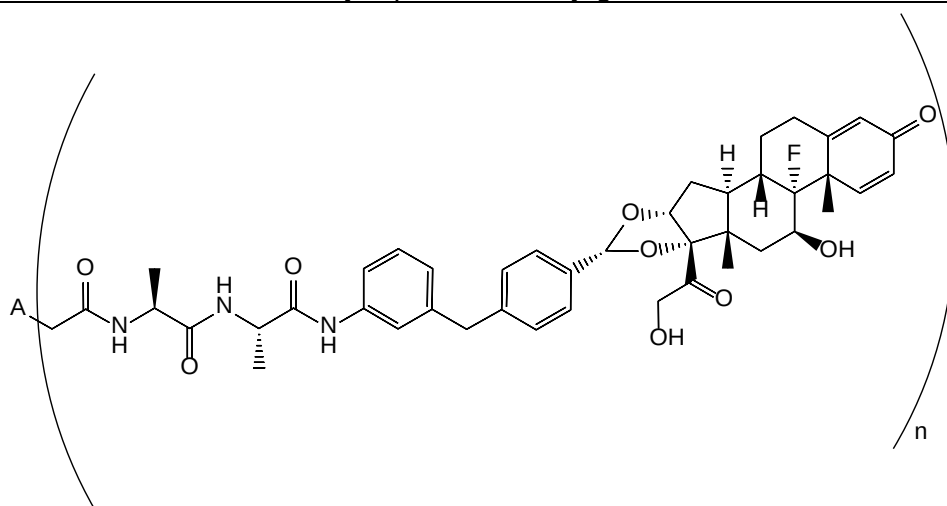


Ejemplo 29A – conjugado

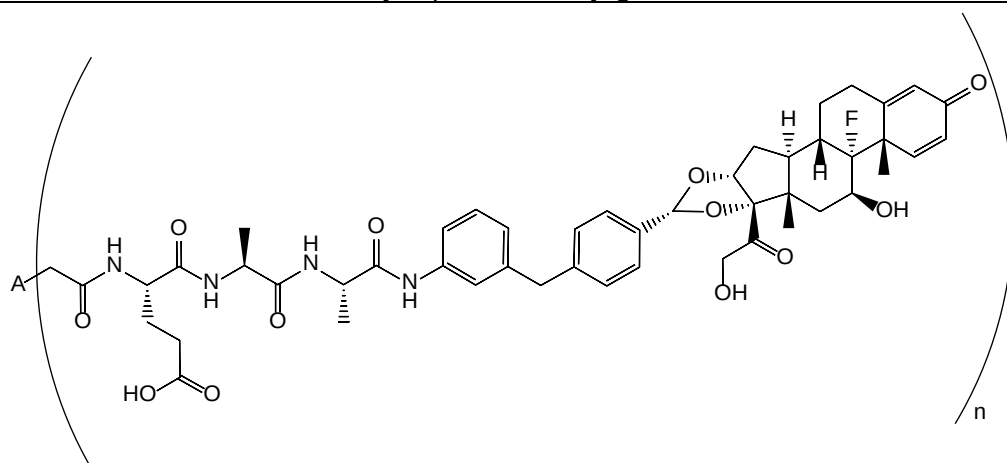
Tabla 5. ADC conjugado



Ejemplo 29B – conjugado

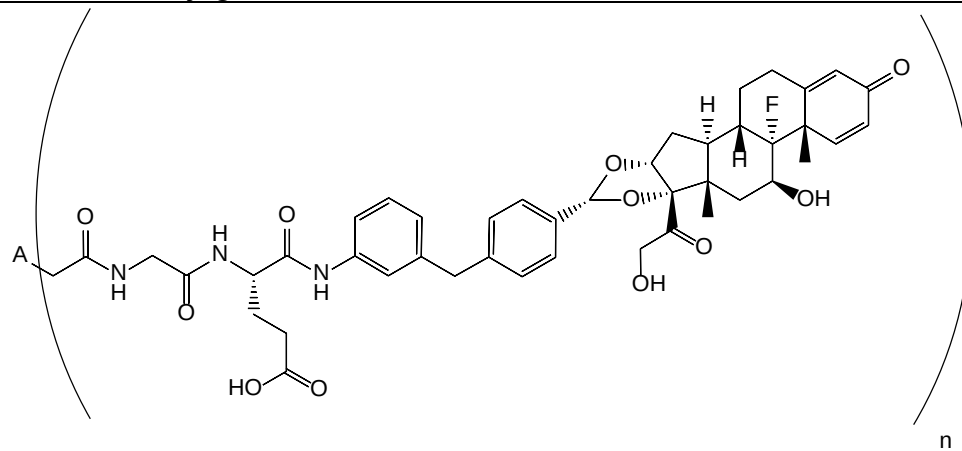


Ejemplo 30 – conjugado

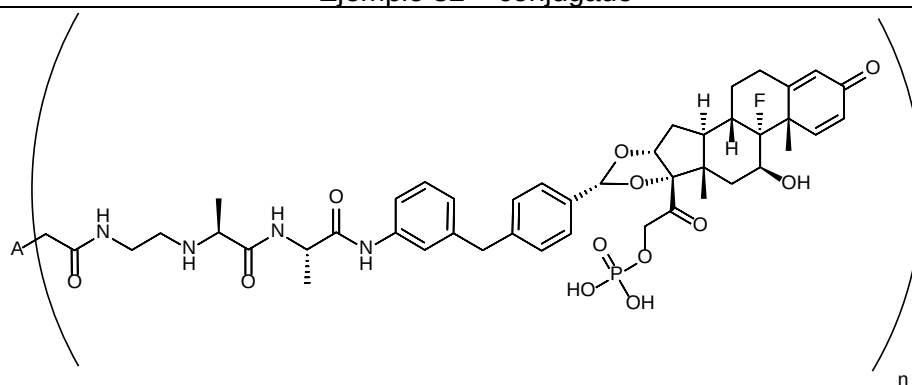


Ejemplo 31 – conjugado

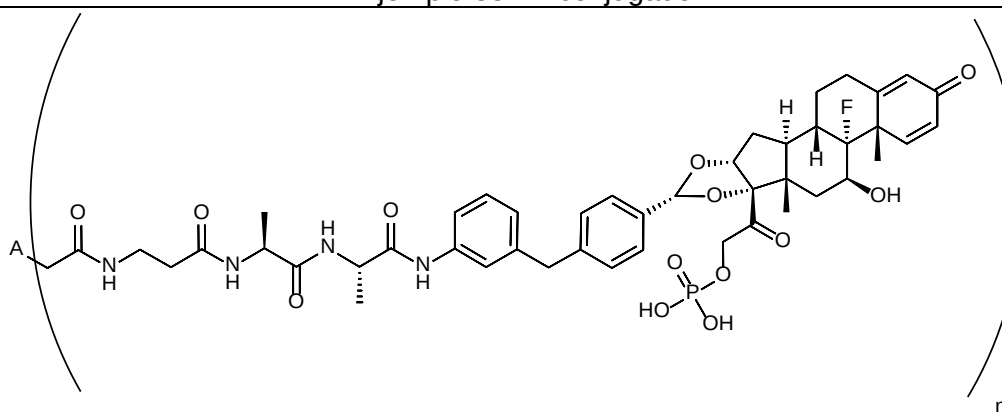
Tabla 5. ADC conjugado



Ejemplo 32 – conjugado

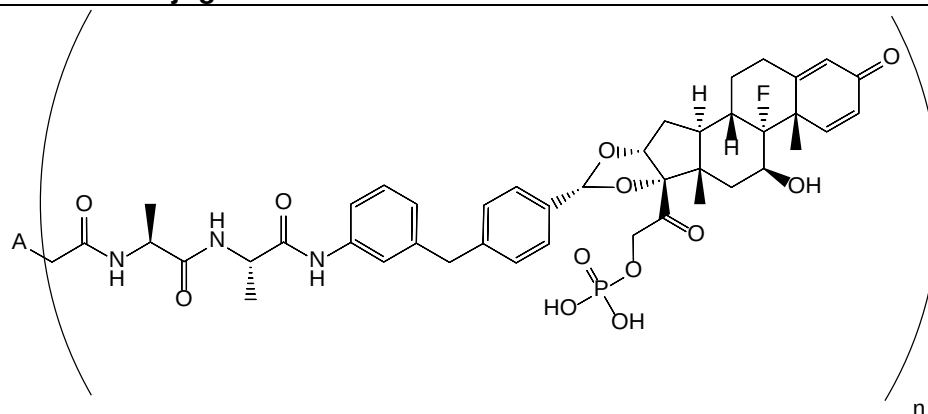


Ejemplo 33A – conjugado

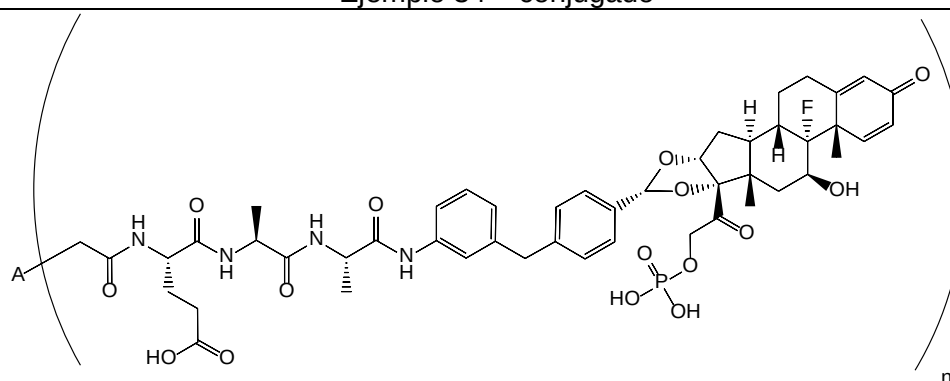


Ejemplo 33B – conjugado

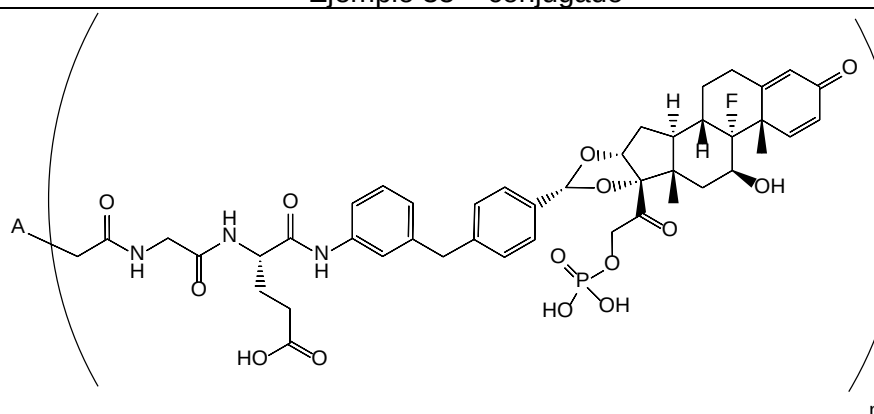
Tabla 5. ADC conjugado



Ejemplo 34 – conjugado

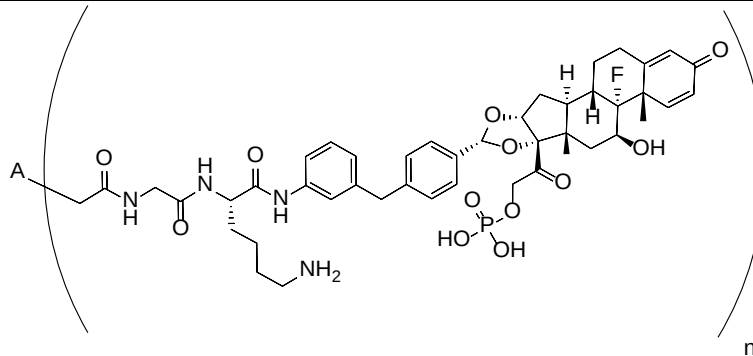


Ejemplo 35 – conjugado

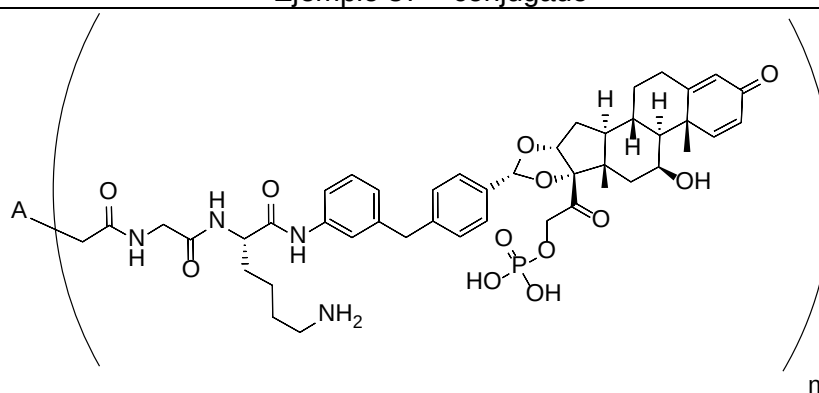


Ejemplo 36 – conjugado

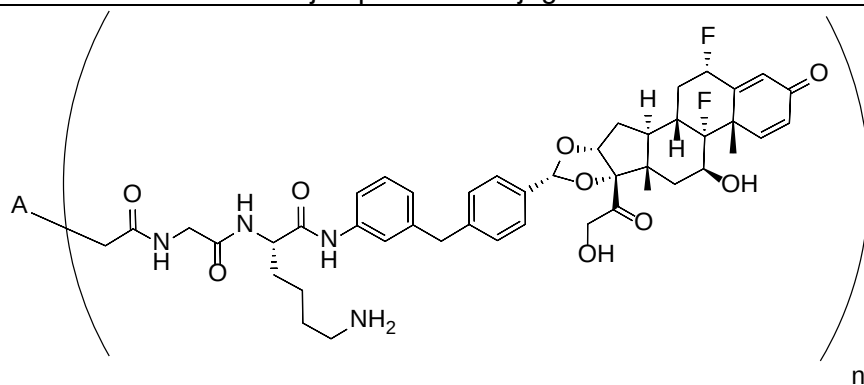
Tabla 5. ADC conjugado



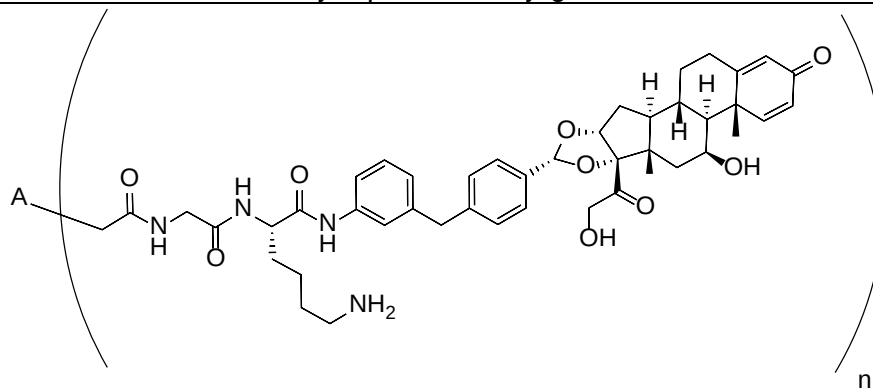
Ejemplo 37 – conjugado



Ejemplo 38 – conjugado

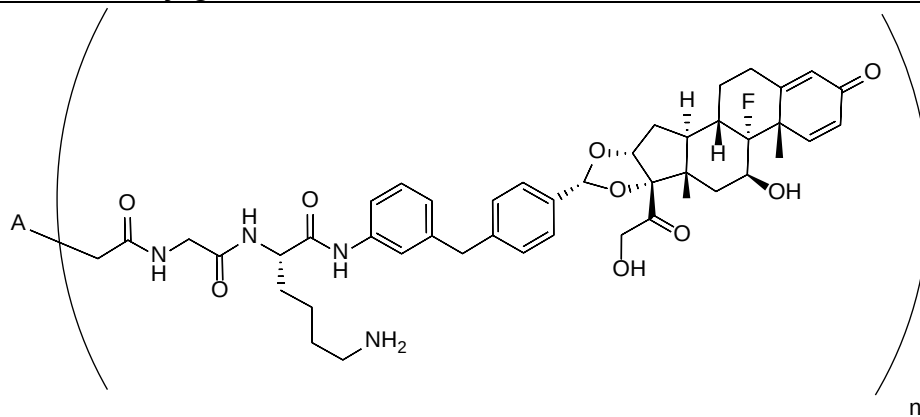


Ejemplo 39 – conjugado

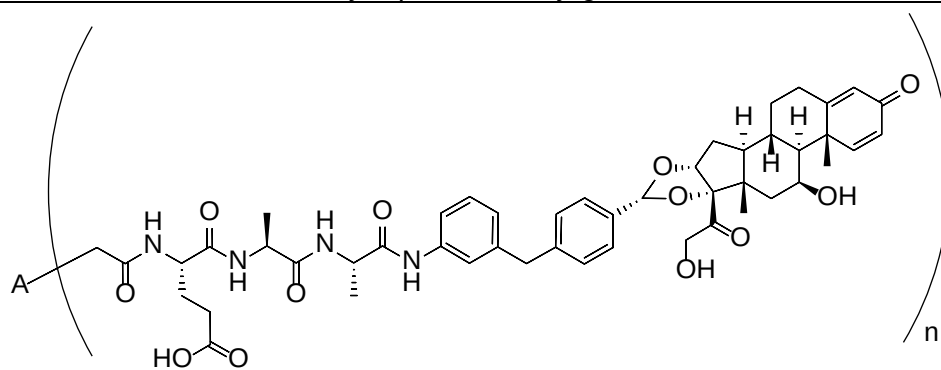


Ejemplo 40 – conjugado

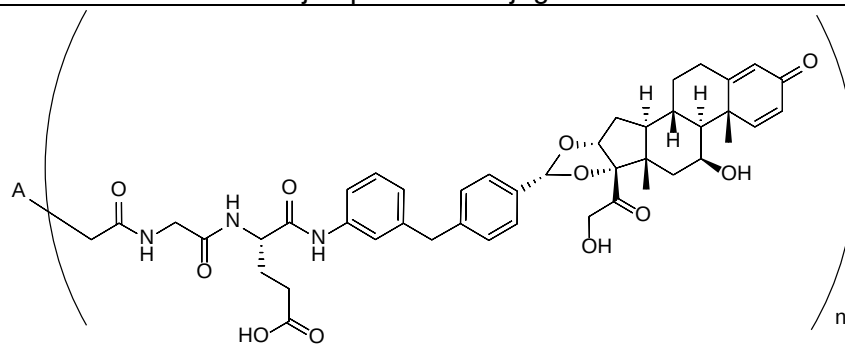
Tabla 5. ADC conjugado



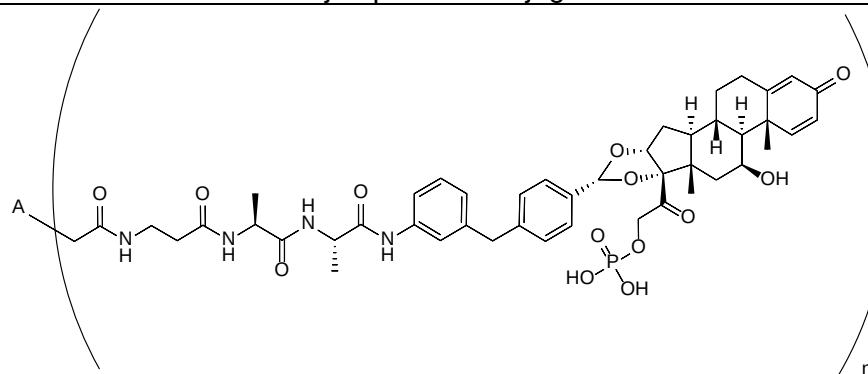
Ejemplo 41 – conjugado



Ejemplo 42 – conjugado

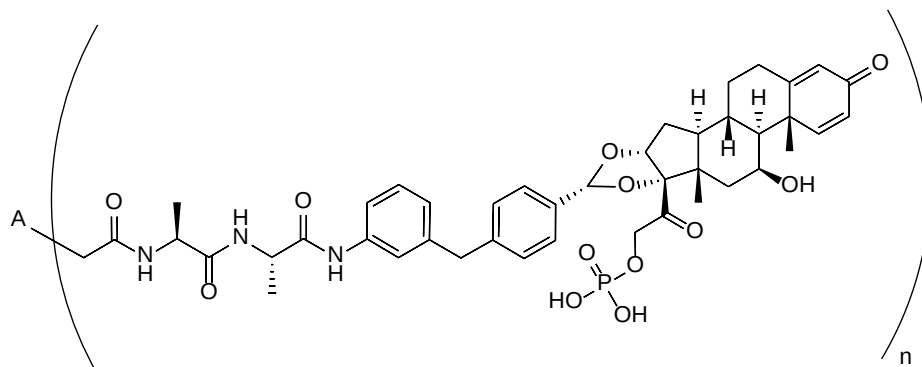


Ejemplo 43 - conjugado

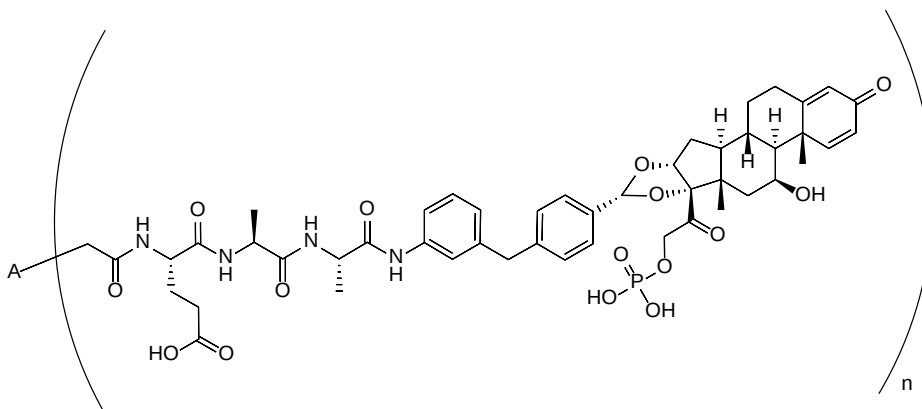


Ejemplo 44 - conjugado

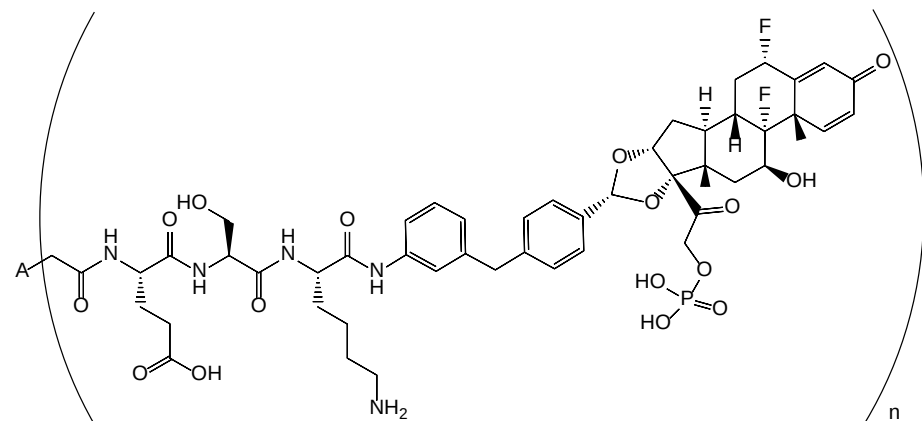
Tabla 5. ADC conjugado



Ejemplo 45 - conjugado

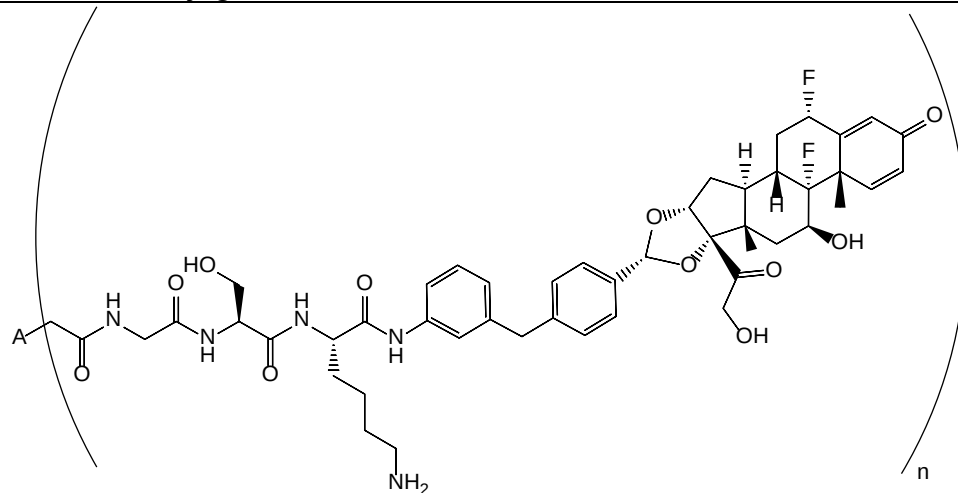


Ejemplo 46 - conjugado



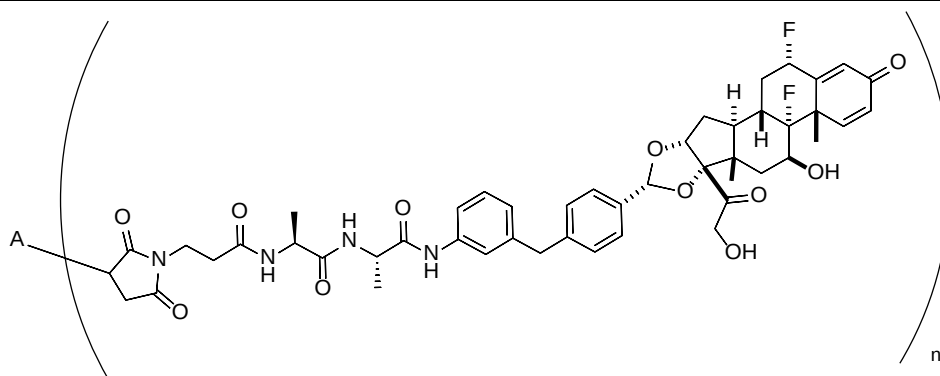
Ejemplo 47 - conjugado

Tabla 5. ADC conjugado

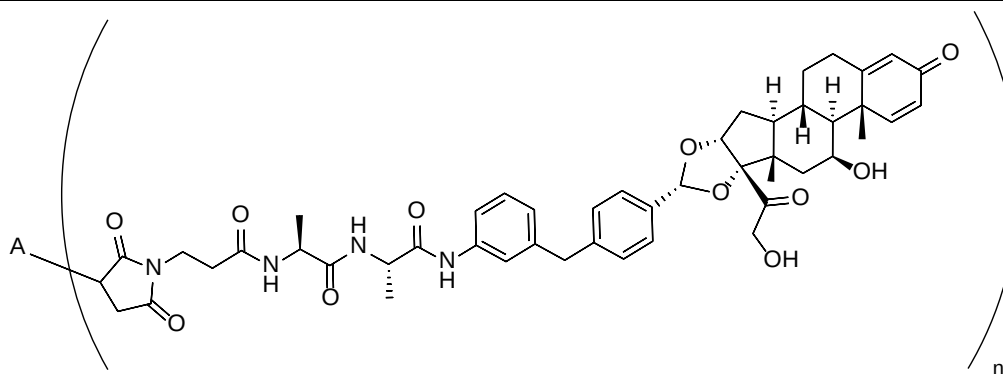


Ejemplo 48 – conjugado

Tabla 6A. ADC conjugado



Ejemplo 6 – conjugado



Ejemplo 7 – conjugado

Tabla 5. ADC conjugado

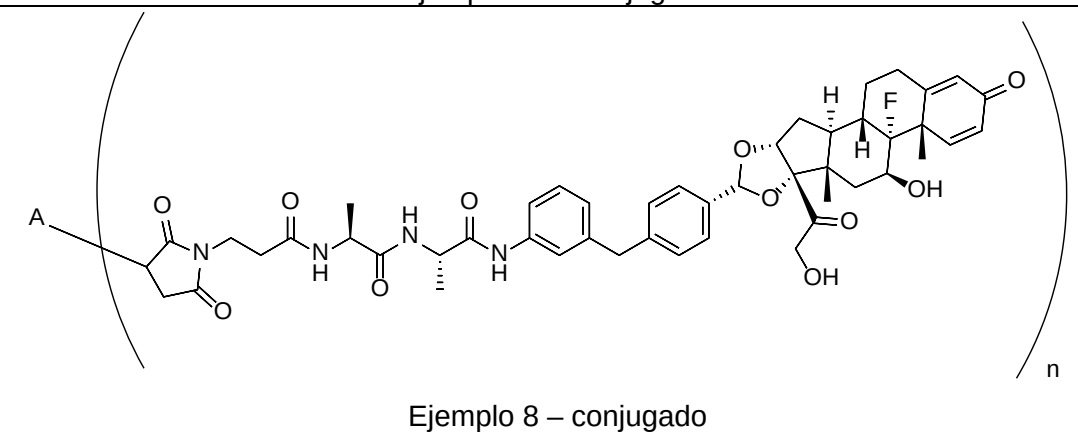
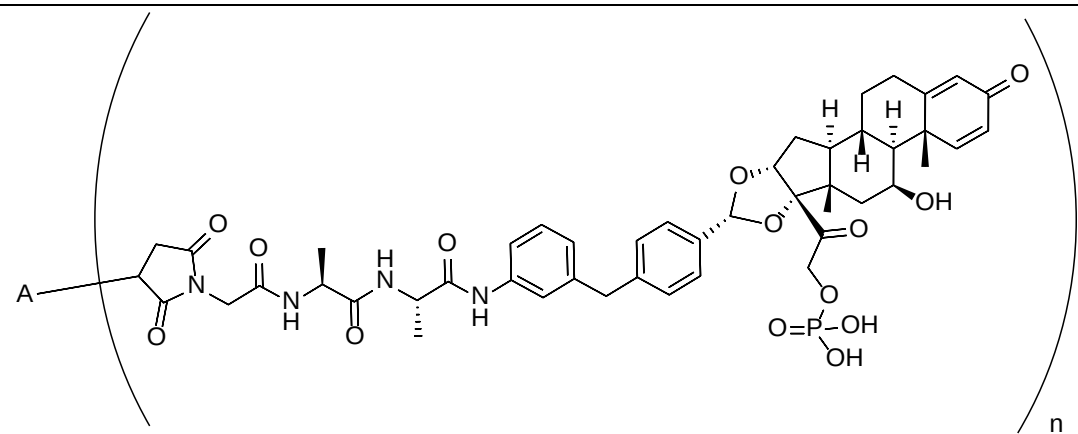
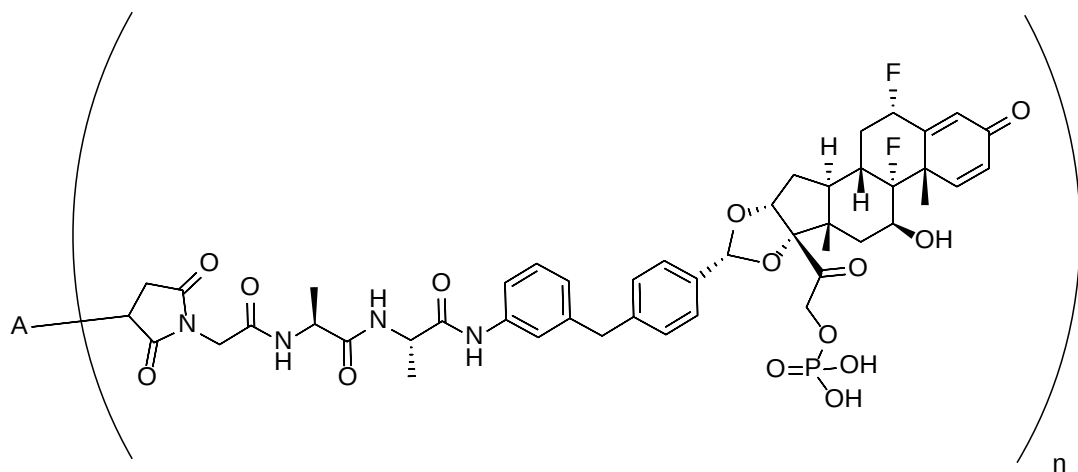
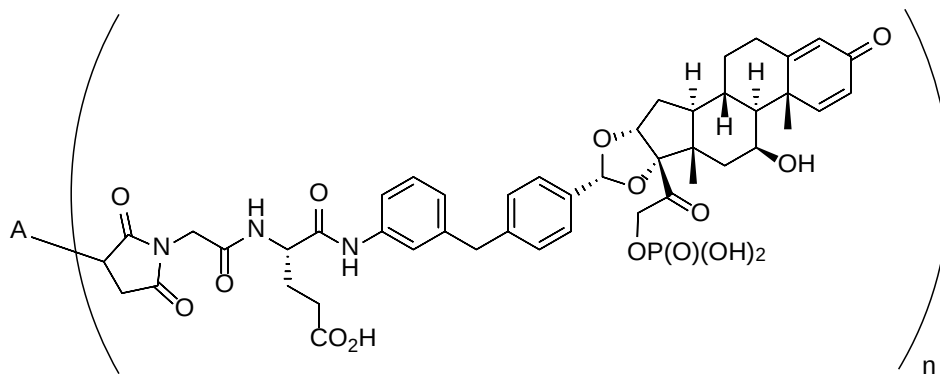
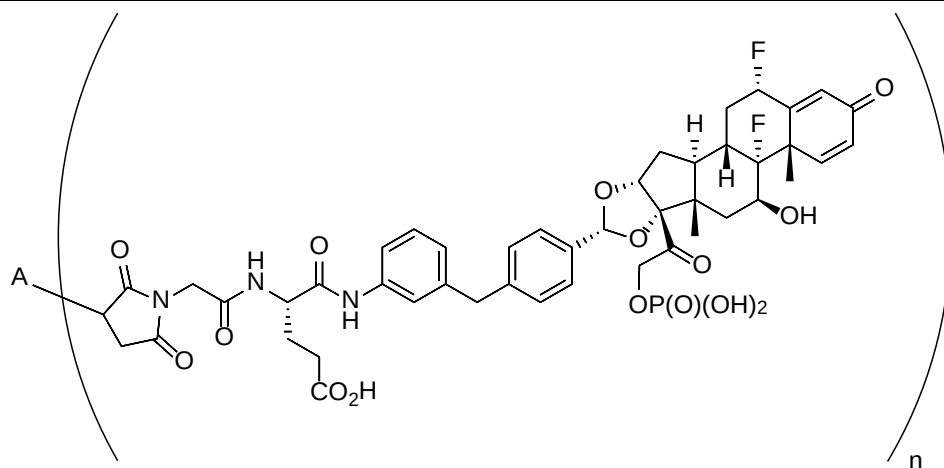


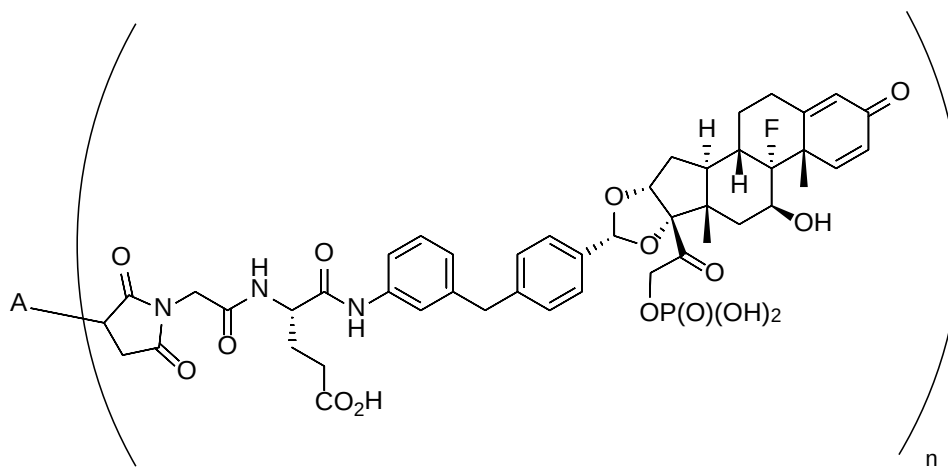
Tabla 5. ADC conjugado



Ejemplo 9 – conjugado

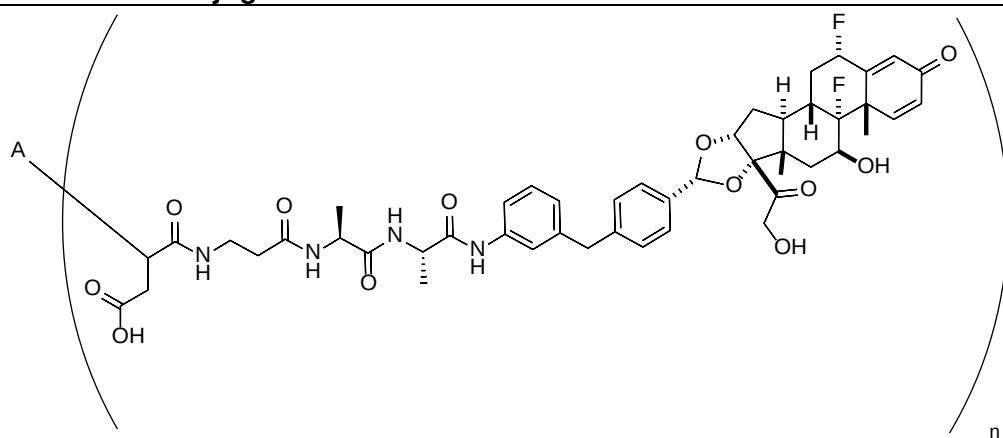


Ejemplo 10 – conjugado

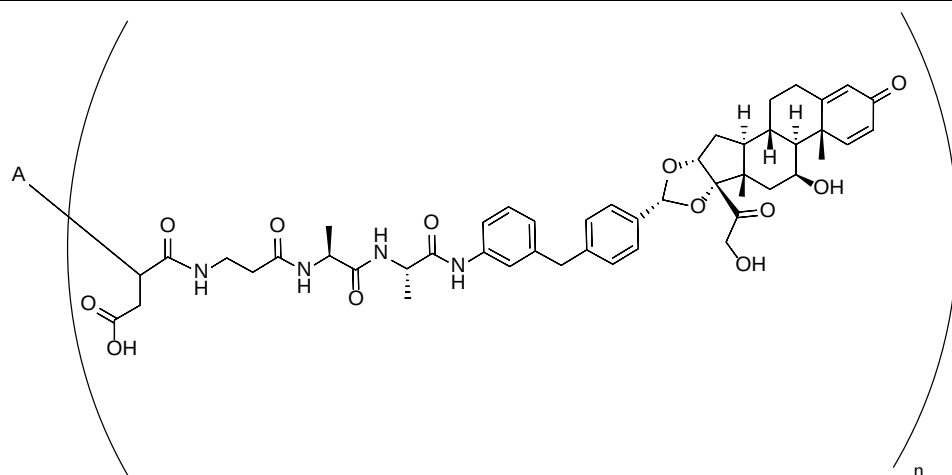


Ejemplo 11 – conjugado

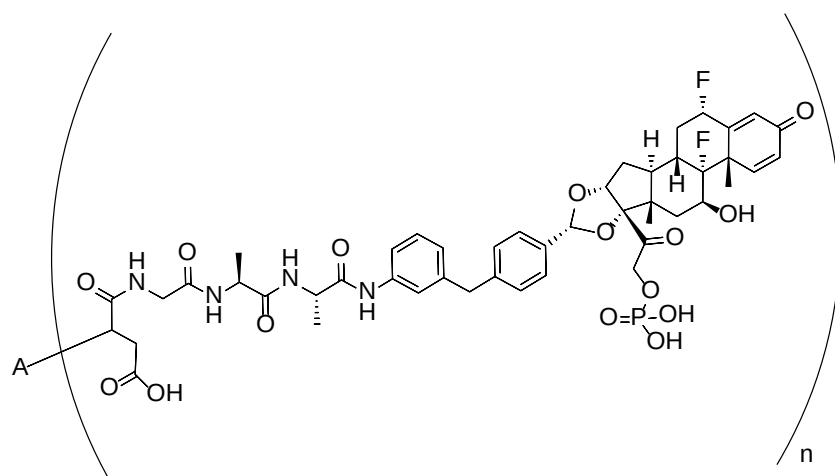
Tabla 6B. ADC conjugado e hidrolizado



Ejemplo 6 – hidrolizado

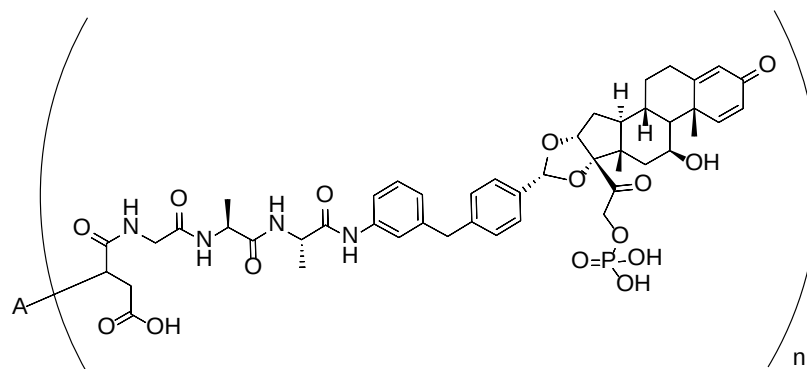


Ejemplo 7 – hidrolizado

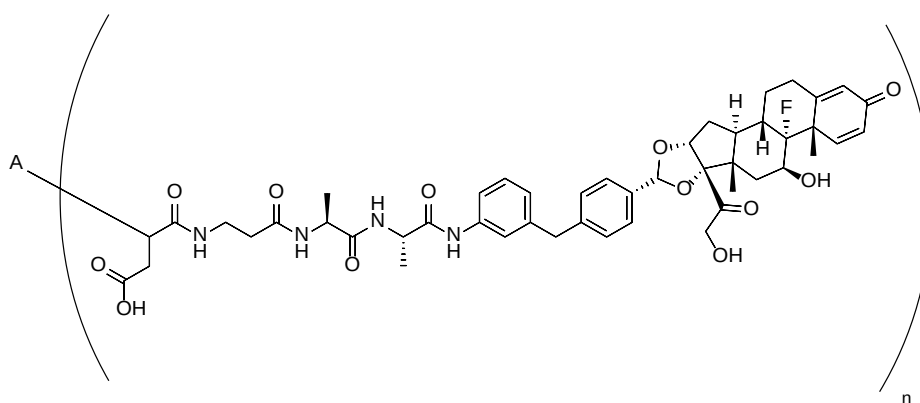


Ejemplo 12 – hidrolizado

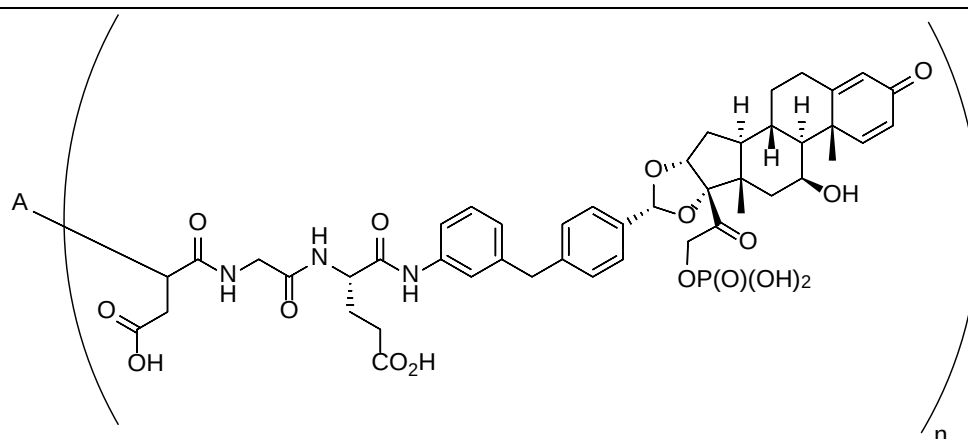
Tabla 6B. ADC conjugado e hidrolizado



Ejemplo 13 – hidrolizado

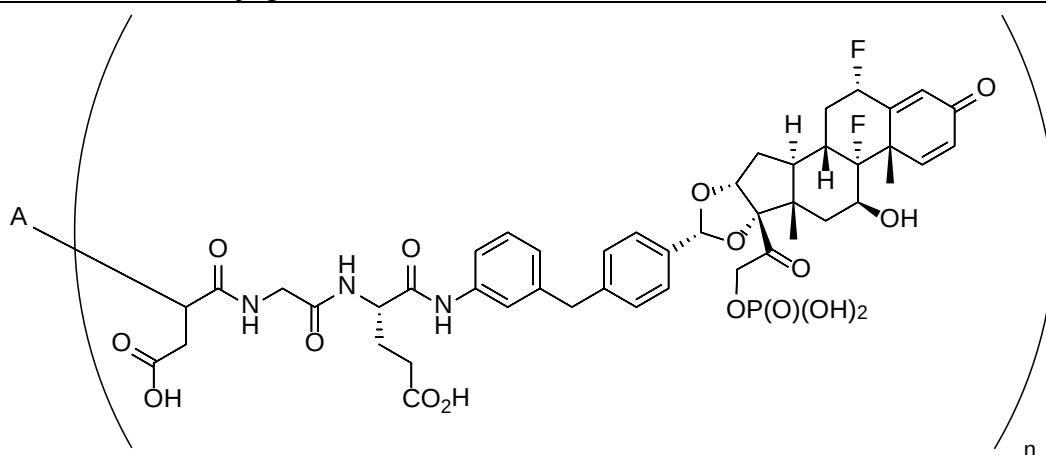


Ejemplo 8 – hidrolizado

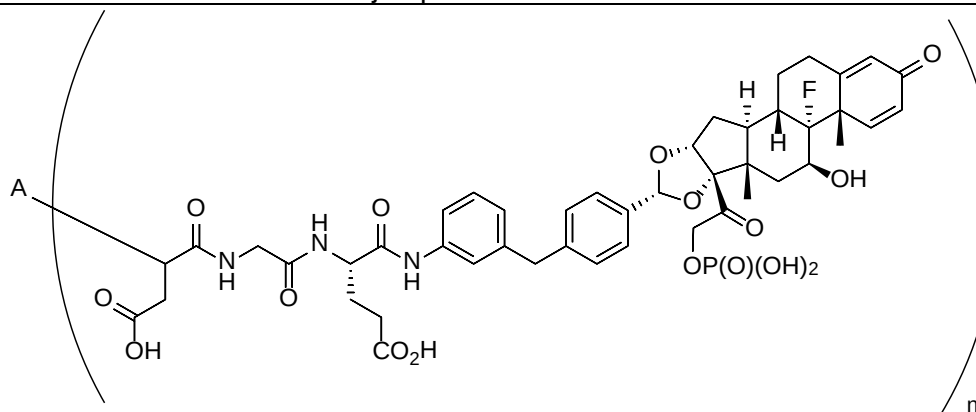


Ejemplo 9 – hidrolizado

Tabla 6B. ADC conjugado e hidrolizado



Ejemplo 10 – hidrolizado



Ejemplo 11 – hidrolizado

[00112] En ciertas formas de realización de la Tabla 5, el conjugado anticuerpo-fármaco es el Ejemplo 4-conjugado o el Ejemplo 28-conjugado. En ciertas formas de realización, el anticuerpo anti-CD40 comprende regiones determinantes de la complementariedad (CDR) establecidas como SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, y SEQ ID NO: 12. En ciertas formas de realización, el anticuerpo anti-CD40 comprende una región variable de la cadena pesada establecida como SEQ ID NO: 5 y una región variable de la cadena liviana establecida como SEQ ID NO: 6. En ciertas formas de realización, el anticuerpo anti-CD40 comprende una cadena pesada establecida como SEQ ID NO: 3 y una cadena liviana establecida como SEQ ID NO: 4. En ciertas formas de realización, n es 2. En ciertas formas de realización, n es 4. En ciertas formas de realización de la Tabla 5, el conjugado anticuerpo-fármaco es el Ejemplo 4-conjugado, el Ejemplo 28-conjugado o el Ejemplo 47-conjugado, en donde n es 2 o 4. En ciertas formas de realización de la Tabla 5, el conjugado anticuerpo-fármaco es el Ejemplo 47-conjugado, en donde n es

2. En ciertas formas de realización de la Tabla 5, el conjugado anticuerpo-fármaco es el Ejemplo 47-conjugado, en donde n es 4. En ciertas formas de realización de la Tabla 5, el conjugado anticuerpo-fármaco es el Ejemplo 28-conjugado, en donde n es 2. En ciertas formas de realización de la Tabla 5, el conjugado anticuerpo-fármaco es el Ejemplo 28-conjugado, en donde n es 4.

[00113] En ciertas formas de realización de las Tablas 6A y 6B, el conjugado anticuerpo-fármaco es el Ejemplo 6-conjugado, el Ejemplo 6-hidrolizado, el Ejemplo 7-conjugado, el Ejemplo 7-hidrolizado, el Ejemplo 12-conjugado, el Ejemplo 12-hidrolizado, el Ejemplo 13-conjugado o el Ejemplo 13-hidrolizado. En ciertas formas de realización, el conjugado anticuerpo-fármaco es el Ejemplo 6-hidrolizado, el Ejemplo 7-hidrolizado, el Ejemplo 12-hidrolizado o el Ejemplo 13-hidrolizado. En ciertas formas de realización, el compuesto es el Ejemplo 6-hidrolizado, el Ejemplo 7-hidrolizado o el Ejemplo 12-hidrolizado. En ciertas formas de realización, el conjugado anticuerpo-fármaco es el Ejemplo 12-hidrolizado o el Ejemplo 13-hidrolizado. En ciertas formas de realización, el anticuerpo anti-CD40 comprende regiones determinantes de la complementariedad (CDR) establecidas como SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, y SEQ ID NO: 12. En ciertas formas de realización, el anticuerpo anti-CD40 comprende una región variable de la cadena pesada establecida como SEQ ID NO: 5 y una región variable de la cadena liviana establecida como SEQ ID NO: 6. En ciertas formas de realización, el anticuerpo anti-CD40 comprende una cadena pesada establecida como SEQ ID NO: 3 y una cadena liviana establecida como SEQ ID NO: 4. En ciertas formas de realización, n es 2. En ciertas formas de realización, n es 4.

III. Métodos de uso y composiciones farmacéuticas

[00114] En la presente se proporcionan conjugados anticuerpo-fármaco de la Fórmula (I) o (II) que pueden usarse *in vitro* o *in vivo*. Por consiguiente, también se proporcionan composiciones, por ejemplo, composiciones farmacéuticas para ciertos usos *in vivo*, que comprenden un conjugado anticuerpo-fármaco de la Fórmula (I) o (II) que tiene el grado deseado de pureza en un portador, excipiente o estabilizante aceptable desde el punto de vista fisiológico (Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, PA). Los portadores, excipientes o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas.

[00115] Las composiciones (por ejemplo, composiciones farmacéuticas) a usar para la administración *in vivo* pueden ser estériles, lo que se puede lograr mediante

filtración a través de, por ejemplo, membranas de filtración estériles. Las composiciones (por ejemplo, composiciones farmacéuticas) a usar para la administración *in vivo* pueden comprender un conservante.

[00116] Los conjugados anticuerpo-fármaco pueden formularse en formas de dosis y administrarse (por ejemplo, mediante infusión o administración intravenosa) de acuerdo con el conocimiento en la técnica.

[00117] Los conjugados anticuerpo-fármaco y/o las composiciones farmacéuticas que comprenden conjugados anticuerpo-fármaco descritos en la presente pueden ser útiles para lisar una célula que expresa CD40 (*in vitro* o *in vivo*) y/o para el tratamiento de enfermedades o trastornos caracterizados por un aumento de CD40. En algunas formas de realización, los conjugados anticuerpo-fármaco y/o las composiciones son útiles para inhibir la liberación de citocinas (*in vitro* o *in vivo*) y/o para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias o inflamatorias.

[00118] En ciertas formas de realización, se proporciona un método para tratar una afección seleccionada del grupo que consiste en enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), lupus eritematoso sistémico (SLE), esclerosis múltiple, artritis reumatoide, síndrome de Sjogren, e hidradenitis supurativa (HS), en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz del conjugado anticuerpo-fármaco o la composición farmacéutica como se describe en la presente. En ciertas formas de realización, la afección es una enfermedad inflamatoria intestinal (IBD). En ciertas formas de realización, la IBD es colitis ulcerosa (UC) o enfermedad de Crohn. En ciertas formas de realización, la afección es el lupus eritematoso sistémico (SLE). En ciertas formas de realización, la afección es la esclerosis múltiple. En ciertas formas de realización, la afección es la artritis reumatoide. En ciertas formas de realización, la afección es el síndrome de Sjogren. En ciertas formas de realización, la afección es la hidradenitis supurativa (HS).

[00119] En otra forma de realización, se proporciona el conjugado anticuerpo-fármaco o la composición farmacéutica, como se describe en la presente, para su uso en el tratamiento de una afección seleccionada del grupo que consiste en enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), lupus eritematoso sistémico (SLE), esclerosis múltiple, artritis reumatoide, síndrome de Sjogren, e hidradenitis supurativa (HS).

[00120] En otra forma de realización, se proporciona el conjugado anticuerpo-fármaco o la composición farmacéutica, como se describe en la presente, para la preparación de un medicamento para tratar una afección seleccionada del grupo que consiste en enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), lupus eritematoso sistémico

(SLE), esclerosis múltiple, artritis reumatoide, síndrome de Sjogren, e hidradenitis supurativa (HS).

[00121] Algunas formas de realización comprenden métodos para administrar un agonista del receptor de glucocorticoides a una célula que expresa CD40. Tales métodos pueden incluir una etapa de poner en contacto una célula que expresa CD40 con un conjugado anticuerpo-fármaco como se describe en la presente. Algunas formas de realización comprenden un método *in vitro* para administrar un agonista del receptor de glucocorticoides a una célula que expresa CD40.

[00122] También se proporcionan métodos para determinar la actividad antiinflamatoria de un conjugado anticuerpo-fármaco. Tales métodos pueden incluir una etapa de poner en contacto una célula que expresa CD40 con un conjugado anticuerpo-fármaco como se describe en la presente. Algunas formas de realización comprenden poner en contacto una célula que expresa CD40 con un conjugado anticuerpo-fármaco como se describe en la presente y determinar la liberación reducida de citocinas proinflamatorias de la célula en comparación con una célula de control. Algunas formas de realización comprenden un método *in vitro* para determinar la actividad antiinflamatoria de un conjugado anticuerpo-fármaco.

[00123] Algunas formas de realización comprenden métodos de cribado (por ejemplo, métodos *in vitro*) que incluyen poner en contacto, directa o indirectamente, células (por ejemplo, células que expresan CD40) con un conjugado anticuerpo-fármaco y determinar si el conjugado anticuerpo-fármaco modula una actividad o función de las células, como lo reflejan, por ejemplo, los cambios en la morfología o viabilidad celular, la expresión de un marcador, la diferenciación o desdiferenciación, la respiración celular, la actividad mitocondrial, la integridad de la membrana, la maduración, la proliferación, la viabilidad, la apoptosis o la muerte celular. Un ejemplo de una interacción directa es la interacción física, mientras que una interacción indirecta incluye, por ejemplo, la acción de una composición sobre una molécula intermedia que, a su vez, actúa sobre la entidad a la que se referencia (por ejemplo, una célula o un cultivo celular).

[00124] Por lo tanto, en ciertas formas de realización, se proporciona un método para administrar un agonista del receptor de glucocorticoides a una célula que expresa CD40, que comprende la etapa de poner en contacto la célula con el conjugado anticuerpo-fármaco o una composición farmacéutica como se describe en la presente.

[00125] En ciertas formas de realización adicionales, se proporciona un método para determinar la actividad antiinflamatoria de un conjugado anticuerpo-fármaco que

comprende poner en contacto una célula que expresa CD40 con el conjugado anticuerpo-fármaco como se describe en la presente; y determinar una liberación reducida de citocinas proinflamatorias de la célula en comparación con una célula de control.

IV. Artículos de elaboración

[00126] La divulgación también incluye envases y kits farmacéuticos que comprenden uno o más recipientes, en donde un recipiente puede comprender una o más dosis de un conjugado anticuerpo-fármaco o una composición como se describe en la presente. En ciertas formas de realización, el envase o kit contiene una dosis unitaria, es decir una cantidad predeterminada de una composición o un conjugado anticuerpo-fármaco, con o sin uno o más agentes adicionales.

[00127] En algunas formas de realización, los kits se proporcionan en una o más soluciones líquidas, que pueden ser soluciones no acuosas o acuosas. En algunas formas de realización, la solución es una solución estéril. La composición en el kit también puede proporcionarse como polvos secos o en forma liofilizada que puede reconstituirse tras la adición de un líquido adecuado. El líquido utilizado para la reconstitución puede estar contenido en un recipiente separado. Tales líquidos pueden comprender amortiguadores aceptables desde el punto de vista farmacéutico estériles u otros diluyentes tales como agua bacteriostática para inyección, solución salina amortiguada con fosfato, solución de Ringer o solución de dextrosa.

[00128] El kit puede comprender uno o varios recipientes y una etiqueta o prospecto en, sobre o asociado con los recipientes, que indique que la composición incluida se usa para tratar la enfermedad en cuestión. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas, etc. Los recipientes pueden formarse a partir de una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico. Los recipientes pueden comprender un puerto de acceso estéril, por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón que puede perforarse con una aguja de inyección hipodérmica.

[00129] En algunas formas de realización, el kit puede contener un medio con el cual administrar el conjugado anticuerpo-fármaco y cualesquier componentes opcionales a un sujeto que lo necesite, por ejemplo, una o más agujas o jeringas (precargadas o vacías), un gotero, una pipeta, u otro aparato similar, desde el cual se puede inyectar o introducir la composición en el sujeto o se la puede aplicar a un área enferma del cuerpo. Los kits de la divulgación también incluirán por lo general un medio para contener los viales, o similares, y otros componentes en confinamiento

cercano para la venta comercial, tal como, por ejemplo, recipientes de plástico moldeados por soplado en los que se colocan y retienen los viales deseados y otros aparatos.

[00130] Por lo tanto, en ciertas formas de realización, se proporciona un kit que comprende:

(a) un recipiente que comprende el conjugado anticuerpo-fármaco o una composición farmacéutica como se describe en la presente; y

(b) una etiqueta o prospecto sobre o asociado con uno o más recipientes, en donde la etiqueta o el prospecto indica que el conjugado anticuerpo-fármaco o la composición farmacéutica se usa para tratar una afección seleccionada del grupo que consiste en enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), lupus eritematoso sistémico (SLE), esclerosis múltiple, artritis reumatoide, síndrome de Sjogren, e hidradenitis supurativa (HS).

EJEMPLOS

[00131] Se entiende que los ejemplos y las formas de realización descritos en la presente son solo para fines ilustrativos y que a las personas del oficio de nivel medio se les ocurrirán diversas modificaciones o cambios al respecto de estos, los cuales han de incluirse dentro del espíritu y ámbito de esta divulgación.

MÉTODOS ANALÍTICOS

1. Procedimientos analíticos de moléculas pequeñas

[00132] A menos que se indique lo contrario, todos los datos de ^1H y ^{13}C NMR (resonancia magnética nuclear) se recopilaron en un instrumento Varian Mercury Plus 400 MHz o un instrumento Bruker AVIII 300 MHz; los cambios químicos se indican en partes por millón (ppm). Los datos analíticos de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) y LCMS o bien se detallan dentro del experimento o hacen referencia a las condiciones enumeradas en la Tabla 7.

Tabla 7. Lista de métodos de LCMS y HPLC	
Método	Condiciones
a	El gradiente fue de 1-90% de B en 3,4 min, 90-100% de B en 0,45 min, 100-1% de B en 0,01 min, y luego se mantuvo en 1% de B durante 0,65 min (velocidad de flujo de 0,8 ml/min). La fase móvil A fue 0,0375% de ácido trifluoroacético en H ₂ O, la fase móvil B fue 0,018% de ácido trifluoroacético en acetonitrilo. La columna utilizada para la cromatografía fue una columna Phenomenex Luna-C18 de 2,0 X 50 mm (partículas de 5 µm). Los métodos de detección son detector de haz de diodos (DAD) y detector de dispersión de luz por evaporación (ELSD), así como ionización por electrospray positiva (MS).
b	Se usó un gradiente de 5-100% de acetonitrilo (A) y 0,1% de ácido trifluoroacético en agua (B), a una velocidad de flujo de 1,5 ml/min (0-0,05 min 5% de A, 0,05-1,2 min 5-100% de A, 1,2-1,4 min 100% de A, 1,4-1,5 min 100-5% de A, 0,25 min de retraso después de la ejecución).
c	El gradiente fue de 5-90% de B en 3,4 min, 90-100% de B en 0,45 min, 100-5% de B en 0,01 min, y luego se mantuvo en 5% de B durante 0,65 min (velocidad de flujo de 0,8 ml/min). La fase móvil A fue NH ₄ HCO ₃ 10 mM, la fase móvil B fue acetonitrilo de grado de HPLC. La columna utilizada para la cromatografía es una columna Xbridge Shield RPC18 de 2,1 x 50 mm (partículas de 5 µm). Los métodos de detección son detección con haz de diodos (DAD) y con dispersión de luz por evaporación (ELSD), así como con ionización por electrospray positiva (MS)
AA1	Instrumento: HPLC preparativa Shimadzu LC-8A. Columna: Phenomenex Luna C18 200*40mm*10µm. Fase móvil A: H ₂ O (0,09% de ácido trifluoroacético) y B: acetonitrilo. Gradiente: B de 40% a 60% en 20 min. Velocidad de flujo: 60 ml/min. Longitud de onda: 220 y 254 nm.
AA2	Instrumento: sistema de HPLC semipreparativa Gilson 281. Fase móvil A: ácido trifluoroacético/H ₂ O = 0,075% v/v; B: acetonitrilo. Columna: Nano-micro Kromasil C18 100*30 mm 5 µm. Velocidad de flujo: 25 ml/min. Longitud de onda de monitor: 220 y 254 nm.
AA3	Instrumento: sistema de HPLC semipreparativa Gilson 281. Fase móvil A: ácido trifluoroacético/H ₂ O = 0,075% v/v; B: acetonitrilo. Columna: Phenomenex Synergi C18 100*30mm*4 µm Velocidad de flujo: 25 ml/min. Longitud de onda de monitor: 220 y 254 nm.
AA4	El gradiente fue de 1-90% de B en 3,4 min, 90-100% de B en 0,45 min, 100-1% de B en 0,01 min, y luego se mantuvo en 1% de B durante 0,65 min (velocidad de flujo de 0,8 ml/min). Fase móvil A: 0,0375% de ácido trifluoroacético en agua, B: 0,018% de ácido trifluoroacético en acetonitrilo. La columna utilizada para la cromatografía fue una columna Phenomenex Luna-C18 de 2,0 x 50 mm (partículas de 5 µm). Los métodos de detección son la detección con DAD y ELSD, así como la ionización por electrospray positiva (MS).
AA5	Instrumento: sistema de HPLC semipreparativa Gilson 281. Fase móvil A: ácido trifluoroacético/H ₂ O = 0,075% v/v; B: acetonitrilo. Columna: Luna C18 100*30 5µm. Velocidad de flujo: 25 ml/min. Longitud de onda de monitor: 220 y 254 nm. 25 – 100% de gradiente B durante 10 min.
AA6	Instrumento: HPLC preparativa Shimadzu LC-8A. Columna: Phenomenex Luna C18 200*40 mm*10 µm. Fase móvil A: H ₂ O (0,09% de ácido trifluoroacético); B: acetonitrilo. Gradiente: B de 15% a 45% en 20 min. Velocidad de flujo: 60 ml/min. Longitud de onda: 220 y 254 nm.
AA7	Instrumento: HPLC preparativa Shimadzu LC-8A. Columna: Phenomenex Luna C18 200*40 mm*10 µm. Fase móvil A: H ₂ O y B: acetonitrilo. Gradiente: B de 50% a 100% en 30 min. Velocidad de flujo: 60 ml/min. Longitud de onda: 220 y 254 nm.
AA8	Columna: Phenomenex Luna C18 200*40mm*10 µm. Fase móvil A: H ₂ O (0,09% de ácido trifluoroacético) y B: acetonitrilo. Gradiente: B de 35% a 55% en 20 min. Velocidad de flujo: 60 ml/min. Longitud de onda: 220 y 254 nm.

Tabla 7. Lista de métodos de LCMS y HPLC	
Método	Condiciones
AA9	Instrumento: sistema de HPLC semipreparativa Gilson 281. Fase móvil A: ácido trifluoroacético/H ₂ O = 0,075% v/v; B: acetonitrilo. Columna: Luna C18 100*30 5 um. Velocidad de flujo: 15 ml/min. Longitud de onda de monitor: 220 y 254 nm. 15 – 100% de gradiente B durante 10 min.
AA10	Instrumento: HPLC preparativa Shimadzu LC-8A. Columna: Phenomenex Luna C18 200*40mm*10 um. Fase móvil A H ₂ O (0,09% de ácido trifluoroacético) y B: acetonitrilo. Gradiente: B de 20% a 40% en 20 min. Velocidad de flujo: 60 ml/min. Longitud de onda: 220 y 254 nm.
AA11	Instrumento: sistema de HPLC semipreparativa Gilson 281. Fase móvil A: ácido trifluoroacético/H ₂ O = 0,075% v/v; B: acetonitrilo. Columna: Luna C18 100*30 5 um. Velocidad de flujo: 15 ml/min. Longitud de onda de monitor: 220 y 254 nm. 50 – 100% de gradiente B durante 10 min.
AA12	Instrumento: sistema de HPLC semipreparativa Gilson 281. Fase móvil A: ácido trifluoroacético/H ₂ O = 0,075% v/v; B: acetonitrilo. Columna: Luna C18 100*30 5um. Velocidad de flujo: 25 ml/min. Longitud de onda de monitor: 220 y 254 nm. 10 – 100% de gradiente B durante 10 min.
AA13	El gradiente fue de 5-95% de B en 0,7 min, 95-95% de B en 0,45 min, 95-5% de B en 0,01 min, y luego se mantuvo en 0% de B durante 0,44 min (velocidad de flujo de 1,5 ml/min). Fase móvil A: 0,0375% de ácido trifluoroacético en agua, fase móvil B: 0,018% de ácido trifluoroacético en acetonitrilo. La columna utilizada para la cromatografía es una columna Chromolith Flash RP-18e de 25-2 mm. Los métodos de detección son la detección con DAD y ELSD, así como la ionización por electrospray positiva (MS).
AA14	Instrumento: HPLC preparativa Shimadzu LC-8A. Columna: Phenomenex Luna C18 200*40 mm*10 um. Fase móvil A: H ₂ O (0,05% de ácido trifluoroacético) y B: acetonitrilo. Gradiente: B de 30% a 100% en 30 min. Velocidad de flujo: 60 ml/min. Longitud de onda: 220 y 254 nm.
AA15	El gradiente fue de 10-80% de B en 4 min, se mantuvo en 80% de B durante 0,9 min, 80-10% de B en 0,01 min, y luego se mantuvo en 10% de B durante 1 min (velocidad de flujo de 0,8 ml/min). La fase móvil A fue 0,0375% de ácido trifluoroacético en agua, la fase móvil B fue 0,018% de ácido trifluoroacético en acetonitrilo. La columna utilizada para la cromatografía fue una columna Phenomenex Luna-C18 de 2,0 x 50 mm (partículas de 5 µm). El método de detección es DAD.
AA16	El gradiente fue de 15-100% de B en 8,00 min y se mantuvo en 100% de B durante 2 min, 100-15% de B en 0,01 min, y luego se mantuvo en 15% durante 5,00 min, la velocidad de flujo fue de 0,80 ml/min. La fase móvil A fue bicarbonato de amonio 10 mM, la fase móvil B fue acetonitrilo de grado de HPLC. La columna utilizada para la cromatografía fue una columna Xbridge Shield RPC18 de 2,1*50 mm (partículas de 5um). Los métodos de detección son la detección con DAD y ELSD, así como la ionización por electrospray positiva.
AA17	Instrumento: HPLC preparativa Shimadzu LC-8A. Columna: Phenomenex Luna C18 200*40 mm*10 um. Fase móvil: A para H ₂ O (0,09% de ácido trifluoroacético) y B para acetonitrilo. Gradiente: B de 30% a 40% en 20 min. Velocidad de flujo: 60 ml/min. Longitud de onda: 220 y 254 nm.
AA18	El gradiente fue de 5-95% de B en 1,0 min, 95-100% de B en 0,80 min, 100-5% de B en 0,01 min, y luego se mantuvo en 5% de B durante 0,39 min (velocidad de flujo de 1,0 ml/min). La fase móvil A fue 0,0375% de TFA en agua, la fase móvil B fue 0,018% de TFA en MeCN. La columna utilizada para la cromatografía fue una columna ZORBAX Eclipse XDB-C18 2,1*30 mm, 3,5um. Los métodos de detección son haz de diodos (DAD) e ionización por electrospray positiva (MS).

Tabla 7. Lista de métodos de LCMS y HPLC	
Método	Condiciones
AA19	El gradiente fue de 10-90% de B en 1,15 min, se mantuvo en 90% de B durante 0,50 min, 90-10% de B en 0,01 min, y luego se mantuvo en 10% de B durante 0,34 min. La fase móvil A fue NH_4HCO_3 10 mM en agua, la fase móvil B fue MeCN. La columna utilizada para la cromatografía fue una columna Xbridge Shield RP18 2,1*50 mm, 5µm. Los métodos de detección son haz de diodos (DAD) e ionización por electrospray positiva (MS). La velocidad de flujo del sistema fue de 0,8 ml/min (0,00-1,51 min), 1,2 ml/min (1,52-2,00 min).
AA20	Instrumento: sistema de HPLC semipreparativa Gilson 281. Fase móvil: A: $\text{NH}_4\text{OH}/\text{H}_2\text{O}=0,040\%$ v/v; B: MeCN. Columna: YMC-Actus Triart C18 100*30mm*5µm. Velocidad de flujo: 25 ml/min. Longitud de onda de monitor: 220 y 254 nm. 10-30% de gradiente B durante 12 min.

2. Procedimientos analíticos de ADC

[00133] Se generaron perfiles de los ADC ya sea mediante cromatografía de intercambio aniónico (AEC) o mediante cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) para determinar el grado de conjugación y pureza de ADC.

Cromatografía de intercambio aniónico (AEC).

[00134] Se cargaron aproximadamente 20 µg de ADC en un sistema Ultimate 3000 Dual LC (Thermo Scientific) equipado con una columna Propac™ WAX-10 de 4 X 250 mm (Tosoh Bioscience, cat. 054999). La columna se equilibró con 100% de amortiguador A y se eluyó con un gradiente lineal de 100% de amortiguador A a 100% de amortiguador B durante 18 min a 1,0 ml/min, donde el amortiguador A es MES 20 mM, pH 6,7, y el amortiguador B es MES 20 mM, cloruro de sodio 500, pH 6,7.

Cromatografía de interacción hidrófoba (HIC).

[00135] Se cargaron aproximadamente 20 µg del ADC en un sistema Ultimate 3000 Dual LC (Thermo Scientific) equipado con una columna Butyl-NPR de 4,6 X 35 mm (Tosoh Bioscience, cat. 14947). La columna se equilibró en 100% de amortiguador A y se eluyó con un gradiente lineal de 100% de amortiguador A a 100% de amortiguador B durante 12 min a 0,8 ml/min, donde el amortiguador A es fosfato de sodio 25 mM, sulfato de amonio 1,5 M, pH 7,0, y el amortiguador B es fosfato de sodio 25 mM, 25% de isopropanol, pH 7,0.

Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC).

[00136] Se generaron perfiles de las distribuciones de tamaño de los ADC mediante SEC de exclusión por tamaño con un sistema Ultimate 3000 Dual LC (Thermo Scientific) equipado con una columna TSK-gel 3000SW_{XL} de 7,8 X 300 mm (Tosoh Bioscience, cat. 08541). Se cargaron aproximadamente 20 µg de ADC en la columna y se eluyó durante 17 min con un gradiente isocrático de sulfato de sodio 100 mM, fosfato de sodio 100 mM, pH 6,8, a una velocidad de flujo de 1,0 ml/min.

[00137] También se pueden realizar estudios de agregación mediante SEC, y el porcentaje del agregado puede medirse al integrar el área del pico de agregados según lo determinado mediante el estándar de filtración en gel (Bio-rad, 151-1901).

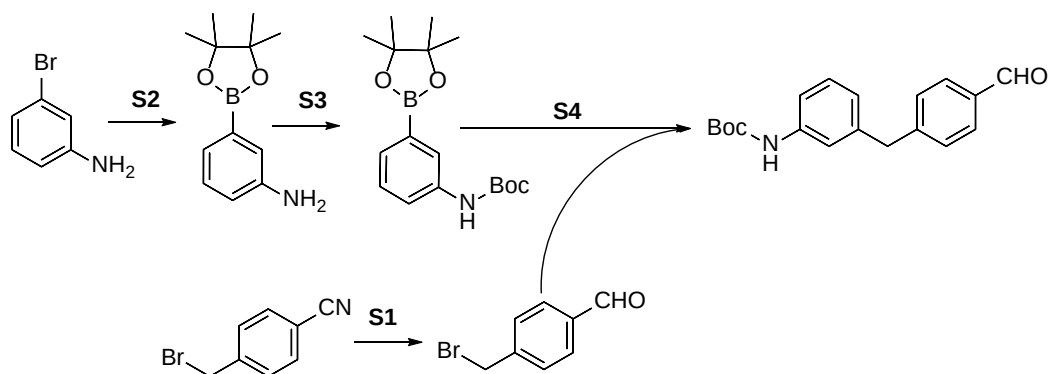
Espectroscopía de masas (MS).

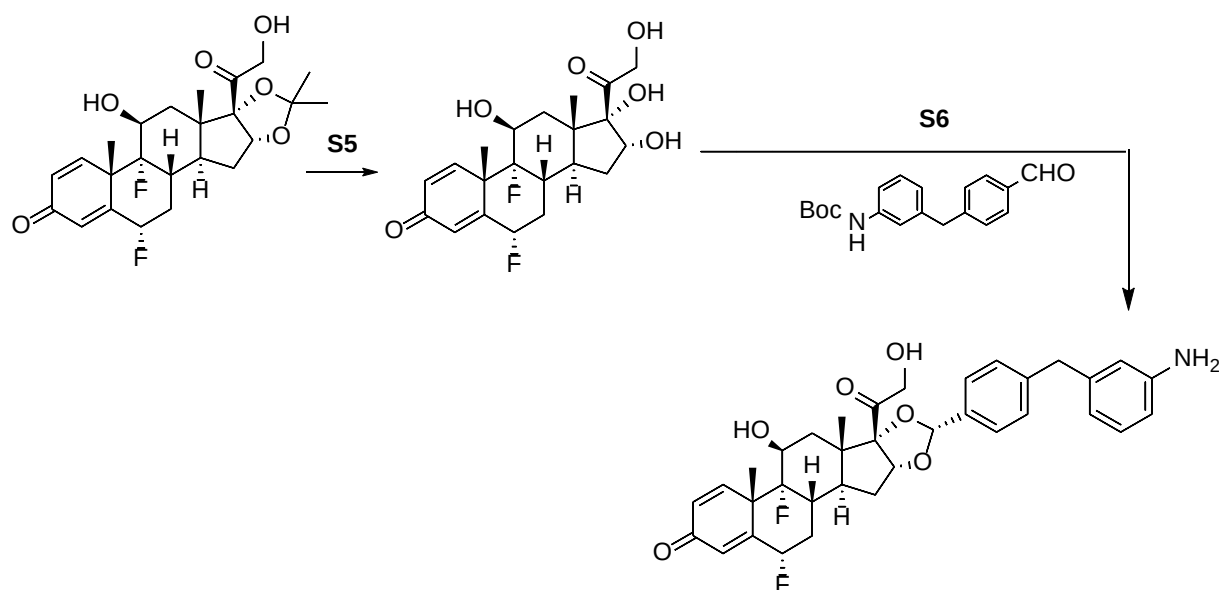
[00138] Se inyectaron muestras reducidas (10 µL) en un sistema Agilent 6550 QToF LC/MS mediante un automuestreador CTC con temperatura controlada (5°C). Se logró la elución de la muestra en una columna de HPLC Waters C-4, 3,5 µm, 300 Å, 2,1 x 50 mm i.d.. Las fases móviles fueron: A: 0,1% de ácido fórmico en agua, y B: 0,1% de ácido fórmico en acetonitrilo; la velocidad de flujo fue de 0,45 ml/min, y el compartimento de la columna se mantuvo a 40°C. El gradiente de HPLC es el siguiente:

Tabla 8. Gradiente para LCMS		
Tiempo (min)	% de A	% de B
0	95	5
0,6	95	5
1,1	10	90
2,2	10	90
2,4	95	5
3,5	95	5

SÍNTESIS DE MOLÉCULAS PRECURSORAS

Ejemplo de precursor 1: Síntesis de (2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-aminobencil)fenil)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-1,2,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-4H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-4-ona





[00139] Etapa 1: Síntesis of 4-(bromometil)benzaldehído. Se agregó hidruro de diisobutilaluminio (153 ml, 153 mmol, 1 M en tolueno) por goteo a una solución a 0°C de 4-(bromometil)benzonitrilo (20 g, 102 mmol) en tolueno (400 ml) durante 1 hora. Se prepararon dos reacciones adicionales como se describió anteriormente. Las tres mezclas de reacción se combinaron. A la mezcla se le agregó 10% de HCl acuoso (1,5 l). La mezcla se extrajo con diclorometano (3 x 500 ml). La capa orgánica se secó en Na₂SO₄, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna en gel de sílice (que se eluyó con éter de petróleo/acetato de etilo = 10/1) para obtener el compuesto del título (50 g, 82% de rendimiento). ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 10,02 (s, 1H), 7,91 - 7,82 (m, 2H), 7,56 (d, J=7,9 Hz, 2H), 4,55 - 4,45 (m, 2H).

[00140] Etapa 2: Síntesis de 3-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)anilina. A una solución de 3-bromoanilina (40 g, 233 mmol) en 1,4-dioxano (480 ml) se le agregaron 4,4,4',4',5,5,5',5'-tetrametil-2,2'-bi(1,3,2-dioxaborolano) (94 g, 372 mmol), acetato de potasio (45,6 g, 465 mmol), 2-diciclohexilfosfino-2',4',6'-tri-i-propil-1,1'-bifenilo (8,07 g, 13,95 mmol), tris(dibencilidenacetona)dipaladio(0) (8,52 g, 9,30 mmol). Luego, la mezcla resultante se calentó a 80°C durante 4 horas en nitrógeno. Se preparó una reacción adicional como se describió anteriormente. Las dos mezclas de reacción se combinaron y se concentraron y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna en gel de sílice (que se eluyó con éter de petróleo:acetato de etilo = 10:1) para obtener el compuesto del título (60 g, 55,4% de rendimiento). ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 7,23 - 7,13 (m, 3H), 6,80 (d, J=7,5 Hz, 1H), 3,82 - 3,38 (m, 2H), 1,34 (s, 12H).

[00141] Etapa 3: Síntesis de ter-butil (3-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenil)carbamato. El producto de la etapa 2 del Ejemplo de precursor 1 (30 g, 137 mmol) y dicarbonato de di-ter-butilo (38,9 g, 178 mmol) se mezclaron en tolueno (600 ml) a 100°C durante 24 horas. Se preparó otra reacción como se describió anteriormente. Las dos mezclas de reacción se combinaron y la mezcla marrón se evaporó, se disolvió en acetato de etilo (1,5 l), se lavó con HCl 0,1 N (3 x 2 l) y salmuera (3 l), se secó en Na₂SO₄, se filtró y se concentró a presión reducida para obtener el compuesto del título (50 g, 57% de rendimiento). ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 7,63 (br m, 2H), 7,48 (d, J=7,1 Hz, 1H), 7,37 - 7,28 (m, 1H), 1,52 (s, 9H), 1,34 (s, 12H). Boc = *ter*-butoxicarbonilo.

[00142] Etapa 4: Síntesis de ter-butil (3-(4-formilbencil)fenil)carbamato. Una mezcla del producto de la etapa 1 del Ejemplo de precursor 1 (24,94 g, 125 mmol), complejo de 1,1'-bis(difenilfosfino)ferrocendicloro paladio(II) diclorometano (13,75 g, 18,80 mmol), el producto de la etapa 3 del Ejemplo de precursor 1 (20 g, 62,7 mmol) y carbonato de potasio (43,3 g, 313 mmol) en tetrahidrofurano (400 ml) se calentó hasta 80°C durante 12 horas. Se preparó otra reacción adicional como se describió anteriormente. Las dos mezclas de reacción se combinaron y se diluyeron con agua (500 ml). La mezcla acuosa se extrajo con acetato de etilo (3 x 500 ml). Las capas orgánicas se combinaron y se secaron en Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna en gel de sílice (que se eluyó con éter de petróleo:acetato de etilo = 10:1) para obtener el compuesto del título (15 g, 38,4% de rendimiento). ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 9,95 (s, 1H), 7,78 (d, J=7,9 Hz, 2H), 7,33 (d, J=7,9 Hz, 2H), 7,27 - 7,13 (m, 3H), 6,82 (d, J=7,1 Hz, 1H), 6,47 (br. s., 1H), 4,00 (s, 2H), 1,48 (s, 9H).

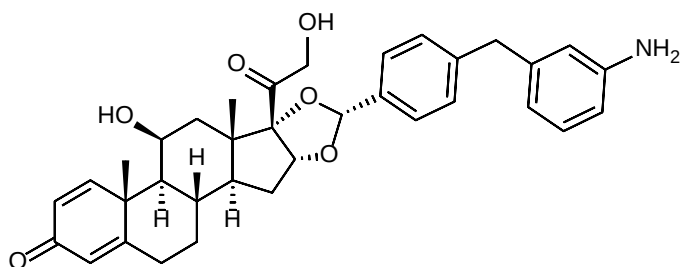
[00143] Etapa 5: Síntesis de (6S,8S,9R,10S,11S,13S,14S,16R,17S)-6,9-difluoro-11,16,17-trihidroxi-17-(2-hidroxiacetil)-10,13-dimetil-6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-dodecahidro-3H-ciclopenta[a]fenantren-3-ona. (2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,11aR,12aS,12bS)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a,10,10-tetrametil-1,2,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-4H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-4-ona (20 g, 44,2 mmol) se suspendió en 40% de HBF₄ acuoso (440 ml) y la mezcla se agitó a 25°C durante 48 horas. Después de completarse la reacción, se agregaron 2 l de H₂O y el sólido se recolectó mediante filtración. Este sólido se lavó con H₂O (1 l) y luego metanol (200 ml) para obtener el compuesto del título (11 g, 60,3% de rendimiento). ¹H NMR (400MHz, dimetilsulfóxido-d₆) δ 7,25 (d, J=10,1 Hz, 1H), 6,28 (d, J=10,1 Hz, 1H), 6,10 (s, 1H), 5,73 - 5,50 (m,

1H), 5,39 (br. s., 1H), 4,85 - 4,60 (m, 2H), 4,50 (d, J=19,4 Hz, 1H), 4,20 - 4,04 (m, 2H), 2,46 - 2,06 (m, 6H), 1,87 - 1,75 (m, 1H), 1,56 - 1,30 (m, 6H), 0,83 (s, 3H). dimetilsulfóxido = dimetilsulfóxido.

[00144] Etapa 6: Síntesis de (2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10S,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-aminobencil)fenil)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-1,2,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-4H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-4-ona. Una suspensión del producto de la etapa 5 del Ejemplo de precursor 1 (4,4 g, 10,67 mmol) y MgSO₄ (6,42 g, 53,3 mmol) en acetonitrilo (100 ml) se agitó a 20°C durante 1 hora. Una solución del producto de la etapa 4 del Ejemplo de precursor 1 (3,65 g, 11,74 mmol) en acetonitrilo (100 ml) se agregó en una porción. Se agregó ácido trifluorometansulfónico (9,01 ml, 53,3 mmol) por goteo mientras se mantenía una temperatura interna por debajo de la temperatura ambiente con un baño de hielo. Después de la adición, la mezcla se agitó a 20°C durante 2 horas. Se prepararon tres reacciones adicionales como se describió anteriormente. Las cuatro mezclas de reacción se combinaron y se concentraron y el residuo se purificó mediante HPLC preparativa para obtener el compuesto del título (4,5 g, 14,2% de rendimiento). LCMS (método a, Tabla 7) R_t = 2,65 min; MS m/z = 606,2 (M+H)⁺, ¹H NMR (400MHz, dimetilsulfóxido-d₆) δ 7,44 - 7,17 (m, 5H), 6,89 (t, J=7,7 Hz, 1H), 6,44 - 6,25 (m, 4H), 6,13 (br. s., 1H), 5,79 - 5,52 (m, 2H), 5,44 (s, 1H), 5,17 - 4,89 (m, 3H), 4,51 (d, J=19,4 Hz, 1H), 4,25 - 4,05 (m, 2H), 3,73 (s, 2H), 3,17 (br. s., 1H), 2,75 - 2,55 (m, 1H), 2,36 - 1,97 (m, 3H), 1,76 - 1,64 (m, 3H), 1,59 - 1,39 (m, 4H), 0,94 - 0,78 (m, 3H). Método de HPLC preparativa: Instrumento: sistema de HPLC semipreparativa Gilson 281; Fase móvil: A: ácido fórmico/H₂O = 0,01% v/v; B: acetonitrilo; Columna: Luna C18 150*25 5 micrómetros; Velocidad de flujo: 25 ml/min; Longitud de onda de monitor: 220 y 254 nm.

Tabla 9. Condiciones de fase móvil para el eluyente B							
Tiempo (min)	0,0	10,5	10,6	10,7	13,7	13,8	15,0
% de B	15	35	35	100	100	10	10

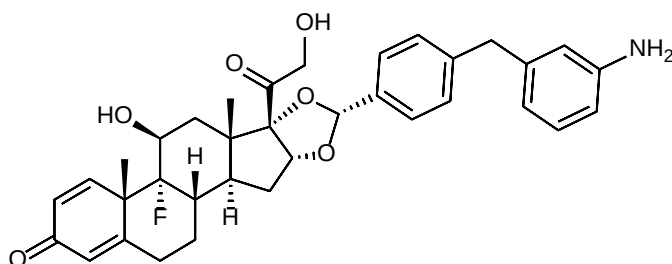
Ejemplo de precursor 2: Síntesis de (6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-aminobencil)fenil)-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-1,2,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-4H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-4-ona.



[00145] El producto del Ejemplo de precursor 2 se sintetizó en un procedimiento similar al Ejemplo de precursor 1 con (6aR,6bS,7S,8aS,8bS,11aR,12aS,12bS)-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetyl)-6a,8a,10,10-tetrametil-1,2,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-4H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-4-ona.

[00146] ^1H NMR (400MHz, dimetilsulfóxido- d_6) δ 7,36 (d, $J=7,9$ Hz, 2H), 7,31 (d, $J=10,1$ Hz, 1H), 7,20 (d, $J=7,9$ Hz, 2H), 6,89 (t, $J=7,9$ Hz, 1H), 6,39 - 6,28 (m, 3H), 6,16 (dd, $J=1,5, 9,9$ Hz, 1H), 5,93 (s, 1H), 5,39 (s, 1H), 5,08 (t, $J=5,7$ Hz, 1H), 4,98 - 4,87 (m, 3H), 4,78 (d, $J=3,1$ Hz, 1H), 4,49 (dd, $J=6,2, 19,4$ Hz, 1H), 4,29 (br. s., 1H), 4,17 (dd, $J=5,5, 19,6$ Hz, 1H), 3,74 (s, 2H), 2,61 - 2,53 (m, 1H), 2,36 - 2,26 (m, 1H), 2,11 (d, $J=11,0$ Hz, 1H), 2,07 (s, 1H), 2,02 (d, $J=12,8$ Hz, 1H), 1,83 - 1,54 (m, 5H), 1,39 (s, 3H), 1,16 - 0,96 (m, 2H), 0,85 (s, 3H). LCMS (método a, Tabla 7) R_t = 2,365 min; m/z = 570,2 ($M+H$) $^+$.

Ejemplo de precursor 3: Síntesis de (6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-aminobencil)fenil)-6b-fluoro-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetyl)-6a,8a-dimetil-1,2,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-4H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-4-ona.

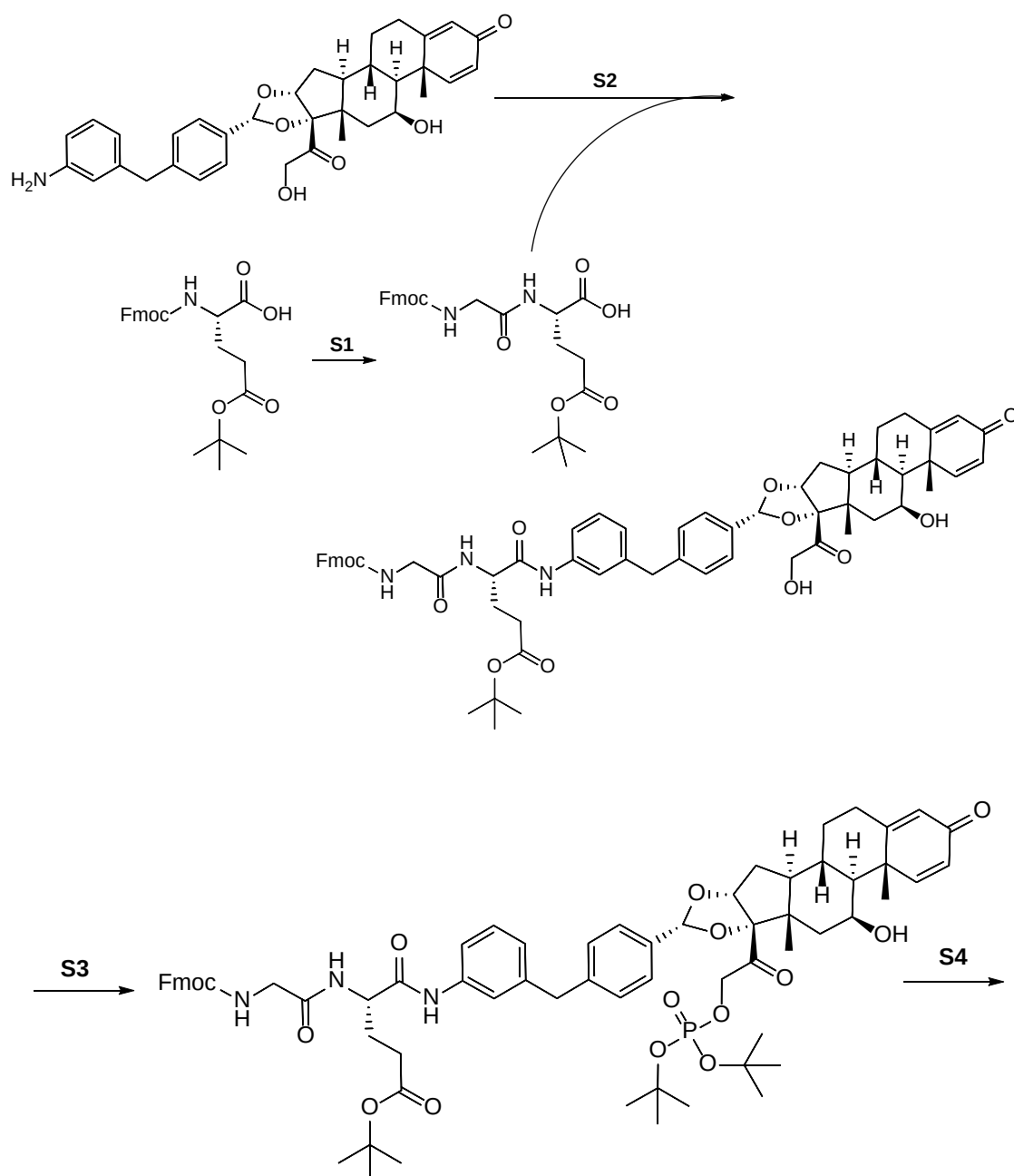


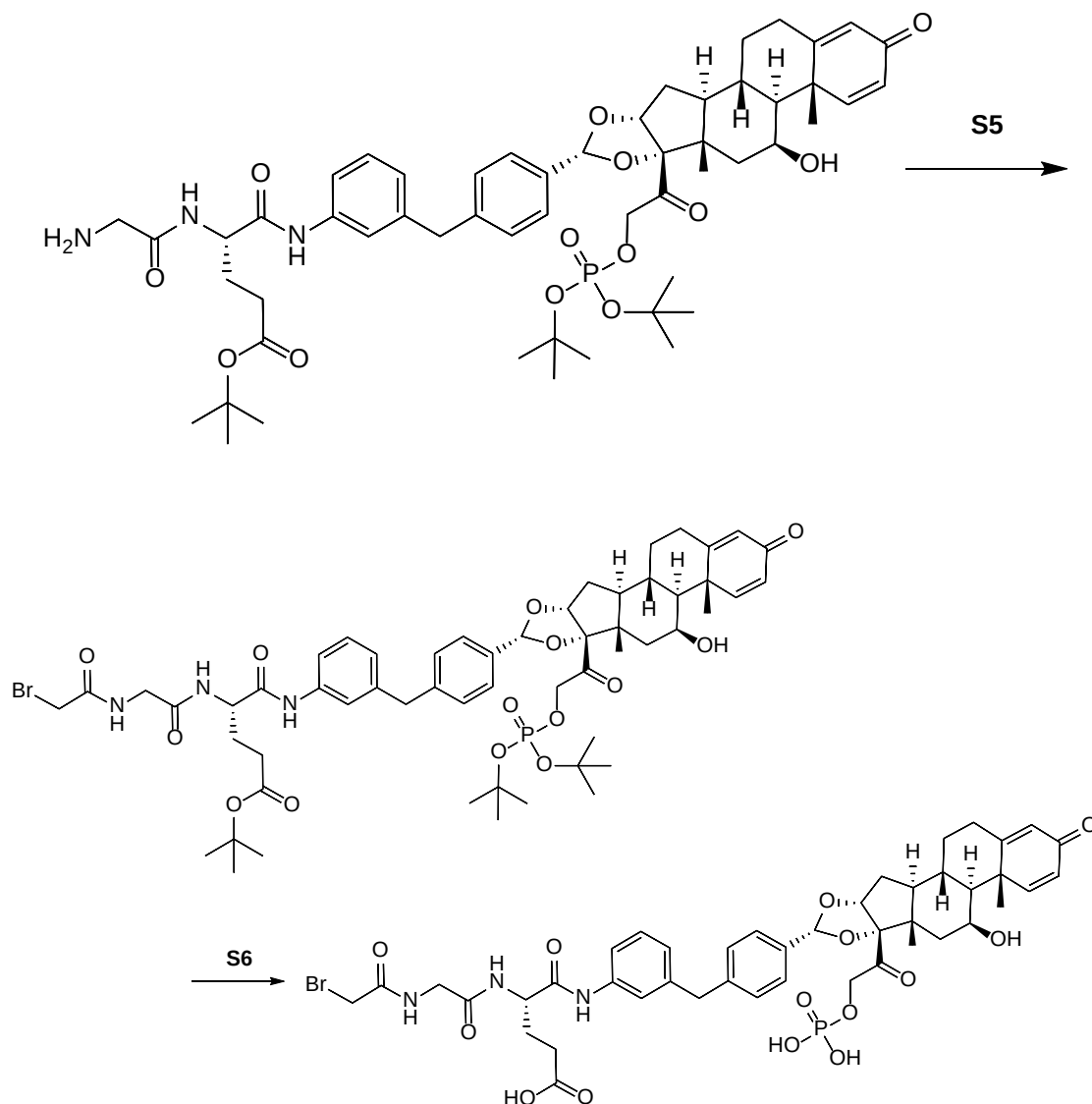
[00147] El producto del Ejemplo de precursor 3 se sintetizó en un procedimiento similar al Ejemplo de precursor 1 con (6aS,6bR,7S,8aS,8bS,11aR,12aS,12bS)-6b-fluoro-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetyl)-6a,8a,10,10-tetrametil-1,2,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-4H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-4-ona.

[00148] ^1H NMR (400MHz, dimetilsulfóxido- d_6) δ 7,37 - 7,26 (m, 3H), 7,21 (d, $J=7,9$ Hz, 2H), 6,89 (t, $J=7,7$ Hz, 1H), 6,43 - 6,30 (m, 3H), 6,23 (d, $J=10,1$ Hz, 1H), 6,04 (s, 1H), 5,75 (s, 1H), 5,44 (s, 2H), 5,09 (t, $J=5,7$ Hz, 1H), 4,93 (br. s., 3H), 4,50 (dd,

$J=6,2, 19,4$ Hz, 1H), 4,28 - 4,09 (m, 2H), 3,74 (s, 2H), 2,73 - 2,54 (m, 2H), 2,35 (d, $J=13,2$ Hz, 1H), 2,25 - 2,12 (m, 1H), 2,05 (d, $J=15,0$ Hz, 1H), 1,92 - 1,77 (m, 1H), 1,74 - 1,58 (m, 3H), 1,50 (s, 3H), 1,45 - 1,30 (m, 1H), 0,87 (s, 3H). LCMS (método a, Tabla 7) $R_t = 2,68$ min; $m/z = 588,1$ (M+H)⁺.

Ejemplo de precursor 4: Síntesis de ácido (S)-4-(2-(2-bromoacetamido)acetamido)-5-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-8b-(2-(fosfonooxi)acetil)-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-5-oxopentanoico





[00149] Etapa 1: Síntesis de ácido (S)-2-(2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)acetamido)-5-(ter-butoxi)-5-oxopentanoico. Una mezcla de resina de cloruro de 2-clorotritilo (30 g, 92 mmol), trietilamina (46,4 g, 458 mmol) y ácido (S)-2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-5-(ter-butoxi)-5-oxopentanoico (25,5 g, 60 mmol) en diclorometano seco (200 ml) se burbujeó con N₂ a 20°C durante 8 horas. La mezcla se filtró y la resina se lavó con diclorometano (2 x 200 ml), metanol (MeOH) (2 x 200 ml) y dimetilformamida (2 x 200 ml). A la resina se le agregó una solución de piperidina:dimetilformamida (1:4, 400 ml) y la mezcla se burbujeó con N₂ durante 8 minutos y luego se filtró. Esta operación se repitió cinco veces para obtener la eliminación completa del grupo protector de 9-fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc). La resina se lavó con dimetilformamida (5 x 500 ml) para obtener ácido (S)-2-amino-5-(ter-butoxi)-5-oxopentanoico fijado a la resina. Una mezcla de ácido 2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)acético (13,38 g, 45,0 mmol), N,N-diisopropiletilamina (7,86

ml, 45 mmol), hidroxibenzotriazol (6,89 g, 45 mmol), hexafluorofosfato de 2-(6-cloro-1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilisouronio (V) (18,62 g, 45,0 mmol) en dimetilformamida (200 ml) se agitó a 20°C durante 30 min. A la mezcla se le agregó el ácido (S)-2-amino-5-(ter-butoxi)-5-oxopentanoico fijado a la resina y la mezcla resultante se burbujeó con N₂ a 25°C durante 1,5 horas. La mezcla se filtró y la resina se lavó con dimetilformamida (4 x 500 ml) y diclorometano (2 x 500 ml). A la mezcla se le agregó 1% de ácido trifluoroacético/diclorometano (5 x 500 ml) y se burbujeó con N₂ durante 5 min. La mezcla se filtró y el filtrado se agregó a una solución saturada de NaHCO₃ (200 ml) directamente. La mezcla combinada se separó y la fase orgánica se lavó con solución saturada de ácido cítrico y agua (4 x 400 ml) y salmuera (2 x 300 ml). La solución orgánica final se secó en Na₂SO₄ (20 g), se filtró y se concentró a presión reducida para obtener el compuesto del título (10 g, 20% de rendimiento). ¹H NMR: (CDCl₃, 400 MHz) δ 7,75 (d, J = 7,5 Hz, 2H), 7,59 (br d, J = 7,5 Hz, 2H), 7,41 - 7,36 (m, 2H), 7,30 (t, J = 7,0 Hz, 2H), 5,82 (br s, 1H), 4,57 (br d, J = 4,8 Hz, 1H), 4,38 (br d, J = 7,5 Hz, 2H), 4,27 - 4,15 (m, 1H), 4,06 - 3,83 (m, 2H), 2,50 - 2,29 (m, 2H), 2,26 - 2,13 (m, 1H), 2,06 - 2,02 (m, 1H), 1,43 (s, 9H).

[00150] Etapa 2: Síntesis de ter-butil (S)-4-(2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)acetamido)-5-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-5-oxopentanoato. A una solución del producto de la etapa 1 del Ejemplo 4 (424 mg, 0,878 mmol) en dimetilformamida (3,5 ml) se le agregaron el Ejemplo 2 (500 mg, 0,878 mmol) y trietilamina (0,3 ml, 2,63 mmol) a 25°C. La solución se enfrió hasta 0°C y luego se agregó 2,4,6-trióxido de 2,4,6-tripropil-1,3,5,2,4,6-trioxatrilfosfinano (1,12 g, 1,755 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 12 horas a 25°C. LCMS mostró que la reacción se había completado. Se prepararon catorce reacciones adicionales como se describió anteriormente. Las tres mezclas de reacción se combinaron. La mezcla se purificó mediante columna de fase inversa para obtener el compuesto del título (5 g, 38,4% de rendimiento) como un sólido amarillo. Método de columna de fase inversa: Instrumento: HPLC preparativa Shimadzu LC-8A; Columna: Phenomenex Luna C18 200*40 mm*10 μm; Fase móvil: A para H₂O (0,05% de ácido trifluoroacético) y B para acetonitrilo; Gradiente: B de 30% a 100% en 30 minutos; Velocidad de flujo: 60 ml/min; Longitud de onda: 220 y 254 nm. LCMS (método a, Tabla 7) R_t = 1,34 min; m/z 1016,6 (M+H-18)⁺.

[00151] Etapa 3: Síntesis de ter-butil (S)-4-(2-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)acetamido)-5-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((di-ter-butoxifosforil)oxi)acetil)-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-5-oxopentanoato. A una solución del producto de la etapa 2 del Ejemplo 4 (400 mg, 0,387 mmol) en dimetilformamida (2,5 ml) se le agregaron 1H-tetrazol (271 mg, 3,87 mmol) y di-ter-butil dietilfosforamidita (1,16 g, 4,64 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2,5 horas y luego se enfrió hasta 0°C. Se agregó peróxido de hidrógeno (241 mg, 2,127 mmol) a la mezcla resultante, se calentó hasta temperatura ambiente y se agitó durante 1 hora, después de lo cual LCMS mostró que la reacción se había completado. Se prepararon once reacciones adicionales como se describió anteriormente. Las doce mezclas de reacción se combinaron. La mezcla se purificó mediante columna de fase inversa para obtener el compuesto del título (4,4 g, 64,2% de rendimiento). Método de columna de fase inversa: Instrumento: HPLC preparativa Shimadzu LC-8A; Columna: Phenomenex Luna C18 200*40 mm*10 µm; Fase móvil: A para H₂O y B para acetonitrilo; Gradiente: B de 50% a 100% en 30 minutos; Velocidad de flujo: 60 ml/min; Longitud de onda: 220 y 254 nm. LCMS (método a, Tabla 7) R_t = 1,41 min; m/z 1226,7 (M+H)⁺.

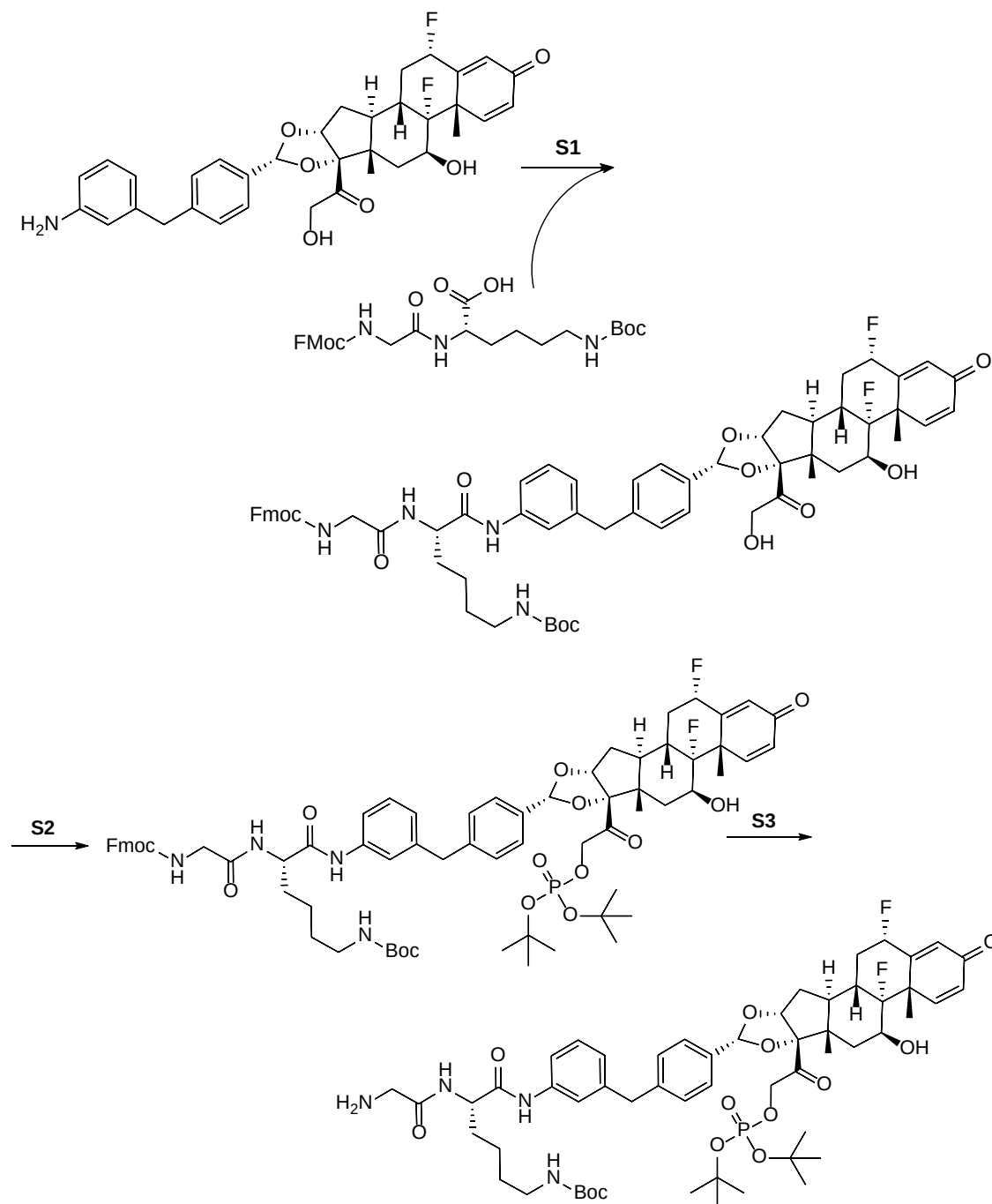
[00152] Etapa 4: Síntesis de ter-butil (S)-4-(2-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)acetamido)-5-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((di-ter-butoxifosforil)oxi)acetil)-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-5-oxopentanoato. A una solución del producto de la etapa 3 del Ejemplo 4 (1,1 g, 0,897 mmol) en acetonitrilo (6 ml) se le agregó piperidina (0,75 ml, 7,58 mmol) a 25°C. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 20 min, después de lo cual LCMS mostró que la reacción se había completado. Se prepararon tres reacciones adicionales como se describió anteriormente. Las cuatro mezclas de reacción se combinaron. La mezcla se concentró para obtener un residuo, que se trató con éter de petróleo (10 ml) con agitación durante 2 horas. El sólido resultante se recolectó mediante filtración, y se secó a presión reducida para obtener el compuesto del título (3,8 g, 90% de rendimiento). LCMS (método a, Tabla 7) R_t = 1,16 min; m/z 1004,6 (M+H)⁺.

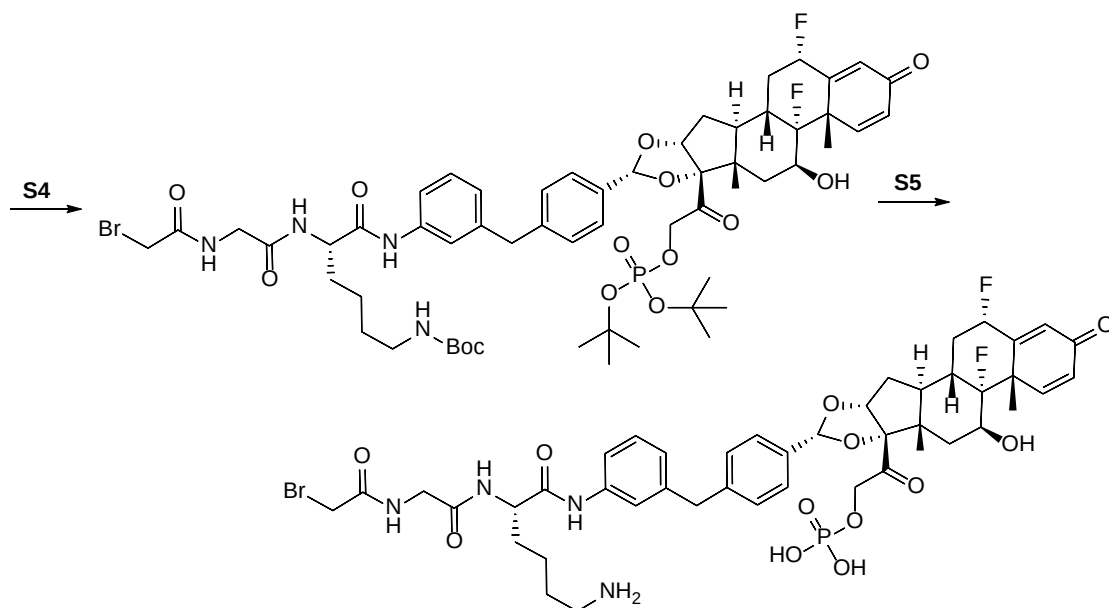
[00153] Etapa 5: Síntesis de ter-butil (S)-4-(2-(2-bromoacetamido)acetamido)-5-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((di-ter-

butoxifosforil)oxi)acetil)-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-5-oxopentanoato. A una solución de ácido 2-bromoacético (97 mg, 0,697 mmol) en dimetilformamida (2,5 ml) se le agregó 2-etoxi-1-etoxycarbonil-1,2-dihidroquinolina (EEDQ) (172 mg, 0,697 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se agregó el producto de la etapa 4 del Ejemplo 4 (350 mg, 0,349 mmol) y la mezcla resultante se agitó durante 2,5 horas, después de lo cual LCMS mostró que la reacción se había completado. Se prepararon siete reacciones adicionales como se describió anteriormente. Las ocho mezclas de reacción se combinaron. La reacción se diluyó con diclorometano (100 ml), se lavó con HBr acuoso (1 M, 2 x 80 ml), NaHCO₃ acuoso (60 ml), salmuera (60 ml). La capa orgánica se secó en Na₂SO₄, se filtró y se concentró a presión reducida para obtener el compuesto del título (2 g, 63,7% de rendimiento). LCMS (método a, Tabla 7) R_t = 1,30 min; m/z 1126,4 (M+H)⁺.

[00154] Etapa 6: Síntesis de ácido (S)-4-(2-(2-bromoacetamido)acetamido)-5-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-8b-(2-(fosfonooxi)acetil)-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-5-oxopentanoico. A una solución del producto de la etapa 5 del Ejemplo 4 (2 g, 1,778 mmol) en diclorometano (16 ml) se le agregó ácido trifluoroacético (8 ml, 104 mmol) y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 40 min, después de lo cual LCMS mostró que la reacción se había completado. Se eliminó el solvente a presión reducida. El residuo resultante se purificó mediante HPLC preparativa. La fase móvil se liofilizó directamente para obtener el compuesto del título (640 mg, 35,3% de rendimiento). Método de HPLC preparativa: Instrumento: HPLC preparativa Shimadzu LC-8A; Columna: Phenomenex Luna C18 200*40 mm*10 µm; Fase móvil: A para H₂O (0,09% de ácido trifluoroacético) y B para acetonitrilo; Gradiente: B de 30% a 40% en 20 minutos; Velocidad de flujo: 60 ml/min; Longitud de onda: 220 y 254 nm. ¹H NMR: (dimetilsulfóxido-d₆, 400 MHz) δ 9,88 (s, 1H), 8,52 (s, 1H), 8,24 (br d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,46 (br d, J = 7,9 Hz, 1H), 7,42 (s, 1H), 7,36 (br d, J = 7,9 Hz, 2H), 7,30 (br d, J = 9,7 Hz, 1H), 7,23 - 7,17 (m, 3H), 6,90 (br d, J = 6,8 Hz, 1H), 6,16 (br d, J = 10,4 Hz, 1H), 5,93 (s, 1H), 5,47 (s, 1H), 4,96 - 4,85 (m, 3H), 4,58 (br dd, J = 7,9, 18,7 Hz, 1H), 4,38 (br d, J = 5,3 Hz, 1H), 4,29 (br s, 1H), 3,93 (s, 2H), 3,89 (s, 2H), 3,80 (br s, 2H), 2,30 - 2,22 (m, 2H), 2,16 - 1,91 (m, 4H), 1,85 - 1,62 (m, 6H), 1,39 (s, 3H), 1,00 (br s, 2H), 0,87 (s, 3H). LCMS (método a, Tabla 7) R_t = 2,86 min; m/z 956,0, 958,0 (M+H)⁺.

Ejemplo de precursor 5: Síntesis de 2-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-((S)-6-amino-2-(2-(2-bromoacetamido)acetamido)hexanamido)bencil)fenil)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-1,2,4,6a,6b,7,8,8a,11a,12,12a,12b-dodecahidro-8bH-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-8b-il)-2-oxoetil dihidrógeno fosfato.





[00155] Etapa 1: Síntesis de ter-butil ((S)-5-(2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)acetamido)-6-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-6-oxohexil)carbamato. A una solución de N²-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)glicil)-N6-(ter-butoxicarbonil)-L-lisina (5,58 g, 8,26 mmol) en dimetilformamida (60 ml) a 0°C se le agregaron 2,4,6-trióxido de 2,4,6-tripropil-1,3,5,2,4,6-trioxatrilfosfinano (10,51 g, 16,51 mmol) y trietilamina (3,45 ml, 24,77 mmol). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora y luego se agregó el producto de la etapa 6 del Ejemplo de precursor 1 (5 g, 8,26 mmol). La mezcla resultante se agitó durante 5 horas a temperatura ambiente, después de lo cual LCMS mostró que la reacción se había completado. Se prepararon seis reacciones adicionales como se describió anteriormente. Las siete mezclas de reacción se combinaron. La reacción se purificó mediante columna de fase inversa para obtener el compuesto del título (24 g, 24,62% de rendimiento). Método de columna de fase inversa: Instrumento: HPLC preparativa Shimadzu LC-8A; Columna: Phenomenex Luna C18 200*40 mm*10 µm; Fase móvil: A para H₂O (0,05% de ácido trifluoroacético) y B para acetonitrilo; Gradiente: B de 30% a 100% en 30 min; Velocidad de flujo: 60 ml/min; Longitud de onda: 220 y 254 nm. LCMS (método a, Tabla 7) R_t = 1,29 min; m/z 1095,6 (M+H-18)⁺. Fmoc = fluorenilmetiloxycarbonilo; Boc = terbutoxicarbonilo.

[00156] Etapa 2: Síntesis de ter-butil ((S)-5-(2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)acetamido)-6-((3-(4-

((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((di-ter-butoxifosforil)oxi)acetil)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-6-oxohexil)carbamato. A una solución del producto de la etapa 1 del Ejemplo 5 (3 g, 2,69 mmol) en dimetilformamida (30 ml) se le agregó 1H-tetrazol (1,888 g, 26,9 mmol) y di-ter-butil dietilfosforamidita (8,06 g, 32,3 mmol) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3,5 horas. Se agregó peróxido de hidrógeno (224 mg, 1,97 mmol) a la reacción y se agitó durante 0,5 horas, después de lo cual LCMS mostró que la reacción se había completado. Se prepararon seis reacciones adicionales como se describió anteriormente. Las siete mezclas de reacción se combinaron. La reacción se purificó mediante columna de fase inversa para obtener el compuesto del título (10 g, pureza: 78%, 37,1% de rendimiento). Método de columna de fase inversa: Instrumento: HPLC preparativa Shimadzu LC-8A; Columna: Phenomenex Luna C18 200*40 mm*10 µm; Fase móvil: A para H₂O y B para acetonitrilo; Gradiente: B de 50% a 100% en 30 min; Velocidad de flujo: 60 ml/min; Longitud de onda: 220 y 254 nm. LCMS (método a, Tabla 7) R_t = 1,42 min; m/z 1305,7 (M+H)⁺.

[00157] Etapa 3: Síntesis de ter-butil ((S)-5-(2-aminoacetamido)-6-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((di-ter-butoxifosforil)oxi)acetil)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-6-oxohexil)carbamato. A una solución del producto de la etapa 2 del Ejemplo 5 (2,5 g, 1,969 mmol) en acetonitrilo (10 ml) se le agregó piperidina (2 ml, 1,969 mmol) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora, después de lo cual LCMS mostró que la reacción se había completado. Se prepararon tres reacciones adicionales como se describió anteriormente. Las cuatro mezclas de reacción se combinaron. La reacción se concentró para obtener un producto crudo, que se agitó en éter de petróleo (30 ml) durante 2 horas. El sólido resultante se recolectó mediante filtración y se secó a presión reducida para obtener el compuesto del título (7 g, pureza: 83%, 70,4% de rendimiento) como un sólido amarillo. LCMS (método a, Tabla 7) R_t = 1,17 min; m/z 1083,5 (M+H)⁺.

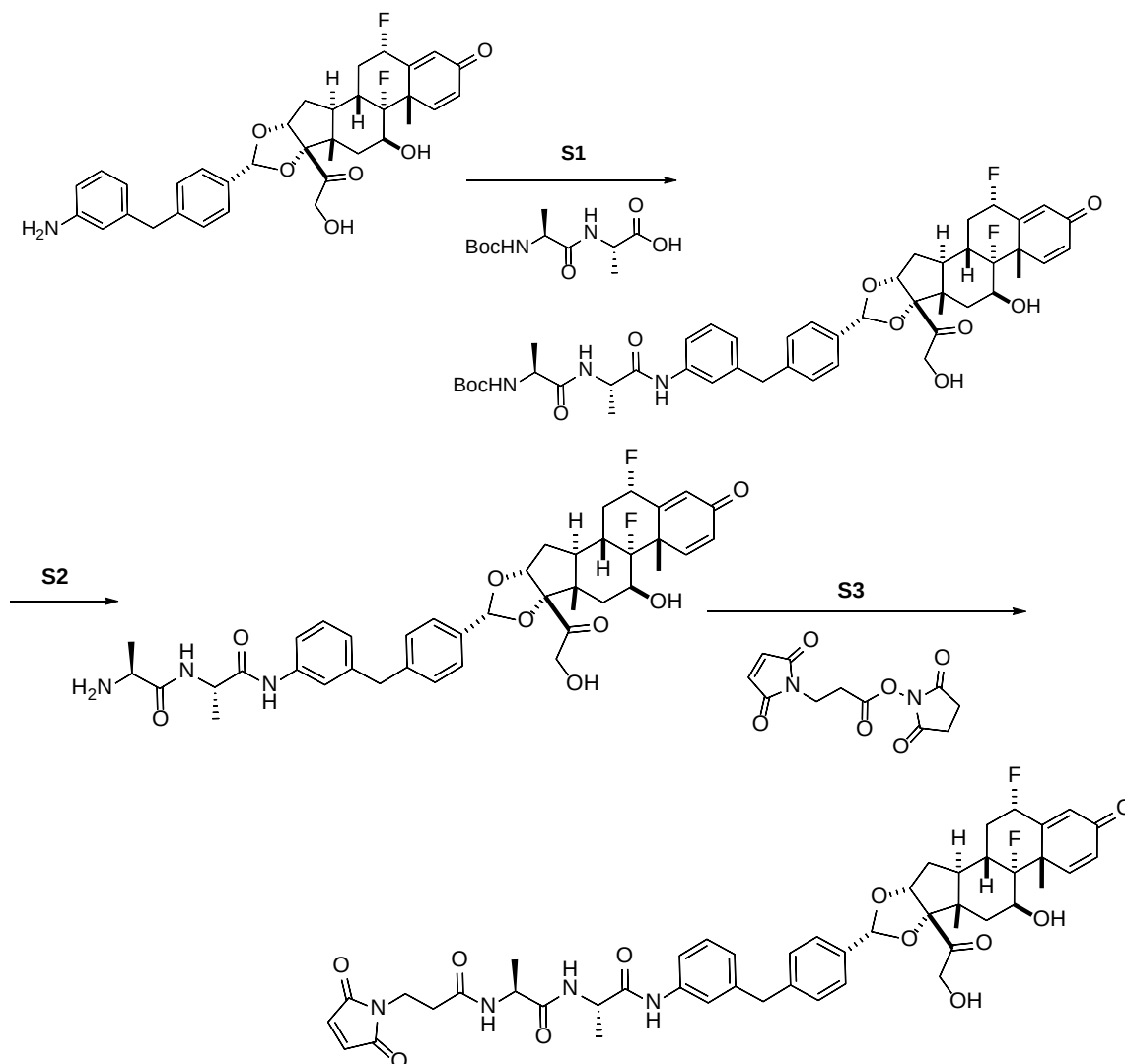
[00158] Etapa 4: Síntesis de ter-butil ((S)-5-(2-(2-bromoacetamido)acetamido)-6-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((di-ter-butoxifosforil)oxi)acetil)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-

2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-6-oxohexil)carbamato. A una solución de ácido 2-bromoacético (0,929 g, 6,68 mmol) en dimetilformamida (35 ml) se le agregó 2-etoxi-1-etoxicarbonil-1,2-dihidroquinolina (1,653 g, 6,68 mmol) y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se agregó el producto de la etapa 3 del Ejemplo 5 (3,5 g, 3,34 mmol) y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. LCMS mostró que la reacción se había completado. La reacción se diluyó con diclorometano (100 ml), se lavó con HBr acuoso (1 M, 2 X 80 ml), NaHCO₃ acuoso (60 ml) y salmuera (60 ml). La capa orgánica se secó en Na₂SO₄, se filtró y se concentró a presión reducida para obtener el compuesto del título (2 g, 51,2% de rendimiento). LCMS (método a, Tabla 7) R_t = 1,32 min; m/z 1205,5 (M+H)⁺.

[00159] Etapa 5: Síntesis de 2-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-((S)-6-amino-2-(2-(2-bromoacetamido)acetamido)hexanamido)bencil)fenil)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-1,2,4,6a,6b,7,8,8a,11a,12,12a,12b-dodecahidro-8bH-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-8b-il)-2-oxoetil dihidrógeno fosfato. A una solución del producto de la etapa 4 del Ejemplo 5 (2 g, 1,661 mmol) en diclorometano (10 ml) se le agregó ácido trifluoroacético (5 ml, 64,9 mmol) y la reacción se agitó a rt durante 40 min, después de lo cual LCMS mostró que la reacción se había completado. El solvente se eliminó a presión reducida y el producto crudo se purificó mediante HPLC preparativa. La fase móvil se liofilizó directamente para obtener el compuesto del título (550 mg, pureza: 96,9%, 32,3% de rendimiento). Método de HPLC preparativa: Instrumento: HPLC preparativa Shimadzu LC-8A; Columna: Phenomenex Luna C18 200*40 mm*10 µm; Fase móvil: A para H₂O (0,09% de ácido trifluoroacético) y B para acetonitrilo; Gradiente: B de 30% a 40% en 20 min; Velocidad de flujo: 60 ml/min; Longitud de onda: 220 y 254 nm. LCMS (método a, Tabla 7) R_t = 2,31 min. ¹H NMR: (dimetilsulfóxido-d₆, 400 MHz) δ ppm 0,90 (s, 3 H) 1,19 - 1,41 (m, 2 H) 1,43 - 1,62 (m, 7 H) 1,64 - 1,77 (m, 3 H) 1,84 (br d, J=14,55 Hz, 1 H) 1,95 - 2,07 (m, 1 H) 2,18 - 2,36 (m, 3 H) 2,65 - 2,78 (m, 3 H) 3,71 - 3,86 (m, 3 H) 3,89 (s, 2 H) 3,93 (s, 2 H) 4,20 (br d, J=9,48 Hz, 1 H) 4,33 - 4,41 (m, 1 H) 4,59 (br dd, J=18,41, 8,05 Hz, 1 H) 4,81 (br dd, J=18,52, 8,60 Hz, 1 H) 4,94 (d, J=4,63 Hz, 1 H) 5,50 (s, 1 H) 5,54 - 5,76 (m, 1 H) 6,13 (s, 1 H) 6,29 (dd, J=10,14, 1,32 Hz, 1 H) 6,95 (d, J=7,72 Hz, 1 H) 7,15 - 7,28 (m, 4 H) 7,30 - 7,41 (m, 3 H) 7,51 (br d, J=7,94 Hz, 1 H) 7,72 (br s, 3 H) 8,21 (br d, J=7,72 Hz, 1 H) 8,54 (t, J=5,62 Hz, 1 H) 9,93 (br d, J=2,65 Hz, 1 H).

Ejemplo de precursor 6: Síntesis de (S)-N-(3-(4-

((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)-2-((S)-2-(3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanamido)propanamido)propanamida.



[00160] Etapa 1: Síntesis de *ter*-butil ((S)-1-(((S)-1-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)carbamato. Se agregaron hexafluorofosfato de 3-óxido de 1-[bis(dimetilamino)metilen]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio (HATU) (610 mg, 1,605 mmol) y 2,6-lutidina (0,3 ml, 2,58 mmol) a una mezcla a temperatura ambiente del producto de la etapa 6 del Ejemplo de precursor 1 (648,1 mg, 1,070 mmol) y ácido (S)-2-((S)-2-((*ter*-butoxicarbonil)amino)propanamido)propanoico (334 mg, 1,284 mmol) en THF (11,5 ml). Después de 9 horas, la reacción se diluyó con acetato de etilo (16 ml),

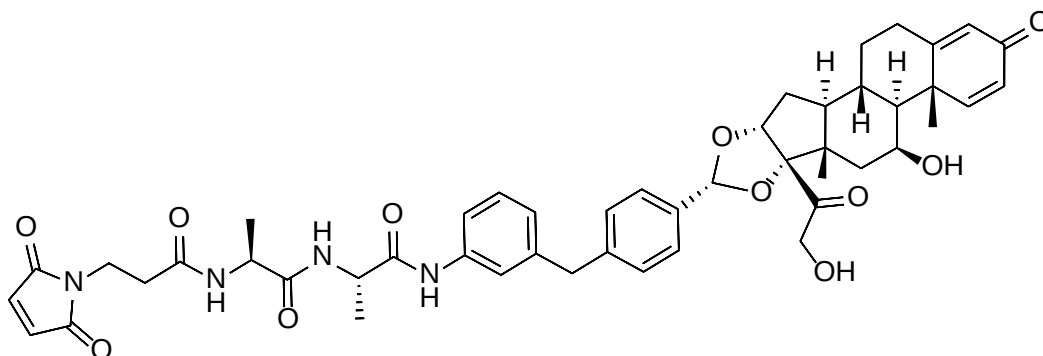
y luego se lavó con una solución acuosa de HCl 1 N (3 X 4 ml), seguida de una solución acuosa saturada de salmuera (4 ml). De la purificación mediante cromatografía (sílice, 40 g), que se eluyó con un gradiente de 0-10% de metanol/diclorometano, se obtuvo el compuesto del título (773,7 mg, 0,912 mmol, 85% de rendimiento). LCMS (método b, Tabla 7) R_t = 0,92 min, m/z = 848,53 $[M+H^+]$.

[00161] Etapa 2: Síntesis de (S)-2-amino-N-((S)-1-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)propanamida. Se agregó ácido trifluoroacético (1,97 ml, 25,6 mmol) por goteo a una solución a temperatura ambiente del producto de la etapa 1 del Ejemplo 6 (0,7683 g, 0,906 mmol) en diclorometano (6,0 ml). Después de 50 min, el solvente se eliminó a presión reducida para obtener un jarabe marrón. El residuo se disolvió en 1:1 dimetil sulfóxido:metanol (12 ml) y se purificó mediante HPLC de fase inversa en una columna Phenomenex C18(2) de 10 micrómetros (columna de 250 x 50 mm). Se usó un gradiente de acetonitrilo (A) y 0,1% de ácido trifluoroacético en agua (B), a una velocidad de flujo de 90 ml/min (0-5,0 min 15% de A, 5,0-20 min gradiente lineal de 15-75% de A, mantenido durante 2 min, 22,0-22,5 min gradiente lineal de 75-95% A, mantenido durante 4 min). Las fracciones combinadas se concentraron a presión reducida hasta secarse y el residuo se secó durante la noche en el horno de vacío a 50°C para obtener el compuesto del título (230 mg, 0,308 mmol, 34% de rendimiento). LC-MS (método b, Tabla 7) isómero de acetal mayor R_t = 0,73 min, m/z = 748,78 $[M+H^+]$. ^1H NMR (400 MHz, dimetilsulfóxido- d_6) δ 10,01 (s, 1H), 8,62 (d, J = 7,2 Hz, 1H), 8,04 (d, J = 5,4 Hz, 3H), 7,46 – 7,31 (m, 4H), 7,31 – 7,13 (m, 4H), 6,91 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 6,27 (dd, J = 10,2, 1,9 Hz, 1H), 6,11 (s, 1H), 5,76 – 5,47 (m, 2H), 5,43 (s, 1H), 4,93 (d, J = 4,6 Hz, 1H), 4,49 (d, J = 19,5 Hz, 1H), 4,42 (q, J = 7,1 Hz, 1H), 4,23 – 4,13 (m, 2H), 2,72 – 2,54 (m, 1H), 2,33 – 2,16 (m, 2H), 2,02 (dt, J = 13,6, 3,6 Hz, 1H), 1,69 (h, J = 5,9, 5,1 Hz, 3H), 1,48 (s, 4H), 1,33 (d, J = 7,0 Hz, 3H), 1,30 (d, J = 7,1 Hz, 3H), 0,85 (s, 3H).

[00162] Etapa 3: Síntesis de (S)-N-(3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)-2-((S)-2-(3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanamido)propanamido)propanamida. Se agregó diisopropiletilamina (0,1 ml, 0,573 mmol) a una solución a temperatura ambiente del

producto de la etapa 2 del Ejemplo 6 (0,220 g, 0,294 mmol) y *N*-succinimidil 3-maleimidopropionato (0,086 g, 0,324 mmol) en dimetilformamida (2,8 ml). Después de 30 min, el pH de la mezcla de reacción se ajustó hasta 4-5 mediante la adición por goteo de una solución al 7% de ácido trifluoroacético en agua (1,0 ml). La mezcla cruda se purificó mediante HPLC de fase inversa en una columna Phenomenex C18(2) de 10 micrómetros (columna de 250 x 50 mm). Se usó un gradiente de acetonitrilo (A) y 0,1% de ácido trifluoroacético en agua (B), a una velocidad de flujo de 90 ml/min (0-5,0 min 15% de A, 5,0-20 min gradiente lineal de 15-85% de A, mantenido durante 2 min). Las fracciones combinadas se concentraron a presión reducida para eliminar los solventes volátiles, y la solución resultante se congeló y se liofilizó para obtener el compuesto del título (175,2 mg, 0,195 mmol, 66% de rendimiento). LCMS (método b, Tabla 7) $R_t = 0,82$ min, $m/z = 899,87$ $[M+H]^+$. ^1H NMR (400 MHz, dimetilsulfóxido- d_6) δ 9,70 (s, 1H), 8,14 (d, $J = 7,0$ Hz, 1H), 8,01 (d, $J = 7,2$ Hz, 1H), 7,47 – 7,35 (m, 2H), 7,32 (d, $J = 8,1$ Hz, 2H), 7,26 – 7,10 (m, 4H), 6,95 (s, 1H), 6,87 (dt, $J = 7,6, 1,3$ Hz, 1H), 6,26 (dd, $J = 10,2, 1,9$ Hz, 1H), 6,09 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H), 5,72 – 5,51 (m, 1H), 5,48 (s, 1H), 5,41 (s, 1H), 4,91 (d, $J = 4,9$ Hz, 1H), 4,47 (d, $J = 19,4$ Hz, 1H), 4,30 (p, $J = 7,1$ Hz, 1H), 4,25 – 4,11 (m, 3H), 3,85 (s, 2H), 3,57 (t, $J = 7,3$ Hz, 2H), 2,71 – 2,48 (m, 1H), 2,36 (dd, $J = 8,0, 6,7$ Hz, 2H), 2,23 (ddt, $J = 25,1, 12,2, 6,6$ Hz, 2H), 2,01 (dt, $J = 13,7, 3,7$ Hz, 1H), 1,75 – 1,57 (m, 3H), 1,48 (p, $J = 11,9$ Hz, 1H), 1,46 (s, 3H), 1,24 (d, $J = 7,2$ Hz, 3H), 1,13 (d, $J = 7,2$ Hz, 3H), 0,83 (s, 3H).

Ejemplo de precursor 7: Síntesis de 3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-*N*-((*S*)-1-(((*S*)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)propanamida

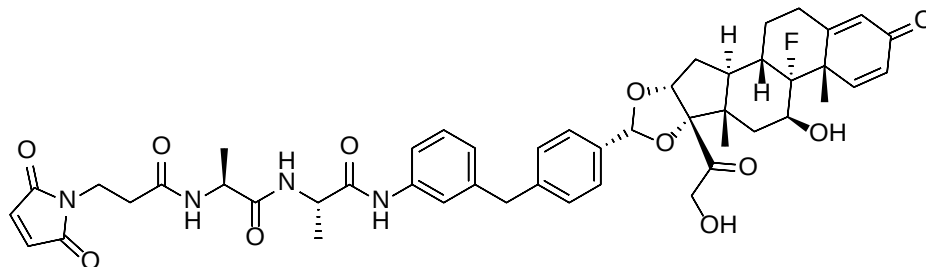


[00163] El producto del Ejemplo de precursor 7 se sintetizó en un procedimiento similar al Ejemplo 6 con (6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-aminobencil)fenil)-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-

1,2,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-4H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-4-ona. LCMS (método b, Tabla 7) $R_t = 0,85$ min, $m/z = 863,4$ [M+H].

[00164] ^1H NMR (501 MHz, dimetilsulfóxido- d_6) δ 9,71 (s, 1H), 8,17 (d, $J = 7,0$ Hz, 1H), 8,03 (d, $J = 7,3$ Hz, 1H), 7,43 (dd, $J = 7,8, 1,1$ Hz, 2H), 7,38 – 7,32 (m, 2H), 7,29 (d, $J = 10,1$ Hz, 1H), 7,22 – 7,15 (m, 3H), 6,96 (s, 2H), 6,88 (dt, $J = 7,8, 1,3$ Hz, 1H), 6,13 (dd, $J = 10,1, 1,9$ Hz, 1H), 5,90 (t, $J = 1,6$ Hz, 1H), 5,37 (s, 1H), 4,90 (d, $J = 5,4$ Hz, 1H), 4,48 (d, $J = 19,4$ Hz, 1H), 4,32 (p, $J = 7,1$ Hz, 1H), 4,27 (q, $J = 3,3$ Hz, 1H), 4,21 (p, $J = 7,1$ Hz, 1H), 4,16 (d, $J = 19,4$ Hz, 1H), 3,87 (s, 2H), 3,59 (t, $J = 7,3$ Hz, 2H), 2,57 – 2,49 (m, 1H), 2,38 (dd, $J = 8,0, 6,6$ Hz, 2H), 2,32 – 2,24 (m, 1H), 2,15 – 2,04 (m, 1H), 2,04 – 1,95 (m, 1H), 1,80 – 1,54 (m, 5H), 1,37 (s, 3H), 1,26 (d, $J = 7,1$ Hz, 3H), 1,15 (d, $J = 7,1$ Hz, 3H), 1,02 (ddd, $J = 21,2, 12,1, 4,2$ Hz, 2H), 0,84 (s, 3H).

Ejemplo de precursor 8: Síntesis de 3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-N-((S)-1-(((S)-1-((3-(4-((6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-6b-fluoro-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)propanamida.

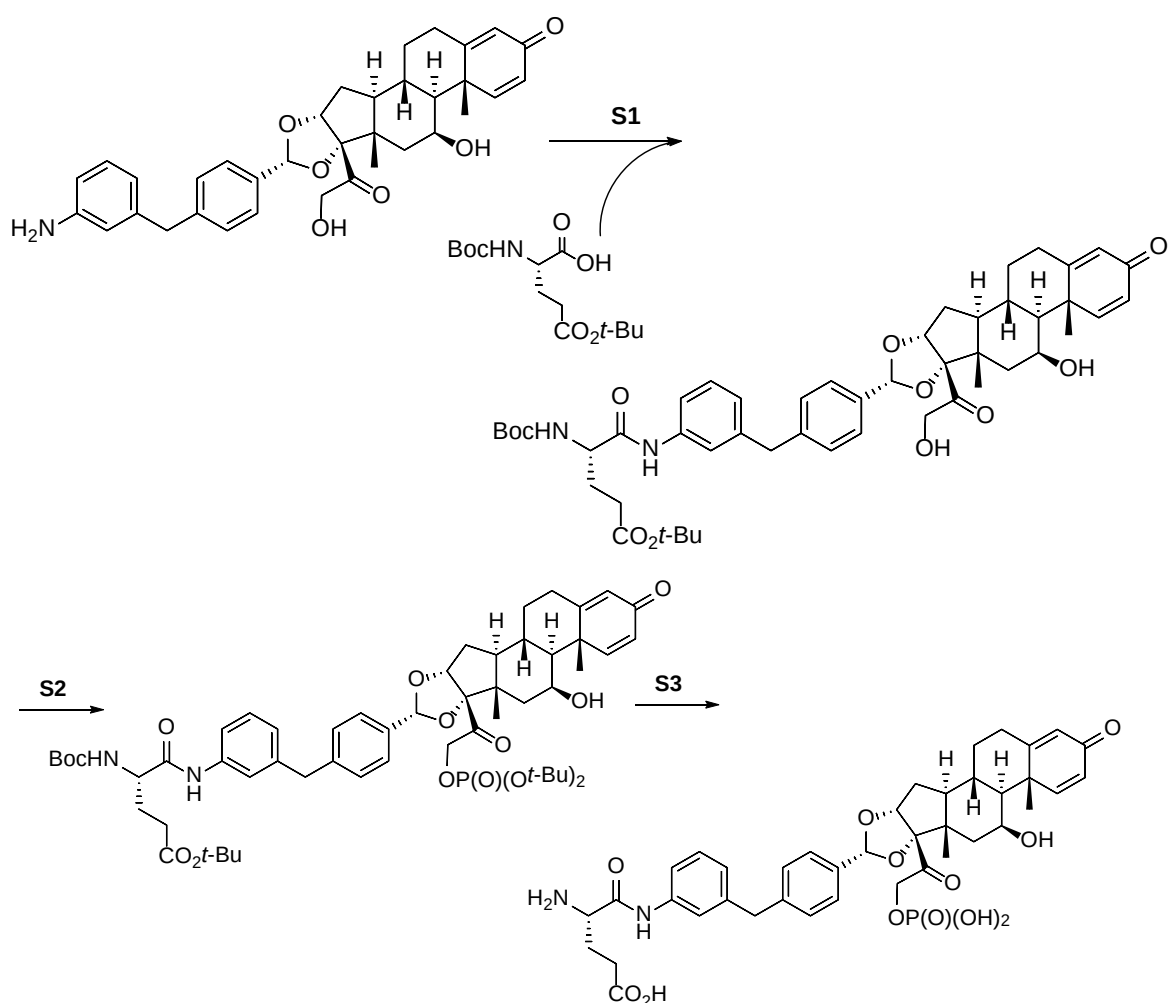


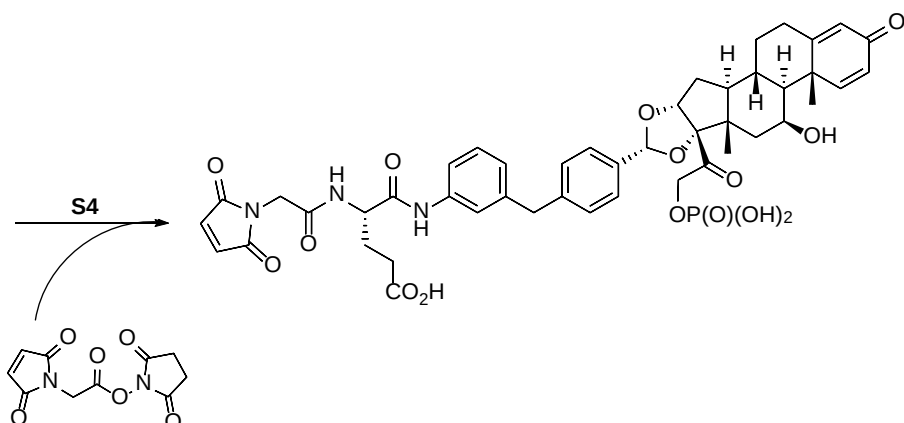
[00165] El producto del Ejemplo de precursor 8 se sintetizó en un procedimiento similar al Ejemplo 6 con (6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-aminobencil)fenil)-6b-fluoro-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-1,2,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-4H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-4-ona. LCMS (método b, Tabla 7) $R_t = 0,85$ min; $m/z = 881,46$ [M+H] $^+$.

[00166] ^1H NMR (dimetilsulfóxido- d_6) δ 0,83 (s, 3H), 1,13 (d, $J = 7,1$ Hz, 3H), 1,24 (d, $J = 7,1$ Hz, 3H), 1,35 (qd, $J = 13,3, 12,8, 5,1$ Hz, 1H), 1,46 (s, 3H), 1,63 (q, $J = 9,7, 8,5$ Hz, 3H), 1,73 – 1,88 (m, 1H), 2,01 (dt, $J = 13,7, 3,5$ Hz, 1H), 2,14 (td, $J = 11,8, 7,2$ Hz, 1H), 2,26 – 2,40 (m, 3H), 2,48 – 2,69 (m, 2H), 3,57 (t, $J = 7,3$ Hz, 2H), 3,85 (s, 2H), 4,17 (ddd, $J = 17,5, 11,7, 6,2$ Hz, 3H), 4,30 (p, $J = 7,2$ Hz, 1H), 4,47 (d, $J = 19,4$ Hz, 1H), 4,83 – 4,95 (m, 1H), 5,40 (s, 2H), 5,99 (d, $J = 1,6$ Hz, 1H), 6,20 (dd, $J = 10,1, 1,9$ Hz, 1H), 6,87 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H), 6,95 (s, 2H), 7,16 (t, $J = 7,9$ Hz, 1H), 7,20 (d, $J =$

8,1 Hz, 2H), 7,25 (d, $J = 10,1$ Hz, 1H), 7,31 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H), 7,38 (d, $J = 1,9$ Hz, 1H), 7,43 (dd, $J = 8,0, 2,0$ Hz, 1H), 8,01 (d, $J = 7,3$ Hz, 1H), 8,14 (d, $J = 7,1$ Hz, 1H), 9,70 (s, 1H).

Ejemplo de precursor 9: Síntesis de ácido (S)-4-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)acetamido)-5-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-8b-(2-(fosfonooxi)acetyl)-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-5-oxopentanoico





[00167] Etapa 1: Síntesis de *ter*-butil (S)-4-((*ter*-butoxicarbonil)amino)-5-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-5-oxopentanoato. Se agregaron hexafluorofosfato de 3-óxido de 1-[bis(dimetilamino)metilen]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio (HATU) (260 mg, 0,685 mmol) y 2,6-dimetilpiridina (0,184 ml, 1,580 mmol) a una suspensión a temperatura ambiente del producto del Ejemplo de precursor 2 (300 mg, 0,527 mmol) y ácido (S)-5-(*ter*-butoxi)-2-((*ter*-butoxicarbonil)amino)-5-oxopentanoico (168 mg, 0,553 mmol) en dimetilformamida (6 ml). Después de 2 horas a temperatura ambiente, la reacción se diluyó con acetato de etilo (30 ml) y luego se lavó secuencialmente con una solución acuosa de HCl 1 N (2 x 15 ml), una solución acuosa saturada de NaHCO₃ (15 ml) y salmuera (15 ml). La capa orgánica se secó (Na₂SO₄) y el solvente se eliminó a presión reducida. De la purificación mediante cromatografía (sílice), que se eluyó con un gradiente de 0-10% de metanol/diclorometano, se obtuvo el compuesto del título (400 mg, 0,47 mmol, 89% de rendimiento) como un sólido blanquecino. LCMS (método b, Tabla 7) Rt=1,09 min; MS m/z = 854,9 [M+H]⁺.

[00168] Etapa 2: Síntesis de *ter*-butil (S)-4-((*ter*-butoxicarbonil)amino)-5-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((di-*ter*-butoxifosforil)oxi)acetil)-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-5-oxopentanoato. Se agregó di-*ter*-butil dietilfosforamidita (0,42 ml, 1,5 mmol) a una solución a temperatura ambiente del producto de la etapa 1 del Ejemplo de precursor 9 (400 mg, 0,468 mmol) y 1H-tetrazol (0,35 ml, 2,25 mmol) en dimetilacetamida (5 ml). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas, después de lo cual se agregó por goteo una solución al 50% de peróxido de hidrógeno en agua (1,5 ml). Una vez que LCMS indicó

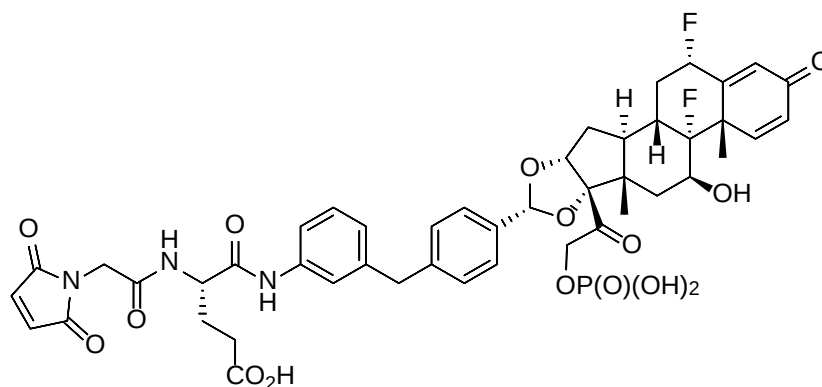
que la oxidación se había completado, la reacción se enfrió hasta 0°C y se inactivó mediante la adición de una solución acuosa de Na₂S₂O₃ 1 M (8 ml). La mezcla se extrajo con acetato de etilo (2 X 30 ml), las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (15 ml), se secaron (Na₂SO₄) y se filtraron y el solvente se eliminó a presión reducida. De la purificación mediante HPLC de fase inversa preparativa se obtuvo el compuesto del título (420 mg, 0,40 mmol, 86% de rendimiento). LCMS (método b, Tabla 7) R_t=1,27 min; MS m/z = 1047,6 [M+H]⁺. ¹H NMR (400 MHz, dimetilsulfóxido-*d*₆) δ 9,80 (s, 1H), 7,41 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H), 7,37 – 7,31 (m, 3H), 7,29 (d, *J* = 10,1 Hz, 1H), 7,20 (d, *J* = 8,0 Hz, 2H), 7,17 (t, *J* = 7,9 Hz, 1H), 6,94 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 6,88 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H), 6,11 (dd, *J* = 10,1, 1,9 Hz, 1H), 5,89 (s, 1H), 5,46 (s, 1H), 5,00 – 4,81 (m, 3H), 4,58 (dd, *J* = 18,0, 9,1 Hz, 1H), 4,26 (s, 1H), 4,00 (d, *J* = 6,7 Hz, 1H), 3,86 (s, 2H), 2,49 (d, *J* = 2,2 Hz, 1H), 2,29 (p, *J* = 2,0 Hz, 1H), 2,27 – 2,16 (m, 2H), 2,06 (d, *J* = 10,3 Hz, 1H), 1,98 (d, *J* = 11,0 Hz, 1H), 1,91 – 1,56 (m, 6H), 1,39 (d, *J* = 1,5 Hz, 18H), 1,35 (s, 3H), 1,33 (s, 18H), 1,01 (t, *J* = 13,7 Hz, 2H), 0,85 (s, 3H).

[00169] Etapa 3: Síntesis de ácido (S)-4-amino-5-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-8b-(2-(fosfonooxi)acetil)-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-5-oxopentanoico. Se agregó ácido trifluoroacético (2,0 ml, 0,40 mmol) a una solución a temperatura ambiente del producto de la etapa 2 del Ejemplo de precursor 9 (420 mg, 0,401 mmol) en diclorometano (6 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 45 minutos, después de lo cual se eliminó el solvente a presión reducida. El compuesto del título se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional. LCMS (método a, Tabla 7) isómero de acetal mayor R_t=0,69 min, MS m/z = 779,8 [M+H]⁺; isómero de acetal menor R_t=0,72 min, MS m/z = 779,9 [M+H]⁺.

[00170] Etapa 4: Síntesis de ácido (S)-4-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)acetamido)-5-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-8b-(2-(fosfonooxi)acetil)-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-5-oxopentanoico. *N,N*-diisopropiletilamina (0,90 ml, 5,1 mmol) y éster de *N*-hidroxisuccinimida de ácido maleimidoacético (141 mg, 0,561 mmol) se agregaron secuencialmente a una solución a temperatura ambiente del producto de la etapa 3 del Ejemplo de precursor 9 (364 mg, 0,467 mmol) en dimetilformamida (5 ml). LCMS indicó que la reacción se había completado en 15 minutos, después de lo cual la reacción se enfrió hasta 0°C y el pH se ajustó hasta 1 mediante la adición de ácido

2,2,2-trifluoroacético (0,432 ml, 6,6 mmol). De la purificación mediante HPLC de fase inversa preparativa y liofilización se obtuvo el compuesto del título (146 mg, 0,159 mmol, 34% de rendimiento). LCMS (método b, Tabla 7) $R_t = 0,79$ min; MS $m/z = 915,9$ $[M+H]^+$. ^1H NMR (400 MHz, dimetilsulfóxido- d_6) δ 9,92 (s, 1H), 8,45 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H), 7,43 – 7,38 (m, 1H), 7,35 (d, $J = 8,1$ Hz, 3H), 7,28 (d, $J = 10,1$ Hz, 1H), 7,21 (d, $J = 8,3$ Hz, 3H), 7,16 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H), 7,05 (s, 2H), 6,89 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H), 6,13 (dd, $J = 10,1, 1,9$ Hz, 1H), 5,89 (d, $J = 1,6$ Hz, 1H), 5,44 (s, 1H), 4,93 – 4,83 (m, 2H), 4,80 (s, 1H), 4,53 (dd, $J = 18,2, 8,2$ Hz, 1H), 4,34 (td, $J = 8,1, 5,3$ Hz, 1H), 4,27 (s, 1H), 4,08 (s, 2H), 3,87 (s, 2H), 2,58 – 2,48 (m, 1H), 2,34 – 2,16 (m, 3H), 2,16 – 2,03 (m, 1H), 2,03 – 1,84 (m, 2H), 1,84 – 1,53 (m, 4H), 1,36 (s, 3H), 1,01 (td, $J = 13,1, 11,3, 4,0$ Hz, 2H), 0,84 (s, 3H).

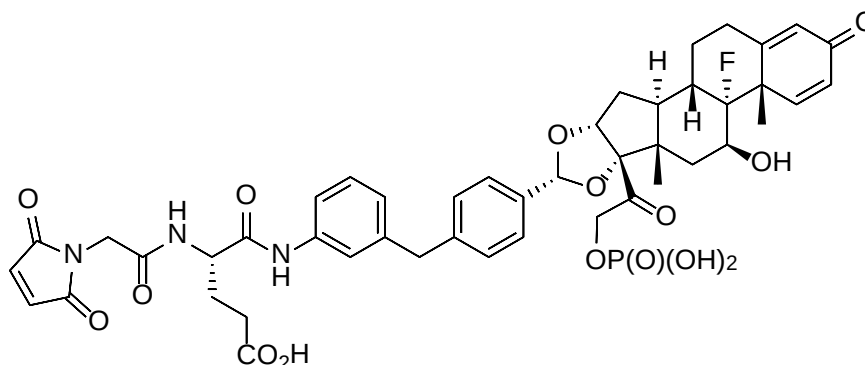
Ejemplo de precursor 10: Síntesis de ácido (S)-4-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)acetamido)-5-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-8b-(2-(fosfonooxi)acetil)-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-5-oxopentanoico.



[00171] El producto del Ejemplo de precursor 10 se sintetizó en un procedimiento similar al Ejemplo de precursor 9 con el producto de la etapa 6 del Ejemplo de precursor 1. LCMS (método b, Tabla 7) $R_t = 0,79$ min; MW m/z 974,3 $[M+Na]^+$.

[00172] ^1H NMR (400 MHz, dimetilsulfóxido- d_6) δ 9,91 (s, 1H), 8,45 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H), 7,42 (dd, $J = 8,0, 1,9$ Hz, 1H), 7,37 – 7,29 (m, 3H), 7,28 – 7,20 (m, 3H), 7,17 (t, $J = 7,9$ Hz, 1H), 7,04 (s, 1H), 6,89 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H), 6,26 (dd, $J = 10,2, 1,8$ Hz, 1H), 6,09 (s, 1H), 5,67 (dd, $J = 11,2, 6,7$ Hz, 1H), 5,60 – 5,48 (m, 2H), 4,94 – 4,85 (m, 2H), 4,56 (dd, $J = 18,2, 8,4$ Hz, 1H), 4,34 (td, $J = 8,2, 5,4$ Hz, 1H), 4,23 – 4,13 (m, 1H), 4,08 (s, 2H), 3,86 (s, 2H), 2,69 – 2,52 (m, 1H), 2,32 – 2,12 (m, 4H), 2,03 (dt, $J = 13,7, 3,7$ Hz, 1H), 1,96 – 1,85 (m, 1H), 1,83 – 1,60 (m, 4H), 1,55 – 1,41 (m, 4H), 0,85 (s, 3H).

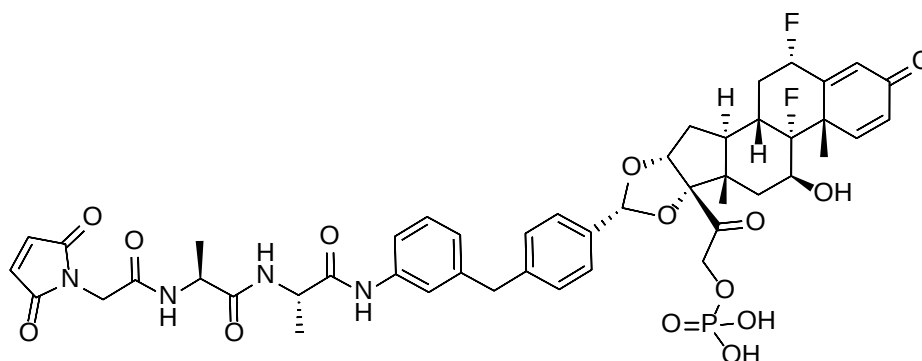
Ejemplo de precursor 11: Síntesis de ácido (S)-4-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)acetamido)-5-((3-(4-((6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-6b-fluoro-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-8b-(2-(fosfonooxi)acetil)-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-5-oxopentanoico.



[00173] El producto del Ejemplo de precursor 11 se sintetizó en un procedimiento similar al Ejemplo de precursor 9 con el producto del Ejemplo de precursor 3. LCMS (método b, Tabla 7) $R_t = 0,80$ min; MW m/z 934 $[M+H]^+$.

[00174] ^1H NMR (400 MHz, dimetilsulfóxido- d_6) δ 0,89 (s, 3H), 1,39 (dd, $J = 12,7, 5,1$ Hz, 1H), 1,50 (s, 3H), 1,67 (q, $J = 6,2$ Hz, 3H), 1,76 – 2,02 (m, 3H), 2,07 (d, $J = 13,1$ Hz, 1H), 2,22 (dtd, $J = 16,7, 11,1, 10,4, 4,6$ Hz, 3H), 2,31 – 2,43 (m, 1H), 2,57 – 2,75 (m, 1H), 3,90 (s, 2H), 4,11 (s, 2H), 4,20 (d, $J = 8,9$ Hz, 1H), 4,38 (td, $J = 8,2, 5,5$ Hz, 1H), 4,58 (dd, $J = 18,2, 8,3$ Hz, 1H), 4,84 – 5,00 (m, 2H), 5,51 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H), 6,04 (d, $J = 1,7$ Hz, 1H), 6,24 (dd, $J = 10,2, 1,9$ Hz, 1H), 6,88 – 6,99 (m, 1H), 7,09 (s, 2H), 7,15 – 7,32 (m, 4H), 7,32 – 7,42 (m, 3H), 7,42 – 7,53 (m, 1H), 8,48 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H), 9,95 (s, 1H).

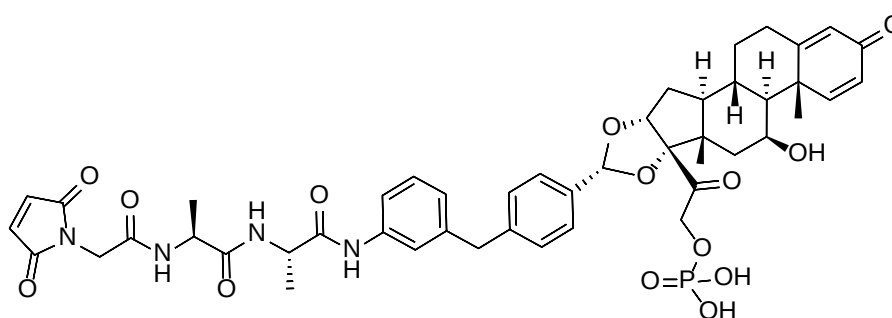
Ejemplo de precursor 12. 2-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-((S)-2-((S)-2-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)acetamido)propanamido)propanamido)bencil)fenil)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-1,2,4,6a,6b,7,8,8a,11a,12,12a,12b-dodecahidro-8bH-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-8b-il)-2-oxoetil dihidrógeno fosfato



[00175] El producto del Ejemplo de precursor 12 se sintetizó en un procedimiento similar al Ejemplo de precursor 9 con el producto amino del Ejemplo de precursor 1, el dipéptido del Ejemplo de precursor 6 (etapa 1), y el reactivo de maleimida del Ejemplo de precursor 9 (etapa 4). LCMS (método b, Tabla 7) $R_t = 0,82$ min; $m/z = 965,2$ $[M+H]^+$.

[00176] ^1H NMR (400 MHz, dimetilsulfóxido- d_6) δ 9,74 (s, 1H), 8,36 (d, $J = 7,3$ Hz, 1H), 8,09 (d, $J = 7,2$ Hz, 1H), 7,40 (dd, $J = 8,0, 2,0$ Hz, 1H), 7,35 (d, $J = 1,8$ Hz, 1H), 7,32 (d, $J = 7,9$ Hz, 2H), 7,26 7,19 (m, 3H), 7,15 (t, $J = 7,8$ Hz, 1H), 7,04 (s, 2H), 6,87 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H), 6,26 (dd, $J = 10,1, 1,9$ Hz, 1H), 6,09 (s, 1H), 5,74 5,51 (m, 2H), 5,50 (s, 1H), 4,96 4,83 (m, 2H), 4,56 (dd, $J = 18,2, 8,4$ Hz, 1H), 4,29 (dp, $J = 14,3, 7,1$ Hz, 2H), 4,18 (d, $J = 9,3$ Hz, 1H), 4,11 3,98 (m, 2H), 3,85 (s, 2H), 2,62 (dtd, $J = 33,1, 12,3, 4,2$ Hz, 1H), 2,34 2,14 (m, 2H), 2,03 (dt, $J = 13,3, 3,7$ Hz, 1H), 1,67 (dd, $J = 13,2, 5,1$ Hz, 3H), 1,46 (s, 4H), 1,24 (d, $J = 7,1$ Hz, 3H), 1,17 (d, $J = 7,0$ Hz, 3H), 0,85 (s, 3H).

Ejemplo de precursor 13. 2-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-((S)-2-((S)-2-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)acetamido)propanamido)propanamido)bencil)fenil)-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-1,2,4,6a,6b,7,8,8a,11a,12,12a,12b-dodecahidro-8bH-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-8b-il)-2-oxoetil dihidrógeno fosfato

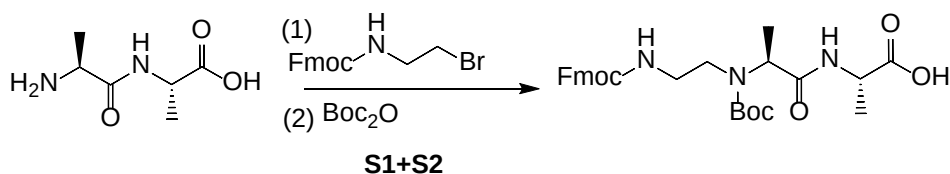


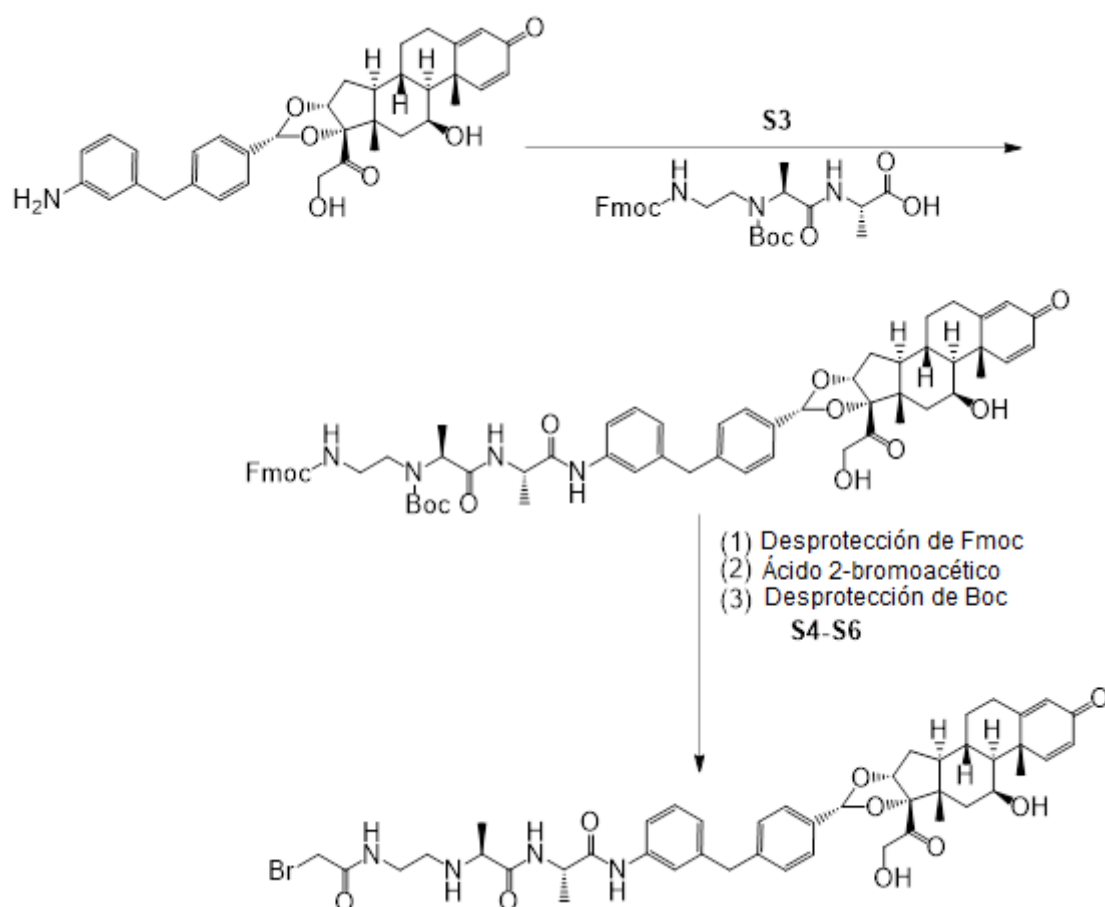
[00177] El producto del Ejemplo de precursor 13 se sintetizó en un

procedimiento similar al Ejemplo de precursor 9 con el producto amino del Ejemplo de precursor 2, el dipéptido del Ejemplo de precursor 6 (etapa 1), y el reactivo de maleimida del Ejemplo de precursor 9 (etapa 4). LCMS (método c, Tabla 7) $R_t = 0,82$ min; $m/z = 929,4$ $[M+H]^+$.

[00178] ^1H NMR (400MHz, dimetilsulfóxido- d_6) $\delta = 9,79$ (s, 1H), 8,42 (br d, $J=7,5$ Hz, 1H), 8,15 (br d, $J=7,0$ Hz, 1H), 7,49 - 7,28 (m, 5H), 7,25 - 7,12 (m, 3H), 7,07 (s, 2H), 6,90 (br d, $J=7,5$ Hz, 1H), 6,16 (br d, $J=10,1$ Hz, 1H), 5,92 (s, 1H), 5,48 (s, 1H), 4,96 - 4,85 (m, 2H), 4,56 (dd, $J=8,3, 18,4$ Hz, 1H), 4,37 - 4,23 (m, 3H), 4,08 (br d, $J=2,6$ Hz, 2H), 3,89 (s, 2H), 2,19 - 1,95 (m, 3H), 1,84 - 1,60 (m, 6H), 1,38 (s, 3H), 1,27 (br d, $J=7,0$ Hz, 3H), 1,20 (br d, $J=6,6$ Hz, 3H), 1,02 (br d, $J=11,4$ Hz, 2H), 0,87 (s, 3H), 0,00 - 0,00 (m, 1H).

Ejemplo de precursor 14A. (S)-2-((2-(2-bromoacetamido)etil)amino)-N-((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)propanamida





[00179] El producto del Ejemplo de precursor 14A puede sintetizarse con el acoplamiento de N-(2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)etil)-N-(ter-butoxicarbonil)-L-alanil-L-alanina (el producto de las etapas **S1** y **S2**) al producto amino del Ejemplo 2, seguido de las etapas **S4-S6**: (1) desprotección de Fmoc, (2) acoplamiento con ácido 2-bromoacético y (3) desprotección de Boc. Fmoc = fluorenilmetiloxicarbonilo; Boc = terbutoxicarbonilo.

Ejemplos de precursor adicionales

[00180] Los productos de bromoacetamida de los Ejemplos 14B-48, enumerados en la Tabla 10, pueden sintetizarse con los procedimientos descritos en la presente.

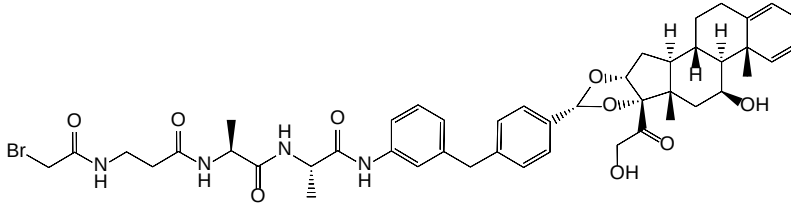
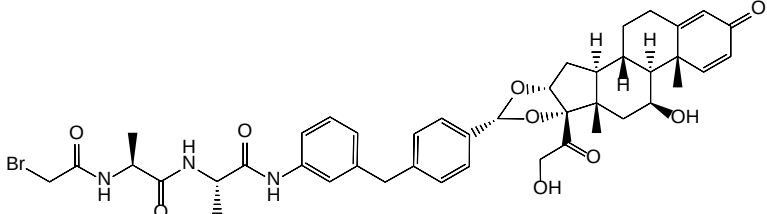
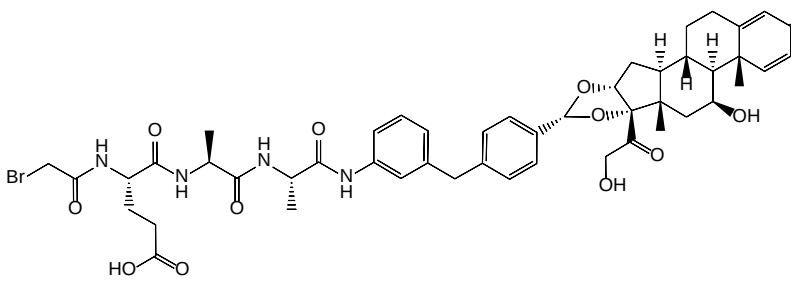
Tabla 10. Precursores de bromoacetamida adicionales		
Ej.	Producto de bromoacetamida	Protocolo de síntesis
14 B		Se puede elaborar a partir del Ejemplo 2 con una vía similar a la de las etapas 1 y 2 del Ejemplo 6 y la etapa 5 del Ejemplo 4. Después de esta Tabla se proporcionan también un protocolo de síntesis y caracterización para este precursor.
15		Se puede elaborar a partir del Ejemplo 2 con una vía similar a la de las etapas 1 y 2 del Ejemplo 6 y la etapa 5 del Ejemplo 4. Después de esta Tabla se proporcionan también un protocolo de síntesis y caracterización para este precursor.
16		Se puede elaborar a partir del Ejemplo 2 con una vía similar a la del Ejemplo 4.

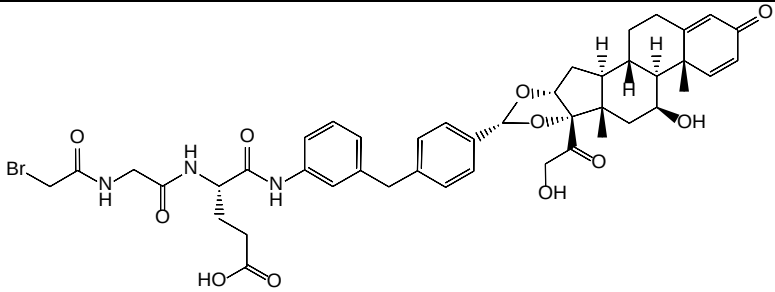
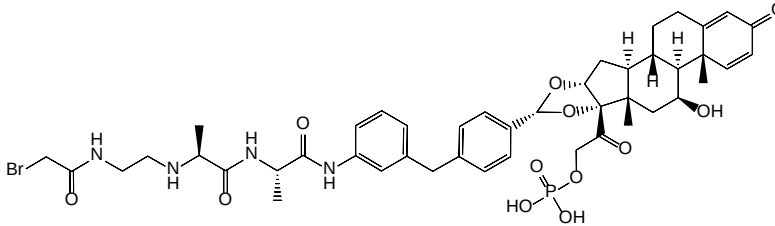
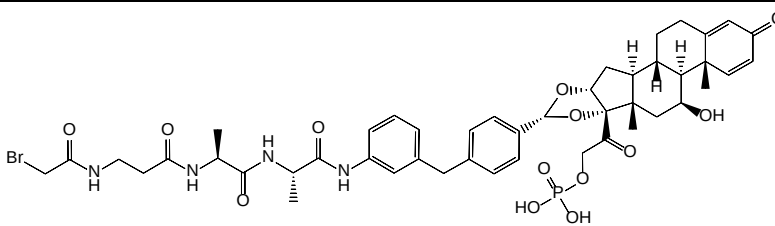
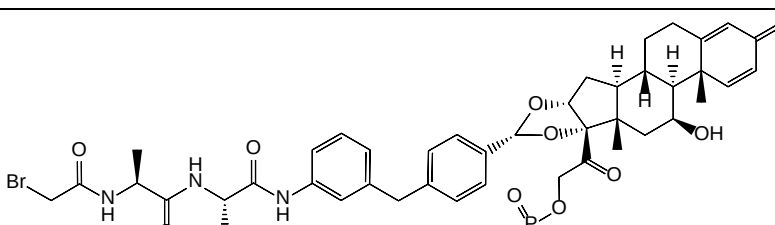
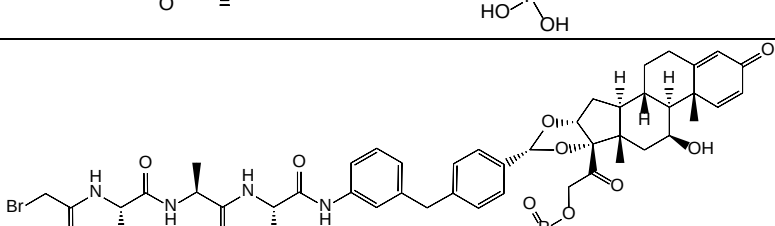
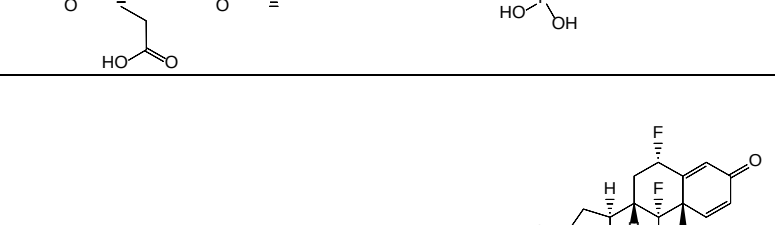
Tabla 10. Precursores de bromoacetamida adicionales		
Ej.	Producto de bromoacetamida	Protocolo de síntesis
17		Se puede elaborar a partir del Ejemplo 2 con una vía similar a la del Ejemplo 4.
18 A		Se puede elaborar a partir del Ejemplo 2 con una vía similar a la del Ejemplo 14A.
18 B		Se puede elaborar a partir del Ejemplo 2 con una vía similar a la de las etapas 1 y 2 del Ejemplo 6 y el Ejemplo 4.
19		Se puede elaborar a partir del Ejemplo 2 con una vía similar a la de las etapas 1 y 2 del Ejemplo 6 y el Ejemplo 4.
20		Se puede elaborar a partir del Ejemplo 2 con una vía similar a la del Ejemplo 4.
21 A		Se puede elaborar a partir del Ejemplo 1 con una vía similar a la del Ejemplo 14A.

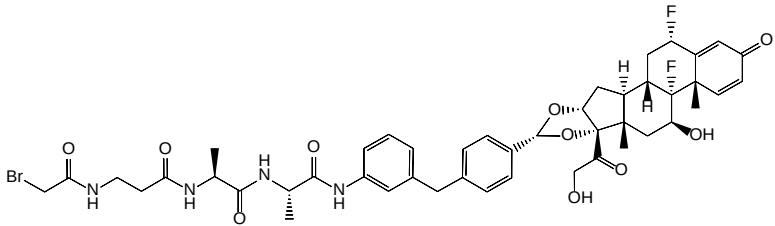
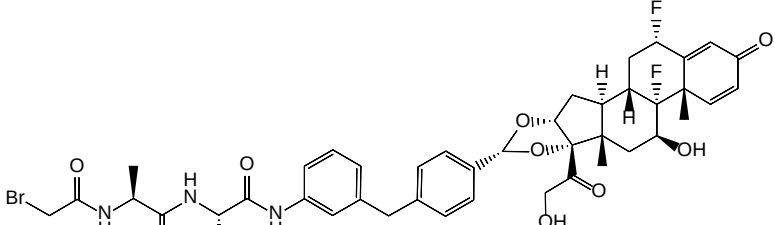
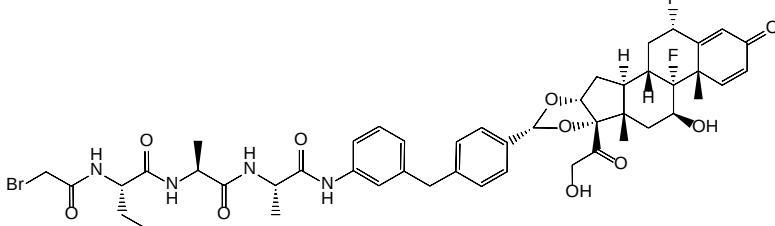
Tabla 10. Precursores de bromoacetamida adicionales		
Ej.	Producto de bromoacetamida	Protocolo de síntesis
21 B		Se puede elaborar a partir del Ejemplo 1 con una vía similar a la de las etapas 1 y 2 del Ejemplo 6 y la etapa 5 del Ejemplo 4. Después de esta Tabla se proporcionan también un protocolo de síntesis y caracterización para este precursor.
22		Se puede elaborar a partir del Ejemplo 1 con una vía similar a la de las etapas 1 y 2 del Ejemplo 6 y la etapa 5 del Ejemplo 4. Después de esta Tabla se proporcionan también un protocolo de síntesis y caracterización para este precursor.
23		Se puede elaborar a partir del Ejemplo 1 con una vía similar a la del Ejemplo 4. Después de esta Tabla se proporcionan también un protocolo de síntesis y caracterización para este precursor.

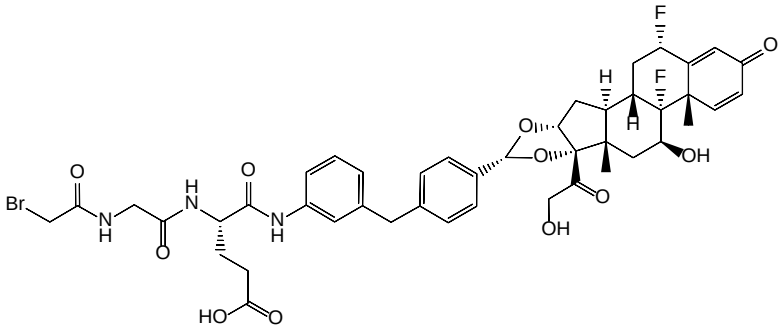
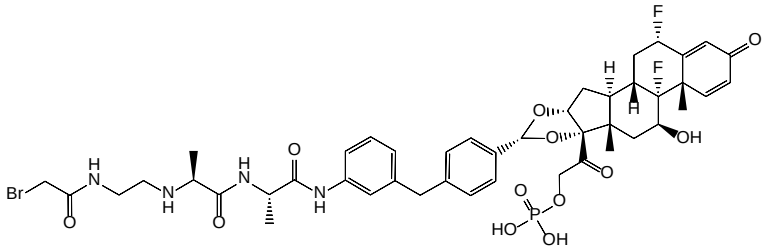
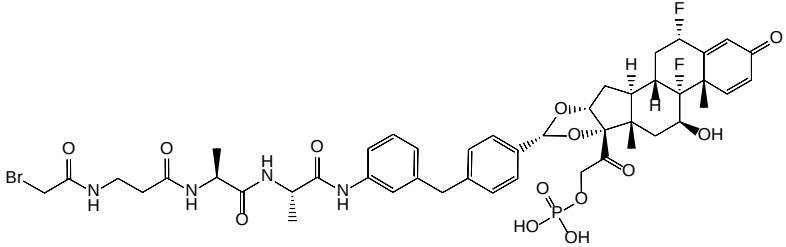
Tabla 10. Precursores de bromoacetamida adicionales		
Ej.	Producto de bromoacetamida	Protocolo de síntesis
24		Se puede elaborar a partir del Ejemplo 1 con una vía similar a la del Ejemplo 4. Después de esta Tabla se proporcionan también un protocolo de síntesis y caracterización para este precursor.
25 A		Se puede elaborar a partir del Ejemplo 1 con una vía similar a la del Ejemplo 14A.
25 B		Se puede elaborar a partir del Ejemplo 1 con una vía similar a la de las etapas 1 y 2 del Ejemplo 6 y el Ejemplo 4. Después de esta Tabla se proporcionan también un protocolo de síntesis y caracterización para este precursor.

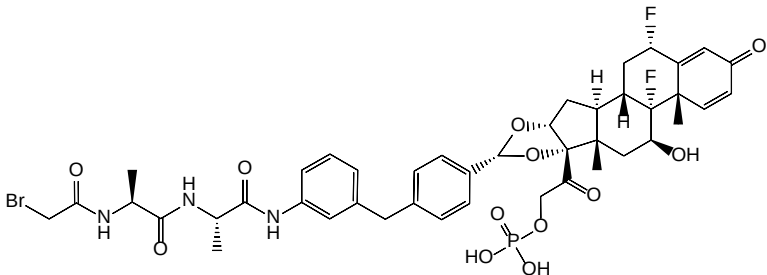
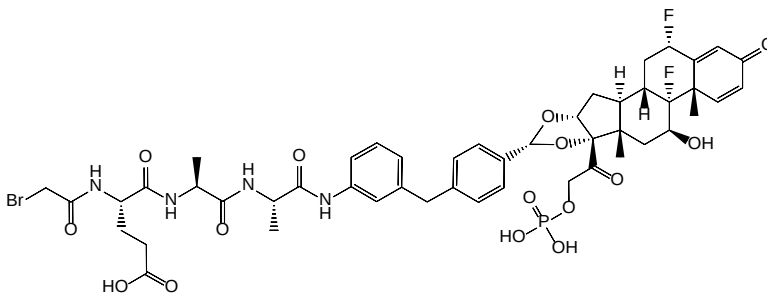
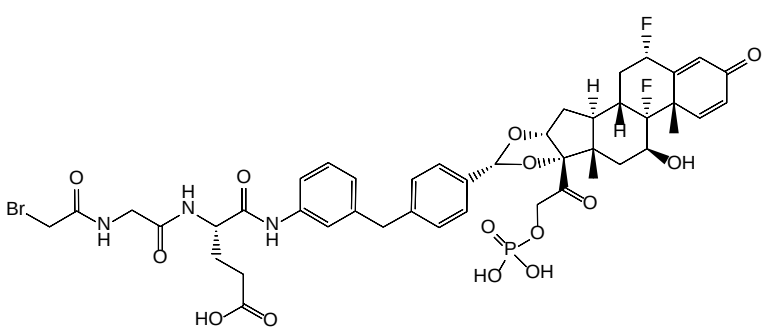
Tabla 10. Precursores de bromoacetamida adicionales		
Ej.	Producto de bromoacetamida	Protocolo de síntesis
26		Se puede elaborar a partir del Ejemplo 1 con una vía similar a la de las etapas 1 y 2 del Ejemplo 6 y el Ejemplo 4. Después de esta Tabla se proporcionan también un protocolo de síntesis y caracterización para este precursor.
27		Se puede elaborar a partir del Ejemplo 1 con una vía similar a la del Ejemplo 4. Después de esta Tabla se proporcionan también un protocolo de síntesis y caracterización para este precursor.
28		Se puede elaborar a partir del Ejemplo 1 con una vía similar a la del Ejemplo 4. Después de esta Tabla se proporcionan también un protocolo de síntesis y caracterización para este precursor.

Tabla 10. Precursores de bromoacetamida adicionales		
Ej.	Producto de bromoacetamida	Protocolo de síntesis
29 A		Se puede elaborar a partir del Ejemplo 3 con una vía similar a la del Ejemplo 14A.
29 B		Se puede elaborar a partir del Ejemplo 3 con una vía similar a la de las etapas 1 y 2 del Ejemplo 6 y la etapa 5 del Ejemplo 4.
30		Se puede elaborar a partir del Ejemplo 3 con una vía similar a la de las etapas 1 y 2 del Ejemplo 6 y la etapa 5 del Ejemplo 4.
31		Se puede elaborar a partir del Ejemplo 3 con una vía similar a la del Ejemplo 4.
32		Se puede elaborar a partir del Ejemplo 3 con una vía similar a la del Ejemplo 4.
33 A		Se puede elaborar a partir del Ejemplo 3 con una vía similar a la del Ejemplo 14A.

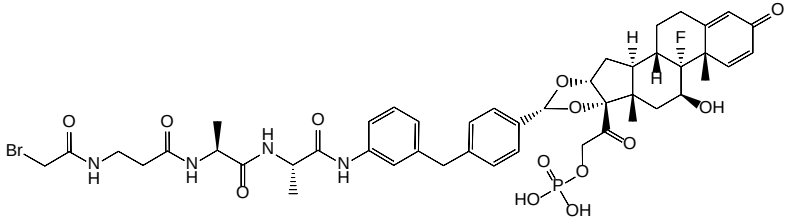
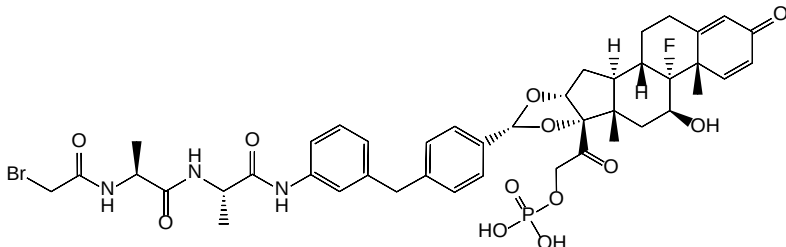
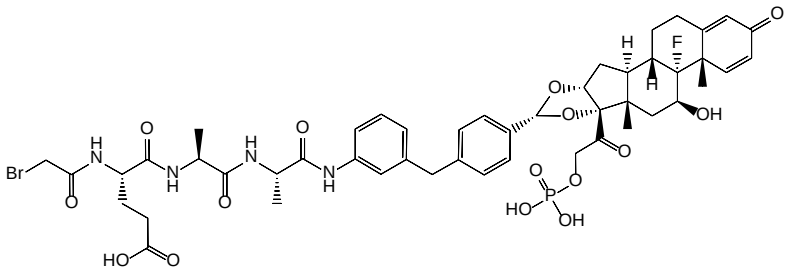
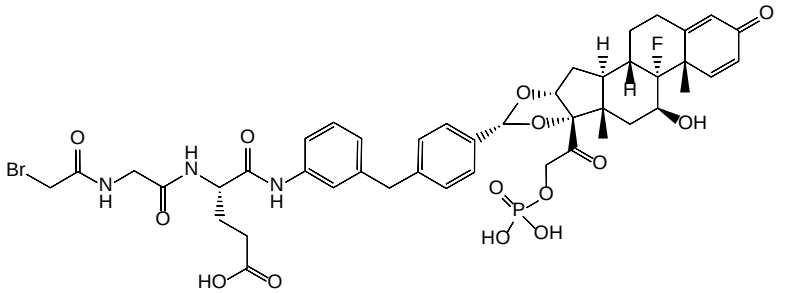
Tabla 10. Precursores de bromoacetamida adicionales		
Ej.	Producto de bromoacetamida	Protocolo de síntesis
33 B		Se puede elaborar a partir del Ejemplo 3 con una vía similar a la de las etapas 1 y 2 del Ejemplo 6 y el Ejemplo 4.
34		Se puede elaborar a partir del Ejemplo 3 con una vía similar a la de las etapas 1 y 2 del Ejemplo 6 y el Ejemplo 4.
35		Se puede elaborar a partir del Ejemplo 3 con una vía similar a la del Ejemplo 4.
36		Se puede elaborar a partir del Ejemplo 3 con una vía similar a la del Ejemplo 4. Después de esta Tabla se proporcionan también un protocolo de síntesis y caracterización para este precursor.

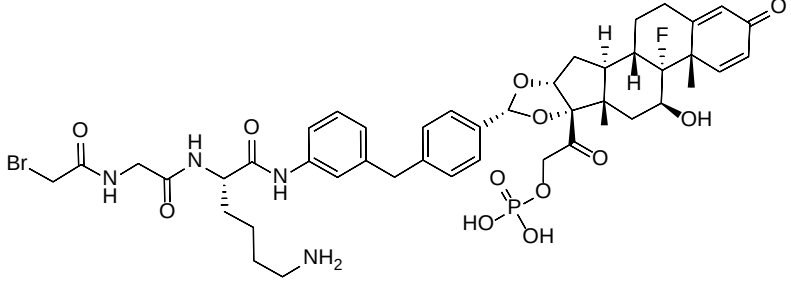
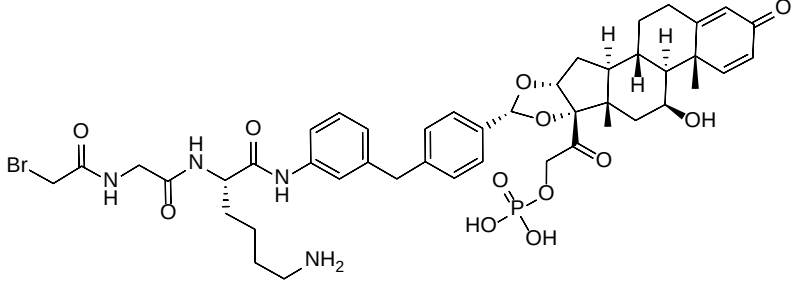
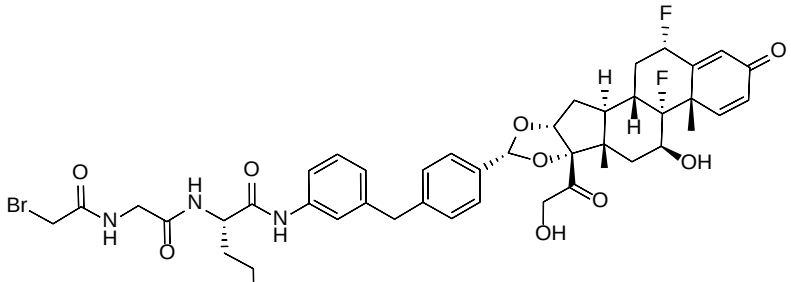
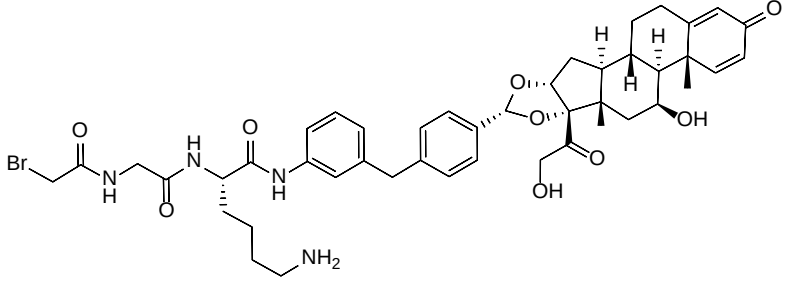
Tabla 10. Precursores de bromoacetamida adicionales		
Ej.	Producto de bromoacetamida	Protocolo de síntesis
37		Se puede elaborar a partir del Ejemplo 3 con una vía similar a la del Ejemplo 5. Después de esta Tabla se proporcionan también un protocolo de síntesis y caracterización para este precursor.
38		Se puede elaborar a partir del Ejemplo 2 con una vía similar a la del Ejemplo 5.
39		Se puede elaborar a partir del Ejemplo 2 con una vía similar a la del Ejemplo 5. Después de esta Tabla se proporcionan también un protocolo de síntesis y caracterización para este precursor.
40		Se puede elaborar a partir del Ejemplo 2 con una vía similar a la del Ejemplo 5.

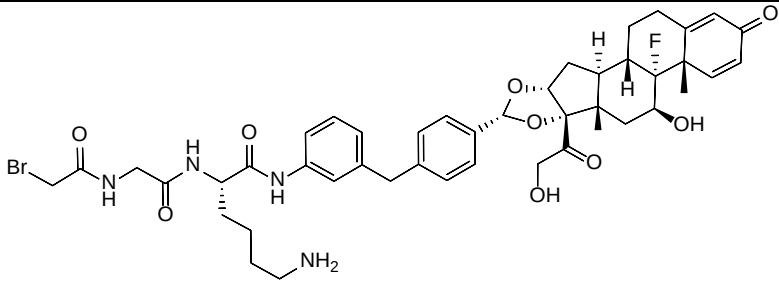
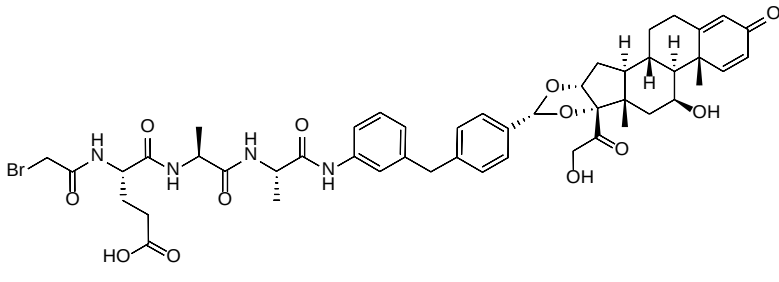
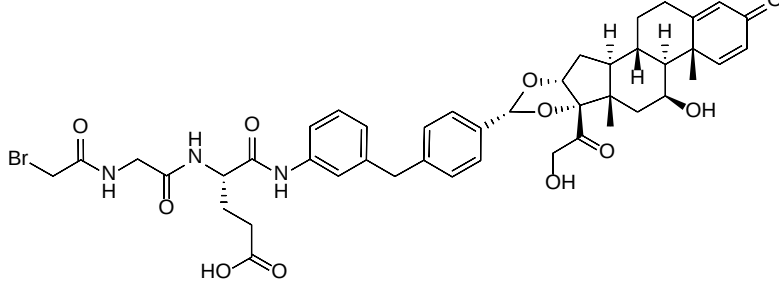
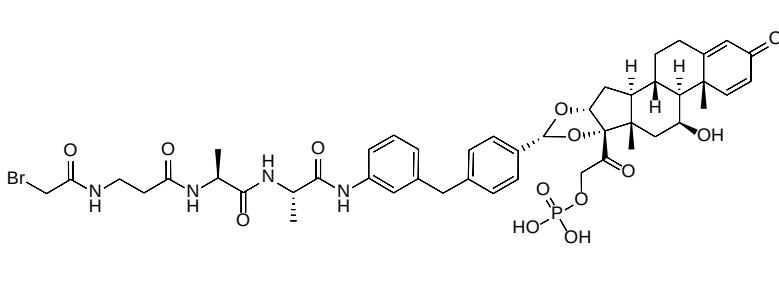
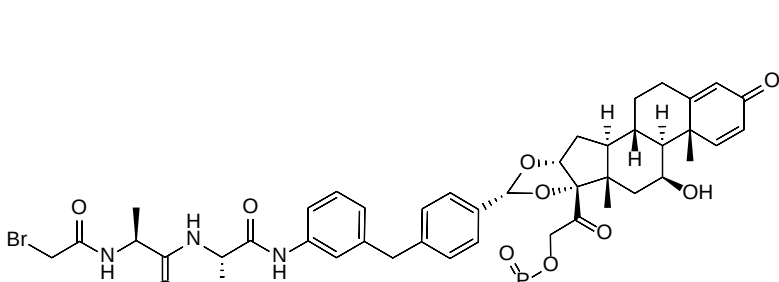
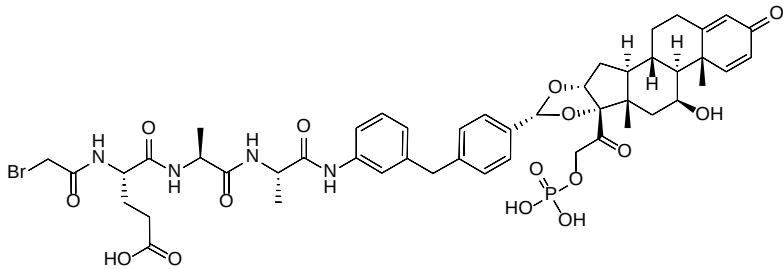
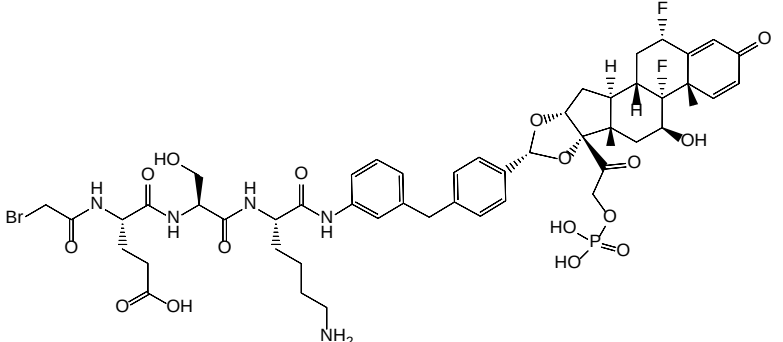
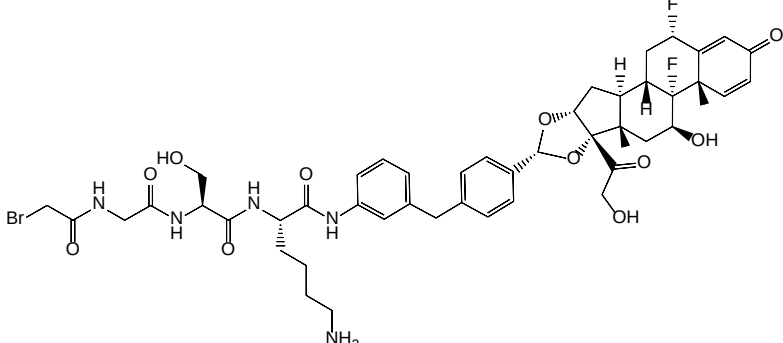
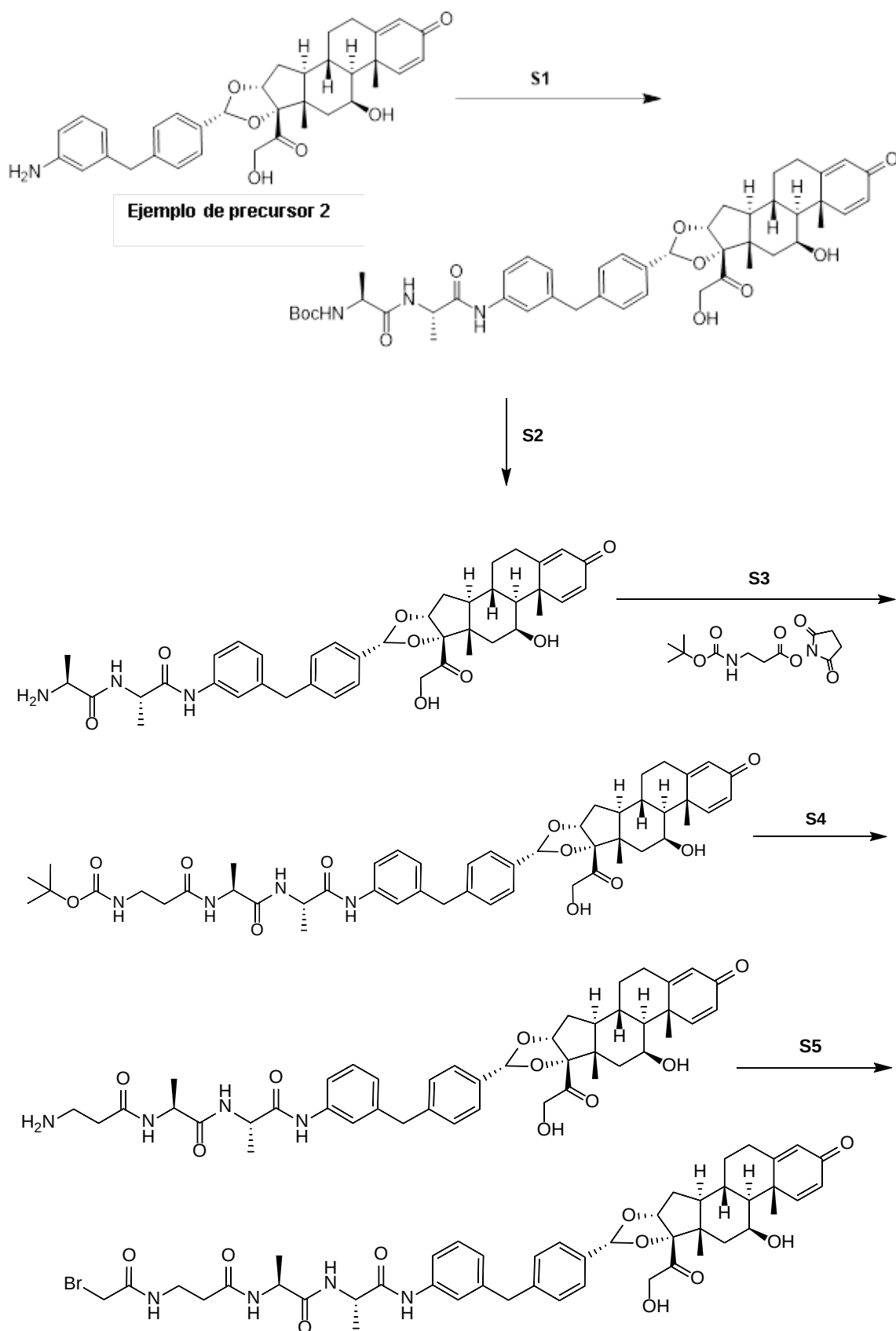
Tabla 10. Precursores de bromoacetamida adicionales		
Ej.	Producto de bromoacetamida	Protocolo de síntesis
41		Se puede elaborar a partir del Ejemplo 3 con una vía similar a la del Ejemplo 5.
42		Después de esta Tabla se proporcionan también un protocolo de síntesis y caracterización para este precursor.
43		Después de esta Tabla se proporcionan también un protocolo de síntesis y caracterización para este precursor.
44		Después de esta Tabla se proporcionan también un protocolo de síntesis y caracterización para este precursor.
45		Después de esta Tabla se proporcionan también un protocolo de síntesis y caracterización para este precursor.

Tabla 10. Precursores de bromoacetamida adicionales		
Ej.	Producto de bromoacetamida	Protocolo de síntesis
46		Después de esta Tabla se proporcionan también un protocolo de síntesis y caracterización para este precursor.
47		Después de esta Tabla se proporcionan también un protocolo de síntesis y caracterización para este precursor.
48		Después de esta Tabla se proporcionan también un protocolo de síntesis y caracterización para este precursor.

Ejemplo de precursor 14B. 3-(2-bromoacetamido)-N-((S)-1-(((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)propanamida



[00181] Etapa 1: Síntesis de ter-butil ((S)-1-(((S)-1-((3-(4-

((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)carbamato. A una solución de (ter-butoxicarbonil)-L-alanil-L-alanina (11,9 g, 45,6 mmol, 1,30 eq) en tetrahidrofurano (140 ml) se le agregó *N*-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinolina (11,3 g, 45,6 mmol, 1,30 eq), y la mezcla de reacción se agitó a 15°C durante 0,5 horas. Luego se agregó el producto del Ejemplo de precursor 2 ((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-aminobencil)fenil)-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-1,2,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-4H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-4-ona (20,0 g, 35,1 mmol)) y la mezcla se agitó a 15°C durante 2 horas. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida para obtener un residuo y se purificó mediante cromatografía en columna en gel de sílice (SiO₂, éter de petróleo/acetato de etilo = 3/1 a 0/1) para obtener el compuesto del título (25,0 g, 88% de rendimiento). ¹H NMR (400MHz dimetilsulfóxido-*d*6) δ 9,85 (s, 1H), 7,96 (d, J = 7,2 Hz, 1H), 7,37-7,41 (m, 4H), 7,31 (d, J = 10,0 Hz, 1H), 7,21-7,23 (m, 3H), 6,94 (dd, J = 23,6, 7,2 Hz, 2H), 6,16 (d, J = 10,0 Hz, 1H), 5,93 (s, 1H), 5,41 (s, 1H), 5,08 (t, J = 5,6 Hz, 1H), 4,92 (d, J = 5,2 Hz, 1H), 4,78 (d, J = 3,2 Hz, 1H), 4,50 (dd, J = 19,6, 6,4 Hz, 1H), 4,35-4,38 (m, 1H), 4,29 (s, 1H), 4,18 (dd, J = 19,6, 5,6 Hz, 1H), 3,98-4,16 (m, 1H), 3,89 (s, 2H), 2,54-2,58 (m, 1H), 2,31 (d, J = 10,8 Hz, 1H), 2,03 - 2,10 (m, 2H), 1,67 - 1,77 (m, 6H), 1,39 (s, 3H), 1,37 (s, 9H), 1,16-1,19 (m, 3H), 1,01-1,03 (m, 2H), 0,86 (s, 3H).

[00182] Etapa 2: Síntesis de clorhidrato de (S)-2-amino-N-((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)propanamida. Una solución de ter-butil ((S)-1-(((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)carbamato (15,0 g, 18,5 mmol, 1,0 eq) en HCl/metil ter-butil éter (90 ml, 4 M) se agitó a 20°C durante 0,5 horas. La mezcla de reacción se filtró y la torta de filtro se secó. El residuo se purificó mediante HPLC preparativa para obtener el compuesto del título (10,2 g, 74% de rendimiento). ¹H NMR (400 MHz dimetilsulfóxido-*d*6) δ 10,0 (s, 1 H), 8,68 (d, J = 7,2 Hz, 1H), 8,13 (br d, J = 3,6 Hz, 3H),

7,43 - 7,45 (m, 2H), 7,39 (d, J = 7,6 Hz, 2H), 7,32 (d, J = 10,4 Hz, 1H), 7,21 - 7,24 (m, 3H), 6,93 (br d, J = 7,6 Hz, 1H), 6,16 (dd, J = 10,0, 1,6 Hz, 1H), 5,93 (s, 1H), 5,41 (s, 1H), 4,92 (d, J = 4,8 Hz, 1H), 4,82 (br s, 1H), 4,41 - 4,52 (m, 2H), 4,29 (br s, 1H), 4,18 (d, J = 19,6 Hz, 1H), 3,87 - 3,89 (m, 3H), 2,54 - 2,58 (m, 1H), 2,29 - 2,33 (m, 1H), 2,01 - 2,03 (m, 2H), 1,67 - 1,77 (m, 5H), 1,40 (s, 3H), 1,34 (dd, J = 14,4, 6,8 Hz, 6H), 1,02 - 1,03 (m, 2H), 0,86 (s, 3H).

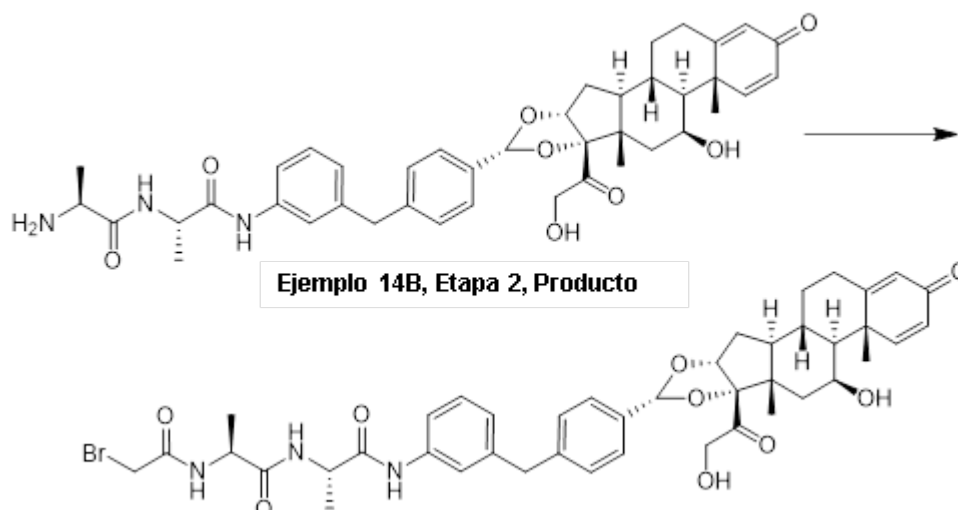
[00183] Etapa 3: Síntesis de ter-butil (3-(((S)-1-(((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-3-oxopropil)carbamato. A una solución de 2,5-dioxopirrolidin-1-il 3-((ter-butoxicarbonil)amino)propanoato (205 mg, 0,716 mmol) en dimetilformamida (3 ml) se le agregaron (S)-2-amino-N-(((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)propanamida (333 mg, 0,477 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (0,167 ml, 0,954 mmol) a 25°C. La reacción se agitó a 25°C durante 2 horas. Se prepararon dos viales adicionales como se describió anteriormente. Las tres mezclas de reacción se combinaron y se purificaron mediante HPLC preparativa (método AA1) para obtener el compuesto del título (300 mg, 24% de rendimiento). LCMS (método AA13) Rt = 1,152 min, m/z 883,5 (M+H)⁺.

[00184] Etapa 4: Síntesis de 3-amino-N-(((S)-1-(((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)propanamida. A una solución de ter-butil (3-(((S)-1-(((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-3-oxopropil)carbamato (100 mg, 0,113 mmol) en diclorometano (1 ml) se le agregó ácido trifluoroacético (0,33 ml, 4,28 mmol) a 25°C. La reacción se agitó a 25°C durante 1 hora. Se preparó un vial adicional como se describió anteriormente. Ambas mezclas de reacción se combinaron y se purificaron mediante HPLC preparativa (método AA2) para obtener el compuesto del título (50 g,

28% de rendimiento). LCMS (método AA13) Rt = 0,987 min, m/z 783,4 (M+H)⁺.

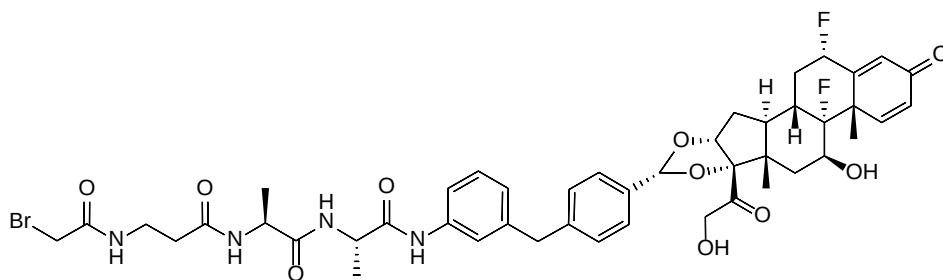
[00185] Etapa 5: Síntesis de 3-(2-bromoacetamido)-N-((S)-1-(((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)propanamida. A una solución de ácido 2-bromoacético (35,5 mg, 0,255 mmol) en dimetilformamida (1 ml) se le agregó 2-etoxi-1-etoxicarbonil-1,2-dihidroquinolina (63,2 mg, 0,255 mmol) a 25°C. La reacción se agitó a 25°C durante 30 minutos, luego se agregó 3-amino-N-((S)-1-(((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)propanamida (100 mg, 0,128 mmol) a 25°C. La reacción se agitó a 25°C durante 2 horas. Se preparó un vial adicional como se describió anteriormente. Ambas mezclas de reacción se combinaron y se purificaron mediante HPLC preparativa (método AA3) para obtener el compuesto del título (80 g, 35% de rendimiento). LCMS (método AA4) Rt: 2,993 min. m/z 905,3 (M+H)⁺. ¹H NMR (metanol-d₄, 400MHz) δ 7,53 - 7,48 (m, 1H), 7,46 - 7,40 (m, 2H), 7,34 (dd, J=1,5, 8,2 Hz, 2H), 7,23 - 7,14 (m, 3H), 6,92 (t, J=7,5 Hz, 1H), 6,24 (d, J=9,5 Hz, 1H), 6,01 (s, 1H), 5,42 (d, J=1,3 Hz, 1H), 5,04 (d, J=4,9 Hz, 1H), 4,62 (d, J=19,4 Hz, 1H), 4,48 - 4,21 (m, 4H), 3,93 (d, J=2,2 Hz, 2H), 3,76 (s, 1H), 3,65 (s, 1H), 3,45 (quind, J=6,4, 12,8 Hz, 2H), 2,65 (dt, J=5,6, 13,1 Hz, 1H), 2,52 - 2,34 (m, 3H), 2,25 (dq, J=3,9, 10,8 Hz, 1H), 2,13 (br dd, J=5,7, 12,6 Hz, 1H), 1,95 (br d, J=13,7 Hz, 1H), 1,89 - 1,64 (m, 5H), 1,48 (s, 3H), 1,43 (dd, J=2,2, 7,3 Hz, 3H), 1,36 (dd, J=7,2, 10,7 Hz, 3H), 1,20 - 1,07 (m, 1H), 1,03 (ddd, J=3,6, 7,5, 11,1 Hz, 1H), 0,98 (s, 3H).

Ejemplo de precursor 15: (S)-2-(2-bromoacetamido)-N-((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)propanamida



[00186] Etapa 1: Síntesis de (S)-2-(2-bromoacetamido)-N-((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)propanamida. A una solución de ácido 2-bromoacético (109 mg, 0,787 mmol) en dimetilformamida (2 ml) se le agregó 2-etoxi-1-etoxicarbonil-1,2-dihidroquinolina (195 mg, 0,787 mmol) a 25°C. La reacción se agitó a 25°C durante 30 minutos, tras lo cual se agregó a la mezcla el producto de la etapa 2 del Ejemplo de precursor 14B ((S)-2-amino-N-((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)propanamida) (280 mg, 0,393 mmol). La reacción se agitó a 25°C durante 2 horas y luego se purificó mediante HPLC preparativa (método AA5) para obtener el compuesto del título (85 mg, 26% de rendimiento). LCMS (método AA4) Rt = 3,10 min, m/z 834,3 (M+H)⁺. ¹H NMR (metanol-d₄, 400 MHz) δ 0,98 (s, 3H), 1,02 (br s, 1H), 1,12 (br d, J=10,5 Hz, 1H), 1,40 (br dd, J=7,0, 10,5 Hz, 6H), 1,48 (s, 3H), 1,89 - 1,66 (m, 4H), 1,98 - 1,89 (m, 1H), 2,12 (br d, J=12,7 Hz, 1H), 2,24 (br d, J=10,5 Hz, 1H), 2,37 (br d, J=11,0 Hz, 1H), 2,70 - 2,58 (m, 1H), 3,93 - 3,80 (m, 4H), 4,46 - 4,24 (m, 4H), 4,61 (d, J=19,3 Hz, 1H), 5,04 (d, J=4,8 Hz, 1H), 5,43 (s, 1H), 6,01 (s, 1H), 6,24 (br d, J=8,8 Hz, 1H), 6,90 (br d, J=7,0 Hz, 1H), 7,23 - 7,12 (m, 3H), 7,47 - 7,30 (m, 5H).

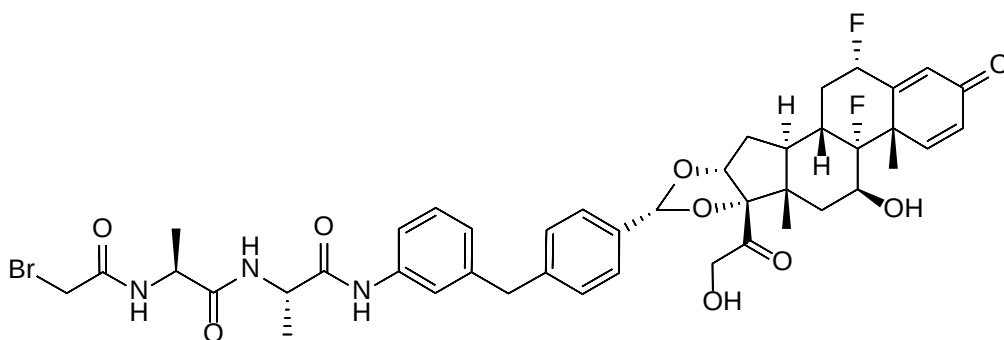
Ejemplo de precursor 21B: (S)-2-((2-(2-bromoacetamido)etil)amino)-N-((S)-1-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)propanamida



[00187] Preparado mediante una vía similar al Ejemplo de precursor 14B con (2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-aminobencil)fenil)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-1,2,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-4H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-4-ona.

[00188] LCMS (método AA4) Rt = 2,942 min, m/z 940,3 (M+H)⁺. ¹H NMR (dimetilsulfóxido-*d*6) δ = 9,81 - 9,68 (m, 1H), 8,31 - 8,17 (m, 2H), 8,15 - 8,04 (m, 1H), 7,56 - 7,39 (m, 2H), 7,35 (d, J=7,9 Hz, 2H), 7,30 - 7,16 (m, 4H), 6,91 (d, J=7,5 Hz, 1H), 6,30 (dd, J=2,0, 10,3 Hz, 1H), 6,13 (s, 1H), 5,74 - 5,49 (m, 2H), 5,45 (s, 1H), 5,46 - 5,43 (m, 1H), 4,94 (d, J=4,8 Hz, 1H), 4,51 (d, J=19,7 Hz, 1H), 4,40 - 4,15 (m, 4H), 3,88 (s, 2H), 3,82 (d, J=3,9 Hz, 2H), 3,32 - 3,22 (m, 2H), 2,72 - 2,57 (m, 1H), 2,36 - 2,19 (m, 4H), 2,09 - 2,00 (m, 1H), 1,78 - 1,62 (m, 3H), 1,57 - 1,45 (m, 4H), 1,27 (dd, J=2,4, 7,2 Hz, 3H), 1,20 (d, J=7,0 Hz, 3H), 0,86 (s, 3H).

Ejemplo de precursor 22: (S)-2-(2-bromoacetamido)-N-((S)-1-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)propanamida

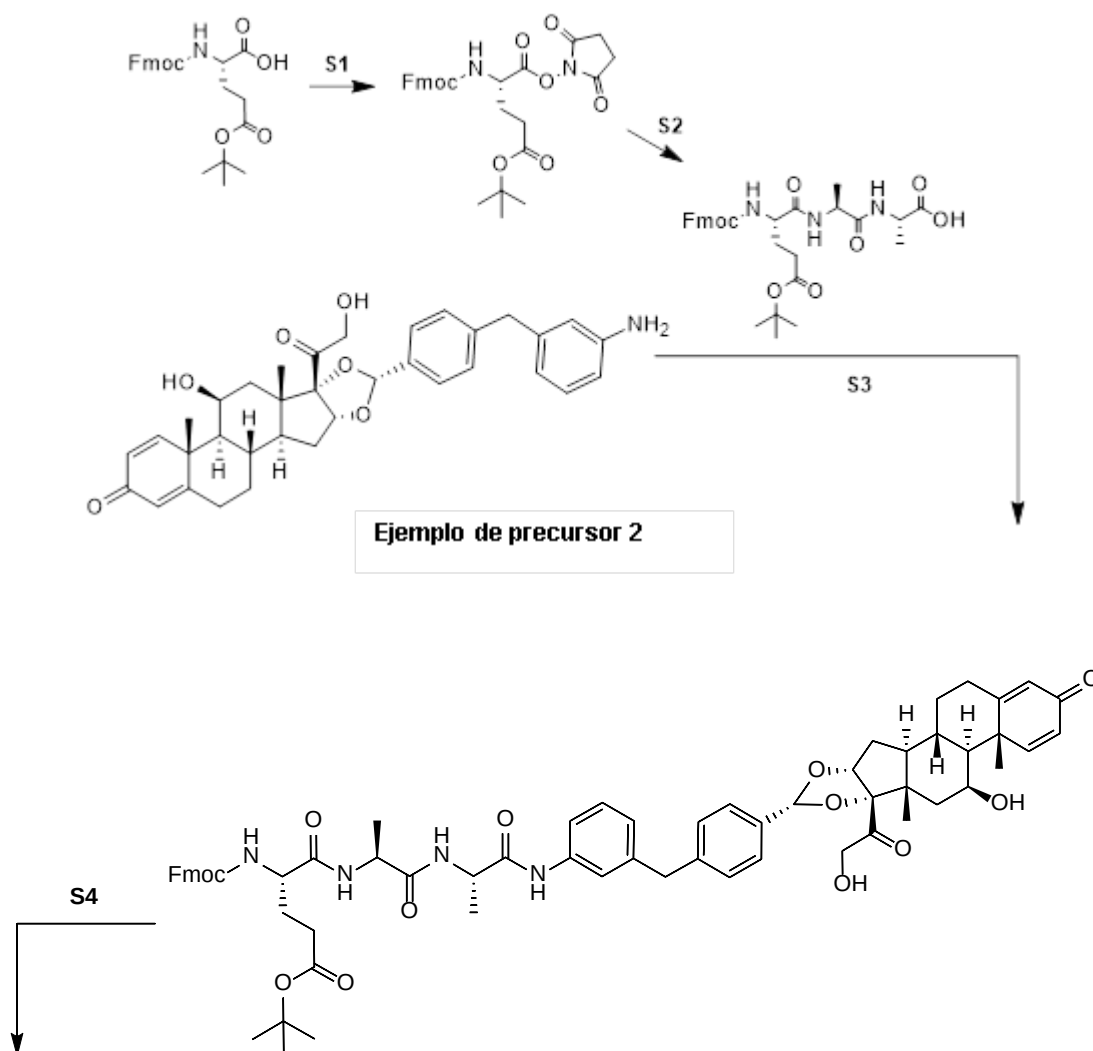


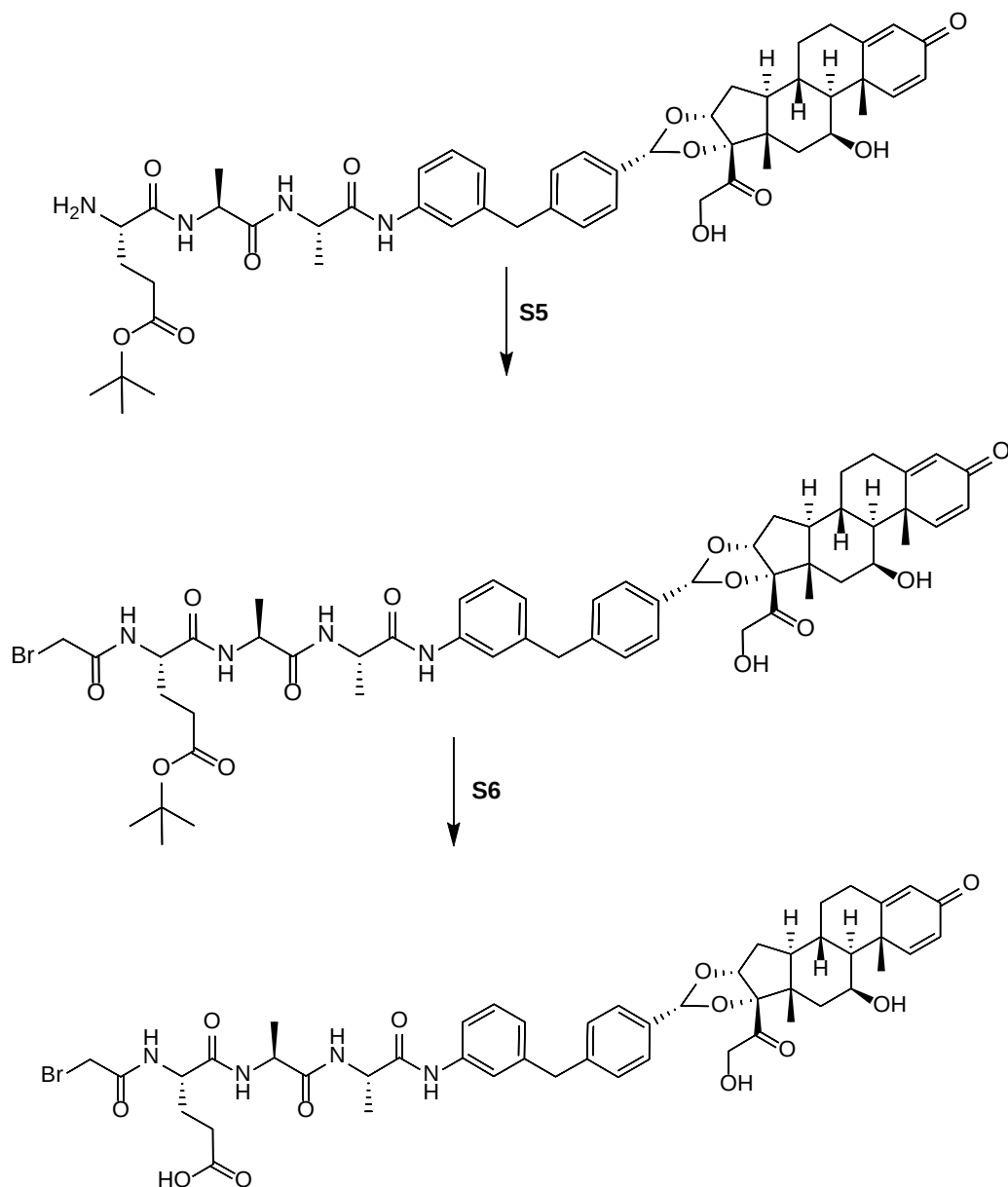
[00189] Preparado mediante una vía similar al Ejemplo de precursor 15 con (2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-aminobencil)fenil)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-1,2,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-4H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-4-ona.

[00190] LCMS (método AA4) Rt = 3,089 min, m/z 869,3 (M+H)⁺. ¹H NMR

(metanol-*d*₄) δ 7,29-7,57 (m, 5H), 7,15-7,26 (m, 3H), 6,93 (br d, *J*=7,02 Hz, 1H), 6,30-6,38 (m, 2H), 5,47-5,68 (m, 1H), 5,43-5,45 (m, 1H), 5,04 (br d, *J*=3,95 Hz, 1H), 4,62 (br d, *J*=19,29 Hz, 1H), 4,25-4,46 (m, 4H), 3,93 (br s, 2H), 3,77-3,90 (m, 2H), 2,60-2,78 (m, 1H), 2,21-2,49 (m, 3H), 1,63-1,85 (m, 4H), 1,58 (s, 3H), 1,35-1,46 (m, 6H), 0,98 (s, 3H).

Ejemplo de precursor 42: ácido (S)-4-(2-bromoacetamido)-5-(((S)-1-(((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-5-oxopentanoico





[00191] Etapa 1: Síntesis de 5-(ter-butil) 1-(2,5-dioxopirrolidin-1-il) (((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)-L-glutamato. A una solución de ácido (S)-2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-5-(ter-butoxi)-5-oxopentanoico (50 g, 118 mmol) y 1-hidroxipirrolidin-2,5-diona (13,52 g, 118 mmol) en diclorometano (600 ml) se le agregó *N,N'*-metandiilidendiciclohexanamina (DCC) (24,25 mg, 118 mmol) a 0°C y la mezcla se agitó a 25°C durante 4 horas. La mezcla se filtró a través de un embudo de vidrio sinterizado y se lavó con diclorometano (100 ml). El solvente se eliminó al vacío para obtener el compuesto del título (60 g, 96% de rendimiento). LCMS (método AA13) Rt = 1,663 min, m/z 545,0 (M+Na)⁺. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 1,40 - 1,54 (m, 9 H) 2,15 (dq, J=14,53, 7,36 Hz, 1 H) 2,25 - 2,38 (m, 1 H) 2,39 - 2,53 (m, 2 H) 2,82 (s, 4 H) 4,17 -

4,27 (m, 1 H) 4,30 - 4,49 (m, 2 H) 4,72 - 4,83 (m, 1 H) 5,71 (br d, J=8,16 Hz, 1 H) 7,24 - 7,34 (m, 2 H) 7,36 - 7,44 (m, 2 H) 7,55 - 7,63 (m, 2 H) 7,76 (d, J=7,50 Hz, 2 H). Fmoc = fluorenilmetiloxycarbonilo

[00192] Etapa 2: Síntesis de ((S)-2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-5-(ter-butoxi)-5-oxopentanoil)-L-alanil-L-alanina. A una solución de ácido (S)-2-((S)-2-aminopropanamido)propanoico (6,13 g, 38,3 mmol) en 1,2-dimetoxietano (200 ml) y agua (133 ml) se le agregaron NaHCO₃ (12,86 g, 153 mmol) y 5-(ter-butil 1-(2,5-dioxopirrolidin-1-il) (((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)-L-glutamato (20 g, 38,3 mmol). La mezcla se agitó a 25°C durante 4 horas. La mezcla se concentró a presión reducida para eliminar el solvente. Se agregaron una solución saturada de NaHCO₃ (250 ml) y acetato de etilo (250 ml) y se separaron las capas. Se agregó HCl acuoso (1 M, 250 ml) a la capa acuosa y se lo extrajo con acetato de etilo (300 ml). La capa orgánica se secó (Na₂SO₄) y se filtró y el solvente se eliminó al vacío para obtener el compuesto del título (15 g, 69% de rendimiento). LCMS (método AA13) Rt = 1,170 min, m/z 568,4 (M+H)⁺. ¹H NMR (dimetilsulfóxido-d₆, 400 MHz) δ 1,15 (t, J=7,06 Hz, 1 H) 1,21 (br d, J=7,06 Hz, 3 H) 1,26 (br d, J=7,28 Hz, 3 H) 1,37 (s, 9 H) 1,65 - 1,78 (m, 1 H) 1,81 - 1,93 (m, 1 H) 1,96 (s, 1 H) 2,23 (br t, J=7,83 Hz, 2 H) 4,01 (quin, J=7,11 Hz, 2 H) 4,15 - 4,23 (m, 2 H) 4,23 - 4,32 (m, 2 H) 7,26 - 7,34 (m, 2 H) 7,36 - 7,43 (m, 2 H) 7,53 (br d, J=8,16 Hz, 1 H) 7,71 (br t, J=6,73 Hz, 2 H) 7,86 (d, J=7,50 Hz, 2 H) 7,99 (br d, J=7,28 Hz, 1 H) 8,14 (br d, J=7,28 Hz, 1 H) 12,53 (br s, 1 H).

[00193] Etapa 3: Síntesis de ter-butil (S)-4-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-5-(((S)-1-(((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-5-oxopentanoato. A una solución de ((S)-2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-5-(ter-butoxi)-5-oxopentanoil)-L-alanil-L-alanina (1,495 g, 2,63 mmol) en dimetilformamida (5 ml) se le agregaron 2,4,6-trióxido de 2,4,6-tripropil-1,3,5,2,4,6-trioxatrfosfinano (2,234 g, 3,51 mmol) y trietilamina (0,533 g, 5,27 mmol) a 0°C. La mezcla se agitó a 25°C durante 30 minutos. Se agregó a la mezcla el Ejemplo de precursor 2 ((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-aminobencil)fenil)-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-1,2,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-4H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-4-ona) (1 g, 1,755 mmol) a 25°C y la reacción se agitó durante 12 horas. La mezcla se agregó a agua helada (50 ml) y el precipitado se recolectó mediante

filtración para obtener el compuesto del título (1,68 g, 86% de rendimiento). LCMS (método AA13) Rt = 1,344 min, m/z 1119,5 (M+H)⁺.

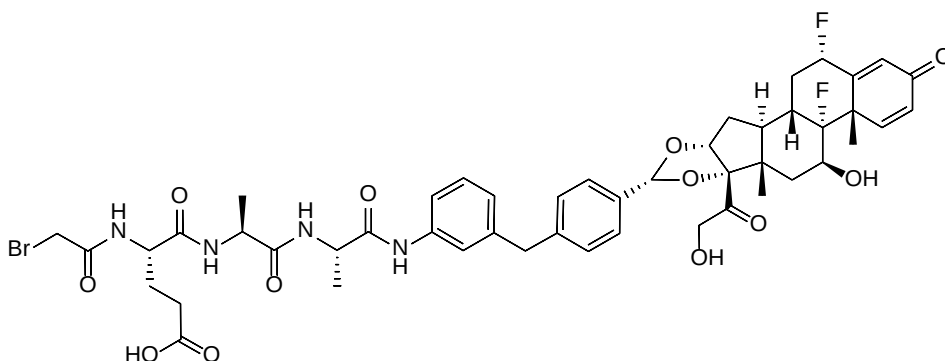
[00194] Etapa 4: Síntesis de *ter*-butil (S)-4-amino-5-(((S)-1-(((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-5-oxopentanoato. A una solución de *ter*-butil (S)-4-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-5-(((S)-1-(((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-5-oxopentanoato (1,68 g, 1,501 mmol) en acetonitrilo (3 ml) se le agregó piperidina (0,6 ml, 1,501 mmol) a 0°C. La mezcla se agitó a 0°C durante 10 minutos. Se agregó ácido trifluoroacético (0,5 ml) y la mezcla se purificó mediante HPLC preparativa (método AA6) para obtener el compuesto del título (1,03 g, 76% de rendimiento). LCMS (método AA13) Rt = 1,080 min, m/z 897,5 (M+H)⁺.

[00195] Etapa 5: Síntesis de *ter*-butil (S)-4-(2-bromoacetamido)-5-(((S)-1-(((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-5-oxopentanoato. A una solución de *ter*-butil (S)-4-amino-5-(((S)-1-(((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-5-oxopentanoato (160 mg, 0,178 mmol) en dimetilformamida (3 ml) se le agregaron ácido 2-bromoacético (37,2 mg, 0,268 mmol) y etil 2-etoxiquinolin-1(2H)-carboxilato (52,9 mg, 0,214 mmol). La mezcla se agitó a 25°C durante 2 horas. La reacción se diluyó con acetato de etilo (50 ml), se lavó con HBr acuoso (1 M, 2 x 40 ml), NaHCO₃ acuoso saturado (30 ml) y salmuera (30 ml). La capa orgánica se secó (Na₂SO₄), se filtró y se concentró para obtener el compuesto del título (140 mg, 77% de rendimiento). LCMS (método AA13) Rt = 1,232 min, m/z 1019,4 (M+H)⁺.

[00196] Etapa 6: Síntesis de ácido (S)-4-(2-bromoacetamido)-5-(((S)-1-(((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-

6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-5-oxopentanoico. A una solución de *ter*-butil (S)-4-(2-bromoacetamido)-5-(((S)-1-(((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-5-oxopentanoato (140 mg, 0,138 mmol) en diclorometano (3 ml) se le agregó ácido trifluoroacético (1 ml). La mezcla se agitó a 20°C durante 1 hora. El solvente se eliminó al vacío y el producto crudo se purificó mediante HPLC preparativa (método AA5) para obtener el compuesto del título (36 mg, 26% de rendimiento). LCMS (método AA4) Rt = 2,975 min, m/z 961,9 (M+H)⁺. ¹H NMR (dimetilsulfóxido-*d*₆, 400 MHz). δ 0,84 (s, 3 H) 0,95 - 1,13 (m, 2 H) 1,18 - 1,28 (m, 6 H) 1,38 (s, 3 H) 1,56 - 1,82 (m, 6 H) 1,83 - 1,95 (m, 1 H) 2,00 (br d, J=12,13 Hz, 1 H) 2,06 - 2,16 (m, 1 H) 2,18 - 2,34 (m, 4 H) 2,52 - 2,72 (m, 1 H) 3,82 - 3,94 (m, 4 H) 4,09 - 4,39 (m, 5 H) 4,48 (d, J=19,40 Hz, 1 H) 4,78 (br s, 1 H) 4,90 (d, J=5,07 Hz, 1 H) 5,38 (s, 1 H) 5,92 (s, 1 H) 6,15 (dd, J=10,03, 1,65 Hz, 1 H) 6,89 (d, J=7,72 Hz, 1 H) 7,15 - 7,24 (m, 3 H) 7,30 (d, J=9,92 Hz, 1 H) 7,37 (d, J=7,94 Hz, 2 H) 7,39 - 7,49 (m, 2 H) 8,00 - 8,31 (m, 2 H) 8,47 (dd, J=7,50, 4,19 Hz, 1 H) 9,62 - 9,90 (m, 1 H).

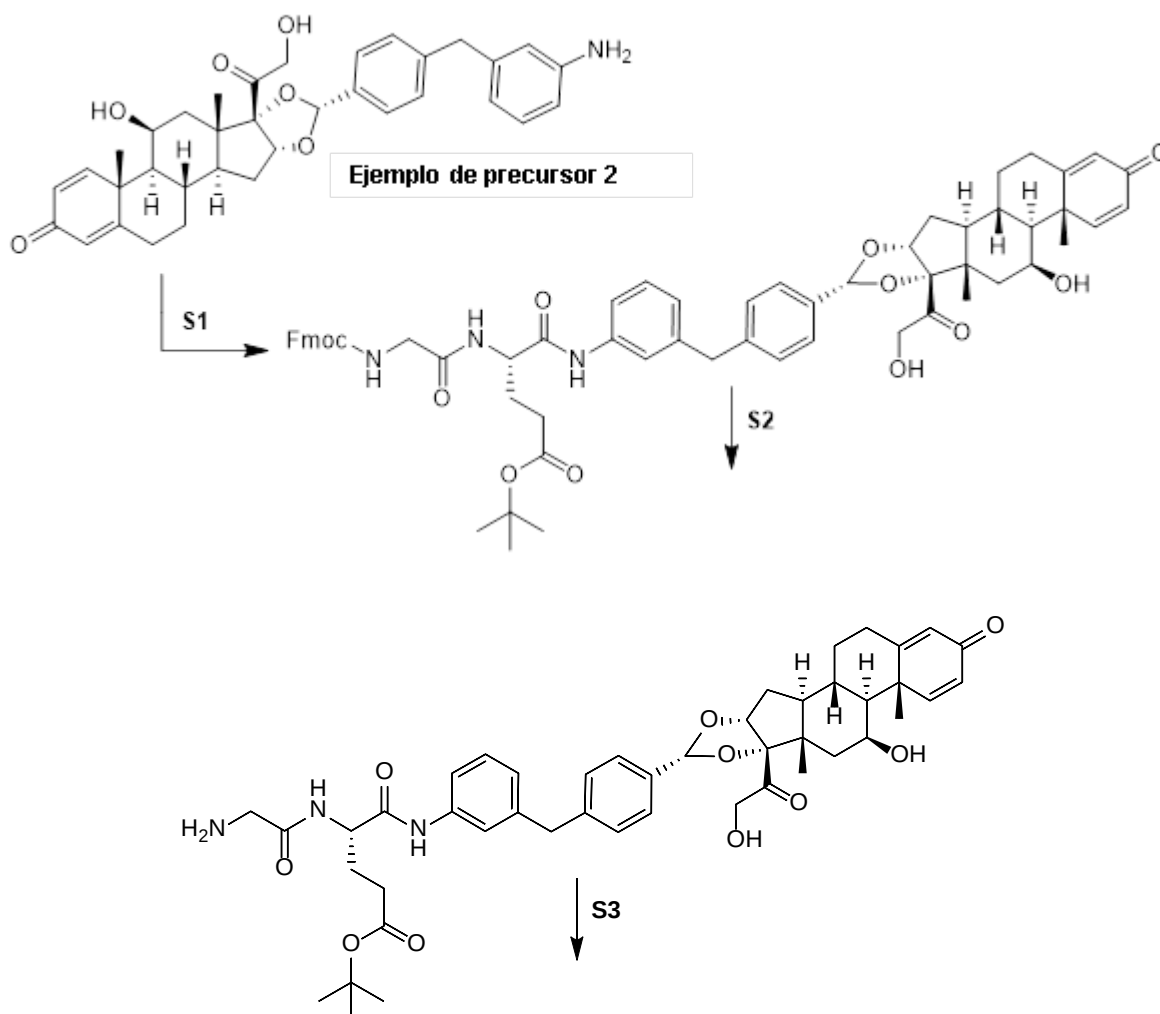
Ejemplo de precursor 23: ácido (S)-4-(2-bromoacetamido)-5-(((S)-1-(((S)-1-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-5-oxopentanoico

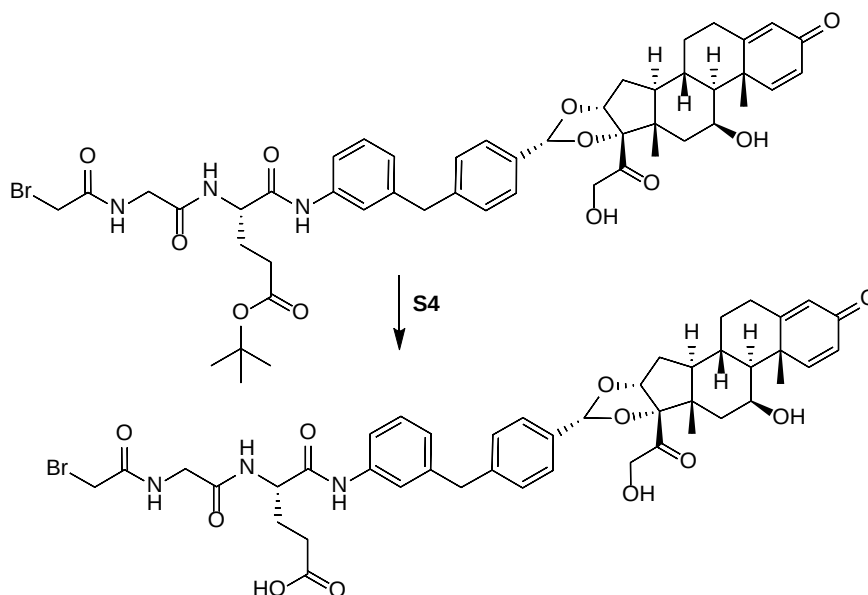


[00197] Preparado mediante una vía similar al Ejemplo de precursor 42 con (2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-aminobencil)fenil)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-1,2,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-4H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-4-ona.

[00198] LCMS (método AA4) $R_t = 2,668$ min, m/z 999,3 ($M+H$)⁺. ¹H NMR (dimetilsulfóxido-*d*6) $\delta = 12,12$ (br s, 1H), 9,89 - 9,72 (m, 1H), 8,50 - 8,45 (m, 1H), 8,40 - 8,24 (m, 1H), 8,18 (br d, $J=7,1$ Hz, 1H), 8,07 (d, $J=7,2$ Hz, 1H), 7,49 - 7,40 (m, 2H), 7,36 (d, $J=7,8$ Hz, 2H), 7,29 - 7,17 (m, 4H), 6,91 (br d, $J=7,3$ Hz, 1H), 6,30 (d, $J=10,3$ Hz, 1H), 6,13 (s, 1H), 5,75 - 5,56 (m, 1H), 5,53 (br d, $J=3,1$ Hz, 1H), 5,45 (s, 1H), 4,95 (d, $J=4,8$ Hz, 1H), 4,51 (d, $J=19,6$ Hz, 1H), 4,40 - 4,09 (m, 6H), 3,96 - 3,85 (m, 4H), 2,27 - 2,20 (m, 3H), 2,09 - 2,01 (m, 2H), 1,90 (br d, $J=7,5$ Hz, 2H), 1,78 - 1,65 (m, 4H), 1,63 - 1,63 (m, 1H), 1,50 (s, 4H), 1,30 - 1,19 (m, 6H), 0,86 (s, 3H).

Ejemplo de precursor 43: ácido (S)-4-(2-(2-bromoacetamido)acetamido)-5-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-5-oxopentanoico





[00199] Etapa 1: Síntesis de ter-butil (S)-4-(2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)acetamido)-5-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-5-oxopentanoato. A una solución de ácido (S)-2-(2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)acetamido)-5-(ter-butoxi)-5-oxopentanoico (508 mg, 1,053 mmol) en dimetilformamida (5 ml) se le agregó 2,4,6-trióxido de 2,4,6-tripropil-1,3,5,2,4,6-trioxatrilfosfinano (1117 mg, 1,775 mmol) y trietilamina (0,367 ml, 2,63 mmol) a 0°C. La reacción se agitó a 25°C durante 30 minutos. Se agregó el Ejemplo de precursor 2 ((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-aminobencil)fenil)-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-1,2,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-4H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-4-ona) (500 mg, 0,878 mmol) a 25°C y la reacción se agitó durante 2 horas a 25°C. Se prepararon seis viales adicionales como se describió anteriormente. Las siete mezclas de reacción se combinaron y se purificaron mediante HPLC preparativa (método AA7) para obtener el compuesto del título (2 g, 31% de rendimiento). LCMS (método AA13) Rt = 1,370 min, m/z 1016,5 (M+H-18)⁺. Fmoc = fluorenilmetiloxicarbonilo.

[00200] Etapa 2: Síntesis de ter-butil (S)-4-(2-aminoacetamido)-5-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-5-oxopentanoato. A una solución de ter-butil (S)-4-(2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)acetamido)-5-((3-

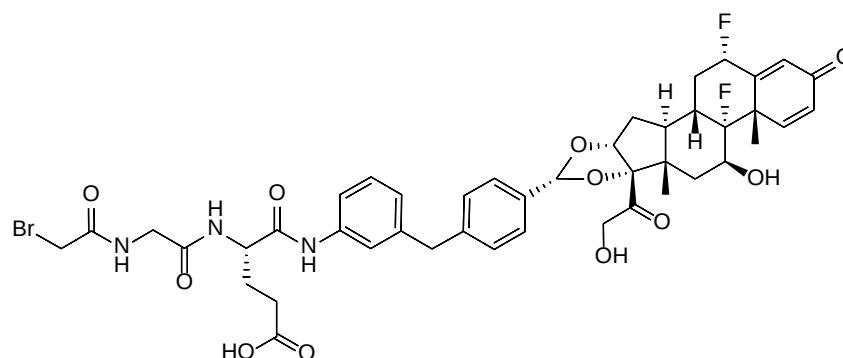
(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-5-oxopentanoato (350 mg, 0,338 mmol) en acetonitrilo (4 ml) se le agregó piperidina (1 ml, 5,05 mmol) a 25°C. La reacción se agitó a 25°C durante 15 minutos y luego se agregó ácido trifluoroacético a pH = 5. Se preparó un vial adicional como se describió anteriormente. Ambas mezclas de reacción se combinaron y se purificaron mediante HPLC preparativa (método AA8) y la fase móvil se liofilizó directamente para obtener el compuesto del título (200 mg, 13% de rendimiento). LCMS (método AA13) Rt = 1,063 min, m/z 812,4 (M+H)⁺.

[00201] Etapa 3: Síntesis de ter-butil (S)-4-(2-(2-bromoacetamido)acetamido)-5-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-5-oxopentanoato. A una solución de ácido 2-bromoacético (68,5 mg, 0,493 mmol) en dimetilformamida (2 ml) se le agregó 2-etoxi-1-etoxicarbonil-1,2-dihidroquinolina (122 mg, 0,493 mmol) a 25°C. La mezcla se agitó a 25°C durante 30 minutos y luego se agregó ter-butil (S)-4-(2-aminoacetamido)-5-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-5-oxopentanoato (200 mg, 0,246 mmol). La reacción se agitó a 25°C durante 1,5 horas. La reacción se diluyó con acetato de etilo (100 ml), se lavó con HBr acuoso (1 M, 2 x 150 ml), NaHCO₃ acuoso (200 ml) y salmuera (200 ml). La capa orgánica se secó (Na₂SO₄), se filtró y se concentró para obtener el compuesto del título (200 mg, 87% de rendimiento). LCMS (método AA13) Rt = 1,201 min, m/z 934,3 (M+H)⁺.

[00202] Etapa 4: Síntesis de ácido (S)-4-(2-(2-bromoacetamido)acetamido)-5-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-5-oxopentanoico. A una solución de ter-butil (S)-4-(2-(2-bromoacetamido)acetamido)-5-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-5-oxopentanoato (200 mg, 0,214 mmol) en diclorometano (2 ml) se le agregó ácido trifluoroacético (0,7 ml, 9,09 mmol) a 25°C. La reacción se agitó a 25°C durante 1 hora. El solvente se eliminó

a presión reducida y el residuo resultante se purificó mediante HPLP preparativa (método AA2). La fase móvil se liofilizó para obtener el compuesto del título (44 mg, 23% de rendimiento). LCMS (método AA4) Rt = 2,976 min, m/z 876,1 (M+H)⁺. ¹H NMR (dimetilsulfóxido-d₆, 400 MHz). δ 9,88 (br s, 1H), 8,52 (br s, 1H), 8,24 (br d, J=7,3 Hz, 1H), 7,51 - 7,14 (m, 9H), 6,92 (br d, J=7,1 Hz, 1H), 6,16 (br d, J=9,9 Hz, 1H), 5,93 (br s, 1H), 5,39 (s, 1H), 4,91 (br d, J=4,2 Hz, 1H), 4,77 (br s, 1H), 4,49 (br d, J=19,6 Hz, 1H), 4,38 (br d, J=5,7 Hz, 1H), 4,29 (br s, 1H), 4,17 (br d, J=19,4 Hz, 1H), 3,91 (br d, J=16,8 Hz, 3H), 3,79 (br s, 2H), 2,37 - 2,18 (m, 4H), 2,15 - 1,92 (m, 4H), 1,87 - 1,65 (m, 6H), 1,39 (br s, 3H), 1,13 - 0,96 (m, 2H), 0,86 (br s, 3H).

Ejemplo de precursor 24: ácido (S)-4-(2-(2-bromoacetamido)acetamido)-5-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-5-oxopentanoico

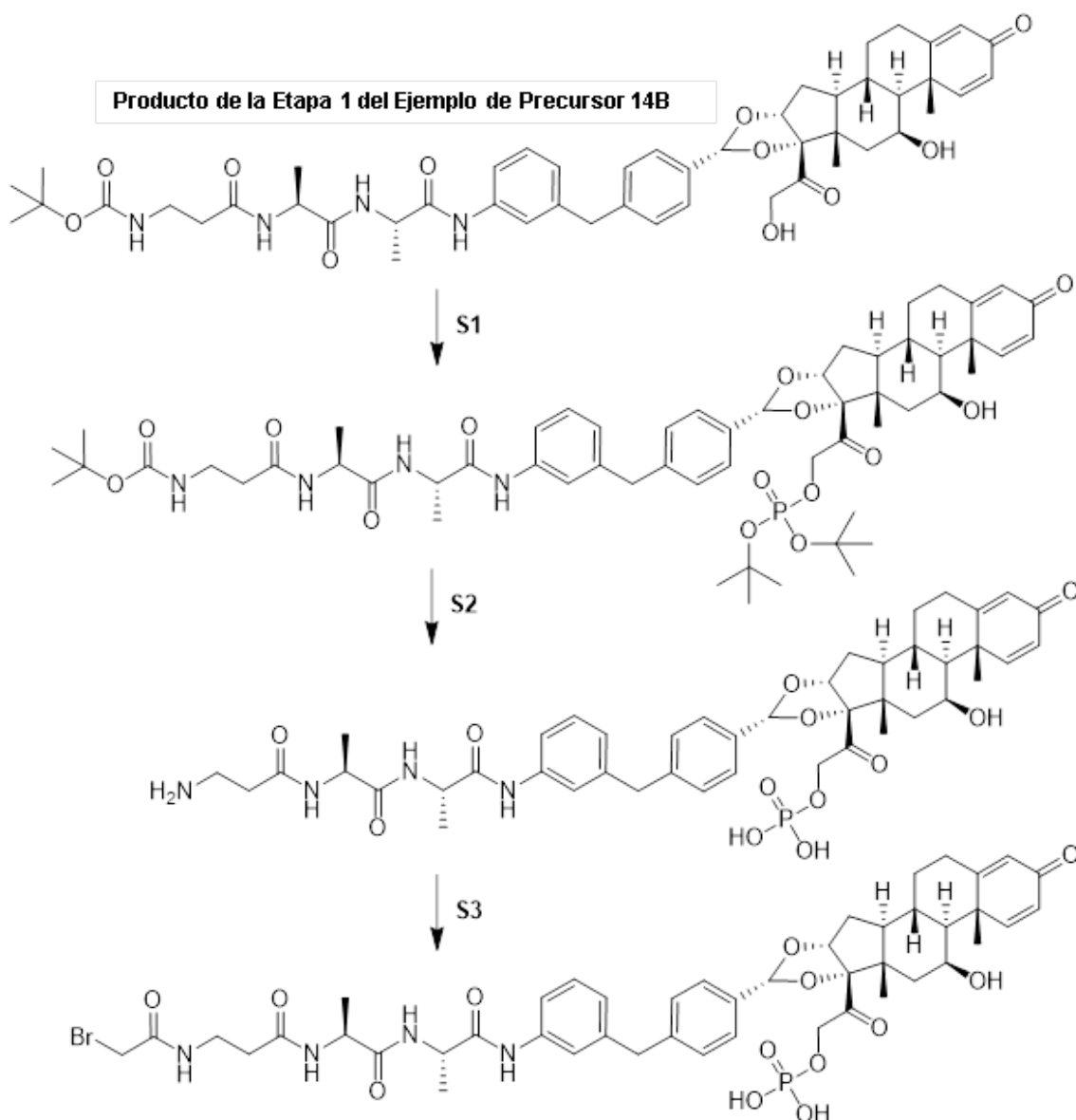


[00203] Preparado mediante una vía similar al Ejemplo de precursor 43 con (2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-aminobencil)fenil)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-1,2,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-4H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-4-ona.

[00204] LCMS (método AA4) Rt = 2,948 min, m/z 914,2 (M+H)⁺. ¹H NMR (dimetilsulfóxido-d₆, 400 MHz) δ = 9,89 (s, 1H), 8,53 (t, J=5,6 Hz, 1H), 8,25 (d, J=7,9 Hz, 1H), 7,47 (br d, J=8,4 Hz, 1H), 7,41 (s, 1H), 7,36 (d, J=8,2 Hz, 2H), 7,29 - 7,23 (m, 3H), 7,20 (t, J=7,8 Hz, 1H), 7,02 - 6,86 (m, 1H), 6,30 (dd, J=1,9, 10,3 Hz, 1H), 6,13 (s, 1H), 5,76 - 5,60 (m, 1H), 5,63 - 5,56 (m, 1H), 5,54 - 5,47 (m, 1H), 5,45 (s, 1H), 4,94 (d, J=5,1 Hz, 1H), 4,51 (d, J=19,6 Hz, 1H), 4,42 - 4,35 (m, 1H), 4,25 - 4,11 (m, 2H), 3,93 (s, 2H), 3,89 (s, 2H), 3,85 - 3,74 (m, 3H), 2,63 - 2,52 (m, 2H), 2,42 (br d, J=1,8 Hz, 1H), 2,30 - 2,16 (m, 4H), 2,07 - 1,90 (m, 2H), 1,87 - 1,61 (m, 4H), 1,55 (br s, 1H), 1,49 (s, 3H), 0,86 (s, 3H).

Ejemplo de precursor 44: 2-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-

((S)-2-((S)-2-(3-(2-bromoacetamido)propanamido)propanamido)propanamido)bencil)fenil)-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-1,2,4,6a,6b,7,8,8a,11a,12,12a,12b-dodecahidro-8bH-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-8b-il)-2-oxoetil dihidrógeno fosfato



[00205] Etapa 1: Síntesis de ter-butil (3-(((S)-1-(((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((di-ter-butoxifosforil)oxi)acetil)-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-3-oxopropil)carbamato. A una solución del producto de la etapa 1 del Ejemplo de precursor 14B (*ter*-butil (3-(((S)-1-(((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-

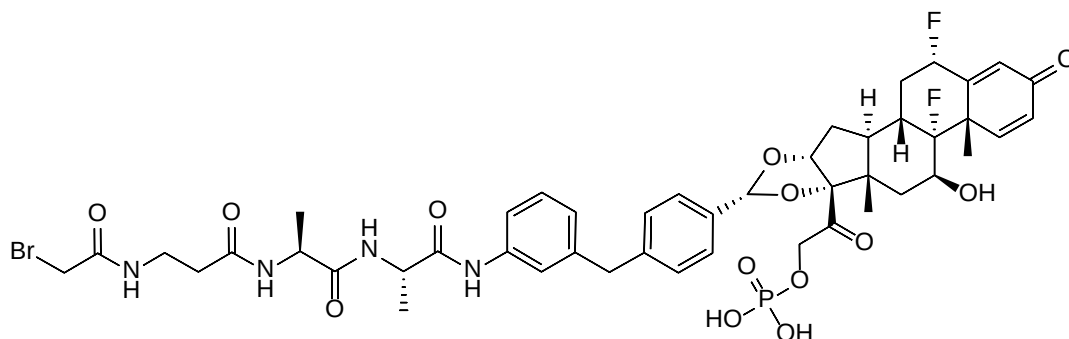
dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-3-oxopropil)carbamato) (500 mg, 0,566 mmol) en diclorometano (5 ml) se le agregó 1H-tetrazol (397 mg, 5,66 mmol) y di-ter-butil dietilfosforamidita (1,694 g, 6,79 mmol) a 25°C. La reacción se agitó a 25°C durante 1 hora y luego se agregó peróxido de hidrógeno (353 mg, 3,11 mmol). La reacción se agitó durante 2 horas. Se preparó un vial adicional como se describió anteriormente. Ambas mezclas de reacción se combinaron y se purificaron mediante HPLC preparativa (método AA7) para obtener el compuesto del título (1 g, 82% de rendimiento). LCMS (método AA13) Rt = 1,300 min, m/z 1075,8 (M+H)⁺.

[00206] Etapa 2: Síntesis de 2-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-((S)-2-((S)-2-(3-aminopropanamido)propanamido)propanamido)bencil)fenil)-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-1,2,4,6a,6b,7,8,8a,11a,12,12a,12b-dodecahidro-8bH-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-8b-il)-2-oxoetil dihidrógeno fosfato. A una solución de *ter*-butil (3-(((S)-1-(((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((di-ter-butoxifosforil)oxi)acetil)-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-3-oxopropil)carbamato (600 mg, 0,558 mmol) en diclorometano (6 ml) se le agregó ácido trifluoroacético (2 ml, 26,0 mmol) a 25°C y la reacción se agitó a 25°C durante 1 hora. El solvente se eliminó a presión reducida y el residuo resultante se purificó mediante HPLC preparativa (método AA6). La fase móvil se liofilizó para obtener el compuesto del título (350 mg, 73% de rendimiento). LCMS (método AA13) Rt = 0,986 min, m/z 863,3 (M+H)⁺.

[00207] Etapa 3: Síntesis de 2-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-((S)-2-((S)-2-(3-(2-bromoacetamido)propanamido)propanamido)propanamido)bencil)fenil)-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-1,2,4,6a,6b,7,8,8a,11a,12,12a,12b-dodecahidro-8bH-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-8b-il)-2-oxoetil dihidrógeno fosfato. A una solución de ácido 2-bromoacético (16,1 mg, 0,116 mmol) en dimetilformamida (1 ml) se le agregaron 2-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-((S)-2-((S)-2-(3-aminopropanamido)propanamido)propanamido)bencil)fenil)-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-1,2,4,6a,6b,7,8,8a,11a,12,12a,12b-dodecahidro-8bH-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-8b-il)-2-oxoetil dihidrógeno fosfato (100 mg, 0,116 mmol), tetrafluoroborato de 2-bromo-1-etilpiridin-1-io (34,9 mg, 0,127 mmol) y N-etil-N-

isopropilpropan-2-amina (30,0 mg, 0,232 mmol) a 25°C y la mezcla se agitó a 25°C durante 2 horas. El residuo resultante se purificó mediante HPLC preparativa (método AA2). La fase móvil se liofilizó para obtener el compuesto del título (65 mg, 30% de rendimiento). LCMS (método AA4) Rt = 2,932 min, m/z 985,2 (M+H)⁺. ¹H NMR (dimetilsulfóxido-d₆, 400 MHz). δ 9,79 - 9,63 (m, 1H), 8,31 - 8,24 (m, 1H), 8,21 - 8,04 (m, 2H), 7,51 - 7,41 (m, 2H), 7,36 (d, J=7,9 Hz, 2H), 7,29 (d, J=10,1 Hz, 1H), 7,24 - 7,12 (m, 3H), 6,89 (br d, J=7,7 Hz, 1H), 6,14 (dd, J=1,5, 10,1 Hz, 1H), 5,91 (s, 1H), 5,46 (s, 1H), 4,95 - 4,78 (m, 3H), 4,54 (br dd, J=8,0, 18,2 Hz, 1H), 4,38 - 4,12 (m, 4H), 3,87 (s, 2H), 3,80 (d, J=3,3 Hz, 2H), 3,25 (br d, J=6,8 Hz, 2H), 2,60 - 2,50 (m, 2H), 2,13 - 1,96 (m, 2H), 1,84 - 1,58 (m, 6H), 1,37 (s, 3H), 1,25 (dd, J=2,1, 7,2 Hz, 3H), 1,19 (s, 3H), 1,06 - 0,98 (m, 2H), 0,85 (s, 3H).

Ejemplo 25B: 2-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-((S)-2-((S)-2-(3-(2-bromoacetamido)propanamido)propanamido)propanamido)bencil)fenil)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-1,2,4,6a,6b,7,8,8a,11a,12,12a,12b-dodecahidro-8bH-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-8b-il)-2-oxoetil dihidrógeno fosfato

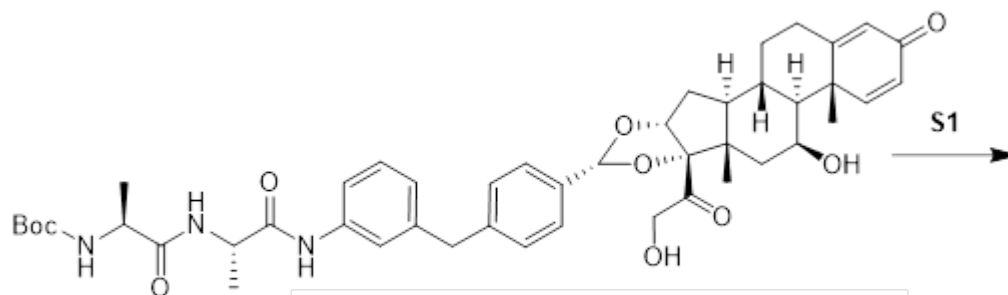


[00208] Preparado mediante una vía similar al Ejemplo de precursor 44 con 2-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-aminobencil)fenil)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-1,2,4,6a,6b,7,8,8a,11a,12,12a,12b-dodecahidro-8bH-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-8b-il)-2-oxoetil dihidrógeno fosfato.

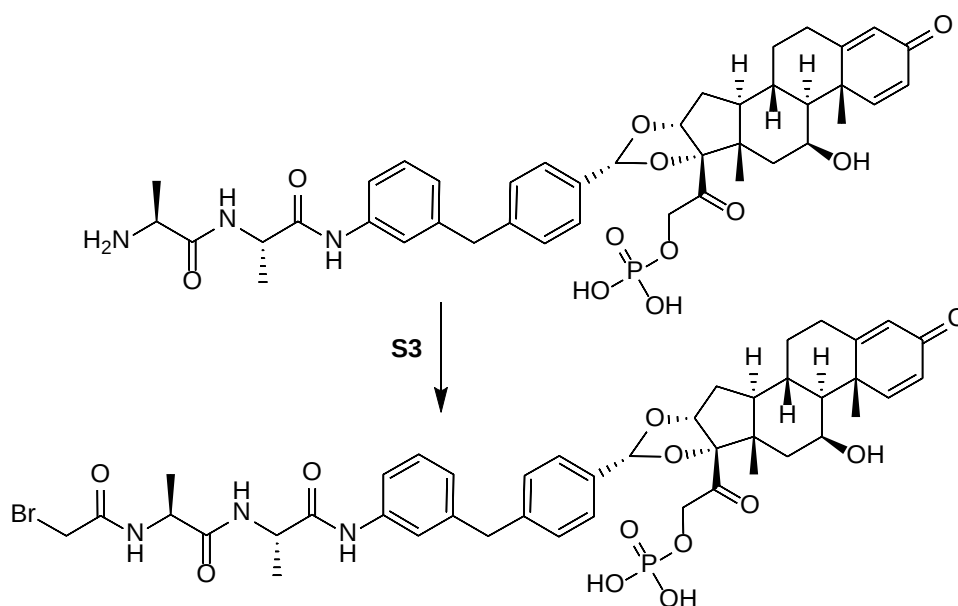
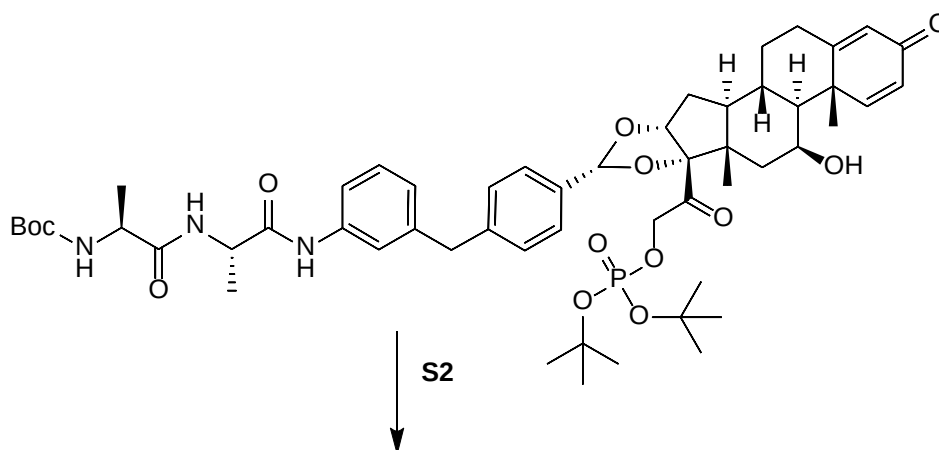
[00209] LCMS (método AA4) Rt = 2,958 min, m/z 1021,3 (M+H)⁺. ¹H (dimetilsulfóxido-d₆, 400 MHz) δ = 9,83 - 9,70 (m, 1H), 8,34 - 8,16 (m, 2H), 8,15 - 8,06 (m, 1H), 7,56 - 7,40 (m, 2H), 7,36 (d, J=7,9 Hz, 2H), 7,30 - 7,16 (m, 4H), 6,91 (br d, J=7,3 Hz, 1H), 6,30 (dd, J=1,5, 10,1 Hz, 1H), 6,12 (s, 1H), 5,75 - 5,56 (m, 2H), 5,53 (s, 1H), 4,99 - 4,87 (m, 2H), 4,59 (dd, J=8,4, 18,1 Hz, 1H), 4,43 - 4,15 (m, 4H), 3,89 (s, 2H), 3,82 (d, J=3,5 Hz, 2H), 3,33 - 3,21 (m, 2H), 2,73 - 2,60 (m, 1H), 2,39 - 2,14 (m, 5H), 2,11 - 2,00 (m, 1H), 1,78 - 1,63 (m, 3H), 1,57 - 1,45 (m, 4H), 1,27 (dd, J=2,3, 6,9

Hz, 3H), 1,19 (d, J=7,1 Hz, 3H), 0,88 (s, 3H).

Ejemplo de precursor 45: 2-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-((S)-2-((S)-2-(2-bromoacetamido)propanamido)propanamido)benzil)fenil)-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-1,2,4,6a,6b,7,8,8a,11a,12,12a,12b-dodecahidro-8bH-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-8b-il)-2-oxoetil dihidrógeno fosfato



Producto de la Etapa 1 del Ejemplo de Precursor 14B



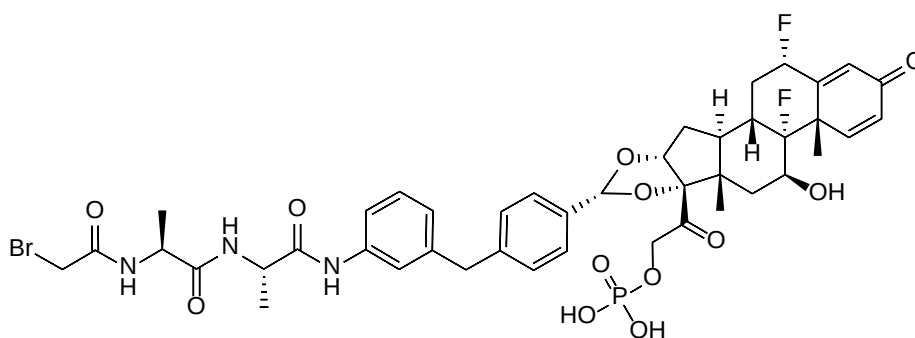
[00210] Etapa 1: Síntesis de *ter*-butil ((S)-1-(((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((di-*ter*-butoxifosforil)oxi)acetil)-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)carbamato. A una solución del producto de la etapa 1 del Ejemplo 14B (*ter*-butil ((S)-1-(((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)carbamato) (400 mg, 0,493 mmol) en dimetilformamida (4 ml) se le agregaron 1H-tetrazol (345 mg, 4,93 mmol) y di-*ter*-butil dietilfosforamidita (1474 mg, 5,91 mmol) a 25°C. La mezcla se agitó a 25°C durante 2 horas y luego se agregó peróxido de hidrógeno (307 mg, 2,71 mmol) a la mezcla a 0°C. La reacción se agitó a 25°C durante 2 horas. Se prepararon cuatro viales adicionales como se describió anteriormente. Las cinco mezclas de reacción se combinaron, se vertieron en agua helada (1 l) y se filtraron para obtener el compuesto del título (1,6 g, 65% de rendimiento). LCMS (método AA13) Rt = 1,344 min, m/z 1004,5 (M+H)⁺. Boc = *ter*-butoxicarbonilo.

[00211] Etapa 2: Síntesis de 2-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-((S)-2-((S)-2-aminopropanamido)propanamido)bencil)fenil)-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-1,2,4,6a,6b,7,8,8a,11a,12,12a,12b-dodecahidro-8bH-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-8b-il)-2-oxoetil dihidrógeno fosfato. A una solución de *ter*-butil ((S)-1-(((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((di-*ter*-butoxifosforil)oxi)acetil)-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)carbamato (1,5 g, 1,494 mmol) en diclorometano (10 ml) se le agregó ácido trifluoroacético (3 ml, 38,9 mmol) a 25°C. La reacción se agitó a 25°C durante 2 horas. La mezcla se purificó mediante HPLC preparativa (método AA10) para obtener el compuesto del título (400 mg, 34% de rendimiento). LCMS (método AA13) Rt = 1,602 min, m/z 792,4 (M+H)⁺.

[00212] Etapa 3: Síntesis de 2-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-((S)-2-((S)-2-(2-bromoacetamido)propanamido)propanamido)bencil)fenil)-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-1,2,4,6a,6b,7,8,8a,11a,12,12a,12b-dodecahidro-8bH-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-8b-il)-2-oxoetil dihidrógeno fosfato. A una

solución de ácido 2-bromoacético (63,2 mg, 0,455 mmol) en dimetilformamida (1,5 ml) se le agregaron tetrafluoroborato de 2-bromo-1-etilpiridin-1-io (125 mg, 0,455 mmol), N,N-diisopropiletilamina (0,159 ml, 0,909 mmol) y 2-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-((S)-2-((S)-2-aminopropanamido)propanamido)bencil)fenil)-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-1,2,4,6a,6b,7,8,8a,11a,12,12a,12b-dodecahidro-8bH-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-8b-il)-2-oxoetil dihidrógeno fosfato (240 mg, 0,303 mmol) a 25°C y la mezcla se agitó a 25°C durante 2 horas. La mezcla resultante se purificó mediante HPLC preparativa (método AA9) para obtener el compuesto del título (100 mg, 36,0% de rendimiento). LCMS (método AA4) Rt = 2,890 min, m/z 914,2 (M+H)⁺. ¹H NMR (dimetilsulfóxido-d₆, 400 MHz) δ 0,84-0,90 (m, 3H), 0,98-1,11 (m, 2H), 1,18-1,23 (m, 3H), 1,28 (d, J=7,09 Hz, 3H), 1,39 (s, 3H), 1,60-1,86 (m, 5H), 1,96-2,17 (m, 2H), 2,32 (br d, J=1,71 Hz, 1H), 2,52-2,59 (m, 2H), 3,86-3,94 (m, 4H), 4,26-4,40 (m, 3H), 4,56 (dd, J=18,22, 8,07 Hz, 1H), 4,82-4,96 (m, 3H), 5,48 (s, 1H), 5,93 (s, 1H), 6,16 (dd, J=10,15, 1,71 Hz, 1H), 6,91 (br d, J=7,58 Hz, 1H), 7,17-7,26 (m, 3H), 7,31 (d, J=10,03 Hz, 1H), 7,35-7,52 (m, 4H), 8,19-8,42 (m, 1H), 8,45-8,57 (m, 1H), 9,71-9,88 (m, 1H).

Ejemplo de precursor 26: Síntesis de 2-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-((S)-2-((S)-2-(2-bromoacetamido)propanamido)propanamido)bencil)fenil)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-1,2,4,6a,6b,7,8,8a,11a,12,12a,12b-dodecahidro-8bH-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-8b-il)-2-oxoetil dihidrógeno fosfato

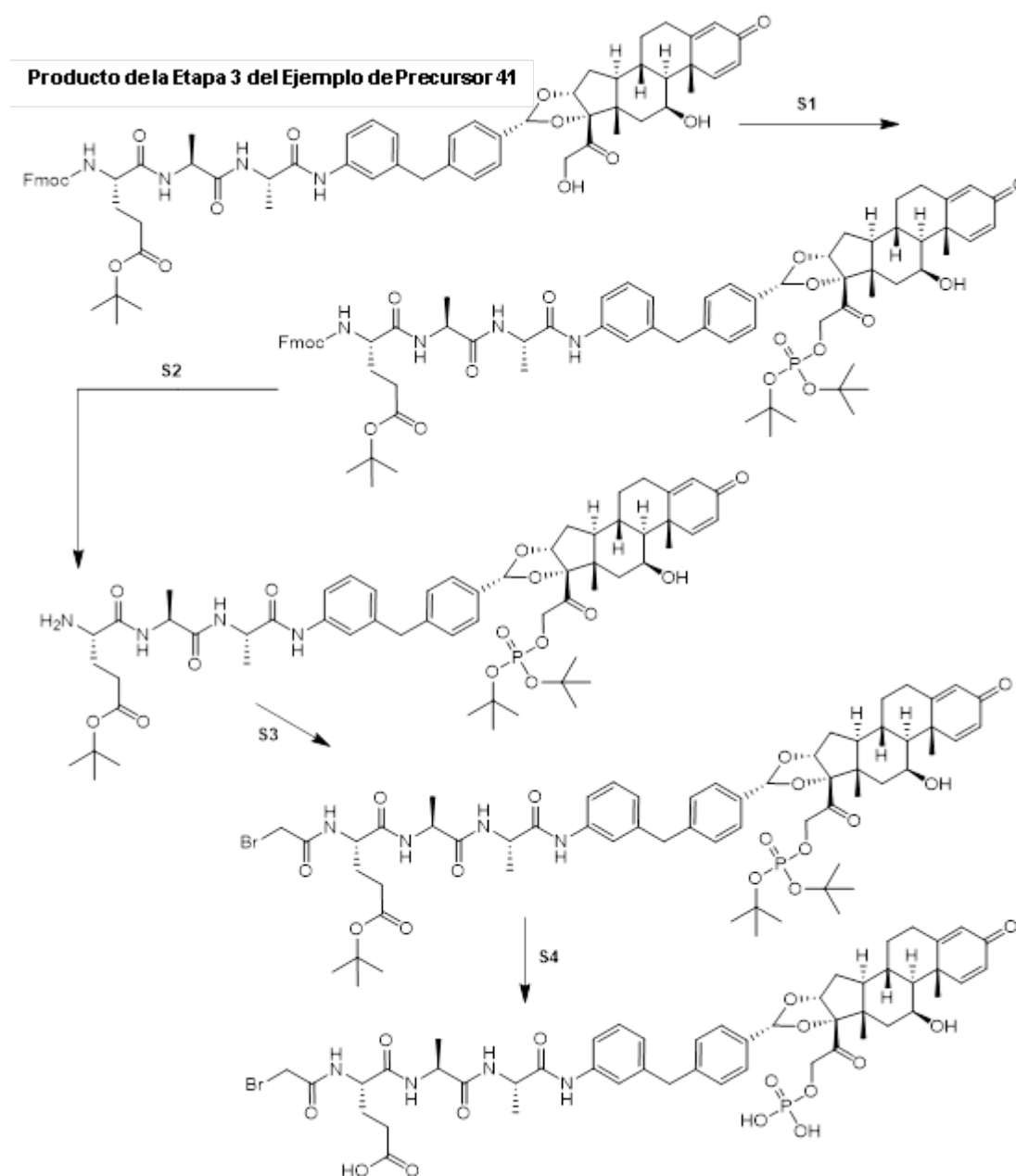


[00213] Preparado mediante una vía similar al Ejemplo de precursor 45 con 2-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-aminobencil)fenil)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-1,2,4,6a,6b,7,8,8a,11a,12,12a,12b-dodecahidro-8bH-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-8b-il)-2-oxoetil dihidrógeno fosfato.

[00214] LCMS (método AA4) Rt = 2,924 min, m/z 950,3 (M+H)⁺. ¹H NMR (metanol-d₄, 400 MHz) δ = 7,44 - 7,38 (m, 1H), 7,36 - 7,31 (m, 4H), 7,23 - 7,17 (m, 3H), 6,93 (br d, J=7,6 Hz, 1H), 6,35 - 6,33 (m, 2H), 5,61 - 5,47 (m, 2H), 5,03 (s, 1H),

5,01-4,97 (m, 1H), 4,80 - 4,76 (m, 1H), 4,43 - 4,30 (m, 3H), 3,94 (s, 2H), 3,88 - 3,81 (m, 2H), 2,76 - 2,66 (m, 1H), 2,42 - 2,38 (m, 3H), 1,81 - 1,79 (m, 3H), 1,78 - 1,75 (m, 1H), 1,58 (s, 3H), 1,42 - 1,37 (m, 6H), 1,01 (s, 3H).

Ejemplo de precursor 46: ácido (S)-4-(2-bromoacetamido)-5-(((S)-1-(((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-8b-(2-(fosfonooxi)acetil)-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-5-oxopentanoico



[00215] Etapa 1: Síntesis de *ter*-butil (S)-4-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-5-(((S)-1-(((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((di-*ter*-butoxifosforil)oxi)acetil)-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-5-oxopentanoato. A una solución del producto de la etapa 3 del Ejemplo de precursor 42 (*ter*-butil (S)-4-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-5-(((S)-1-(((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-5-oxopentanoato) (500 mg, 0,447 mmol) en dimetilformamida (2 ml) se le agregó 1H-tetrazol (313 mg, 4,47 mmol) y di-*ter*-butil dietilfosforamidita (1,337 g, 5,36 mmol) a 20°C. La reacción se agitó a 20°C durante 1 hora, luego se agregó peróxido de hidrógeno (279 mg, 2,457 mmol) y la reacción se agitó durante 1 hora adicional. La reacción se purificó mediante HPLC preparativa (método AA6) para obtener el compuesto del título (450 mg, 77% de rendimiento). LCMS (método AA13) Rt = 1,524 min, m/z 1311,6 (M+H)⁺.

[00216] Etapa 2. Síntesis de *ter*-butil (S)-4-amino-5-(((S)-1-(((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((di-*ter*-butoxifosforil)oxi)acetil)-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-5-oxopentanoato. A una solución de *ter*-butil (S)-4-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-5-(((S)-1-(((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((di-*ter*-butoxifosforil)oxi)acetil)-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-5-oxopentanoato (450 mg, 0,343 mmol) en acetonitrilo (2 ml) se le agregó piperidina (0,4 ml) a 0°C. La reacción se agitó a 0°C durante 20 minutos y luego se concentró para obtener un producto crudo, que se agitó en éter de petróleo (20 ml) durante 1 hora. El sólido se recolectó mediante filtración y se secó a presión reducida para obtener el compuesto del título (250 mg, 67% de rendimiento). LCMS (método AA13) Rt = 1,244 min, m/z 1089,5 (M+H)⁺.

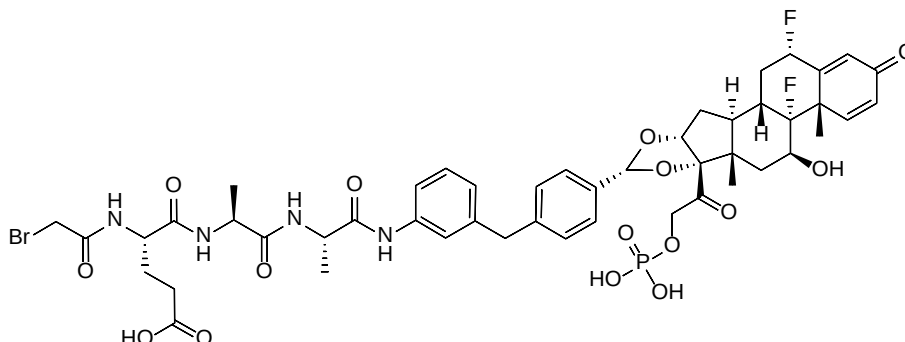
[00217] Etapa 3: Síntesis de *ter*-butil (S)-4-(2-bromoacetamido)-5-(((S)-1-(((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((di-*ter*-

butoxifosforil)oxi)acetil)-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-5-oxopentanoato. A una solución de *ter*-butil (S)-4-amino-5-(((S)-1-(((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((di-*ter*-butoxifosforil)oxi)acetil)-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-5-oxopentanoato (250 mg, 0,23 mmol) en dimetilformamida (3 ml) se le agregaron ácido 2-bromoacético (47,8 mg, 0,344 mmol) y etil 2-etoxiquinolin-1(2H)-carboxilato (68,1 mg, 0,275 mmol). La mezcla se agitó a 25°C durante 2 horas, luego se purificó mediante HPLC preparativa (Método AA11) para obtener el compuesto del título (120 mg, 43% de rendimiento). LCMS (método AA13) Rt = 1,351 min, m/z 1211,4 (M+H)⁺.

[00218] Etapa 4: Síntesis de ácido (S)-4-(2-bromoacetamido)-5-(((S)-1-(((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-8b-(2-(fosfonooxi)acetil)-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-5-oxopentanoico. A una solución de *ter*-butil (S)-4-(2-bromoacetamido)-5-(((S)-1-(((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((di-*ter*-butoxifosforil)oxi)acetil)-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-5-oxopentanoato (120 mg, 0,099 mmol) en diclorometano (3 ml) se le agregó ácido trifluoroacético (1 ml) y la mezcla se agitó a 20°C durante 2 horas. El solvente se eliminó a presión reducida y el producto crudo se purificó mediante HPLC preparativa (método AA12) para obtener el compuesto del título (32 mg, 30% de rendimiento). LCMS (método AA4) Rt = 2,909 min, m/z 1041,9 (M+H)⁺. ¹H NMR (dimetilsulfóxido-*d*6, 400 MHz) δ 9,88 - 9,67 (m, 2H), 8,47 (dd, J=4,3, 7,6 Hz, 2H), 8,26 (d, J=7,1 Hz, 1H), 8,21 - 8,12 (m, 1H), 8,28 - 8,03 (m, 1H), 8,06 (d, J=7,1 Hz, 1H), 7,49 - 7,39 (m, 5H), 7,36 (d, J=8,2 Hz, 5H), 7,30 (d, J=10,1 Hz, 2H), 7,22 (br d, J=8,2 Hz, 1H), 7,24 - 7,15 (m, 1H), 7,19 - 7,14 (m, 1H), 6,88 (d, J=7,7 Hz, 2H), 6,15 (d, J=11,7 Hz, 2H), 5,91 (s, 2H), 5,46 (s, 2H), 4,95 - 4,80 (m, 7H), 4,55 (dd, J=8,0, 18,0 Hz, 2H), 4,38 - 4,31 (m, 1H), 4,31 - 4,19 (m, 3H), 3,93 - 3,85 (m, 4H), 2,66 (s, 2H), 2,31 (br s, 1H), 2,24 (br t, J=8,2 Hz, 2H), 2,33 - 2,18 (m, 1H), 2,17 - 1,94 (m, 5H), 1,87 (br s, 2H), 1,83 - 1,59 (m, 14H), 1,37 (s, 7H), 1,28 - 1,17 (m, 15H), 1,00 (br d,

J=11,2 Hz, 5H), 0,86 (s, 7H).

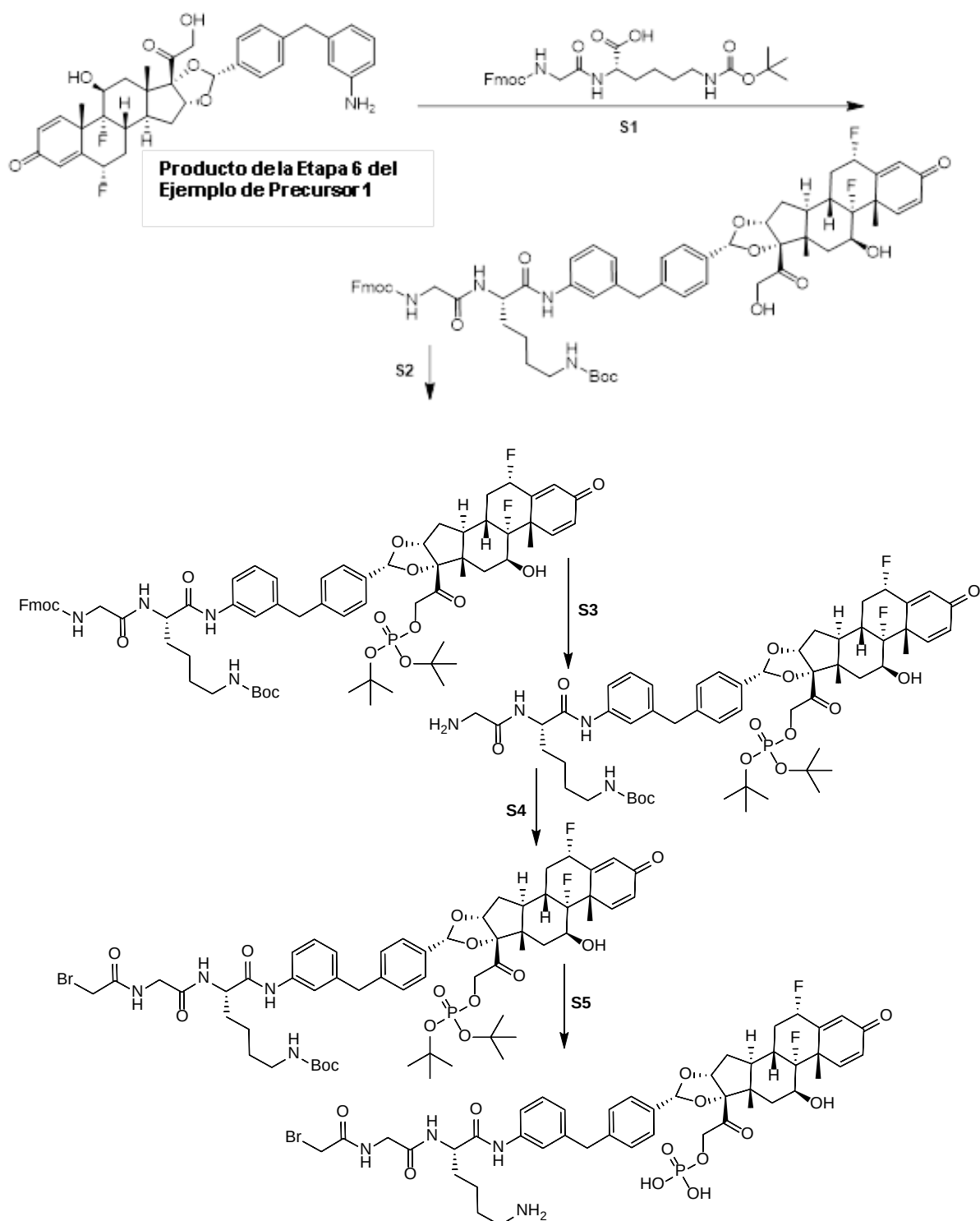
Ejemplo de precursor 27: ácido (S)-4-(2-bromoacetamido)-5-(((S)-1-(((S)-1-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-8b-(2-(fosfonooxi)acetil)-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-5-oxopentanoico



[00219] Preparado mediante una vía similar al Ejemplo de precursor 46 con (2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-aminobencil)fenil)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-1,2,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-4H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-4-ona.

[00220] LCMS (método AA4) Rt = 2,905 min, m/z 1079,1 (M+H)⁺. ¹H NMR (metanol-d₄, 400 MHz) δ = 7,48 - 7,44 (m, 1H), 7,40 - 7,30 (m, 4H), 7,25 - 7,16 (m, 3H), 6,93 (br d, J=7,6 Hz, 1H), 6,37 - 6,30 (m, 2H), 5,64 - 5,52 (m, 2H), 5,04 (br d, J=4,4 Hz, 1H), 5,01 - 4,95 (m, 1H), 4,81 - 4,72 (m, 1H), 4,43 - 4,25 (m, 4H), 4,13 - 3,99 (m, 1H), 3,97 - 3,91 (m, 2H), 3,91 - 3,77 (m, 2H), 2,79 - 2,61 (m, 1H), 2,45 - 2,33 (m, 4H), 2,27 (br d, J=13,7 Hz, 1H), 2,16 - 2,03 (m, 1H), 2,00 - 1,88 (m, 1H), 1,83 - 1,74 (m, 3H), 1,68 - 1,54 (m, 4H), 1,46 - 1,36 (m, 6H), 1,01 (s, 3H).

Ejemplo de precursor 39: 2-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-((S)-6-amino-2-(2-(2-bromoacetamido)acetamido)hexanamido)bencil)fenil)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-1,2,4,6a,6b,7,8,8a,11a,12,12a,12b-dodecahidro-8bH-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-8b-il)-2-oxoetil dihidrógeno fosfato



[00221] Etapa 1: Síntesis de ter-butil ((S)-5-(2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)acetamido)-6-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)encil)fenil)amino)-6-oxohexil)carbamato. A una solución de N²-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)glicil)-N⁶-(ter-butoxicarbonil)-L-

lisina (5,58 g, 8,26 mmol) en dimetilformamida (60 ml) se le agregaron 2,4,6-trióxido de 2,4,6-tripropil-1,3,5,2,4,6-trioxatrilfosfinano (10,51 g, 16,51 mmol) y trietilamina (3,45 ml, 24,77 mmol) a 0°C. La reacción se agitó a 25°C durante 1 hora, y luego se agregó a la reacción el producto de la etapa 6 del Ejemplo de precursor 1 ((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-aminobencil)fenil)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-1,2,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-4H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-4-ona) (5 g, 8,26 mmol) a 25°C. La reacción se agitó durante 5 horas a 25°C. Se prepararon seis viales adicionales como se describió anteriormente. Las siete reacciones se combinaron y se purificaron mediante HPLC preparativa (método AA14) para obtener el compuesto del título (24 g, 25% de rendimiento). LCMS (método AA13) Rt = 1,295 min, m/z 1095,6 (M+H)⁺.

[00222] Etapa 2: Síntesis de ter-butil ((S)-5-(2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)acetamido)-6-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((di-ter-butoxifosforil)oxi)acetil)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-6-oxohexil)carbamato. A una solución de ter-butil ((S)-5-(2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)acetamido)-6-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-6-oxohexil)carbamato (3 g, 2,69 mmol) en dimetilformamida (30 ml) se le agregaron 1H-tetrazol (1,888 g, 26,9 mmol) y di-ter-butil dietilfosforamidita (8,06 g, 32,3 mmol) a 25°C. La reacción se agitó a 25°C durante 3,5 horas, luego se agregó peróxido de hidrógeno (224 mg, 1,976 mmol) y la mezcla se agitó durante 30 minutos. Se prepararon seis viales adicionales como se describió anteriormente. Las siete reacciones se combinaron y se purificaron mediante HPLC preparativa (método AA7) para obtener el compuesto del título (10 g, 37% de rendimiento). LCMS (método AA13) Rt = 1,421 min, m/z 1305,7 (M+H)⁺.

[00223] Etapa 3: Síntesis de ter-butil ((S)-5-(2-aminoacetamido)-6-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((di-ter-butoxifosforil)oxi)acetil)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-6-oxohexil)carbamato. A una solución de ter-butil ((S)-5-(2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)acetamido)-6-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((di-ter-

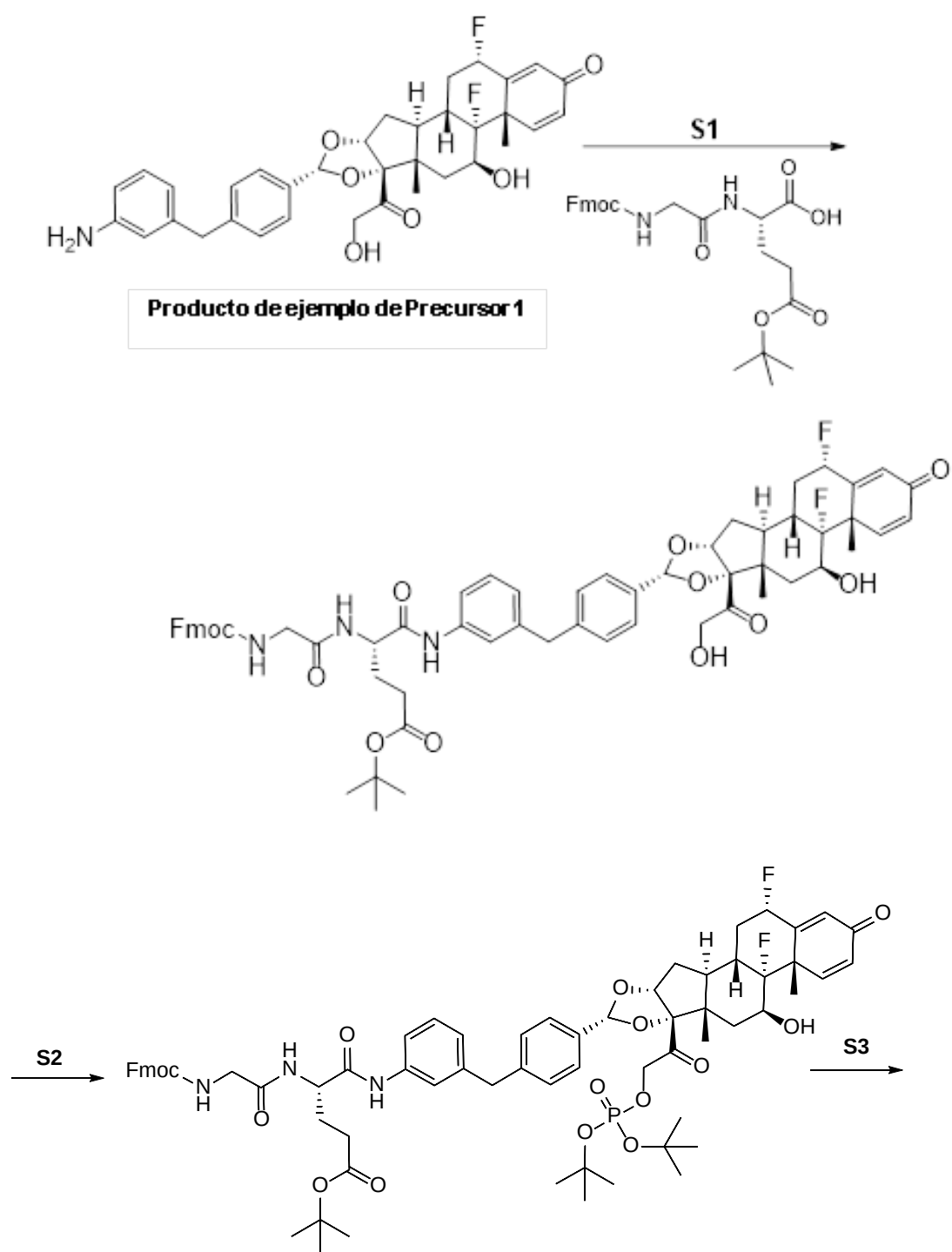
butoxifosforil)oxi)acetil)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-6-oxohexil)carbamato (2,5 g, 1,969 mmol) en acetonitrilo (10 ml) se le agregó piperidina (2 ml, 1,969 mmol) a 25°C. La reacción se agitó a 25°C durante 1 hora. Se prepararon tres viales adicionales como se describió anteriormente. Las cuatro reacciones se combinaron y se concentraron para obtener un residuo que se agitó en éter de petróleo (30 ml) durante 2 horas. El sólido se recolectó mediante filtración y se secó a presión reducida para obtener el compuesto del título (7 g, 70% de rendimiento). LCMS para reacción (ESI+): m/z 1083,5 (M+H)⁺, Rt: 1,175 min.

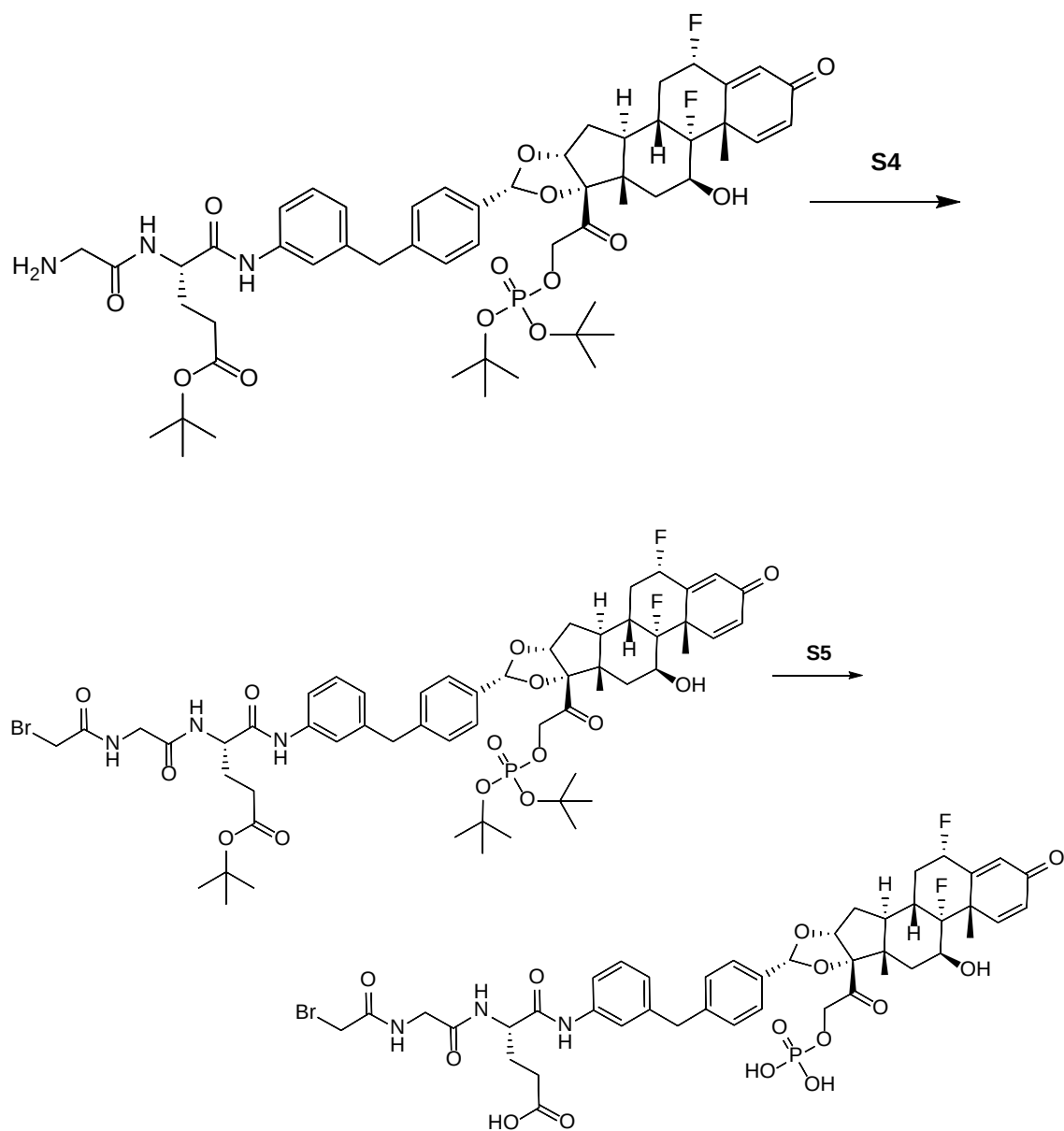
[00224] Etapa 4: Síntesis de ter-butil ((S)-5-(2-(2-bromoacetamido)acetamido)-6-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((di-ter-butoxifosforil)oxi)acetil)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-6-oxohexil)carbamato. A una solución de ácido 2-bromoacético (0,929 g, 6,68 mmol) en dimetilformamida (35 ml) se le agregó 2-etoxi-1-etoxicarbonil-1,2-dihidroquinolina (1,653 g, 6,68 mmol) a 25°C. La mezcla se agitó a 25°C durante 1 hora. Luego se agregó ter-butil ((S)-5-(2-aminoacetamido)-6-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((di-ter-butoxifosforil)oxi)acetil)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-6-oxohexil)carbamato (3,5 g, 3,34 mmol) a la reacción. La reacción se agitó a 25°C durante 2 horas. LCMS mostró que la reacción se había completado. La reacción se diluyó con diclorometano (100 ml), se lavó con HBr acuoso (1 M, 2 x 80 ml), NaHCO₃ acuoso (60 ml) y salmuera (60 ml). La capa orgánica se secó (Na₂SO₄) y se concentró para obtener el compuesto del título (2 g, 51% de rendimiento), que se usó en la siguiente etapa directamente. LCMS (método AA13) Rt = 1,318 min, m/z 1205,5 (M+H)⁺.

[00225] Etapa 5: Síntesis de 2-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-((S)-6-amino-2-(2-(2-bromoacetamido)acetamido)hexanamido)bencil)fenil)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-1,2,4,6a,6b,7,8,8a,11a,12,12a,12b-dodecahidro-8bH-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-8b-il)-2-oxoetil dihidrógeno fosfato. A una solución de ter-butil ((S)-5-(2-(2-bromoacetamido)acetamido)-6-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((di-ter-

butoxifosforil)oxi)acetil)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-6-oxohexil)carbamato (2 g, 1,661 mmol) en diclorometano (10 ml) se le agregó ácido trifluoroacético (5 ml, 64,9 mmol) a 25°C. La reacción se agitó a 25°C durante 40 minutos, luego se evaporó hasta secarse para obtener un residuo que se purificó mediante HPLC preparativa (método AA17) para obtener el compuesto del título (550 mg, 32% de rendimiento). LCMS (método AA13) Rt = 2,313 min, m/z 993,1 (M+H)⁺. ¹H NMR (dimetilsulfóxido-*d*6, 400 MHz) δ ppm 0,90 (s, 3 H) 1,19 - 1,41 (m, 2 H) 1,43 - 1,62 (m, 7 H) 1,64 - 1,77 (m, 3 H) 1,84 (br d, J=14,55 Hz, 1 H) 1,95 - 2,07 (m, 1 H) 2,18 - 2,36 (m, 3 H) 2,65 - 2,78 (m, 3 H) 3,71 - 3,86 (m, 3 H) 3,89 (s, 2 H) 3,93 (s, 2 H) 4,20 (br d, J=9,48 Hz, 1 H) 4,33 - 4,41 (m, 1 H) 4,59 (br dd, J=18,41, 8,05 Hz, 1 H) 4,81 (br dd, J=18,52, 8,60 Hz, 1 H) 4,94 (d, J=4,63 Hz, 1 H) 5,50 (s, 1 H) 5,54 - 5,76 (m, 1 H) 6,13 (s, 1 H) 6,29 (dd, J=10,14, 1,32 Hz, 1 H) 6,95 (d, J=7,72 Hz, 1 H) 7,15 - 7,28 (m, 4 H) 7,30 - 7,41 (m, 3 H) 7,51 (br d, J=7,94 Hz, 1 H) 7,72 (br s, 3 H) 8,21 (br d, J=7,72 Hz, 1 H) 8,54 (t, J=5,62 Hz, 1 H) 9,93 (br d, J=2,65 Hz, 1 H).

Ejemplo de precursor 28: ácido (S)-4-(2-(2-bromoacetamido)acetamido)-5-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-8b-(2-(fosfonooxi)acetil)-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-5-oxopentanoico





[00226] Etapa 1: Síntesis de ter-butil (S)-4-(2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)acetamido)-5-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)encil)fenil)amino)-5-oxopentanoato. A una solución del producto del Ejemplo de precursor 1 ((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-aminobencil)fenil)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-decahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-4(2H)-ona) (500 mg, 0,826 mmol) en dimetilformamida (10 ml) se le agregaron ácido (S)-2-(2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)acetamido)-5-(ter-butoxi)-5-oxopentanoico (500 mg, 1,036

mmol), 2,4,6-trióxido de 2,4,6-tripropil-1,3,5,2,4,6-trioxatrilfosfinano (1800 mg, 2,83 mmol) y trietilamina (0,689 ml, 4,94 mmol) a 0°C. La mezcla de reacción se agitó durante 30 minutos a 20°C, y luego se agregó producto adicional del Ejemplo de precursor 1 (500 mg, 0,826 mmol). La reacción se agitó durante 12 horas a 25°C. Se realizaron 16 reacciones idénticas y las reacciones se combinaron. La mezcla se agregó a agua (3 l) y se extrajo con acetato de etilo (3 X 500 ml). Las capas se separaron y la capa orgánica se secó en (Na₂SO₄), se filtró y se concentró a presión reducida para obtener el compuesto del título (12 g, 11,21 mmol, 48,0% de rendimiento) como un sólido amarillo. TLC (acetato de etilo) R_f 0,48.

[00227] Etapa 2: Síntesis de ter-butil (S)-4-(2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)acetamido)-5-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((di-ter-butoxifosforil)oxi)acetil)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-5-oxopentanoato. A una solución de (S)-ter-butil 4-(2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)acetamido)-5-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-5-oxopentanoato (1 g, 0,934 mmol) en dimetilformamida (5 ml) se le agregaron 1H-tetrazol (0,655 g, 9,34 mmol) y di-ter-butil dietilfosforamidita (1,864 g, 7,48 mmol) a 25°C. La reacción se agitó a 25°C durante 2,5 horas, luego se agregó peróxido de hidrógeno (0,583 g, 5,14 mmol) a 0°C. La mezcla se agitó a 25°C durante 1 hora. Se realizaron y combinaron 19 reacciones idénticas. La mezcla se agregó a agua y el sólido se recolectó mediante filtración y se purificó mediante HPLC preparativa para obtener el compuesto del título (10 g, 85% de rendimiento). LCMS (método AA18) R_t = 1,434 min, m/z 1262,5 (M+H)⁺.

[00228] Etapa 3: Síntesis de ter-butil (S)-4-(2-aminoacetamido)-5-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((di-ter-butoxifosforil)oxi)acetil)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-5-oxopentanoato. A (S)-ter-butil 4-(2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)acetamido)-5-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((di-ter-butoxifosforil)oxi)acetil)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-

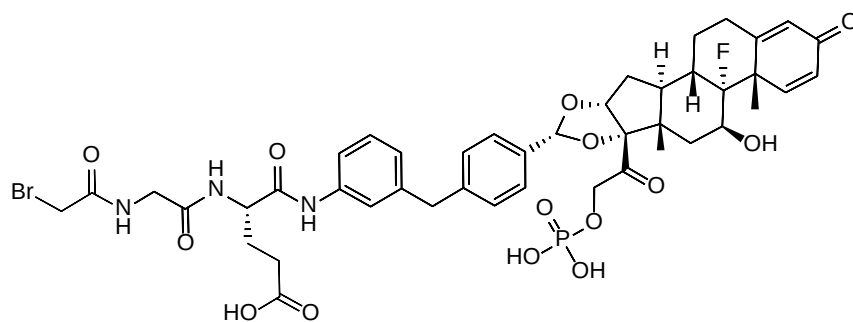
d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-5-oxopentanoato (10 g, 7,92 mmol) en acetonitrilo (20 ml) se le agregó piperidina (4 ml, 7,92 mmol) a 25°C. La mezcla se agitó durante 20 minutos, se concentró y se lavó con éter de petróleo (2 X 300 ml) y se secó a presión reducida para obtener el compuesto del título (5 g, 61% de rendimiento). LCMS (método AA19) Rt = 1,604 min, m/z 1040,7 (M+H)⁺.

[00229] Etapa 4: Síntesis de ter-butil (S)-4-(2-(2-bromoacetamido)acetamido)-5-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((di-ter-butoxifosforil)oxi)acetil)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-5-oxopentanoato. A una solución de ácido 2-bromoacético (0,134 g, 0,961 mmol) en dimetilformamida (4 ml) se le agregó *N*-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinolina (0,238 g, 0,961 mmol) a 25°C. La mezcla se agitó a 25°C durante 1 hora, luego se agregó (S)-ter-butil 4-(2-aminoacetamido)-5-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((di-ter-butoxifosforil)oxi)acetil)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-5-oxopentanoato (0,5 g, 0,481 mmol) y la mezcla se agitó a 25°C durante 2,5 horas. Se realizaron y combinaron 9 reacciones idénticas. La mezcla se concentró y se lavó con HBr 1M en agua (200 ml), solución acuosa de NaHCO₃ (200 ml) y salmuera (200 ml), se secó (Na₂SO₄), se filtró y se concentró para obtener el compuesto del título (5 g, 90% de rendimiento). LCMS (método AA18) Rt = 1,32 min, m/z 1162 (M+H)⁺.

[00230] Etapa 5: Síntesis de ácido (S)-4-(2-(2-bromoacetamido)acetamido)-5-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-8b-(2-(fosfonooxi)acetil)-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-5-oxopentanoico. A (S)-ter-butil 4-(2-(2-bromoacetamido)acetamido)-5-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((di-ter-butoxifosforil)oxi)acetil)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-5-oxopentanoato (3 g, 2,58 mmol) en diclorometano (20 ml) se le agregó ácido trifluoroacético (10 ml) a 25°C y luego la mezcla se agitó durante 2 horas. La mezcla de reacción se concentró y se purificó mediante HPLC preparativa (método AA20) para obtener el compuesto del título (1,09 g, 42% de rendimiento). LCMS (método AA4) Rt = 2,919 min, m/z 994,2 (M+H)⁺. ¹H

NMR (metanol-*d*₄, 400 MHz) δ = 7,45 (br d, J=7,9 Hz, 1H), 7,40 - 7,29 (m, 4H), 7,25 - 7,16 (m, 3H), 6,95 (br d, J=7,5 Hz, 1H), 6,38 - 6,30 (m, 2H), 5,66 - 5,57 (m, 1H), 5,55 - 5,44 (m, 1H), 5,08 - 4,94 (m, 2H), 4,81 - 4,72 (m, 1H), 4,49 (br dd, J=5,0, 9,0 Hz, 1H), 4,32 (br d, J=8,6 Hz, 1H), 3,96 - 3,90 (m, 5H), 2,79 - 2,60 (m, 1H), 2,48 - 2,32 (m, 4H), 2,28 (br d, J=13,3 Hz, 1H), 2,17 (dt, J=7,6, 13,4 Hz, 1H), 2,04 - 1,92 (m, 1H), 1,85 - 1,72 (m, 3H), 1,70 - 1,53 (m, 4H), 1,01 (s, 3H).

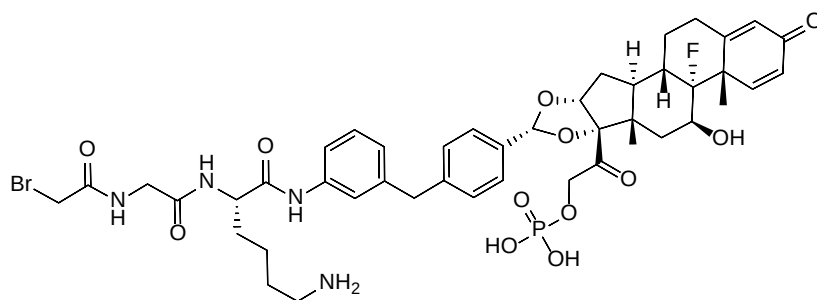
Ejemplo de precursor 36: ácido (S)-4-(2-(2-bromoacetamido)acetamido)-5-((3-(4-((6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-6b-fluoro-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-8b-(2-(fosfonooxi)acetil)-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-5-oxopentanoico



[00231] Preparado mediante una vía similar al Ejemplo de precursor 4 con 2-((6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-aminobencil)fenil)-6b-fluoro-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-1,2,4,6a,6b,7,8,8a,11a,12,12a,12b-dodecahidro-8bH-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-8b-il)-2-oxoetil dihidrógeno fosfato.

[00232] LCMS (método AA15) Rt =1,690 min, m/z 976,1 (M+H)⁺. ¹H NMR (metanol-*d*₄, 400 MHz) δ = 7,47 (br d, J=8,6 Hz, 1H), 7,44 - 7,36 (m, 4H), 7,28 - 7,19 (m, 3H), 6,97 (d, J=7,6 Hz, 1H), 6,33 (dd, J=1,7, 10,1 Hz, 1H), 6,14 (s, 1H), 5,53 (s, 1H), 5,07 - 4,96 (m, 2H), 4,83 - 4,73 (m, 1H), 4,50 (dd, J=4,8, 9,0 Hz, 1H), 4,34 (br d, J=8,7 Hz, 1H), 4,00 - 3,91 (m, 6H), 2,83 - 2,71 (m, 1H), 2,68 - 2,54 (m, 1H), 2,45 (br t, J=7,6 Hz, 3H), 2,40 - 2,26 (m, 2H), 2,25 - 2,13 (m, 1H), 2,06 - 1,91 (m, 2H), 1,84 - 1,72 (m, 3H), 1,65 - 1,50 (m, 4H), 1,04 (s, 3H).

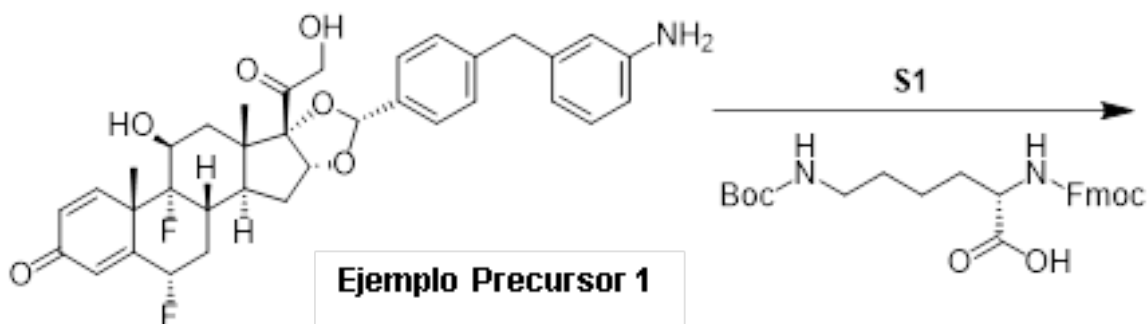
Ejemplo de precursor 37: 2-((6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-((S)-6-amino-2-(2-(2-bromoacetamido)acetamido)hexanamido)bencil)fenil)-6b-fluoro-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-1,2,4,6a,6b,7,8,8a,11a,12,12a,12b-dodecahidro-8bH-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-8b-il)-2-oxoetil dihidrógeno fosfato

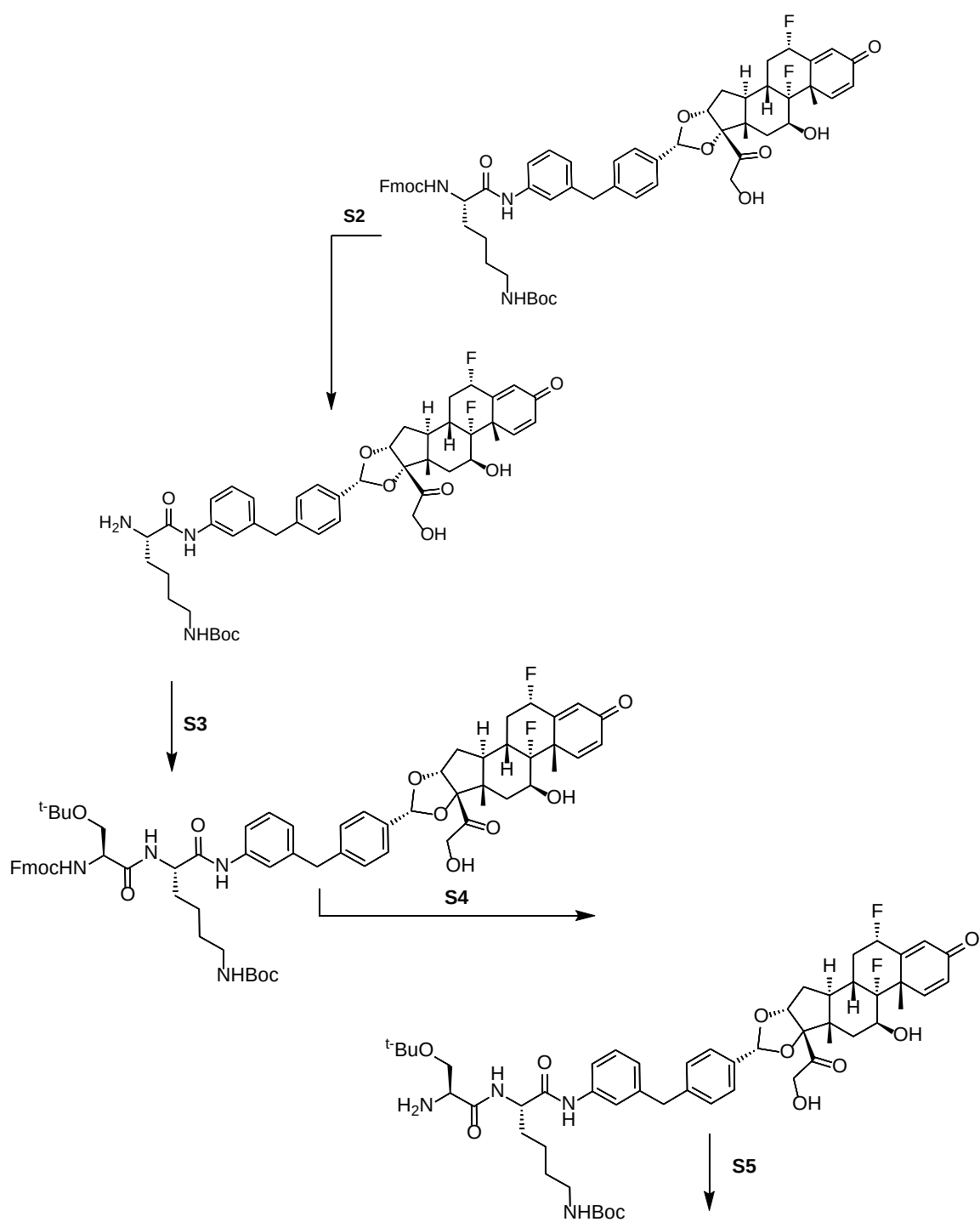


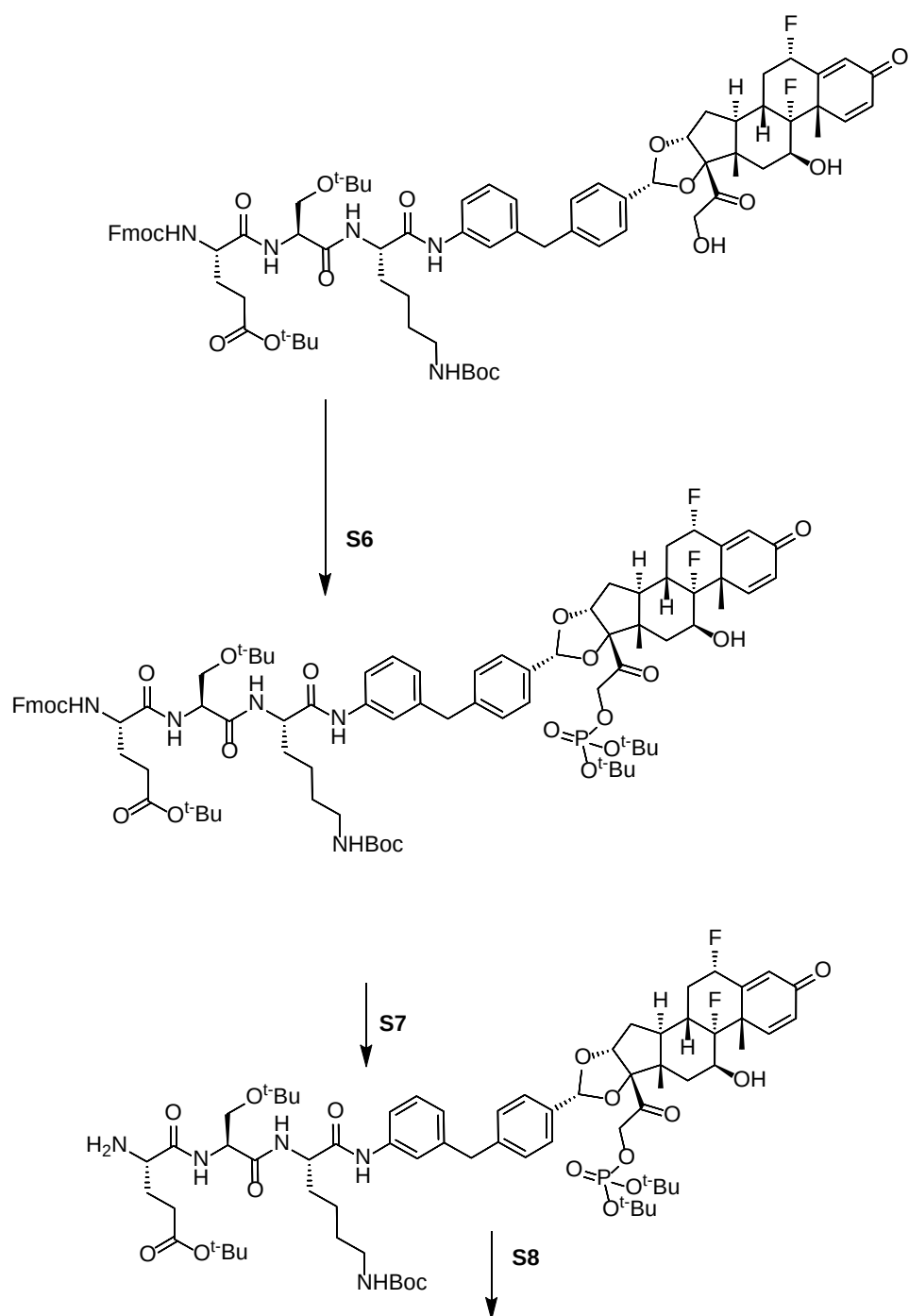
[00233] Preparado mediante una vía similar al Ejemplo de precursor 5 con 2-(((6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-aminobencil)fenil)-6b-fluoro-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-1,2,4,6a,6b,7,8,8a,11a,12,12a,12b-dodecahidro-8bH-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-8b-il)-2-oxoetil dihidrógeno fosfato.

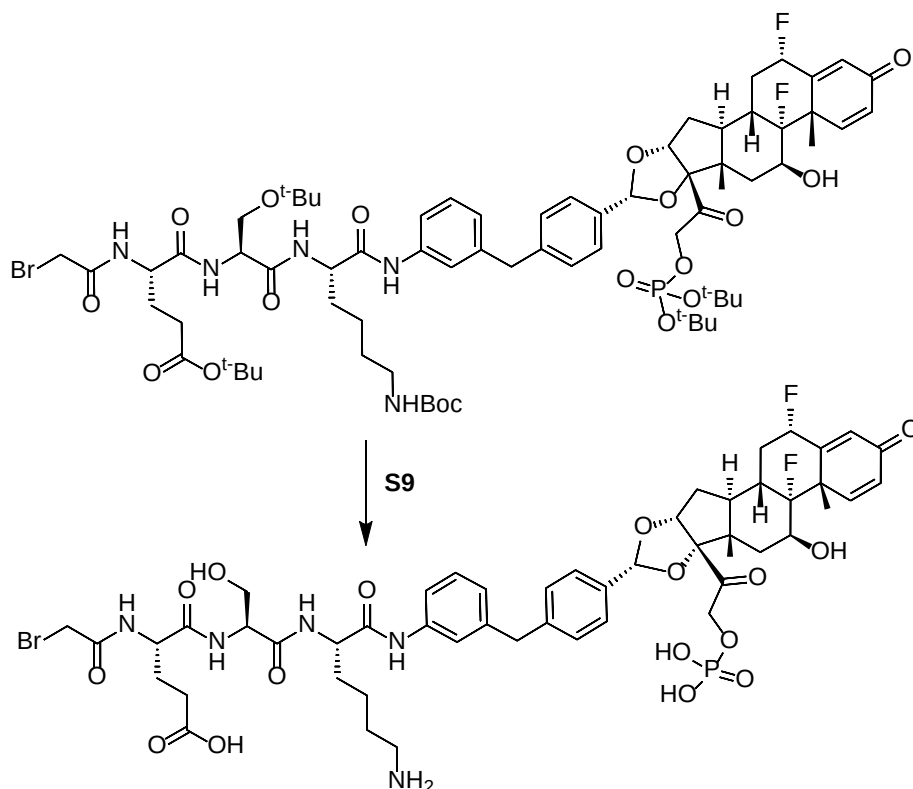
[00234] LCMS (método AA16) Rt = 2,437 min, m/z 975,2 (M+H)⁺. ¹H NMR (dimetilsulfóxido-*d*₆, 400 MHz) δ = 9,94 (br s, 1H), 8,54 (br t, J=5,4 Hz, 1H), 8,21 (br d, J=7,9 Hz, 1H), 7,75 (br s, 3H), 7,51 (br d, J=7,3 Hz, 1H), 7,39 - 7,30 (m, 3H), 7,30 - 7,17 (m, 4H), 6,95 (br d, J=7,5 Hz, 1H), 6,22 (br d, J=10,1 Hz, 1H), 6,03 (s, 1H), 5,49 (s, 1H), 4,92 (br s, 1H), 4,79 (br dd, J=8,3, 18,2 Hz, 1H), 4,58 (br dd, J=8,0, 18,4 Hz, 1H), 4,42 - 4,32 (m, 1H), 4,19 (br d, J=9,0 Hz, 1H), 3,94 (s, 2H), 3,89 (br s, 2H), 3,86 - 3,71 (m, 3H), 2,74 (br s, 2H), 2,33 (br s, 1H), 2,23 - 1,96 (m, 2H), 1,83 (br d, J=10,6 Hz, 2H), 1,76 - 1,46 (m, 10H), 1,45 - 1,22 (m, 3H), 0,90 (s, 3H).

Ejemplo de precursor 47: ácido (S)-5-(((S)-1-(((S)-6-amino-1-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-8b-(2-(fosfonooxi)acetil)-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-1-oxohexan-2-il)amino)-3-hidroxi-1-oxopropan-2-il)amino)-4-(2-bromoacetamido)-5-oxopentanoico









[00235] Etapa 1: Síntesis de (9H-fluoren-9-il)metil ter-butil ((S)-6-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-6-oxohexan-1,5-diil)dicarbamato. Una mezcla de ácido (S)-2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-6-((ter-butoxicarbonil)amino)hexanoico (0,390 g, 0,832 mmol), el producto del Ejemplo de precursor 1 ((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-aminobencil)fenil)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-decahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-4(2H)-ona) (0,504 g, 0,832 mmol), hexafluorofosfato de 3-óxido de 1-[bis(dimetilamino)metilen]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio (HATU) (0,380 g, 0,999 mmol) y 2,6-dimetilpiridina (0,291 ml, 2,496 mmol) en dimetilformamida (4 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 30 horas. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo (100 ml), se lavó con una solución acuosa de HCl 1N (50 ml), una solución acuosa saturada de NaHCO₃ (50 ml) y una solución saturada de salmuera (50 ml). La fase orgánica se secó (Na₂SO₄), se filtró y el solvente se eliminó a presión reducida. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía (sílice), que se eluyó con un gradiente de 0-70% de acetato de etilo/heptanos para obtener el compuesto del título (0,780 g, 89% de rendimiento). LCMS (método AA17): Rt = 1,10 min, m/z 1056,9

(M+H)⁺. ¹H NMR (dimetilsulfóxido-*d*₆, 400 MHz) δ 9,87 (s, 1H), 7,85 (d, *J* = 7,5 Hz, 2H), 7,69 (dd, *J* = 7,6, 4,8 Hz, 2H), 7,52 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H), 7,44 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H), 7,41 – 7,24 (m, 7H), 7,24 – 7,12 (m, 4H), 6,88 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H), 6,71 (s, 1H), 6,24 (dd, *J* = 10,1, 1,9 Hz, 1H), 6,09 (s, 1H), 5,61 (ddd, *J* = 48,9, 11,0, 6,6 Hz, 1H), 5,48 (d, *J* = 3,6 Hz, 1H), 5,41 (s, 1H), 5,06 (t, *J* = 5,9 Hz, 1H), 4,91 (d, *J* = 4,8 Hz, 1H), 4,47 (dd, *J* = 19,4, 6,3 Hz, 1H), 4,27 – 4,11 (m, 4H), 4,07 – 3,95 (m, 1H), 3,85 (s, 2H), 2,89 – 2,83 (m, 2H), 2,66 – 2,51 (m, 1H), 2,28 – 2,23 (m, 2H), 2,20 (dt, *J* = 12,2, 6,3 Hz, 1H), 2,01 (d, *J* = 13,9 Hz, 1H), 1,74 – 1,62 (m, 2H), 1,66 – 1,49 (m, 4H), 1,46 (s, 3H), 1,31 (s, 9H), 1,22 (d, *J* = 9,3 Hz, 1H), 0,83 (s, 3H).

[00236] Etapa 2: Síntesis de *ter*-butil ((S)-5-amino-6-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-6-oxohexil)carbamato. Se agregó dietilamina (0,540 g, 7,39 mmol) a una solución desgasificada de (9H-fluoren-9-il)metil *ter*-butil ((S)-6-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-6-oxohexan-1,5-diil)dicarbamato (0,780 g, 0,739 mmol) en tetrahidrofurano (10 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas, después de lo cual se eliminó el solvente a presión reducida. El residuo resultante se trató con tolueno (3 x 50 ml), el cual se eliminó a presión reducida para quitar la mayor cantidad posible de dietilamina. El compuesto del título crudo se usó inmediatamente sin purificación adicional. LCMS (método AA17): Rt = 0,86 min, m/z 834,0 (M+H)⁺.

[00237] Etapa 3: Síntesis de *ter*-butil ((S)-5-((S)-2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-3-(*ter*-butoxi)propanamido)-6-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-6-oxohexil)carbamato. Una mezcla de ácido (S)-2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-3-(*ter*-butoxi)propanoico (0,283 g, 0,739 mmol), *ter*-butil ((S)-5-amino-6-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-6-oxohexil)carbamato (0,616 g, 0,739 mmol), hexafluorofosfato de 3-óxido de 1-[bis(dimetilamino)metilen]-

1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio (HATU) (0,337 g, 0,887 mmol) y 2,6-dimetilpiridina (0,258 ml, 2,217 mmol) en dimetilformamida (4 ml) se agitó a 0°C durante 0,5 horas. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo (100 ml), se lavó con una solución acuosa de HCl 1N (50 ml), una solución acuosa saturada de NaHCO₃ (50 ml) y una solución saturada de salmuera (50 ml). La fase orgánica se secó (Na₂SO₄), se filtró y el solvente se eliminó a presión reducida. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía (sílice), que se eluyó con un gradiente de 0-70% de acetato de etilo/heptanos para obtener el compuesto del título (0,500 g, 56% de rendimiento). LCMS (método AA17): Rt = 1,18 min, m/z 1199,2 (M+H)⁺. ¹H NMR (dimetilsulfóxido-*d*₆, 500 MHz) δ 9,84 (s, 1H), 7,95 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 7,86 (d, *J* = 7,5 Hz, 2H), 7,70 (t, *J* = 7,1 Hz, 2H), 7,46 – 7,26 (m, 7H), 7,26 – 7,13 (m, 5H), 6,89 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H), 6,67 (s, 1H), 6,27 (dd, *J* = 10,2, 1,9 Hz, 1H), 6,11 (s, 1H), 5,62 (dt, *J* = 48,6, 9,1 Hz, 1H), 5,50 (s, 1H), 5,41 (s, 1H), 5,08 (t, *J* = 5,9 Hz, 1H), 4,92 (d, *J* = 4,9 Hz, 1H), 4,48 (dd, *J* = 19,4, 5,8 Hz, 1H), 4,36 (d, *J* = 6,9 Hz, 1H), 4,33 – 4,07 (m, 5H), 3,84 (s, 2H), 3,44 (d, *J* = 6,1 Hz, 2H), 2,85 (q, *J* = 6,5 Hz, 2H), 2,68 – 2,53 (m, 1H), 2,32 – 2,16 (m, 2H), 2,02 (d, *J* = 13,7 Hz, 1H), 1,67 (d, *J* = 13,5 Hz, 3H), 1,60 – 1,48 (m, 1H), 1,47 (s, 3H), 1,31 (s, 10H), 1,25 – 1,16 (m, 1H), 1,05 (s, 9H), 0,84 (s, 3H).

[00238] Etapa 4: Síntesis de ter-butil ((S)-5-((S)-2-amino-3-(ter-butoxi)propanamido)-6-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-6-oxohexil)carbamato. Se agregó dietilamina (0,305 g, 4,17 mmol) a una solución desgasificada de ter-butil ((S)-5-((S)-2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-3-(ter-butoxi)propanamido)-6-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-6-oxohexil)carbamato (0,500 g, 0,417 mmol) en tetrahidrofurano (10 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas, después de lo cual se eliminó el solvente a presión reducida. El residuo resultante se trató con tolueno (3 x 50 ml), el cual se eliminó a presión reducida para quitar la mayor cantidad posible de dietilamina. El compuesto del título crudo se usó inmediatamente sin purificación adicional. LCMS (método AA17): Rt = 0,92 min, m/z 976,9 (M+H)⁺.

[00239] Etapa 5: Síntesis de (10S,13S,16S)-ter-butil 16-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-13-(ter-butoximetil)-10-((3-(4-

((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)carbamoil)-2,2-dimetil-4,12,15-trioxo-3-oxa-5,11,14-triazanonadecan-19-oato. Una mezcla de ácido (S)-2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-5-(ter-butoxi)-5-oxopentanoico (0,177 g, 0,417 mmol), *ter*-butil ((S)-5-((S)-2-amino-3-(ter-butoxi)propanamido)-6-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-6-oxohexil)carbamato (0,407 g, 0,417 mmol), hexafluorofosfato de 3-óxido de 1-[bis(dimetilamino)metilen]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio (HATU) (0,190 g, 0,500 mmol) y 2,6-dimetilpiridina (0,146 ml, 1,251 mmol) en dimetilformamida (4 ml) se agitó a 0°C durante 0,5 horas. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo (100 ml), se lavó con una solución acuosa de HCl 1M (50 ml), una solución acuosa saturada de NaHCO₃ (50 ml) y una solución saturada de salmuera (50 ml). La fase orgánica se secó (Na₂SO₄), se filtró y el solvente se eliminó a presión reducida. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía (sílice), que se eluyó con un gradiente de 0-70% de acetato de etilo/heptanos para obtener el compuesto del título (0,455 g, 79% de rendimiento). LCMS (método AA17): Rt = 1,03 min, m/z no observada. ¹H NMR (dimetilsulfóxido-d₆, 500 MHz) δ 9,77 (s, 1H), 7,91 (s, 1H), 7,85 (d, J = 7,6 Hz, 3H), 7,77 (d, J = 7,7 Hz, 1H), 7,68 (t, J = 6,7 Hz, 2H), 7,58 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,44 – 7,34 (m, 4H), 7,34 – 7,22 (m, 4H), 7,16 (dd, J = 22,5, 8,0 Hz, 3H), 6,87 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 6,65 (s, 1H), 6,25 (dd, J = 10,1, 1,9 Hz, 1H), 6,09 (s, 1H), 5,70 – 5,50 (m, 1H), 5,48 (d, J = 3,8 Hz, 1H), 5,40 (s, 1H), 5,06 (t, J = 6,0 Hz, 1H), 4,90 (d, J = 4,7 Hz, 1H), 4,47 (dd, J = 19,4, 6,2 Hz, 1H), 4,29 (dt, J = 19,5, 6,5 Hz, 3H), 4,23 – 4,10 (m, 3H), 4,03 (d, J = 6,3 Hz, 1H), 3,84 (s, 2H), 3,53 (s, 0H), 3,52 – 3,36 (m, 1H), 2,84 – 2,78 (m, 2H), 2,67 – 2,50 (m, 1H), 2,22 (t, J = 8,4 Hz, 3H), 2,01 (d, J = 13,6 Hz, 1H), 1,88 (s, 1H), 1,80 – 1,58 (m, 6H), 1,56 – 1,48 (m, 1H), 1,46 (s, 3H), 1,34 (s, 9H), 1,29 (s, 9H), 1,20 (s, 1H), 1,00 (s, 9H), 0,93 (s, 1H), 0,82 (s, 3H).

[00240] Etapa 6: Síntesis de (10S,13S,16S)-*ter*-butil 16-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-13-(ter-butoximetil)-10-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((di-ter-butoxifosforil)oxi)acetil)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)carbamoil)-2,2-dimetil-4,12,15-trioxo-3-oxa-5,11,14-

triazanonadecan-19-oato. Una mezcla de (10S,13S,16S)-*ter*-butil 16-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-13-(*ter*-butoximetil)-10-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)carbamoil)-2,2-dimetil-4,12,15-trioxo-3-oxa-5,11,14-triazanonadecan-19-oato (0,452 g, 0,326 mmol) y 1H-tetrazol (0,105 g, 1,502 mmol) en dimetilformamida (1,5 ml) se trató con di-*ter*-butil dietilfosforamidita (0,291 ml, 1,045 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 h, después de lo cual se agregó una solución acuosa de H₂O₂ (50% en peso, 0,3 ml) y la agitación se continuó durante 1 h. De la purificación mediante HPLC preparativa, que se eluyó con un gradiente de acetonitrilo y acetato de amonio acuoso 10 mM, se obtuvo el compuesto del título (0,455 g, 79% de rendimiento). LCMS (método AA17): Rt = 1,35 min, m/z 1575,8 (M+H)⁺. ¹H NMR (dimetilsulfóxido-*d*₆, 400 MHz) δ 9,76 (s, 1H), 7,85 (d, J = 7,7 Hz, 3H), 7,77 (d, J = 7,7 Hz, 1H), 7,67 (t, J = 6,7 Hz, 2H), 7,58 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,44 – 7,18 (m, 10H), 7,14 (t, J = 7,8 Hz, 1H), 6,88 (d, J = 7,5 Hz, 1H), 6,65 (s, 1H), 6,25 (dd, J = 10,1, 1,9 Hz, 1H), 6,09 (s, 1H), 5,70 – 5,48 (m, 3H), 4,98 – 4,87 (m, 2H), 4,61 (dd, J = 17,9, 9,3 Hz, 1H), 4,29 (dt, J = 19,4, 6,8 Hz, 2H), 4,19 (d, J = 7,0 Hz, 2H), 4,03 (d, J = 7,0 Hz, 1H), 3,84 (s, 2H), 3,54 – 3,32 (m, 1H), 2,82 (d, J = 6,5 Hz, 2H), 2,74 – 2,50 (m, 1H), 2,22 (t, J = 7,9 Hz, 3H), 2,03 (d, J = 13,1 Hz, 1H), 1,94 – 1,80 (m, 1H), 1,76 – 1,60 (m, 5H), 1,55 – 1,41 (m, 2H), 1,45 (s, 3H), 1,39 (s, 9H), 1,38 (s, 9H), 1,34 (s, 9H), 1,29 (s, 9H), 1,25 – 1,12 (m, 1H), 0,99 (s, 9H), 0,91 (s, 1H), 0,85 (s, 3H).

[00241] Etapa 7: Síntesis de (10S,13S,16S)-*ter*-butil 16-amino-13-(*ter*-butoximetil)-10-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((di-*ter*-butoxifosforil)oxi)acetil)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)carbamoil)-2,2-dimetil-4,12,15-trioxo-3-oxa-5,11,14-triazanonadecan-19-oato. Se agregó dietilamina (0,100 g, 1,364 mmol) a una solución desgasificada de (10S,13S,16S)-*ter*-butil 16-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-13-(*ter*-butoximetil)-10-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((di-*ter*-butoxifosforil)oxi)acetil)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)carbamoil)-2,2-dimetil-4,12,15-trioxo-3-oxa-5,11,14-triazanonadecan-19-oato (0,215 g, 0,136 mmol) en THF (8 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas, después de lo cual se eliminó el

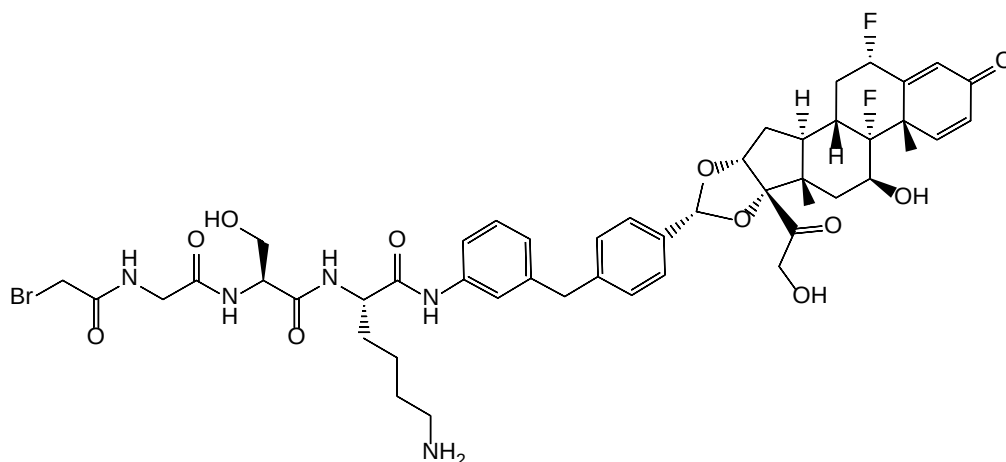
solvente a presión reducida. El residuo resultante se trató con tolueno (3 x 50 ml), el cual se eliminó a presión reducida para quitar la mayor cantidad posible de dietilamina. El compuesto del título crudo se usó inmediatamente sin purificación adicional. LCMS (método AA17): Rt = 1,11 min, m/z 1354,8 (M+H)⁺.

[00242] Etapa 8: Síntesis de (10S,13S,16S)-ter-butil 16-(2-bromoacetamido)-13-(ter-butoximetil)-10-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((di-ter-butoxifosforil)oxi)acetil)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)carbamoil)-2,2-dimetil-4,12,15-trioxo-3-oxa-5,11,14-triazanonadecan-19-oato. Una mezcla de ácido bromoacético (0,0347 g, 0,250 mmol) y etil 2-etoxiquinolin-1(2H)-carboxilato (0,07736 g, 0,298 mmol) en dimetilformamida (0,2 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos, tras lo cual una solución de (10S,13S,16S)-ter-butil 16-amino-13-(ter-butoximetil)-10-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((di-ter-butoxifosforil)oxi)acetil)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)carbamoil)-2,2-dimetil-4,12,15-trioxo-3-oxa-5,11,14-triazanonadecan-19-oato (0,130 g, 0,096 mmol) en dimetilformamida (0,3 ml) se agregó a la solución de ácido bromoacético. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 20 minutos. De la purificación mediante HPLC preparativa, que se eluyó con un gradiente de acetonitrilo y 0,1% (v/v) de ácido trifluoroacético en agua, se obtuvo el compuesto del título (0,103 g, 73% de rendimiento). LCMS (método AA17): Rt = 1,20 min, m/z 1474,4, 1476,5 (M+H)⁺. ¹H NMR (dimetilsulfóxido-*d*6, 400 MHz) δ 9,77 (s, 1H), 8,46 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H), 7,94 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H), 7,85 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 7,41 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H), 7,35 (s, 1H), 7,31 (d, *J* = 8,0 Hz, 2H), 7,22 (dd, *J* = 14,0, 9,0 Hz, 3H), 7,15 (t, *J* = 7,9 Hz, 1H), 6,88 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H), 6,66 (s, 1H), 6,26 (dd, *J* = 10,2, 1,9 Hz, 1H), 6,09 (s, 1H), 5,58 (d, *J* = 51,4 Hz, 3H), 4,98 – 4,87 (m, 2H), 4,61 (dd, *J* = 18,0, 9,2 Hz, 1H), 4,33 (s, 1H), 4,17 (s, 1H), 3,93 – 3,86 (m, 2H), 3,85 (s, 2H), 3,63 (s, 10H), 2,87 – 2,79 (m, 2H), 2,28 – 2,16 (m, 4H), 2,04 (d, *J* = 13,2 Hz, 1H), 1,87 (s, 1H), 1,69 (s, 3H), 1,63 (d, *J* = 13,6 Hz, 2H), 1,46 (s, 3H), 1,39 (s, 9H), 1,38 (s, 9H), 1,33 (s, 9H), 1,30 (s, 9H), 1,19 (d, *J* = 9,7 Hz, 1H), 1,02 (s, 9H), 0,85 (s, 3H).

[00243] Etapa 9: Síntesis de ácido (S)-5-(((S)-1-(((S)-6-amino-1-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-8b-(2-(fosfonooxi)acetil)-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-1-oxohexan-2-il)amino)-

3-hidroxi-1-oxopropan-2-il)amino)-4-(2-bromoacetamido)-5-oxopentanoico. Se agregó ácido trifluoroacético (2 ml, 0,068 mmol) a una solución a 0°C de (10S,13S,16S)-*ter*-butil 16-(2-bromoacetamido)-13-(*ter*-butoximetil)-10-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((di-*ter*-butoxifosforil)oxi)acetil)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)carbamoil)-2,2-dimetil-4,12,15-trioxo-3-oxa-5,11,14-triazanonadecan-19-oato (0,100 g, 0,068 mmol) en diclorometano (2 ml). La reacción se agitó a 0°C durante 10 minutos, después de lo cual el baño de hielo se retiró y se continuó la agitación a temperatura ambiente durante 90 minutos adicionales. De la purificación mediante HPLC preparativa, que se eluyó con un gradiente de acetonitrilo y 0,1% (v/v) de ácido trifluoroacético en agua, se obtuvo el compuesto del título (0,056 g, 72% de rendimiento). LCMS (método AA17) Isómero de acetal mayor: Rt = 0,75 min, m/z 1149,7, 1151,8 (M+H)⁺; isómero de acetal menor Rt = 0,78 min, m/z 1149,7, 1151,7 (M+H)⁺. ¹H NMR (dimetilsulfóxido-*d*6, 500 MHz) δ 9,70 (s, 1H), 8,61 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H), 8,13 (d, *J* = 7,2 Hz, 1H), 8,06 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H), 7,81 (s, 3H), 7,51 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H), 7,35 (d, *J* = 7,9 Hz, 2H), 7,23 (t, *J* = 8,7 Hz, 3H), 7,18 (t, *J* = 7,8 Hz, 1H), 7,13 (s, 1H), 6,97 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H), 6,27 (dd, *J* = 10,1, 1,9 Hz, 1H), 6,11 (s, 1H), 5,77 – 5,53 (m, 1H), 5,43 (s, 1H), 4,92 (d, *J* = 4,7 Hz, 1H), 4,70 (dd, *J* = 19,0, 8,1 Hz, 1H), 4,53 (dd, *J* = 19,0, 7,9 Hz, 1H), 4,27 (q, *J* = 6,6 Hz, 3H), 4,19 (d, *J* = 9,6 Hz, 1H), 3,96 – 3,86 (m, 4H), 3,58 (qd, *J* = 10,9, 5,9 Hz, 2H), 2,77 – 2,52 (m, 3H), 2,68 – 2,54 (m, 0H), 2,49 (s, 2H), 2,23 (q, *J* = 8,3 Hz, 3H), 2,00 (d, *J* = 13,2 Hz, 1H), 1,93 – 1,85 (m, 2H), 1,77 – 1,69 (m, 1H), 1,72 – 1,65 (m, 3H), 1,57 (s, 1H), 1,49 (s, 4H), 1,54 – 1,44 (m, 2H), 1,30 (s, 2H), 0,88 (s, 3H).

Ejemplo de precursor 48: (S)-6-amino-2-((S)-2-(2-(2-bromoacetamido)acetamido)-3-hidroxiopropanamido)-N-(3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)hexanamida



[00244] Preparado mediante una vía similar al Ejemplo de precursor 47 con 2-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-aminobencil)fenil)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-1,2,4,6a,6b,7,8,8a,11a,12,12a,12b-dodecahidro-8bH-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-8b-il)-2-oxoetil dihidrógeno fosfato.

[00245] LCMS (método AA17) Rt = 0,79 min, m/z 998,7, 1000,9 (M+H)⁺. ¹H NMR (dimetilsulfóxido-*d*₆, 500 MHz) δ 9,66 (s, 1H), 8,55 (t, J = 5,7 Hz, 1H), 8,16 (dd, J = 12,8, 7,7 Hz, 2H), 7,62 (s, 3H), 7,48 – 7,40 (m, 2H), 7,40 – 7,32 (m, 2H), 7,31 – 7,23 (m, 3H), 7,23 – 7,17 (m, 2H), 6,92 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 6,54 (s, 1H), 6,30 (dd, J = 10,2, 1,9 Hz, 1H), 6,13 (s, 1H), 5,66 (dt, J = 48,7, 10,2 Hz, 1H), 5,54 (dd, J = 4,5, 1,7 Hz, 1H), 5,45 (s, 1H), 5,21 (s, 1H), 5,13 (s, 1H), 4,95 (d, J = 4,8 Hz, 1H), 4,51 (d, J = 19,4 Hz, 1H), 4,36 (td, J = 12,8, 7,2 Hz, 2H), 4,20 (d, J = 19,2 Hz, 1H), 3,92 (d, J = 1,7 Hz, 2H), 3,89 (d, J = 2,4 Hz, 2H), 3,82 (qd, J = 16,7, 5,7 Hz, 2H), 3,65 (t, J = 8,2 Hz, 1H), 3,58 (dd, J = 10,5, 5,9 Hz, 1H), 2,78 (q, J = 6,7 Hz, 2H), 2,73 – 2,58 (m, 1H), 2,35 – 2,28 (m, 1H), 2,24 (td, J = 12,3, 6,8 Hz, 1H), 2,04 (d, J = 13,3 Hz, 1H), 1,85 – 1,50 (m, 4H), 1,50 (s, 3H), 1,36 (dq, J = 16,0, 8,3 Hz, 2H), 0,87 (s, 3H).

Ejemplo de ADC 1. Conjugación con productos derivados de maleimida (método general)

1. Protocolo de conjugación de cisteína con maleimida

[00246] Se preparó una solución de aproximadamente 10 mg/ml del anticuerpo en solución salina amortiguada con fosfato (PBS), pH 7,4, así como una solución de TCEP (tris(2-carboxietil)fosfina) 10 mM en PBS (Pierce Bond-Breaker, cat. 77720). El anticuerpo anti-CD40 (Tabla 3) se redujo luego parcialmente al agregar aproximadamente dos equivalentes molares (eq) de TCEP 10 mM, mezclar brevemente e incubar durante 60 min a 37°C. Luego se agregó dimetilsulfóxido (DMSO) a los anticuerpos parcialmente reducidos en cantidad suficiente hasta 15% de DMSO total. Para las conjugaciones, se agregaron 8 equivalentes (eq) molares de los

productos de maleimida de los Ejemplos 6 a 13 (10 mM en PBS) y se los incubó durante 30 min a temperatura ambiente con los anticuerpos parcialmente reducidos. El exceso de producto de maleimida y DMSO se eliminó luego mediante el uso de columnas de desalación NAP-5 (GE Healthcare, cat. 17-0853-02) equilibradas previamente con amortiguador de solución salina amortiguada con fosfato, pH 7,4. Las muestras desaladas se analizaron luego mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) y espectrometría de masas reducida.

2. Hidrólisis de tiosuccinimida

[00247] La hidrólisis del anillo de tiosuccinimida de ADC se logró al incubar el ADC a un pH elevado. Sucintamente, se preparó una solución de arginina 0,7 M, pH 9,0, y se la agregó a cada ADC en amortiguador de solución salina amortiguada con fosfato (PBS) para llevar la concentración total de arginina a 50 mM (pH ~8,9). El material se incubó luego a 25°C durante 72 horas. La hidrólisis del anillo de succinimida se confirmó luego mediante espectrometría de masas reducida, después de lo cual la hidrólisis se inactivó con la adición de una solución de ácido acético 0,1 M hasta un total de ácido acético de 12,5 mM (pH ~7,1).

[00248] La Tabla 11 proporciona conjugados ADC sintetizados con este método general (datos de agregación proporcionados para una cantidad de ejemplo de los conjugados ADC). La Tabla 12 proporciona conjugados ADC que pueden sintetizarse con este método general. La variable (A) corresponde al anticuerpo anti-CD40; n = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. El anticuerpo anti-CD40 humano corresponde a Ab102 (Tabla 3). El anticuerpo anti-CD40 de ratón corresponde al Anticuerpo 138 descrito en US 20160347850, incorporado en la presente por referencia. P = Ejemplo de precursor. El anticuerpo 138 tiene características similares a Ab102, por ejemplo, el anticuerpo 138 es un anticuerpo antagonista sin actividad agonista sustancial como Ab102. Por lo tanto, el anticuerpo 138 es representativo de la actividad de Ab102 en modelos de ratón.

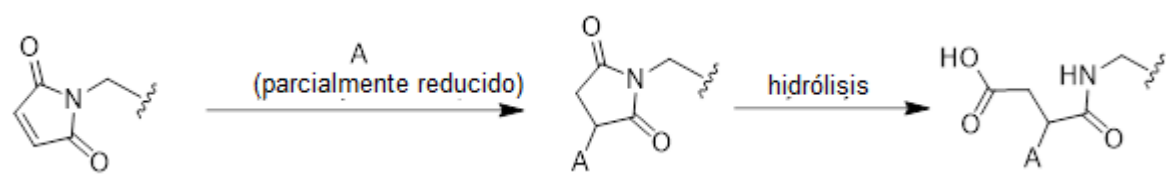


Tabla 11. ADC derivados de maleimida sintetizados

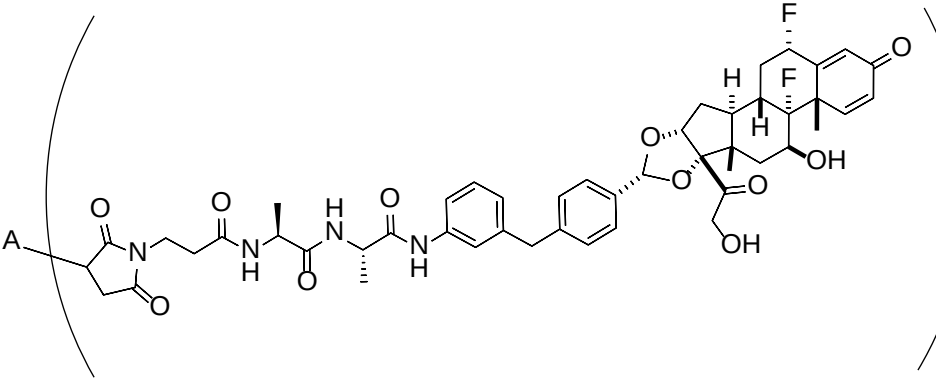
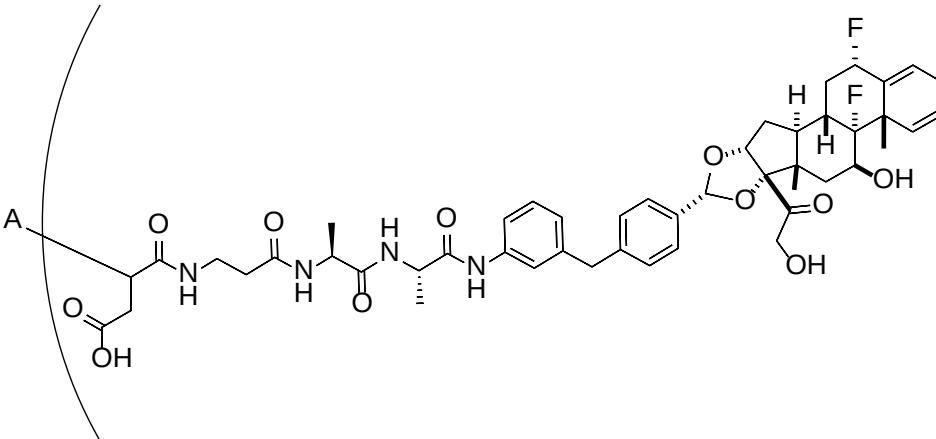
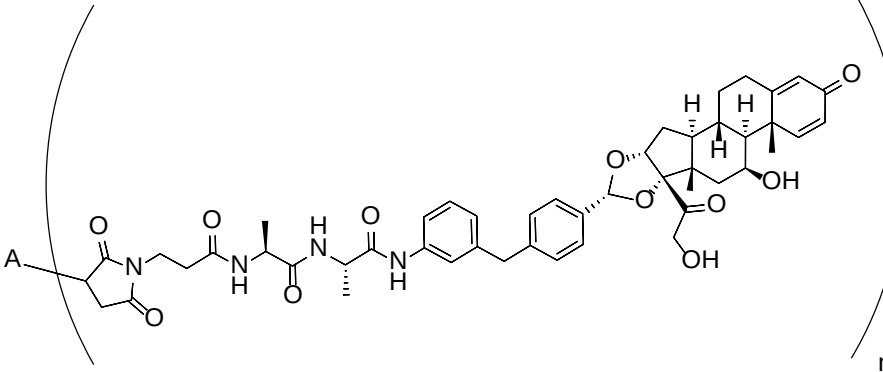
P	Producto de ADC	n
6	 Ejemplo 6 – conjugado (ratón)	4
6	 Ejemplo 6 – hidrolizado (ratón) Agregación (%) = 0,6	4
7	 Ejemplo 7 – conjugado (ratón)	4

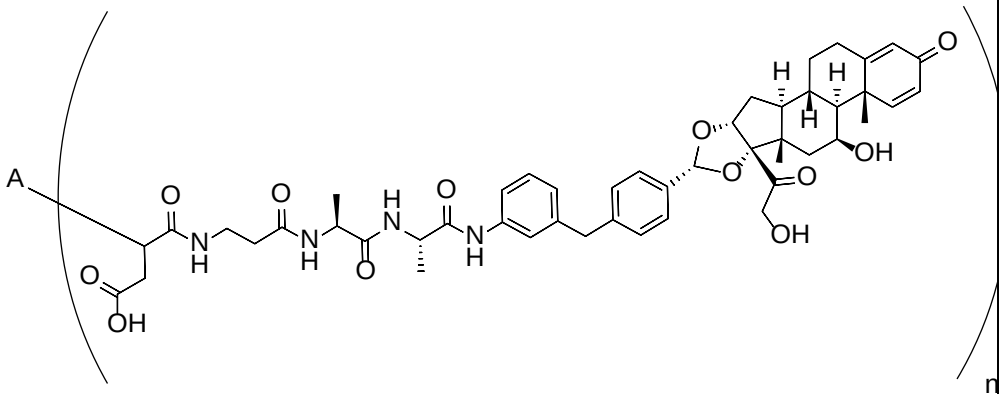
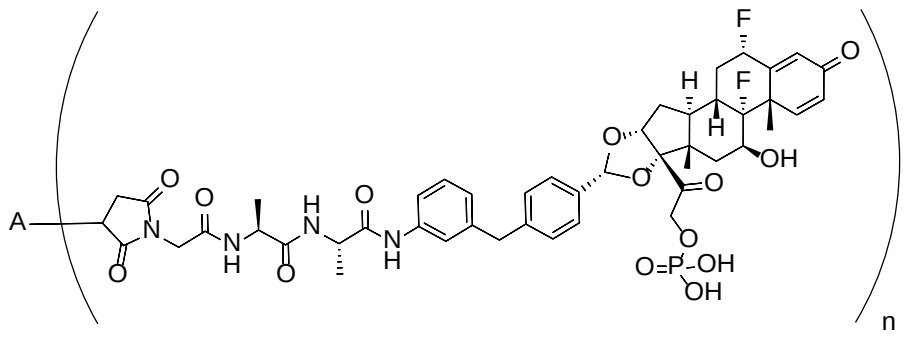
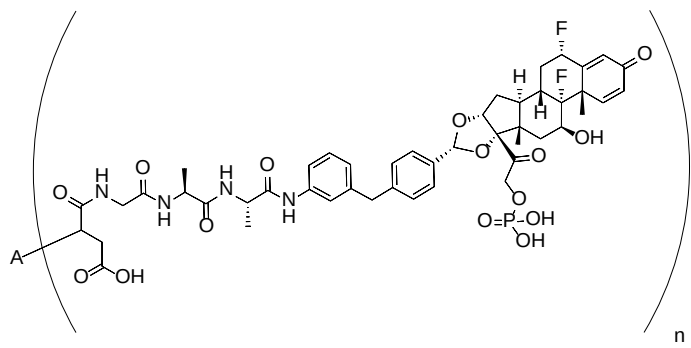
Tabla 11. ADC derivados de maleimida sintetizados		
P	Producto de ADC	n
7	 Ejemplo 7 – hidrolizado (ratón) Agregación (%) = 0	4
12	 Ejemplo 12 – conjugado (ratón)	2
12	 Ejemplo 12 – hidrolizado (ratón) n = 2, agregación (%) = 1,5; n = 4, agregación (%) = 0	2 4

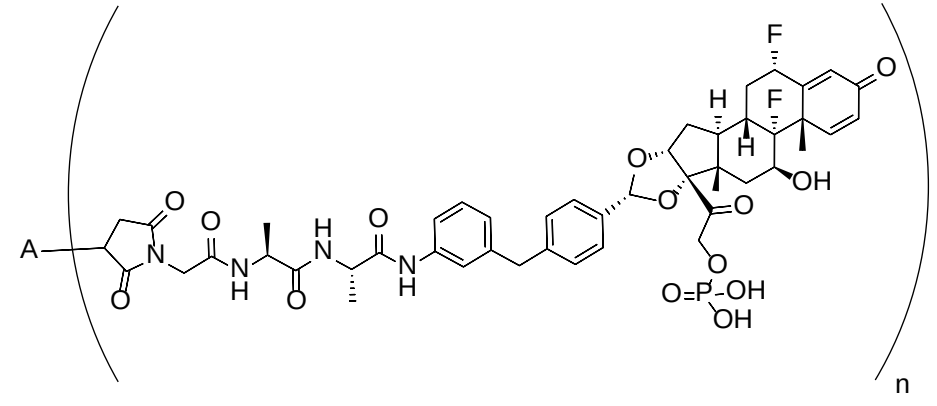
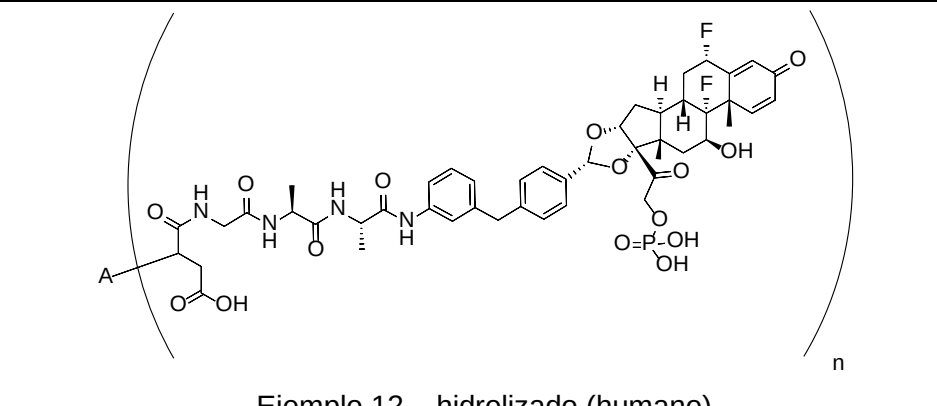
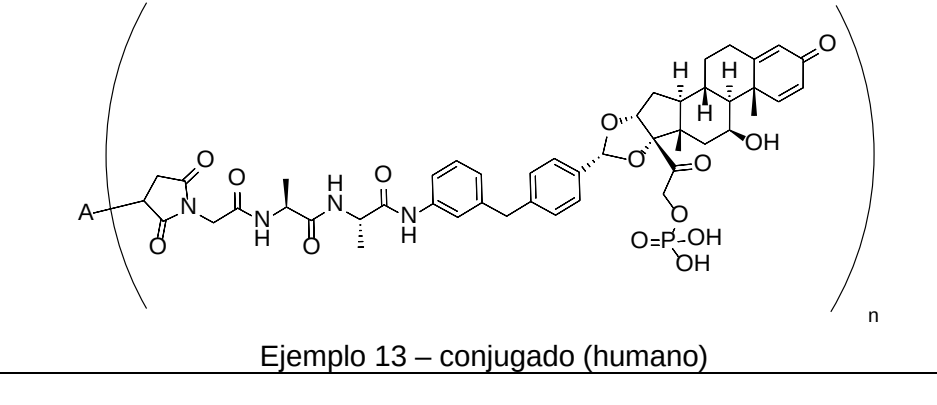
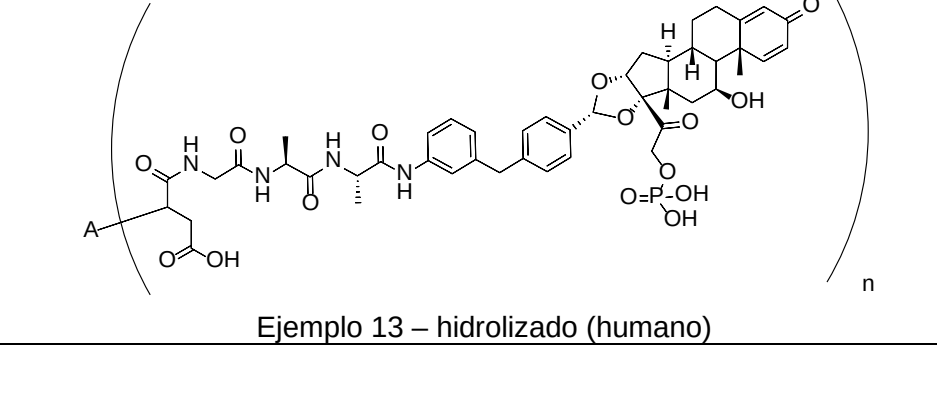
Tabla 11. ADC derivados de maleimida sintetizados		
P	Producto de ADC	n
12	 Ejemplo 12 – conjugado (humano)	4
12	 Ejemplo 12 – hidrolizado (humano)	4
13	 Ejemplo 13 – conjugado (humano)	4
13	 Ejemplo 13 – hidrolizado (humano)	4

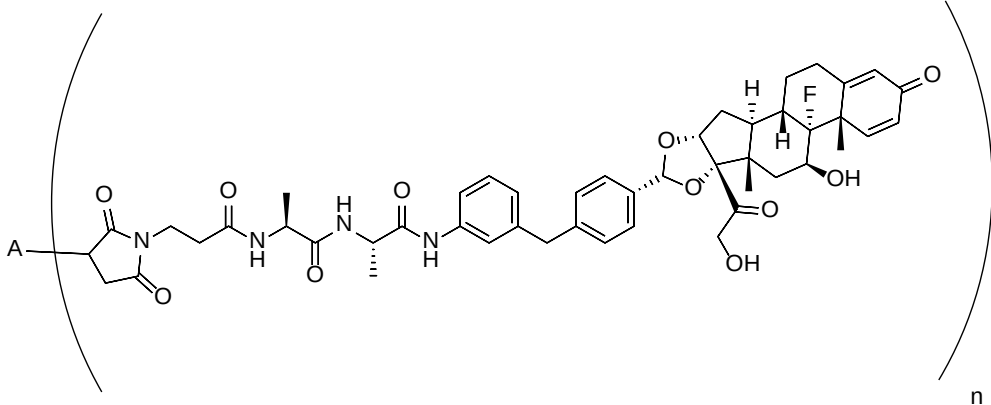
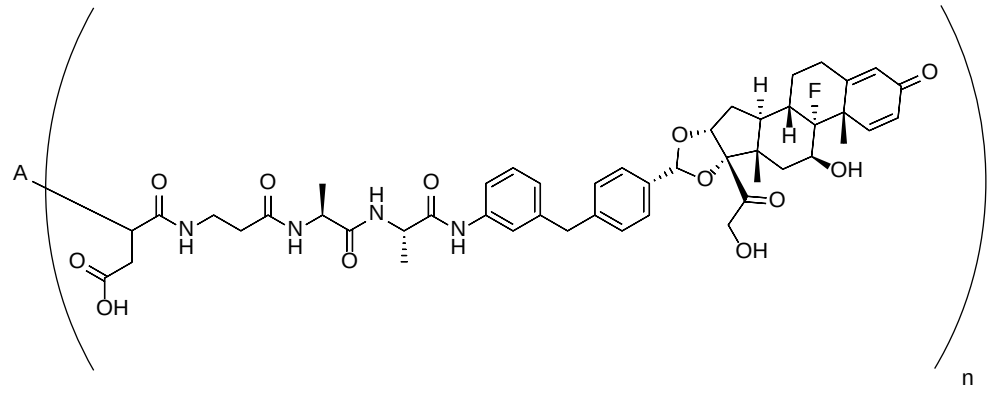
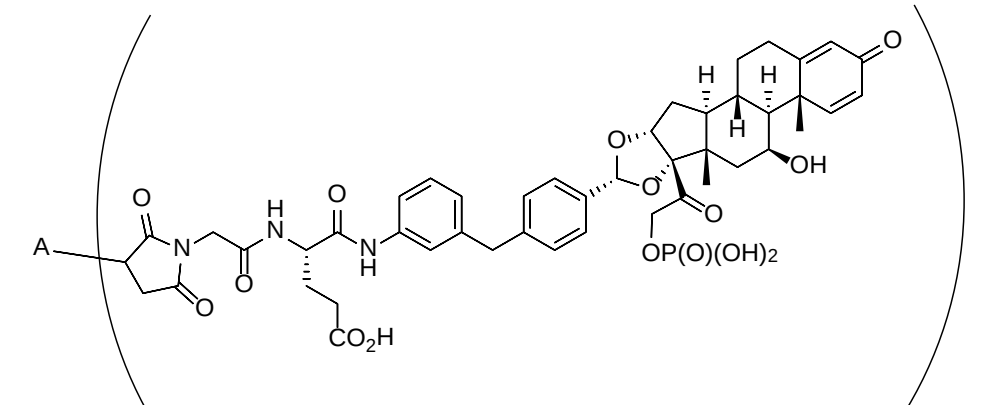
Tabla 12. ADC derivados de maleimida adicionales	
P	Producto de ADC
8	 Ejemplo 8 – conjugado
8	 Ejemplo 8 – hidrolizado
9	 Ejemplo 9 – conjugado

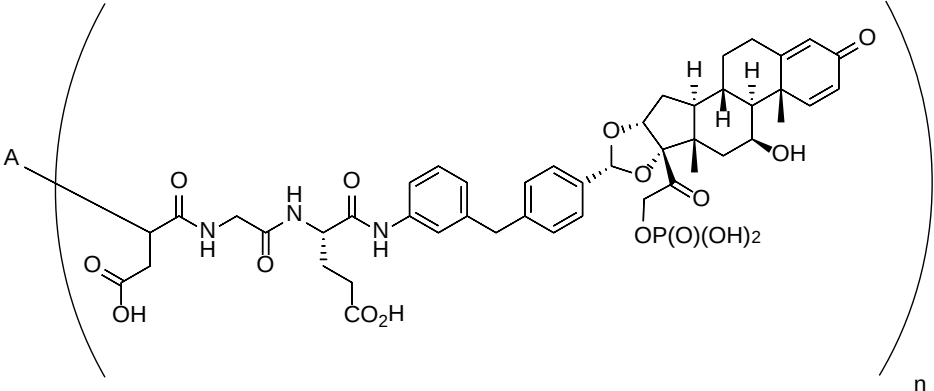
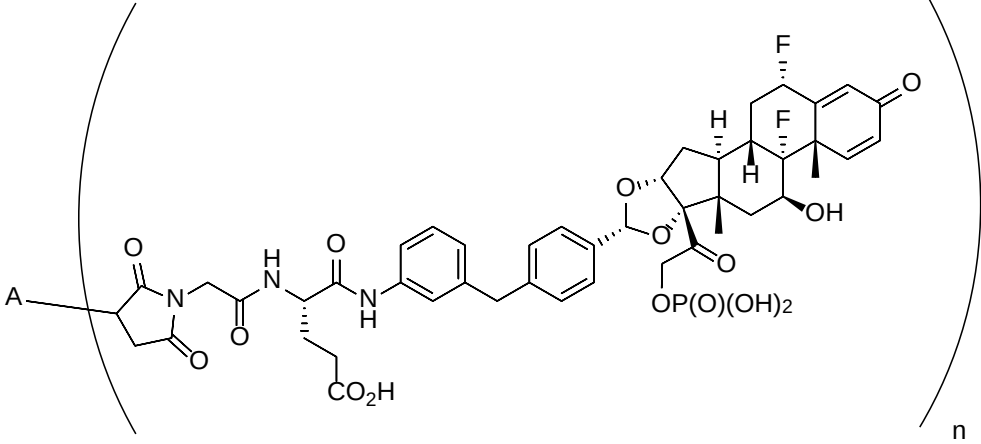
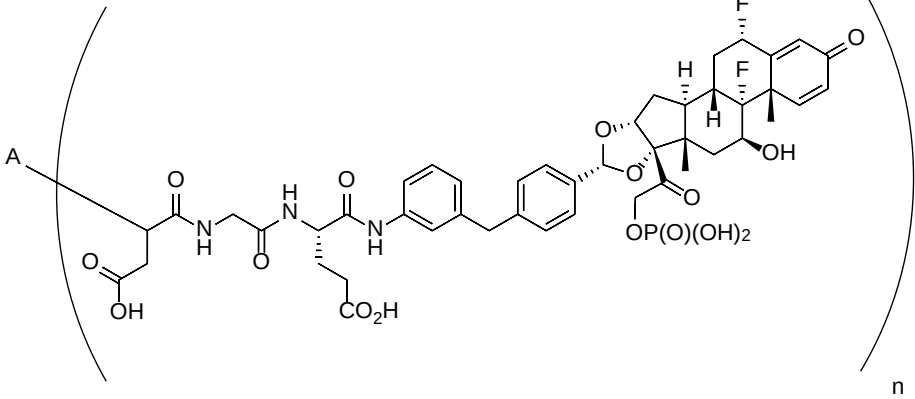
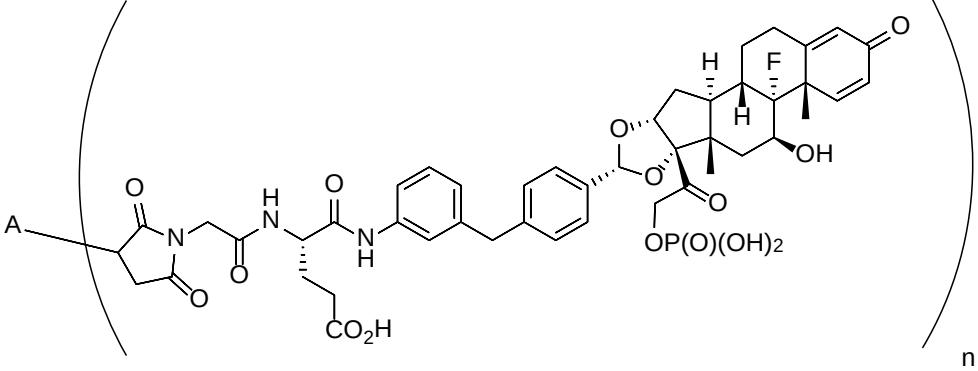
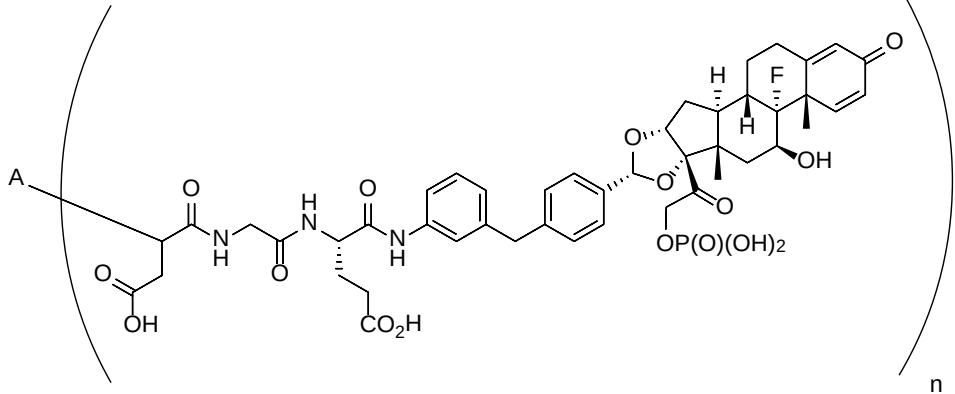
Tabla 12. ADC derivados de maleimida adicionales	
P	Producto de ADC
9	 Ejemplo 9 – hidrolizado
10	 Ejemplo 10 – conjugado
10	 Ejemplo 10 – hidrolizado

Tabla 12. ADC derivados de maleimida adicionales	
P	Producto de ADC
11	 Ejemplo 11 – conjugado
11	 Ejemplo 11 – hidrolizado

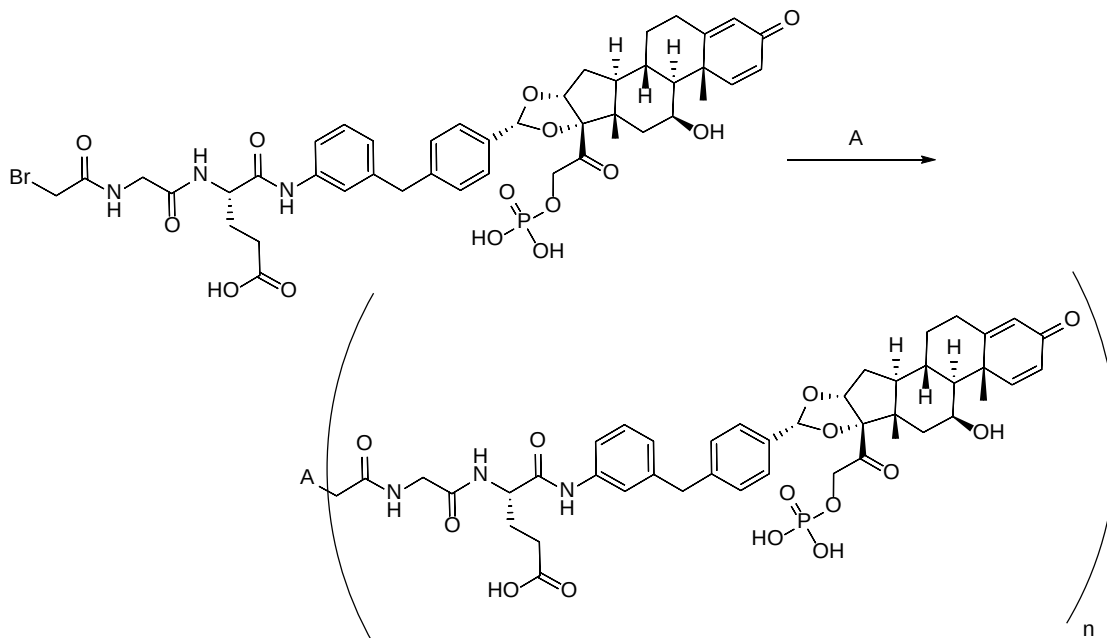
Ejemplo de ADC 2. Conjugación con productos de bromoacetamida precursores (método general)

1. Procedimiento general

[00249] Se preparó una solución de aproximadamente 5-20 mg/ml del anticuerpo deseado en solución salina amortiguada con fosfato (PBS), pH 6 - 7,4. Un agente reductor de elección, tal como TCEP (tris(2-carboxietil)fosfina), se diluyó o disolvió en solventes como H₂O, dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilacetamida (DMA) o dimetilformamida (DMF) para obtener una solución con un rango de concentración entre 1 y 25 mM. Luego el anticuerpo anti-CD40 se redujo parcialmente al agregar alrededor de 2-3,5 eq de agente reductor, mezclar brevemente e incubar durante la noche a 0-4°C. Luego se agregó amortiguador Tris, pH 8-8,5 (20-50 mM), seguido del producto de bromoacetamida de los Ejemplos 4-5 en dimetilsulfóxido (DMSO) o dimetilacetamida (DMA) (menos de 15% en total) y la mezcla se incubó durante 2-3 horas a temperatura ambiente. Luego se eliminaron mediante purificación el exceso de producto de bromoacetamida y el solvente orgánico. Las muestras de ADC purificadas

se analizaron luego mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) y espectrometría de masas reducida.

2. Preparación de ADC humano del Ejemplo de precursor 4



[00250] Se redujeron 100 mg de anticuerpo anti-CD40 humano (Ab102, Tabla 3) a una concentración de 20 mg/ml con ácido difenilfosfinoacético (2,9 - 3,0 equivalentes (eq)) a 0°C durante la noche. Luego se conjugó Ab contra CD40 parcialmente reducido con el producto de bromoacetamida del Ejemplo 4 (10 equivalentes (eq)) en dimetilsulfóxido (DMSO) durante 3 horas a temperatura ambiente. En primer lugar, el amortiguador de la mezcla de conjugación se cambió por amortiguador Tris 20 mM, NaCl 50 mM, pH 7,8 mediante el uso de múltiples columnas de desalación NAP 25. La solución de ADC desalada se purificó mediante AEC para obtener los componentes de DAR2 ($n = 2$) y DAR4 ($n = 4$) del ADC (la cantidad de moléculas ligadas a fármacos depende de la cantidad de puentes disulfuro intercatenarios reducidos).

[00251] Condiciones de AEC

[00252] Las condiciones de AEC utilizadas fueron: La columna fue Propac™ WAX-10, 4 X 250 mm (Thermo Fisher Scientific, cat. 054999) y la temperatura de la columna fue de 37°C. La longitud de onda fue de 280 nm, el tiempo de ejecución fue de 18 minutos, la cantidad de inyección fue de 20 µg y la velocidad de flujo fue de 1,0 ml/minuto. Fase móvil A: MES 20 mM, pH 6,7, Fase móvil B: MES 20 mM, NaCl 500 mM, pH 6,7. El ADC de DAR2 tuvo un tiempo de retención de 7,70 min con 0% de agregación, y el DAR4 un tiempo de retención de 10,88 min con 0% de agregación.

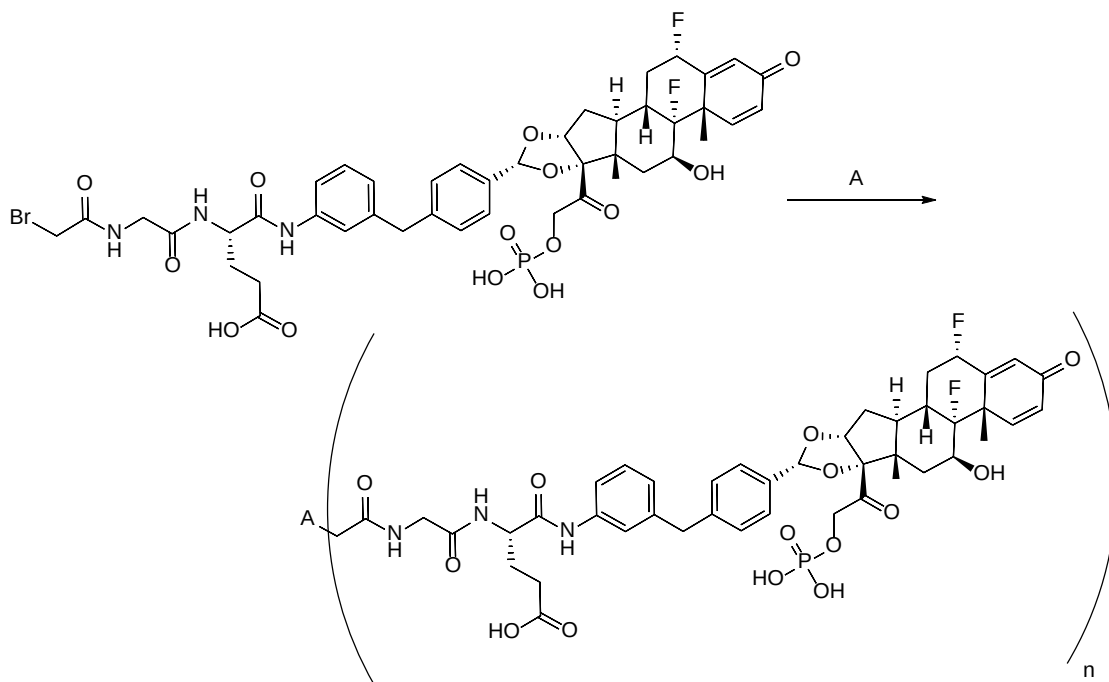
Tabla 13A. Perfil de gradiente		
Tiempo (min)	Fase móvil A (%)	Fase móvil B (%)
0	100	0
16	0	100
18	0	100
18,1	0	10

[00253] Espectroscopía de masas

[00254] Las muestras de ADC se redujeron por completo antes del análisis de MS. Las condiciones de espectrometría de masas utilizadas son las siguientes: columna de HPLC = agua BEH300 C4, 2,1x50 mm, tamaño de partícula de 3,5 micrómetros; Fase móvil A: 0,1% de ácido fórmico en agua; Fase móvil B: 0,1% de ácido fórmico en acetonitrilo; Velocidad de flujo: 450 µL/min; Gradiente: 0-0,6 min, 5% de B, 0,6 a 1,1 min 5-90% de B, 1,1 a 2,2 min 90% de B, 2,2 a 2,4 min, 90-5% de B, 2,4 a 3,5 min 5% de B; Temperatura de la columna: 40°C; Fuente de ionización de MS: ESI.

[00255] En la Figura 1A (n = 4) se muestran datos de espectroscopía de masas deconvolucionados del Ejemplo 4-conjugado (humano). El pico de 25140,73 corresponde a la cadena liviana (SEQ ID NO: 2) con una molécula de fármaco ligador conjugada. El pico de 50917,59 corresponde a la cadena pesada (SEQ ID NO: 1) con una molécula de fármaco ligador conjugada.

3. Preparación de ADC de ratón y humano del Ejemplo de precursor 28



ADC de ratón

[00256] El ADC del Ejemplo 28 – conjugado (ratón) se sintetizó como el ADC del Ejemplo 4, con anticuerpo anti-CD40 de ratón (Anticuerpo 138). El ADC de DAR2 tuvo un tiempo de retención de 7,17 minutos con 0% de agregación, y el DAR4 un tiempo de retención de 10,50 minutos con 0% de agregación.

ADC humano

[00257] Se redujeron 410 mg de anticuerpo anti-CD40 humano (Ab102, Tabla 3) a una concentración de ~20 mg/ml con ácido difenilfosfinoacético (2,7 eq) a ~4°C durante la noche. Se agregó 2% (v/v) de amortiguador Tris 2 M (pH 8,5) al anticuerpo parcialmente reducido, seguido de la adición de 10 eq del producto del Ejemplo de precursor 28 en dimetilsulfóxido. Después de la conjugación a temperatura ambiente durante 3 horas, el amortiguador de la mezcla se cambió por Tris 20 mM, NaCl 50 mM, pH 8,0 mediante el uso de columnas de desalación NAP25 y la mezcla se purificó adicionalmente mediante AEC para obtener los componentes de DAR2 (n = 2) y DAR4 (n = 4) del ADC (la cantidad de moléculas ligadas a fármacos depende de la cantidad de puentes disulfuro intercatenarios reducidos). Instrumento: AKTA pure; Columna: 4X Hitrap Q HP 5 ml; Fase móvil: A para amortiguador Tris 20 mM, pH 8,0; B para amortiguador Tris 20 mM, NaCl 500 mM, pH 8,0; Gradiente: B de 10% a 40% sobre 45 CV; Velocidad de flujo: 5 ml/min; Longitud de onda: 280 y 260 nm.

[00258] Condiciones de AEC

[00259] ProPac™ SAX-10, 4 x 250 mm, 10 µm (Thermo Fisher Scientific, N.º de cat. 054997) a temperatura ambiente; longitud de onda = 280 nm; tiempo de ejecución = 20 minutos; cantidad de inyección = ~20 µg; velocidad de flujo = 1,0 ml/minuto; Fase móvil A: Tris 20 mM, pH 8,0; Fase móvil B: Tris 20 mM, NaCl 1 M, pH 8,0.

Tabla 13B. Perfil de gradiente		
Tiempo (min)	Fase móvil A (%)	Fase móvil B (%)
0	100	0
16,0	50	50
16,1	0	100
18,0	0	100
18,1	100	0
20,0	100	0

[00260] En la Figura 1B (n = 2) y la Figura 1D (n = 4) se muestran datos de AEC del Ejemplo 28-conjugado (humano), con un tiempo de retención de alrededor de 7,5 minutos con 0% de agregación, y alrededor de 13 minutos con 0% de agregación, respectivamente.

[00261] Espectroscopía de masas

[00262] Las muestras de ADC se redujeron por completo antes del análisis de MS. Las condiciones de espectrometría de masas utilizadas son las siguientes: columna de HPLC = agua BEH300 C4, 2,1x50 mm, tamaño de partícula de 3,5 micrómetros; Fase móvil A: 0,1% de ácido fórmico en agua; Fase móvil B: 0,1% de ácido fórmico en acetonitrilo; Velocidad de flujo: 450 µL/min; Gradiente: 0-0,6 min, 5% de B, 0,6 a 1,1 min 5-90% de B, 1,1 a 2,2 min 90% de B, 2,2 a 2,4 min, 90-5% de B, 2,4 a 3,5 min 5% de B; Temperatura de la columna: 40°C; Fuente de ionización de MS: ESI.

[00263] En la Figura 1C (n = 2) y la Figura 1E (n = 4) se muestran datos de espectroscopía de masas deconvolucionados del Ejemplo 28-conjugado (humano).

[00264] Para la Figura 1C (n = 2), el pico de 25176,72 corresponde a la cadena liviana (SEQ ID NO: 2) con una molécula de fármaco ligador conjugada. El pico de 50954,63 corresponde a la cadena pesada (SEQ ID NO: 1) con una molécula de fármaco ligador conjugada.

[00265] Para la Figura 1E (n = 4), el pico de 25176,88 corresponde a la cadena liviana (SEQ ID NO: 2) con una molécula de fármaco ligador conjugada. El pico de 50954,80 corresponde a la cadena pesada (SEQ ID NO: 1) con una molécula de fármaco ligador conjugada.

4. Preparación de ADC de acuerdo con el procedimiento general y los ADC de los Ejemplos 4 y 28

[00266] La Tabla 14A proporciona conjugados ADC sintetizados con este método general, evaluados a partir de fracciones de una población de conjugados ADC (valor DAR proporcionado; población que comprende una mezcla de ADC, por ejemplo, una mezcla de n = 2, 4 y/o 6; también se proporcionan datos de agregación). La Tabla 14B proporciona conjugados ADC que pueden sintetizarse a partir de los productos de bromoacetamida del Ejemplo de precursor 14A y diversos precursores enumerados en la Tabla 10, con el método general anterior. La variable (A) corresponde al anticuerpo anti-CD40 (humano o de ratón); n = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. El anticuerpo anti-CD40 humano corresponde a Ab102 (Tabla 3). El anticuerpo anti-CD40 de ratón corresponde al Anticuerpo 138 descrito en US 20160347850, incorporado en la presente por referencia. P = Ejemplo de precursor. El anticuerpo 138 tiene características similares a Ab102, por ejemplo, el anticuerpo 138 es un anticuerpo antagonista sin actividad agonista sustancial como Ab102. Por lo tanto, el anticuerpo 138 es representativo de la actividad de Ab102 en modelos de ratón.

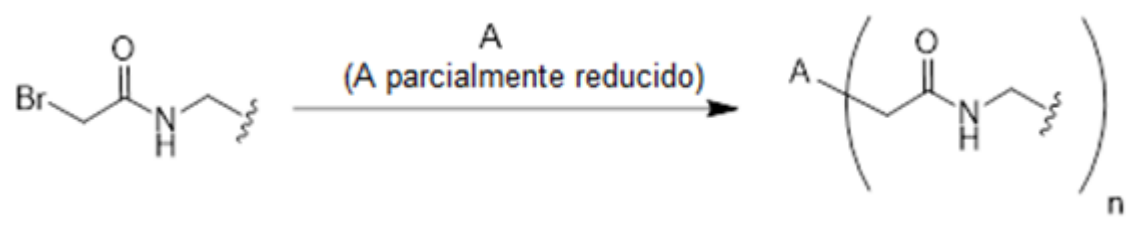


Tabla 14A. ADC de bromoacetamida sintetizados	DAR
14B Ejemplo 14B – conjugado (ratón) Agregación (%) = <1	3,35
15 Ejemplo 15 – conjugado (ratón) Agregación (%) = <1	3,72
16 Ejemplo 16 – conjugado (ratón) Agregación (%) = <1	3,39

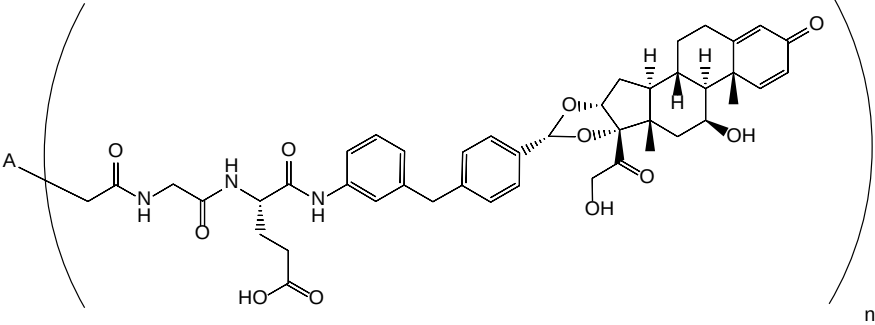
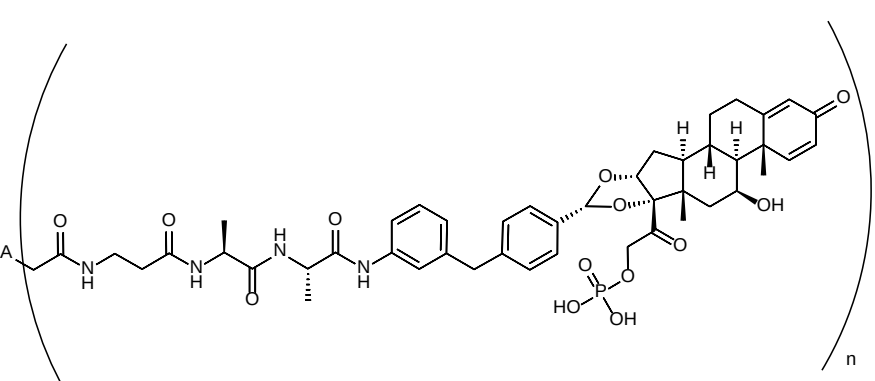
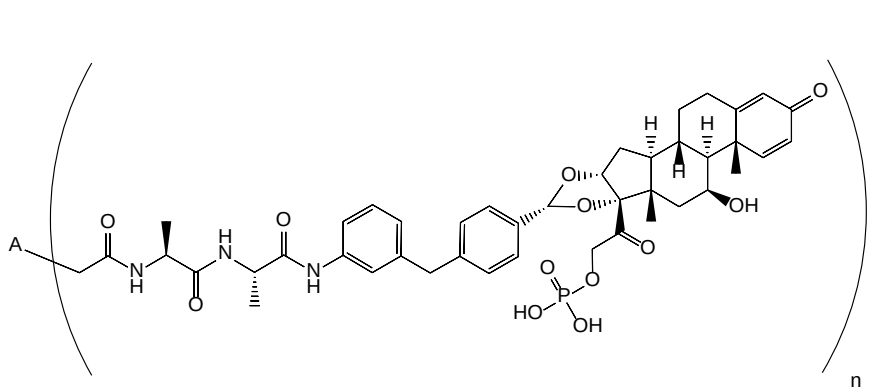
17	Tabla 14A. ADC de bromoacetamida sintetizados	DAR
17	 Ejemplo 17 – conjugado (ratón) Agregación (%) = <1	3,19
18B	 Ejemplo 18B – conjugado (ratón) Agregación (%) = <1	3,65
19	 Ejemplo 19 – conjugado (ratón) Agregación (%) = <1	3,44

Tabla 14A. ADC de bromoacetamida sintetizados	DAR
20 Ejemplo 20 – conjugado (ratón) Agregación (%) = <1 3,23	
21B Ejemplo 21B – conjugado (ratón) Agregación (%) = <1 3,59	
22 Ejemplo 22 – conjugado (ratón) Agregación (%) = <1 3,50	

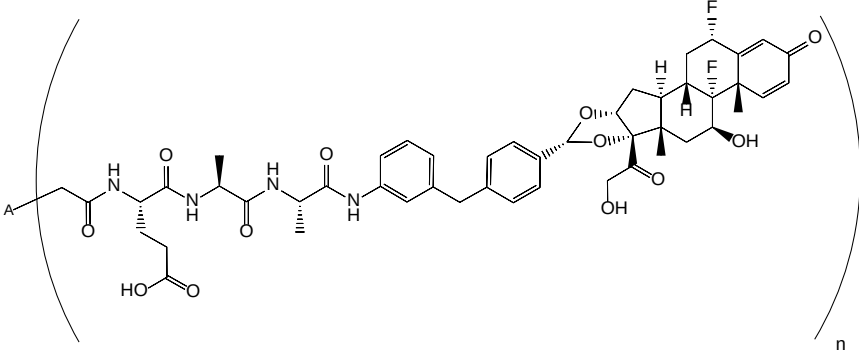
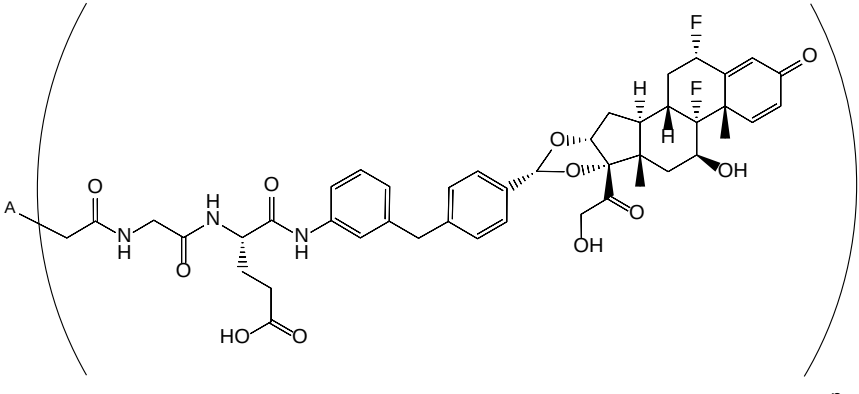
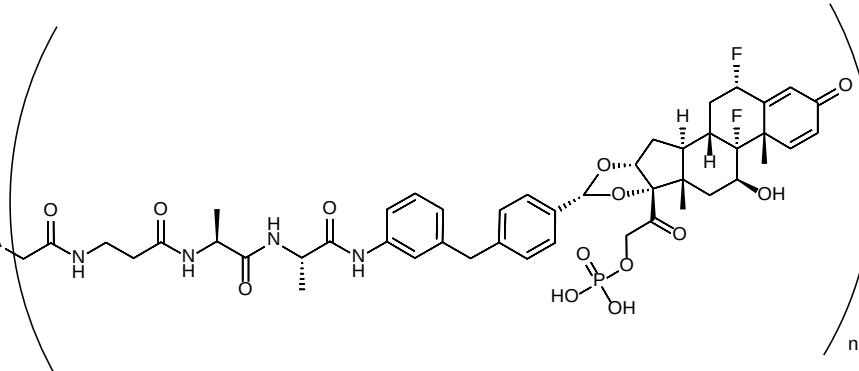
Tabla 14A. ADC de bromoacetamida sintetizados	DAR
23  Ejemplo 23 – conjugado (ratón) Agregación (%) = <1	3,56
24  Ejemplo 24 – conjugado (ratón) Agregación (%) = <1	3,59
25B  Ejemplo 25B – conjugado (ratón) Agregación (%) = <1	3,31

Tabla 14A. ADC de bromoacetamida sintetizados	DAR
27 Ejemplo 27 – conjugado (ratón) Agregación (%) = <1	3,10
36 Ejemplo 36 – conjugado (ratón) Agregación (%) = <1	3,62
37 Ejemplo 37 – conjugado (ratón) Agregación (%) = <1	3,44

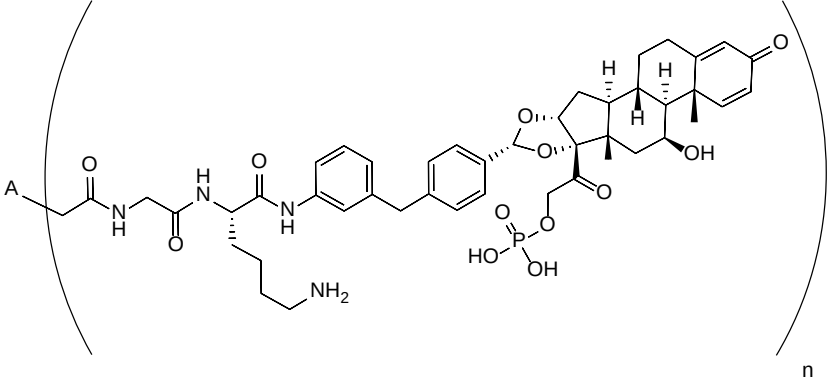
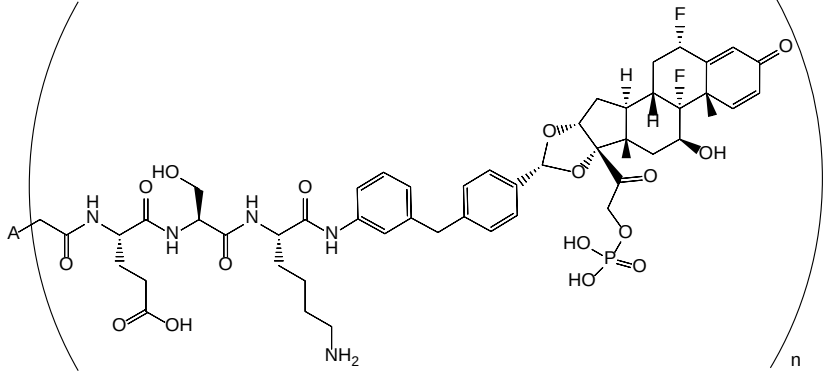
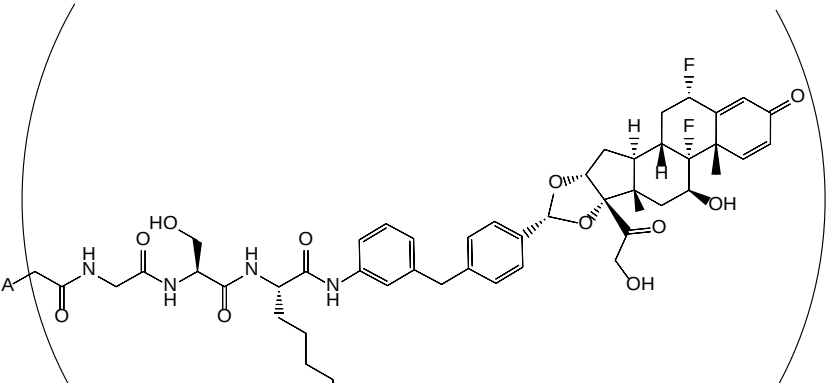
Tabla 14A. ADC de bromoacetamida sintetizados	DAR
38  Ejemplo 38 – conjugado (ratón) Agregación (%) = <1	3,45
47  Ejemplo 47 – conjugado (ratón) Agregación (%) = <1	3,47
48  Ejemplo 48 – conjugado (ratón) Agregación (%) = 1,7	2,12

Tabla 14B. ADC de bromoacetamida adicionales

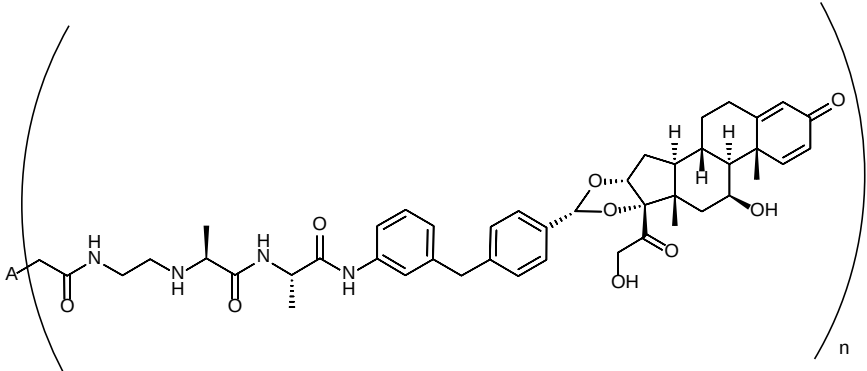
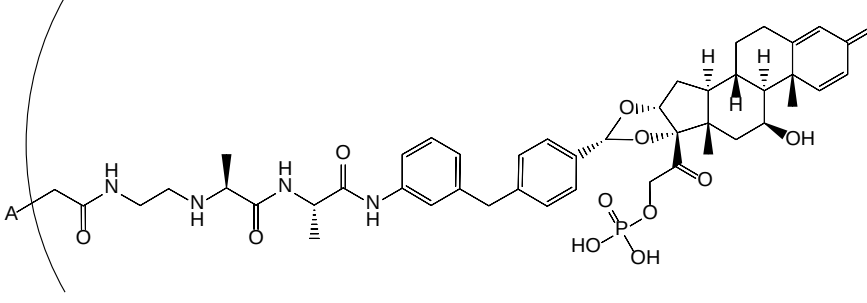
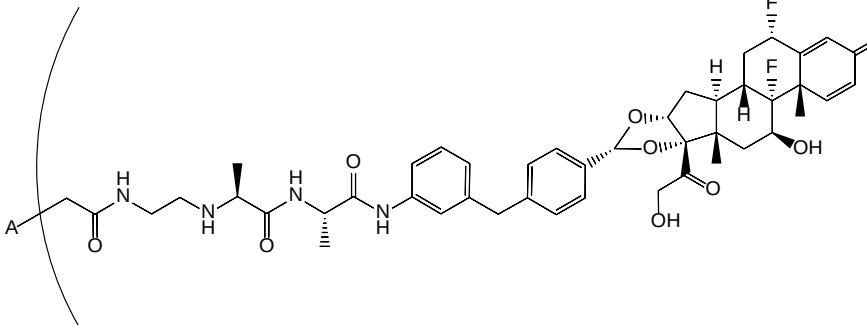
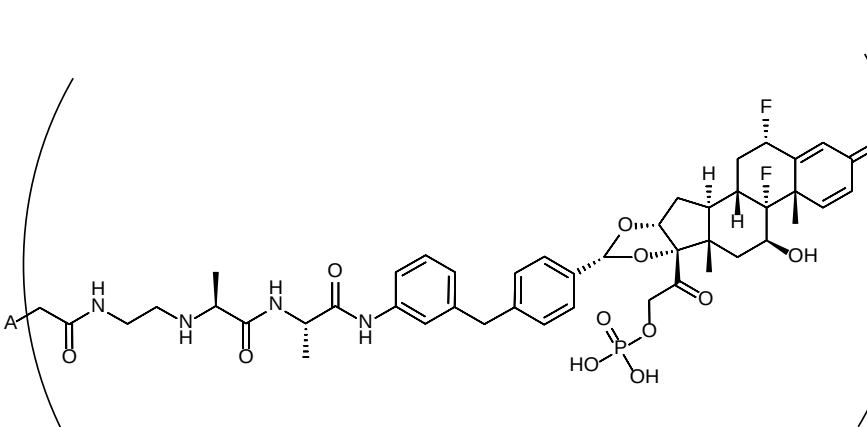
14A	
18A	 Ejemplo 18A – conjugado
21A	 Ejemplo 21A – conjugado
25A	 Ejemplo 25A – conjugado

Tabla 14B. ADC de bromoacetamida adicionales

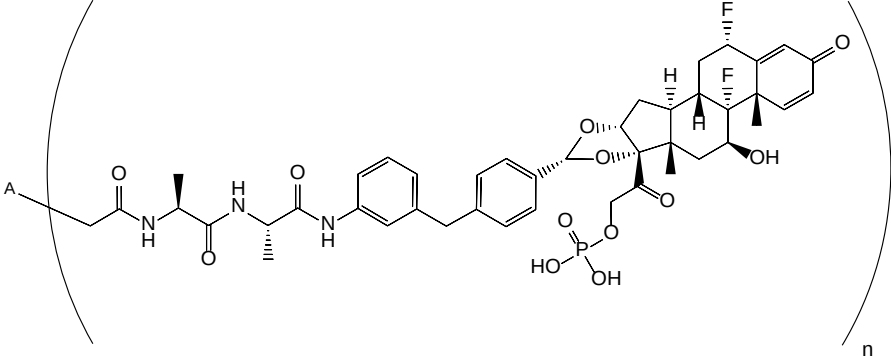
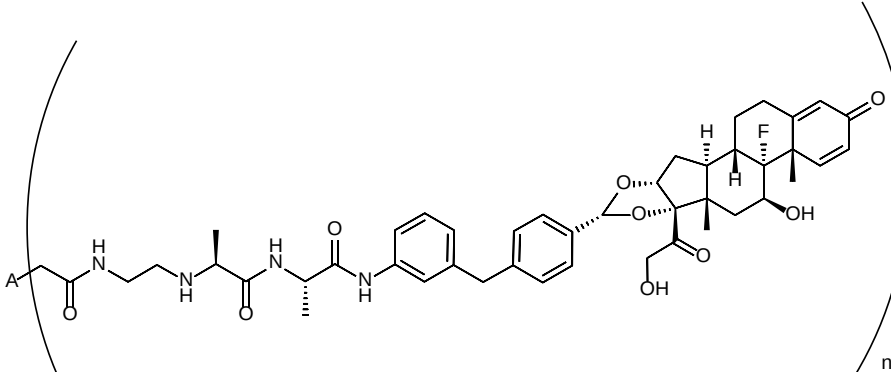
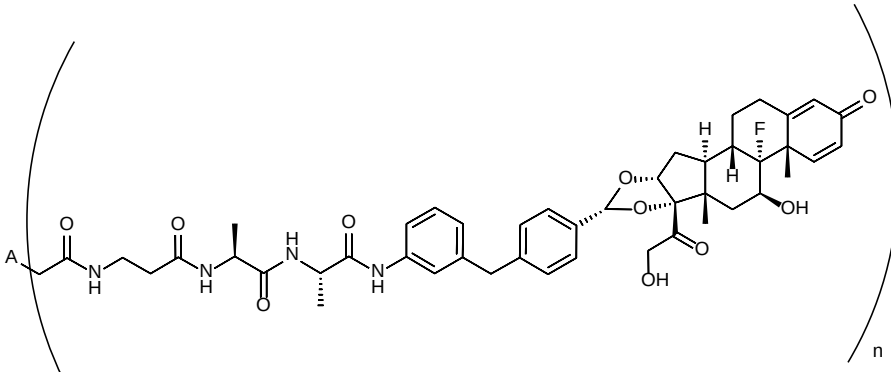
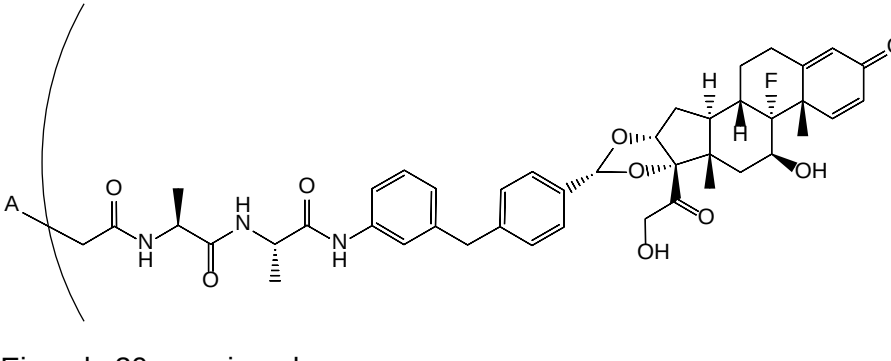
26	 Ejemplo 26 – conjugado
29A	 Ejemplo 29A – conjugado
29B	 Ejemplo 29B – conjugado
30	 Ejemplo 30 – conjugado

Tabla 14B. ADC de bromoacetamida adicionales

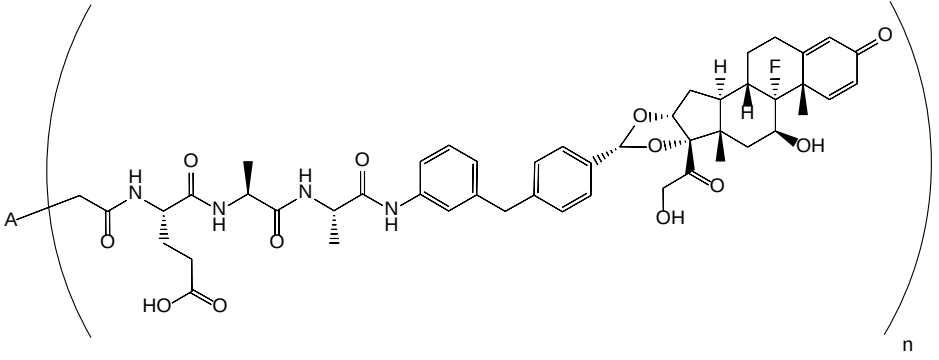
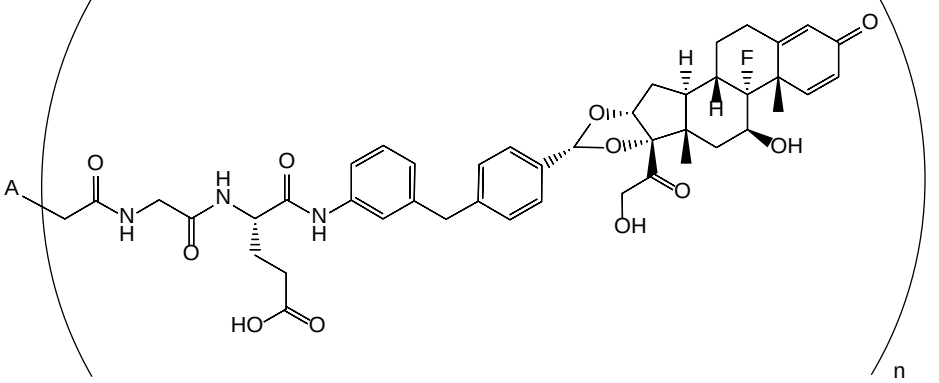
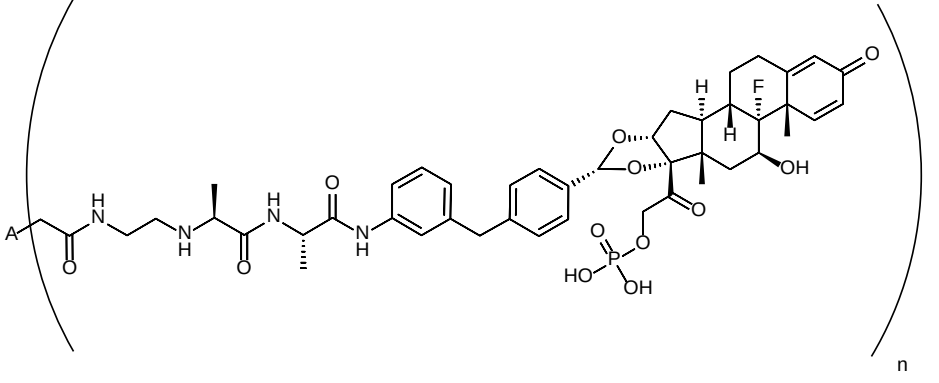
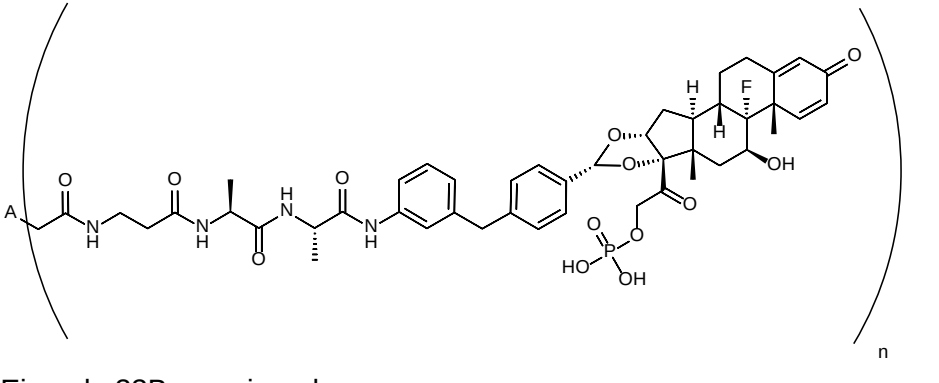
31	 Ejemplo 31 – conjugado
32	 Ejemplo 32 – conjugado
33A	 Ejemplo 33A – conjugado
33B	 Ejemplo 33B – conjugado

Tabla 14B. ADC de bromoacetamida adicionales

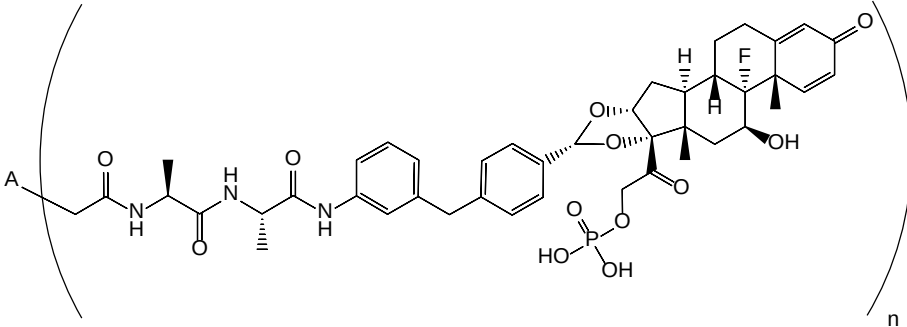
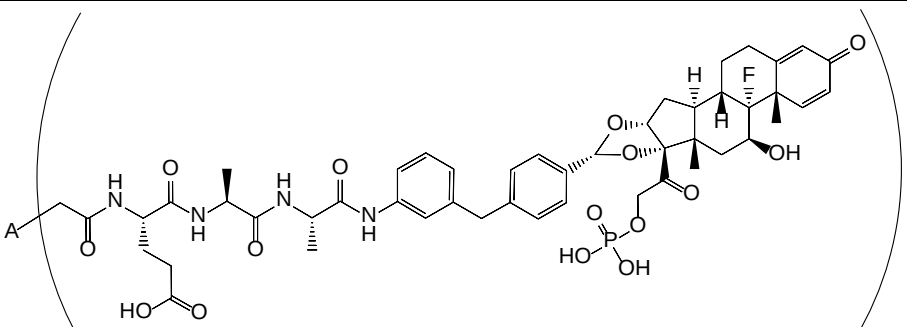
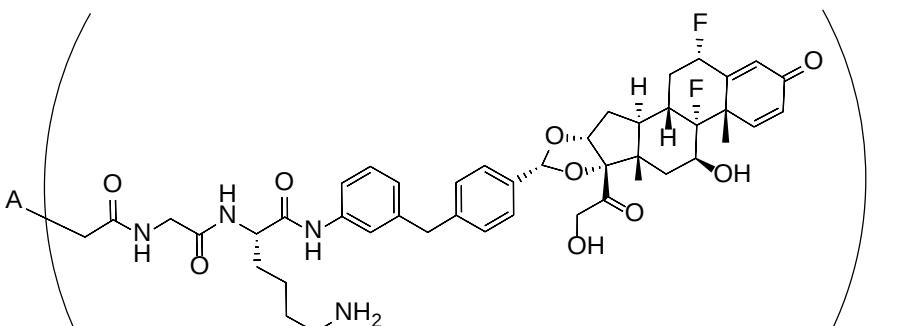
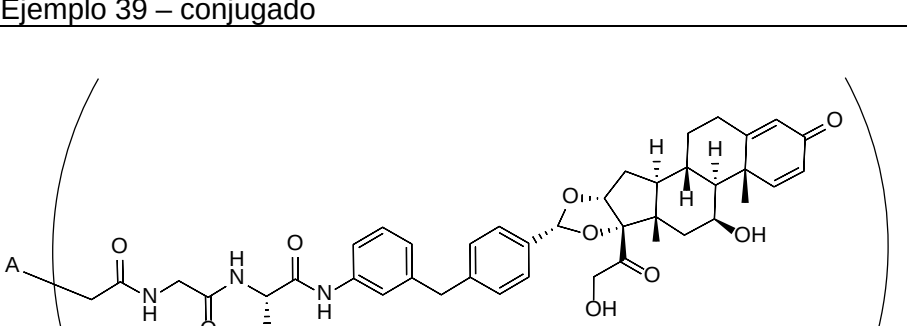
34	 Ejemplo 34 – conjugado
35	 Ejemplo 35 – conjugado
39	 Ejemplo 39 – conjugado
40	 Ejemplo 40 – conjugado

Tabla 14B. ADC de bromoacetamida adicionales

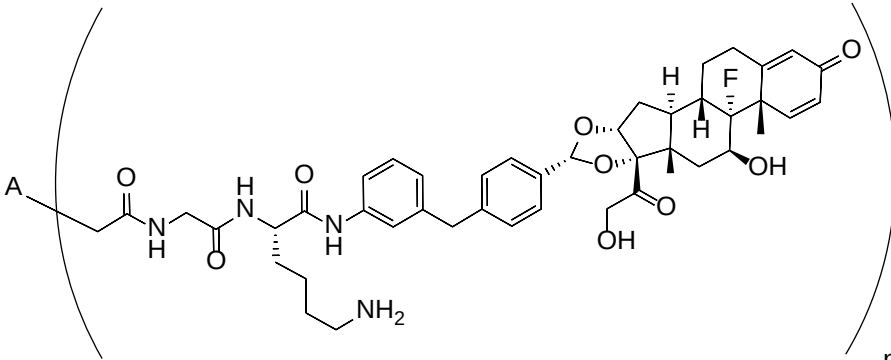
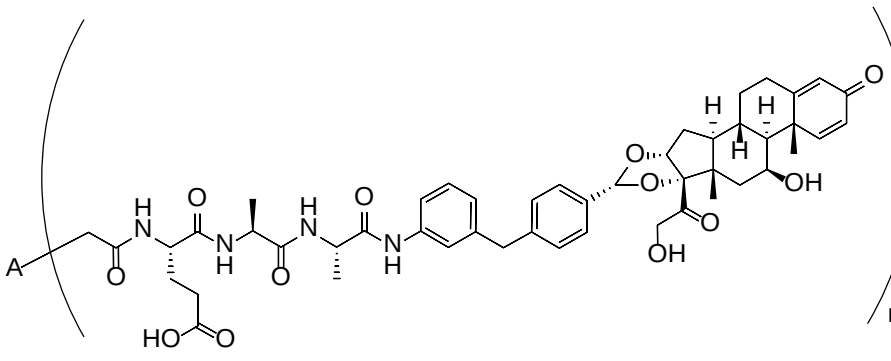
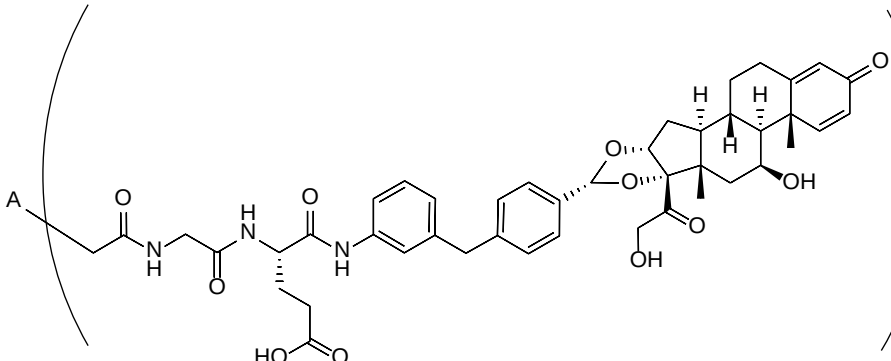
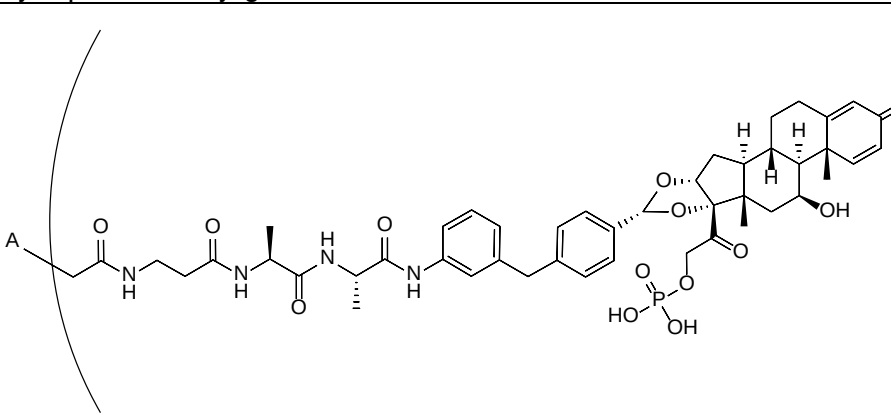
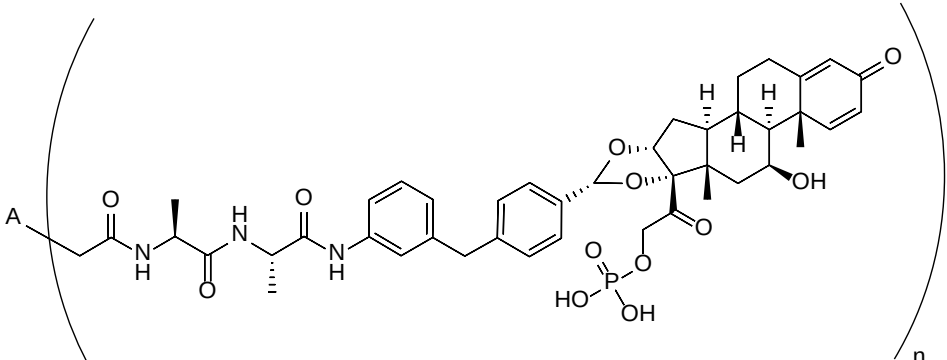
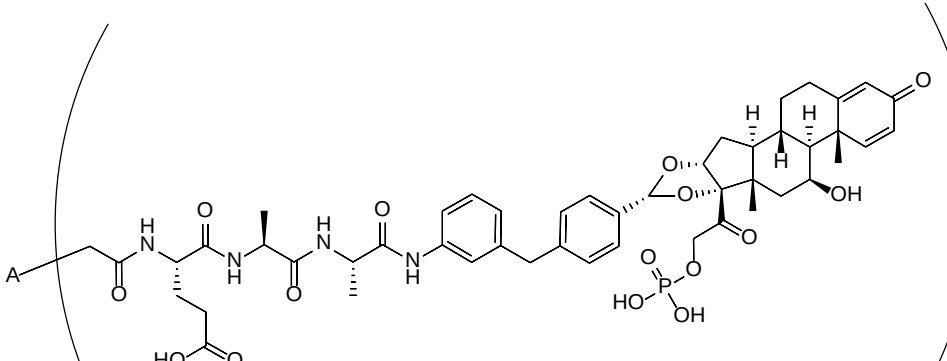
41	 Ejemplo 41 – conjugado
42	 Ejemplo 42 – conjugado
43	 Ejemplo 43 - conjugado
44	 Ejemplo 44 - conjugado

Tabla 14B. ADC de bromoacetamida adicionales	
45	 Ejemplo 45 - conjugado
46	 Ejemplo 46 - conjugado

ENSAYOS BIOLÓGICOS

Tabla 15. Abreviaturas			
MEM	Medios esenciales mínimos	CS FBS	Suero bovino fetal despojado de carbón
NEAA	Aminoácidos esenciales no	FBS	Suero bovino fetal
RPMI	Roswell Park Memorial Institute	DBP	Ftalato de dibutilo
DTT	Ditiotreitol	HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetansulfónico
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos	CFA	Adyuvante completo de Freund
P1NP	Propéptido aminoterminal del procolágeno tipo 1	ACTH	Hormona adrenocorticotrópica
DBP	Ftalato de dibutilo	DTT	Ditiotreitol

Ejemplo A. Generación de líneas celulares indicadoras de CD40 GRE humana y de ratón

[00267] Para crear una línea celular parental, se sembraron células HEK293 en

una placa de 6 cavidades (Costar: 3516) con 2 ml de medio de crecimiento completo (RPMI, 10% de FBS, 1% de L-glutamina, 1% de piruvato de Na y 1% de MEM NEAA) a 250.000 células por cavidad durante 24 horas a 37°C, 5% de CO₂. Al día siguiente, se diluyeron 3 µg de pGL4.36[Luc2P/MMTV/Hygro] (Promega: E316) y 3 µL de reactivo PLUS (Invitrogen: 10964-021) en 244 µL de Opti-MEM (Gibco: 31985-070) y se los incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. El vector de pGL4.36[luc2P/MMTV/Hygro] contiene MMTV LTR (repetición terminal larga del virus del tumor mamario murino) que impulsa la transcripción del gen indicador de luciferasa luc2P en respuesta a la activación de varios receptores nucleares tales como el receptor de glucocorticoides y el receptor de andrógenos. Después de la incubación, la solución diluida de ADN se preincubó con una solución 1:1 de lipofectamina LTX (Invitrogen: 94756) (13,2 µL + 256,8 µL de Opti-MEM) y se incubó a temperatura ambiente durante 25 minutos para formar complejos de ADN-lipofectamina LTX. Después de la incubación, se agregaron directamente 500 µL de complejos de ADN-lipofectamina a la cavidad que contenía las células. Se transfectaron células HEK293 durante 24 horas a 37°C, 5% de CO₂. Después de la incubación, las células se lavaron con 3 ml de solución salina amortiguada con fosfato (PBS) y se seleccionaron con medio de crecimiento completo que contenía 100 µg/ml de higromicina B (Invitrogen: 10687-010) durante dos semanas. Se produjeron células “HEK293 GRE pGL4.36[Luc2P/MMTV/Hygro]”.

[00268] Para crear una línea celular transfectada con CD40 murina, se sembraron células HEK293 en una placa de 6 cavidades (Costar: 3516) con 2 ml de medio de crecimiento completo (RPMI, 10% de FBS, 1% de L-glutamina, 1% de piruvato de Na y 1% de MEM NEAA) a 250.000 células por cavidad durante 24 h a 37°, 5% de CO₂. Al día siguiente, se diluyeron 3 µL de FuGENE 6 Transfection Reagent (Promega: E2311) en 96 µL de medio RPMI no complementado y se los incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después de la incubación, se agregó 1 µg de NEF39 muCD40 HA ICD4 (PDL/FACET Biopharma) a la mezcla de transfección y se lo incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de la incubación, se agregó por goteo una solución diluida de ADN a la cavidad que contenía células a 100 µL por cavidad. Se transfectaron células HEK293 durante 24 h a 37°, 5% de CO₂. Después de la incubación, las células se lavaron con 3 ml de PBS y se seleccionaron con medio de crecimiento completo que contenía 500 g/ml de G418 (Gibco: 10131-027) durante dos semanas. La línea celular resultante se denominó “mCD40_HEK293”.

[00269] Para crear una línea celular indicadora de CD40 GRE murina, se sembraron células HEK293 transfectadas de manera estable con mCD40 en una placa de 6 cavidades (Costar: 3516) con 2 ml de medio de crecimiento completo (RPMI, 10% de FBS, 1% de L-glutamina, 1% de piruvato de Na y 1% de MEM NEAA) a 250.000 células por cavidad durante 24 h a 37°, 5% de CO₂. Al día siguiente, se diluyeron 3 µg de pGL4.36[Luc2P/MMTV/Hygro] (Promega: E316) y 3 µL de reactivo PLUS (Invitrogen: 10964-021) en 244 µL de Opti-MEM (Gibco: 31985-070) y se los incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Después de la incubación, la solución diluida de ADN se preincubó con una solución 1:1 de lipofectamina LTX (Invitrogen: 94756) (13,2 µL + 256,8 µL de Opti-MEM) y se incubó a temperatura ambiente durante 25 minutos para formar complejos de ADN-lipofectamina LTX. Después de la incubación, se agregaron directamente 500 µL de complejos de ADN-lipofectamina a la cavidad que contenía las células. Se transfectaron células HEK293 durante 24 h a 37°, 5% de CO₂. Después de la incubación, las células se lavaron con 3 ml de PBS y se seleccionaron con medio de crecimiento completo que contenía 100 µg/ml de higromicina B (Invitrogen: 10687-010) y 500 µg/ml de G418 (Gibco: 10131-027) durante dos semanas. La línea celular resultante se denominó “mCD40_HEK293 GRE pGL4.36[Luc2P/MMTV/Hygro]”.

[00270] Para crear una línea celular indicadora de CD40 GRE humana, se sembraron células HEK293 pGL4.36[Luc2P/MMTV/Hygro] en una placa de 6 cavidades (Costar: 3516) con 1 ml de medio de crecimiento completo (RPMI, 10% de FBS, 1% de L-glutamina, 1% de piruvato de Na y 1% de MEM NEAA) a 250.000 células por cavidad. Luego, se diluyeron 3 µg de ADN de transcripto de CD40 humana 1 (etiquetado con Myc-DDK) (Origene N.º de cat. RC201977) y 3 µL de reactivo PLUS (Invitrogen: 10964-021) en 500 µL de Opti-MEM (Gibco: 31985-070). La solución de ADN se preincubó con una solución 1:1 de lipofectamina LTX (Invitrogen: 94756) (11 µL + 500 µL de Opti-MEM) y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos para formar complejos de ADN-lipofectamina LTX. Después de la incubación, se agregaron directamente 1.000 µL de complejos de ADN-lipofectamina a la cavidad que contenía las células. Se transfectaron células HEK293 pGL4.36[Luc2P/MMTV/Hygro] durante 24 h a 37°, 5% de CO₂. Después de la incubación, las células se lavaron con 3 ml de PBS y se seleccionaron con medio de crecimiento completo que contenía 100 µg/ml de higromicina B (Invitrogen: 10687-010) y 500 µg/ml de G418 (Gibco: 10131-027) durante dos semanas. La línea celular resultante se denominó “hCD40 transcript 1_HEK293 GRE pGL4.36 [Luc2P/MMTV/Hygro]”.

Ejemplo B. Actividad de ADC anti-CD40 en ensayos indicadores de GRE

[00271] Se colocaron células HEK293 GRE parental (pGL4.36[luc2P/MMTV/Hygro]) y células HEK293 mCD40 o hCD40 GRE (pGL4.36[luc2P/MMTV/Hygro]) en placas blancas tratadas de cultivo tisular de 96 cavidades (Costar: 3917) a 20.000 células por cavidad en 75 µL de medio de ensayo (RPMI, 1% de CSFBS, 1% de L-glutamina, 1% de piruvato de Na y 1% de MEAA) y se las incubó durante 24 h a 37°C, 5% de CO₂. Al día siguiente, las células se trataron con 25 µL de conjugados anticuerpo anti-CD40 murina o humana-fármaco diluidos en serie 4x en medio de ensayo, compuesto de esteroides o medio solo, y se incubaron durante 72 horas a 37°C, 5% de CO₂. Después de 72 horas de incubación, las células se trataron con 100 µL de Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega-E2920) durante 10 minutos y se analizaron para determinar la luminiscencia mediante Microbeta (PerkinElmer). Los datos se analizaron con un ajuste de curva de cuatro parámetros para generar valores de EC₅₀. El porcentaje (%) de activación máxima se normalizó hasta dexametasona 100 nM, que se consideró la activación máxima. Se proporcionan los valores de EC₅₀ para tanto ADC anti-CD40 de ratón como ADC anti-CD40 humana en las Tablas 16 y 17 respectivamente.

Tabla 16. Actividad <i>in vitro</i> de ADC anti-CD40 de ratón en ensayo indicador de CD40 GRE humana						
ADC	n	% de monómero (SEC)	EC₅₀ de mCD40 GRE (µg/ml)	mCD40 GRE (%) máx)	EC₅₀ de HEK293 GRE (µg/ml)	HEK293 GRE (%) máx)
Ejemplo 6-hidrolizado (ratón)	4	99,4	0,11	84,2	5,7	100
Ejemplo 7-hidrolizado (ratón)	4	100	0,42	82,2	>50	52,3
Ejemplo 12-hidrolizado (ratón)	2	100	0,15	104	9,79	93
Ejemplo 12-hidrolizado (ratón)	4	100	0,14	108	6,6	96
Ejemplo 28 (ratón)	4	99,8	0,23	118	19,15	83

Tabla 17. Actividad <i>in vitro</i> de ADC anti-CD40 humana en ensayo indicador de CD40 GRE humana						
ADC	n	% de monómero	EC₅₀ de hCD40 GRE (µg/ml)	hCD40 GRE (% máx)	EC₅₀ de HEK293 GRE (µg/ml)	HEK293 GRE (% máx)
Ejemplo 12-hidrolizado (humano)	4	98,2	0,19	163	>17	117
Ejemplo 13-hidrolizado (humano)	4	99,8	0,29	67	>50	27
Ejemplo 28 (humano)	2	100	16,5	90	>50	82
Ejemplo 28 (humano)	4	100	0,53	77	>50	64
Ejemplo 4 (humano)	4	100	6,57	88	>50	21

SEC = según se mide mediante cromatografía de exclusión por tamaño

Ejemplo C. Actividad de ADC anti-CD40 en lipopolisacárido y ensayo de liberación de citocinas de DC derivadas de monocitos humanos estimuladas por ligando de CD40 soluble

[00272] Se adquirieron células mononucleares de sangre periférica humanas primarias (PBMC) de Sanguine Biosciences, se las lavó en 50 ml de solución salina amortiguada con fosfato (PBS) (pH 7,2), se las volvió a suspender en 100% de FBS con 5% de DMSO, se las dividió en alícuotas y se las criopreservó en nitrógeno líquido hasta su uso. Las PBMC se descongelaron y se lavaron en PBS (pH 7,2) con 0,5% de FBS y EDTA 2 mM. Los monocitos de las PBMC se enriquecieron mediante la selección positiva de células CD14+ con el kit Miltenyi Whole Blood CD14 MicroBeads (N.º de cat. 130-090-879) y el Miltenyi autoMACS Pro Separator de acuerdo con el protocolo del fabricante. Los monocitos purificados se lavaron y se volvieron a suspender en RPMI complementado con 10% de FBS, L-glutamina (Gibco N.º de cat. 25030081), piruvato de sodio (Gibco N.º de cat. 11360070), solución de aminoácidos no esenciales MEM (Gibco N.º de cat. 11140050), penicilina-estreptomicina (Gibco N.º de cat. 15140122), amortiguador HEPES (Gibco N.º de cat. 15630080), 2-mercaptoetanol (Gibco N.º de cat. 21985023). Las células se transfirieron a placas de 6 cavidades (Corning N.º de cat. 3506) a 1,00E+06 células por ml y 3 ml por cavidad, y se incubaron con 100 ng/ml de rhGM-CSF (R&D Systems, N.º de cat. 215-GM-010/CF) y 100 ng/ml de rhIL-4 (R&D Systems, N.º de cat. 204-IL-010/CF) a 37°C y 5% de CO₂ durante 5 días para inducir la diferenciación de monocitos en células

dendríticas (DC). En el día 5, se agruparon DC derivadas de monocitos (MoDC) semiadherentes y se confirmó la eficacia de su diferenciación mediante fenotipado para células CD1a-positivas CD14-negativas (Biolegend N.º de cat. 300106, N.º de cat. 325628) con citometría de flujo. Las MoDC se lavaron, se volvieron a suspender en medio RPMI complementado y se colocaron en una placa de ensayo celular (Costar N.º de cat. 3799) a $1,0 \times 10^5$ células por cavidad. Las células se estimularon con lipopolisacárido (LPS) (Sigma N.º de cat. L4391-1MG) a 0,1 ng/ml durante 2 horas para inducir la regulación ascendente de la expresión de CD40 en la superficie celular en MoDC. Después de la estimulación, el sobrenadante de cultivo se lavó y las células se incubaron con concentraciones variables de anticuerpo anti-CD40 humana o ADC anti-CD40 humana a 37°C y 5% de CO₂ durante 2 horas. Luego, las células se estimularon con 0,2 ng/ml de LPS y 0,5 µg/ml de ligando de CD40 soluble (CD40L) (Adipogen N.º de cat. AG-40B-0010) durante 20 horas. Después de la incubación, la placa se centrifugó durante cinco minutos a 1200 rpm, y 150 µL de medio sobrenadante se transfirieron directamente a una placa adicional de 96 cavidades y se analizaron para determinar las concentraciones de IL-6 (MSD, N.º K151AKB). Los datos de respuesta a la dosis se ajustaron a una curva sigmoideal con regresión no lineal, y los valores de IC₅₀ se calcularon con la ayuda de GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc.). Los resultados mostrados en la Tabla 18 demuestran que el ADC anti-CD40 humana tiene una potente actividad para inhibir la liberación de la citocina proinflamatoria IL-6 de células inmunitarias primarias activadas y la diferencia de potencia entre los ADC del Ejemplo 13-hidrolizado (humano) y del Ejemplo 12-hidrolizado (humano), en donde n es 4, corresponde a las diferencias de potencia entre los dos compuestos de carga útil. La Tabla 18 también proporciona resultados similares para el ADC del Ejemplo 28-conjugado (humano) en donde n es 2, y el ADC del Ejemplo 28-conjugado (humano) en donde n es 4. Un ejemplo representativo de los resultados mostrados en la Figura 2 demuestra que la capacidad máxima para inhibir la activación de células inmunitarias por parte del Ejemplo 13-hidrolizado (humano) y el Ejemplo 12-hidrolizado (humano), en donde n es 4, excede la inhibición proporcionada por el anticuerpo antagonista parental.

Tabla 18. Actividad <i>in vitro</i> de ADC anti-CD40 humana en LPS y ensayo de liberación de citocinas de MoDC humanas estimuladas con CD40L (N=3)				
Control o ADC	% de monómero (SEC)	IC₅₀ de liberación de IL-6 (µg/ml)	Inhibición máxima (%)	n
CONTROL 1 hCD40 mAb	100	0,18	44,5	NA
CONTROL 2* Ejemplo 12 – isotipo hidrolizado (Ab = anti-toxoide tetánico, isotipo humano)*	97,7	3,3	18,2	4
Ejemplo 13- hidrolizado (humano)	99,8	0,14	83,3	4
Ejemplo 12- hidrolizado (humano)	98,2	0,04	99,5	4
Ejemplo 28- conjugado (humano)	100	0,03	81,8	2
Ejemplo 28- conjugado (humano)	100	0,05	87,6	4

*Los anticuerpos de isotipo son anticuerpos que se dirigen al toxoide tetánico y se usan como control del efecto de la administración de IgG que no reconoce un antígeno presente en el modelo de xenoinjerto. Ver, por ejemplo, US 20170182179. El ADC de isotipo humano descrito anteriormente se derivó de los dominios variables clonados de un anticuerpo humano que reconoce la vacuna para el toxoide tetánico. Este es un antígeno cuya expresión por células humanas *in vitro* o *in vivo* no se espera.

SEC = según se mide mediante cromatografía de exclusión por tamaño

Ejemplo D. Actividad de ADC anti-CD40 de ratón en el ensayo de activación de DC derivadas de médula ósea

[00273] Se extruyeron células murinas de médula ósea (BM) de fémures y tibias de ratones C57BL/6 y se las volvió a suspender en medios RPMI complementados. Las células se transfirieron a placas de 6 cavidades (Corning N.º de cat. 3506) a 1,00E+06 células por ml y 5 ml por cavidad y se incubaron con 10 ng/ml de GM-CSF murino (R&D Systems N.º de cat. 415-ML-010) a 37°C y 5% de CO₂ durante 8 días. En los días 3 y 5 de cultivo, 2/3 de los medios de cultivo se reemplazaron con medio nuevo que contenía GM-CSF complementado con 20 ng/ml de IL-4 para inducir la diferenciación de las células BM en células dendríticas (DC). Después de la incubación, estas DC derivadas de BM (BMDC) se lavaron y se volvieron a suspender en medio RPMI complementado y se colocaron en una placa de ensayo celular (Costar N.º de cat. 3799). Las células se estimularon con lipopolisacárido (LPS) (Sigma N.º de cat. L4391-1MG) a 0,1 ng/ml durante 2 horas para inducir la regulación

ascendente de la expresión de CD40 en la superficie celular en BMDC. Después de la estimulación, el sobrenadante de cultivo se lavó y las células se incubaron con concentraciones variables de anticuerpo anti-CD40 de ratón o Ejemplo 6-hidrolizado (ratón) a 37°C y 5% de CO₂ durante 2 horas. Luego, las células se estimularon con 0,1 ng/ml de LPS y 0,5 µg/ml de ligando de CD40 soluble (CD40L) (Enzo Life Sciences, Inc. N.º de cat. ALX-522-120-C010) durante 20 horas. En algunos experimentos, el tratamiento con LPS se evaluó a concentraciones variables (0,1, 1,0, 10 ng/ml) mientras que el CD40L soluble permaneció a 0,5 µg/ml. Después de la incubación, la placa se centrifugó durante cinco minutos a 1200 rpm, y 150 µL de medio sobrenadante se transfirieron directamente a una placa adicional de 96 cavidades y se analizaron para determinar las concentraciones de IL-6 (MSD, N.º de cat. K152TXK). Para cuantificar la regulación ascendente de los marcadores de activación de DC, las células cultivadas que quedaban en la placa de ensayo se lavaron, se tiñeron con anticuerpo anti-CD86 de ratón (GL-1, Biolegend N.º de cat. 105018) y se evaluaron mediante citometría de flujo. Los datos de respuesta a la dosis se ajustaron a una curva sigmoideal con regresión no lineal, y los valores de IC₅₀ se calcularon con la ayuda de GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc.). Se realizaron experimentos adicionales con el Ejemplo 12-hidrolizado (ratón) y el Ejemplo 28 (ratón). Los resultados mostrados en la Tabla 19 demuestran que los ADC anti-CD40 de ratón exhiben una potente actividad para inhibir la regulación ascendente de la expresión de moléculas coestimuladoras en células inmunitarias primarias activadas y las diferencias de potencia entre los ADC corresponden a las diferencias de potencia entre las cargas útiles de fármaco-ligador. Los resultados mostrados en la Figura 3 demuestran que la capacidad máxima para inhibir la activación de células inmunitarias por parte del Ejemplo 6-hidrolizado (ratón) excede la inhibición proporcionada por el anticuerpo antagonista parental.

Tabla 19. Actividad <i>in vitro</i> de ADC anti-CD40 de ratón en LPS y ensayo de activación de BMDC de ratón estimuladas con CD40L (N=3)				
CONTROL O ADC	% de monómero (SEC)	IC₅₀ de expresión de CD86 (µg/ml)	Inhibición máxima (%)	n
CONTROL 1 mCD40 mAb	100	0,13	35,6	NA
CONTROL 2* Ejemplo 6 – isotipo hidrolizado (Ab = anti-toxoide tetánico, isotipo de ratón)	100	1,06	37,5	4
Ejemplo 6- hidrolizado (ratón)	100	0,15	118,4	4
Ejemplo 12- hidrolizado (ratón)	100	0,06	94,2	4
Ejemplo 28 (ratón)	99,8	0,10	90,8	4

*Los anticuerpos de isotipo son anticuerpos que se dirigen al toxoide tetánico y se usan como control del efecto de la administración de IgG que no reconoce un antígeno presente en el modelo de xenoinjerto. Ver, por ejemplo, US 20170182179. El ADC de isotipo de ratón descrito anteriormente se derivó de los dominios variables clonados de un anticuerpo de ratón que reconoce la vacuna para el toxoide tetánico. Este es un antígeno cuya expresión por células de ratón *in vitro* o *in vivo* no se espera.
SEC = según se mide mediante cromatografía de exclusión por tamaño

Ejemplo E. Actividad de ADC anti-CD40 de ratón en un modelo de inflamación aguda inducida por LPS *in vivo*

[00274] Ratones C57BL/6 hembra (n = 3) recibieron dosis por vía intraperitoneal de 100 µL de solución salina amortiguada con fosfato (PBS) (pH 7,2) que contenía 1 µg de LPS y ya sea (1) anticuerpo antagonista parental (mCD40 mAb) como Control 1, (2) Ejemplo 6-isotipo hidrolizado (Ab = anti-toxoide tetánico, isotipo de ratón) (n = 4), o (3) Ejemplo 6-hidrolizado (ratón) como el ADC (10 mg/kg) (n = 4). 24 horas después de la inyección, se recolectaron los bazo de ratones tratados y se los procesó para obtener una suspensión de una sola célula de cada ratón individual. Las células se tiñeron con los siguientes anticuerpos etiquetados con fluorocromo para fenotipar poblaciones de células presentadoras de antígeno específicas con citometría de flujo: PE anti-CD4 de ratón (Biolegend N.º de cat. 100408), BUV395 anti-CD8 de ratón (BD N.º de cat. 563786), PE-Cy7 anti-CD19 de ratón, PerCp-Cy5,5 anti-CD11c de ratón, BV510 anti-CD11b de ratón, Pacific Blue anti-IAIE de ratón, APC anti-CD40 de ratón, Alexa-488 anti-CD86 de ratón. Las células se tiñeron a 1,0E+07 células por ml en PBS (pH 7,2) que contenía 1% de FBS y reactivo de bloqueo de FcR (BD, N.º de cat. 553142). La frecuencia total de células dendríticas activadas (DC) por bazo se calculó

y graficó con la ayuda de GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc.). Los resultados mostrados en la Figura 4 demuestran que el ADC contra CD40 exhibe mayor eficacia en la inhibición de la activación de DC *in vivo* que el anticuerpo antagonista parental o el ADC de isotipo.

Ejemplo F. Actividad de ADC anti-CD40 de ratón en el modelo de hipersensibilidad tipo IV retardada

[00275] Los ADC anti-CD40 de ratón se evaluaron en un modelo de hipersensibilidad tipo IV retardada (DTH) aguda. Una respuesta inflamatoria aguda de la piel impulsada por linfocitos T y provocada por una nueva exposición al antígeno de proteína sensibilizado (BSA). La eficacia de los ADC anti-CD40 de ratón se midió en función de su capacidad para inhibir la hinchazón de las patas.

[00276] Ratones C57BL/6 hembra recibieron dosis por vía intraperitoneal en el día -1 de (1) mAb contra mCD40 como Control 1; (2) Ejemplo 12–isotipo hidrolizado (Ab = anti-toxoide tetánico, isotipo de ratón) como Control 2 (n = 4); o (3) Ejemplo 12–hidrolizado (ratón) como el ADC (n = 4). En el día 0, los ratones se sensibilizaron mediante inmunización con 200 µg de BSA metilado (Sigma-Aldrich, N.º de cat. 1009) emulsionados en CFA H37Ra (Becton Dickinson, N.º de cat. 231131). En el día 7 se midió el espesor inicial de ambas patas traseras. La almohadilla del pie derecho se expuso a 100 µg de mBSA en solución salina amortiguada con fosfato (PBS), mientras que la almohadilla del pie izquierdo se trató con PBS sola. 24 horas después de la exposición, las patas traseras se evaluaron con pinzas de resorte Dyer (Dyer 310-115) para determinar si había hinchazón de las patas, y los cambios en el espesor en comparación con el valor inicial se grafican en la Figura 5A. Después de la medición de la hinchazón de las patas, los ratones recibieron una inyección de ACTH a 1 mpk IP, y se los hizo sangrar de manera terminal 30 min después de la ACTH. Se recolectó plasma y se lo analizó para determinar los niveles de P1NP, corticosterona, esteroides libres y moléculas grandes. Los datos en la Figura 5A demuestran la eficacia mejorada de los ADC contra CD40 para inhibir con mayor potencia la inflamación mediada por linfocitos T *in vivo* en comparación con el anticuerpo antagonista parental o el ADC no dirigido solo.

[00277] La actividad del ADC anti-CD40 de ratón que consiste en el Ejemplo 28–conjugado (ratón) con anti-CD40 de ratón o isotipo (Ab = anti-ovoalbúmina, isotipo de ratón) también se evaluó en el ensayo DTH con el procedimiento expuesto anteriormente. La Figura 5B demuestra la eficacia mejorada de los ADC contra CD40 para inhibir la inflamación mediada por linfocitos T *in vivo* en comparación con el

anticuerpo antagonista parental o el ADC no dirigido solo.

Ejemplo G. Biomarcadores de esteroides en el modelo DTH de inflamación

1. P1NP en plasma

[00278] La cuantificación de P1NP en plasma se realizó en una plataforma LC/MS en función de la digestión de la proteína tripsina. Las muestras de plasma se precipitaron parcialmente y se redujeron completamente mediante la adición de mezcla de MeCN/bicarbonato de amonio 0,1 M/DTT. El sobrenadante se recolectó y se alquiló mediante la adición de ácido yodoacético. Las proteínas alquiladas se digirieron con tripsina y los péptidos trípticos resultantes se analizaron mediante LC/MS.

[00279] Se generaron curvas de calibración mediante el uso de péptido tríptico sintético agregado a suero de caballo (matriz sustituta que no interfiere). Se usó péptido flanqueante etiquetado con isótopos estables (extensión de 3-6 aminoácidos en ambos terminales del péptido tríptico) como estándar interno agregado en la mezcla de precipitación de proteínas MeCN/DTT para normalizar tanto la eficiencia de la digestión como la inyección de LC/MS. Se usó una columna Columnex Chromenta BB-C18, 2,1x150 mm, 5 µm para la separación cromatográfica. La fase móvil A fue 0,1% de ácido fórmico en agua de HPLC MilliQ, y la fase móvil B fue 0,1% de ácido fórmico en MeCN. Se aplicó un gradiente lineal de 2% de fase móvil B a 65% de fase móvil B de 0,6 a 3 min. El tiempo de ejecución total fue de 8 minutos a una velocidad de flujo de 0,45 ml/min. Se usó un espectrómetro de masas AB Sciex 4000Qtrap en modo MRM positivo para cuantificar los péptidos P1NP, a una temperatura de fuente de 700°C.

2. Corticosterona endógena y esteroides libres liberados

[00280] Se preparó una curva de calibración de esteroides en plasma de ratón con concentraciones finales de 0,03 nM a 0,1 µM a 8 niveles de concentración diferentes. Se preparó una curva de calibración de corticosterona con una variación de concentraciones finales de corticosterona de 0,3 nM a 1 µM en 70 mg/ml de solución de albúmina de suero bovino en solución salina amortiguada con fosfato (PBS). Se agregó una solución de 160 µL de MeCN con 0,1% de ácido fórmico a estándares de calibración o muestras de plasma de estudio de 40 µL. Se diluyeron sobrenadantes con agua destilada y se inyectaron 30 µL de solución de muestra final para análisis de LC/MS.

[00281] La cuantificación de corticosterona y esteroides libres liberados se realizó en un espectrómetro de masas triple cuádruple AB Sciex 5500 conectado con

un sistema de HPLC Shimadzu AC20 interconectado con una fuente de ionización por electrospray que funciona en modo positivo. Se usó una columna Waters XBridge BEH C18, 2,1x30mm, de 3,5 μ m para la separación cromatográfica. La fase móvil A fue 0,1% de ácido fórmico en agua de HPLC Milli Q, y la fase móvil B fue 0,1% de ácido fórmico en MeCN. Se aplicó un gradiente lineal de 2% de fase móvil B a 98% de fase móvil B de 0,6 a 1,2 minutos. El tiempo total de ejecución fue de 2,6 minutos a una velocidad de flujo de 0,8 ml/min. El espectrómetro de masas se operó en modo MRM positivo a una temperatura de fuente de 700°C. Los datos en la Tabla 20 demuestran que el tratamiento con ADC en el modelo DTH no afecta significativamente los niveles séricos de biomarcadores de esteroides, P1NP y corticosterona.

Tabla 20. Efecto de la actividad de ADC anti-CD40 de ratón sobre biomarcadores de esteroides			
Control/ADC	n	P1NP (ng/ml $\pm$ SD)	Corticosterona (ng/ml $\pm$ SD)
Vehículo	4	1294 $\pm$ 183	292,832 $\pm$ 40
Ejemplo 12-hidrolizado (ratón), 10 mpk	4	1096,4 $\pm$ 306	312,526 $\pm$ 46
Ejemplo 12-hidrolizado (ratón), 3 mpk	4	1486,6 $\pm$ 313	332,304 $\pm$ 27
Ejemplo 12-hidrolizado (ratón), 1 mpk	4	1255,4 $\pm$ 318	303,742 $\pm$ 40
Ejemplo 12-hidrolizado (ratón), 0,3 mpk	4	1736 $\pm$ 197	271,182 $\pm$ 83
Ejemplo 12-hidrolizado (ratón), 0,1 mpk	4	1311,2 $\pm$ 418	282,856 $\pm$ 43

Ejemplo H. Actividad del inmunoconjugado anti-CD40 de ratón en artritis inducida por colágeno (CIA)

[00282] Se evaluó la capacidad del ADC del Ejemplo 6-hidrolizado (ratón) para afectar la enfermedad en el modelo de artritis inducida por colágeno (CIA).

[00283] En estos experimentos, se obtuvieron ratones DBA/1J macho de Jackson Labs (Bar Harbor, ME). Los ratones se usaron a las 6-12 semanas de edad. Todos los animales se mantuvieron a temperatura y humedad constantes en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas y se alimentaron con comida para roedores (Lab Diet 5010 PharmaServ, Framingham, MA) y agua a voluntad. AbbVie está acreditada por la AAALAC (Asociación Internacional para la Evaluación y Acreditación del Cuidado de Animales de Laboratorio), y todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales (IACUC) y supervisados por un veterinario asistente. Se realizó un monitoreo del peso corporal y la condición, y los

animales se sometieron a eutanasia si presentaban una pérdida de peso >20%.

[00284] Los ratones DBA/J macho se inmunizaron por vía intradérmica (i.d.) en la base de la cola con 100 µL de emulsión que contenía 100 µg de colágeno bovino tipo II (MD Biosciences) disuelto en ácido acético 0,1 N y 200 µg de Mycobacterium tuberculosis H37Ra inactivada por calor (adyuvante completo de Freund, Difco, Laurence, KS). Veintiún días después de la inmunización con colágeno, los ratones recibieron un refuerzo IP de 1 mg de Zymosan A (Sigma, San Luis, MO) en solución salina amortiguada con fosfato (PBS). Después del refuerzo, los ratones se monitorearon de 3 a 5 veces por semana para detectar artritis. Las patas traseras se evaluaron con pinzas de resorte Dyer (Dyer 310-115) para determinar si había hinchazón de las patas.

[00285] Los ratones se inscribieron entre los días 24 y 28 al detectarse los primeros signos clínicos de enfermedad y se distribuyeron en grupos de gravedad artrítica equivalente. El tratamiento terapéutico temprano comenzó al momento de la inscripción.

[00286] Los animales recibieron dosis por vía intraperitoneal de anticuerpo antagonista anti-CD40 de ratón a razón de 10 mg/kg o ADC del Ejemplo 6-hidrolizado (ratón) (n = 4) en solución salina al 0,9%. Se recolectó sangre mediante un corte en la cola para determinar la exposición a anticuerpos 24 y 72 horas después de la dosis. Las patas se recolectaron en el punto final de tiempo para histopatología. Se recolectó sangre en el punto final de tiempo mediante punción cardíaca para obtener recuentos sanguíneos completos (Sysmex XT-2000iV). Se determinó la significancia estadística mediante ANOVA. El Ejemplo 6-isotipo hidrolizado (Ab = anti-toxoide tetánico, isotipo de ratón) (n = 4) y el mAb anti-mCD40 parental se utilizaron como los Controles 1 y 2. Los resultados mostrados en la Figura 6 demuestran que una sola dosis de ADC esteroide anti-CD40 de ratón puede exhibir una duración de acción prolongada mediante la mejora de la hinchazón de las patas durante ~6 semanas en comparación con los Controles 1 y 2.

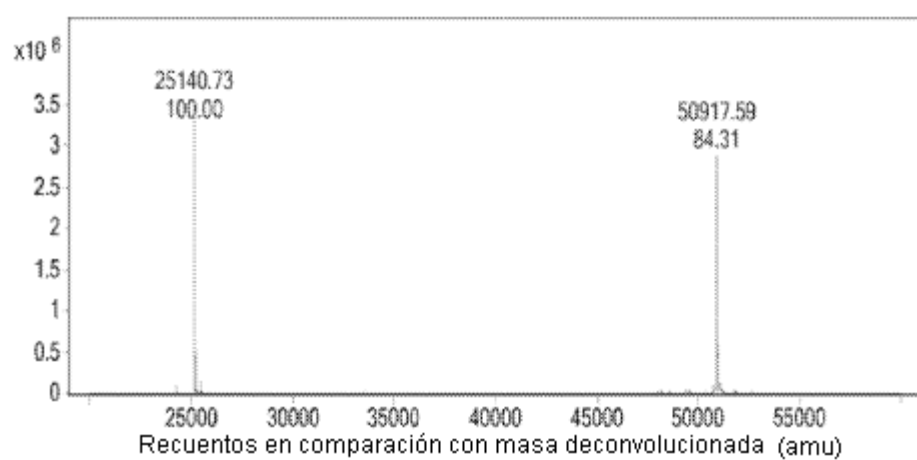
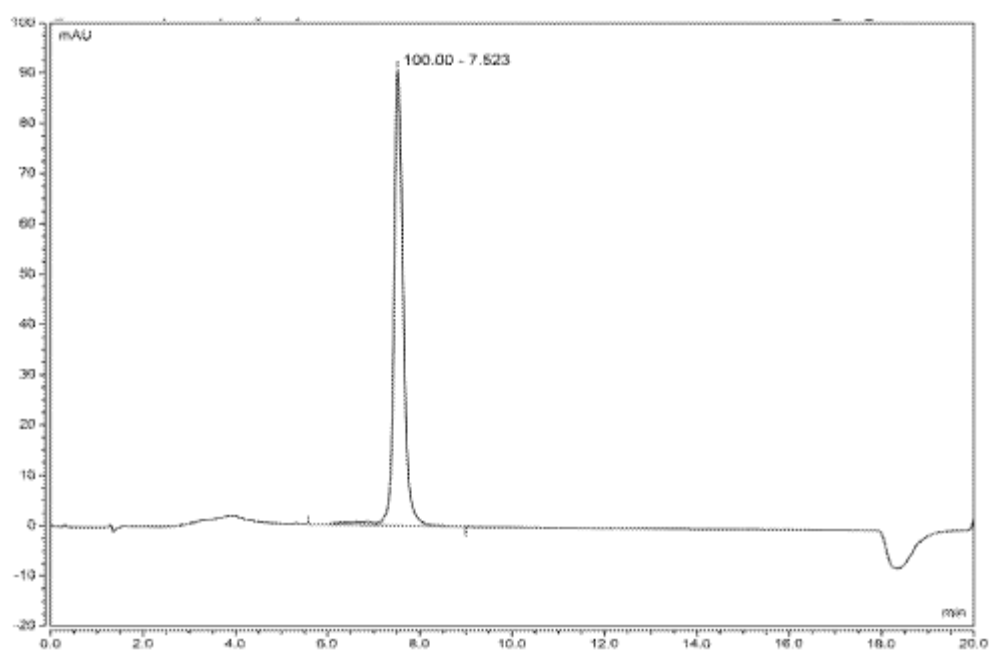
INCORPORACIÓN POR REFERENCIA

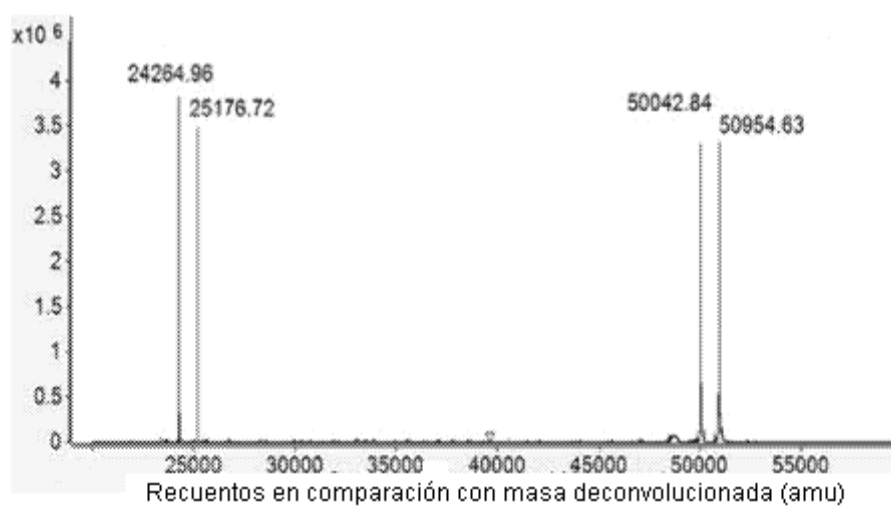
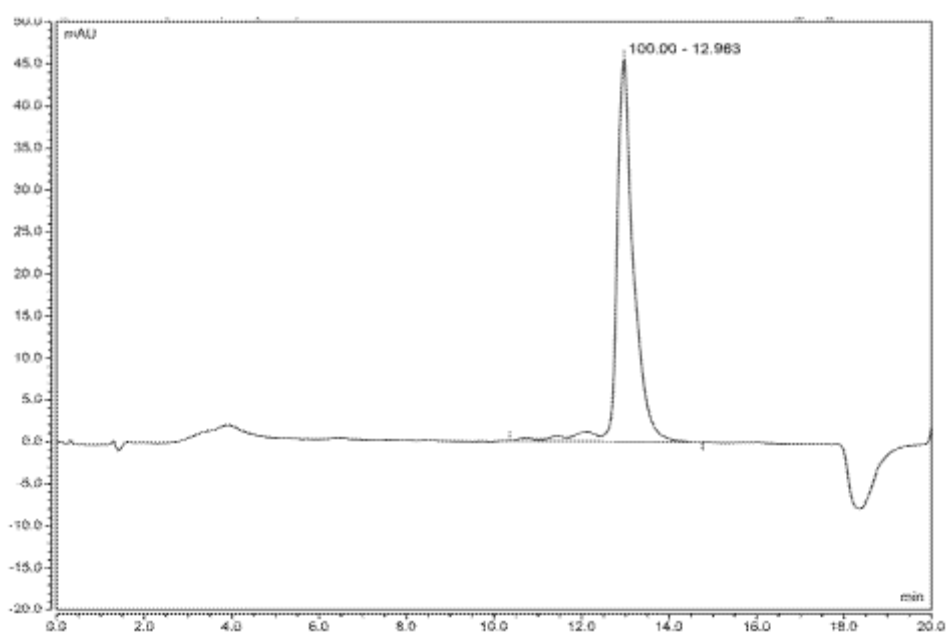
[00287] Todas las publicaciones, incluso las patentes y las solicitudes publicadas, a las que se hace referencia en la Descripción detallada de la invención y los Ejemplos se incorporan por referencia en la presente en su totalidad.

OTRAS FORMAS DE REALIZACIÓN

[00288] Lo anterior se ha descrito de ciertas formas de realización no limitativas de la presente divulgación. Las personas del oficio de nivel medio observarán que se

le pueden realizar diversos cambios y modificaciones a esta descripción sin apartarse del espíritu o el alcance de la presente divulgación, como se define en las siguientes reivindicaciones.

**Figura 1A****Figura 1B**

**Figura 1C****Figura 1D**

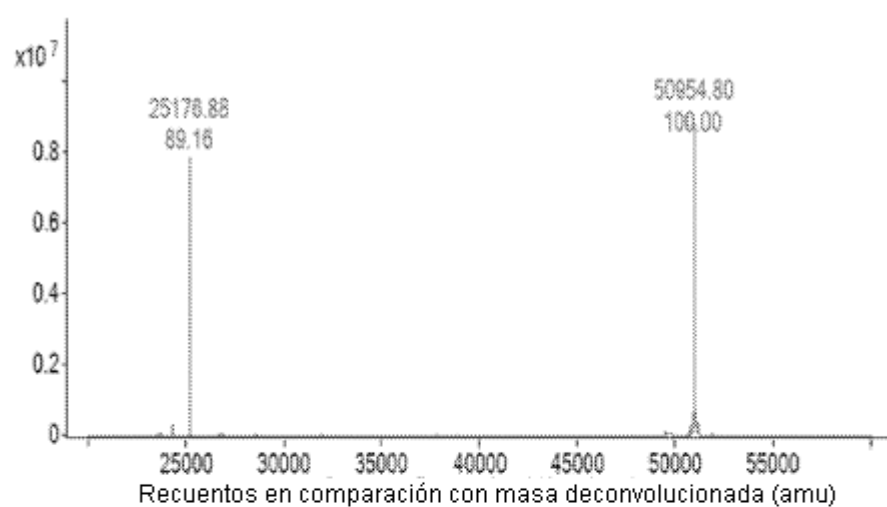


Figura 1E

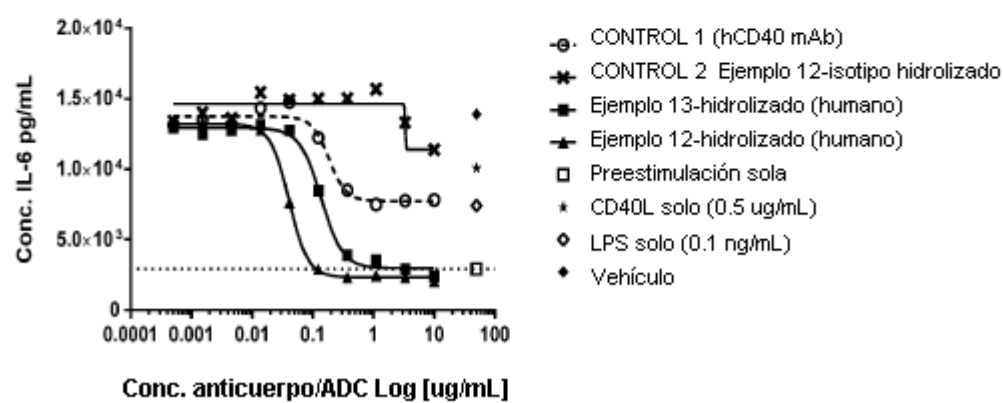


Figura 2

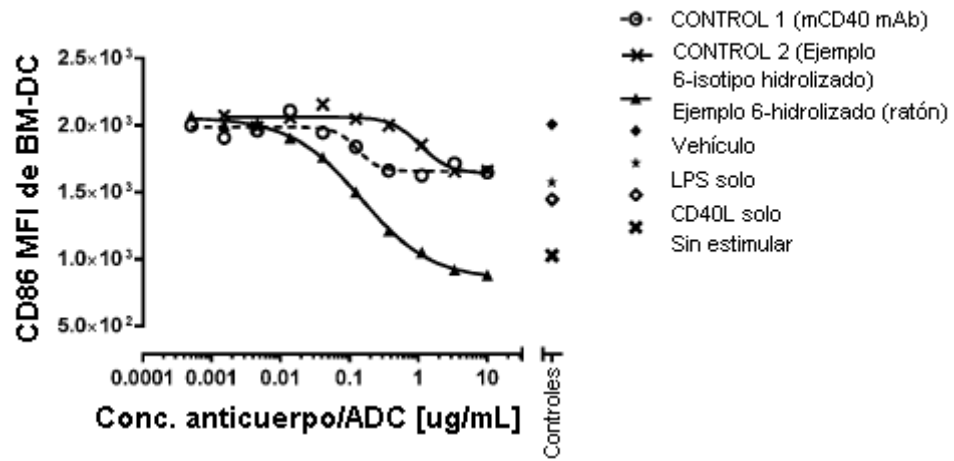


Figura 3

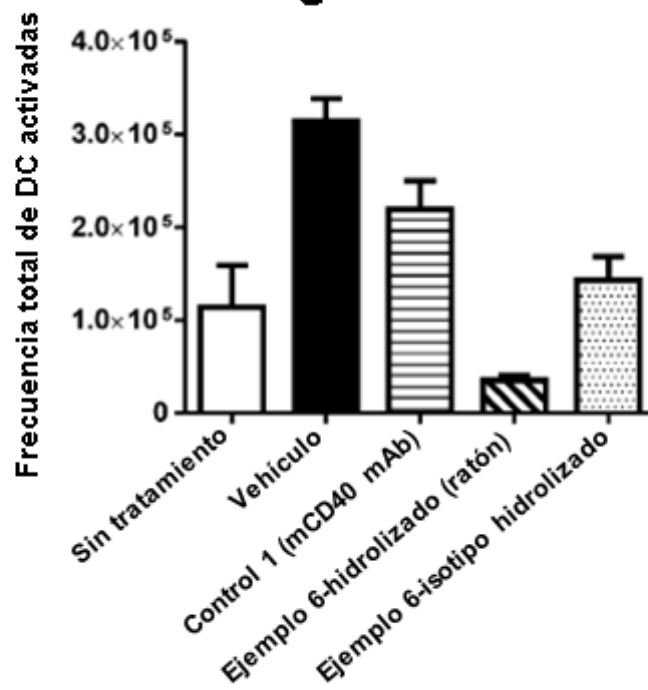
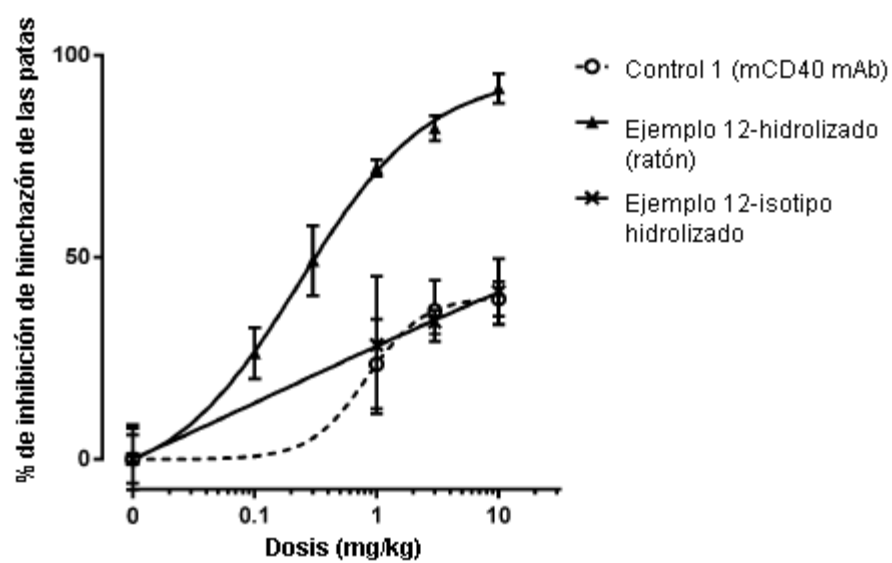


Figura 4

**Figura 5A**

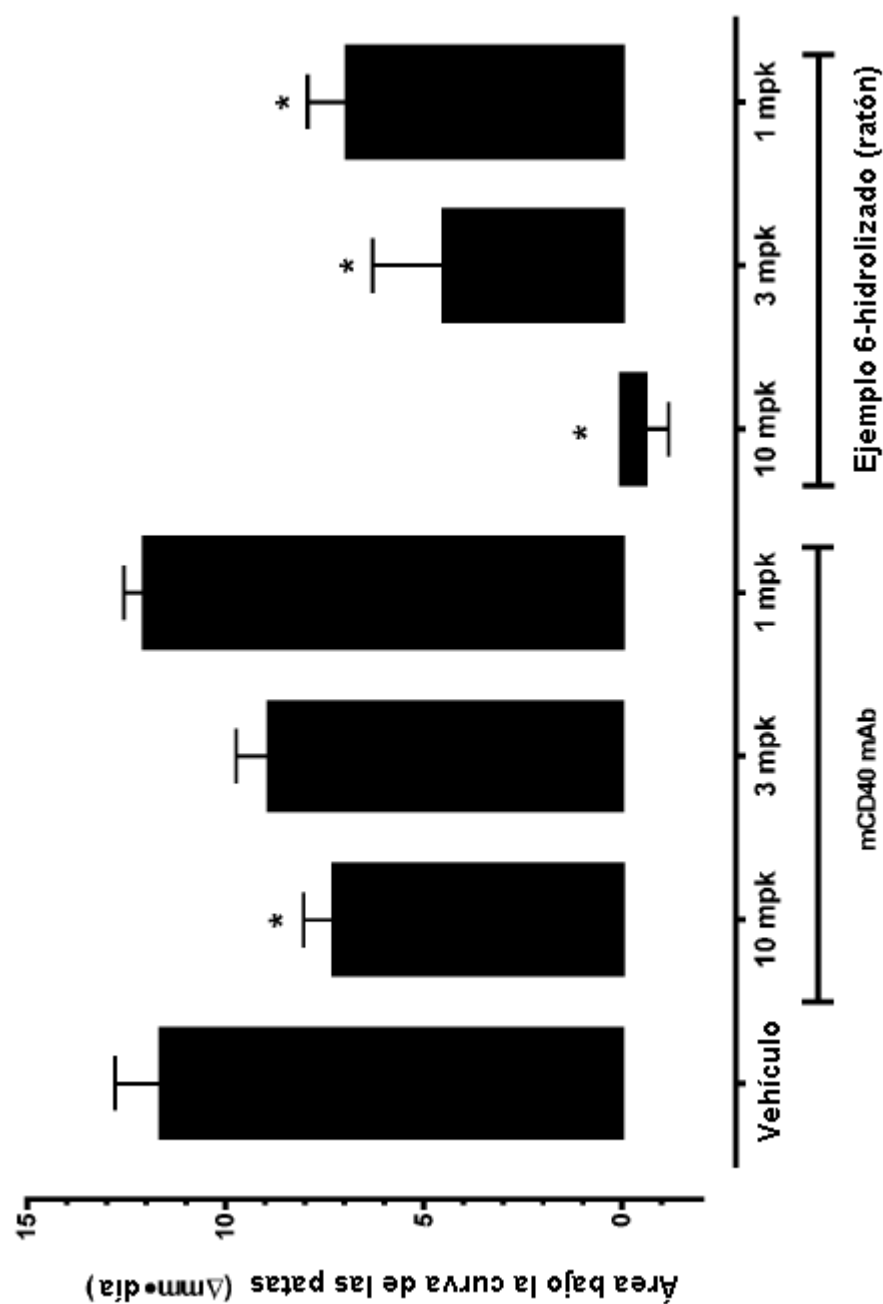


Figura 6