

COMPUESTOS, COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA TRATAR ENFERMEDADES QUE INVOLUCREN TEJIDOS CON ENFERMEDADES ÁCIDAS O HIPÓXICAS

5

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a compuestos terapéuticos y composiciones farmacéuticas para el tratamiento de enfermedades que involucren tejidos con enfermedades ácidas o hipóxicas, que incluyen cáncer, enfermedades cardiovasculares tales como accidente cerebrovascular e infarto de miocardio, y enfermedades neurodegenerativas a largo plazo, así como a métodos para su uso y fabricación.

15

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La hipoxia y la acidosis son marcadores fisiológicos de muchos procesos de enfermedades, incluido el cáncer. En el cáncer, la hipoxia es un mecanismo responsable del desarrollo de un ambiente ácido dentro de los tumores sólidos. Como resultado, deben eliminarse los iones de hidrógeno de la célula (por ejemplo, mediante una bomba de protones) para mantener un pH normal dentro de la célula. Como consecuencia de esta exportación de iones de hidrógeno, las células cancerosas tienen un mayor gradiente de pH a través de la bicapa lipídica de la membrana celular y un pH más bajo en el medio extracelular, en comparación con las células normales.

El cáncer es un grupo de enfermedades caracterizadas por un control aberrante del crecimiento celular. Se estima que la incidencia anual del cáncer supera los 1,6 millones solo en los Estados Unidos. Si bien se usan cirugía, radiación, quimioterapia y hormonas para tratar el cáncer, sigue siendo la segunda causa de muerte en los EE. UU. Se estima que alrededor de 600.000 estadounidenses morirán de cáncer cada año.

El tratamiento del cáncer en humanos mediante la administración sistémica de

agentes farmacéuticos a menudo disminuye o termina la replicación descontrolada característica de las células cancerosas. Una clase de tales agentes son los inhibidores de reparación del ADN. Sin embargo, dicha desaceleración o terminación afecta no solo la replicación de las células cancerosas sino también la replicación de las células no cancerosas, lo que produce los efectos secundarios no deseables conocidos de dicho tratamiento contra el cáncer. Sería muy deseable administrar selectivamente dichos agentes a las células cancerosas objetivo y minimizar o evitar los efectos secundarios causados por la administración sistémica. La familia de enzimas PARP, incluidas la poli(ADP-ribosa) polimerasa (PARP-1) y las enzimas relacionadas PARP-2 y PARP-3 (colectivamente "PARP"), representa elementos importantes en la reparación de roturas de cadena sencilla de ADN, particularmente mediante la vía de reparación de escisión de bases. Si las roturas de cadena sencilla no se reparan antes de la replicación del ADN, se pueden formar roturas de cadena doble. Las células con un número creciente de roturas de cadena doble se vuelven más dependientes de otras vías de reparación, como la recombinación homóloga, y (si las roturas de cadena sencilla continúan sin reparación) se produce la muerte de las células.

Se han desarrollado inhibidores de PARP y continúan elaborándose como agentes anticancerígenos. Dado que estos inhibidores evitan la reparación de roturas de cadena sencilla de ADN, tienen una variedad de funciones en el tratamiento del cáncer. (Ver, por ejemplo, Nicola J. Curtin y Ricky A. Sharma - "PARP Inhibitors for Cancer Treatment", Cancer Drug Discovery and Development, tomo 83, Humana Press 2015).

Los inhibidores de PARP pueden usarse para el tratamiento de formas de cáncer que dependan más de PARP que las células normales (los llamados cánceres "sensibles a PARP"). Por ejemplo, el tratamiento con un inhibidor de PARP tiene un efecto beneficioso en los pacientes con deficiencia de recombinación homóloga (HRD, por sus siglas en inglés), como la que involucra los genes BRCA1 y BRCA2, ya sea en monoterapia o en combinación con otros agentes. Dado que la reparación del ADN y la supervivencia de las células inhibidas con PARP dependen en gran medida de la HR, los pacientes con mutaciones relacionadas con BRCA (que

exhiben HRD) son adecuados para el tratamiento con inhibidores de PARP.

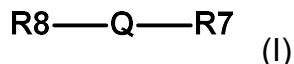
Si bien los inhibidores de PARP son útiles en el tratamiento del cáncer, los compuestos también exhiben efectos secundarios. Los efectos secundarios de PARP, que incluyen reacciones adversas hematológicas y gastrointestinales graves y leucemia mieloide aguda potencialmente mortal, son altamente indeseables.

Se esperaría que otros agentes terapéuticos contra el cáncer que inhiban la reparación del ADN exhiban de manera similar efectos secundarios no deseados cuando se administran por vía sistémica. Tales agentes terapéuticos contra el cáncer que inhiben la reparación del ADN adicionales incluyen los dirigidos a la proteína quinasa de ataxia-telangiectasia mutada (ATM, por sus siglas en inglés), la proteína quinasa relacionada con ATM-Rad3 (ATR) y la proteína quinasa de serina/treonina nuclear DNA-PK. La terapia contra el cáncer se beneficiaría significativamente si los compuestos que actúan a través de estos mecanismos pudieran administrarse selectivamente a las células cancerosas y así evitar efectos no deseados en las células normales.

Además, los inhibidores de PARP tienen potencial de utilidad en el tratamiento de otras enfermedades además del cáncer, incluidas las enfermedades cardiovasculares e inflamatorias, a través de posibles roles de las PARP en funciones distintas a la reparación del ADN, como participación en la regulación del traslado de la mitocondria al núcleo del factor de inducción de apoptosis (AIF, por sus siglas en inglés) o participación en la regulación de la expresión de proteínas implicadas en la inflamación. (Ver, por ejemplo, Pacher y Szabo - "Role of Poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) in Cardiovascular Diseases: The Therapeutic Potential of PARP Inhibitors, *Cardiovasc Drug Rev.* 2007; 25(3): 235-260). El suministro preferencial de inhibidores de PARP en estos tejidos enfermos también sería beneficioso.

COMPRENDIO

La presente descripción proporciona, entre otros, un compuesto de la fórmula (I):



- 5 o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en el que las variables constituyentes se definen en el presente documento.

En términos generales, la invención proporciona (1) compuestos que comprenden una molécula terapéutica (por ejemplo, R⁷) y un péptido sensible al pH (o dependiente del pH) (por ejemplo, R⁸) unidos entre sí, como mediante un enlazador
 10 que contenga disulfuro u otro enlazador que se escindiría en el entorno intracelular, (2) composiciones farmacéuticas que comprenden estos compuestos y un portador farmacéuticamente aceptable, (3) métodos para usar estos compuestos y composiciones en el tratamiento de enfermedades y afecciones que involucren células ácidas y/o hipóxicas en humanos y otros mamíferos, y (4) métodos para
 15 preparar los compuestos y las composiciones e intermedios útiles en dichos métodos.

La presente descripción proporciona además una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la descripción o una sal farmacéuticamente aceptable de este y al menos un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.

- 20 La presente descripción también proporciona métodos para tratar enfermedades o afecciones que involucren tejidos con enfermedades ácidas o hipóxicas mediante la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la descripción a un ser humano u otro mamífero que necesite dicho tratamiento. La descripción también proporciona métodos para reducir la toxicidad en la médula
 25 ósea asociada con la administración de una radiación ionizante o un agente citotóxico, que comprenden administrarle a un ser humano u otro mamífero una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la descripción en combinación con la radiación ionizante o el agente citotóxico.

- La presente descripción también proporciona usos de los compuestos descritos en
 30 la presente en la fabricación de un medicamento para uso en terapia. La presente descripción también proporciona los compuestos descritos en la presente para uso

en terapia.

La presente descripción también proporciona métodos para sintetizar los compuestos de la descripción e intermedios útiles en estos métodos.

5

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 muestra el retraso del crecimiento tumoral de R⁸H-15 y el ejemplo 12 en ratones BRCA^{-/-}.

La figura 2 muestra la supervivencia de R⁸H-15 y el ejemplo 12 en ratones BRCA^{-/-}

10 La figura 3 muestra el retraso del crecimiento tumoral de R⁸H-16 y el ejemplo 18 en ratones BRCA^{-/-}.

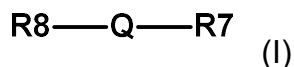
La figura 4 muestra el efecto de la administración intraperitoneal durante 9 días del ejemplo 18 y R⁸H-16 sobre la PARilación tumoral en un modelo de xenoinjerto de BRCA2^{-/-} DLD-1 murino.

15 La figura 5 muestra la PARilación en células de médula ósea después de la administración intravenosa del ejemplo 12 o la administración oral de R⁸H-15 en combinación con la administración oral de temozolomida (TMZ) a ratones atímicos. La figura 6 muestra la PARilación en células de médula ósea después de la administración intraperitoneal del ejemplo 18 o R⁸H-16 a ratones atímicos.

20

DESCRIPCIÓN DETALLADA

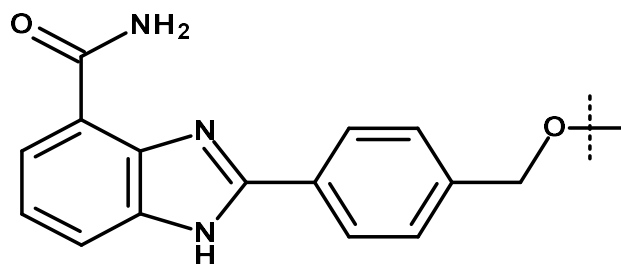
En este documento se proporciona un compuesto de la fórmula (I):



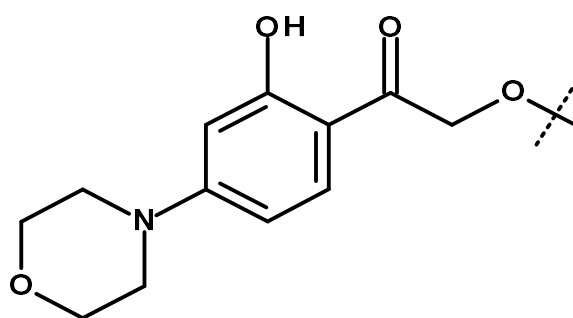
o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en el que:

25 R⁷ es un péptido;

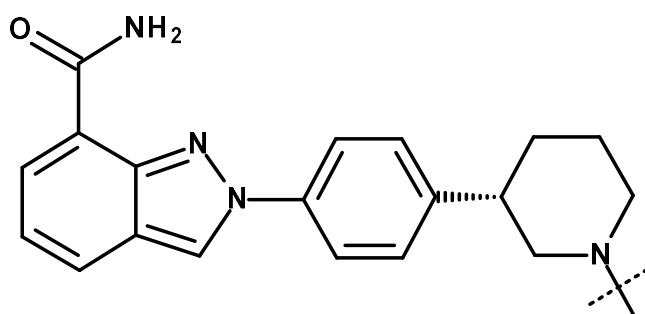
R⁸ se selecciona del grupo que consiste en:



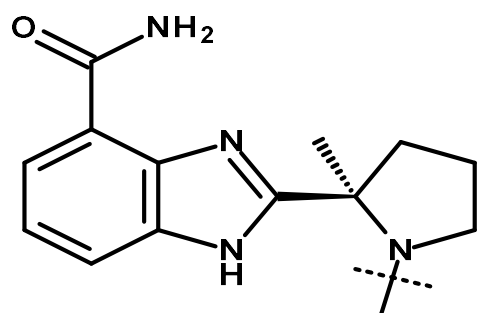
,



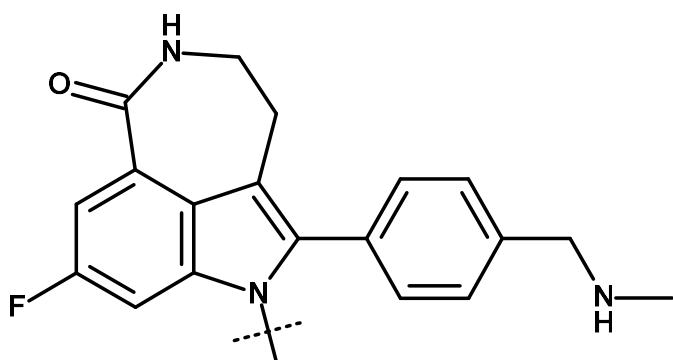
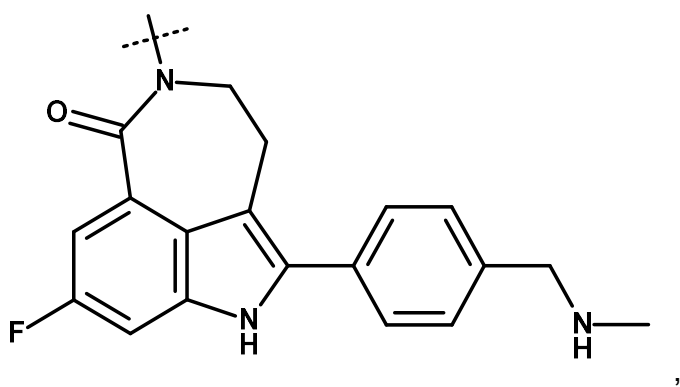
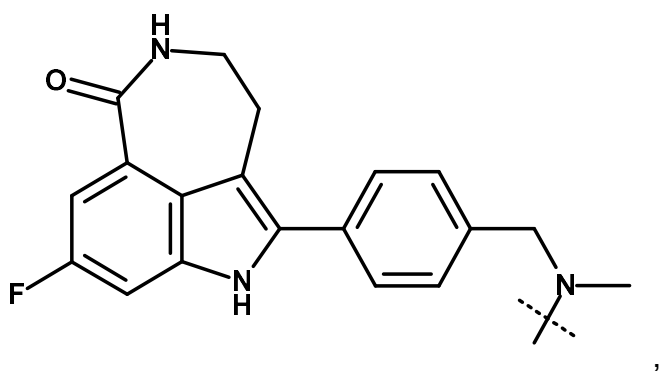
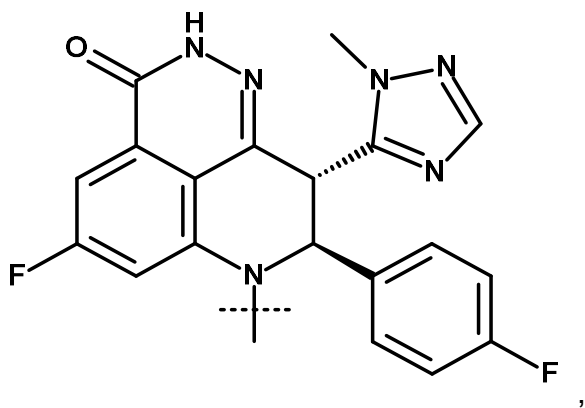
,

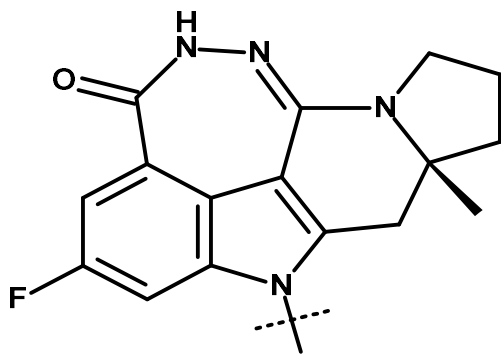


,

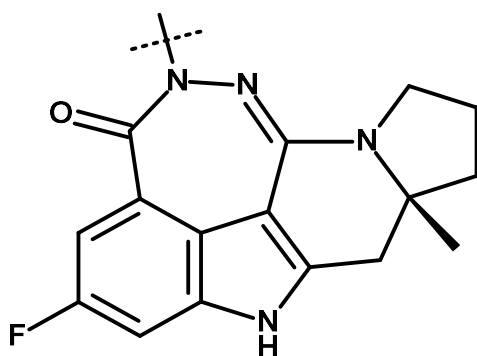


,

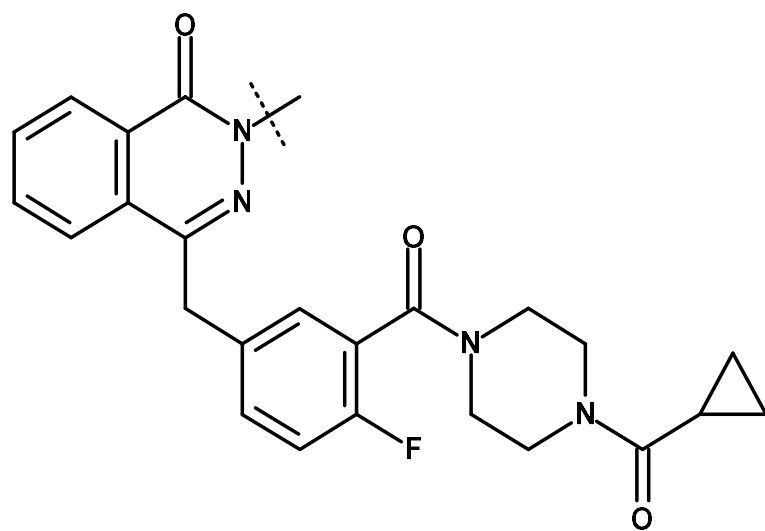




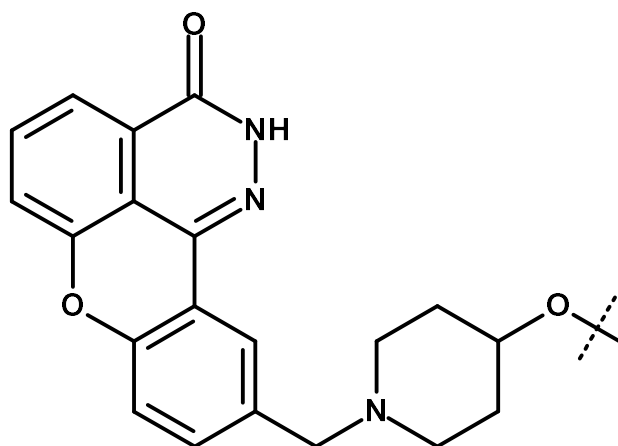
,



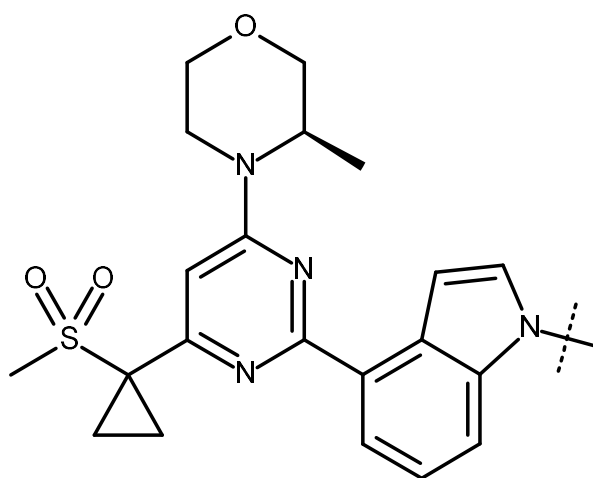
,



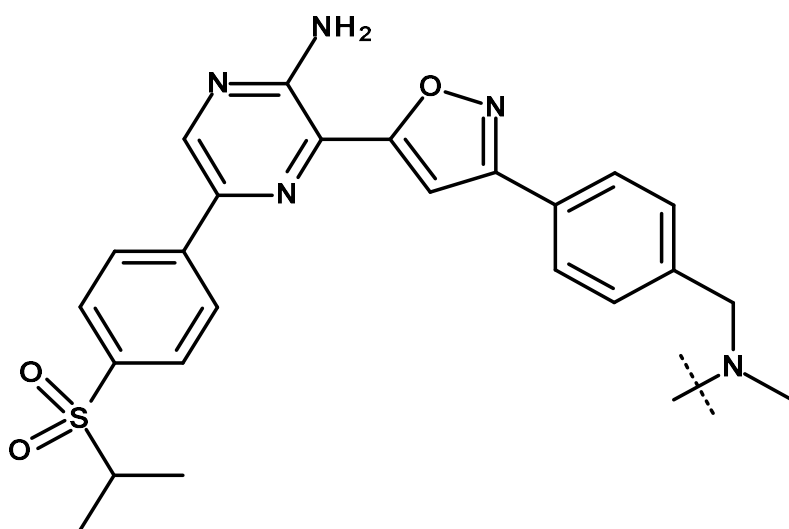
,



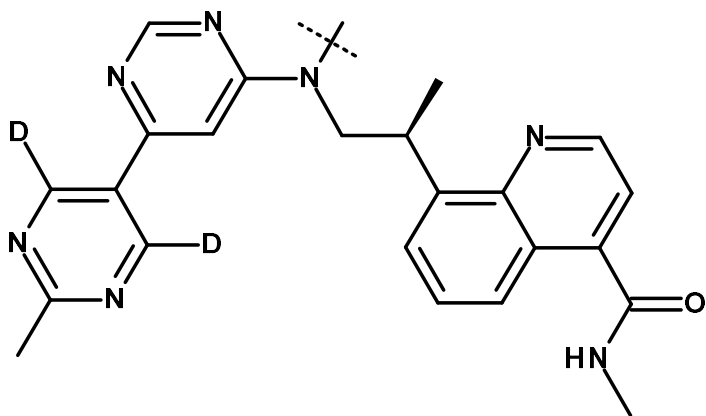
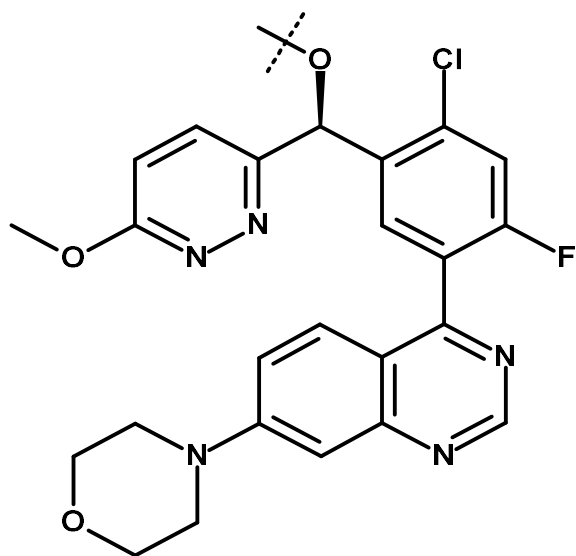
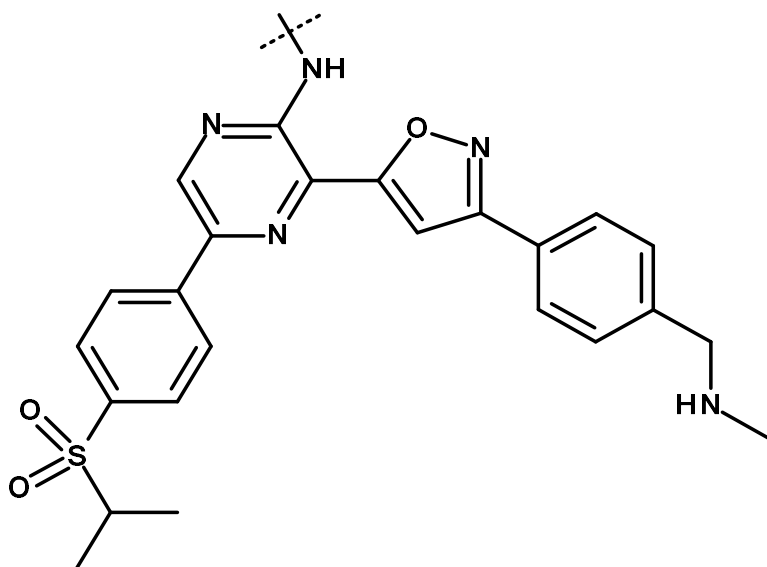
,

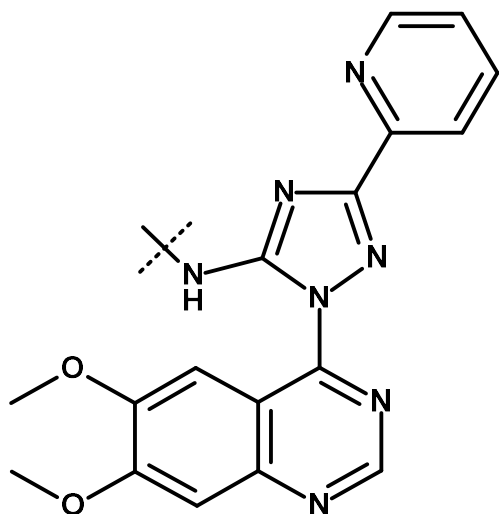


,

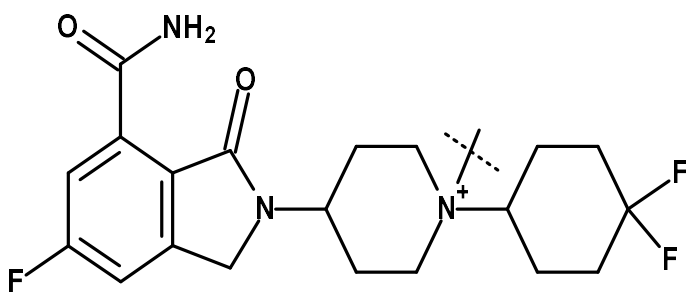


,

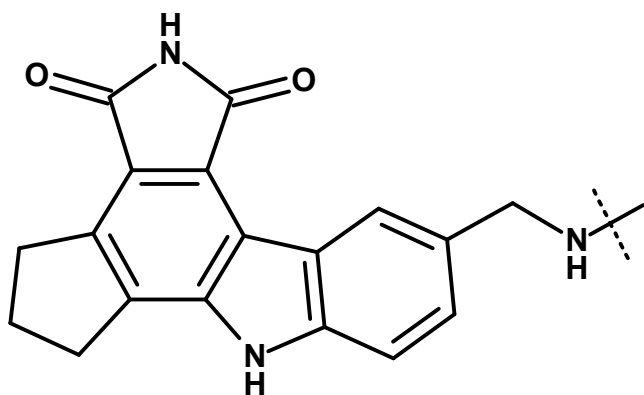




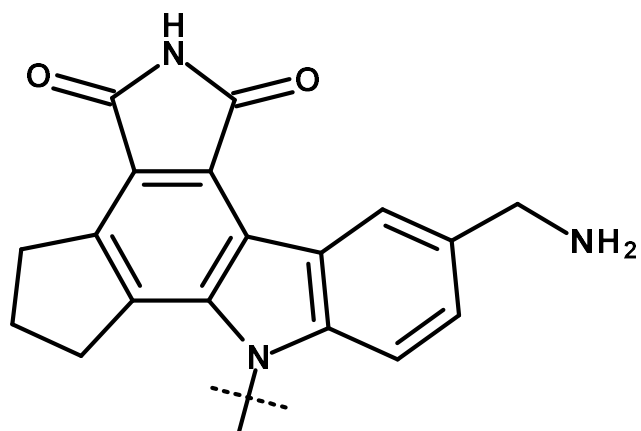
,



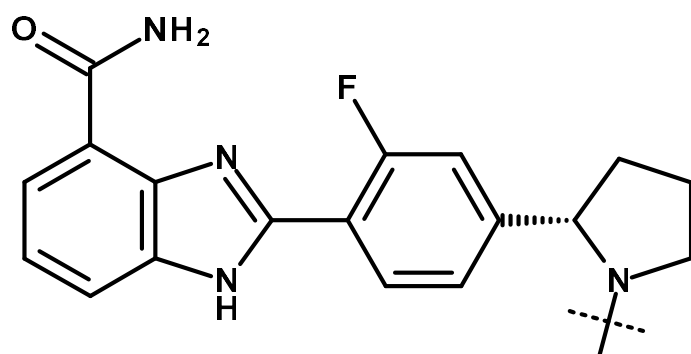
,



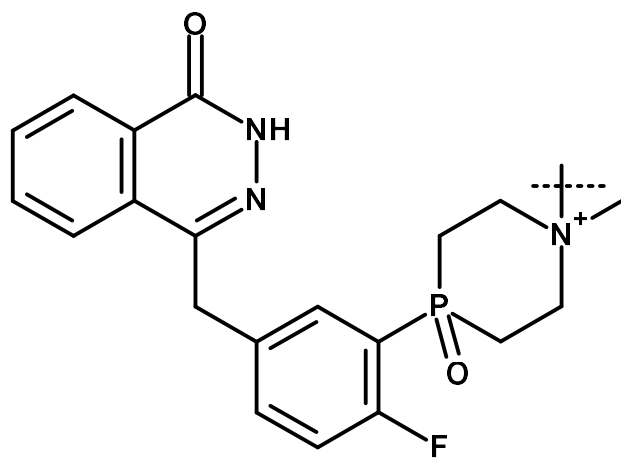
,



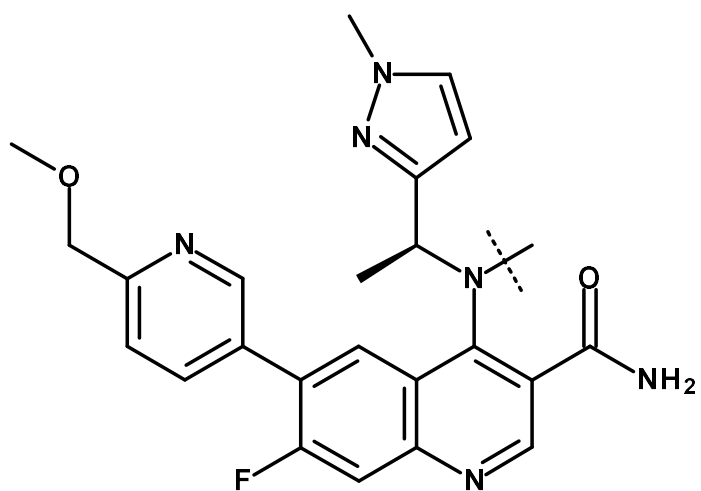
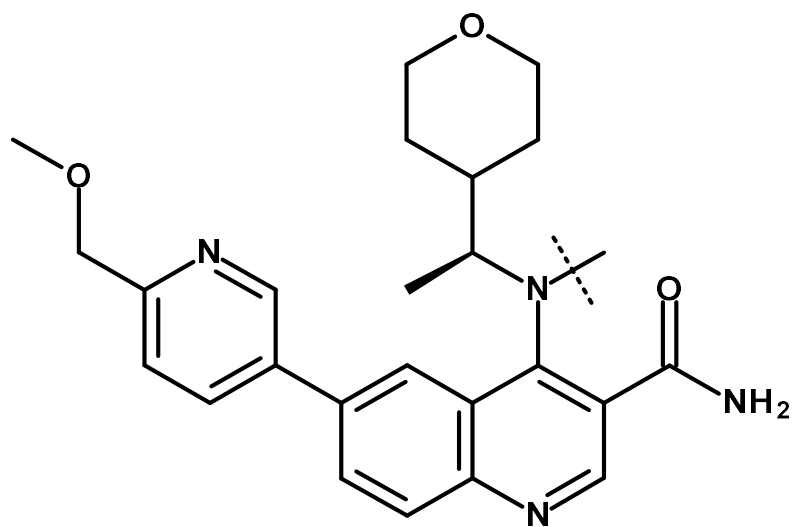
,



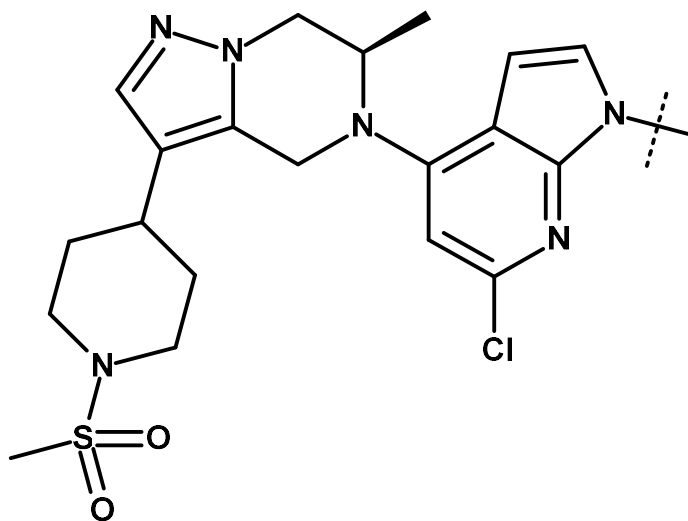
,



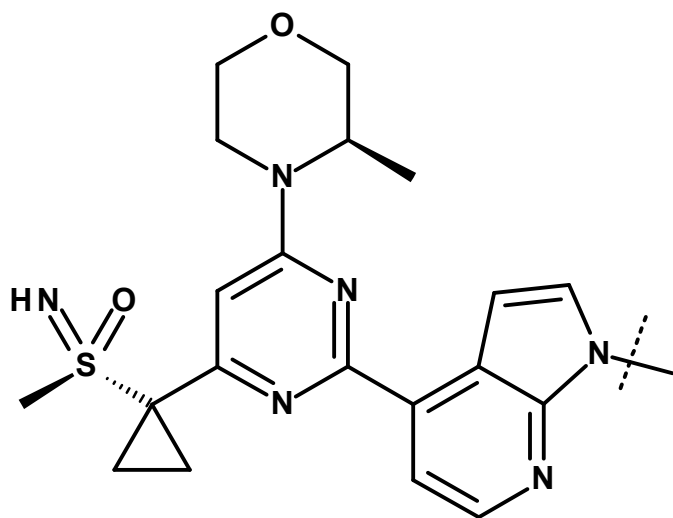
,



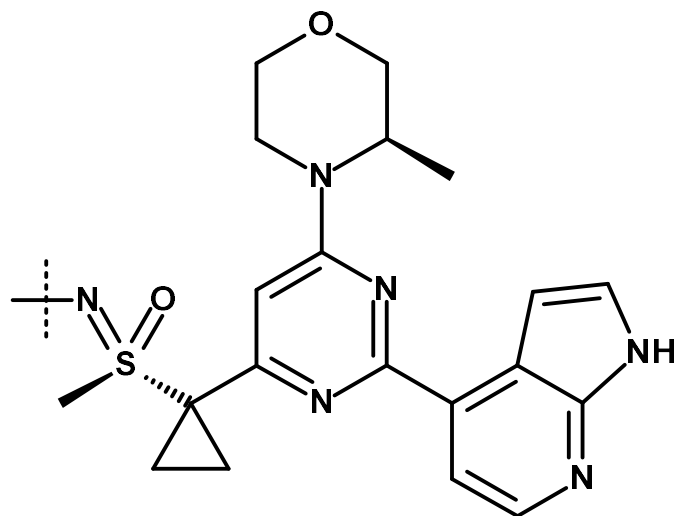




,

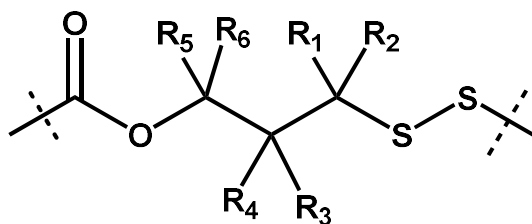
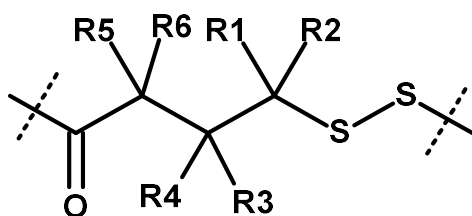
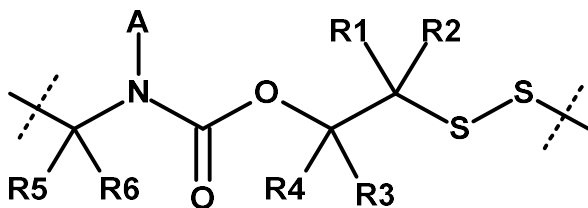
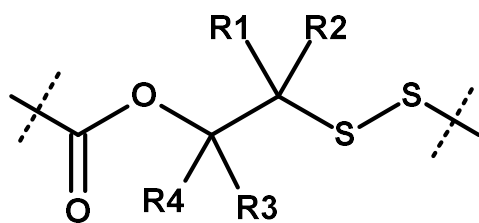


y

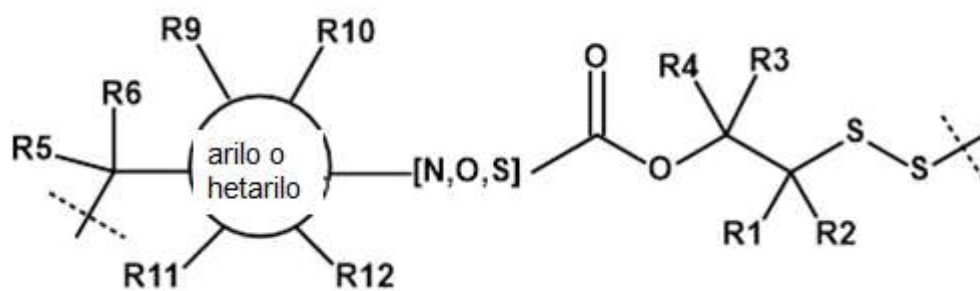


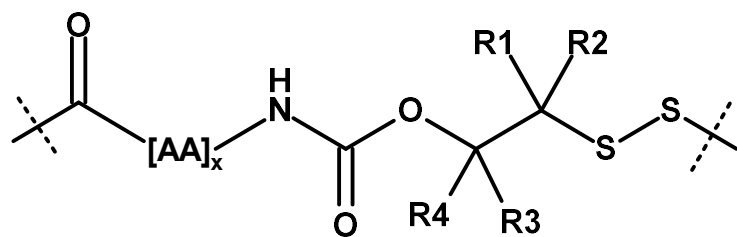
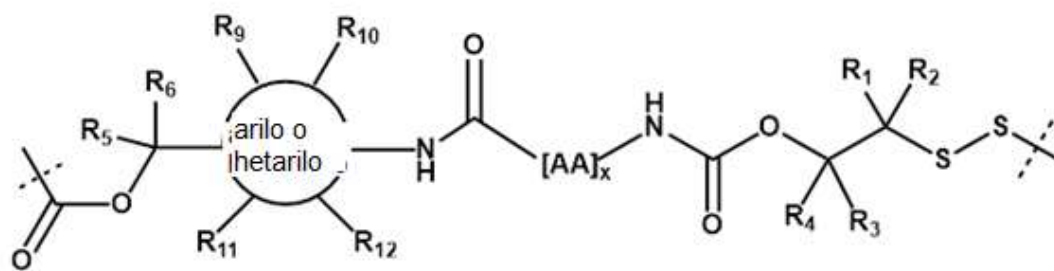
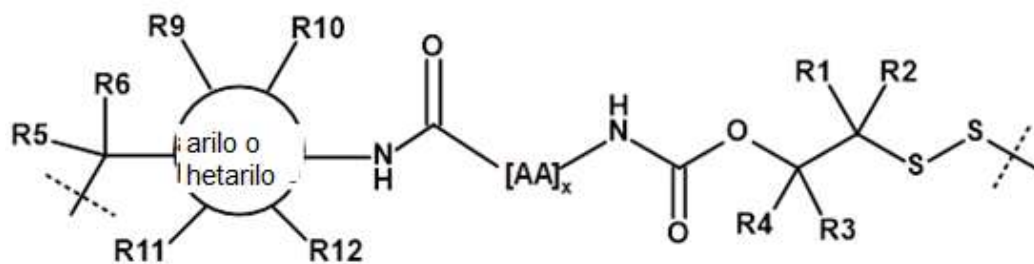
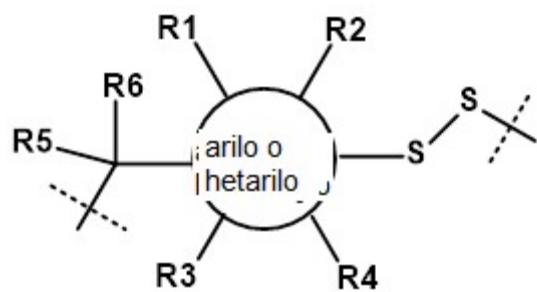
;

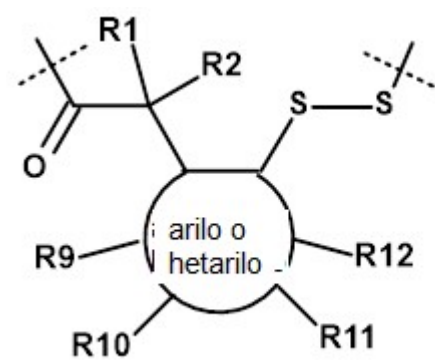
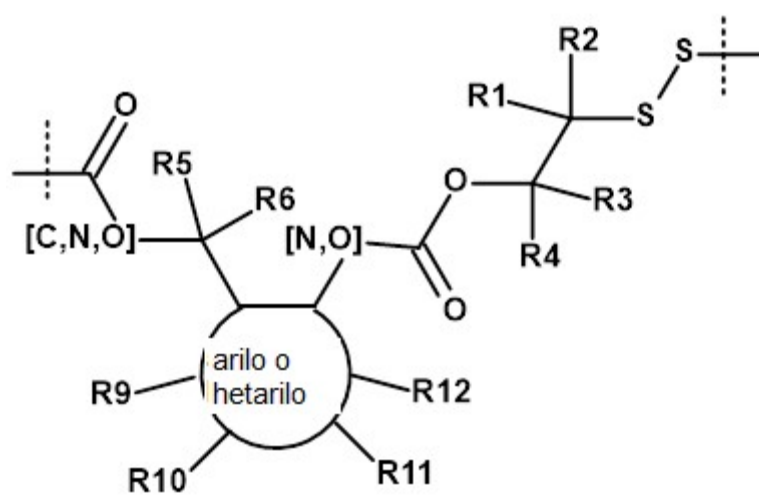
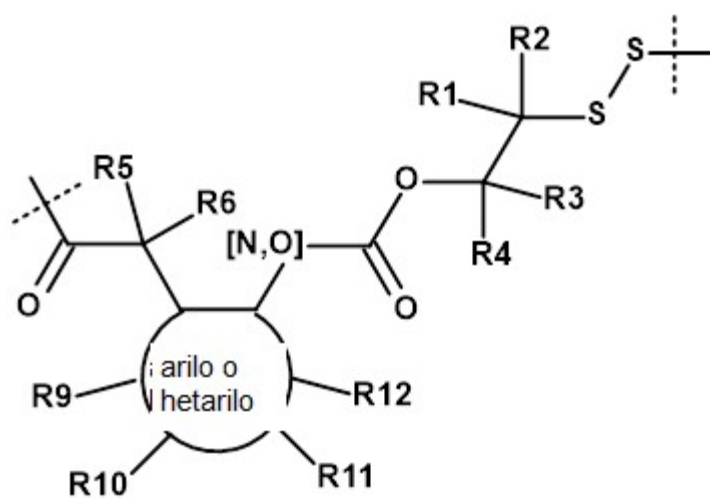
Q se selecciona del grupo que consiste en:

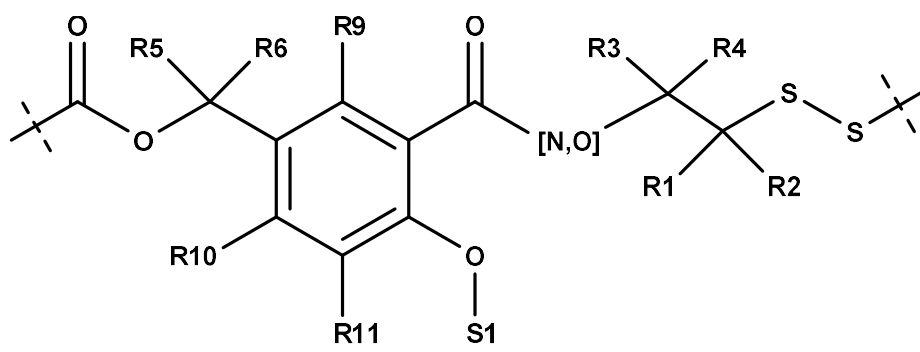
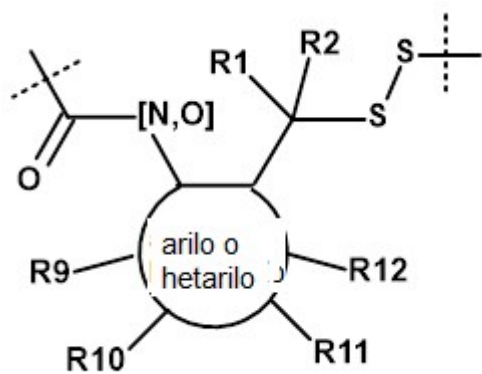
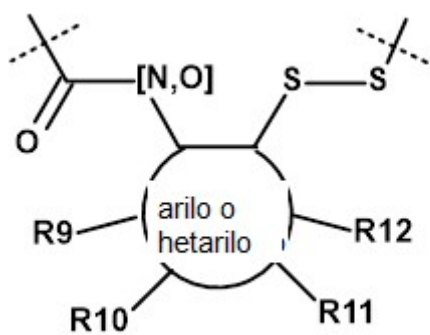
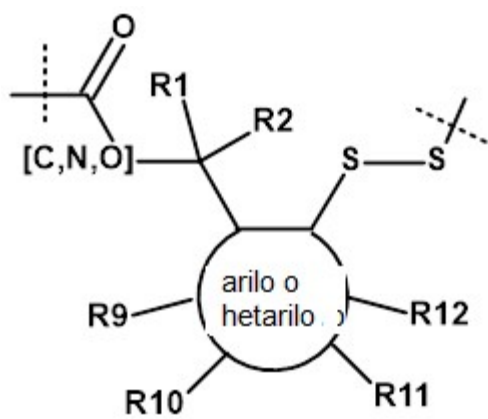


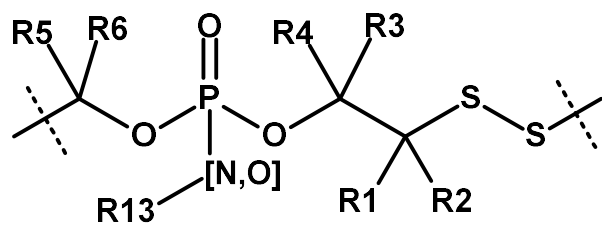
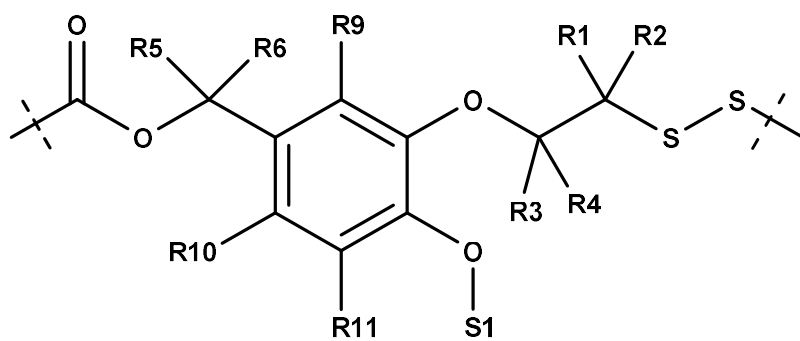
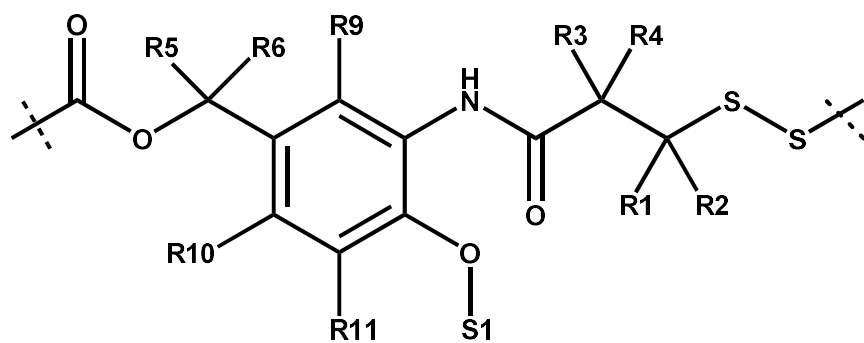
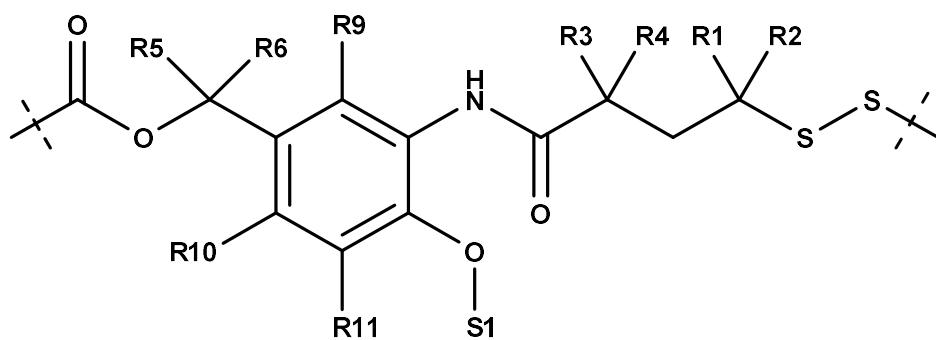
5



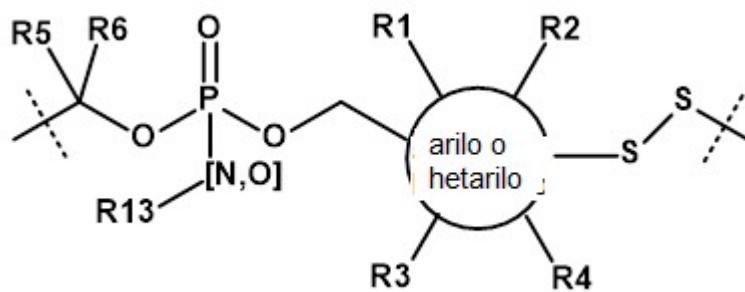


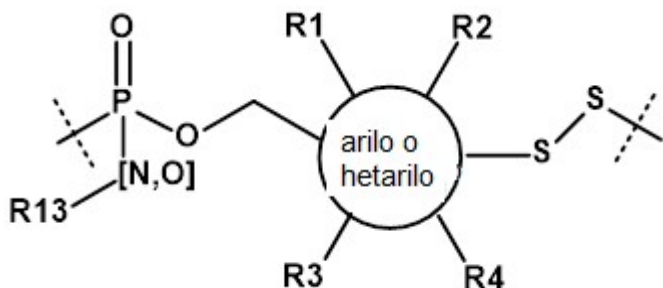
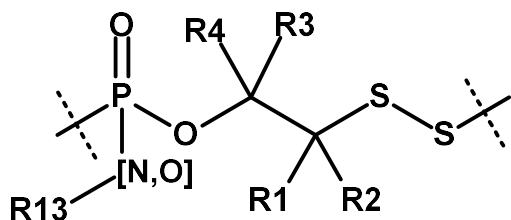
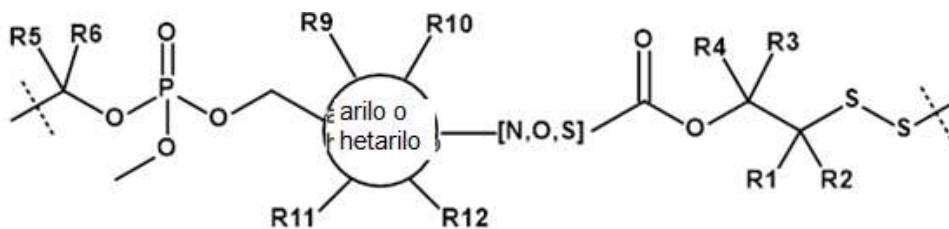




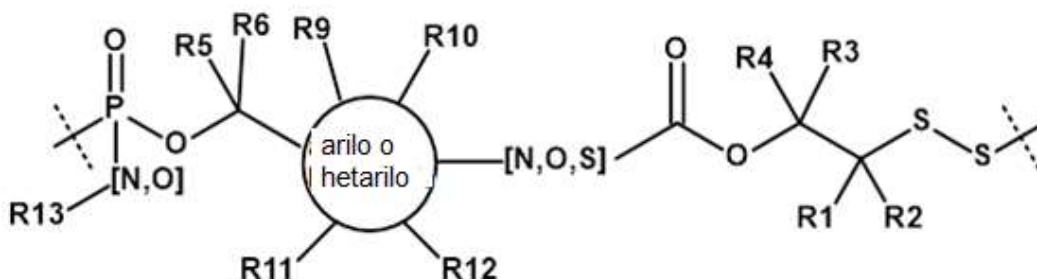


5





y



;

- 5 cada uno de R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁹, R¹⁰, R¹¹ y R¹² se selecciona independientemente de H, alquilo C₁₋₄, alquenilo C₁₋₄, arilo C₆₋₁₀, heteroarilo de 5-10 miembros, halo, CN, NO₂, OR^{a1}, SR^{a1}, C(O)R^{b1}, C(O)NR^{c1}R^{d1}, C(O)OR^{a1}, OC(O)R^{b1}, OC(O)NR^{c1}R^{d1}, NR^{c1}R^{d1}, NR^{c1}C(O)R^{b1}, NR^{c1}C(O)OR^{a1} y NR^{c1}C(O)NR^{c1}R^{d1}, donde cada uno de dichos alquilo C₁₋₄, alquenilo C₁₋₄, arilo C₆₋₁₀ y heteroarilo de 5-10 miembros se encuentra opcionalmente sustituido con 1, 2 o 3 sustituyentes independientemente seleccionados de halo, CN, NO₂, OR^{a1}, SR^{a1}, C(O)R^{b1}, C(O)NR^{c1}R^{d1}, C(O)OR^{a1}, OC(O)R^{b1}, OC(O)NR^{c1}R^{d1}, NR^{c1}R^{d1}, NR^{c1}C(O)R^{b1}, NR^{c1}C(O)OR^{a1} y NR^{c1}C(O)NR^{c1}R^{d1};
- 10

o R¹ y R² junto con el átomo de carbono al que están unidos forman un grupo cicloalquilo C₃₋₇ opcionalmente sustituido con 1, 2 o 3 sustituyentes independientemente seleccionados de halo, CN, NO₂, OR^{a1}, SR^{a1}, C(O)R^{b1}, C(O)NR^{c1}R^{d1}, C(O)OR^{a1}, OC(O)R^{b1}, OC(O)NR^{c1}R^{d1}, NR^{c1}R^{d1}, NR^{c1}C(O)R^{b1},
 5 NR^{c1}C(O)OR^{a1} y NR^{c1}C(O)NR^{c1}R^{d1};

o R¹ y R³ junto con el átomo de carbono al que están unidos forman un grupo cicloalquilo C₃₋₇ opcionalmente sustituido con 1, 2 o 3 sustituyentes independientemente seleccionados de halo, CN, NO₂, OR^{a1}, SR^{a1}, C(O)R^{b1}, C(O)NR^{c1}R^{d1}, C(O)OR^{a1}, OC(O)R^{b1}, OC(O)NR^{c1}R^{d1}, NR^{c1}R^{d1}, NR^{c1}C(O)R^{b1},
 10 NR^{c1}C(O)OR^{a1} y NR^{c1}C(O)NR^{c1}R^{d1};

o R³ y R⁴ junto con el átomo de carbono al que están unidos forman un grupo cicloalquilo C₃₋₇ opcionalmente sustituido con 1, 2 o 3 sustituyentes independientemente seleccionados de halo, CN, NO₂, OR^{a1}, SR^{a1}, C(O)R^{b1}, C(O)NR^{c1}R^{d1}, C(O)OR^{a1}, OC(O)R^{b1}, OC(O)NR^{c1}R^{d1}, NR^{c1}R^{d1}, NR^{c1}C(O)R^{b1},
 15 NR^{c1}C(O)OR^{a1} y NR^{c1}C(O)NR^{c1}R^{d1};

o R⁵ y R⁶ junto con el átomo de carbono al que están unidos forman un grupo cicloalquilo C₃₋₇ opcionalmente sustituido con 1, 2 o 3 sustituyentes independientemente seleccionados de halo, CN, NO₂, OR^{a1}, SR^{a1}, C(O)R^{b1}, C(O)NR^{c1}R^{d1}, C(O)OR^{a1}, OC(O)R^{b1}, OC(O)NR^{c1}R^{d1}, NR^{c1}R^{d1}, NR^{c1}C(O)R^{b1},
 20 NR^{c1}C(O)OR^{a1} y NR^{c1}C(O)NR^{c1}R^{d1}

R¹³ es H o alquilo C₁₋₆;

A es H o alquilo C₁₋₄;



es arilo C₆₋₁₀ o heteroarilo de 5-10 miembros; en donde el heteroarilo de 5-10 miembros tiene al menos un átomo de carbono formador de anillo y 1, 2, 3
 25 o 4 heteroátomos formadores de anillo seleccionados independientemente de N, O y S;

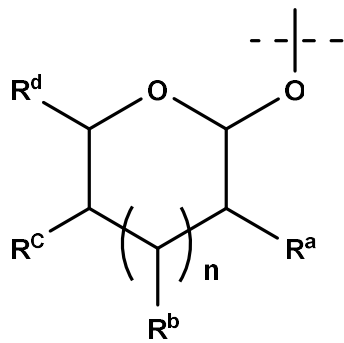
[N, O, S] es NH, O o S;

[N, O] es NH u O;

[C, N, O] es CR^XR^Y, NH u O;

cada R^X y R^Y se seleccionan independientemente de H y alquilo C_{1-4} ;

$[AA]_x$ es un péptido que puede escindirse mediante acción enzimática;



S1 es ;

cada R^a , R^b , R^c y R^d se selecciona independientemente de H, alquilo C_{1-4} , OR^{a2} , CO_2R^{a2} y $OC(=O)R^{a2}$, donde dicho alquilo C_{1-4} se encuentra opcionalmente sustituido con OR^{a2} , CO_2R^{a2} y $OC(=O)R^{a2}$;

cada R^{a1} , R^{b1} , R^{c1} y R^{d1} se selecciona independientemente de H, alquilo C_{1-6} , alquenilo C_{2-6} , alquinilo C_{2-6} , haloalquilo C_{1-6} , OH, CN, NO_2 y CO_2CH_3 ; donde cada uno de dichos alquilo C_{1-6} y alquenilo C_{2-6} se encuentra opcionalmente sustituido con OH, CN, NO_2 o CO_2CH_3 ;

R^{a2} es H o alquilo C_{1-4} ; y

n es 0 o 1.

En algunas modalidades, el lado izquierdo de Q se une a R^8 y el lado derecho de Q se une a R^7 .

En algunas modalidades, un átomo de azufre del resto disulfuro de Q es parte de un residuo de cisteína de R^7 .

Los péptidos adecuados para su uso como R^7 se describen, por ejemplo, en las patentes de los Estados Unidos 8.076.451 y 9.289.508 (que se incorporan en la presente mediante esta referencia en su totalidad), aunque podrían usarse otros péptidos capaces de tal inserción selectiva. Otros péptidos adecuados se describen, por ejemplo, en Weerakkody, *et ál.*, PNAS 110 (15), 5834-5839 (9 de abril de 2013), que también se incorpora a la presente mediante esta referencia en su totalidad. Sin

adherir a una teoría, se cree que el péptido R^7 se pliega de forma inversa e inserta a través de las membranas celulares en respuesta a los cambios de pH. El péptido

R^7 puede dirigirse al tejido ácido y transferir selectivamente moléculas polares impermeables para las células a través de las membranas celulares en respuesta

al pH extracelular bajo. En algunas modalidades, R^7 es un péptido capaz de suministrar selectivamente R_8Q^- a través de una membrana celular con un manto ácido o hipóxico que tenga un pH inferior a alrededor de 6,0. En algunas modalidades, R^7 es un péptido capaz de suministrar selectivamente R_8Q^- a través de una membrana celular con un manto ácido o hipóxico que tenga un pH inferior a alrededor de 6,5. En algunas modalidades, R^7 es un péptido capaz de suministrar selectivamente R_8Q^- a través de una membrana celular con un manto ácido o hipóxico que tenga un pH inferior a alrededor de 5,5. En algunas modalidades, R^7 es un péptido capaz de suministrar selectivamente R_8Q^- a través de una membrana celular con un manto ácido o hipóxico que tenga un pH de entre alrededor de 5,0 y alrededor de 6,0.

En algunas modalidades, R^7 está unido a Q a través de un residuo de cisteína de R^7 . En algunas modalidades, el átomo de azufre del residuo de cisteína puede formar parte del enlace disulfuro del enlazador que contenga el enlace disulfuro.

En algunas modalidades, R^7 es un péptido que comprende al menos una de las siguientes secuencias:

ADDQNPWRAYLDLLFPTDTLLLDLLWCG (SEQ ID NO. 1; Pv1),

AEQNPIYWARYADWLFTTPLLILLDLALLVDADECG (SEQ ID NO. 2; Pv2), y

ADDQNPWRAYLDLLFPTDTLLLDLLWDADECG (SEQ ID NO. 3; Pv3);

Ac-AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLILLDLALLVDADEGKCG (SEQ ID NO. 4; Pv4);
y

AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLILLDLALLVDADEGTC (SEQ ID NO. 5; Pv5);

donde R^7 está unido a Q a través de un residuo de cisteína de R^7 .

En algunas modalidades, R^7 es un péptido que comprende al menos una de las siguientes secuencias:

ADDQNPWRAYLDLLFPTDTLLLDLLWCG (SEQ ID NO. 1; Pv1),

AEQNPIYWARYADWLFTTPLLILLDLALLVDADECG (SEQ ID NO. 2; Pv2), y

ADDQNPWRAYLDLLFPTDTLLLDLLWDADECG (SEQ ID NO. 3; Pv3),

donde R^7 está unido a Q a través de un residuo de cisteína de R^7 .

En algunas modalidades, R^7 es un péptido que comprende la secuencia ADDQNPWRAYLDLLFPTDTLLLDLLWCG (SEQ ID NO. 1; Pv1).

En algunas modalidades, R⁷ es un péptido que comprende la secuencia AEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADECG (SEQ ID NO. 2; Pv2).

En algunas modalidades, R⁷ es un péptido que comprende la secuencia ADDQNPWRAYLDLLFPTDTLLLDLLWDADECG (SEQ ID NO. 3; Pv3).

5 En algunas modalidades, R⁷ es un péptido que comprende la secuencia Ac-AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGKCG (SEQ ID NO. 4; Pv4).

En algunas modalidades, R⁷ es un péptido que comprende la secuencia AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTC (SEQ ID NO. 5; Pv5)

10 En algunas modalidades, R⁷ es un péptido que consiste en la secuencia ADDQNPWRAYLDLLFPTDTLLLDLLWCG (SEQ ID NO. 1; Pv1).

En algunas modalidades, R⁷ es un péptido que consiste en la secuencia AEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADECG (SEQ ID NO. 2; Pv2).

En algunas modalidades, R⁷ es un péptido que consiste en la secuencia ADDQNPWRAYLDLLFPTDTLLLDLLWDADECG (SEQ ID NO. 3; Pv3).

15 En algunas modalidades, R⁷ es un péptido que consiste en la secuencia Ac-AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGKCG (SEQ ID NO. 4; Pv4).

En algunas modalidades, R⁷ es un péptido que consiste en la secuencia AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTC (SEQ ID NO. 5; Pv5)

20 En algunas modalidades, R⁷ es un péptido que comprende al menos una secuencia seleccionada de la SEQ ID NO: 6 a la SEQ ID NO: 311, como se muestra en la tabla 1.

En algunas modalidades, R⁷ es un péptido que consiste en al menos una secuencia seleccionada de la SEQ ID NO: 6 a la SEQ ID NO: 311, como se muestra en la tabla 1.

25 Tabla 1. Secuencias de R⁷ adicionales

SEQ ID NO.	Secuencia
6	AAEQNPIYWWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCG
7	AEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGT

8	GGEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGT
9	AEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGT
10	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCTG
11	GGEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCTG
12	ACEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTG
13	ACEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGT
14	AKEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGT
15	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCTG
16	AKEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADECT
17	ACEQNPIYWARYANWLFTTPLLLLNLALLVDADEGTG
18	ACEQNPIYWARYAKWLFTTPLLLLKLALLVDADEGTG
19	GGEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVNANQGT
20	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLALALLVDADEGT
21	AAEQNPIYWARYAAWLFTTPLLLLDLALLVDADEGT
22	AAEQNPIYWARYADWLFTTALLLLDLALLVDADEGT
23	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLELALLVDADEGT
24	AAEQNPIYWARYAEWLFTTPLLLLDLALLVDADEGT
25	AAEQNPIYWARYADWLFTDLPLLLLDLLALLVDADEGT
26	GEQNPIYWAQYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCTG
27	GGEQNPIYWARYADWLFTTPLLLDLLALLVDADEGTCTG
28	GGEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLDALLVDADEGTCTG
29	GGEQNPIYWARYDAWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCTG
30	GGEQNPIYWARYAWDLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCTG
31	AAEQNPIYWARYADWLFTTGLLLLDLALLVDADEGT
32	DDDEDNPIYWARYADWLFTTPLLLLHGALLVDADECT
33	DDDEDNPIYWARYAHWLFTTPLLLLHGALLVDADEGCT
34	DDDEDNPIYWARYAHWLFTTPLLLLHGALLVNADECT
35	DDDEDNPIYWARYAHWLFTTPLLLLHGALLVNANECT
36	AEQNPIYWARYADFLFTTPLLLLDLALLVDADET
37	AEQNPIYFARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGT

38	AEQNPIYFARYADFLFTTPLLLLLDLALLWDADET
39	AKEDQNPYWARYADWLFTTPLLLLLDLALLVDG
40	ACEDQNPYWARYADWLFTTPLLLLLDLALLVDG
41	AEDQNPYWARYADWLFTTPLLLLLDLALLVDCG
42	AEDQNPYWARYADWLFTTPLLLLLLELALLVECG
43	AKEDQNPYWARYADLFTPLTLLDLLALWDG
44	ACEDQNPYWARYADLFTPLTLLDLLALWDG
45	ACDDQNPWARYLDLLFPTDTLLLDLLW
46	TEDADVLLALDLLLLPTTFLWD
47	AEQNPIYWARYADWLFTTPL
48	AEQNPIYWARYADWLFTTPCL
49	ACEQNPIYWARYADWLFTTPL
50	AEQNPIYFARYADWLFTTPL
51	KEDQNPWARYADLLFPTTLAW
52	ACEDQNPWARYADLLFPTTLAW
53	ACEDQNPWARYADWLFTTLLLLD
54	ACEEQNPWARYAELLFPTTLAW
55	ACEEQNPWARYAEWLFPTTLLLLLE
56	ACEEQNPWARYLEWLFPTTETLLLLLE
57	GGEQNPIY WARYADWLFTTPLLLLLDLALLV DADEGT
58	ACEQNPIY WARYADWLFTTPLLLLLDLALLV
59	WARYADWLFTTPLLLLLDLALLV DADEGTG
60	WARYADWLFTTPLLLLLDLALLV DADEGCT
61	GGEQNPIY WARYADWLFTTPLLLLLDLALLV DADEGTG
62	ACEQNPIY WARYADWLFTTPLLLLLDLALLV DADEGT
63	AKEQNPIY WARYADWLFTTPLLLLLDLALLV DADEGT
64	AKEQNPIY WARYADWLFTTPLLLLLDLALLV DADECT
65	AAEQNPIY WARYADWLFTTALLLLDLALLV DADEGT
66	ACAEQNPIY WARYADWLFTTGLLLLDLALLV DADEGT
67	AEQNPIY WARYADFLFTTALLLLDLALLV DADE_T

68	AEQNPIY FARYADWLFTTPLLLLLDLALLV DADEGT
69	AEQNPIY FARYADFLFTTPLLLLLDLALLW DADE_T
70	AKEDQNP_Y WARYADWLFTTPLLLLLDLALLV DG_____
71	ACEDQNP_Y WARYADWLFTTPLLLLLDLALLV DG_____
72	AEDQNP_Y WARYADWLFTTPLLLLLDLALLV DG_____
73	AEDQNP_Y WARYADWLFTTPLLLLLLELALLV ECG_____
74	AKEDQNP_Y WRAYAD_LFT_PLTLLDLLALW DG_____
75	ACEDQNP_Y WRAYAD_LFT_PLTLLDLLALW DG_____
76	AKEDQNDP_Y WARYADWLFTTPLLLLLDLALLV G_____
77	TEDADVLLALDLLLLPTTFLWDAYRAWYPNQECA
78	GGEQNPIY WARYADWLFTTPLLLLLDLALLV DADEGT
79	AEQNPIY WARYADWLFTTPL
80	AEQNPIY WARYADWLFTTPCL
81	ACEQNPIY WARYADWLFTTPL
82	ACEQNPIY FARYADWLFTTPL
83	ACDDQNP WRAYLDLLFPTDTLLLDLLW
84	ACEEQNP WRAYLELLFPTETLLLELLW
85	ACDDQNP WARYLDWLFPTDTLLLDL
86	CDNNNP WRAYLDLLFPTDTLLLDW
87	ACEEQNP WARYLEWLFPTETLLLEL
88	ACEDQNP WARYADWLFPTTLLLLD
89	ACEEQNP WARYAEWLFPTTLLLLE
90	ACEDQNP WARYADLLFPTTLAW
91	ACEDQNP WARYAELLFPTTLW
92	KEDQNP WARYADLLFPTTLW
93	DDDEDNP IWARYAHWLFTTPLLLLLHGALLVDADECT
94	DDDEDNPIYWARYAHWLFTTPLLLLLDGALLVDADECT
95	DDDEDNPIYWARYAHWLFTTPLLLLLHGALLVNADECT
96	DDDEDNPIYWARYAHWLFTTPLLLLLHGALLVNANECT
97	DDDEDNPIYWARYADWLFTTPLLLLLHGALLVDADECT

98	ACEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGIG
99	ACEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADET
100	ACEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGT
101	GGEQNPIYWARYADWLFTTPLLLDLLALLVDADEGTCTG
102	GGEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLDALLVDADEGTCTG
103	GGEQNPIYWARYAWDLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCTG
104	AAEQNPIYWARYAEWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCTG
105	AAEQNPIYWARYAEWLFTTPLLLLLELALLVDADEGTCTG
106	GGEQNPIYWARYDAWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCTG
107	GGEQNPIYWAQYDAWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCTG
108	GGEQNPIYWAQDYAWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCTG
109	AAEQNPIYWARYAAWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCTG
110	ACEQNPIYWARYANWLFTTPLLLLNLALLVDADEGTG
111	DDDEDNPIYWARYAHWLFTTPLLLLHGALLVNANECT
112	DDDEDNPIYWARYAHWLFTTPLLLLHGALLVNADECT
113	DDDEDNPIYWARYADWLFTTPLLLLHGALLVDADECT
114	DDDEDNPIYWARYAHWLFTTPLLLLHGALLVDADECT
115	DDDEDNPIYWARYAHWLFTTPLLLLDGALLVDADECT
116	GGEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVNANQGT
117	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLELALLVDADEGTCTG
118	AAEQNPIYWARYAEWLFTTPLLLLLELALLVDADEGTCTG
119	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLELALLVDADEGTCG
120	GGEQNPIYWAQYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCTG
121	GGEQNPIYWAQYDAWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCTG
122	GGEQNPIYWAQDYAWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCTG
123	GGEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDALLVNANQGT
124	DDDEDNPIYWARYAHWLFTTPLLLLHGALLVNADECT
125	DDDEDNPIYWARYAHWLFTTPLLLLHGALLVNANECT
126	ACEQNPIYWARYAKWLFTTPLLLLKLALLVDADEGTG
127	GGEQNPIYWAQDYAWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCTG

128	GGEQNPIYWAQYDAWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGTCTG
129	GGEQNPIYWAQYADWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGTCTG
130	AAEQNPIYWARYAAWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGTCTG
131	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGT
132	GGEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGTCTG
133	GGEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGTCTG
134	AAEQNPIYWARYADWLFTTGLLLLDLALLVDADEGT
135	AEQNPIYWARYAAWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGTCTG
136	GGEQNPIYWAQYDAWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGTCTG
137	GGEQNPIYWAQDYAWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGTCTG
138	GGEQNPIYWARYDAWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGTCTG
139	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLALALLVDADEGTCTG
140	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGTCTG EGTK(rodamina))C(faloidina)G
141	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLLELALLVDADEGTCTG
142	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGTCTG
143	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGTCT(faloidina)G
144	GGEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGTCTG
145	ACEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLDLALLVDADET
146	ACEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGTG
147	ACEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGT
148	GGEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLDLALLVNANQGT
149	DDDEDNPIYWARYAHWLFTTPLLLLLHGALLVNADECT
150	DDDEDNPIYWARYAHWLFTTPLLLLLHGALLVNANECT
151	GGEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGTCTG
152	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGTCT(faloidina)G
153	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLLELALLVDADEGTCTG
154	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGTCTG
155	DDDEDNPIYWARYAHWLFTTPLLLLLBGALLVNADECT
156	DDDEDNPIYWARYAHWLFTTPLLLLLDGALLVNADECT

157	DDDEDNPIYWARYAHWLFTTPLLLLLBGALLVNADECT
158	DDDEDNPIYWARYAHWLFTTPLLLLLBGALLVNANECT
159	DDDEDNPIYWARYADWLFTTPLLLLLIBGALLVDADECT
160	DDDEDNPIYWARYADWTFTTPLLLLLHGALLVDADECT
161	DDDEDNPIYWARYAHWLFTTPLLLLLDGALLVDADECT
162	DDDEDNPIYWARYAHWLFTTPLLLLLHGALLVDADECT
163	DDDEDNPIYWARYAHWLFTTPLLLLLHGALLVNADECT
164	DDDEDNPIYWARYHWLFTTPLLLLLHGALLVNANECT
165	DDDEDNPIYWARYAHWLFTTPLLLLLHGALLVNANECT
166	DDDEDNPIYWARYAHWLFTTPLLLLLHGALLVNADECT
167	DDDEDNPIYWARYADWLFTTPLLLLLHGALLVDADECT
168	DDDEDNPIYWARYAHWLFTTPLLLLLHGALLVDADECT
169	DDDEDNPIYWARYAHWLFTTPLLLLLDGALLVDADECT
170	GGEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLDLALLVNANQGT
171	DDDEDNPIYWARYAHWLFTTPLLLLLHGALLVNADECT
172	DDDEDNPIYWARYADWLFTTPLLLLLHGALLVDADECT
173	DDDEDNPIYWARYAHWLFTTPLLLLLHGALLVDADECT
174	DDDEDNPIYWARYAHMLFTTPLLLLLDGALLVDADECT
175	DDDEDNPIYWARYAHWLFTTPLLLLLHGALLVNANECT
176	DDDEDNPIYWARYAHWLFTTPLLLLLDGALLVDADECT
177	DDDEDNPIYWARYADWLFTTPLLLLLHGALLVDADECT
178	DDDEDNPIYWARYAHWLFTTPLLLLLHGALLVDADECT
179	DDDEDNPIYWARYAHWLFTTPLLLLLHGALLVNADECT
180	DDDEDNPIYWARYAHWLFTTPLLLLLHGALLVNANECT
181	AAEQNPIYWARYADWLFTTGLLLLDLALLVDADEGT
182	GGEQNPIYWARYAWDLFTTPLLLLLDLALLVDADEGTCTG
183	GGEQNPIYWARYDAWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGTCTG
184	GGEQNPIYWAQYDAWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGTCTG
185	GGEQNPIYWAQDYAWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGTCTG
186	AAEQNPIYWARYAAWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGTCTG

187	GGEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDALLVDADEGTCTG
188	GGEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLLALLVDADEGTCTG
189	GGEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLLALLVDADEGTCTG
190	GGEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLDALLVDADEGTCTG
191	GGEQNPIYWAQYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCTG
192	GGEQNPIYWAQYDAWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCTG
193	GGEQNPIYWAQDYAWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCTG
194	GGEQNPIYWAQYDAWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCTG
195	GGEQNPIYWAQDYAWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCTG
196	GGEQNPIYWAQYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCTG
197	AAEQNPIYWARYAAWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCTG
198	GGEQNPIYWAQDYAWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCTG
199	GGEQNPIYWAQYDAWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCTG
200	GGEQNPIYWAQYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCTG
201	AAEQNPIYWARYAAWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCTG
202	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLELALLVDADEGTCCTG
203	EGTK(ridamina)C(faloidina)G
204	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCCTG
205	ACEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCTG
206	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCT(faloidina)G
207	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCCTG
208	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLELALLVDADEGTCCTG
209	AAEQNPIYWARYADWLFTDLPLLLLDLLALLVDADEGTCTG
210	AAEQNPIYWARYAAWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCTG
211	GGEQNPIYWAQYDAWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCTG
212	GGEQNPIYWAQDYAWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCTG
213	GGEQNPIYWARYDAWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCTG
214	AAEQNPIYWARYAEWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCTG
215	AAEQNPIYWARYAEWLFTTPLLLLLELALLVDADEGTCTG
216	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLALALLVDADEGTCTG

217	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLLELALLVDADEGTCG
218	AAEQNPIYWARYAEWLFTTPLLLLLLELALLVDADEGTCG
219	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLLELALLVDADEGTKCG
220	ACEQNPIYWARYAKWLFTTPLLLLLKLALLVDADEGTG
221	ACEQNPIYWARYANWLFTTPLLLLLNLALLVDADEGTG
222	AAEQNPIYWARYADWLFTTALLLLDLALLVDADEGT
223	AEQNPIYFARYADLLFPTTLAW
224	AEQNPIYWARYADLLFPTTLAF
225	AEQNPIYWARYADLLFPTTLAW
226	ACEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLDLALLVDADET
227	GGEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGT
228	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGTCG
229	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGTKCG
230	AKEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLDLALLVDADECT
231	CCTCTTACCTCAGTTACA
232	D-Arg8 D-Arg8-CCTCTTACCTCAGTTACA
233	D-Lys4 D-Lys4-CCTCTTACCTCAGTTACA
234	S-S-CCTCTTACCTCAGTTACA
235	S-S-CCTCTGACCTCATTTACA
236	D-Arg8-Deca D-Arg8-Deca-CCTCTTACCTCAGTTACA
237	D-Arg8-Deca-error de emparejamientoD-Arg8-Deca-CCTCTGACCTCATTTACA
238	S-S-CCTCTTACCTCAGTTACA
239	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGTCG
240	AEDQNPHYWARYDWLFTTPLLLLLDLALLVDCG
241	AEDQNPHYWARYADWLFTTPLLLLLLELALLVECG
242	AEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGCT
243	ACEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLDLALLVDADET
244	AE-QN-PI YWARYADWLFTTPLLLLLDLALLV DAEDEGT-COOH
245	AEDQN-P- YWARYADWLFTTPLLLLLDLALLV D---G--COOH
246	AEDQNDP-YWARYADWLFTTPLLLLLDLALLV----G--COOH

247	AEQNPI YWARYADFLFTTPLL LLDLALLV DADET-COOH
248	AEQNPI YFARYADWLFTTPLL LLDLALLV DADET-COOH
249	AEQNPI YFARYADFLFTTPLL LLDLALLW DADET-COOH
250	AE-QN-PI YWARYADWLFTTPLL LLDLALLV DADEGCT-COOH
251	AEDQN-PI YWARYADWLFTTPLL LLDLALLV DC--G-T-COOH
252	AEDQNDPI YWARYADWLFTTPLL LLELALLV EC--G-T-COOH
253	Quelato-ACEEQNPWARYLEWLFPTETL LLEL
254	AEQNPIY WARYADWLFTTPLL LLDLALLV DADEGT-COOH
255	AKEDQNPY WARYADWLFTTPLL LLDLALLV DG-COOH
256	AKEDQNDPY WARYADWLFTTPLL LLDLALLV G-COOH
257	AEQNPI YWARYADWLFTTPLL LLDLALLV DADEGC-Biotina-T-COO H
258	AEDQNP YWARYADWLFTTPLL LLDLALLV DC-Biotina-G-COOH
259	AEDQNP YWARYADWLFTTPLL LLELALLV EC-Biotina-G-COOH
260	ACEQNPIY WARYADWLFTTPLL LLDLALLV DADEGT
261	ACEDQNPY WARYADWLFTTPLL LLDLALLV DG
262	ACEDQNPY WRAYADLFTPL TLLDLLALW DG
263	ACDDQNP WRAYLDLLFPTDTLL LDLLW
264	WRAYLELLFPTETL LLELLW
265	WARYLDWLFPTDTLL LD
266	WRAYLDLLFPTDTLL LDW
267	WARYLEWLFPTETL LLEL
268	WAQYLELLFPTETL LLEW
269	WRAYLELLFPTETL LLEW
270	WARYADWLFPTTLL LD
271	WARYAEWLFPTTLL LE
272	ACEDQNP WARYADLLFPTTLAW
273	ACEEQNP WARYAELLFPTTLAW
274	Ac-TEDAD VLLALDLLLLPTTFLW DAYRAW YPNQECA-Am
275	CDDDDDNPNY WARYANWLFTTPLL LINGALLV EAEET
276	CDDDDDNPNY WARYAPWLFTTPLL LIPGALLV EAEET

277	Ac-AEQNPYIYARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGCT
278	Ac-AKEQNPYIYARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTG
279	ACEQNPYIYARYANWLFTTPLLLNLALLVDADEGT
280	Ac-AAEQNPYIYARYADWLFTTPLLLLELALLVDADEGTKCG
281	DDDEDNPYIYARYADWLFTTPLLLHLGALLVDADET
282	CDDDEDNPYIYARYAHWLFTTPLLLHLGALLVDADET
283	DDDEDNPYIYARYAHWLFTTPLLLHLGALLVDADEGT
284	DDDEDNPYIYARYAHWLFTTPLLLHLGALLVNADEGT
285	DDDEDNPYIYARYAHWLFTTPLLLHLGALLVNANEGT
286	AKEDQNDPYIYARYADWLFTTPLLLLDLALLVG
287	AEDQNPYIYARYADWLFTTPLLLLELALLVCG
288	AKDDQNPWRAYLDLLFPTDTLLLDLLWC
289	ACEEQNPWRAYLELLFPTETLLLELLW
290	ACDDQNPWARYLDWLFPTDTLLLDL
291	CDNNNPWRAYLDLLFPTDTLLLDW
292	CEEQQPWAQYLELLFPTETLLLEW
293	EEQQPWRAYLELLFPTETLLLEW
294	CDDDDDNPNYIYARYANWLFTTPLLLNLGALLVEAEET
295	CDDDDDNPNYIYARYAPWLFTTPLLLLPGALLVEAEE
296	AEQNPYIFARYADLLFPTTLAW
297	AEQNPYIYARYADLLFPTTLAF
298	AEQNPYIYARYADLLFPTTLAW
299	KEDQNPWARYADLLFPTTLW
300	ACEEQNPQAEYAEWLFPTTLLE
301	AAEEQNPWARYLEWLFPTETLLLEL
302	AKEEQNPWARYLEWLFPTETLLLEL
303	AAEQNPYIYARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTGG
304	XXEXNPYIYAXXXXXLFTXXLLLXXXALLVXAXXXTXG
305	DAAEQNPYIYARYADWLFTTPLLLLDLLALLVDADEGTKGG
306	GGEQNPYIYARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTGG

307	XXEXNPIYWAXXXXLFTXXLLLXXXALLVXAXXTGG
308	DGGEQNDPIYWARYADWLFTTLPLLLDLLALLVDADEGCTXGG
309	AAEQNPYWARYADWLFTTPLLLDLALLVDADEGTGG
310	AEDQNPYWARYDWLFTTPLLLDLALLVDCG
311	GLAGLAGLLGLEGLLGLPLGLLEGLWLGLELEGN

En algunas modalidades, R⁷ es un péptido que tiene de 10 a 50 aminoácidos.

En algunas modalidades, R⁷ es un péptido que tiene de 20 a 40 aminoácidos. En algunas modalidades, R⁷ es un péptido que tiene de 20 a 40 aminoácidos. En

- 5 algunas modalidades, R⁷ es un péptido que tiene de 10 a 20 aminoácidos. En algunas modalidades, R⁷ es un péptido que tiene de 20 a 30 aminoácidos. En algunas modalidades, R⁷ es un péptido que tiene de 30 a 40 aminoácidos.

- Las moléculas terapéuticas adecuadas (por ejemplo, R⁸) para usar en la invención incluyen aquellas que tienen efectos secundarios indeseables cuando se administran sistémicamente debido a su posible efecto perjudicial sobre el tejido normal. Los ejemplos de moléculas terapéuticas son compuestos inhibidores de la reparación del ADN, tales como inhibidores de PARP, ATR, DNK-PK y ATM. Dicho compuesto inhibidor de la reparación del ADN es útil para el tratamiento del cáncer y otras enfermedades en las que sería deseable la inhibición de la reparación del ADN.
- 15

- Tres inhibidores de PARP (olaparib, rucaparib y niraparib) están actualmente disponibles en el mercado y otros están en desarrollo, como AG-014699 (Agouron/Pfizer), KU-0059436 (KuDOS/AstraZeneca), INO-1001 (Inotek/Genentech), NT-125 (actualmente E-7449; Eisai; 3H-piridazino[3,4,5-de]quinazolin-3-ona, 8-[(1,3-dihidro-2H-isoindol-2-il)metil]-1,2-dihidro-), 2X-121 (2X Oncology; 3H-piridazino[3,4,5-de]quinazolin-3-ona, 8-[(1,3-dihidro-2H-isoindol-2-il)metil]-1,2-dihidro-) y ABT-888 (Abbvie). Los inhibidores de PARP se describen (por ejemplo) en las patentes de los Estados Unidos 6.100.283; 6.310.082; 6.495.541; 6.548.494; 6.696.437; 7.151.102; 7.196.085; 7.449.464; 7.692.006; 20 7.781.596; 8.067.613; 8.071.623; y 8.697.736, cuyas patentes se incorporan a la presente mediante esta referencia en su totalidad.
- 25

En algunas modalidades, cada uno de R^1 y R^2 se selecciona independientemente de H y metilo, y cada uno de R^3 , R^4 , R^5 y R^6 es hidrógeno.

En algunas modalidades, cada uno de R^1 y R^2 se selecciona independientemente de H y metilo.

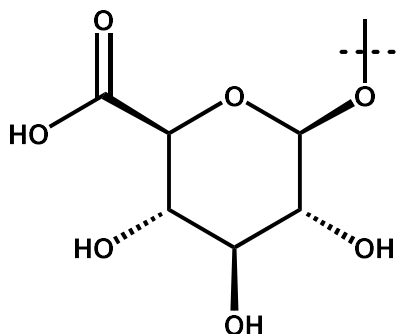
- 5 En algunas modalidades, cada uno de R^1 y R^2 es H.
En algunas modalidades, cada uno de R^3 y R^4 es H.
En algunas modalidades, cada uno de R^5 y R^6 es H.
En algunas modalidades, cada uno de R^9 , R^{10} , R^{11} y R^{12} se selecciona independientemente de H y metilo.
- 10 En algunas modalidades, la enzima capaz de escindir $[AA]_x$ es catepsina B, metaloproteinasas de matriz (MMP, por sus siglas en inglés), DPPIV, glicoproteína, peptidasa o caspasa. En algunas modalidades, $[AA]_x$ es un péptido que tiene de dos a doce (x es de 2 a 12) residuos de aminoácidos (AA). En algunas modalidades, $[AA]_x$ es un péptido que tiene de dos a diez (x es de 2 a 10) residuos de aminoácidos
- 15 (AA). En algunas modalidades, $[AA]_x$ es un péptido que tiene de dos a cinco (x es de 2 a 5) residuos de aminoácidos (AA). En algunas modalidades, $[AA]_x$ es un péptido que tiene de seis a nueve (x es de 6 a 9) residuos de aminoácidos (AA). En algunas modalidades, $[AA]_x$ es un péptido que tiene de tres a ocho (x es de 3 a 8) residuos de aminoácidos (AA).
- 20 Los enlaces peptídicos (por ejemplo, $[AA]_x$) que pueden ser escindidos por proteínas se describen en Yang, Y., Acta Pharmaceutica Sinica B 2011, 1(3), 143-159; Choi, K., Theranostics 2012, 2, 156-178; y Anderson, C., Ind. Eng. Chem. Res. 2017, 56, 4761-5777.
Los enlazadores peptídicos (por ejemplo, $[AA]_x$) que pueden ser escindidos por
- 25 DPPIV se describen en Diez-Torrubia, A., J. Med. Chem. 2010, 53, 559-572; Garcia-Aparicio, C., J. Med. Chem. 2006, 49, 5339-5351; Diez-Torrubia, A., ChemMedChem 2012, 7, 618-628; Dahan, A., Mol. Pharmaceutics 2014, 11, 4385-4394; Wickstrom, M., Oncotarget 2017, 8, 66641-66655; y Simplicio, A. L., Molecules, 2008, 13, 519-547.
- 30 Los enlazadores peptídicos (por ejemplo, $[AA]_x$) que pueden ser escindidos por la catepsina B se describen en Caculitan, N., Cancer Res. 2017, 77(24), 7027-7037;

Zhong, Y-J, International Journal of Oncology 2013, 42, 373-383; y Fan, P., Drug Metabolism and Disposition 2016, 44, 1253-1261.

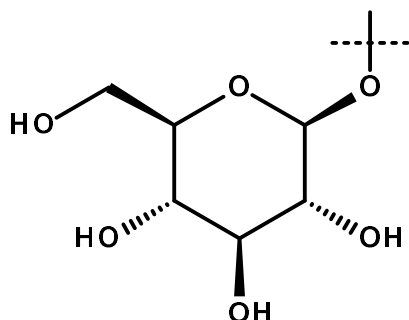
Los enlazadores peptídicos (por ejemplo, [AA]_x) que pueden ser escindidos por MMP (por ejemplo, MMP-9) se describen en Kalafatovic, D., Biomaterials 98 (2016), 192-202; Kim, HS, Gene Therapy 2013, 20, 378-385; y Yao, W., Trends in Pharmacological Sciences 2018, 39, 766-781.

En algunas modalidades, [AA]_x es -Pro_Gly-, -Val_Cit-, -Gly_Pro_Leu_Gly_Leu_Ala_Gly_Asp_Asp-, -Gly_Pro_GLeu_Gly_Val_Arg_Gly o -Ser_Ser_Lys_Leu_Gly-.

10 En algunas modalidades, S1 es un grupo que tiene la siguiente estructura:

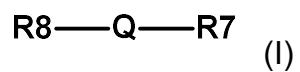


En algunas modalidades, S1 es un grupo que tiene la siguiente estructura:



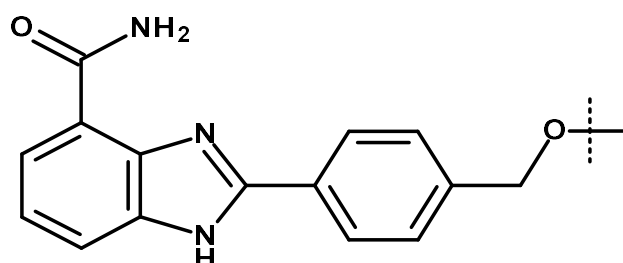
El grupo S1 puede ser un carbohidrato que puede ser escindido por la glucuronidasa. Dichos grupos de carbohidratos se usan en la técnica como profármacos de glucurónido y se describen en Grinda, M. Med. Chem. Commun. 2012, 3, 68-70; Herceg, V., Biorganic Chemistry 2018, 78, 372-380; Adiyala P., Bioorganic Chemistry 2018, 76, 288-293; y Kolakowski, R., Angew. Chem. Int. Ed. 2016, 55, 7948-7951.

20 En este documento se proporciona también un compuesto de la fórmula (I)

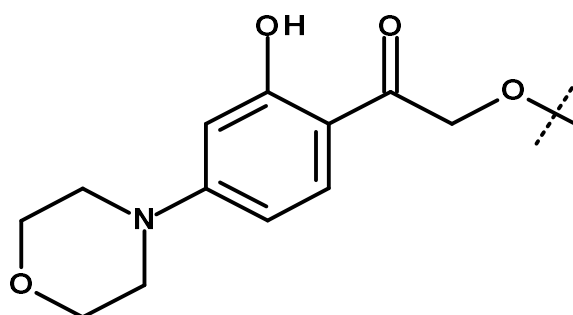


y las sales farmacéuticamente aceptables de este, en el que

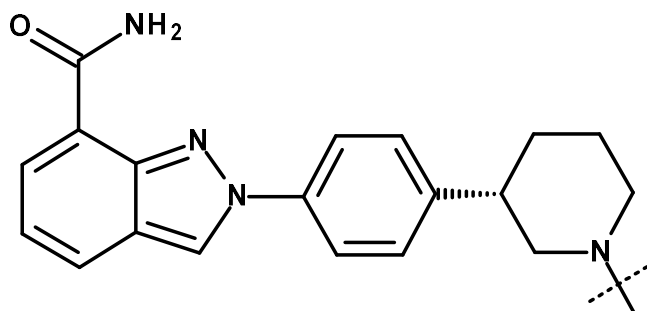
R^8 es un miembro seleccionado del grupo que consiste en:



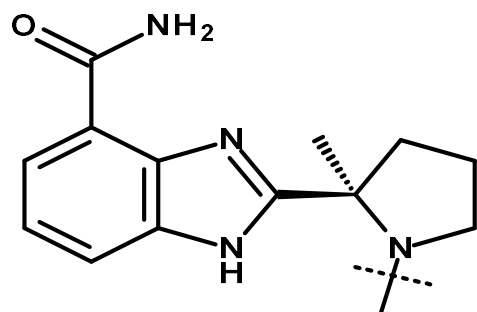
;



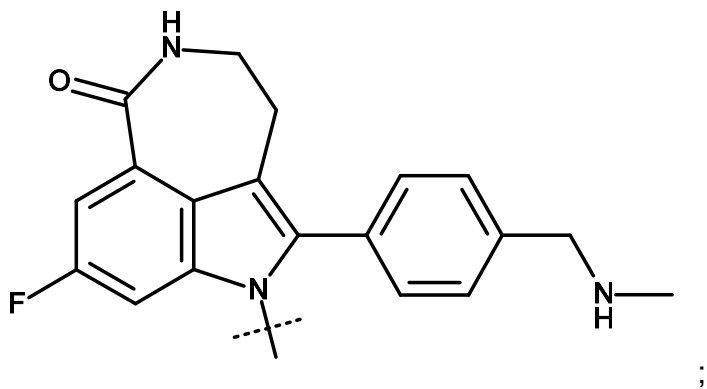
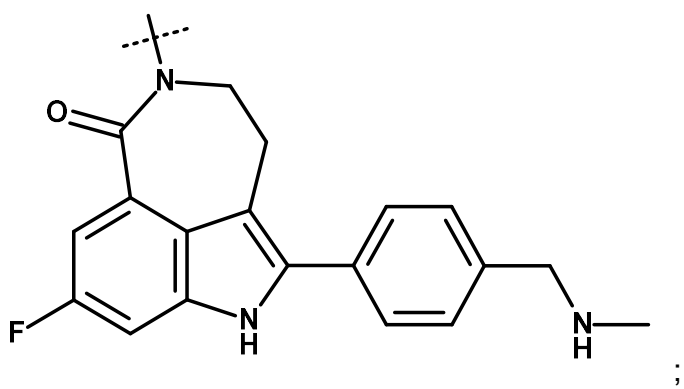
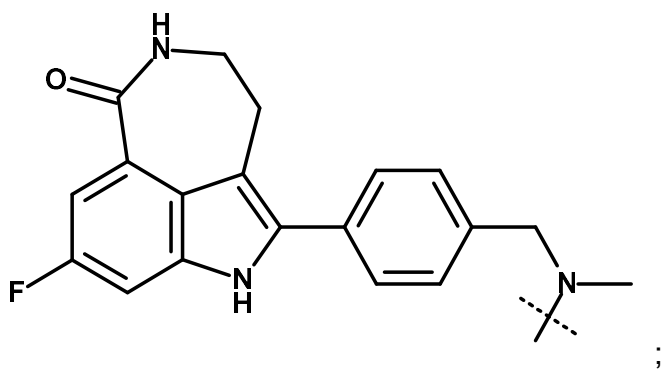
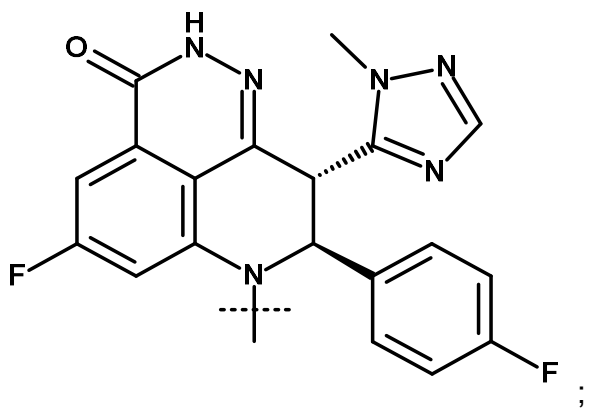
;

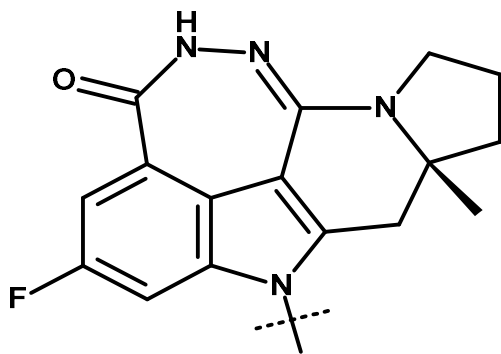


;

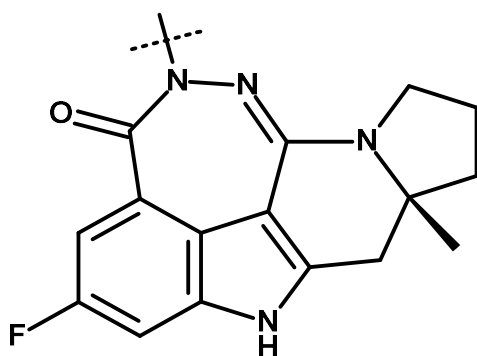


;

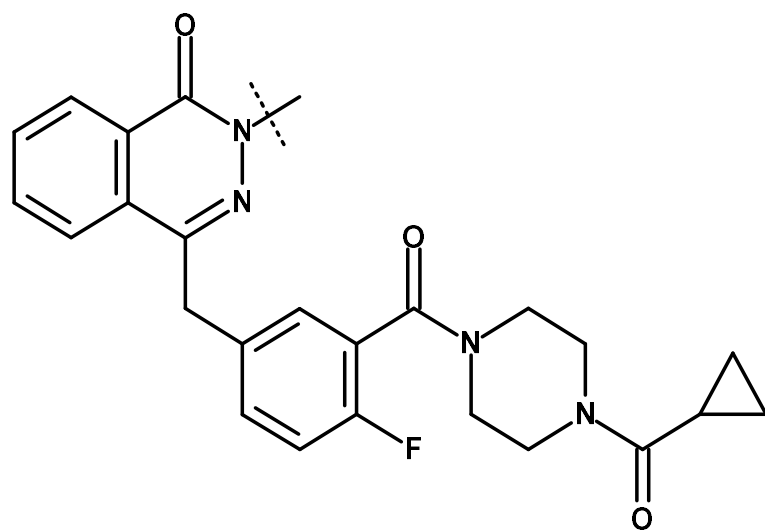




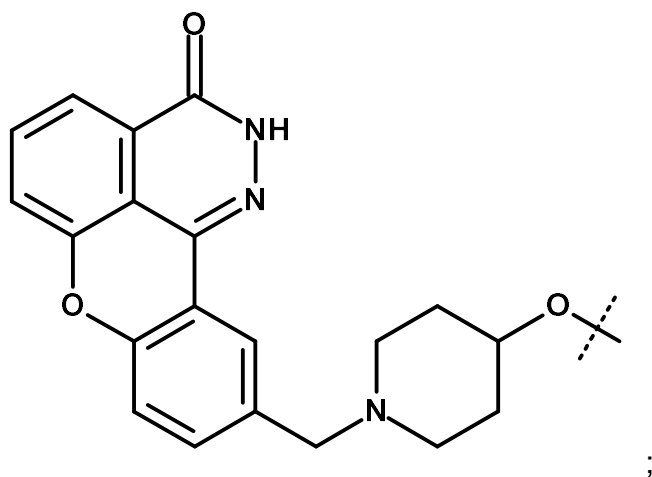
;



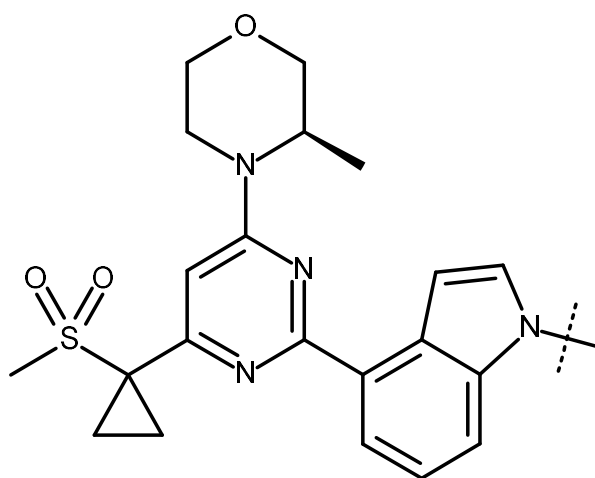
;



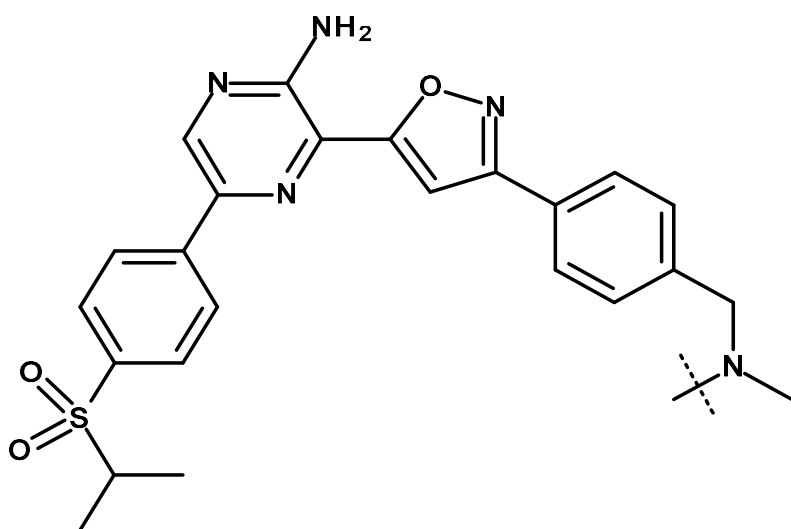
;



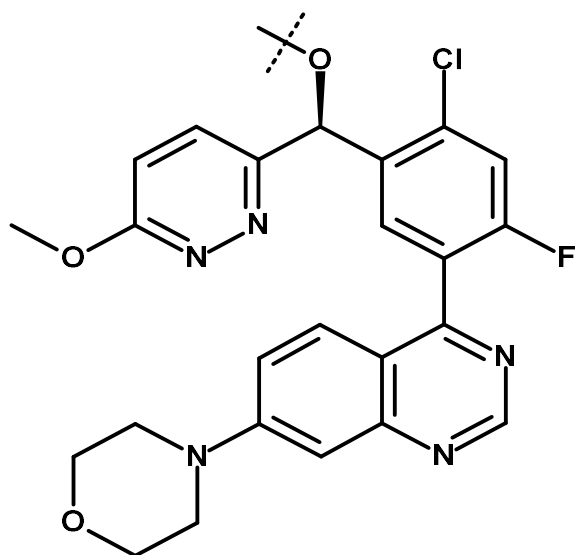
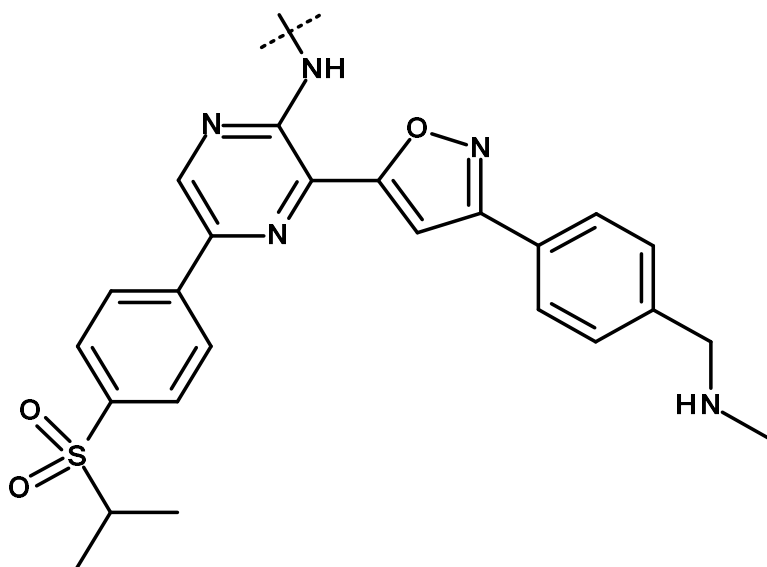
;



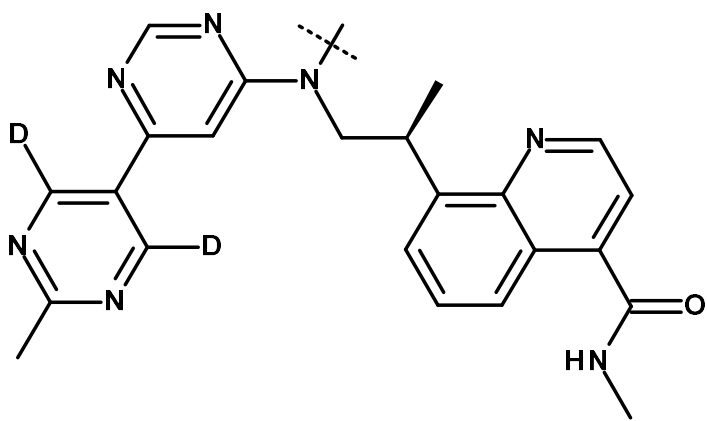
;



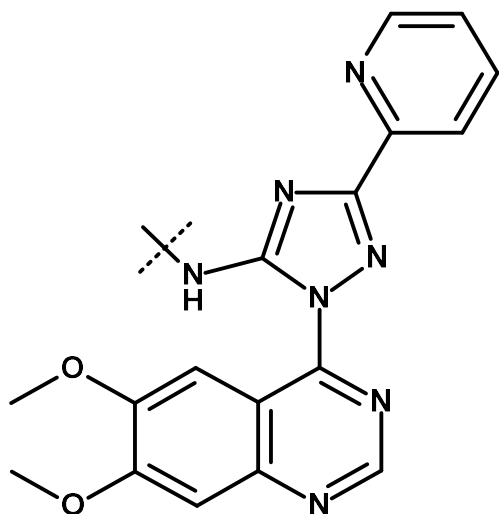
;



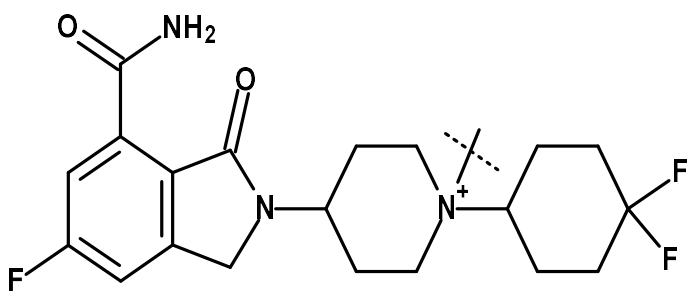
;



;

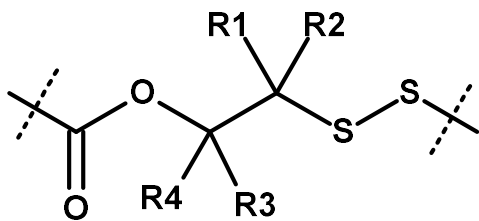


y

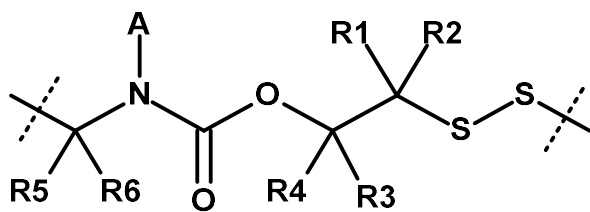


;

Q es un miembro seleccionado del grupo que consiste en

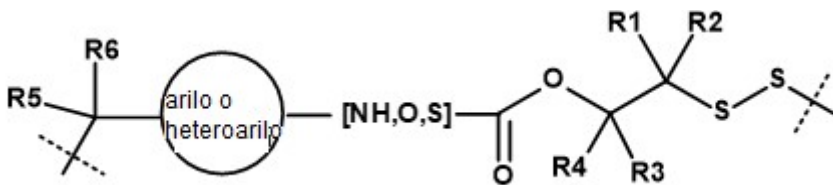


,



5

y



donde R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 y R^6 se seleccionan independientemente de H, alquilo C₁-C₄ opcionalmente sustituido, alquenilo C₁-C₄ opcionalmente sustituido, alcoxi C₁-C₄ opcionalmente sustituido, amino opcionalmente sustituido con uno o dos sustituyentes alquilo C₁-C₄, halo, nitro o hidroxilo, y donde [NH,O,S] significa un

5 resto de enlace NH, O o S,

y

R^7 es un péptido capaz de suministrar selectivamente R^8Q a través de una membrana celular con un manto ácido o hipóxico de forma dependiente del pH.

En algunas modalidades, R^7 es un miembro seleccionado del grupo que consiste
10 en ADDQNPWRAYLDLLFPTDTLLLDLLWCG (SEQ ID NO. 1; Pv1),

AEQNPIYWARYADWLFTTPLLDDLALLVDADECG (SEQ ID NO. 2; Pv2), y

ADDQNPWRAYLDLLFPTDTLLLDLLWDADECG (SEQ ID NO. 3; Pv3),

donde R^7 y Q están unidos a través de un residuo de cisteína.

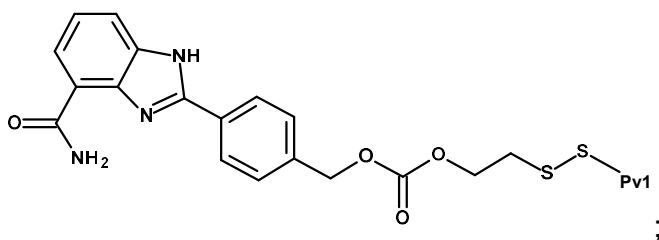
En algunas modalidades, cada uno de R^1 y R^2 se selecciona independientemente
15 de H y metilo, y cada uno de R^3 , R^4 , R^5 y R^6 es hidrógeno.

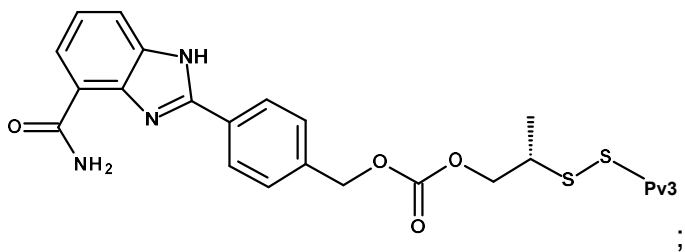
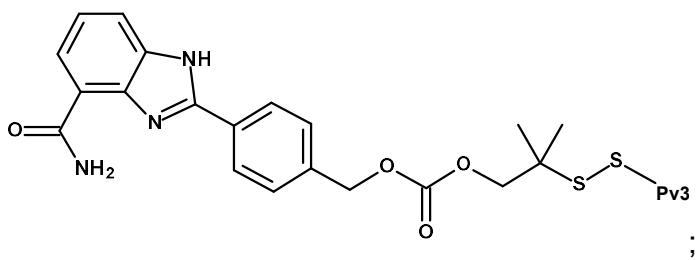
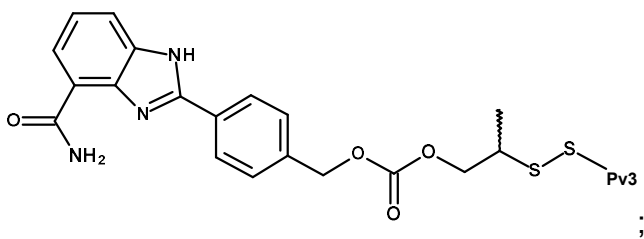
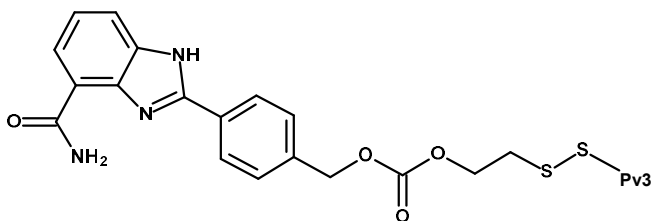
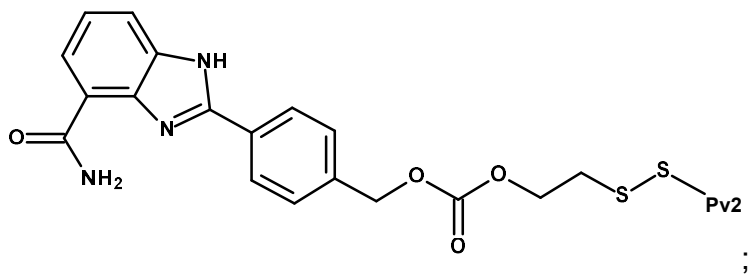
En algunas modalidades, R^7 es ADDQNPWRAYLDLLFPTDTLLLDLLWCG (SEQ ID NO. 1; Pv1).

En algunas modalidades, R^7 es AEQNPIYWARYADWLFTTPLLDDLALLVDADECG (SEQ ID NO. 2; Pv2).

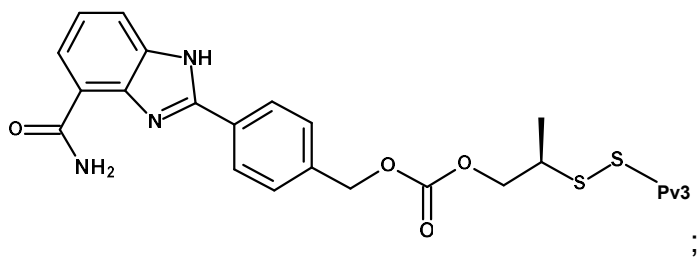
20 En algunas modalidades, R^7 es ADDQNPWRAYLDLLFPTDTLLLDLLWDADECG (SEQ ID NO. 3; Pv3).

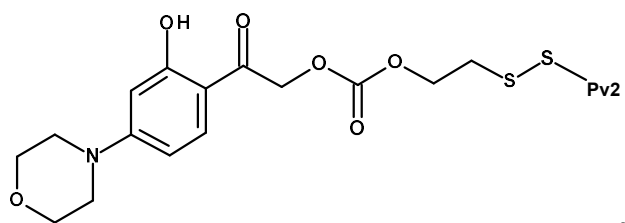
En algunas modalidades, el compuesto de la fórmula (I) se selecciona de:



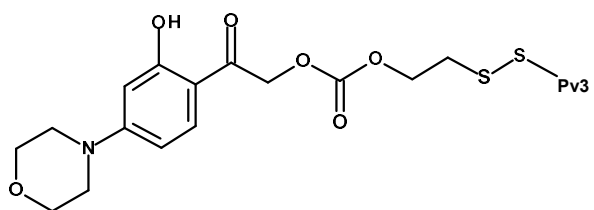


5

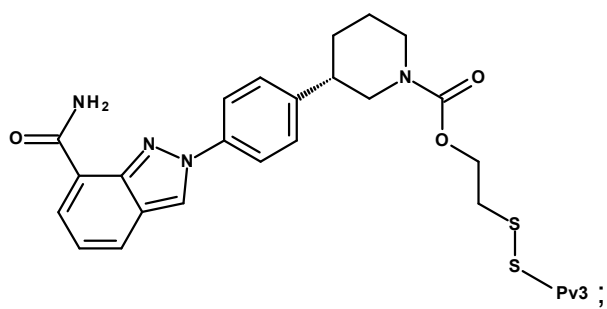




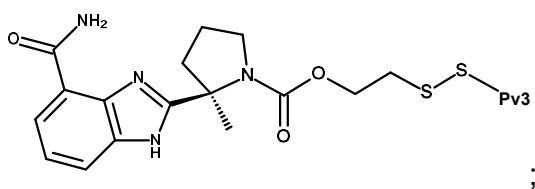
;



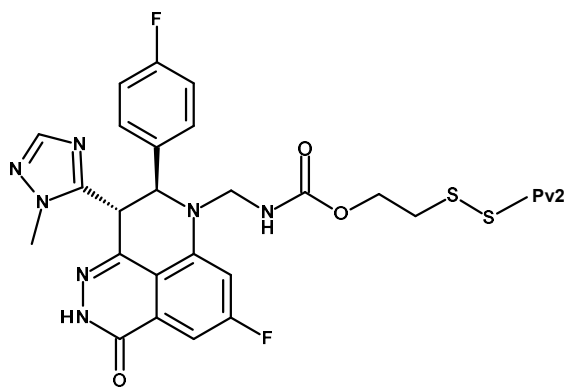
;



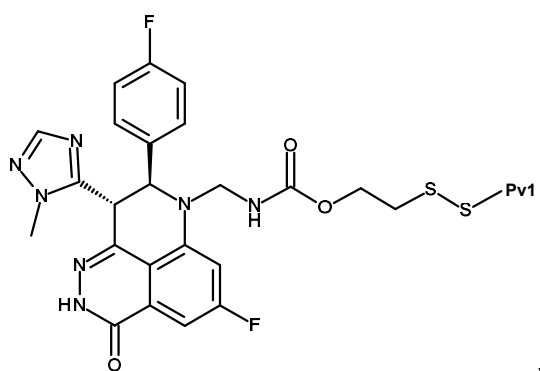
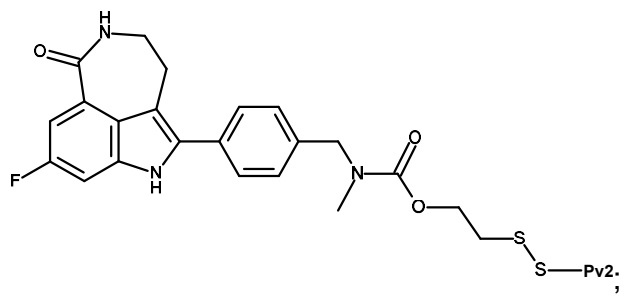
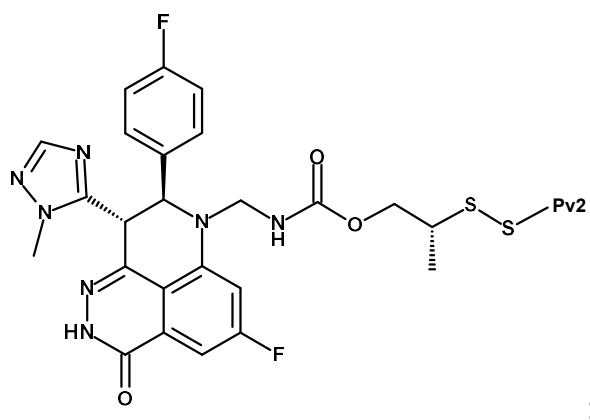
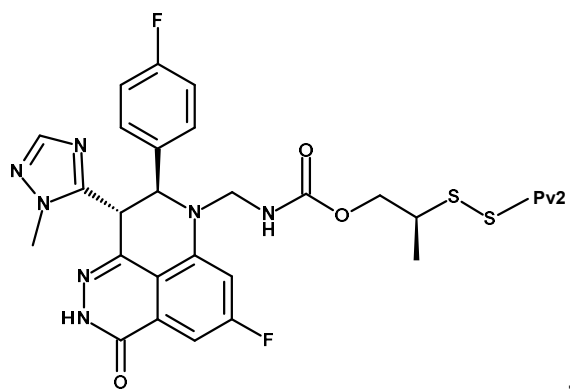
;

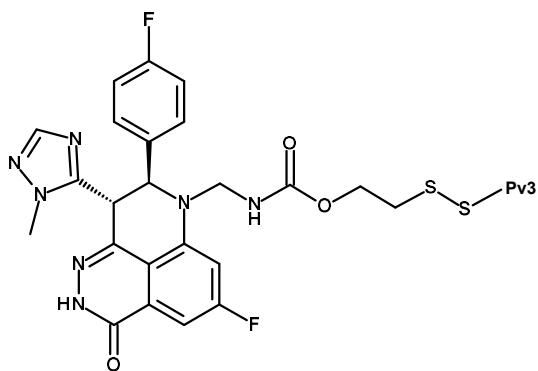


;



;





Las moléculas de la invención se pueden etiquetar, por ejemplo, con una sonda tal como un fluoróforo, radioisótopo y similares. En algunas modalidades, la sonda es una sonda fluorescente, tal como LICOR. Una sonda fluorescente puede incluir cualquier resto que pueda reemitir luz tras la excitación lumínica (por ejemplo, un fluoróforo).

Los aminoácidos están representados por las abreviaturas IUPAC, de la siguiente forma: alanina (Ala; A), arginina (Arg; R), asparagina (Asn; N), ácido aspártico (Asp; D), cisteína (Cys; C), glutamina (Gln; Q), ácido glutámico (Glu; E), glicina (Gly; G), histidina (His; H), isoleucina (Ile; I), leucina (Leu; L), lisina (Lys; K), metionina (Met; M), fenilalanina (Phe; F), prolina (Pro; P), serina (Ser; S), treonina (Thr; T), triptófano (Trp; W), tirosina (Tyr; Y), valina (Val; V). El término "Pv1" significa ADDQNPWRAYLDLLFPTDTLLLDLLWCG, que es el péptido de la SEQ ID NO. 1.

El término "Pv2" significa AEQNPIYWARYADWLFTTPLLDDLALLVDADECG, que es el péptido de SEQ ID NO. 2. El término "Pv3" significa ADDQNPWRAYLDLLFPTDTLLLDLLWDADECG, que es el péptido de SEQ ID NO. 3.

El término "Pv4" significa Ac-AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLDDLALLVDADEGKCG, que es el péptido de SEQ ID NO. 4. El término "Pv5" significa

AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLDDLALLVDADEGTC, que es el péptido de SEQ ID NO. 5. En los compuestos de la invención, los péptidos R⁷ están unidos al enlazador disulfuro mediante el resto cisteína.

El término "manto ácido y/o hipóxico" se refiere al entorno de la célula en el tejido enfermo en cuanto a que tiene un pH inferior a 7,0 y, preferiblemente, inferior a 6,5.

Un manto ácido o hipóxico más preferiblemente tiene un pH de alrededor de 5,5 y,

aun más preferiblemente, tiene un pH de alrededor de 5,0. Los compuestos de la fórmula (I) se insertan a través de una membrana celular con un manto ácido y/o hipóxico de forma dependiente del pH para insertar R^8Q en la célula, tras lo cual el enlazador disulfuro se escinde para suministrar R^8H libre. Dado que los compuestos de la fórmula (I) dependen del pH, se insertan preferentemente a través de una membrana celular solamente en presencia de un manto ácido o hipóxico que rodee la célula y no a través de la membrana celular de las células "normales", que no tienen un manto ácido o hipóxico.

Los términos "sensible al pH" o "dependiente del pH" como se usan en este documento para referirse al péptido R^7 o al modo de inserción del péptido R^7 o de los compuestos de la invención a través de una membrana celular significa que el péptido tiene una mayor afinidad por una bicapa lipídica de la membrana celular con un manto ácido o hipóxico que una bicapa lipídica de la membrana a pH neutro. Por lo tanto, los compuestos de la invención se insertan preferentemente a través de la membrana celular para insertar R^8Q en el interior de la célula (y así suministrar R^8H como se describió anteriormente) cuando la bicapa lipídica de la membrana celular tiene un manto ácido o hipóxico (una célula "enferma"), pero no se inserta a través de una membrana celular cuando el manto (el entorno de la bicapa lipídica de la membrana celular) no es ácido o hipóxico (una célula "normal"). Se cree que esta inserción preferencial se logra como resultado de que el péptido R^7 forme una configuración helicoidal, que facilita la inserción en la membrana.

Se aprecia además que ciertas características de la invención que, por motivos de claridad, se describen en el contexto de modalidades separadas, también se pueden proporcionar en combinación en una sola modalidad (mientras que las modalidades están previstas para combinarse como si estuvieran escritas en múltiples formas dependientes). Por el contrario, varias características de la invención que, por motivos de brevedad, se describen en el contexto de una sola modalidad, también se pueden proporcionar por separado o en cualquier subcombinación adecuada. Por lo tanto, se contempla que las características descritas como modalidades de los compuestos de la fórmula (I) se puedan combinar en cualquier combinación adecuada.

En varias partes de la presente memoria descriptiva, ciertas características de los compuestos se describen en grupos o en intervalos. Se pretende específicamente que dicha descripción incluya todas y cada una de las subcombinaciones individuales de los miembros de dichos grupos e intervalos. Por ejemplo, el término

5 "alquilo C₁₋₆" está previsto específicamente para describir individualmente (sin limitación) metilo, etilo, alquilo C₃, alquilo C₄, alquilo C₅ y alquilo C₆.

El término "de n miembros", donde n es un número entero, típicamente describe el número de átomos formadores de anillos en un resto donde el número de átomos formadores de anillos es n. Por ejemplo, piperidinilo es un ejemplo de un anillo

10 heterocicloalquilo de 6 miembros, pirazolilo es un ejemplo de un anillo heteroarilo de 5 miembros, piridilo es un ejemplo de un anillo heteroarilo de 6 miembros y 1,2,3,4-tetrahidro-naftaleno es un ejemplo de un grupo cicloalquilo de 10 miembros.

En varias partes en la presente memoria descriptiva, se pueden describir variables

15 que definen grupos de enlace divalentes. Se pretende específicamente que cada sustituyente de enlace incluya tanto las formas directas como inversas del sustituyente de enlace. Por ejemplo, -NR(CR'R")_n- incluye tanto -NR(CR'R")_n- como -(CR'R")_nNR- y está previsto para describir cada una de las formas individualmente. Cuando la estructura requiere un grupo de enlace, se entiende que las variables de

20 Markush enumeradas para ese grupo son grupos de enlace. Por ejemplo, si la estructura requiere un grupo de enlace y la definición del grupo Markush para esa variable enumera "alquilo" o "arilo", entonces se entiende que el "alquilo" o "arilo" representa un grupo alquileo o grupo arileno de enlace, respectivamente.

El término "sustituido" significa que un átomo o grupo de átomos reemplaza

25 formalmente al hidrógeno como un "sustituyente" unido a otro grupo. A menos que se indique lo contrario, el término "sustituido" se refiere a cualquier nivel de sustitución, por ejemplo, mono-, di-, tri-, tetra- o penta-sustitución, cuando dicha sustitución esté permitida. Los sustituyentes se seleccionan independientemente y la sustitución puede estar en cualquier posición químicamente accesible. Debe

30 entenderse que la sustitución en un átomo dado está limitada por la valencia. Debe entenderse que la sustitución en un átomo dado da como resultado una molécula

químicamente estable. La frase "opcionalmente sustituido" significa no sustituido o sustituido. El término "sustituido" significa que se elimina un átomo de hidrógeno y se reemplaza con un sustituyente. Un único sustituyente divalente, por ejemplo, oxo, puede reemplazar dos átomos de hidrógeno.

- 5 El término " C_{n-m} " indica un intervalo que incluye los valores extremos, en donde n y m son enteros e indican el número de carbonos. Los ejemplos incluyen C_{1-4} , C_{1-6} y similares.

El término "alquilo", empleado solo o en combinación con otros términos, se refiere a un grupo hidrocarbonado saturado que puede ser de cadena lineal o ramificada.

- 10 El término "alquilo C_{n-m} " se refiere a un grupo alquilo que tiene n a m átomos de carbono. Un grupo alquilo corresponde formalmente a un alcano con un enlace C-H reemplazado por el punto de unión del grupo alquilo al resto del compuesto. En algunas modalidades, el grupo alquilo contiene de 1 a 6 átomos de carbono, de 1 a 4 átomos de carbono, de 1 a 3 átomos de carbono o de 1 a 2 átomos de carbono.
- 15 Los ejemplos de restos alquilo incluyen, de modo no taxativo, grupos químicos tales como metilo, etilo, *n*-propilo, isopropilo, *n*-butilo, *tert*-butilo, isobutilo, *sec*-butilo, homólogos superiores tales como 2-metil-1-butilo, *n*-penilo, 3-pentilo, *n*-hexilo, 1,2,2-trimetilpropilo y similares.

- El término "alquenilo", empleado solo o en combinación con otros términos, se refiere a un grupo hidrocarbonado de cadena lineal o ramificada que corresponde a un grupo alquilo con uno o más enlaces dobles carbono-carbono. Un grupo alquenilo corresponde formalmente a un alqueno con un enlace C-H reemplazado por el punto de unión del grupo alquenilo al resto del compuesto. El término "alquenilo C_{n-m} " se refiere a un grupo alquenilo que tiene n a m carbonos. En algunas
- 20 modalidades, el resto alquenilo contiene 2 a 6, 2 a 4, o 2 a 3 átomos de carbono. Los ejemplos de grupos alquenilo incluyen, de modo no taxativo, etenilo, *n*-propenilo, isopropenilo, *n*-butenilo, *sec*-butenilo y similares.

- El término "alquinilo", empleado solo o en combinación con otros términos, se refiere a un grupo hidrocarbonado de cadena lineal o ramificada que corresponde a un grupo alquilo con uno o más enlaces triples carbono-carbono. Un grupo alquinilo
- 30 corresponde formalmente a un alquino con un enlace C-H reemplazado por el punto

de unión del grupo alquilo al resto del compuesto. El término "alquinilo C_{n-m} " se refiere a un grupo alquinilo que tiene n a m carbonos. Los ejemplos de grupos alquinilo incluyen, de modo no taxativo, etinilo, propin-1-ilo, propin-2-ilo y similares. En algunas modalidades, el resto alquinilo contiene 2 a 6, 2 a 4, o 2 a 3 átomos de carbono.

El término "alquilenilo", empleado solo o en combinación con otros términos, se refiere a un grupo de enlace de alquilo divalente. Un grupo alquilenilo corresponde formalmente a un alcano con dos enlaces C-H remplazados por puntos de unión del grupo alquilenilo al resto del compuesto. El término "alquilenilo C_{n-m} " se refiere a un grupo alquilenilo que tiene n a m átomos de carbono. Los ejemplos de grupos alquilenilo incluyen, de modo no taxativo, etan-1,2-diilo, etan-1,1-diilo, propan-1,3-diilo, propan-1,2-diilo, propan-1,1-diilo, butan-1,4-diilo, butan-1,3-diilo, butan-1,2-diilo, 2-metil-propan-1,3-diilo y similares.

El término "amino" se refiere a un grupo de fórmula $-NH_2$.

El término "carbonilo", empleado solo o en combinación con otros términos, se refiere a un grupo $-C(=O)-$, que también puede escribirse como $C(O)$.

Los términos "ciano" o "nitrilo" se refieren a un grupo de fórmula $-C\equiv N$, que también puede escribirse como $-CN$.

Los términos "halo" o "halógeno", usados solos o en combinación con otros términos, se refieren a fluoro, cloro, bromo y yodo. En algunas modalidades, "halo" se refiere a un átomo de halógeno seleccionado de F, Cl o Br. En algunas modalidades, los grupos halo son F.

El término "haloalquilo", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo alquilo en el que uno o más de los átomos de hidrógeno se encuentran remplazados por un átomo de halógeno. El término "haloalquilo C_{n-m} " se refiere a un grupo alquilo C_{n-m} que tiene n a m átomos de carbono y de al menos uno hasta $\{2(n \text{ a } m)+1\}$ átomos de halógeno, que pueden ser iguales o diferentes. En algunas modalidades, los átomos de halógeno son átomos de fluoro. En algunas modalidades, el grupo haloalquilo tiene 1 a 6 o 1 a 4 átomos de carbono. Los ejemplos de grupos haloalquilo incluyen CF_3 , C_2F_5 , CHF_2 , CH_2F , CCl_3 , $CHCl_2$, C_2Cl_5 y similares. En algunas modalidades, el grupo haloalquilo es un grupo fluoroalquilo.

El término "haloalcoxi", empleado solo o en combinación con otros términos, se refiere a un grupo de fórmula -O-haloalquilo, en el que el grupo haloalquilo es como se definió anteriormente. El término "haloalcoxi C_{n-m}" se refiere a un grupo haloalcoxi, cuyo grupo haloalquilo tiene de n a m carbonos. Los ejemplos de grupos haloalcoxi incluyen trifluorometoxi y similares. En algunas modalidades, el grupo haloalquilo tiene 1 a 6, 1 a 4, o 1 a 3 átomos de carbono.

El término "oxo" se refiere a un átomo de oxígeno como un sustituyente divalente, que forma un grupo carbonilo cuando se une al carbono o se une a un heteroátomo para formar un grupo sulfóxido o sulfona, o un grupo N-óxido. En algunas modalidades, los grupos heterocíclicos pueden estar opcionalmente sustituidos con 1 o 2 sustituyentes oxo (=O).

El término "oxidado" en referencia a un átomo de N formador de anillo se refiere a un N-óxido formador de anillo.

El término "oxidado" en referencia a un átomo de S formador de anillo se refiere a un sulfonilo formador de anillo o un sulfinilo formador de anillo.

El término "aromático" se refiere a un carbociclo o heterociclo que tiene uno o más anillos poliinsaturados con carácter aromático (*es decir*, con $(4n + 2)$ electrones π (pi) deslocalizados, donde n es un entero).

El término "arilo", empleado solo o en combinación con otros términos, se refiere a un grupo hidrocarbonado aromático, que puede ser monocíclico o policíclico (por ejemplo, con 2 anillos fusionados). El término "arilo C_{n-m}" se refiere a un grupo arilo que tiene n a m átomos de carbono en el anillo. Los grupos arilo incluyen, por ejemplo, fenilo, naftilo y similares. En algunas modalidades, los grupos arilo tienen de 6 a alrededor de 10 átomos de carbono. En algunas modalidades, los grupos arilo tienen 6 átomos de carbono. En algunas modalidades, los grupos arilo tienen 10 átomos de carbono. En algunas modalidades, el grupo arilo es fenilo.

Los términos "heteroarilo" o "heteroaromático", empleados solos o en combinación con otros términos, se refieren a un heterociclo aromático monocíclico o policíclico con al menos un miembro del anillo heteroátomo seleccionado de azufre, oxígeno y nitrógeno. En algunas modalidades, el anillo heteroarilo tiene 1, 2, 3 o 4 miembros del anillo heteroátomo seleccionados independientemente de nitrógeno, azufre y

oxígeno. En algunas modalidades, cualquier N formador de anillo en un resto heteroarilo puede ser un N-óxido. En algunas modalidades, el anillo heteroarilo tiene 5-14 átomos en el anillo incluidos átomos de carbono y 1, 2, 3 o 4 miembros del anillo heteroátomo seleccionados independientemente de nitrógeno, azufre y oxígeno. En algunas modalidades, el anillo heteroarilo tiene 5-10 átomos en el anillo incluidos átomos de carbono y 1, 2, 3 o 4 miembros del anillo heteroátomo seleccionados independientemente de nitrógeno, azufre y oxígeno. En algunas modalidades, el anillo heteroarilo tiene 5-6 átomos en el anillo y 1 o 2 miembros del anillo heteroátomo seleccionados independientemente de nitrógeno, azufre y oxígeno. En algunas modalidades, el heteroarilo es un anillo heteroarilo de cinco o seis miembros. En otras modalidades, el heteroarilo es un anillo heteroarilo bicíclico fusionado de ocho miembros, nueve miembros o diez miembros.

Un anillo heteroarilo de cinco miembros es un grupo heteroarilo que tiene cinco átomos en el anillo, en el que uno o más (por ejemplo, 1, 2 o 3) átomos en el anillo se seleccionan independientemente de N, O y S.

Un anillo heteroarilo de seis miembros es un grupo heteroarilo que tiene seis átomos en el anillo, en el que uno o más (por ejemplo, 1, 2 o 3) átomos en el anillo se seleccionan independientemente de N, O y S.

El término "cicloalquilo", empleado solo o en combinación con otros términos, se refiere a un sistema anular hidrocarbonado no aromático (monocíclico, bicíclico o policíclico), incluidos grupos alquilo y alquenilo ciclados. El término "cicloalquilo C_{n-m}" se refiere a un cicloalquilo que tiene n a m átomos de carbono en el miembro del anillo. Los grupos cicloalquilo pueden incluir grupos mono o policíclicos (por ejemplo, con 2, 3 o 4 anillos fusionados) y espirociclos. Los grupos cicloalquilo pueden tener 3, 4, 5, 6 o 7 carbonos formadores de anillos (C₃₋₇). En algunas modalidades, el grupo cicloalquilo tiene 3 a 6 miembros del anillo, 3 a 5 miembros del anillo o 3 a 4 miembros del anillo. En algunas modalidades, el grupo cicloalquilo es monocíclico. En algunas modalidades, el grupo cicloalquilo es monocíclico o bicíclico. En algunas modalidades, el grupo cicloalquilo es un grupo cicloalquilo monocíclico C₃₋₆. Los átomos de carbono formadores de anillo de un grupo cicloalquilo se pueden oxidar opcionalmente para formar un grupo oxo o sulfido. Los

grupos cicloalquilo también incluyen cicloalquilidenos. En algunas modalidades, cicloalquilo es ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo o ciclohexilo. También se incluyen en la definición de cicloalquilo restos que tienen uno o más anillos aromáticos fusionados (*es decir*, que tienen un enlace en común) con el anillo cicloalquilo, por ejemplo, derivados benzo o tienilo de ciclopentano, ciclohexano y similares. Un grupo cicloalquilo que contenga un anillo aromático fusionado se puede unir a través de cualquier átomo formador de anillo, incluido un átomo formador de anillo del anillo aromático fusionado. Los ejemplos de grupos cicloalquilo incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, ciclopentenilo, ciclohexenilo, ciclohexadienilo y similares. En algunas modalidades, el grupo cicloalquilo es ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo o ciclohexilo.

El término "heterocicloalquilo", empleado solo o en combinación con otros términos, se refiere a un anillo o sistema anular no aromático, que puede contener opcionalmente uno o más grupos alquilenilo como parte de la estructura del anillo, que tiene al menos un miembro del anillo heteroátomo seleccionado independientemente de nitrógeno, azufre, oxígeno y fósforo, y que tiene 4-10 miembros del anillo, 4-7 miembros del anillo o 4-6 miembros del anillo. Dentro del término "heterocicloalquilo" se incluyen grupos heterocicloalquilo monocíclicos de 4, 5, 6 y 7 miembros. Los grupos heterocicloalquilo pueden incluir sistemas anulares espirocíclicos o mono o bicíclicos (por ejemplo, con dos anillos fusionados o puenteados). En algunas modalidades, el anillo heterocicloalquilo es un grupo monocíclico que tiene 1, 2 o 3 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, azufre y oxígeno. Los átomos de carbono formadores de anillo y los heteroátomos de un grupo heterocicloalquilo se pueden oxidar opcionalmente para formar un grupo oxo o sulfido u otro enlace oxidado (por ejemplo, C(O), S(O), C(S) o S(O)₂, N-óxido, *etc.*) o se puede cuaternizar un átomo de nitrógeno. El grupo heterocicloalquilo puede estar unido a través de un átomo de carbono formador de anillo o un heteroátomo formador de anillo. En algunas modalidades, el grupo heterocicloalquilo contiene de 0 a 3 enlaces dobles. En algunas modalidades, el grupo heterocicloalquilo contiene de 0 a 2 enlaces dobles. También se incluyen en la definición de heterocicloalquilo restos que tienen uno o más anillos aromáticos

fusionados (*es decir*, que tienen un enlace en común) con el anillo heterocicloalquilo, por ejemplo, derivados benzo o tienilo de piridina, morfolina, azepina, etc. Un grupo heterocicloalquilo que contenga un anillo aromático fusionado se puede unir a través de cualquier átomo formador de anillo, incluido un átomo formador de anillo del anillo aromático fusionado. Los ejemplos de grupos heterocicloalquilo incluyen 2pirrolidinilo, morfolinul, azetidinilo y piperazinilo.

En ciertas partes, las definiciones o modalidades se refieren a anillos específicos (por ejemplo, un anillo azetidina, un anillo piridina, *etc.*). A menos que se indique lo contrario, estos anillos se pueden unir a cualquier miembro del anillo, siempre que no se exceda la valencia del átomo. Por ejemplo, un anillo azetidina puede estar unido en cualquier posición del anillo, mientras que un anillo azetidina-3-ilo está unido en la posición 3.

Los compuestos descritos en el presente documento pueden ser asimétricos (por ejemplo, tener uno o más estereocentros). Se prevén todos los estereoisómeros, tales como enantiómeros y diastereómeros, a menos que se indique lo contrario.

Los compuestos de la presente invención que contienen átomos de carbono sustituidos asimétricamente pueden aislarse en formas ópticamente activas o racémicas. Los métodos sobre cómo preparar formas ópticamente activas a partir de materiales de partida ópticamente inactivos son conocidos en la técnica, como mediante resolución de mezclas racémicas o mediante síntesis estereoselectiva. Muchos isómeros geométricos de olefinas, enlaces doble C=N y similares también pueden estar presentes en los compuestos descritos en el presente documento y todos estos isómeros estables se contemplan en la presente invención. Se describen los isómeros geométricos *cis* y *trans* de los compuestos de la presente invención y pueden aislarse como una mezcla de isómeros o como formas isoméricas separadas.

La resolución de mezclas racémicas de compuestos puede llevarse a cabo mediante cualquiera de los numerosos métodos conocidos en la técnica. Un método incluye la recristalización fraccional usando un ácido de resolución quiral que sea un ácido orgánico formador de sales y ópticamente activo. Los agentes de resolución adecuados para los métodos de recristalización fraccional son, por

ejemplo, ácidos ópticamente activos, tales como las formas D y L de ácido tartárico, ácido diacetiltartárico, ácido dibenzoiltartárico, ácido mandélico, ácido málico, ácido láctico o los diversos ácidos canforsulfónicos ópticamente activos como ácido β -canforsulfónico. Otros agentes de resolución adecuados para los métodos de
5 cristalización fraccional incluyen formas estereoisoméricamente puras de α -metilbencilamina (por ejemplo, formas *S* y *R*, o formas diastereoméricamente puras), 2-fenilglicinol, norefedrina, efedrina, *N*-metilefedrina, ciclohexiletilamina, 1,2-diaminociclohexano y similares.

La resolución de mezclas racémicas también se puede llevar a cabo mediante
10 elución en una columna cargada con un agente de resolución ópticamente activo (por ejemplo, dinitrobenzoilfenilglicina). La composición de disolvente de elución adecuada puede ser determinada por un experto en la técnica.

En algunas modalidades, los compuestos de la invención tienen la configuración (*R*). En otras modalidades, los compuestos de la invención tienen la configuración
15 (*S*). En compuestos con más de un centro quiral, cada uno de los centros quirales en el compuesto puede ser independientemente (*R*) o (*S*), a menos que se indique lo contrario.

Los compuestos de la invención también incluyen formas tautoméricas. Las formas tautoméricas son el resultado del intercambio de un enlace simple por un enlace
20 doble adyacente junto con la migración concomitante de un protón. Las formas tautoméricas incluyen tautómeros prototrópicos que son estados de protonación isoméricos con la misma fórmula empírica y carga total. Los ejemplos de tautómeros prototrópicos incluyen pares de cetona - enol, pares de amida - ácido imídico, pares de lactama - lactim, pares de enamina - imina y formas anulares donde un protón
25 puede ocupar dos o más posiciones de un sistema heterocíclico, por ejemplo, 1*H*- y 3*H*-imidazol, 1*H*-, 2*H*- y 4*H*-1,2,4-triazol, 1*H*- y 2*H*-isoindol y 1*H*- y 2*H*-pirazol. Las formas tautoméricas pueden estar en equilibrio o bloqueadas estéricamente en una forma mediante la sustitución apropiada.

Los compuestos de la invención también pueden incluir todos los isótopos de
30 átomos que se produzcan en los compuestos intermedios o finales. Los isótopos incluyen los átomos que tienen el mismo número atómico pero diferentes números

de masa. Por ejemplo, los isótopos de hidrógeno incluyen tritio y deuterio. Uno o más átomos constituyentes de los compuestos de la invención pueden remplazarse o sustituirse con isótopos de los átomos en una abundancia natural o no natural. En algunas modalidades, el compuesto incluye al menos un átomo de deuterio. Por ejemplo, uno o más átomos de hidrógeno en un compuesto de la presente descripción se pueden remplazar o sustituir con deuterio. En algunas modalidades, el compuesto incluye dos o más átomos de deuterio. En algunas modalidades, el compuesto incluye 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 átomos de deuterio. Los métodos sintéticos para incluir isótopos en compuestos orgánicos son conocidos en la técnica (Deuterium Labeling in Organic Chemistry de Alan F. Thomas (Nueva York, N.Y., Appleton-Century-Crofts, 1971; The Renaissance of H/D Exchange de Jens Atzrodt, Volker Derdau, Thorsten Fey y Jochen Zimmermann, Angew. Chem. Int. Ed. 2007, 7744-7765; The Organic Chemistry of Isotopic Labelling de James R. Hanson, Royal Society of Chemistry, 2011). En varios estudios se pueden usar compuestos marcados isotópicamente, como en espectroscopía de RMN, experimentos de metabolismo y/o ensayos.

La sustitución con isótopos más pesados, como deuterio, puede proporcionar ciertas ventajas terapéuticas que surgen de una mayor estabilidad metabólica, por ejemplo, una mayor vida media in vivo o requisitos de dosificación reducidos y, por lo tanto, puede ser preferible en algunas circunstancias. (A. Kerekes et ál. *J. Med. Chem.* **2011**, 54, 201-210; R. Xu et ál. *J. Label Compd. Radiopharm.* **2015**, 58, 308-312).

El término "compuesto", como se usa en el presente documento, pretende incluir todos los estereoisómeros, isómeros geométricos, tautómeros e isótopos de las estructuras representadas. El término también se refiere a los compuestos de las invenciones, independientemente de cómo se preparen, por ejemplo, sintéticamente, a través de un proceso biológico (por ejemplo, metabolismo o conversión enzimática) o una combinación de estos.

Todos los compuestos y sus sales farmacéuticamente aceptables se pueden encontrar junto con otras sustancias tales como agua y disolventes (por ejemplo, hidratos y solvatos) o se pueden aislar. Cuando se encuentran en estado sólido, los

compuestos descritos en el presente documento y sus sales pueden presentarse en diversas formas y pueden, por ejemplo, tomar la forma de solvatos, incluidos hidratos. Los compuestos pueden estar en cualquier forma de estado sólido, como un polimorfo o solvato, por lo que, a menos que se indique claramente lo contrario, la referencia en la memoria descriptiva a compuestos y sus sales debe entenderse como inclusiva de cualquier forma de estado sólido del compuesto.

En algunas modalidades, los compuestos de la invención o sus sales están sustancialmente aislados. Por "sustancialmente aislado" se entiende que el compuesto está al menos parcial o sustancialmente separado del entorno en el que se formó o detectó. La separación parcial puede incluir, por ejemplo, una composición enriquecida en los compuestos de la invención. La separación sustancial puede incluir composiciones que contengan al menos alrededor de 50 %, al menos alrededor de 60 %, al menos alrededor de 70 %, al menos alrededor de 80 %, al menos alrededor de 90 %, al menos alrededor de 95 %, al menos alrededor de 97 % o al menos alrededor de 99 % en peso de los compuestos de la invención o su sal.

La frase "farmacéuticamente aceptable" se emplea en la presente para referirse a aquellos compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que, dentro del alcance del buen juicio médico, son adecuadas para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin irritación, respuesta alérgica, toxicidad excesiva u otro problema o complicación, acorde a una relación razonable entre beneficio y riesgo.

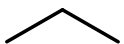
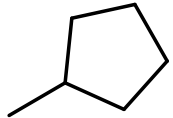
La expresión "temperatura ambiente", como se usa en el presente documento, se entiende en la técnica y se refiere generalmente a una temperatura, por ejemplo, una temperatura de reacción, que es aproximadamente la temperatura de la habitación en la que se lleva a cabo la reacción, por ejemplo, una temperatura de alrededor de 20 °C a alrededor de 30 °C.

La presente invención también incluye sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos descritos en la presente. El término "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a derivados de los compuestos descritos en los que el compuesto original se modifica convirtiendo un resto ácido o básico existente en su

forma salina. Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen, de modo no taxativo, sales de ácidos minerales u orgánicos de residuos básicos tales como aminas, sales alcalinas u orgánicas de residuos ácidos tales como ácidos carboxílicos y similares. Las sales farmacéuticamente aceptables de la presente invención incluyen las sales no tóxicas del compuesto original formado, por ejemplo, a partir de ácidos inorgánicos u orgánicos no tóxicos. Las sales farmacéuticamente aceptables de la presente invención se pueden sintetizar a partir del compuesto original que contiene un resto básico o ácido a través de métodos químicos convencionales. Generalmente, tales sales se pueden preparar haciendo reaccionar las formas de ácido o base libres de estos compuestos con una cantidad estequiométrica de la base o el ácido apropiados en agua o en un disolvente orgánico o en una mezcla de los dos; en general, se prefieren medios no acuosos como éter, acetato de etilo, alcoholes (por ejemplo, metanol, etanol, iso-propanol o butanol) o acetonitrilo (MeCN). Se encuentran listas de sales adecuadas en *Remington Pharmaceutical Sciences*, 17^a ed., (Mack Publishing Company, Easton, 1985), p. 1418, Berge *et ál.*, *J. Pharm. Sci.*, **1977**, 66(1), 1-19 y en Stahl *et ál.*, *Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use*, (Wiley, 2002). En algunas modalidades, los compuestos descritos en el presente documento incluyen las formas de N-óxido.

Como se entiende en la técnica, se usa el símbolo  en fórmulas estructurales para indicar el enlace que es el punto de unión del resto que lo contiene con la porción adyacente del compuesto. Según una convención similar, los átomos de carbono colgantes y sus átomos de hidrógeno unidos pueden no expresarse

explícitamente. Por lo tanto, el símbolo  representa un grupo metilo, el

símbolo  representa un grupo etilo, el símbolo  representa un grupo ciclopentilo y así sucesivamente. La orientación de un grupo sustituyente en una molécula o un resto está representada por la convención de que el símbolo



representa un enlace en el que el grupo se proyecta desde el plano de la

página hacia el lector, mientras que el símbolo  representa un enlace en que el grupo se proyecta detrás del plano de la página y en sentido opuesto al lector y



el símbolo representa un enlace en el que el grupo tiene una orientación

5 indeterminada (es decir, el compuesto es diastereomérico).

A menos que se indique lo contrario, todos los términos que se usan en la presente memoria descriptiva se entenderán en su significado ordinario como se conoce en la técnica. Por ejemplo, "alquilo C₁₋₄" es un radical monovalente hidrocarbonado alifático saturado que contiene 1-4 carbonos tales como metilo, etilo, *n*-propilo, 1-
10 metiletilo (isopropilo), *n*-butilo o *t*-butilo; "alcoxi C₁₋₄" es un alquilo C₁₋₄ con un oxígeno terminal, tal como metoxi, etoxi, propoxi, butoxi. Todos los grupos alquilo, alquenilo y alquinilo se entenderán como ramificados o no ramificados, ciclados o no ciclados cuando sea estructuralmente posible y a menos que se especifique lo contrario. Las siguientes son otras definiciones más específicas:

15 El término "alquilo C_{1-n}", en el que *n* es un número entero de 2 a 6, solo o en combinación con otro radical, denota un radical hidrocarbonado acíclico, saturado, ramificado o lineal con 1 a *n* átomos de C. Por ejemplo, el término alquilo C₁₋₅ abarca los radicales H₃C-, H₃C-CH₂-, H₃C-CH₂-CH₂-, H₃C-CH(CH₃)-, H₃C-CH₂-CH₂-CH₂-,
20 H₃C-CH₂-CH(CH₃)-, H₃C-CH(CH₃)-CH₂-, H₃C-C(CH₃)₂-, H₃C-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-,
H₃C-CH₂-CH₂-CH(CH₃)-, H₃C-CH₂-CH(CH₃)-CH₂-, H₃C-CH(CH₃)-CH₂-CH₂-, H₃C-CH₂-C(CH₃)₂-,
H₃C-C(CH₃)₂-CH₂-, H₃C-CH(CH₃)-CH(CH₃)- y H₃C-CH₂-CH(CH₂CH₃)-.

El término "alquilo C_{3-n}", en el que *n* es un número entero de 4 a 7, solo o en combinación con otro radical, denota un radical hidrocarbonado cíclico, saturado y
25 no ramificado con 3 a *n* átomos de C. Por ejemplo, el término cicloalquilo C₃₋₇ incluye ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo y cicloheptilo.

El término "heteroátomo", como se usa en el presente documento, se entenderá como sinónimo de átomos distintos a carbono, tales como O, N, S y P.

En algunas modalidades, grupos alquilo o cadenas de carbono, uno o más átomos

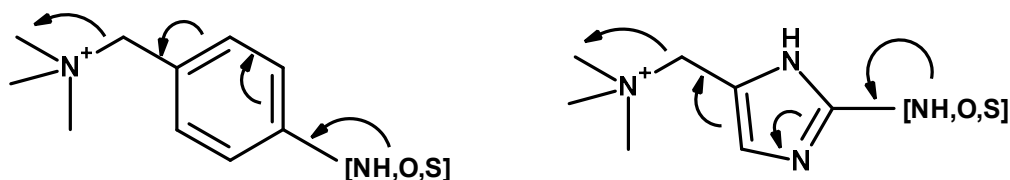
de carbono se pueden remplazar opcionalmente con heteroátomos: O, S o N. Se entenderá que si N no se representa como sustituido, entonces es NH, y que los heteroátomos pueden remplazar los átomos de carbono terminales o los átomos de carbono internos dentro de una cadena de carbono ramificada o no ramificada.

- 5 Dichos grupos pueden sustituirse como se describió anteriormente en este documento con grupos tales como oxo para dar como resultado definiciones tales como, de modo no taxativo: alcoxicarbonilo, acilo, amido y tioxo.

En algunas modalidades, el término "arilo" como se usa en el presente documento, ya sea solo o en combinación con otro radical, denota un grupo monocíclico aromático carbocíclico que contiene 6 átomos de carbono que pueden fusionarse
10 adicionalmente con un segundo grupo carbocíclico de 5 o 6 miembros que puede ser aromático, saturado o insaturado. Arilo incluye, de modo no taxativo, fenilo, indanilo, indenilo, naftilo, antracenilo, fenantrenilo, tetrahidronaftilo y dihidronaftilo.

- En algunas modalidades, el término "heteroarilo" (a veces abreviado "hetarilo")
15 significa un heteroarilo monocíclico aromático de 5 a 6 miembros o un anillo heteroarilo bicíclico aromático de 7 a 11 miembros donde al menos uno de los anillos es aromático, en donde el anillo heteroarilo contiene 1-4 heteroátomos tales como N, O y S. Los ejemplos no taxativos de anillos heteroarilo monocíclicos de 5 a 6 miembros incluyen furanilo, oxazolilo, isoxazolilo, oxadiazolilo, tiazolilo, pirazolilo,
20 pirrolilo, imidazolilo, tetrazolilo, triazolilo, tienilo, tiadiazolilo, piridinilo, pirimidinilo, piridazinilo, pirazinilo, triazinilo y purinilo. Los ejemplos no taxativos de anillos heteroarilo bicíclicos heteroarilo de 7 a 11 miembros incluyen bencimidazolilo, quinolinilo, dihidro-2*H*-quinolinilo, tetrahidroquinolinilo, isoquinolinilo, quinazolinilo, indazolilo, tieno[2,3-*d*]pirimidinilo, indolilo, isoindolilo, benzofuranilo,
25 dihidrobenzofuranilo, benzopiranilo, benzodioxolilo, benzoxazolilo y benzotiazolilo.

Como se usa en Q, la definición de "arilo y hetarilo" es como se describió anteriormente. Son preferiblemente fenilo o imidazoilo, tales como los siguientes restos que, junto con [NH,O,S], experimentan químicamente inmolación para liberar R₈H como se describe a continuación.



En algunas modalidades, el término "heterociclilo" significa un radical heterocíclico monocíclico no aromático estable de 4-8 miembros o un radical heterocíclico fusionado bicíclico, bicíclico puenteado o espirocíclico estable y no aromático de 6 a 11 miembros. El heterociclo de 5 a 11 miembros consta de átomos de carbono y uno o más, preferiblemente de uno a cuatro, heteroátomos elegidos de nitrógeno, oxígeno y azufre. El heterociclo puede estar saturado o parcialmente insaturado. Los ejemplos no taxativos de radicales heterocíclicos monocíclicos de 4-8 miembros no aromáticos incluyen tetrahidrofurano, azetidino, pirrolidino, pirano, tetrahidropirano, dioxano, tiomorfolino, 1,1-dioxo-1λ⁶-tiomorfolino, morfolino, piperidino, piperazino y azepino. Los ejemplos no taxativos de radicales bicíclicos fusionados no aromáticos de 6 a 11 miembros incluyen octahidroindolilo, octahidrobenzofuranilo y octahidrobenzotiofenilo. Los ejemplos no taxativos de radicales bicíclicos puenteados no aromáticos de 6 a 11 miembros incluyen 2-azabicyclo[2.2.1]heptano, 3-azabicyclo[3.1.0]hexano y 3-azabicyclo[3.2.1]octano. Los ejemplos no taxativos de radicales heterocíclicos espirocíclicos no aromáticos de 6 a 11 miembros incluyen 7-aza-espiro[3,3]heptano, 7-espiro[3,4]octano y 7-aza-espiro[3,4]octano. El término "heterociclilo" incluye todas las formas isoméricas posibles.

El término "halógeno" y el término "halo" correspondiente, tal como se usan en la presente memoria descriptiva, se entenderán con el significado de bromo, cloro, flúor/fluoro o yodo. Las definiciones "halogenado", "parcial o totalmente halogenado", "parcialmente o totalmente fluorado", "sustituido por uno o más átomos de halógeno" incluyen, por ejemplo, derivados mono, di o tri halo en uno o más átomos de carbono. Para alquilo, los ejemplos no taxativos serían -CH₂CHF₂, -CF₃, etc.

Se entenderá que cada alquilo, cicloalquilo, heterociclo, arilo o heteroarilo o sus análogos descritos en la presente están opcionalmente parcial o totalmente

halogenados.

Como se usan en el presente documento, "nitrógeno" o "N" y "azufre" o "S" incluyen cualquier forma oxidada de nitrógeno y azufre y la forma cuaternizada de cualquier nitrógeno básico. Por ejemplo, a menos que se especifique lo contrario, se entenderá que un radical -S-alquilo C₁₋₆ incluye -S(O)-alquilo C₁₋₆ y -S(O)₂-alquilo C₁₋₆; del mismo modo, -S-R_a puede representarse como fenil-S(O)_m- cuando R_a es fenilo y donde m es 0, 1 o 2.

A menos que se indique específicamente, a lo largo de la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, una fórmula o un nombre químicos específicos abarcarán tautómeros y todos los estereoisómeros, isómeros ópticos y geométricos (por ejemplo, enantiómeros, diastereómeros, isómeros E/Z, etc.) y sus racematos, así como mezclas en diferentes proporciones de los enantiómeros separados, mezclas de diastereómeros o mezclas de cualquiera de las formas anteriores donde existan dichos isómeros y enantiómeros, así como sales, incluidas las sales farmacéuticamente aceptables de estos y solvatos de estos tales como, por ejemplo, hidratos que incluyen solvatos de los compuestos libres o solvatos de una sal del compuesto. En los péptidos R₇, los aminoácidos pueden tener en su totalidad la configuración L, en su totalidad la configuración D o una mezcla de configuración D y L.

Los compuestos de la invención también incluyen sus formas marcadas isotópicamente. Una forma marcada isotópicamente de un compuesto de la presente invención es idéntica a dicho agente activo salvo por el hecho de que uno o más átomos de dicho compuesto han sido remplazados por un átomo o átomos que tienen una masa atómica o un número de masa diferente a la masa atómica o el número de masa de dicho átomo según se encuentra generalmente en la naturaleza. Los ejemplos de isótopos fácilmente disponibles en el mercado y que se pueden incorporar en un compuesto de la presente invención de acuerdo con procedimientos bien establecidos incluyen isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, fósforo, flúor y cloro, por ejemplo, ²H (deuterio o "D"), ³H, ¹³C, ¹⁴C, ¹⁵N, ¹⁸O, ¹⁷O, ³¹P, ³²P, ³⁵S, ¹⁸F y ³⁶Cl, respectivamente. Un compuesto de la presente invención, un profármaco de este o una sal farmacéuticamente aceptable

de cualquiera de estos contiene uno o más de los isótopos mencionados anteriormente y/o se contempla que otros isótopos de otros átomos estén dentro del alcance de la presente invención.

La invención incluye derivados farmacéuticamente aceptables de compuestos de la fórmula (I). El término "derivado farmacéuticamente aceptable" se refiere a cualquier sal o éster farmacéuticamente aceptables o cualquier otro compuesto que, tras la administración a un paciente, pueda proporcionar (directa o indirectamente) un compuesto útil de la invención o un metabolito farmacológicamente activo o residuo farmacológicamente activo de este. Se entenderá que un metabolito farmacológicamente activo significa cualquier compuesto de la invención capaz de ser metabolizado enzimática o químicamente. Esto incluye, por ejemplo, compuestos de derivados hidroxilados u oxidados de la fórmula (I).

Tal como se usa en la presente, el término "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a derivados de los compuestos descritos en los que el compuesto original se modifica realizando sales ácidas o básicas de este. Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen, de modo no taxativo, sales de ácidos minerales u orgánicos de residuos básicos tales como aminas, sales alcalinas u orgánicas de residuos ácidos tales como ácidos carboxílicos y similares. Por ejemplo, tales sales incluyen acetatos, ascorbatos, bencenosulfonatos, benzoatos, besilatos, bicarbonatos, bitartratos, bromuros/bromhidratos, edetatos, camsilatos, carbonatos, cloruros/clorhidratos, citratos, edisilatos, etano disulfonatos, estolatos esilatos, fumaratos, gluceptatos, gluconatos, glutamatos, glicolatos, glicolilarsnilatos, hexilresorcinatos, hidrabaminas, hidroximaleatos, hidroxinaftoatos, yoduros, isotionatos, lactatos, lactobionatos, malatos, maleatos, mandelatos, metanosulfonatos, metilbromuros, metilnitratos, metilsulfatos, mucados, napsilatos, nitratos, oxalatos, pamoatos, pantotenatos, fenilacetatos, fosfatos/difosfatos, poligalacturonatos, propionatos, salicilatos, estearatos, subacetatos, succinatos, sulfamidas, sulfatos, tanatos, tartratos, teoclatos, toluenosulfonatos, trietilyoduros, amonio, benzatinas, cloroprocaínas, colinas, dietanolaminas, etilendiaminas, megluminas y procaínas. Se pueden formar otras sales farmacéuticamente aceptables con cationes de metales como aluminio, calcio, litio, magnesio, potasio,

sodio, zinc y similares. (Ver, por ejemplo, Pharmaceutical Salts, Birge, S.M. et ál., J. Pharm. Sci., (1977), 66, 1-19).

Las sales farmacéuticamente aceptables de la presente invención se pueden sintetizar a partir del compuesto original que contiene un resto básico o ácido a través de métodos químicos convencionales. Generalmente, tales sales se pueden preparar haciendo reaccionar las formas de ácido o base libres de estos compuestos con una cantidad suficiente de la base o el ácido apropiados en agua o en un disolvente orgánico como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol o acetonitrilo o una mezcla de estos.

10 Las sales de otros ácidos distintos a los mencionados anteriormente que, por ejemplo, son útiles para purificar o aislar los compuestos de la presente invención (por ejemplo, sales de acetato de trifluoro) también constituyen una parte de la invención.

Además, dentro del alcance de la invención se encuentran los profármacos de los compuestos de la fórmula (I). Los profármacos incluyen aquellos compuestos que, tras una simple transformación química, se modifican para producir los compuestos de la invención. Las transformaciones químicas simples incluyen hidrólisis, oxidación y reducción. Específicamente, cuando se le administra un profármaco a un paciente, el profármaco puede transformarse en un compuesto descrito anteriormente y de esa forma imparte el efecto farmacológico deseado. Al reservar el derecho condicionar o excluir cualquier miembro individual de dicho grupo, incluido cualquier subintervalo o combinación de subintervalos dentro del grupo, que puedan reivindicarse de acuerdo con un intervalo o de manera similar, es posible reivindicar menos que la totalidad de esta descripción por cualquier motivo. Además, al reservar el derecho de condicionar o excluir cualquier sustituyente, análogo, compuesto, ligando, estructura o grupo de estos individuales o cualquier miembro de un grupo reivindicado, se puede reivindicar menos de la totalidad de esta descripción por cualquier motivo.

Los términos "un/una" y "el/la" tienen la finalidad de incluir varias alternativas, por ejemplo, al menos una, a menos que se especifique lo contrario. Por ejemplo, la descripción de "un agente terapéutico" o "un compuesto" debe abarcar uno o

mezclas o combinaciones de más de un agente o compuesto terapéutico, respectivamente.

Si bien las composiciones y los métodos se describen con términos como "que comprenden" diversos componentes o etapas, las composiciones y los métodos
5 también pueden "consistir esencialmente en" o "consistir en" los diversos componentes o etapas. Por ejemplo, una composición farmacéutica descrita en el presente documento puede comprender, alternativamente, puede consistir esencialmente en o, alternativamente, puede consistir en (i) una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable
10 de este y (ii) un diluyente, excipiente o portador farmacéuticamente aceptables.

Síntesis

Los compuestos de la invención, incluidas sus sales, pueden prepararse usando técnicas de síntesis orgánica conocidas y pueden sintetizarse de acuerdo con
15 cualquiera de diversas rutas sintéticas posibles, tales como las de los esquemas a continuación.

Las reacciones para preparar compuestos de la invención pueden llevarse a cabo en disolventes adecuados que puede seleccionar fácilmente un experto en la técnica de síntesis orgánica. Los disolventes adecuados pueden ser
20 sustancialmente no reactivos con los materiales de partida (reactivos), los intermedios o productos a las temperaturas a las que se llevan a cabo las reacciones, por ejemplo, temperaturas que pueden variar desde la temperatura de congelación del disolvente hasta la temperatura de ebullición del disolvente. Una reacción dada puede llevarse a cabo en un disolvente o una mezcla de más de un
25 disolvente. Dependiendo de la etapa de reacción particular, el experto en la técnica puede seleccionar disolventes adecuados para una etapa de reacción particular.

La preparación de compuestos de la invención puede implicar la protección y desprotección de diversos grupos químicos. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente la necesidad de protección y desprotección, y la selección de
30 grupos protectores apropiados. La química de los grupos protectores se describe, por ejemplo, en Kocienski, *Protecting Groups*, (Thieme, 2007); Robertson,

Protecting Group Chemistry, (Oxford University Press, 2000); Smith *et ál.*, *March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure*, 6^a ed. (Wiley, 2007); Petursson *et ál.*, "Protecting Groups in Carbohydrate Chemistry", *J. Chem. Educ.*, 1997, 74(11), 1297; y Wuts *et ál.*, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 4.^a Ed., (Wiley, 2006).

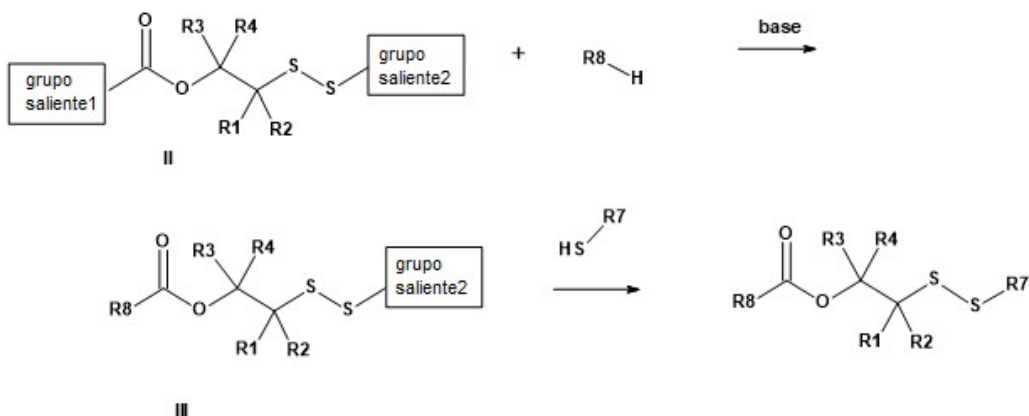
Las reacciones se pueden controlar de acuerdo con cualquier método adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, la formación del producto se puede controlar por medios espectroscópicos, como espectroscopía de resonancia magnética nuclear (por ejemplo, ^1H o ^{13}C), espectroscopía infrarroja, espectrofotometría (por ejemplo, UV-visible), espectrometría de masas o a través de métodos cromatográficos como la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC, por sus siglas en inglés) o cromatografía en capa fina (TLC, por sus siglas en inglés).

Los esquemas a continuación proporcionan una guía general en relación con la preparación de los compuestos de la invención. Un experto en la técnica entenderá que las preparaciones ilustradas en los esquemas pueden modificarse u optimizarse usando conocimientos generales de química orgánica para preparar diversos compuestos de la invención.

Los compuestos de la fórmula (I) se pueden preparar, por ejemplo, usando un proceso como se ilustra en los esquemas a continuación.

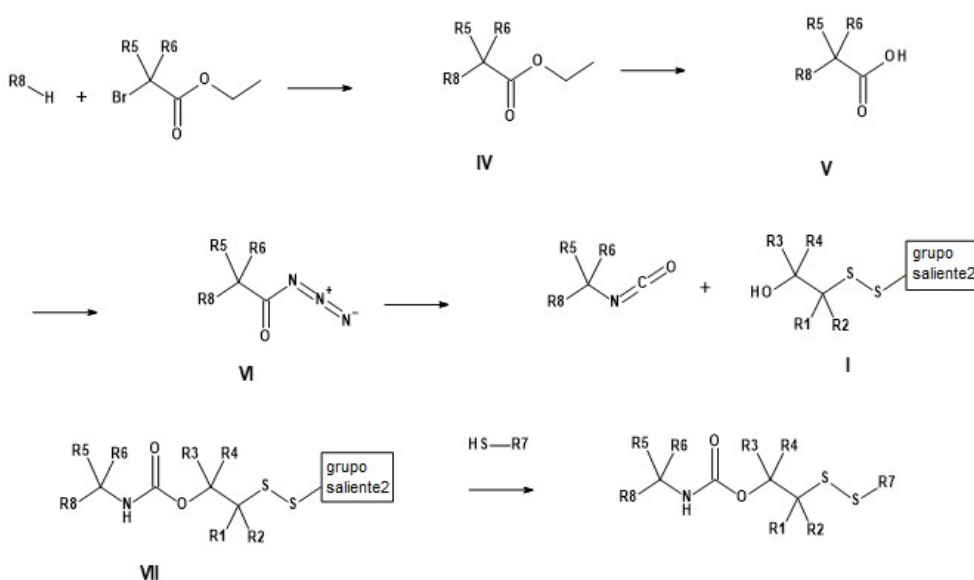
Como se muestra en el esquema 1, el intermedio II, que está flanqueado por grupos salientes ortogonales, puede hacerse reaccionar con un compuesto nucleofílico R^8H para dar el intermedio III. El intermedio III se hace reaccionar luego con un péptido que contiene tiol (HS-R^7) que participa en una reacción de intercambio de disulfuro para dar el compuesto final. Los grupos salientes adecuados se describen a continuación.

Esquema 1: síntesis de compuestos enlazados a carbonato y carbamato



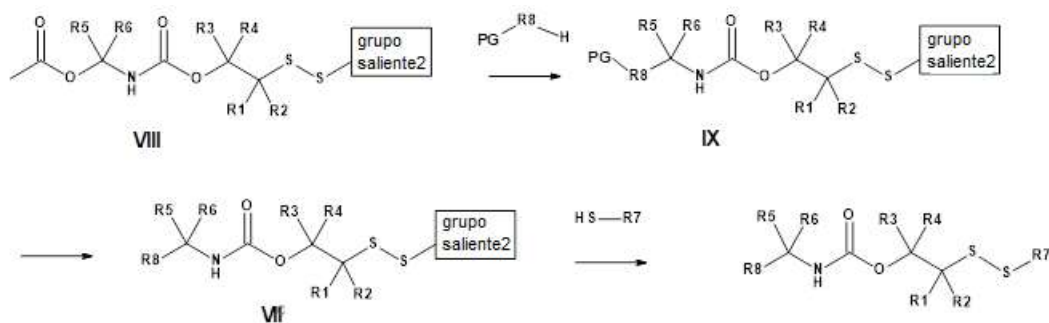
La síntesis de compuestos con enlace aminal se muestra en el esquema 2. Un compuesto nucleofílico R_8H se hace reaccionar con un derivado de ácido bromoacético para proporcionar el intermedio IV. Este intermedio que contiene éster se hidroliza en condiciones básicas para dar el ácido intermedio V. El ácido resultante se transforma en el intermedio de acil azida y luego se somete a condiciones de reorganización de Curtius. El isocianato transitorio correspondiente se atrapa con el intermedio I que contiene hidroxilo para dar el intermedio VII. El intermedio VII se hace reaccionar luego con un péptido que contiene tior (HS- R^7) que participa en una reacción de intercambio de disulfuro para dar el compuesto final.

Esquema 2: síntesis de compuestos con enlace aminal



En el esquema 3 se muestra una síntesis alternativa de conjugados con enlace amina. El R⁸-H nucleofílico, que puede incluir un grupo protector (PG, por sus siglas en inglés), se hace reaccionar con carbamato AcO-hemi-aminal VIII con un grupo saliente 2 con enlace preinstalado para dar intermedio IX. Este compuesto se trata con condiciones para eliminar el grupo protector y el compuesto VII resultante se hace reaccionar con R⁷-SH para dar el conjugado deseado.

10 Esquema 3: síntesis 2 de conjugados con enlace amina

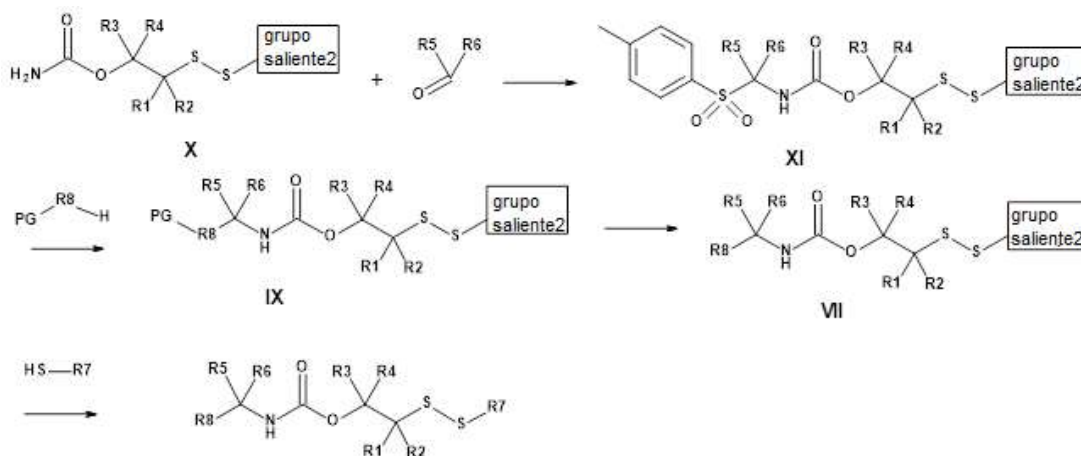


En el esquema 4 se muestra una síntesis alternativa adicional de conjugados con enlace amina. El carbamato primario X con un grupo saliente 2 con enlace preinstalado se hace reaccionar con un compuesto de carbonilo y sal sódica de p-toluenosulfonato para dar el carbamato de sulfonilo XI. Este se trata adicionalmente con R⁸-H nucleofílico con un grupo protector (PG) para dar IX. Este compuesto se trata como se describió previamente para dar el conjugado deseado.

20

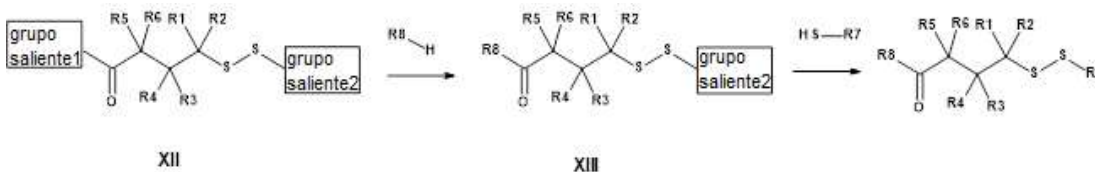
25

Esquema 4: síntesis 3 de conjugados con enlace amina



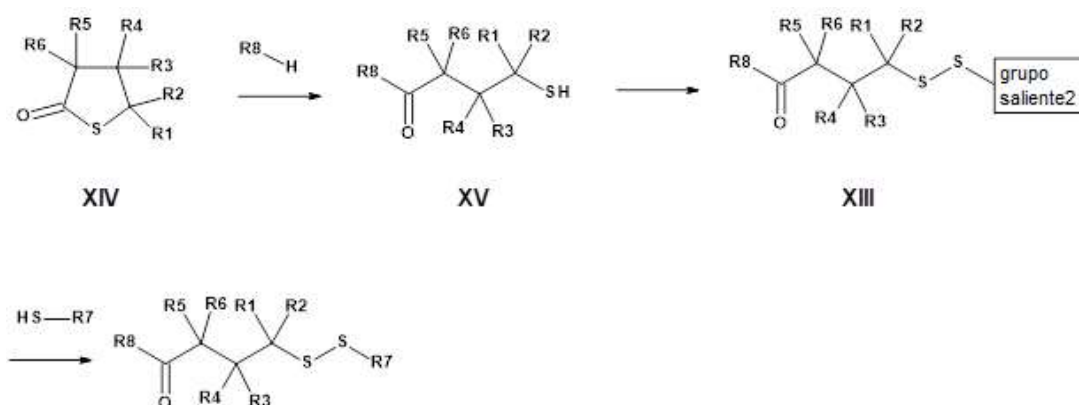
En el esquema 5 se muestra una síntesis ejemplar de conjugados enlazados a tiopropionato se muestra. El disulfuro de propionato XII con los grupos salientes 1 y 2 previamente instalados se hace reaccionar selectivamente con R^8-H nucleofílico para dar XII. Este compuesto se hace reaccionar adicionalmente con R^7-SH para proporcionar el conjugado deseado.

Esquema 5: síntesis 1 de conjugados enlazados a tiopropionato



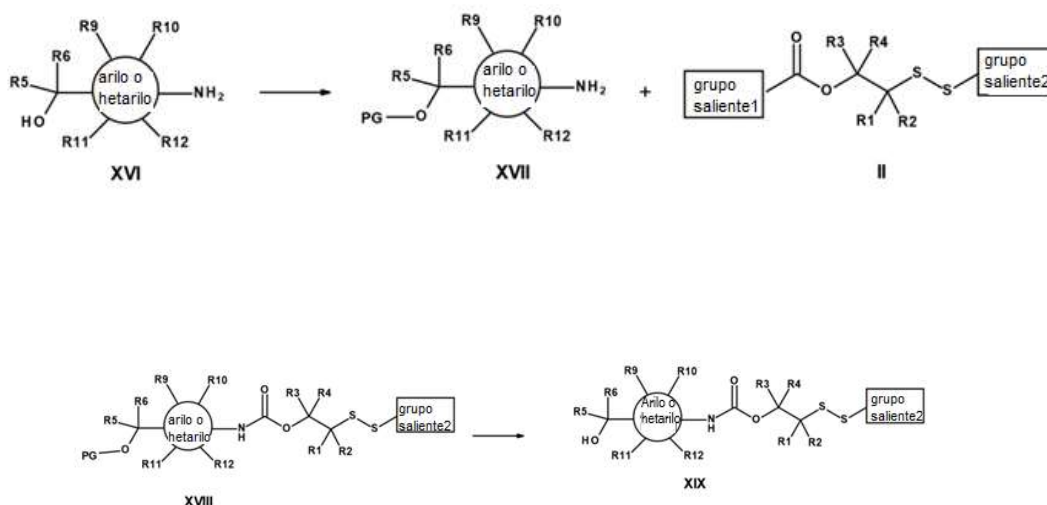
En el esquema 6 se muestra una síntesis alternativa de conjugados enlazados a tiopropionato. Se hace reaccionar tionoéster XVI con R^8-H nucleofílico para dar el propionato tiol XV. Este compuesto participa en una reacción de intercambio de disulfuro para proporcionar XIII. Este compuesto se trata con R^7-SH para proporcionar el conjugado deseado.

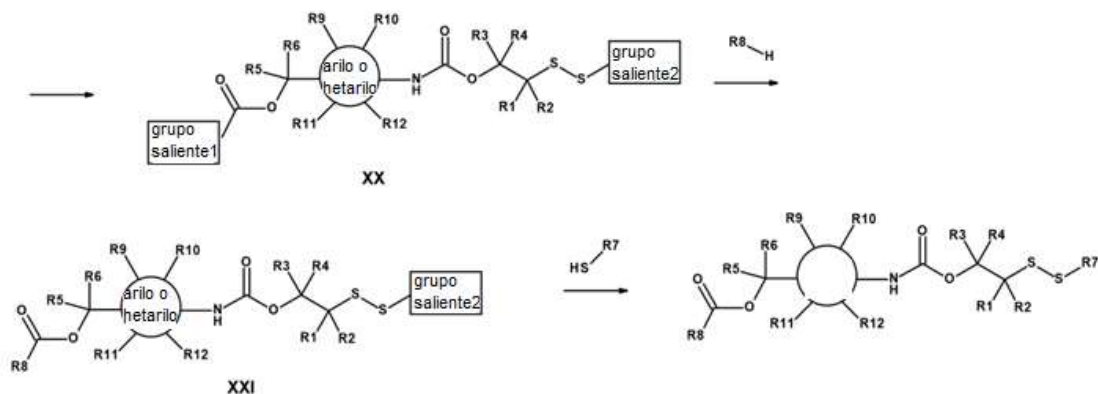
Esquema 6: síntesis 2 de conjugados enlazados a tiopropionato



En el esquema 7 se muestra la síntesis de conjugados con enlace benzoico. El alcohol paraaminobenzoico XVI se protege selectivamente en el oxígeno para dar XVII. Esto se hace reaccionar posteriormente en la posición de anilina con II para proporcionar el aril carbamato XVIII. Se elimina el grupo protector, lo cual brinda OH XIX libre que se trata con un agente activador para proporcionar XX que contiene grupos salientes ortogonales. La reacción de XX con R^8-H para dar XXI, seguida por R^7-SH proporciona el conjugado deseado.

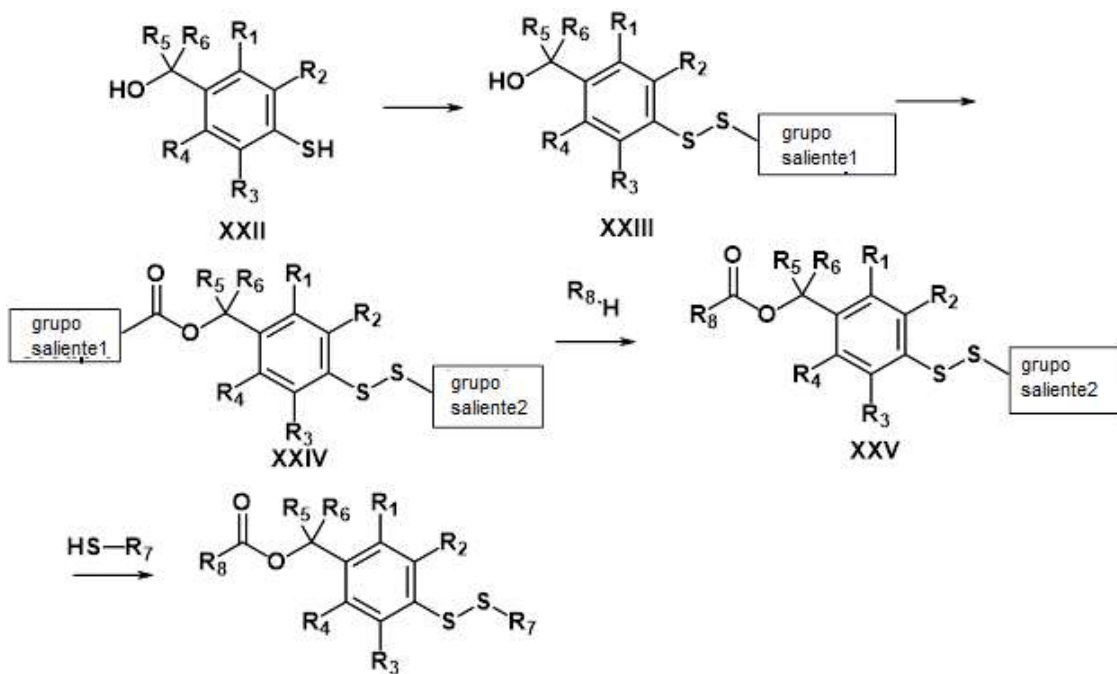
Esquema 7: síntesis 1 de conjugados con enlace parabenzoico





En el esquema 8 se muestra una síntesis alternativa de conjugados con enlace parabenzoico. Se hace reaccionar alcohol 4-mercapto benzoico XXII en una reacción de intercambio de disulfuro para dar disulfuro de alcohol 4-mercapto benzoico XXI que contiene el grupo saliente 2. El alcohol bencílico restante se trata para proporcionar el compuesto activado XXIV. Esto además se hace reaccionar selectivamente con R^8 -H nucleofílico y produce XXV con R^7 -SH para dar el conjugado deseado.

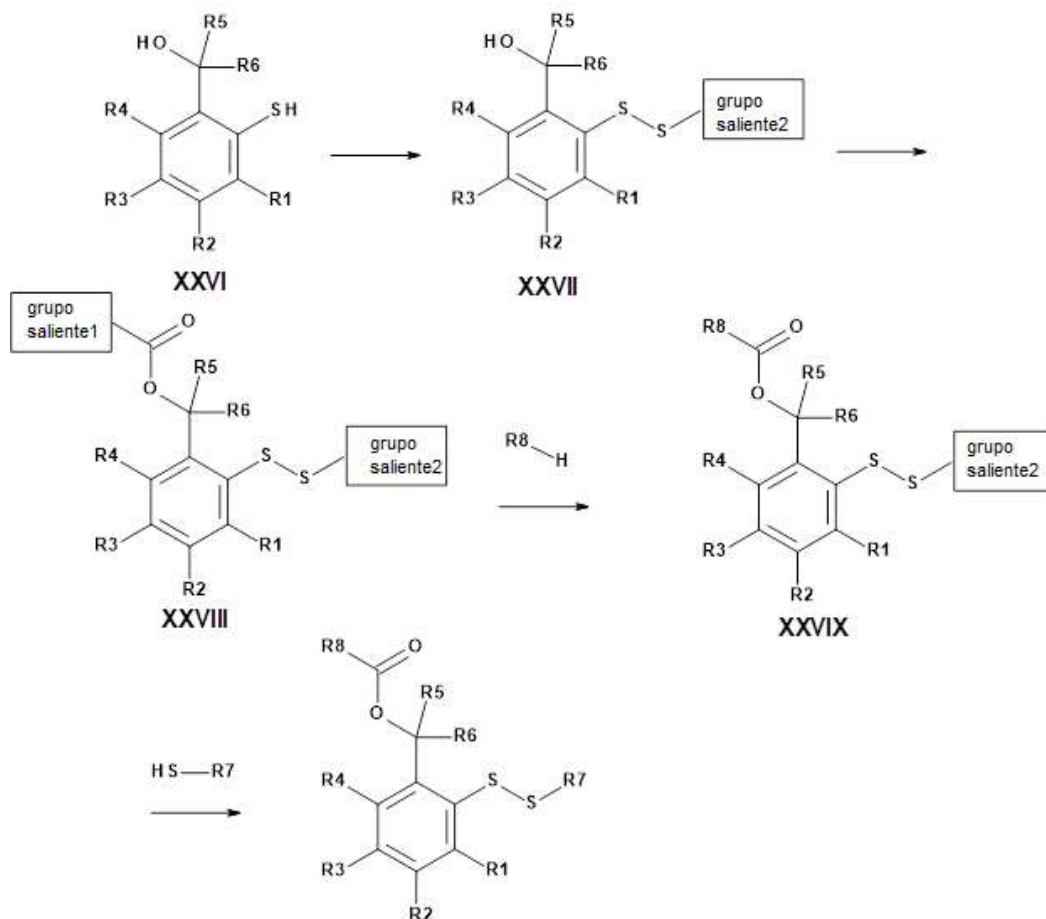
10 Esquema 8: síntesis 2 de conjugados con enlace parabenzoico



En el esquema 9 se muestra la síntesis de conjugados con enlace ortobenzoico. Se

hace reaccionar alcohol 2-mercapto benzoico XXVIII como se describió previamente para el esquema 8 para dar el conjugado deseado.

Esquema 9: síntesis de conjugados con enlace ortobenzoico



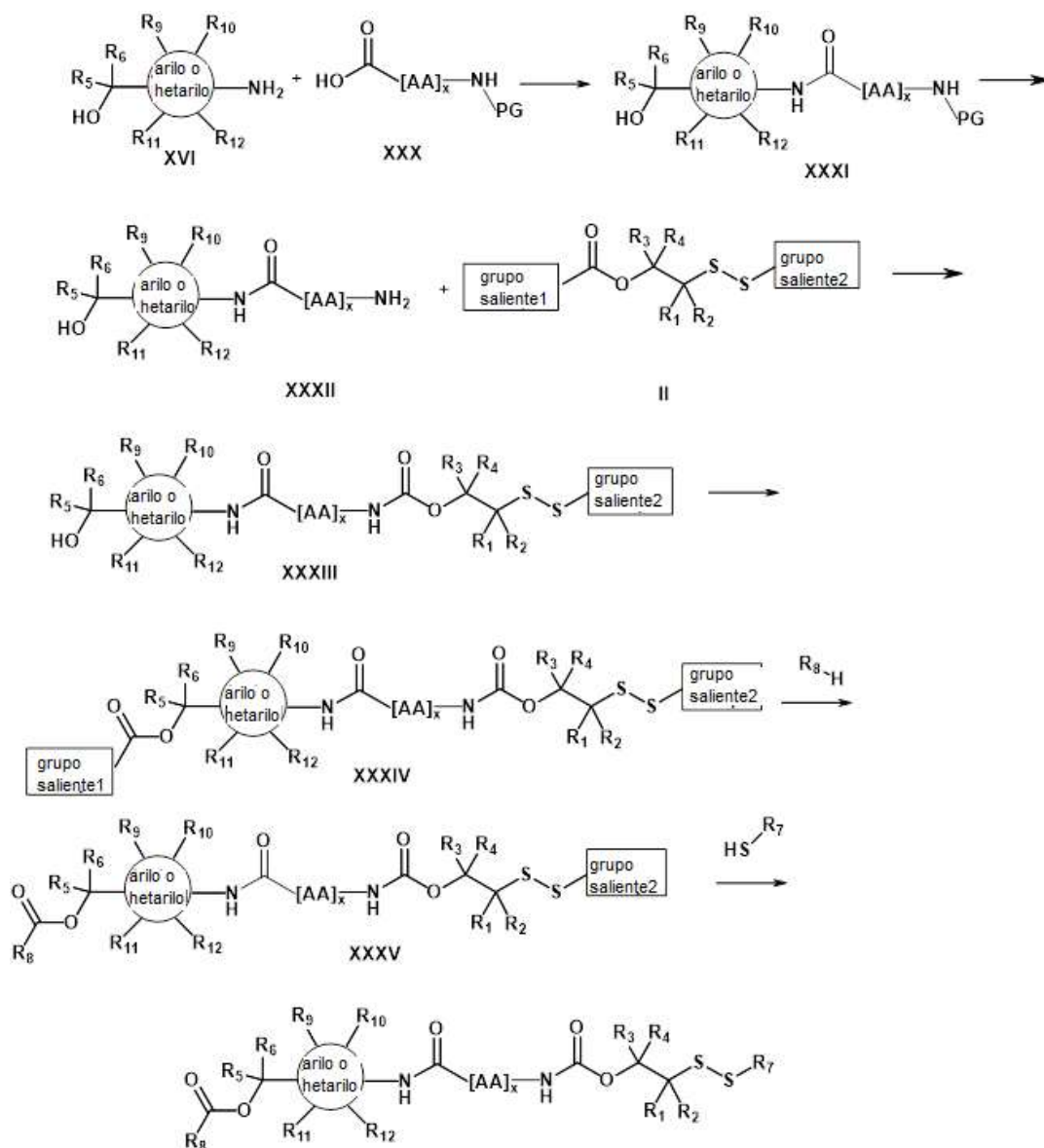
5

En el esquema 10 se muestra la síntesis de conjugados enlazados a carbamato benzoico de aminoácidos. Se puede acoplar selectivamente alcohol paraaminobenzoico/heterobenzoico XVI a un aminoácido protegido con N o péptido XXX para dar XXXI. El grupo protector se puede eliminar para proporcionar XXXII, que luego se hace reaccionar con II para dar el carbamato XXXIII con el grupo saliente 2 instalado. El alcohol se puede hacer reaccionar selectivamente para dar el carbonato XXXIV con el grupo saliente 1 presente. El grupo saliente 1 puede desplazarse posteriormente con R^8-H para dar XXXV, que se hace reaccionar con R^7-SH para proporcionar el conjugado enlazado a carbamato benzoico de

10

aminoácido deseado.

Esquema 10: síntesis de conjugados enlazados a carbamato benzoico de aminoácido



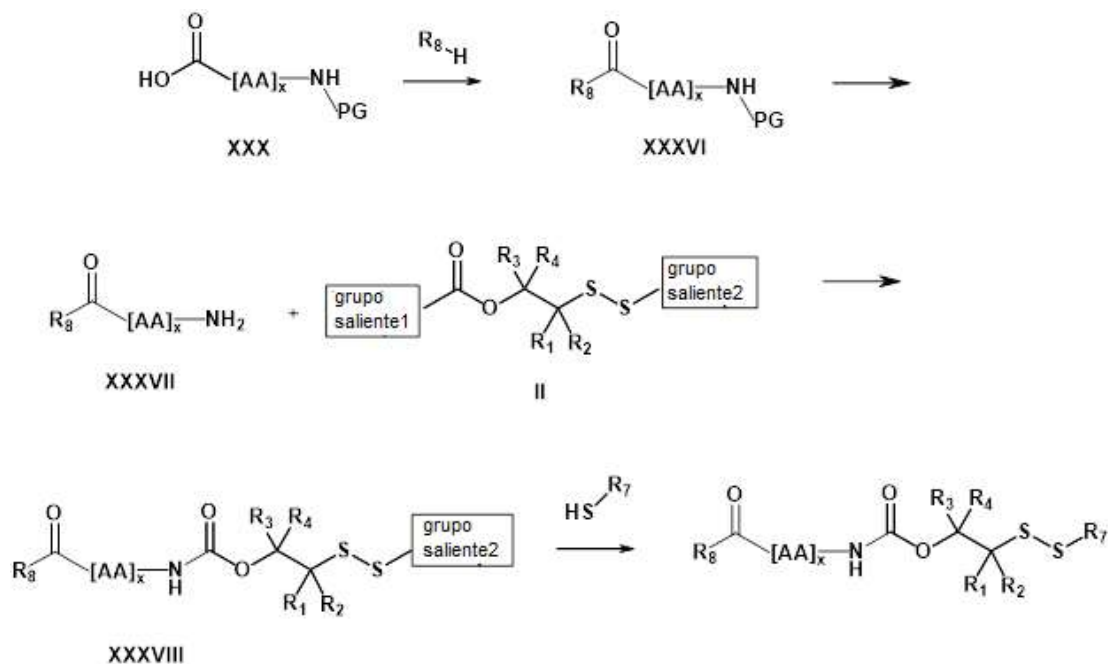
5

En el esquema 11 se muestra la síntesis de conjugados enlazados a aminoácidos. Se pueden acoplar aminoácidos protegidos con N o péptido XXX a R⁸-H para dar XXXVI. El grupo protector se puede eliminar para dar XXXVII, que se puede hacer reaccionar posteriormente con II, lo cual desplaza el grupo saliente 1 para dar XXXVIII. Este intermedio se puede tratar luego con R⁷-SH para proporcionar el

10

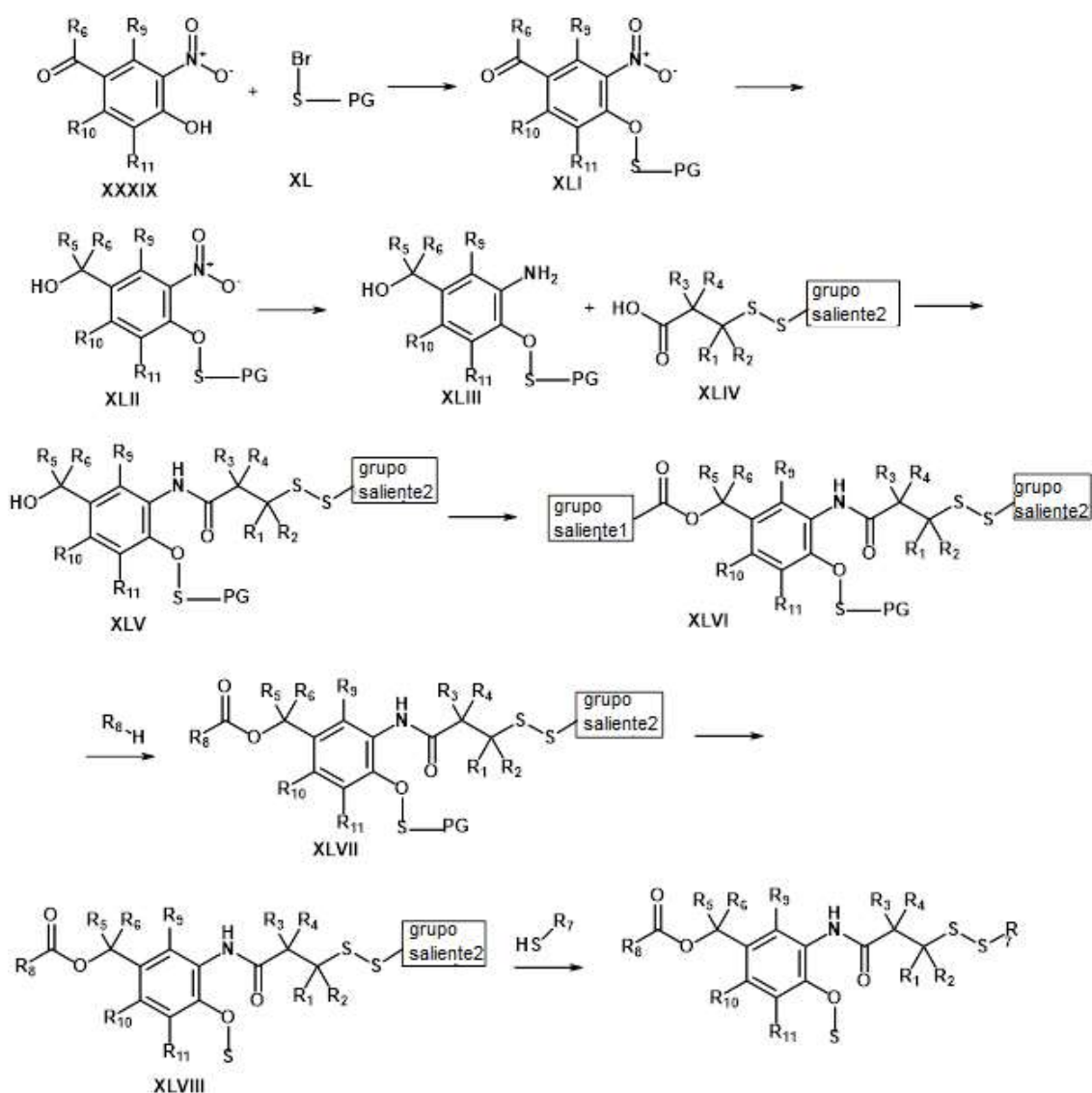
conjugado.

Esquema 11: síntesis de conjugados enlazados a aminoácido



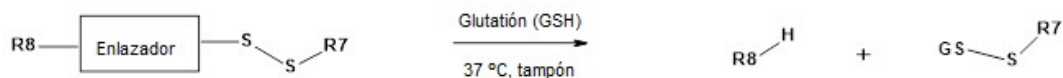
- 5 En el esquema 12 se muestra la síntesis de conjugados de glucurónido enlazados a alcohol benzoico. Se puede acoplar 2-nitrofenol XXXIX con glucurónido XL protegido para dar XLI. Este intermedio puede reducirse selectivamente en el carbonilo para dar alcohol XLII y luego el grupo nitro puede reducirse para proporcionar la anilina XLIII. Este intermedio se puede acoplar adicionalmente con
- 10 el derivado de ácido propiónico XLIV para dar la amida XLV que contiene el grupo saliente 2. Luego se puede hacer reaccionar XLV en el alcohol para instalar el grupo saliente 2, lo cual brinda XLVI. El grupo de salida 1 se puede desplazar selectivamente con R^8-H para dar XLVII. Se pueden retirar los grupos protectores en el glucurónido y XLVIII se pueden hacer reaccionar con R^7-SH para dar el
- 15 conjugado.

Esquema 12: síntesis de conjugados de glucorónido enlazados a alcohol benzoico



La escisión del compuesto final para liberar R^8H se puede lograr tratando el compuesto con un exceso de glutatión (GSH) en un tampón con incubación a 37 °C. Se usa análisis de HPLC de fase inversa en tiempo deseado para seguir el transcurso de la escisión.

Esquema 13: escisión de conjugados peptídicos



Los péptidos R⁷ pueden prepararse usando el método sintético en fase sólida descrito por primera vez por Merrifield en JACS, tomo 85, pág. 2149-2154 (1963), aunque también pueden emplearse otros métodos conocidos en la técnica. La técnica de Merrifield es muy comprendida y constituye un método común para la preparación de péptidos. Se describen técnicas útiles para la síntesis de péptidos en fase sólida en varios libros, como el texto "Principles of Peptide Synthesis" de Bodanszky, Springer Verlag 1984. Este método de síntesis implica la adición gradual de aminoácidos protegidos a una cadena peptídica en crecimiento que se encontraba enlazada mediante enlaces covalentes a una partícula de resina sólida. Mediante este procedimiento, los reactivos y subproductos se eliminan mediante filtración, lo cual elimina la necesidad de purificar los intermedios. El concepto general de este método depende de la unión del primer aminoácido de la cadena a un polímero sólido mediante un enlace covalente, seguido de la adición de los aminoácidos protegidos sucesivos, uno a la vez, de forma gradual hasta haber ensamblado la secuencia deseada. Finalmente, el péptido protegido se retira del soporte de resina sólida y se escinden los grupos protectores.

Los aminoácidos pueden estar unidos a cualquier polímero adecuado. El polímero debe ser insoluble en los disolventes utilizados, debe tener una forma física estable que permita una filtración fácil y debe contener un grupo funcional al que pueda unirse firmemente el primer aminoácido protegido mediante un enlace covalente. Varios polímeros son adecuados para este propósito, tales como celulosa, alcohol polivinílico, polimetilmetacrilato y poliestireno.

25 *Métodos de uso*

Otro aspecto de la presente invención es el uso de los compuestos de la fórmula (I) en el tratamiento de enfermedades que involucren tejido con enfermedades ácidas o hipóxicas, como cáncer, accidente cerebrovascular, infarto de miocardio o enfermedad neurodegenerativa a largo plazo. En algunas modalidades, el cáncer es sensible a PARP. En algunas modalidades, el cáncer está asociado con una

expresión o actividad anormal de ATM. En algunas modalidades, el cáncer está asociado con una expresión o actividad anormal de ATM. En algunas modalidades, el cáncer está asociado con una expresión o actividad anormal de DNA-PK. En algunas modalidades, el cáncer es un cáncer de mama con mutación de BRCA. En algunas modalidades, el cáncer es un cáncer de ovario con mutación de BRCA de línea germinal.

3. En estos métodos de tratamiento, se puede administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de este como agente único o en combinación con otras formas de terapia, tales como radiación ionizante o agentes citotóxicos en el caso del cáncer. En la terapia de combinación, el compuesto de la fórmula (I) puede administrarse antes, al mismo tiempo o después que la otra modalidad terapéutica, como apreciarán los expertos en la técnica. Cualquiera de los métodos de tratamiento (agente único o combinación con otras formas de terapia) puede administrarse como un curso de tratamiento que involucre múltiples dosis o tratamientos durante un período de tiempo. La descripción también proporciona métodos para reducir la toxicidad en la médula ósea asociada con la administración de una radiación ionizante o un agente citotóxico, que comprenden administrarle a un ser humano u otro mamífero una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la descripción o una sal farmacéuticamente aceptable de este en combinación con la radiación ionizante o el agente citotóxico. La reducción en la toxicidad de la médula ósea puede ser relativa a la toxicidad en la médula ósea observada cuando se administran la radiación ionizante o el agente citotóxico junto con R^8H en lugar del compuesto de la invención con el mismo R^8 (por ejemplo, donde el compuesto R^8H corresponde al resto de R^8 protonado del compuesto R^8-Q-R^7 de la invención). En algunas modalidades, la toxicidad se puede medir a través de la PARilación en tejido de la médula ósea. En algunas modalidades, la toxicidad se puede medir de acuerdo con las células totales de médula ósea nucleadas. En algunas modalidades, el agente citotóxico puede ser cualquiera de los indicados en la presente. En algunas modalidades, el agente citotóxico es temozolomida (TMZ).

- Los ejemplos de cánceres que se pueden tratar usando los compuestos de la presente descripción incluyen, de modo no taxativo, cáncer de hueso, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, melanoma maligno cutáneo o intraocular, cáncer uterino, cáncer de ovario, cáncer rectal, cáncer de la región anal,
- 5 cáncer de estómago, cáncer testicular, cáncer uterino, carcinoma de las trompas de Falopio, carcinoma del endometrio, cáncer endometrial, carcinoma del cuello uterino, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, cáncer del esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroides, cáncer de la glándula paratiroides,
- 10 cáncer de la glándula suprarrenal, sarcoma de tejidos blandos, cáncer de la uretra, cáncer del pene, leucemias crónicas o agudas que incluyen leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, tumores sólidos de la infancia, linfoma linfocítico, cáncer de vejiga, cáncer de riñón o uretra, carcinoma de la pelvis renal, neoplasia del sistema nervioso
- 15 central (SNC), linfoma primario del SNC, angiogénesis tumoral, tumor del eje espinal, glioma del tronco encefálico, adenoma pituitario, sarcoma de Kaposi, cáncer epidermoide, cáncer de células escamosas, linfoma de células T, cánceres inducidos por el medio ambiente, incluidos los inducidos por el amianto, y combinaciones de dichos cánceres.
- 20 En algunas modalidades, los cánceres que se pueden tratar con compuestos de la presente descripción incluyen melanoma (por ejemplo, melanoma maligno metastásico), cáncer renal (por ejemplo, carcinoma de células claras), cáncer de próstata (por ejemplo, adenocarcinoma de próstata refractario a hormonas), cáncer de mama, cáncer de mama triple negativo, cáncer de colon y cáncer de pulmón (por
- 25 ejemplo, cáncer de pulmón no microcítico y cáncer de pulmón microcítico). Además, la descripción incluye tumores malignos refractarios o recurrentes cuyo crecimiento puede inhibirse usando los compuestos de la descripción.
- En algunas modalidades, los cánceres que se pueden tratar usando los compuestos de la presente descripción incluyen, de modo no taxativo, tumores sólidos (por
- 30 ejemplo, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer de esófago, cáncer de endometrio, cáncer de ovario, cáncer de útero, cáncer renal, cáncer hepático,

cáncer de páncreas, cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cánceres de cabeza y cuello, cáncer de tiroides, glioblastoma, sarcoma, cáncer de vejiga, etc.), cánceres hematológicos (por ejemplo, linfoma, leucemia como leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia mielógena aguda (LMA), leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia mielógena crónica (LMC), DLBCL, linfoma de células del manto, linfoma no Hodgkin (incluido LNH recidivante o refractario y folicular recurrente), linfoma de Hodgkin o mieloma múltiple) y combinaciones de dichos cánceres.

En ciertas modalidades, un compuesto de la fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de este puede usarse en combinación con un agente quimioterapéutico, una terapia dirigida contra el cáncer, una inmunoterapia o radioterapia. Los agentes se pueden combinar con los presentes compuestos en una sola forma de dosificación o los agentes se pueden administrar simultáneamente o secuencialmente como formas de dosificación separadas. En algunas modalidades, el agente quimioterapéutico, la terapia dirigida contra el cáncer, la inmunoterapia o la radioterapia son menos tóxicos para el paciente, como en una menor toxicidad en la médula ósea, cuando se administran junto con un compuesto de la fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en comparación con la administración en combinación con el compuesto inhibidor de la reparación del ADN libre correspondiente (por ejemplo, R^8 -H), tal como un inhibidor de PARP, ATR, DNK-PK o ATM como se describe en el presente documento.

Los agentes quimioterapéuticos u otros agentes anticancerígenos adecuados incluyen, por ejemplo, agentes alquilantes (que incluyen, sin limitación, mostazas nitrogenadas, derivados de etilenimina, alquilsulfonatos, nitrosoureas y triazenos) tales como mostaza de uracilo, clormetina, ciclofosfamida (CytosanTM), ifosfamida, melfalán, clorambucilo, pipobromano, trietilen-melamina, trietilenofofosforamina, busulfano, carmustina, lomustina, estreptoizocina, dacarbazina y temozolomida.

Otros agentes adecuados para usar en combinación con los compuestos de la presente invención incluyen: dacarbazina (DTIC), opcionalmente, junto con otros fármacos de quimioterapia tales como carmustina (BCNU) y cisplatino; el "régimen de Dartmouth", que consiste en DTIC, BCNU, cisplatino y tamoxifeno; una

combinación de cisplatino, vinblastina y DTIC; o temozolomida. Los compuestos de acuerdo con la invención también se pueden combinar con fármacos de inmunoterapia, incluidas citocinas tales como interferón alfa, interleucina 2 y factor de necrosis tumoral (TNF, por sus siglas en inglés).

- 5 Los agentes quimioterapéuticos u otros agentes anticancerígenos adecuados incluyen, por ejemplo, antimetabolitos (que incluyen, sin limitación, antagonistas de ácido fólico, análogos de pirimidina, análogos de purina e inhibidores de adenosina desaminasa) tales como metotrexato, 5-fluorouracilo, floxuridina, citarabina, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, fosfato de fludarabina, pentostatina y gemcitabina.
- 10 Los agentes quimioterapéuticos u otros agentes anticancerígenos adecuados incluyen además, por ejemplo, ciertos productos naturales y sus derivados (por ejemplo, alcaloides de la vinca, antibióticos antitumorales, enzimas, linfocinas y epipodofilotoxinas) tales como vinblastina, vincristina, vindesina, bleomicina, dactinomicina, daunorrubicina, doxorubicina, epirubicina, idarrubicina, ara-C,
- 15 paclitaxel (TAXOLTM), mitramicina, desoxicoformicina, mitomicina-C, L-asparaginasa, interferones (especialmente IFN- α), etopósido y tenipósido.
Otros agentes citotóxicos que pueden administrarse en combinación con los compuestos de la invención incluyen, por ejemplo, navelbeno, CPT-11, anastrozol, letrozol, capecitabina, reloxafina, ciclofosfamida, ifosamida y droloxafina.
- 20 También son adecuados los agentes citotóxicos tales como, por ejemplo, epidofilotoxina, una enzima antineoplásica, un inhibidor de topoisomerasa, procarbazona, mitoxantrona, complejos de coordinación de platino tales como cisplatino y carboplatino, modificadores de la respuesta biológica, inhibidores del crecimiento, agentes terapéuticos antihormonales, leucovorina, tegafur y factores
- 25 de crecimiento hematopoyético.
Otros agentes anticancerígenos incluyen agentes terapéuticos de anticuerpos como trastuzumab (Herceptin), anticuerpos contra moléculas coestimuladoras como CTLA-4, 4-1BB y PD-1, o anticuerpos contra citocinas (IL-10, TGF- α , etc.).
Otros agentes anticancerígenos también incluyen aquellos que bloquean la
- 30 migración de las células inmunes, como los antagonistas de los receptores de quimiocinas, incluidos CCR2 y CCR4.

Otros agentes anticancerígenos también incluyen aquellos que aumentan el sistema inmunitario, como los adyuvantes o la transferencia adoptiva de células T.

Las vacunas contra el cáncer que se pueden administrar en combinación con los compuestos de la invención incluyen, por ejemplo, células dendríticas, péptidos sintéticos, vacunas de ADN y virus recombinantes.

Otros agentes adecuados para usar en combinación con los compuestos de la presente invención incluyen combinaciones de quimioterapia tales como dobletes basados en platino usados en cáncer de pulmón y otros tumores sólidos (cisplatino o carboplatino más gemcitabina; cisplatino o carboplatino más docetaxel; cisplatino o carboplatino más paclitaxel; cisplatino o carboplatino más pemetrexed) o gemcitabina más partículas enlazadas a paclitaxel (Abraxane®).

Los compuestos de esta invención pueden ser efectivos en combinación con agentes antihormonales para el tratamiento del cáncer de mama y otros tumores. Ejemplos adecuados son agentes antiestrógeno que incluyen, entre otros, tamoxifeno y toremifeno, inhibidores de aromatasa incluidos, entre otros, letrozol, anastrozol y exemestano, adrenocorticosteroides (por ejemplo, prednisona), progestinas (por ejemplo, acetato de megastrol) y antagonistas del receptor de estrógenos (por ejemplo, fulvestrant). Los agentes antihormonales adecuados que se usan para el tratamiento de cáncer de próstata y otros cánceres también se pueden combinar con compuestos de la presente invención. Estos incluyen antiandrógenos que incluyen, entre otros, flutamida, bicalutamida y nilutamida, análogos de la hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH, por sus siglas en inglés), incluidos leuprolida, goserelina, triptorelina e histrelina, antagonistas de LHRH (por ejemplo, degarelix) y bloqueadores de los receptores de andrógenos (por ejemplo, enzalutamida) y agentes que inhiben la producción de andrógenos (por ejemplo, abiraterona).

Los compuestos de la presente invención pueden combinarse o administrarse en secuencia con otros agentes contra las quinasas receptoras de la membrana, especialmente en pacientes que hayan desarrollado resistencia primaria o adquirida a la terapia dirigida. Estos agentes terapéuticos incluyen inhibidores o anticuerpos contra EGFR, Her2, VEGFR, c-Met, Ret, IGFR1 o Flt-3 y contra las proteínas

quinasas de fusión asociadas al cáncer, como Bcr-Abl y EML4-Alk. Los inhibidores contra EGFR incluyen gefitinib y erlotinib, y los inhibidores contra EGFR/Her2 incluyen, entre otros, dacomitinib, afatinib, lapitinib y neratinib. Los anticuerpos contra el EGFR incluyen, entre otros, cetuximab, panitumumab y necitumumab. Los inhibidores de c-Met pueden usarse en combinación con los compuestos de la invención. Estos incluyen onartumzumab, tivantnib e INC-280. Los agentes contra Abl (o Bcr-Abl) incluyen imatinib, dasatinib, nilotinib y ponatinib y aquellos contra Alk (o EML4-ALK) incluyen crizotinib.

Los inhibidores de la angiogénesis pueden ser eficaces en algunos tumores en combinación con los compuestos de la invención. Estos incluyen anticuerpos contra VEGF o VEGFR o inhibidores de quinasas de VEGFR. Los anticuerpos u otras proteínas terapéuticas contra VEGF incluyen bevacizumab y aflibercept. Los inhibidores de las quinasas VEGFR y otros inhibidores antiangiogénesis incluyen, entre otros, sunitinib, sorafenib, axitinib, cediranib, pazopanib, regorafenib, brivanib y vandetanib.

La activación de las vías de señalización intracelular es frecuente en el cáncer y los agentes que se dirigen a los componentes de estas vías se han combinado con agentes que se dirigen al receptor para mejorar la eficacia y reducir la resistencia. Los ejemplos de agentes que pueden combinarse con los compuestos de la presente invención incluyen inhibidores de la vía PI3K-AKT-mTOR, inhibidores de la vía Raf-MAPK, inhibidores de la vía JAK-STAT e inhibidores de las proteínas chaperonas y el avance del ciclo celular.

Los agentes contra la PI3 quinasa incluyen, entre otros, topilralisib, idelalisib, buparlisib. Los inhibidores de mTOR tales como rapamicina, sirolimus, temsirolimus y everolimus pueden combinarse con los compuestos de la invención. Otros ejemplos adecuados incluyen, entre otros, vemurafenib y dabrafenib (inhibidores de Raf) y trametinib, selumetinib y GDC-0973 (inhibidores de MEK). Los inhibidores de una o más JAK (por ejemplo, ruxolitinib, baricitinib, tofacitinib), Hsp90 (por ejemplo, tanespimicina), quinasas dependientes de ciclina (por ejemplo, palbociclib), HDAC (por ejemplo, panobinostat), PARP (por ejemplo, olaparib) y proteasomas (por ejemplo, bortezomib, carfilzomib) también se pueden combinar con los compuestos

de la presente invención.

Los expertos en la técnica conocen métodos para la administración segura y efectiva de la mayoría de estos agentes quimioterapéuticos. Además, su administración se describe en la literatura estándar. Por ejemplo, la administración de muchos de los agentes quimioterapéuticos se describe en "Physicians' Desk Reference" (PDR, por ejemplo, edición de 1996, Medical Economics Company, Montvale, NJ), cuya descripción se incorpora a la presente mediante esta referencia como si se indicara en su totalidad.

La frase "cantidad terapéuticamente efectiva" de un compuesto (agente terapéutico, ingrediente activo, fármaco, etc.) se refiere a una cantidad del compuesto que se le debe administrar a un sujeto que necesita terapia o tratamiento que alivia un síntoma, mejora una afección o ralentiza la aparición de enfermedades, de acuerdo con los estándares clínicamente aceptables para el trastorno o la afección que se deben tratar. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente efectiva puede ser una cantidad que se haya demostrado que tiene un efecto terapéutico deseado en un ensayo *in vitro*, un ensayo animal *in vivo* o un ensayo clínico. La cantidad terapéuticamente efectiva puede variar según la forma de dosificación particular, el método de administración, el protocolo de tratamiento, la enfermedad o afección específica que se desee tratar, la relación entre el riesgo y el beneficio, etc., entre muchos otros factores.

Dicha cantidad terapéuticamente efectiva puede obtenerse de un ensayo clínico, un modelo animal o un ensayo de cultivo celular *in vitro*. Se sabe en la técnica que la cantidad efectiva adecuada para uso humano puede calcularse a partir de la cantidad efectiva determinada a partir de un modelo animal o un ensayo de cultivo celular *in vitro*. Por ejemplo, según lo informado por Reagan-Shaw et ál., FASEB J. 2008: 22(3) 659-61, "µg/ml" (cantidad efectiva basada en ensayos de cultivo celular *in vitro*) = "mg/kg de peso corporal/día" (cantidad efectiva para un ratón). Además, la cantidad efectiva para un humano se puede calcular a partir de la cantidad efectiva para un ratón, basándose en el hecho de que la velocidad del metabolismo de los ratones es 6 veces más rápida que la de los humanos.

Como ejemplo de tratamiento con un compuesto de la fórmula (I) como

monoterapia, se le puede administrar una dosis terapéuticamente efectiva de un compuesto de la fórmula (I) en la que R⁸H es un inhibidor de PARP a un paciente que padezca un cáncer dependiente de PARP, como una mujer que padezca cáncer de mama con mutación de BRCA, cáncer de ovario con mutación de BRCA de línea germinal, cáncer de trompas de Falopio o a un paciente que padezca cáncer peritoneal primario, cáncer de pulmón de células escamosas o cáncer de pulmón no microcítico, o a un paciente que experimente accidente cerebrovascular, infarto de miocardio o enfermedad neurodegenerativa a largo plazo. Como otro ejemplo, una dosis terapéuticamente efectiva de un compuesto de la fórmula (I) en el que R⁸H es un inhibidor de la reparación del ADN dirigido a la proteína quinasa de ataxia-telangiectasia mutada (ATM), la proteína quinasa relacionada con ATM-Rad3 (ATR) o la proteína quinasa de serina/treonina nuclear DNA-PK podría administrársele a un paciente que padezca un cáncer en el que la inhibición de una o más de las proteínas anteriores sería terapéuticamente útil.

Como ejemplo de tratamiento usando un compuesto de la fórmula (I) en combinación con un agente citotóxico, se le puede administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la fórmula (I) a un paciente que padezca cáncer como parte de un régimen de tratamiento que también involucre una cantidad terapéuticamente efectiva de radiación ionizante o un agente citotóxico. En el contexto de este régimen de tratamiento, debe entenderse que el término cantidad "terapéuticamente efectiva" significa efectiva en la terapia de combinación. Los expertos en la técnica del tratamiento contra el cáncer entenderán cómo ajustar las dosis para lograr el resultado terapéutico óptimo.

De manera similar, los expertos en las técnicas médicas pueden determinar fácilmente las dosis apropiadas de los compuestos de la invención para el tratamiento de enfermedades o afecciones no cancerosas (tales como enfermedades cardiovasculares).

El término "tratar", como se usa en el presente documento, incluye la administración de un compuesto o una composición que reduzca la frecuencia, retrase la aparición o reduzca el avance de los síntomas de una enfermedad que involucre tejido con enfermedad ácida o hipóxica, como cáncer, accidente cerebrovascular, infarto de

miocardio o enfermedad neurodegenerativa a largo plazo, en un sujeto en relación con un sujeto que no reciba el compuesto o la composición. Esto puede incluir revertir, reducir o detener los síntomas, los signos clínicos o la patología subyacente de una afección de manera de mejorar o estabilizar la afección de un sujeto (por ejemplo, regresión del crecimiento tumoral en el caso del cáncer o disminución o mejora de la lesión por reperfusión isquémica miocárdica en el infarto de miocardio, el accidente cerebrovascular o la enfermedad cardiovascular similar). Los términos "inhibición" o "reducción" se usan para el cáncer en referencia a métodos para inhibir o reducir el crecimiento tumoral (por ejemplo, disminuir el tamaño de un tumor) en una población en comparación con una población de control no tratada.

Todas las publicaciones (incluidas las patentes) mencionadas en el presente documento se incorporan en el presente documento mediante esta referencia con el fin de describir y divulgar, por ejemplo, los conceptos y las metodologías que se describen en las publicaciones, que podrían usarse en relación con la descripción aquí descrita. Las publicaciones mencionadas a lo largo del texto se proporcionan únicamente por su divulgación previa a la fecha de presentación de la presente solicitud.

En la presente se describen varios tipos de intervalos. Cuando se describe o reivindica un intervalo de cualquier tipo, la intención es describir o reivindicar individualmente cada número que dicho intervalo pudiese abarcar razonablemente, incluidos los valores extremos del intervalo, así como cualquier subintervalo y combinaciones de subintervalos abarcados en estos. Cuando se describe o reivindica un intervalo de cantidades terapéuticamente efectivas de un ingrediente activo, por ejemplo, la intención es describir o reclamar individualmente cada número que dicho intervalo pudiese abarcar, de acuerdo con la descripción en este documento. Por ejemplo, al describir que la cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto puede estar en un intervalo de alrededor de 1 mg/kg a alrededor de 50 mg/kg (del peso corporal del sujeto), la intención es indicar que la cantidad terapéuticamente efectiva puede ser igual a alrededor de 1 mg/kg, alrededor de 2 mg/kg, alrededor de 3 mg/kg, alrededor de 4 mg/kg, alrededor de 5 mg/kg, alrededor de 6 mg/kg, alrededor de 7 mg/kg, alrededor de 8 mg/kg, alrededor de 9 mg/kg,

alrededor de 10 mg/kg, alrededor de 11 mg/kg, alrededor de 12 mg/kg, alrededor de 13 mg/kg, alrededor de 14 mg/kg, alrededor de 15 mg/kg, alrededor de 16 mg/kg, alrededor de 17 mg/kg, alrededor de 18 mg/kg, alrededor de 19 mg/kg, alrededor de 20 mg/kg, alrededor de 21 mg/kg, alrededor de 22 mg/kg, alrededor de 23 mg/kg, alrededor de 24 mg/kg, alrededor de 25 mg/kg, alrededor de 26 mg/kg, alrededor de 27 mg/kg, alrededor de 28 mg/kg, alrededor de 29 mg/kg, alrededor de 30 mg/kg, alrededor de 31 mg/kg, alrededor de 32 mg/kg, alrededor de 33 mg/kg, alrededor de 34 mg/kg, alrededor de 35 mg/kg, alrededor de 36 mg/kg, alrededor de 37 mg/kg, alrededor de 38 mg/kg, alrededor de 39 mg/kg, alrededor de 40 mg/kg, alrededor de 41 mg/kg, alrededor de 42 mg/kg, alrededor de 43 mg/kg, alrededor de 44 mg/kg, alrededor de 45 mg/kg, alrededor de 46 mg/kg, alrededor de 47 mg/kg, alrededor de 48 mg/kg, alrededor de 49 mg/kg o alrededor de 50 mg/kg. Además, la cantidad terapéuticamente efectiva puede estar dentro de cualquier subintervalo incluido dentro de alrededor de 1 mg/kg a alrededor de 50 mg/kg (por ejemplo, la cantidad puede estar en un intervalo de alrededor de 2 mg/kg a alrededor de 10 mg/kg) y esto también incluye cualquier combinación de intervalos entre alrededor de 1 mg/kg y alrededor de 50 mg/kg (por ejemplo, la cantidad puede estar en un intervalo de alrededor de 1 mg/kg a alrededor de 5 mg/kg o de alrededor de 20 mg/kg a alrededor de 35 mg/kg). Del mismo modo, todos los demás intervalos descritos en este documento deben interpretarse de manera similar a este ejemplo.

Formulación, formas de dosificación y administración

Para preparar las composiciones farmacéuticas de la presente invención, se combina un compuesto de la fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de este como ingrediente activo en una mezcla íntima con un portador farmacéutico de acuerdo con las técnicas convencionales de composición farmacéutica, en el que el portador puede tomar una amplia variedad de formas dependiendo de la forma de preparación deseada para la administración, por ejemplo, oral o parenteral. En la preparación de las composiciones en forma de dosificación oral, se puede emplear cualquiera de los medios farmacéuticos habituales, tales como, por ejemplo, agua, glicoles, aceites, alcoholes, agentes aromatizantes, conservantes, agentes

colorantes y similares en el caso de preparaciones líquidas orales. tales como, por ejemplo, suspensiones, elíxires y soluciones; o portadores tales como almidones, azúcares, diluyentes, agentes de granulación, lubricantes, aglutinantes, agentes desintegrantes y similares en el caso de preparaciones sólidas orales como, por ejemplo, polvos, cápsulas y tabletas. Debido a su facilidad de administración, las tabletas y las cápsulas representan la forma unitaria de dosificación oral más ventajosa, en cuyo caso obviamente se emplean portadores farmacéuticos sólidos. Si se desea, las tabletas pueden recubrirse con azúcar o con recubrimiento entérico mediante técnicas estándar. Para los parenterales, el portador generalmente comprenderá agua estéril, aunque pueden incluirse otros ingredientes, por ejemplo, para ayudar a la solubilidad o con fines conservantes. También se pueden preparar suspensiones inyectables, en cuyo caso se pueden emplear portadores líquidos apropiados, agentes de suspensión y similares. Un experto en la técnica farmacéutica y médica podrá determinar fácilmente una dosis adecuada de las composiciones farmacéuticas de la invención para la enfermedad o afección particular que se desee tratar.

EJEMPLOS

Según se usan en este documento, todas las abreviaturas, los símbolos y las convenciones son acordes a los utilizados en la literatura científica contemporánea. Ver, por ejemplo, Janet S. Dodd, ed., *The ACS Style Guide: A Manual for Authors and Editors*, 2.^a ed., Washington, D.C: American Chemical Society, 1997. Las siguientes definiciones describen los términos y abreviaturas utilizados en la presente:

- Salmuera: una solución saturada de NaCl en agua
- DCM: diclorometano
- TFA: ácido trifluoroacético
- DIPEA: diisopropiletilamina
- DMA: dimetilacetamida
- DME: dimetoxietano

- DMF: dimetilformamida
- DMSO: metilsulfóxido
- TDT: ditiotreitól
- MSD: detector de especificaciones de masa
- 5 • Et₂O: éter etílico
- EtOAc: acetato de etilo
- EtOH: alcohol etílico
- HATU: hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio
- 10 • HOBt: 1-hidroxibenzotriazol
- RP: fase inversa
- HPLC: cromatografía líquida de alto rendimiento
- IPA: isopropanol
- LAH: hidruro de litio y aluminio
- 15 • N-BuLi: n-butil litio
- LC-MS: cromatografía líquida-espectrometría de masas
- LDA: diisopropilamida de litio
- Me: metilo
- MeOH: metanol
- 20 • MTBE: metil t-butil éter
- NMP: N-metilpirrolidina
- Ph: fenilo
- PNPC: cloroformiato de para-nitrofenilo
- RT o rt: temperatura ambiente
- 25 • SFC: cromatografía de fluidos supercríticos
- TBAI: yoduro de tetrabutilamonio
- TBME: éter terc-butilmetílico
- tBu: butilo terciario
- THF: tetrahidrofurano
- 30 • TEA: trietilamina
- TMEDA: tetrametiletildiamina

- GSH: glutatión
- GS: glutatión enlazado a azufre
- LiOH: hidróxido de litio
- DPPA: difenilfosforilazida
- 5 • $\text{Sn}(\text{Bu})_2(\text{Laurato})_2$: dilaurato de dibutilestaño
- PBS: solución salina tamponada con fosfato
- ACN: acetonitrilo
- AcOH: ácido acético
- EEDQ: *N*-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinolina
- 10 • DMAP: 4-dimetilaminopiridina
- EDC: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida

Métodos de HPLC

- 15 Todos los métodos de HPLC utilizan condiciones de fase inversa: H_2O /acetonitrilo con modificador de TFA (0.05 %); velocidad de flujo: 1 mL/min; longitud de onda = 217 nm. Las condiciones de la columna se describen a continuación:

A: Sunfire C18 150 x 4.6 mm

B: Ace Equivalence 250 x 4.6 mm

C: Sunfire C18 150 x 30 mm

20

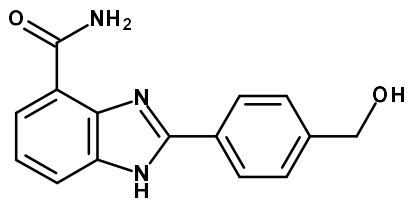
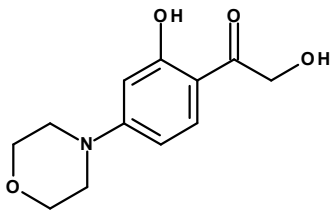
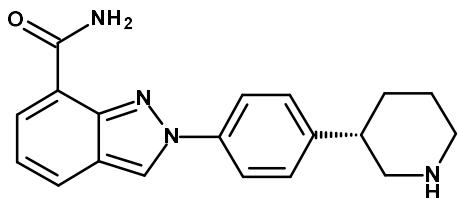
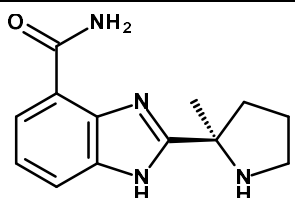
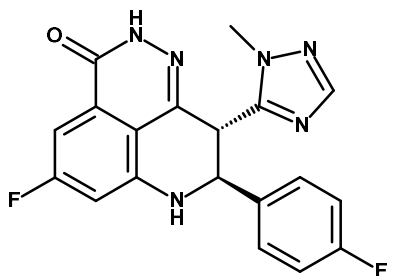
Intermedios de R^8H

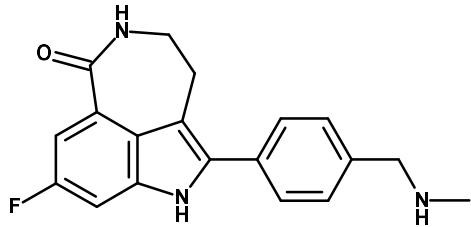
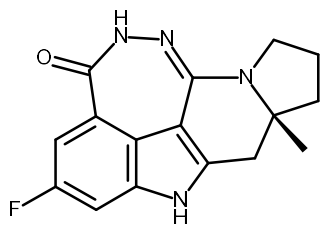
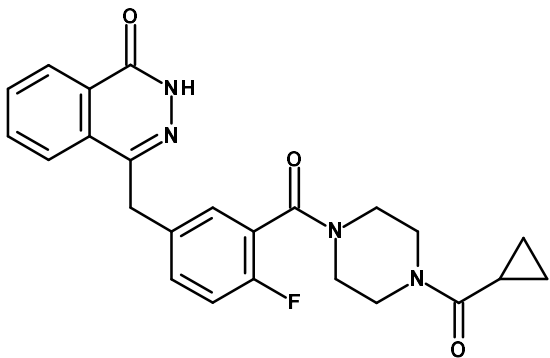
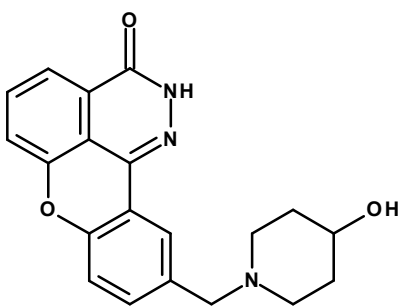
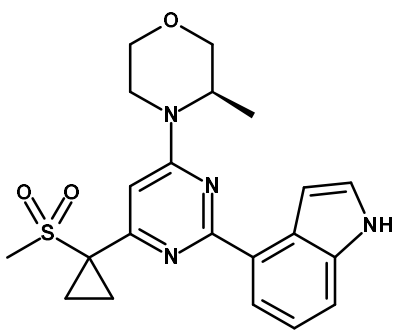
Los grupos R^8H utilizados en los ejemplos se compraron o sintetizaron como se indica en la tabla 2.

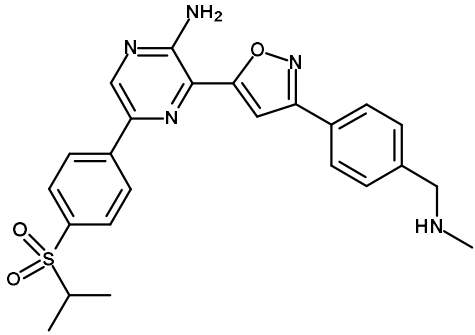
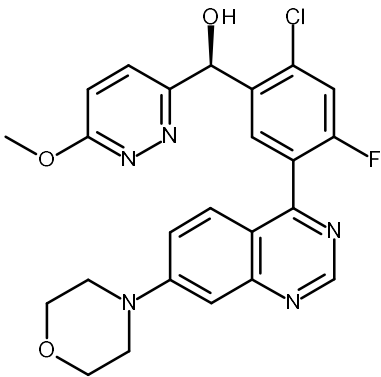
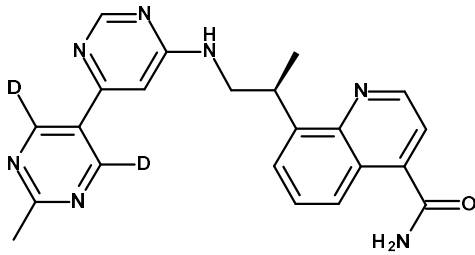
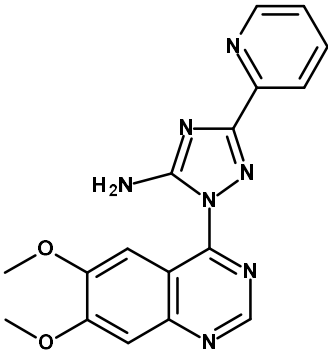
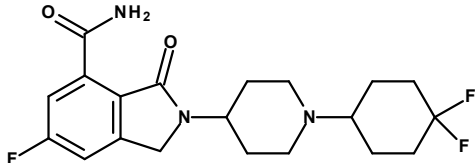
Tabla 2: intermedios de R^8H

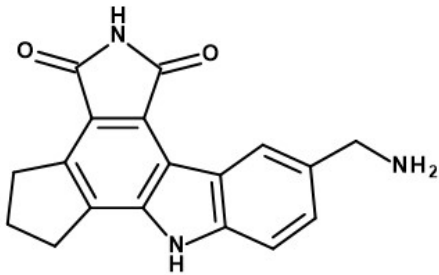
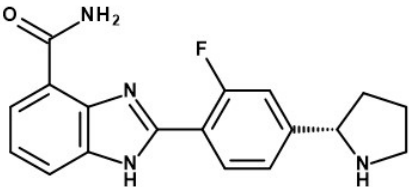
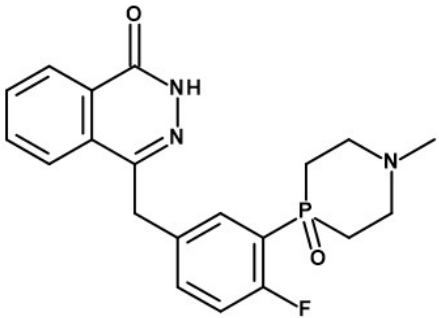
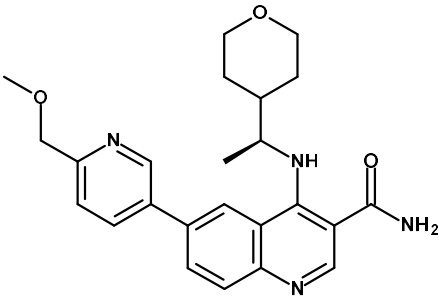
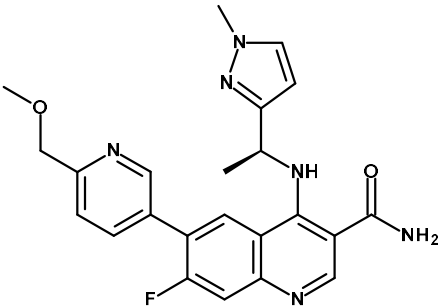
25

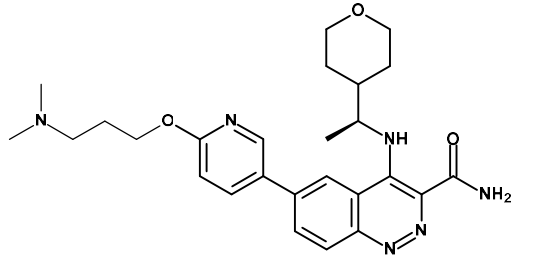
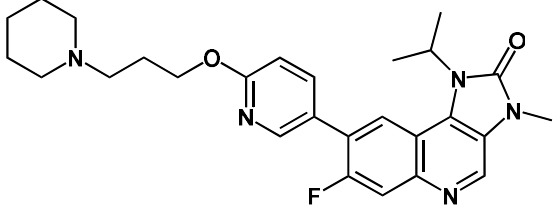
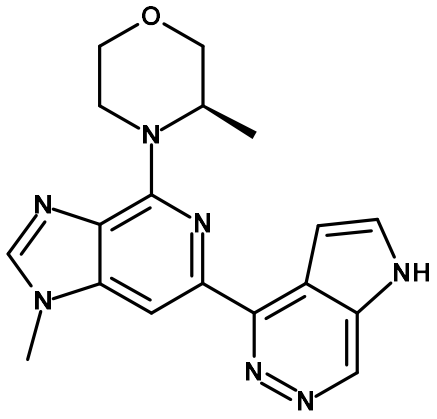
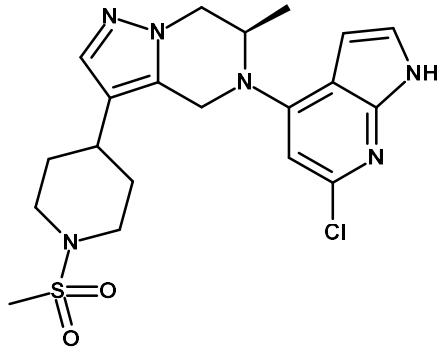
Código de R^8	Estructura de R^8H	Referencia de síntesis o adquisición	Clase

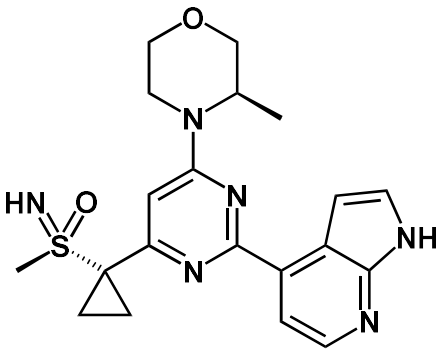
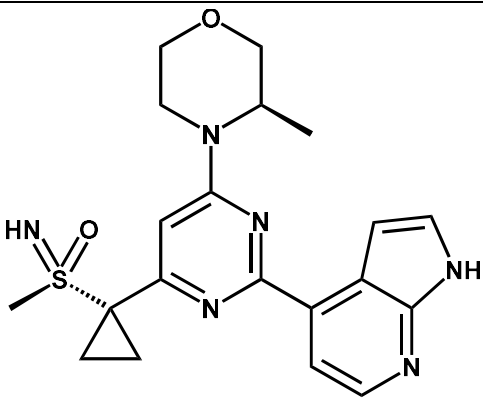
R⁸H-1		Sintetizado - Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 14 (2004) 2433– 2437; J. Med. Chem. 2000, 43, 4084-4097	PARP
R⁸H-2		Sintetizado - WO0220500A2	ADN-PK
R⁸H-3		Astatech 42568	PARP
R⁸H-4		MedKoo 203115	PARP
R⁸H-15		Chemscene CS-0937	PARP

R⁸H-16		Astatech 81136	PARP
R⁸H-17		MentonChem MC7030606	PARP
R⁸H-18		Selleckchem S1060	PARP
R⁸H-19		MedKoo 205150	PARP
R⁸H-20		Advanced Chemblocks 10278	ATR

R⁸H-21		Astatech 42043	ATR
R⁸H-22		Medchem Express HY-10619B	ADN-PK
R⁸H-23		Sintetizado - WO2013163190 A1	DNA-PK
R⁸H-24		Astatech 40964	ATM
R⁸H-25		MedKoo 407142	PARP

R⁸H-26		MedKoo 406357	PARP
R⁸H-27		MedKoo 406362	PARP
R⁸H-28		Sintetizado WO2012166983 A1	PARP
R⁸H-29		Sintetizado J. Med. Chem 2016, 59, 6281-6292	ATM
R⁸H-30		Sintetizado J. Med. Chem 2016, 59, 6281-6292	ATM

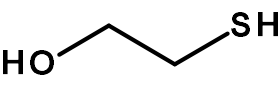
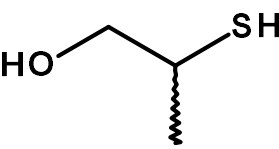
R⁸H-31		ACS Med. Chem. Lett. 2018, 9, 809–814	ATM
R⁸H-32		J. Med. Chem. 2018, 61, 3823–3841.	ATM
R⁸H-33		Sintetizado ACS Med. Chem. Lett. 2015, 6, 42–46	ATR
R⁸H-34		Sintetizado ACS Med. Chem. Lett. 2015, 6, 37–41	ATR

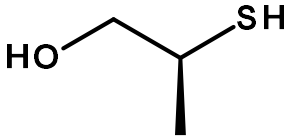
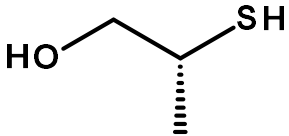
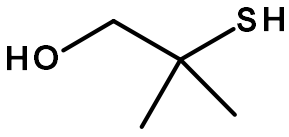
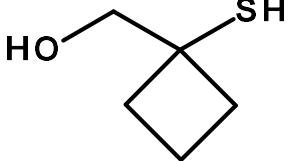
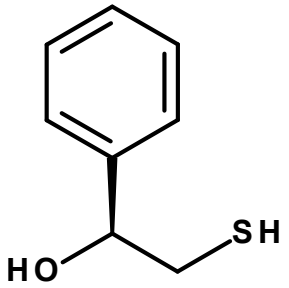
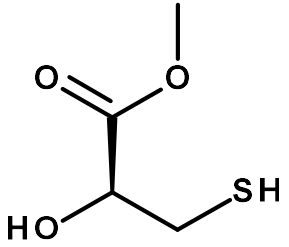
R⁸H-35		Oncotarget, 6, 42, 44289-44305	ATR
R⁸H-36		Oncotarget, 6, 42, 44289-44305	ATR

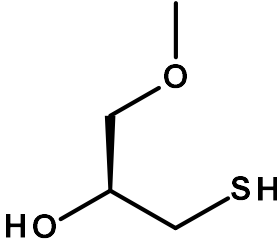
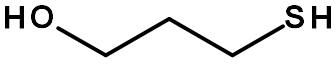
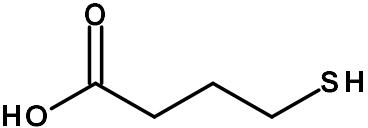
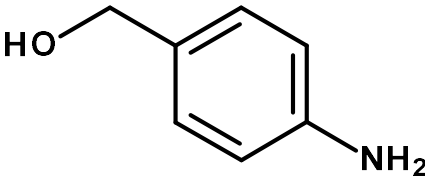
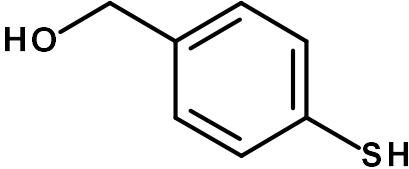
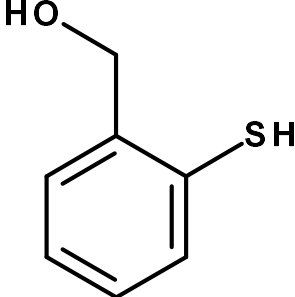
Enlazadores

Los enlazadores utilizados en este documento se compraron o sintetizaron como se muestra a continuación en la tabla 3:

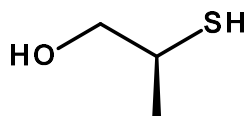
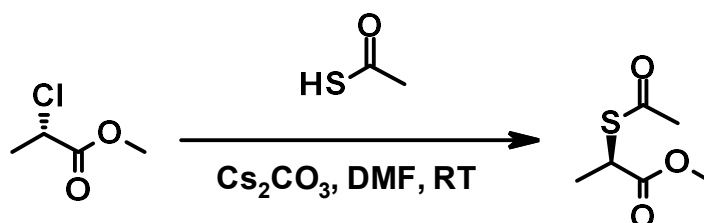
5 Tabla 3: enlazadores disponibles comercialmente

Código del enlazador	Estructura del enlazador	Referencia sintética o adquisición
L1		Alfa Aesar A15890
L2		Enamine EN300-9515

L4		Sintetizado - WO2013055987A1
L5		Sintetizado - WO2013055987A1
L3		Enamine EN300-220914
L6		Sintetizado- ACS Med. Chem. Lett. 2016, 7, 988–993
L7		Sintetizado Synlett, 2005, 20 3063
L8		Sintetizado Synlett, 2005, 20 3063

L9		Sintetizado Synlett, 2005, 20 3063
L10		TCI M1206
L11		Aurum GN23710
Enlazado r XVI-1		Combiblocks OR-0735
Enlazado r XXII-1		Combiblocks OR-5865
Enlazado r XXVI-1		Oakwood 001239

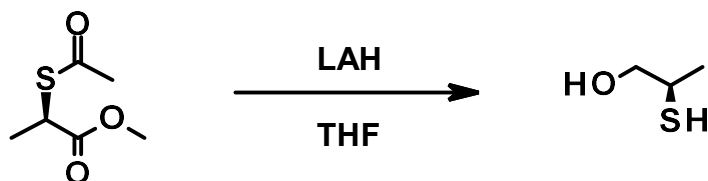
Enlazador XXXI-1		Aurum DS18383
-------------------------	--	------------------

Enlazador L4: (2R)-2-sulfanilpropan-1-ol

Etapa 1: (2R)-2-acetilsulfanilpropanoato de metilo


5

Se recogieron ácido tioacético (2,24 g, 29,4 mmol) y carbonato de cesio (7,98 g, 24,5 mmol) en 40 mL de DMF seca. La mezcla se agitó a RT durante 30 minutos antes de que se añadiera (2S)-2-cloropropanoato de metilo (3,00 g, 24,5 mmol). La mezcla se agitó luego durante 3 h adicionales. Se añadieron éter dietílico (150 mL) y agua (150 mL) y las capas se separaron. La capa acuosa se lavó con éter adicional y los orgánicos combinados se secaron en Na₂SO₄. La capa orgánica se concentró y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna (SiO₂, 0-10 % de EtOAc/hexanos) para dar 3,50 g, 88 % de (2R)-2-acetilsulfanilpropanoato de metilo.

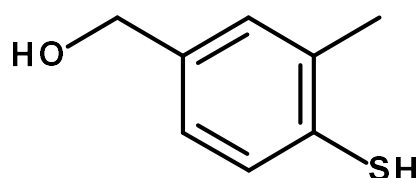
10

Etapa 2: (2R)-2-sulfanilpropan-1-ol


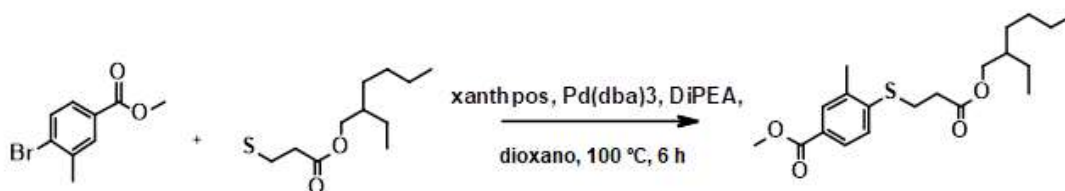
15

Una solución de (2R)-2-acetilsulfanilpropanoato de metilo (3,50 g, 21,6 mmol) en THF (30 mL) se agregó gota a gota a una suspensión de LAH (4,10 g, 108 mmol) en THF (60 mL) a 0 °C. Después de completar la adición, la mezcla se agitó a RT durante 3 h. La reacción se enfrió hasta 0 °C, después se inactivó mediante la adición de HCl 2 N (~75 mL) gota a gota. Después de completar la adición, la mezcla se agitó a RT durante 1 h. La mezcla se extrajo con CH₂Cl₂ (5 X 100 mL) y se secó con Na₂SO₄. El (2R)-2-sulfanilpropan-1-ol bruto, 1,60 g, 81 % se continuó sin purificación adicional.

Enlazador XXII-2: (3-metil-4-sulfanil-fenil)metanol

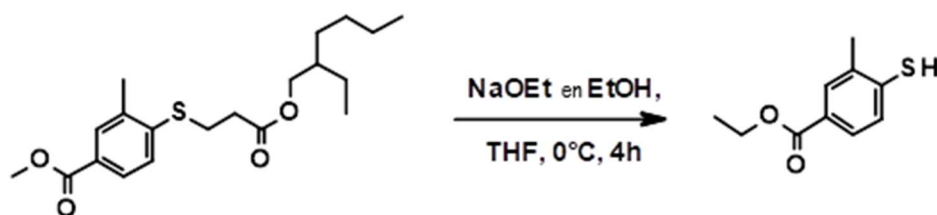


Etapa 1: 4-((3-((2-etilhexil)oxi)-3-oxopropil)tio)-3-metilbenzoato



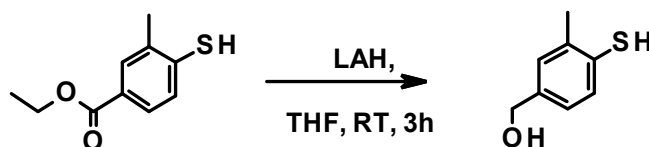
A una solución agitada de 4-bromo-3-metilbenzoato de metilo (0,20 g, 0,88 mmol) y 3-mercaptopropanoato de 2-etilhexilo (0,21 g, 0,96 mmol) en 1,4-dioxano (2 mL), se le agregaron DIPEA (0,32 mL, 1,80 mmol), Xanthphos (0,005 g, 0,009 mmol). La mezcla de reacción se purgó con argón durante 5 min. Se añadió Pd(dba)₃ (0,008 g, 0,009 mmol) y la mezcla de reacción se calentó a 100 °C durante 6 h. Una vez completada la reacción, la mezcla de reacción se inactivó con agua (10 mL) y se extrajo en acetato de etilo (20 mL). La capa orgánica se lavó con solución de cloruro de sodio (20 mL) y se secó en Na₂SO₄ para proporcionar el producto bruto. El producto bruto se purificó mediante cromatografía instantánea (SiO₂, 0-5 % de acetato de etilo/hexano) para proporcionar 4-((3-((2-etilhexil)oxi)-3-oxopropil)tio)-3-metilbenzoato como un líquido de color amarillo (0,2 g, 62 % de rendimiento). MS m/z 367,1 [M+H]⁺.

Etapa 2: 4-mercapto-3-metilbenzoato de etilo



Una solución agitada de 4-((3-((2-etilhexil)oxi)-3-oxopropil)tio)-3-metilbenzoato de metilo (0,20 g, 0,54 mmol) en THF (5 mL) se enfrió hasta 0 °C. Se agregó etóxido de sodio (35 % en peso, 2 mL) y la mezcla se agitó durante 4 h temperatura ambiente. Una vez completada la reacción, la mezcla de reacción se acidificó con HCl 2 N (10 mL) y se concentró. El residuo resultante se extrajo en acetato de etilo (20 mL). La capa orgánica se lavó con agua (20 mL), solución saturada de cloruro sódico (20 mL) y se secó en Na₂SO₄ para dar 4-mercapto-3-metilbenzoato de etilo como un líquido incoloro (80 mg, 80 % de rendimiento). MS m/z 197.1 [M+H]⁺.

10 *Etapa 3: (3-metil-4-sulfanil-fenil)metanol*



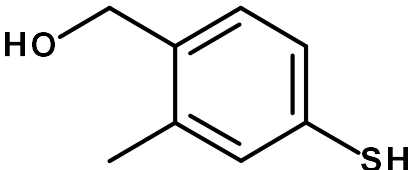
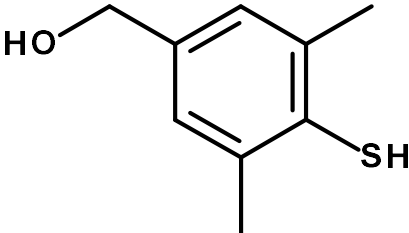
XXII-2

A una solución agitada de 4-mercapto-3-metilbenzoato de etilo (0,60 g, 3,07 mmol) en THF (20 mL) mantenida a 0 °C se le añadió lentamente una solución 1 M de LAH en THF (7,80 mL, 7,80 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. Una vez completada la reacción, la mezcla de reacción se enfrió hasta 0 °C y se inactivó con agua (20 mL). La temperatura se mantuvo por debajo de 20 °C durante la inactivación. Después de completar la inactivación, el pH se ajustó a 2-3 con HCl 2 N. El residuo resultante se extrajo en acetato de etilo (20 mL) y la capa orgánica se lavó con solución de cloruro de sodio (20 mL). La fase orgánica se secó en Na₂SO₄ para proporcionar el producto bruto. El producto bruto

se purificó mediante cromatografía instantánea (SiO_2 , 0-20 % de acetato de etilo/hexano) para proporcionar (3-metil-4-sulfanil-fenil)metanol como un líquido incoloro (0,45 g, 90 % de rendimiento). MS m/z 153,0 $[\text{M-H}]^-$.

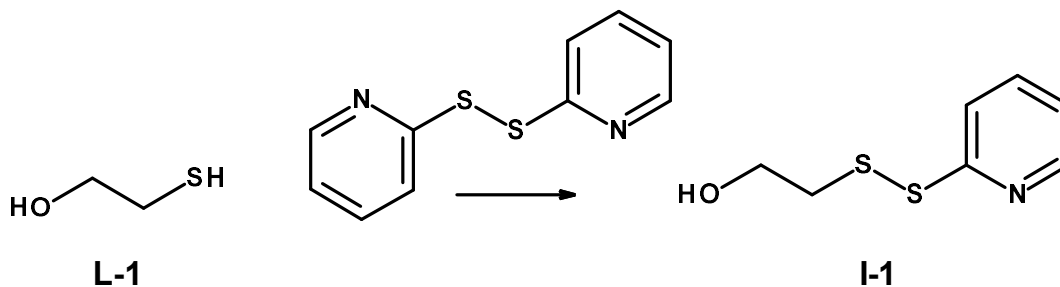
- 5 XXII-3 y XXII-4, como se muestra en la tabla 4 a continuación, se sintetizaron de manera análoga al enlazador XXII-2.

10 Tabla 4: enlazadores adicionales

Código del enlazador	Estructura del enlazador	m/z hallada $[\text{M-H}]$
XXII-3		153,1
XXII-4		167,0

Intermedios

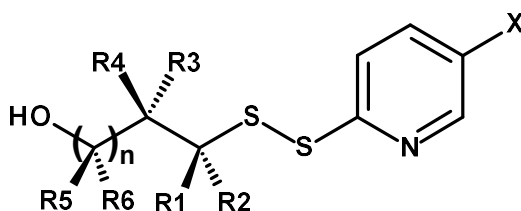
Intermedio I-1: 2-(2-piridildisulfanil)etanol



A 2-(2-piridildisulfanil)piridina (4,693 g, 21,3 mmol) en 40 ml de (N₂)MeOH desgasificado se le añadió 2-sulfaniletanol (0,498 mL, 7,10 mmol) por goteo. La mezcla se agitó durante 2-20 h en N₂. La mezcla se concentró hasta sequedad y se purificó directamente (SiO₂, 0-5 % de EtOAc/CH₂Cl₂) para dar 3 fracciones; (F1 mezcla SM A y producto; F2 producto; F3 mezcla de 2-tiopiridina/producto). El material impuro se purificó nuevamente (SiO₂, 0-50 % de EtOAc/hexanos) para dar 1,17 g, 88 % de rendimiento de 2-(2-piridildisulfanil)etanol. MS m/z hallado 188.4 [M+H]⁺

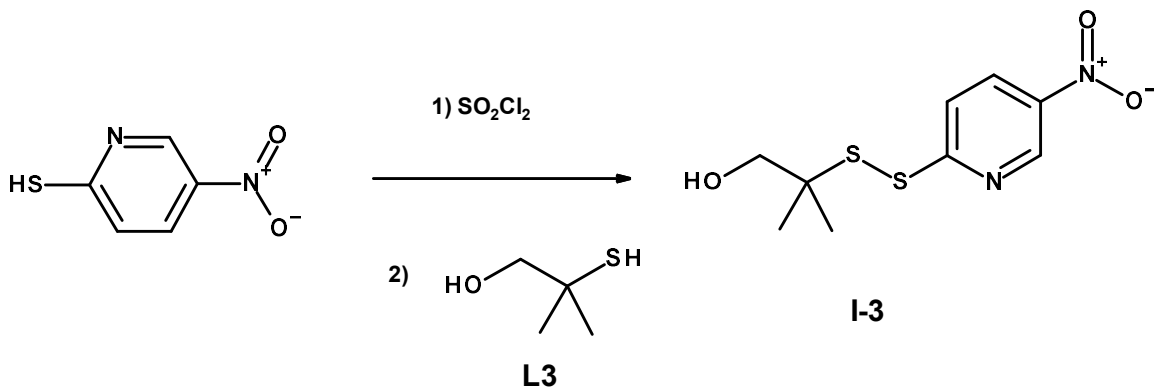
- 10 Los siguientes intermedios que se muestran en la tabla 5 se prepararon de manera análoga al intermedio I-1.

Tabla 5. Intermedios



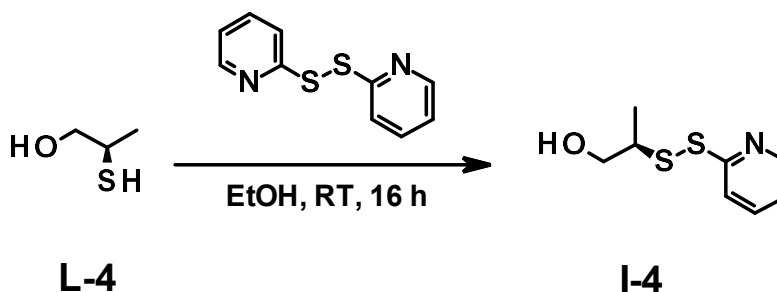
Intermedio	R ¹ , R ²	R ³ , R ⁴	n	R ⁵ , R ⁶	X	MH ⁺
I-2	Me-H (rac)	H, H	0	---	H	202,1
I-7	H, H	H, Ph	0	---	H	264,1
I-8	H, H	H, CO ₂ Me	0	----	H	246,1
I-9	H, H	H, CH ₂ OMe	0	--	H	232,0
I-10	H, H	H, H	1	H, H	H	367,0

- 15 **Intermedio I-3: 2-metil-2-[(5-nitro-2-piridil)disulfanil]propan-1-ol**



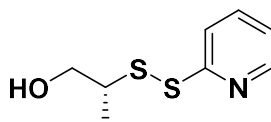
Se añadió SO_2Cl_2 (0,382 mL, 4,71 mmol) gota a gota a una suspensión agitada de 5-nitropiridin-2-tiol (668 mg, 4,28 mmol) en DCM seco (15 mL) a 4 °C en una atmósfera de N_2 . La mezcla de reacción pasó de una suspensión amarilla a una solución amarilla y se dejó calentar a temperatura ambiente con agitación durante 2 horas, después de lo cual la mezcla se concentró para proporcionar un sólido amarillo. El sólido se redisolvió en DCM (15 mL) y se trató gota a gota con una solución de 2-metil-2-sulfanil-propan-1-ol (454 mg, 4,28 mmol) en DCM seco (10 mL) a 4 °C en una atmósfera de N_2 . La mezcla de reacción se dejó calentar hasta temperatura ambiente y se agitó durante 20 horas. La reacción se controló mediante LC/MS para determinar la masa deseada del producto. A la mezcla se le añadieron 50 mL de H_2O y la mezcla diluida se trató con solución de hidróxido de amonio. La mezcla de reacción se diluyó con 50 mL de EtOAc, se repartió y se separó. La fase orgánica se secó con MgSO_4 , se filtró y se concentró para dar el producto bruto. La mezcla bruta se purificó (SiO_2 , 0-50 % de EtOAc/hexanos) para dar 721 mg, 65 % de rendimiento de 2-metil-2-[(5-nitro-2-piridil)disulfanil]propan-1-ol. MS m/z hallado 261,7 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Intermedio I-4: (2R)-2-(2-piridildisulfanil)propan-1-ol



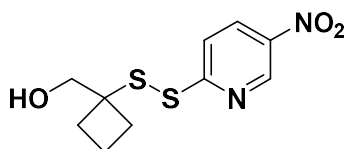
A 2-(2-piridildisulfanil)piridina (5,00 g, 22,7 mmol) en 40 ml de MeOH desgasificado con N₂ se le añadió (2R)-2-sulfanilpropan-1-ol (0,75 g, 8,14 mmol) por goteo. La mezcla se agitó durante 2 h en N₂. La mezcla se concentró hasta sequedad y se cargó directamente en una columna ultrarrápida de SiO₂ y se sometió a elución con 0-50 % de EtOAc/hexanos para dar 1,17 g, 71 % de (2R)-2-(2-piridildisulfanil)propan-1-ol. MS m/z hallado 202.1 [M+H]⁺

Intermedio I-5



El intermedio I-5 se preparó de manera análoga al intermedio I-4 a partir de L-5.

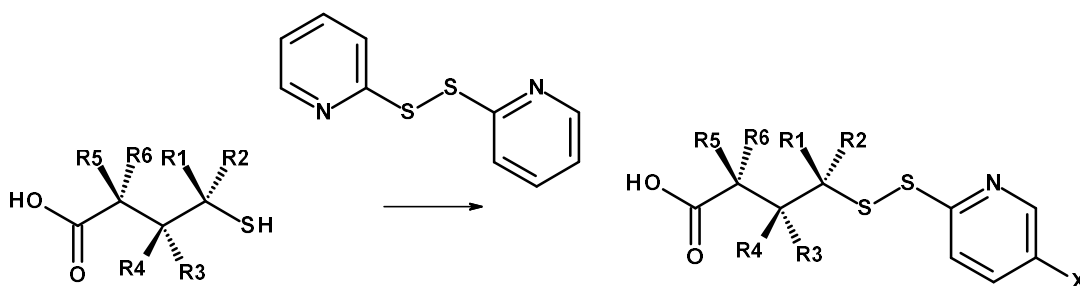
Intermedio I-6



El intermedio I-6 se preparó de manera análoga al intermedio I-3 a partir del enlazador L-6.

Síntesis de intermedios XII

Tabla 6. Intermedios XII

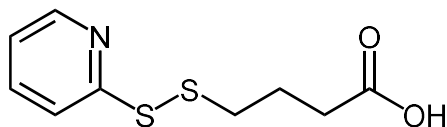


XII

Int.	R ¹ , R ²	R ³ , R ⁴	R ⁵ , R ⁶	X	MH ⁺
------	---------------------------------	---------------------------------	---------------------------------	---	-----------------

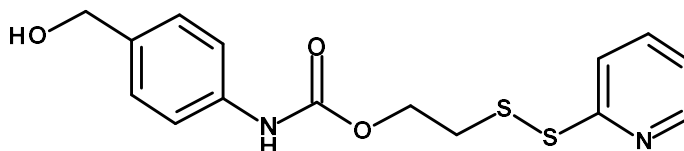
XII-1	H, H	H, H	H, H	H	230,0
-------	------	------	------	---	-------

Síntesis del intermedio XII-1: ácido 4-(2-piridildisulfanil)butanoico



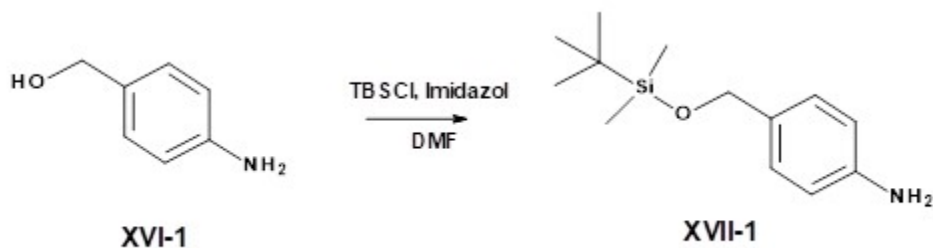
A 2-(2-piridildisulfanil)piridina (1120 mg, 5,08 mmol) en 20 ml de (N₂)MeOH desgasificado se le añadió ácido 4-sulfanilbutanoico (500 mg, 4,16 mmol) por goteo. La mezcla se agitó durante 16 h en N₂. La mezcla se concentró hasta sequedad y se purificó mediante cromatografía de fase inversa (Sunfire C18, 30 x 150 mm, 5-95 % de CH₃CN/H₂O, TFA al 0.05 %) para dar 187 mg, 19.6 % de ácido 4-(2piridildisulfanil)butanoico. MS m/z hallado 230.0 [M+H]⁺.

Intermedio XIX-1: N-[4-(hidroximetil)fenil]carbamato de 2-(2-piridildisulfanil)etilo



XIX-1

Etapas 1: Síntesis de 4-[[terc-butil(dimetil)silil]oximetil]anilina



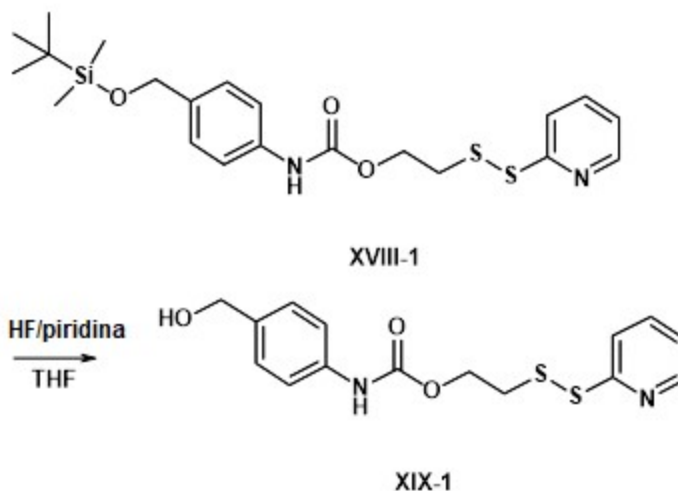
Se le añadió gota a gota una solución de (4-aminofenil)metanol (5,00 g, 40,6 mmol)

Etapa 2: síntesis de 2-(2-piridildisulfanil)etilN-[4-[[terc-butil(dimetil)silil]oximetil]fenil]carbamato



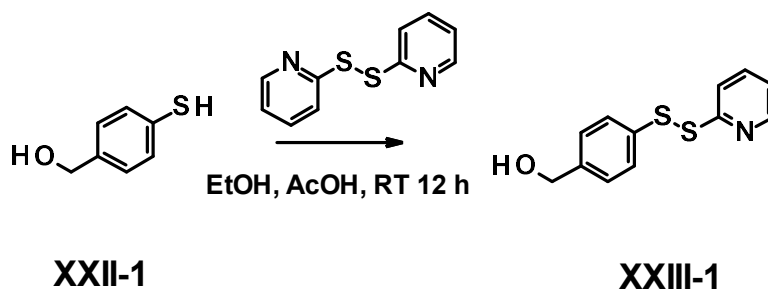
20

Etapa 3: N-[4-(hidroximetil)fenil]carbamato de 2-(2-piridildisulfanil)etilo



Se disolvió N-[4-[[terc-butil(dimetil)silil]oximetil]fenil]-carbamato de 2-(2-piridildisulfanil)etilo (194 mg, 0,430 mmol) en 2 mL de THF y se enfrió hasta 0 °C con N₂. Se añadió HF-piridina (780 µL, 8,89 mmol) y la solución se siguió agitando a 0 °C durante 1 h. Se añadió agua (3 mL) y la reacción se neutralizó con NaHCO₃ sat. y se extrajo con CH₂Cl₂ (3 X 50 mL). La capa orgánica se concentró y se purificó mediante cromatografía en columna (SiO₂, 0-75 % de EtOAc/hexano) para brindar 2-(2-piridildisulfanil)etilN-[4-(hidroximetil)fenil]carbamato (99,1 mg, 0,29 mmol, rendimiento: 68.4 %).

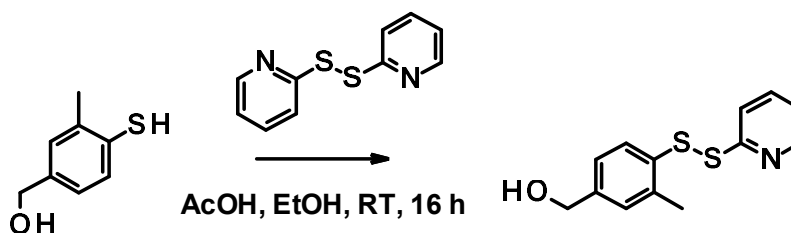
Intermedio XXIII-1: [4-(2-piridildisulfanil)fenil]metanol



Una solución agitada de 1,2-di(piridin-2-il)disulfano (2,68 g, 12,1 mmol) en una mezcla disolvente de AcOH:etanol (5 mL, 1:10) se desgasificó en N₂. Esto fue seguido por adición de 4-mercaptofenil)metanol (0,74 g, 5,2 mmol) en una mezcla disolvente de AcOH/etanol (5 mL) gota a gota durante 20 min y agitación durante

12 h en atmósfera de N₂ a temperatura ambiente. La reacción se concentró a presión reducida para proporcionar el producto bruto que se purificó mediante cromatografía en columna (SiO₂, 60-70 % de EtOAc/hexanos) para proporcionar [4-(2-piridildisulfanil)fenil]metanol como un líquido incoloro (800 mg, 61 % de rendimiento).

Intermedio XXIII-2: [3-metil-4-(2-piridildisulfanil)fenil]metanol



XXII-2

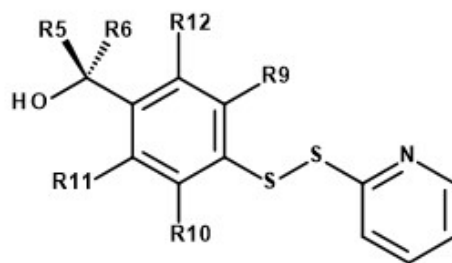
XXIII-2

Una solución agitada de 1,2-di(piridin-2-il)disulfano (1,10 g, 4,90 mmol) disuelto en ácido acético/etanol (1:10, 37 mL) se purgó con N₂ durante 5 min. A esto se le agregó una solución de 4-mercapto-3-metilfenil]metanol (0,51 g, 3,30 mmol) en ácido acético/etanol (1:10, 18 mL) gota a gota durante un período de 20 min. La mezcla de reacción resultante se agitó durante 16 h a temperatura ambiente. Una vez completada la reacción, la mezcla se concentró a presión reducida para proporcionar el producto bruto. El producto bruto se purificó mediante cromatografía instantánea (SiO₂, gradiente de 0-70 % de EtOAc/hexano) para proporcionar [3-metil-4-(2-piridil disulfanil)fenil]metanol como un líquido incoloro (0,69 g, 80 % de rendimiento). MS m/z hallado 264,0 [M+H]⁺.

Intermedios XXIII-3 y XXIII-4

Los intermedios XXIII-3 y XXIII-4 como se muestra en la tabla 7 se prepararon de manera análoga a XXIII-2.

Tabla 7. Intermedios XIII



XXIII

Intermedio	R ⁵ , R ⁶	R ⁹ , R ¹⁰ , R ¹¹ , R ¹²	MH ⁺
XXIII-3	H, H	H, H, H, Me	264,2
XXIII-4	H, H	Me, Me, H, H	278,0

5 Intermedios XXXIII a partir de Intermedios XXXII

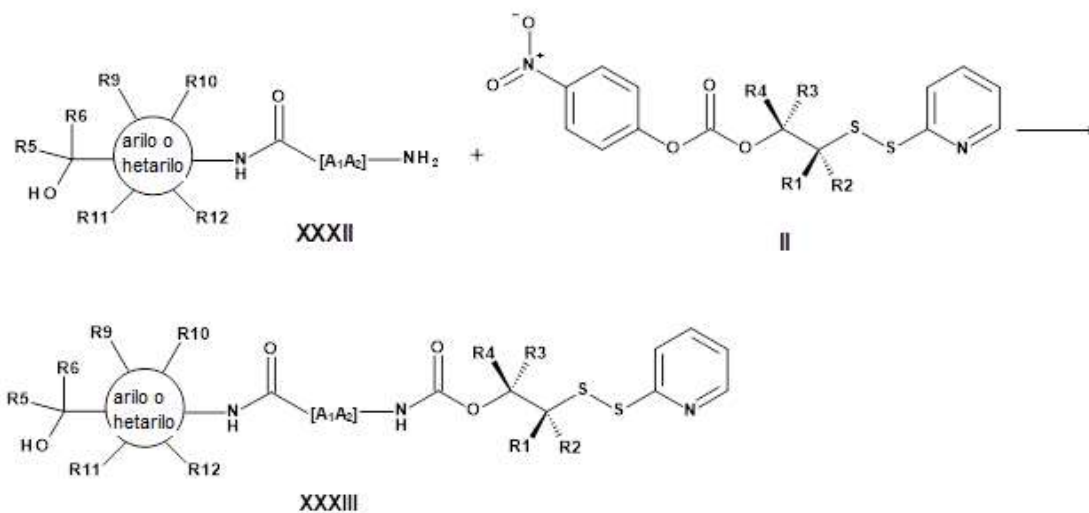
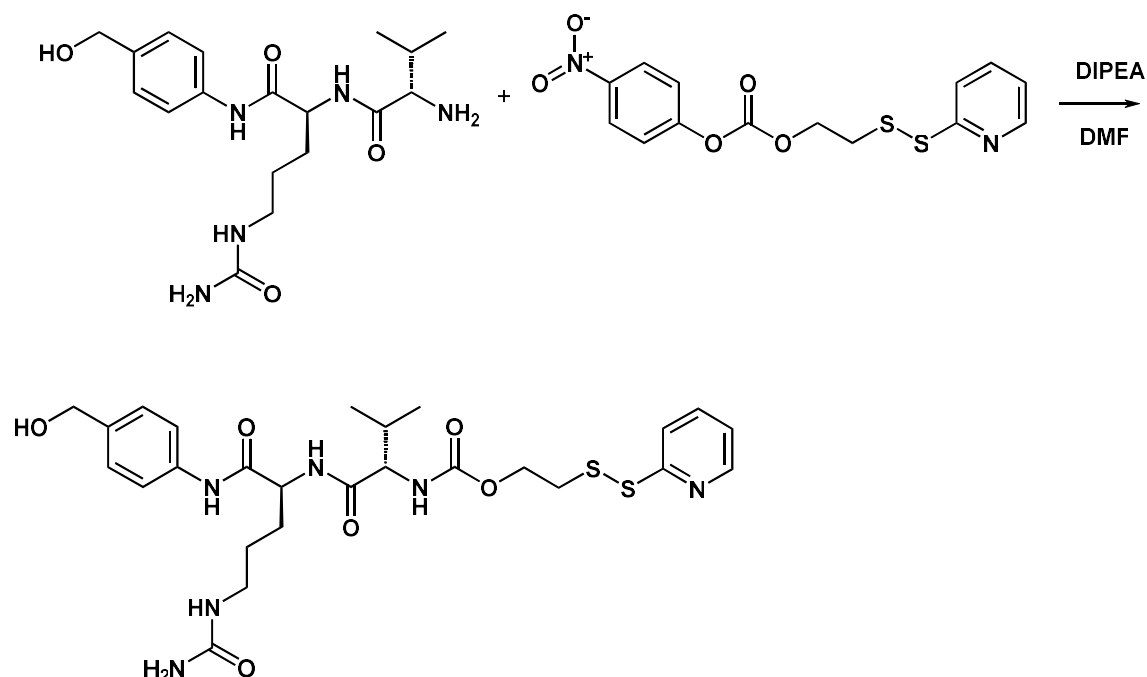


Tabla 8. Intermedios XXXIII

Int.	R ₁ , R ₂ , R ₃ , R ₄ ,	R ₅ , R ₆	R ₉ , R ₁₀ , R ₁₁ , R ₁₂	A ₁ , A ₂	MH ⁺
XXXIII-1	H, H, H, H	H, H	H, H, H, H	Cit, Val	593,2

Síntesis del intermedio XXXIII-1: N-[(1S)-1-[[[(1S)-1-[[4-(hidroximetil)fenil]carbamoil]-4-ureido-butil]carbamoil]-2-metil-propil]carbamato de 2-(2-piridildisulfanil)etilo

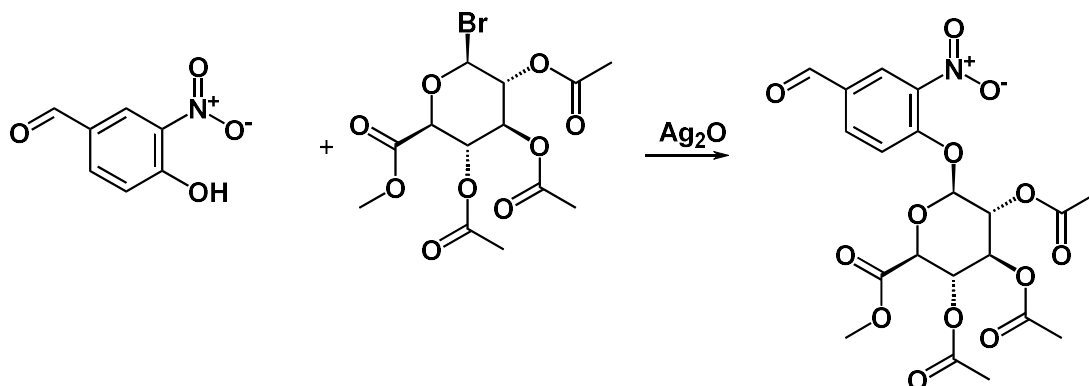


- 5 A (2S)-2-[[[(2S)-2-amino-3-metil-butanoil]amino]-N-[4-(hidroximetil)fenil]-5-ureido-pentanamida (100 mg, 0,264 mmol) en 2 mL DMF seca en N₂ se le agregaron N,N-diisopropiletilamina (0.122 mL, 0.659 mmol) y carbonato de (4-nitrofenil) 2-(2-piridildisulfanil)etil (92,9 mg, 0,264 mmol). La mezcla se agitó durante 16 h en N₂. La mezcla se concentró hasta lograr un sólido. El residuo bruto se purificó en una
- 10 columna de SiO₂ (12 g, 0-10 % de MeOH/CH₂Cl₂) para dar N-[(1S)-1-[[[(1S)-1-[[4-(hidroximetil)fenil]carbamoil]-4-ureido-butil]carbamoil]-2-metil-propil]carbamato de 2-(2-piridildisulfanil)etilo (149 mg, 0,251 mmol, rendimiento: 95.4 %). MS m/z hallado 593.2 [M+H]⁺.

15

20

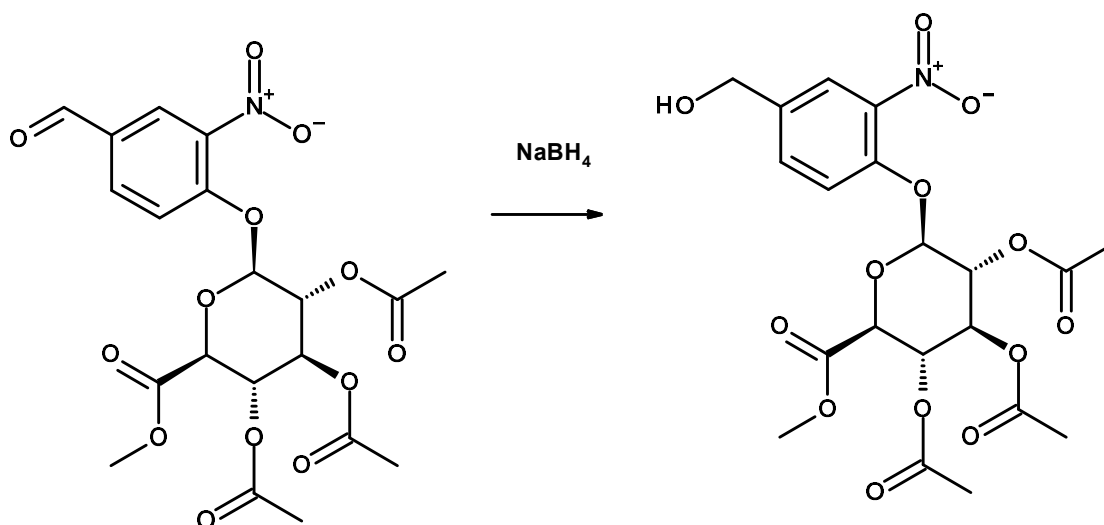
Síntesis de XLI-1: (2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-triacetoxi-6-(4-formil-2-nitro-fenoxi)tetrahidropiran-2-carboxilato de metilo



El compuesto del título se preparó como se describe en US 2017/0145044 A1.

5

Síntesis de XLII-1: (2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-triacetoxi-6-[4-(hidroximetil)-2-nitro-fenoxi]tetrahidropiran-2-carboxilato de metilo

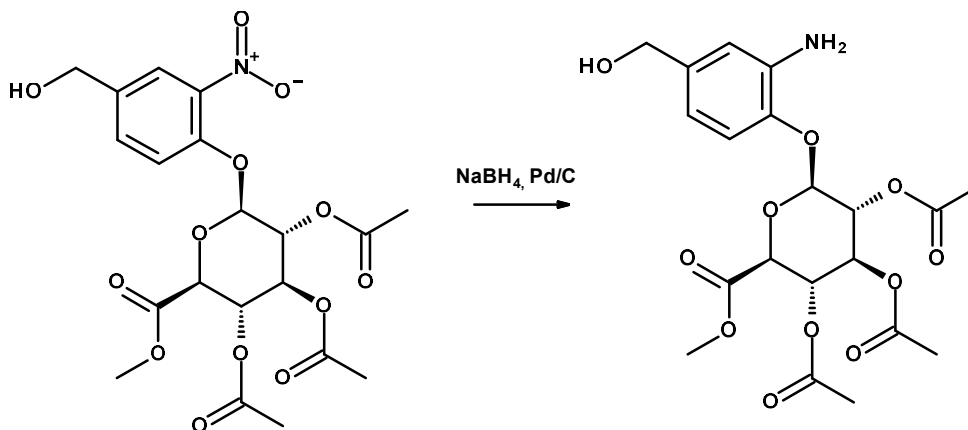


El compuesto del título se preparó como se describe en WO 2011/066418 A1.

10

15

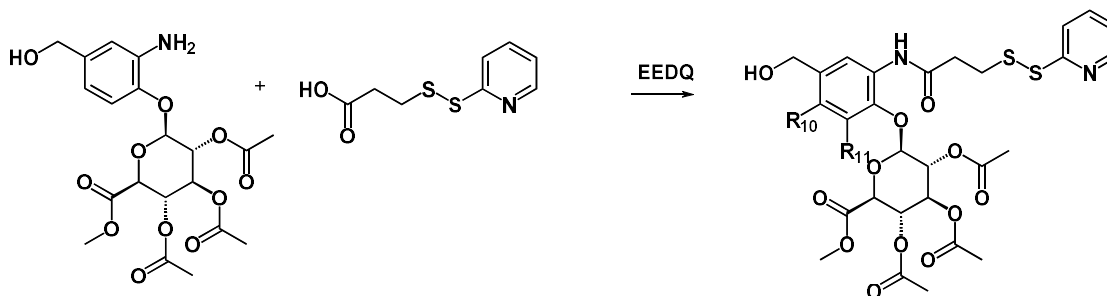
Síntesis de XLIII-1: (2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-triacetoxi-6-[2-amino-4-(hidroximetil)fenoxi]tetrahidropiran-2-carboxilato de metilo



Se disolvió (2S,3S,4S,5R)-3,4,5-triacetoxi-6-[4-(hidroximetil)-2-nitro-
 5 fenoxi]tetrahidropiran-2-carboxilato de metilo (361 mg, 0,74 mmol) en MeOH y se le
 añadió Pd/C (50,0 mg, 0,47 mmol) seguido de NaBH₄ (84,4 mg, 2,23 mmol). La
 mezcla de reacción se agitó a RT durante 15 min. La LC-MS indicó que se había
 formado el producto deseado. La mezcla de reacción se filtró a través de celite y
 luego se inactivó con NH₄Cl sat. El producto se extrajo con DCM, EtOAc y las capas
 10 orgánicas se combinaron. Se lavaron con salmuera y se concentraron. El producto
 bruto separó a la mitad y una parte se purificó mediante RP HPLC (20-95 % de
 ACN/H₂O) para dar (2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-triacetoxi-6-[2-amino-4-
 (hidroximetil)fenoxi]tetrahidropiran-2-carboxilato de metilo (180 mg, 0,40 mmol, 53,1
 % de rendimiento). MS m/z hallado 456.2 [M+H]⁺.

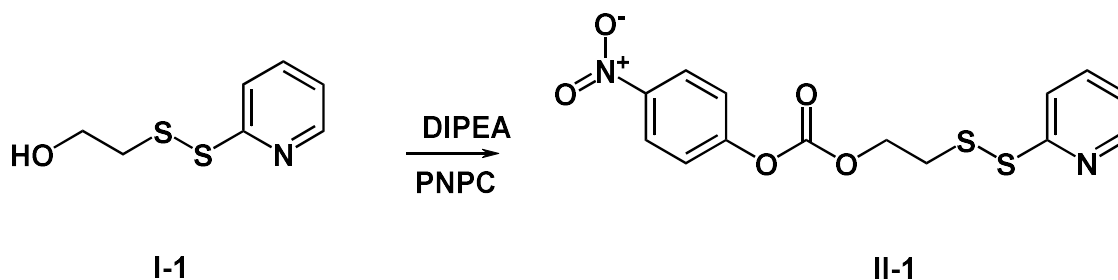
15

Síntesis de XLV-1: (2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-triacetoxi-6-[3-R10-2-R11-4-(hidroximetil)-6-[3-(2-piridilidisulfanil)propanoilamino]fenoxi]tetrahidropiran-2-carboxilato de metilo



Se añadió EEDQ (130 mg, 0,527 mmol) a ácido 3-(2-piridildisulfanil) propanoico (56,7 mg, 0,263 mmol) disuelto en DCM y se agitó durante 20 min en N₂. El (2S,3S,4S,5R)-3,4,5-triacetoxi-6-[2-amino-4-(hidroximetil)fenoxi]tetrahidropiran-2-carboxilato de metilo (120 mg, 0,263 mmol) se disolvió en DCM y se agregó a la mezcla y agitó durante la noche. La LC-MS indicó que se había formado el producto deseado. La mezcla de reacción se concentró y se purificó mediante cromatografía de fase inversa (20-95 % de ACN/H₂O) para dar 63 mg de (2S,3S,4S,5R)-3,4,5-triacetoxi-6-[4-(hidroximetil)-2-[3-(2-piridildisulfanil)propanoilamino]fenoxi]tetrahidropiran-2-carboxilato de metilo (63,0 mg, 0,0965 mmol, rendimiento: 36.6 %). MS m/z hallado 653,2 [M+H]⁺.

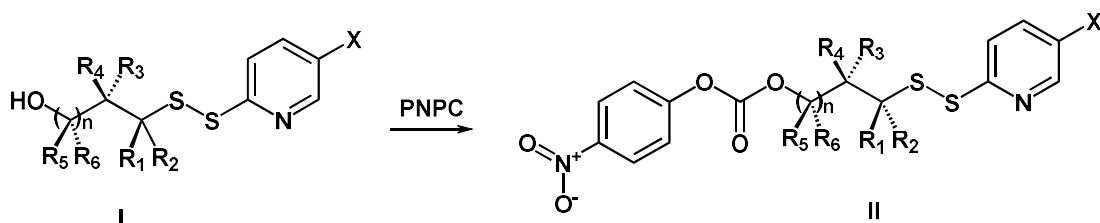
Intermedio II-1: (4-nitrofenil) 2-(2-piridildisulfanil)etil carbonato



A 2-(2-piridildisulfanil)etanol (517 mg, 2,76mmol) en 20 ml de CH₂Cl₂ en N₂ a 4 °C se le agregaron N,N-diisopropiletilamina (1,02 mL, 5,52 mmol) y (4-nitrofenil) carbonocloridato (834 mg, 4,14 mmol). La mezcla se agitó durante 16 h en N₂. La mezcla se disolvió en 40 mL de EtOAc y se inactivó con 20 mL de NH₄Cl sat. La mezcla se lavó con 2 x 20 mL de H₂O y 1 x 20 mL de salmuera saturada. La mezcla bruta se purificó mediante una columna de SiO₂, con elución de 0-50 % de EtOAc/hexanos para dar (4-nitrofenil) 2-(2-piridildisulfanil)etil carbonato (482 mg, 50 % de rendimiento).

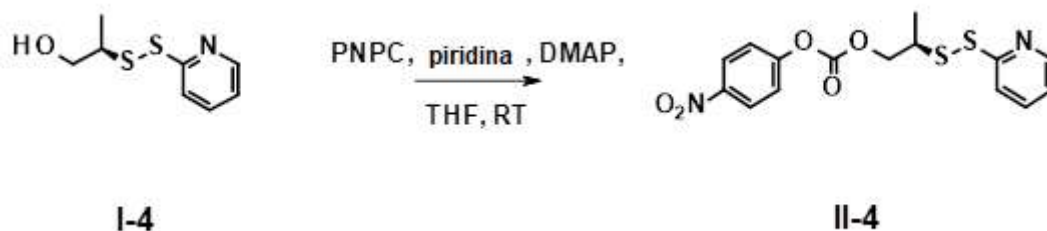
Intermedios II-2, II-3 y II-5

Los intermedios II-2, II-3 y II-5 se prepararon de manera análoga al intermedio II-1, utilizando los intermedios apropiados I-2, I-3 y I-5, como se muestra a continuación: Tabla 9. Intermedios adicionales



Intermedio	R ¹ , R ²	R ³ , R ⁴	n	R ⁵ , R ⁶	X	MH ⁺
II-2	Me-H (rac)	H, H	0	---	H	367,1
II-5	H, Me	H, H	0	---	H	367,1
II-3	Me, Me	H, H	0	---	NO ₂	

Intermedio II-4: (4-nitrofenil) [(2R)-2-(2-piridildisulfanil)propil] carbonato

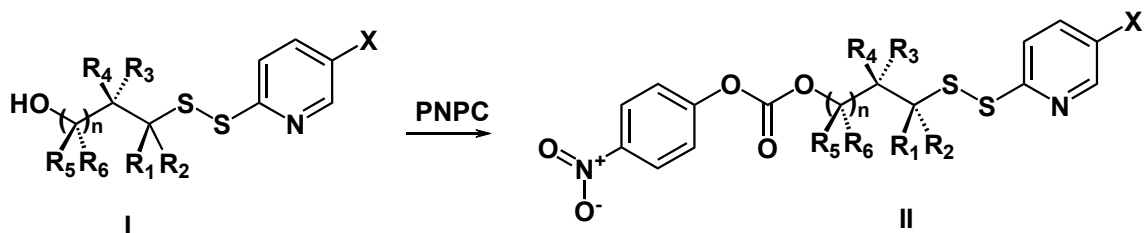


- 5 A (2R)-2-(2-piridildisulfanil)propan-1-ol (0,39 g, 1,94 mmol) en THF en N₂ se le añadió piridina (0,16 mL, 1,94 mmol) y el carbonocloridato de (4-nitrofenilo) (0,59 g, 2,91 mmol). La mezcla se agitó durante 16 h en N₂. La mezcla se diluyó en EtOAc y se inactivó con 20 mL de NH₄Cl sat. La mezcla se lavó con agua y salmuera y la capa orgánica se concentró. La mezcla cruda se purificó por cromatografía en
- 10 columna (SiO₂, 0-50% EtOAc/hexanos) para proporcionar 0,59 g, 83 % de [(2R)-2-(2-piridildisulfanil)propil] carbonato de (4-nitrofenilo). MS m/z hallado 367,1 [M+H]⁺.

Intermedios II-6 a II-9

- Los intermedios II-6, II-7, II-8 y II-9 se prepararon de manera análoga al intermedio
- 15 II-4, como se muestra a continuación en la tabla 10:

Tabla 10. Intermedios adicionales

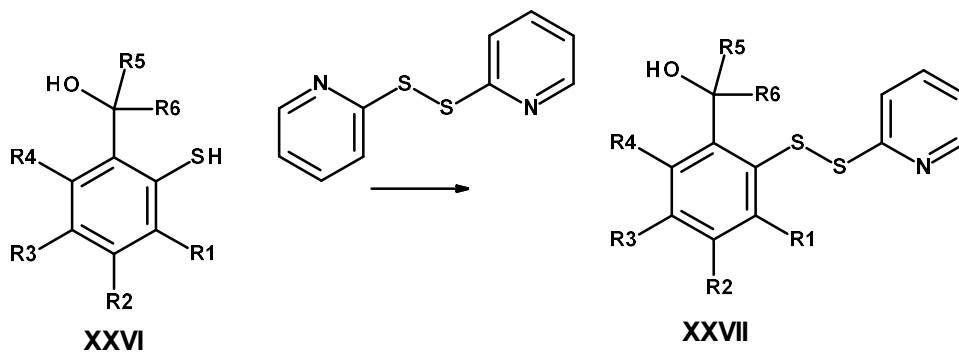


Intermedio	R ¹ , R ²	R ³ , R ⁴	n	R ⁵ , R ⁶	X	MH ⁺
II-6	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ - (R ¹ y R ² forman un ciclobutilo)	H, H	0	---	NO ₂	438,0
II-7	H, H	H, Ph	0	---	H	429,1
II-8	H, H	H, CO ₂ Me	0	---	H	411,0
II-9	H, H	H, CH ₂ OMe	0	---	H	397,1
II-10	H, H	H, H	1	H, H	H	495,1

Síntesis del intermedio XXVII-1

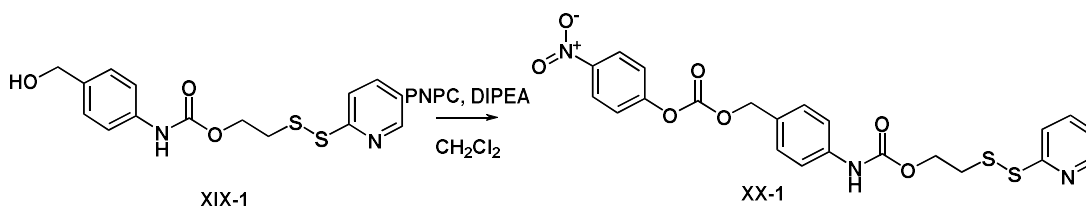
El intermedio XXVII-1 se prepara de manera análoga a los intermedios XXII.

5 Tabla 11. Intermedios XXVII



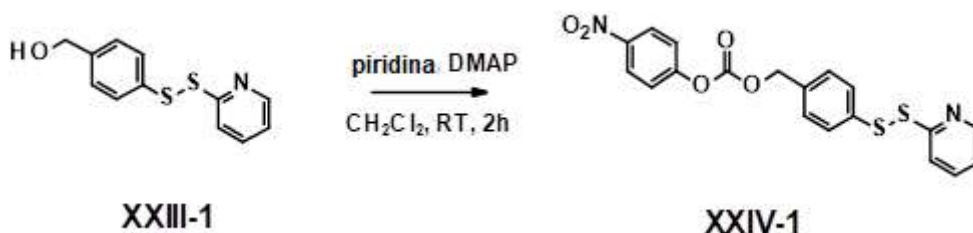
Int.	R ¹ , R ² , R ³ , R ⁴	R ⁵ , R ⁶	MH ⁺
XXVII-1	H, H, H, H	H, H	250,1

Intermedio XX-1: (4-nitrofenil) [4-[2-(2-piridildisulfanil)etoxicarbonil amino]fenil]metil carbonato



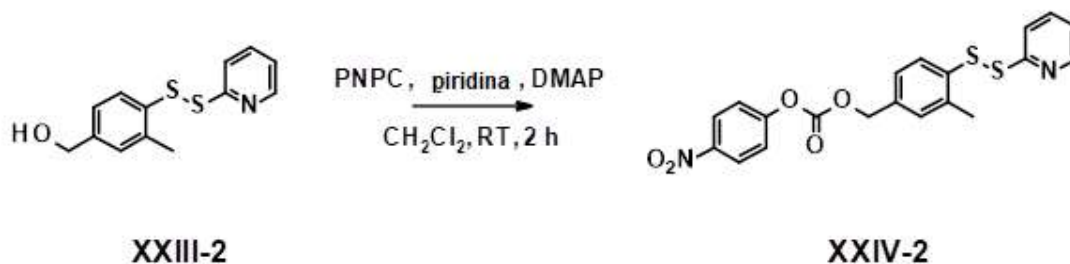
A-[4-(hidroximetil)fenil]carbamato de 2-(2-piridildisulfanil)etilo (136 mg, 0,41 mmol) en 5 ml de CH₂Cl₂ en N₂ se le agregaron DIPEA (0,15 mL, 0,81 mmol) y (4-nitrofenil) carbonocloridato (122 mg, 0,61 mmol). La mezcla se agitó durante 16 h en N₂. La mezcla se disolvió en 20 mL de EtOAc y se inactivó con 20 mL de NH₄Cl sat. La mezcla se lavó con 2 x 20 mL de H₂O y 1 x 20 mL de salmuera saturada. La mezcla bruta se purificó mediante cromatografía en columna (SiO₂, 0-25 % de EtOAc/hexanos) para brindar (4-nitrofenil) [4-[2-(2-piridildisulfanil)etoxicarbonil amino]fenil]metil carbonato (44,2 mg, 0,09 mmol, rendimiento: 21.8 %).

Intermedio XXIV-1: (4-nitrofenil) [4-(2-piridildisulfanil)fenil]metil carbonato



A una solución agitada de (4-(piridin-2-ildisulfanil)fenil)metanol (0,40 g, 1,60 mmol) en CH₂Cl₂ (10 mL) se le agregaron cloroformiato de 4-nitrofenilo (0,65 g, 3,2 mmol), piridina (0,25 mL, 3,20 mmol), una cantidad catalítica de DMAP (0,005 g) a 0 ° C. La mezcla se dejó agitar durante 2 h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se inactivó con solución de HCl 1,5 N. La capa orgánica se separó y se lavó con salmuera, se secó en Na₂SO₄ anhidro y se concentró. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna (SiO₂, 20-30 % de EtOAc/hexanos) para brindar (4-nitrofenil) [4-(2-piridildisulfanil)fenil]metil carbonato como un líquido incoloro (600 mg, 91 % de rendimiento); MS m/z 415,0 [M+H]⁺

Intermedio XXIV-2: [3-metil-4-(2-piridildisulfanil)fenil]metil (4-nitrofenil) carbonato

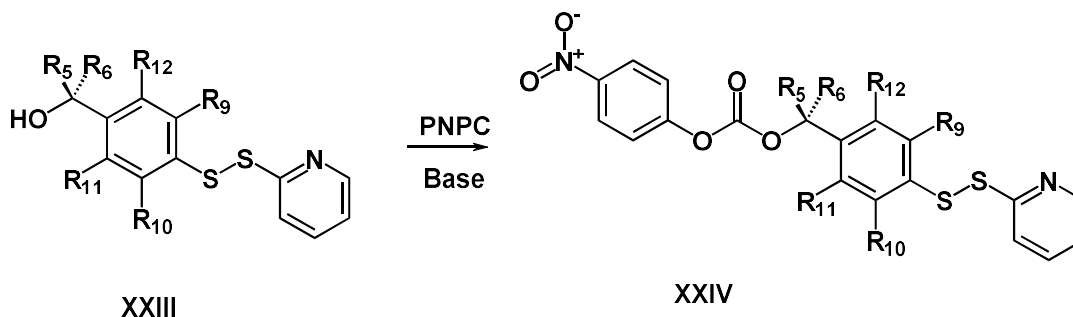


- 5 A una solución agitada de (3-metil-4-(piridin-2-ildisulfanil)fenil)metanol (0,69 g, 2,60 mmol) disuelta en CH₂Cl₂ (10 mL) se le agregaron cloroformiato de 4-nitrofenilo (1,05 g, 5,2 mmol), piridina (0,43 mL, 5,2 mmol) y una cantidad catalítica de DMAP (0,005 g) a 0 °C. La mezcla se dejó agitar durante 2 h a temperatura ambiente. Una vez completada la reacción, la mezcla de reacción se inactivó con HCl 1.5 N. La
- 10 capa orgánica se separó, se lavó con solución de cloruro de sodio (10 mL), se secó en Na₂SO₄ anhidro y se concentró. El producto bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en columna (SiO₂, 20-30 % de EtOAc/hexanos) para brindar (3-metil-4-(piridin-2-ildisulfanil)fenil]metil (4-nitrofenil) carbonato (700 mg, 62 % de rendimiento). MS m/z 429,0 [M+H]⁺.

15

Los siguientes intermedios se prepararon de manera análoga a los intermedios XXIV-1 y XXIV-2, como se muestra a continuación en la tabla 12:

Tabla 12. Intermedios adicionales

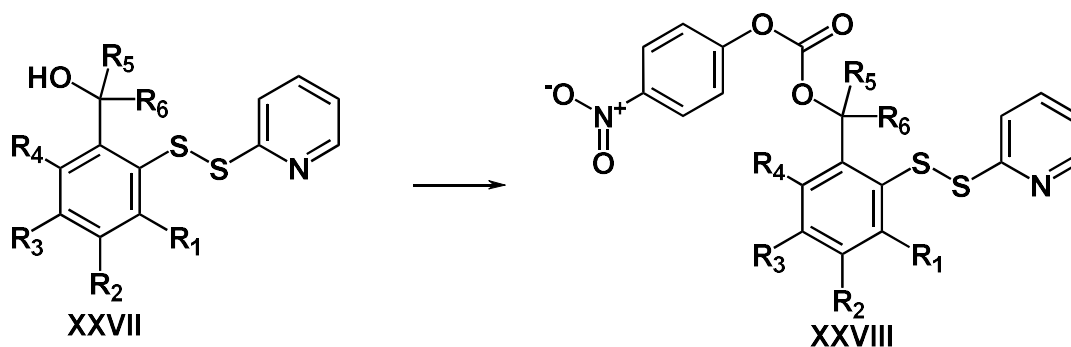


Intermedio	R ⁵ , R ⁶	R ⁹ , R ¹⁰ , R ¹¹ , R ¹²	X	MH ⁺
XXIV-3	H, H	H, H, Me, H	H	429,0

XXIV-4	H, H	Me, Me, H, H	H	443,0
--------	------	--------------	---	-------

Intermedios XXVIII

Tabla 13. Intermedios XXVIII



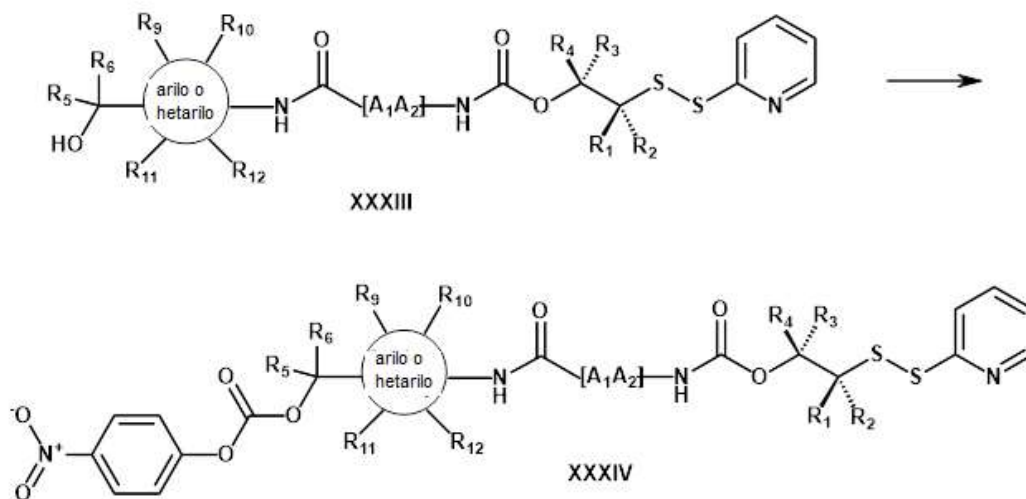
Int.	R ¹ , R ² , R ³ , R ⁴	R ₅ , R ₆	MH ⁺
XXVIII-1	H, H, H, H	H, H	415,0

5

El intermedio XXVIII-1 se preparó de manera análoga a los intermedios XXIV.

Intermedios XXXIV

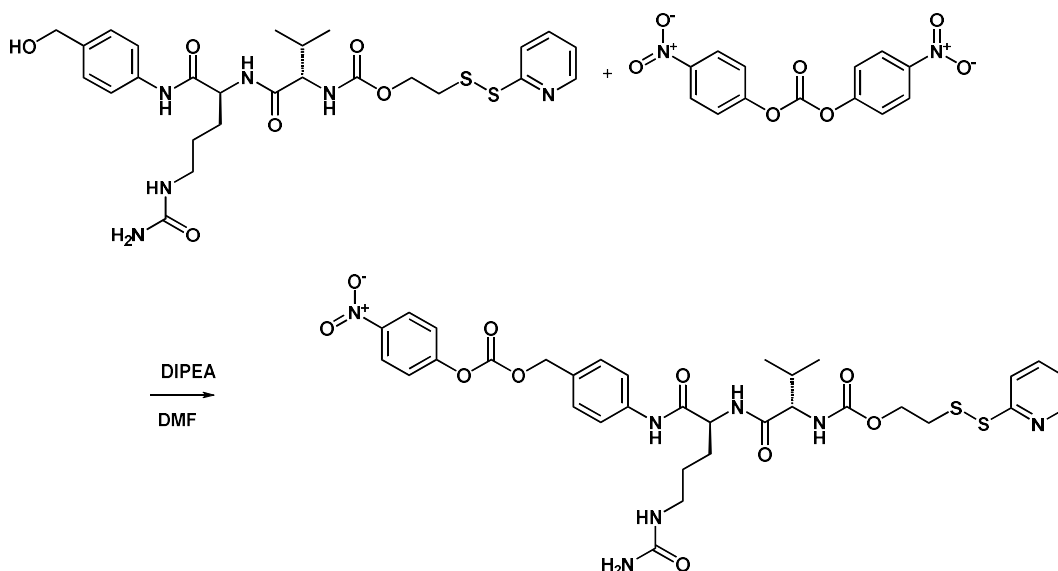
Tabla 14. Intermedios XXXIV



10

Int.	R ¹ , R ² , R ³ , R ⁴	R ⁵ , R ⁶	R ⁹ , R ¹⁰ , R ¹¹ , R ¹²	A ₁ , A ₂	MH ⁺
XXXIV-1	H, H, H, H	H, H	H, H, H, H	Cit, Val	758,2

Síntesis de XXXIV-1: [4-[[[(2S)-2-[[[(2S)-3-metil-2-[2-(2-piridildisulfanil)-etoxicarbonilamino]butanoil]amino]-5-ureido-pentanoil]amino]fenil]metilo (4-nitrofenil) carbonato

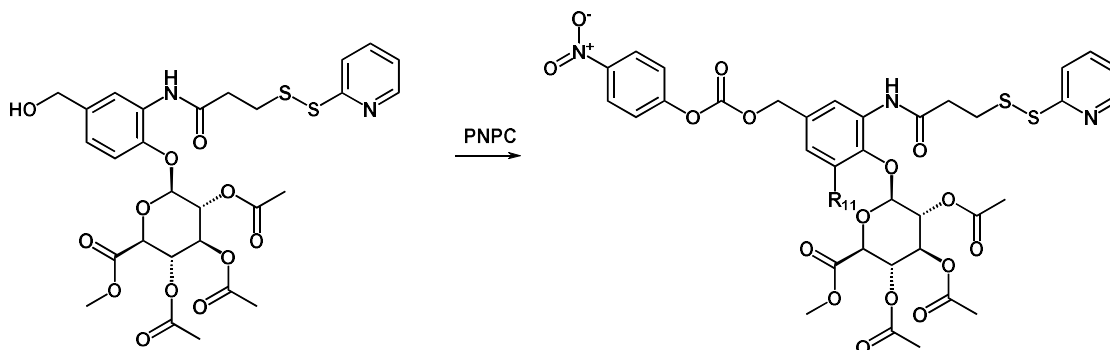


5

Se disolvió *N*-[(1S)-1-[[[(1S)-1-[4-(hidroximetil)fenil]carbamoil]-4-ureido-butil]carbamoil]-2-metil-propil]carbamato de 2-(2-piridildisulfanil)etilo (149 mg, 0,251 mmol) en 2 mL de DMF seca y se enfrió hasta 4 °C. A esto se le añadieron bis(4-nitrofenil)carbonato (153 mg, 0,503 mmol) y *N,N*-diisopropiletilamina (0,0928 mL, 0,503 mmol). La mezcla se dejó calentar hasta RT durante 2 h. El avance de la reacción se controló mediante LC-MS. La mezcla se concentró y se purificó (25 g de SiO₂, 0-10 % de MeOH/CH₂Cl₂) para brindar [4-[[[(2S)-2-[[[(2S)-3-metil-2-[2-(2-piridildisulfanil)etoxicarbonilamino]butanoil]amino]-5-ureido-

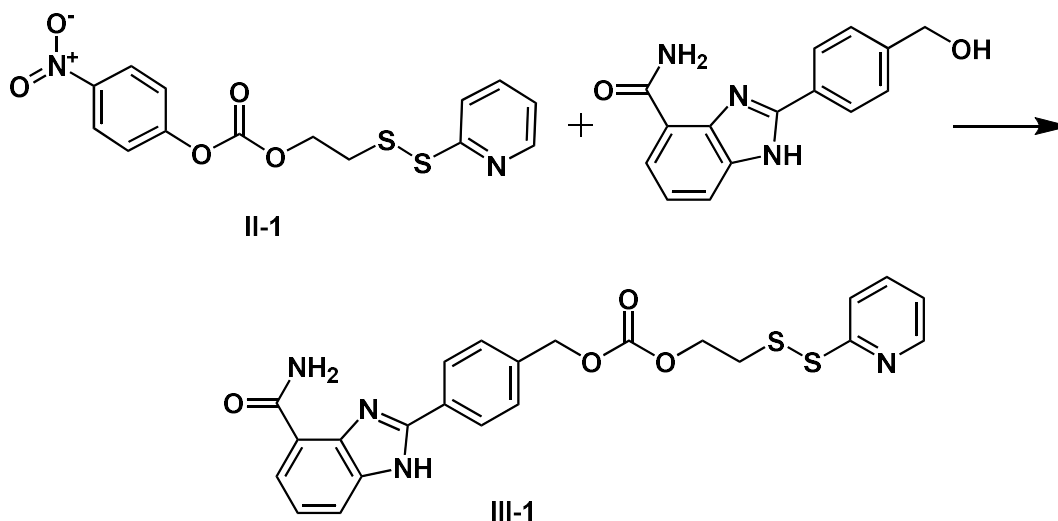
15 MS m/z hallado 758,2 [M+H]⁺.

Síntesis de XLV-1: (2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-triacetoxi-6-[2-R11-4-[(4-nitrofenoxi)carboniloximetil]-6-[3-(2-piridildisulfanil)propanoilamino]-fenoxi]tetrahidropiran-2-carboxilato de metilo



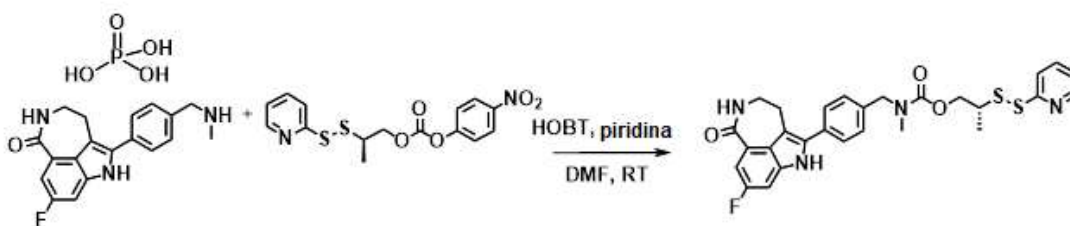
- 5 Se disolvió (2S,3S,4S,5R)-3,4,5-triacetoxi-6-[4-(hidroximetil)-2-[3-(2-piridildisulfanil)propanoilamino]fenoxi]tetrahidropiran-2-carboxilato de metilo (102 mg, 0.15 mmol) en THF y se le añadió piridina (0,02 mL, 0,19 mmol) seguida de (4-nitrofenil) carboncloridato (63,0 mg, 0,313 mmol). La mezcla de reacción se agitó en N₂ durante la noche. La LC-MS indicó una reacción completa. La mezcla se diluyó
- 10 con 100 mL de EtOAc y se inactivó con 50 mL de NH₄Cl sat. La mezcla se lavó con 50 mL de salmuera saturada. La capa orgánica se secó con NaSO₄ y se concentró. La mezcla bruta se purificó mediante cromatografía en columna (50-100 % de EtOAc/hexanos) para dar (58,0 mg, 0,07 mmol, 45,4 %). MS m/z hallado 818,2 [M+H]⁺.

Intermedio III-1: [4-(4-carbamoyl-1H-benzimidazol-2-yl)fenil]metil 2-(2-piridildisulfanil)etil carbonato



A 2-[4-(hidroximetil)fenil]-1~{H}-bencimidazol-4-carboxamida (150 mg, 0,561 mmol)
 5 en 4 mL de DMF seca en N₂ se le agregaron N, N-diisopropiletilamina (0,207 mL, 1,12 mmol), DMAP (68,6 mg, 0,561 mmol) y (4-nitrofenil) 2-(2- piridildisulfanil)etil carbonato (241 mg, 0,684 mmol). La mezcla se agitó durante 16 h y luego se diluyó con 50 ml de EtOAc y se lavó sucesivamente con 1 x 20 mL de NH₄Cl sat., 3 x 30 mL de NaHCO₃ sat., 3 x 30 mL de H₂O y 1 x 20 mL de salmuera saturada. La fase
 10 orgánica se secó con MgSO₄, se filtró y se concentró. El residuo bruto se purificó (SiO₂, 50-100 % de EtOAc/hexanos) para dar 260 mg, 97 % de rendimiento de [4-(4-carbamoyl-1H-benzimidazol-2-yl)fenil]metil2-(2-piridildisulfanil)etil carbonato.

Intermedio III-4: [(2R)-2-(2-piridildisulfanil)propil] N-[[4-(6-fluoro-3,10-diazatriciclo[6.4.1.0^{4,13}]trideca-1,4,6,8(13)-tetraen-2-yl)fenil]metil]-N-metil-carbamato



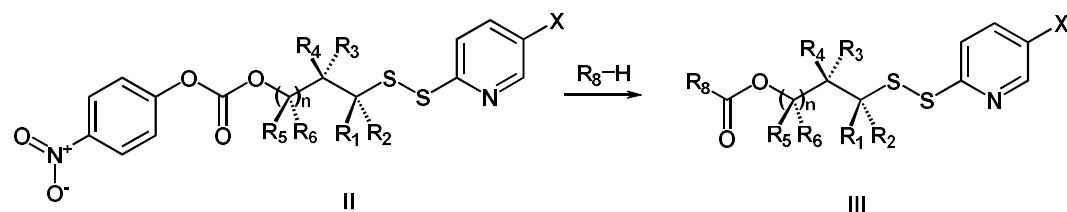
A una mezcla de HOBt (48,0 mg, 0,31 mmol), piridina (0,11 mL, 1,31 mmol), tamiz molecular finamente molido 4 Å (250 mg) y el fosfato de 6-fluoro-2-[4-

(metilaminomet,il)fenil]-3,10-diazatriciclo[6.4.1.04,13]trideca-1,4,6,8(13)-tetraen-9-ona (110 mg, 0,26 mmol) en 5 mL de DMF anhidra se le agregó el (4-nitrofenil) [(2R)-2-(2-piridildisulfanil)propil] carbonato [Intermedio II-4] (105 mg, 0,29 mmol). Después de agitar durante 16 h a temperatura ambiente, los tamices moleculares se retiraron mediante filtración y el disolvente se eliminó al vacío. El residuo luego se adsorbió en SiO₂ y se purificó mediante cromatografía en columna (SiO₂, 0-10 % de MeOH/CH₂Cl₂) para brindar [(2R)-2-(2-piridildisulfanil)propil] N-[[4-(6-fluoro-3,10-diazatriciclo[6.4.1.04,13]trideca-1,4,6,8(13)-tetraen-2-il)fenil]metil]-N-metil-carbamato (115 mg, 80 % de rendimiento) MS m/z 551,1 (M+H)⁺.

Intermedios III-2, III-3 y III-5 a III-15

Los siguientes intermedios se prepararon de manera análoga a los intermedios III-1 y III-4, como se muestra a continuación en la tabla 15.

Tabla 15. Intermedios adicionales

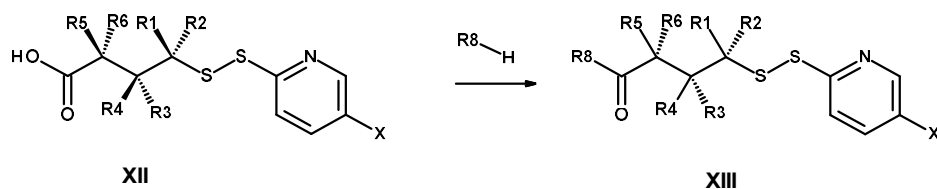


Intermedio	R ⁸ H	R ¹ , R ²	R ³ , R ⁴	n	R ⁵ , R ⁶	X	MH ⁺
III-2	R ⁸ H-1	Me-H (rac)	H, H		---	H	495,1
III-3	R ⁸ H -1	Me, Me	H, H		---	NO ₂	
III-5	R ⁸ H -1	Me, H	H, H		---	H	496,1
III-6	R ⁸ H -2	H, H	H, H		---	H	451,1
III-7	R ⁸ H -3	H, H	H, H		---	H	534,2
III-8	R ⁸ H -4	H, H	H, H		---	H	458,1
III-9	R ⁸ H -16	H, H	H, H		---	H	536,4
III-10	R ⁸ H -16	H, Me	H, H		---	H	551,1
III-11	R ⁸ H -16	Me, H	H, H		---	H	551,1
III-12	R ⁸ H -16	- CH ₂ CH ₂ CH ₂ -	H. H		---	NO ₂	622,2

III-13	R ⁸ H -16	H, H	Ph, H		---	H	613,2
III-14	R ⁸ H -16	H, H	CO ₂ Me. H		---	H	595,2
III-15	R ⁸ H -16	H, H	CH ₂ OMe		---	H	581,2
III-16	R ₈ H-3	H, Me	H, H	0	---	H	548,1
III-17	R ₈ H-3	Me, H	H, H	0	---	H	548,1
III-18	R ₈ H-4	H, Me	H, H	0	---	H	472,1
III-19	R ₈ H-4	Me, H	H, H	0	---	H	472,1
III-20	R ₈ H-16	H, H	H, H	1	H, H	H	495,2

Intermedios XIII enlazados a éster

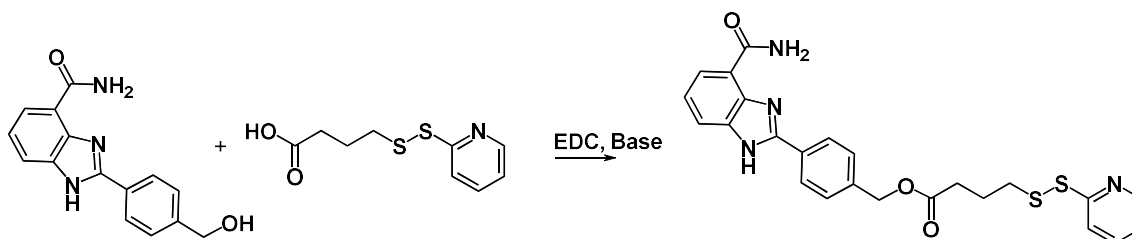
Tabla 16. Intermedios XIII



5

Int.	R ⁸	R ¹ , R ²	R ³ , R ⁴	R ⁵ , R ⁶	X	MH ⁺
XIII-1	R ⁸ H-1	H, H	H, H	H, H	H	479,0

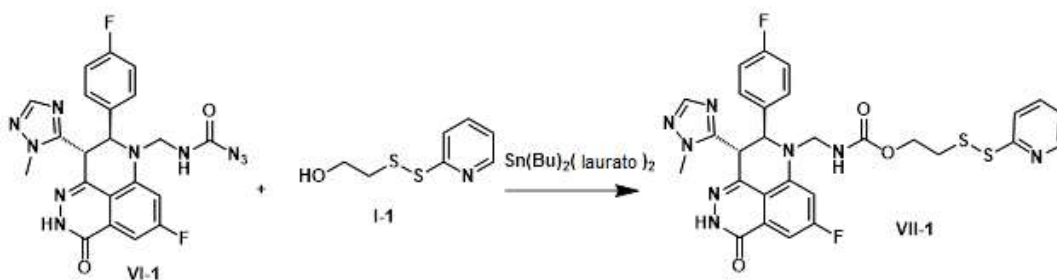
Síntesis de XIII-1: 4-(2-piridildisulfanil)butanoato de [4-(4-carbamoyl-1H-benzimidazol-2-il)fenil]metilo



- 10 A una mezcla de sal de TFA del ácido 4-(2-piridildisulfanil)butanoico (81,2 mg, 0,236 mmol), EDC HCl (47,8 mg, 0,250 mmol) y DIEA (0,0986 mL, 0,576 mmol) en 2 mL de DMF se le agregó 2-[4-(hidroximetil)fenil]-1H-benzimidazol-4-carboxamida (51,3 mg, 0,192 mmol). La mezcla se agitó durante la noche y se controló mediante LC-MS. La mezcla se concentró y se purificó con cromatografía con SiO₂ (0-10 % de
- 15 MeOH/CH₂Cl₂) para dar (83,1 mg, 0,17 mmol, rendimiento: 90,4 %) MS m/z hallado

479,0 [M+H]⁺,

Intermedio VII-1: N-[[[(11S,12R)-7-fluoro-11-(4-fluorofenil)-12-(2-metil-1,2,4-triazol-3-il)-4-oxo-2,3,10-triazatriciclo[7.3.1.0⁵,13]trideca-1,5,7,9(13)-tetraen-10-il]metil]carbamato de 2-(2-piridildisulfanil)etilo

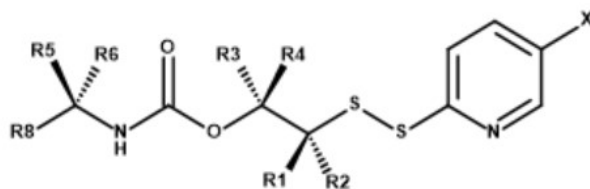


Se disolvió la 2-[(11S,12R)-7-fluoro-11-(4-fluorofenil)-12-(2-metil-1,2,4-triazol-3-il)-4-oxo-2,3,10-triazatriciclo[7.3.1.0⁵,13]trideca-1,5,7,9(13)-tetraen-10-il]acetil azida, V-1 (170 mg, 0,367 mmol) en DMF seca (2 mL) y se añadió 2-(2-piridildisulfanil)etanol (137 mg, 0,734 mmol). La reacción se calentó hasta 65 ° C durante 2 h. Se añadió dilaurato de dibutilestaño catalítico (40 uL) y la mezcla de reacción se agitó durante la noche a 65°C. La mezcla se concentró y se purificó mediante cromatografía en columna (0-10 % de MeOH/DCM) para dar 3 picos. La RMN indicó que el pico 2 era el producto deseado. MALDI mostró 3 masas de 624 (producto deseado), 646 (product+23) y 380 (BMN). Rendimiento: 80 mg de intermedio VII-1: N-[[[(11S,12R)-7-fluoro-11-(4-fluorofenil)-12-(2-metil-1,2,4-triazol-3-il)-4-oxo-2,3,10-triazatriciclo[7.3.1.0⁵,13]trideca-1,5,7,9(13)-tetraen-10-il]metil]carbamato de 2-(2-piridildisulfanil)etilo.

20 Intermedios VII-2 a VII-5

Los intermedios VII-2, VII-3 y VII-4 se prepararon usando R₈H-15 y los intermedios II-4, II-5 y II-6, respectivamente. El intermedio VII-5 se preparó usando R₈H-17 y el intermedio II-1 como se muestra en la tabla 17.

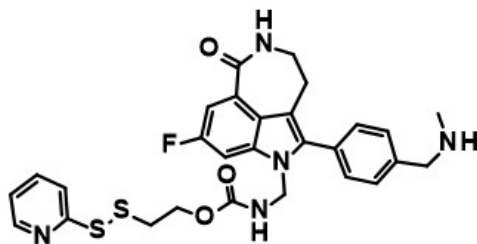
Tabla 17. Intermedios adicionales



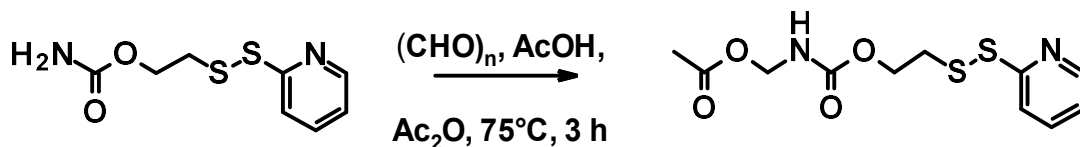
VII

Int.	R ⁸ H	R ¹ , R ²	R ³ , R ⁴	R ⁵ , R ⁶	X	MH ⁺
VII-2	R ⁸ H -15	H, Me	H, H	H, H	H	637,2
VII-3	R ⁸ H-15	Me, H	H, H	H, H	H	637,2
VII-4	R ⁸ H -15	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ - (R1 y R2 forman un ciclopropilo)	H, H	H, H	NO ₂	708,2
VII-5	R ⁸ H-17	H, H	H, H	H, H	H	541,1

Intermedio VII-6: N-[[6-fluoro-2-[4-(metilaminometil)fenil]-9-oxo-3,10-diazatriciclo[6.4.1.0^{4,13}]trideca-1,4,6,8(13)-tetraen-3-il]metil]carbamato de 2-(2-piridildisulfanil)etilo



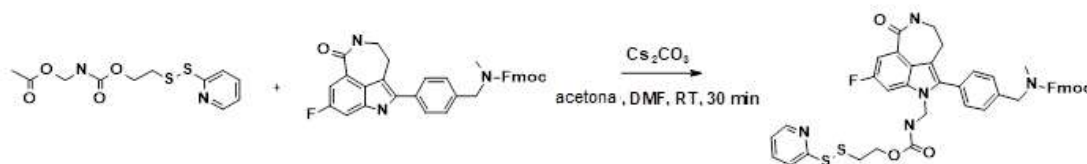
Etapas 1: (((2- (piridin-2-ilisulfanil)etoxi)carbonil)amino)acetato de metilo



A una solución agitada de carbamato de 2-(piridin-2-ildisulfanil)etilo (0,10 g, 0,43 mmol) en ácido acético (0,59 mL) se le añadieron paraformaldehído (0,01 g, 0,47 mmol) y anhídrido acético (1,78 mL). La mezcla se calentó a 75 °C durante 3 h. Una vez completada la reacción, la mezcla de reacción se inactivó con agua (20 mL) y se extrajo con acetato de etilo (20 mL x 2). La capa orgánica combinada se lavó con

agua (20 mL) y solución de salmuera (20 mL). La fase orgánica se separó en Na_2SO_4 anhidro y se concentró. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna (SiO_2 , 40-50 % de acetato de etilo/hexanos) para proporcionar (((2-(piridin-2-ilisulfanil)etoxi)carbonil)amino)acetato de metilo como un líquido amarillo (120 mg, 70 %). MS m/z 303,3 ($\text{M}+\text{H}^+$)

Etapa 2: (4-(8-fluoro-1-oxo-6-(((2-(piridin-2ildisulfanil)etoxi)carbonilo)amino)metil)-2,3,4,6-tetrahidro-1H-azepino[5,4,3-cd]indol-5-il)bencil)(metil)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo



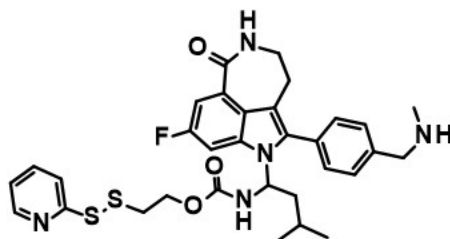
- 10 A una solución agitada de (4-(8-fluoro-1-oxo-2,3,4,6-tetrahidro-1H-azepino[5,4,3-cd]indol-5-il)bencil)(metil)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo (0,05 g, 0,09 mmol) en acetona (1,0 mL) se le añadió carbonato de cesio (0,06 g, 0,18 mmol) y se agitó durante 5 min a temperatura ambiente en atmósfera de N_2 . Luego se añadieron acetato de (((2-(piridin-2-ilisulfanil)etoxi)carbonil)amino)metilo (0,03 g, 0,09 mmol) y
- 15 DMF (0,1 mL) y se agitó adicionalmente durante 30 minutos a temperatura ambiente. La reacción se inactivó con agua (25 mL) y luego se extrajo con mezcla al 10 % de $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (50 mL x 2). La capa orgánica combinada se secó en sulfato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida para proporcionar el producto bruto que se purificó mediante cromatografía en columna instantánea usando una mezcla al
- 20 60-70 % de $\text{EtOAc}/\text{hexanos}$ para proporcionar (9H-fluoren-9-il)metil(4-(8-fluoro-1-oxo-6-(((2-(piridin-2ildisulfanil)etoxi)carbonil)amino)metil)-2,3,4,6-tetrahidro-1H-azepino[5,4,3-cd]indol-5-il)bencil)(methil)carbamato (12 mg, 17 % rendimiento); MS m/z 788,8 ($\text{M}+\text{H}^+$).

Etapa 3: N-[[6-fluoro-2-[4-(metilaminometil)fenil]-9-oxo-3,10-diazatriciclo[6.4.1.0^{4,13}]trideca-1,4,6,8(13)-tetraen-3-il]metil]carbamato de 2-(2-piridildisulfanil)etilo

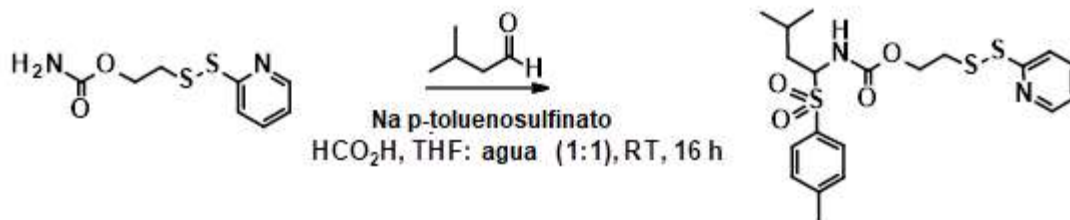


Se agito (4-(8-fluoro-1-oxo-6-(((2-(piridin-2ildisulfanil)etoxi)carbonilo)amino)metil)-2,3,4,6-tetrahidro-1H-azepino[5,4,3-cd]indol-5-il)bencil)(metil)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo (0.15 g, 0.19 mmol) con 20 % de dietilamina en DMF (1.4 mL) durante 1 h en N₂ a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se concentró hasta sequedad y se purificó mediante HPLC prep. [columna: Inertsil ODS 3V (250 mm X 20 mm X 5 mic); fase móvil-A: amoniaco al 0.1 % en H₂O: fase móvil-B: ACN] para proporcionar N-[[6-fluoro-2-[4-(metilaminometil)fenil]-9-oxo-3,10-diazatriciclo[6.4.1.0^{4,13}]trideca-1,4,6,8(13)-tetraen-3-il]metil]carbamato de 2-(2-piridildisulfanil)etilo como un sólido incoloro (30 mg, 28 % de rendimiento). MS m/z 566,4 (M+H)⁺.

Intermedio VII-7: N-[1-[6-fluoro-2-[4-(metilaminometil)fenil]-9-oxo-3,10-diazatriciclo[6.4.1.0^{4,13}]trideca-1,4,6,8(13)-tetraen-3-il]-3-metil-butil]carbamato de 2-(2-piridildisulfanil)etilo

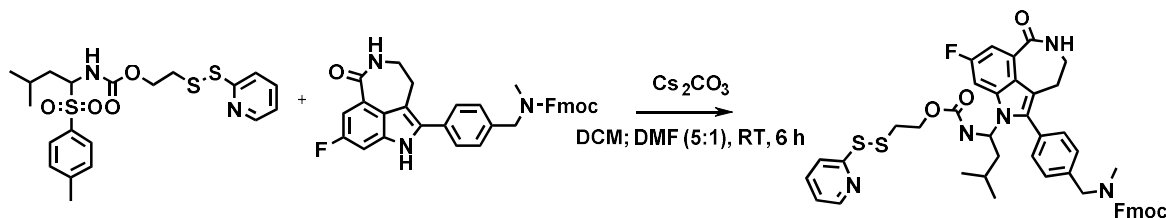


*Eta*pa 1: (3-metil-1-(fenilsulfonil)butil)carbamato de 2-(piridin-2-ilisulfanil)etilo



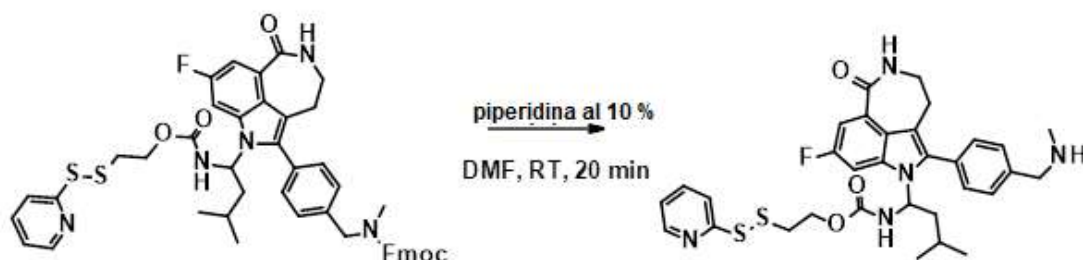
A una solución agitada de carbamato de 2-(piridin-2-ildisulfanil)etilo (2,50 g, 0,01 mol) en THF:agua (19 mL, 1:1) se le añadieron p-toluenosulfonato de sodio (1,93 g, 0,01 mol), 3-metilbutanal (1,26 mL, 0,01 mol) y luego ácido fórmico (2,5 mL). La mezcla se agitó durante 16 h a temperatura ambiente en N₂. La mezcla de reacción se concentró hasta sequedad y después se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en columna (SiO₂, 40-70 % de EtOAc/hexanos) para proporcionar 2-(piridin-2-ilisulfanil) etil(3-metil-1-(fenilsulfonil)butil)carbamato (1,7 g, 41 % de rendimiento). MS m/z 455,1 [M+H]⁺.

Etapa 2: (9H-fluoren-9-il)metil (4-(8-fluoro-6-(3-metil-1-(((2-(piridin-2-ildisulfanil) etoxi) carbonil)amino)butil)-1-oxo-2,3,4,6-tetrahidro-1H-azepino[5,4,3-cd]indol-5-il)bencil)(metil) carbamato



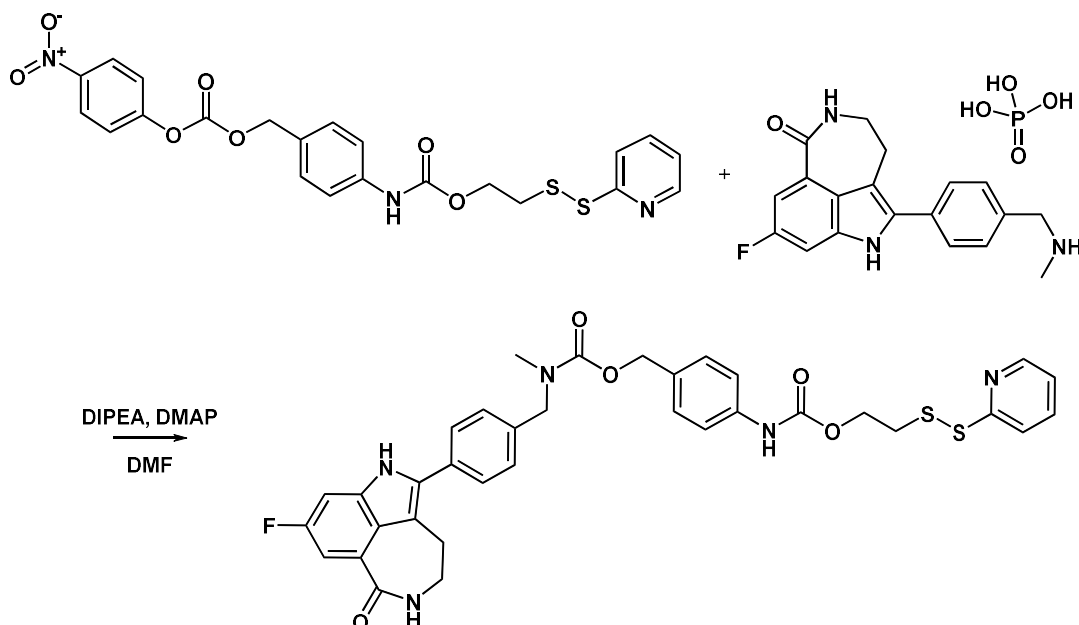
A una suspensión agitada de (9H-fluoren-9-il)metil(4-(8-fluoro-1-oxo-2,3,4,6-tetrahidro-1H-azepino[5,4,3-cd]indol-5il)bencil)(metil)carbamato (0,5 g, 0,92 mmol) y carbonato de cesio (0,89 g, 2,74 mmol) en CH₂Cl₂:DMF (5:1, 12 mL) se le añadió 2-(piridin-2-ilisulfanil) etil(3-metil-1-(fenilsulfonil)butil)carbamato (0,80 g, 1,83 mmol) en porciones durante 4 h. La mezcla se agitó durante 2 h adicionales en N₂ a temperatura ambiente. La reacción se controló mediante TLC. La mezcla de reacción se diluyó con agua (25 mL) y DCM (100 mL). La capa orgánica se separó, se lavó con agua, salmuera. La fase orgánica se separó en Na₂SO₄ anhidro y se concentró. El producto bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en columna (SiO₂, 90-100 % de EtOAc/hexanos) para brindar (9H-fluoren-9-il)metil (4-(8-fluoro-6-(3-metil-1-(((2-(piridin-2-ildisulfanil) etoxi) carbonil)amino)butil)-1-oxo-2,3,4,6-tetrahidro-1H-azepino[5,4,3-cd]indol-5-il)bencil)(metil) carbamato (0,35 g, 45 % de rendimiento). MS m/z 844,1 [M+H]⁺.

Etapa 3: N-[1-[6-fluoro-2-[4-(metilaminometil)fenil]-9-oxo-3,10-diazatriciclo[6.4.1.0^{4,13}]trideca-1,4,6,8(13)-tetraen-3-il]-3-metil-butil]carbamato de 2-(2-piridildisulfanil)etilo



Se agito (9H-fluoren-9-il)metil (4-(8-fluoro-6-(3-metil-1-(((2-(piridin-2-ildisulfanil) etoxi) carbonil)amino)butil)-1-oxo-2,3,4,6-tetrahidro-1H-azepino[5,4,3-cd]indol-5-il)bencil)(metil) carbamato (0.30 g, 0.355 mmol) con 10 % de piperidina en DMF (1.4 mL) durante 20 min a temperatura ambiente en N₂. La mezcla de reacción se concentró hasta sequedad y luego se trituro con éter dietílico para obtener un sólido incoloro. El sólido resultante se purificó adicionalmente mediante HPLC prep. [columna: Inertsil ODS 3V (250 mm X 20 mm X 5 mic), fase móvil-A: amoniaco al 0.1 % en H₂O: fase móvil-B: ACN] para proporcionar N-[1-[6-fluoro-2-[4-(metilaminometil)fenil]-9-oxo-3,10-diazatriciclo[6.4.1.0⁴,13]trideca-1,4,6,8(13)-tetraen-3-il]3-metil-butil]carbamato de 2-(2-piridildisulfanil)etilo (0,07 g, 30 % de rendimiento). MS m/z 622,0 [M+H]⁺.

Intermedio XXI-1: [4-[2-(2-piridildisulfanil) etoxycarbonilamino] fenil]metil N-[[4-(6-fluoro-9-oxo-3,10-diazatriciclo[6.4.1.0⁴,13]trideca-1,4(13),5,7-tetraen-2-il)fenil]metil]-N-metil-carbamato

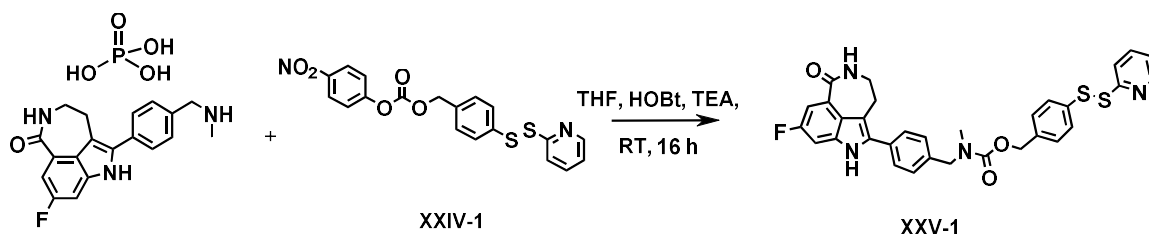


5

A 2-[4-(metilaminometil)fenil]-3,10-diazatriciclo[6.4.1.0⁴,13]trideca-1,4(13),5,7-tetraen-9-ona; ácido fosfórico (36,0 mg, 0,09 mmol) en 2 mL de DMF seca en N₂ se le agregaron DIPEA (0,03 mL, 0,18 mmol), DMAP (10,9 mg, 0,09 mmol) y (4-nitrofenil) [4-[2-(2-piridildisulfanil)etoxycarbonil amino] fenil]metil carbonato (44,8 mg, 0,09 mmol). La mezcla se agitó durante 16 h. La mezcla se diluyó con 20 ml de EtOAc, se lavó con 1 x 20 mL de NH₄Cl sat., 2 x 20 mL de NaHCO₃ sat., 3 x 30 mL de H₂O y 1 x 20 mL de salmuera saturada. La mezcla se secó con MgSO₄, se filtró y se concentró. El residuo bruto se purificó mediante cromatografía en columna (SiO₂, 0-5 % de MeOH/CH₂Cl₂) a brindar [4-[2-(2-piridildisulfanil) etoxycarbonilamino]fenil]metil N-[[4-(6-fluoro-9-oxo-3,10-diazatriciclo[6.4.1.0⁴,13]trideca-1,4(13),5,7-tetraen-2-il)fenil]metil]-N-metil-carbamato (44,2 mg, 0,06 mmol, rendimiento: 75,4 %).

20

Intermedio XXVI-1: N-[[4-(6-fluoro-9-oxo-3,10-diazatriciclo[6.4.1.0^{4,13}]trideca-1,4,6,8(13)-tetraen-2-il)fenil]metil]-N-metil-carbamato de [4-(2-piridildisulfanil)fenil]metilo



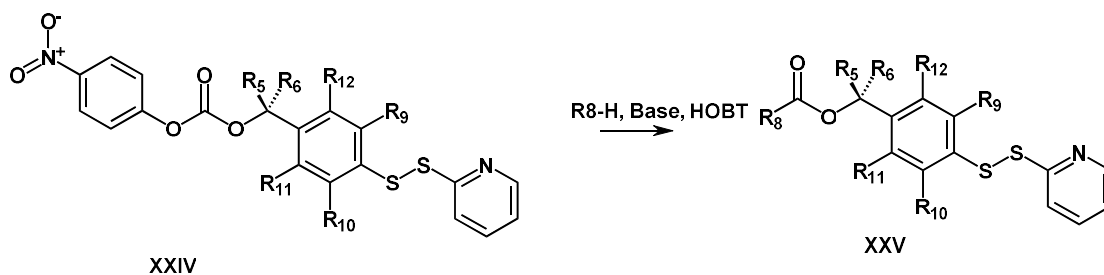
- 5 A una solución agitada de 2-[4-(metilaminometil)fenil]-3,10-diazatriciclo[6.4.1.0^{4,13}]trideca-1,4(13),5,7-tetraen-9-ona; ácido fosfórico (1,00 g, 3,09 mmol) en THF (20 ml) en N₂ se le agregaron TEA (1,40 mL, 3,04 mmol), HOBt (0,21 g, 1,50 mmol) y (4-(piridin-2-ildisulfaneil)bencil)carbonato de 4-nitrofenilo (1,40 g, 3,40 mmol). La mezcla se agitó en N₂ durante 16 h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción
- 10 se concentró y el bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (SiO₂, 0-5 % de MeOH/CH₂Cl₂ para brindar N-[[4-(6-fluoro-9-oxo-3,10-diazatriciclo[6.4.1.0^{4,13}]trideca-1,4,6,8(13)-tetraen-2-il)fenil]metil]-N-metil-carbamato de [4-(2-piridildisulfanil)fenil]metilo como un sólido incoloro (1,13 g, 59 % de rendimiento). MS m/z 599,0 (M+H)⁺.

15

Intermedios XXV-2 a XXV-5

Los intermedios XXV-2 a XXV-5 se prepararon de manera análoga al intermedio XXV-1, utilizando el compuesto R⁸-H apropiado y los intermedios XXIV-2 a XXIV-5 como se muestra a continuación en la tabla 18.

20 Tabla 18. Intermedios adicionales

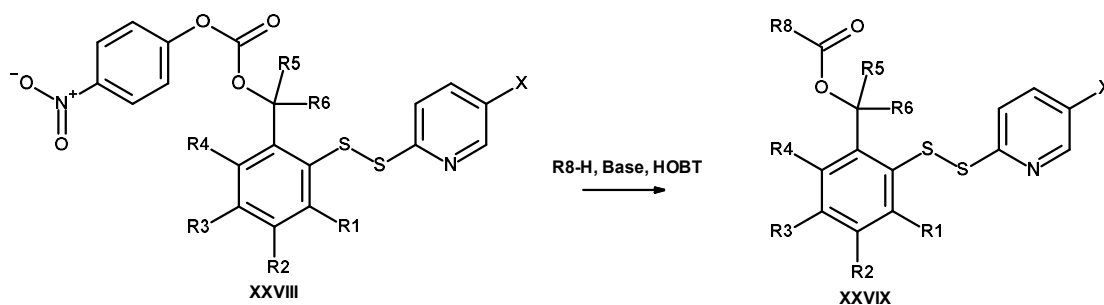


Int.	R ⁸ H	R ⁵ , R ⁶	R ⁹ , R ¹⁰ , R ¹¹ , R ¹²	X	MH ⁺
XXV-2	R ⁸ H-16	H, H	Me, H, H, H	H	613,2

XXV-3	R ⁸ H-16	H, H	H, H, Me, H	H	613,0
XXV-4	R ⁸ H-16	H, H	Me, Me, H, H	H	627,0
XXV-5	R ₈ H-3	H, H	H, H, H, H	H	596,2
XXV-6	R ₈ H-4	H, H	H, H, H, H	H	520,2
XXV-7	R ₈ H-21	H, H	H, H, H, H	H	739,2

Síntesis de intermedios XXVIX a partir de XXVII

Tabla 19. Intermedios XXVIX



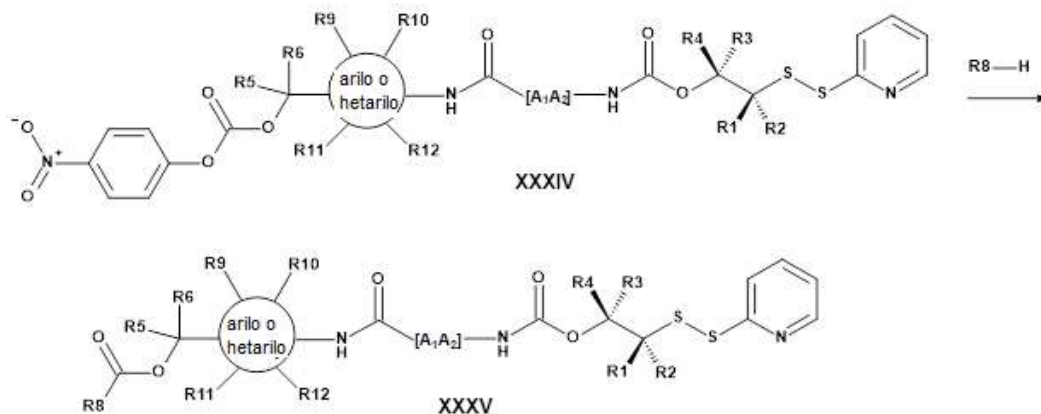
Int.	R ⁸	R ¹ , R ²	R ³ , R ⁴	R ⁵ , R ⁶	X	MH ⁺
XXVIX-1	R ₈ H-16	H, H	H, H	H, H	H	599,1

5

El intermedio XXVIX-1 se preparó a partir del intermedio XXVIII-1, de forma análoga al intermedio XXV-1.

Intermedios XXXV a partir de XXXIV

10 Tabla 20. Intermedios XXXV

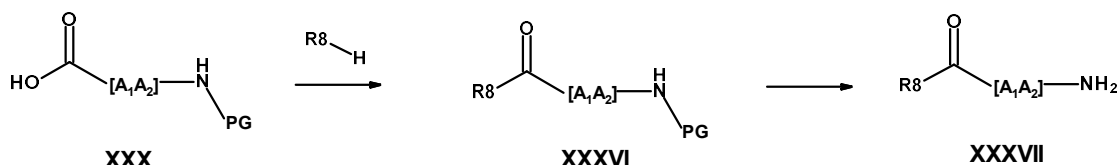


Int.	R ⁸	R ¹ , R ² , R ³ , R ⁴ ,	R ⁵ , R ⁶	R ⁹ , R ₁₀ , R ₁₁ , R ₁₂	A ₁ , A ₂	MH ⁺
XXXV-1	R ⁸ H-16	H, H, H, H	H, H	H, H, H, H	Cit, Val	942,4

El intermedio XXXV-1 se preparó a partir del intermedio XXXIV-1, de forma análoga al intermedio XXV-1.

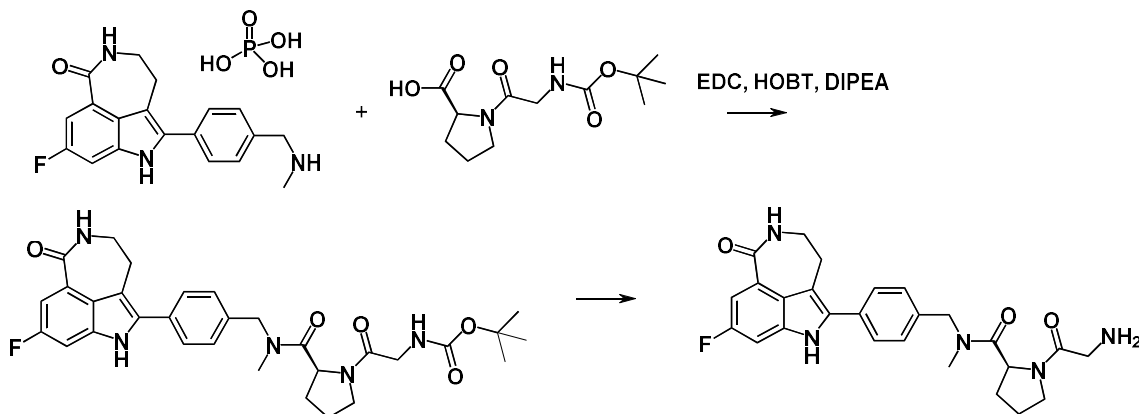
5 Intermedios XXXVII a partir de XXX

Tabla 21. Intermedios XXXVII



Int.	R ⁸	R ¹ , R ² , R ³ , R ⁴ ,	A ₁ , A ₂	X	MH ⁺
XXXVII-1	R ⁸ H-16	H, H, H, H	Pro, Gly	H	478,2

Síntesis de XXXVII-1: (2S)-1-(2-aminoacetil)-N-[[4-(6-fluoro-9-oxo-3,10-diazatriciclo[6.4.1.0^{4,13}]trideca-1,4,6,8(13)-tetraen-2-il)fenil]metil]-N-metil-pirrolidina-2-carboxamida



Etap 1. Síntesis de terc-butil-N-[2-[(2S)-2-[[4-(6-fluoro-9-oxo-3,10-diazatriciclo[6.4.1.0^{4,13}]trideca-1,4,6,8(13)-tetraen-2-il)fenil]metil]-metil-carbamoyl]pirrolidin-1-il]-2-oxo-etil]carbamato

Se disolvió ácido 1-[2-(terc-butoxicarbonilamino)acetil]pirrolidina-2-carboxílico (0,16

g, 0,59 mmol) en DMF y se le añadieron hidrato de 1-hidroxibenzotriazol (80,0 %, 114 mg, 0,59 mmol) y EDC HCl (114 mg, 0,59 mmol). La solución se agitó a RT durante 15 minutos antes de agregar el 6-fluoro-2-[4-(metilaminometil)fenil]-3,10-diazatriciclo[6.4.1.04,13]trideca-1,4,6,8(13)-tetraen-9-ona, ácido fosfórico (200 mg, 0,475 mmol) y N, N-diisopropiletilamina (0,44 mL, 2,37 mmol). La solución se calentó luego hasta 65 °C durante la noche. La LC-MS indicó una reacción completa. La mezcla se diluyó con EtOAc, se lavó con NH₄Cl sat., agua y salmuera. El [1-[2-(terc-butoxicarbonilamino)acetil]pirrolidin-2-il] N-[[4-(6-fluoro-9-oxo-3,10-diazatriciclo[6.4.1.04,13]trideca-1,4,6,8(13)-tetraen-2-il)fenil]metil]-N-metil-

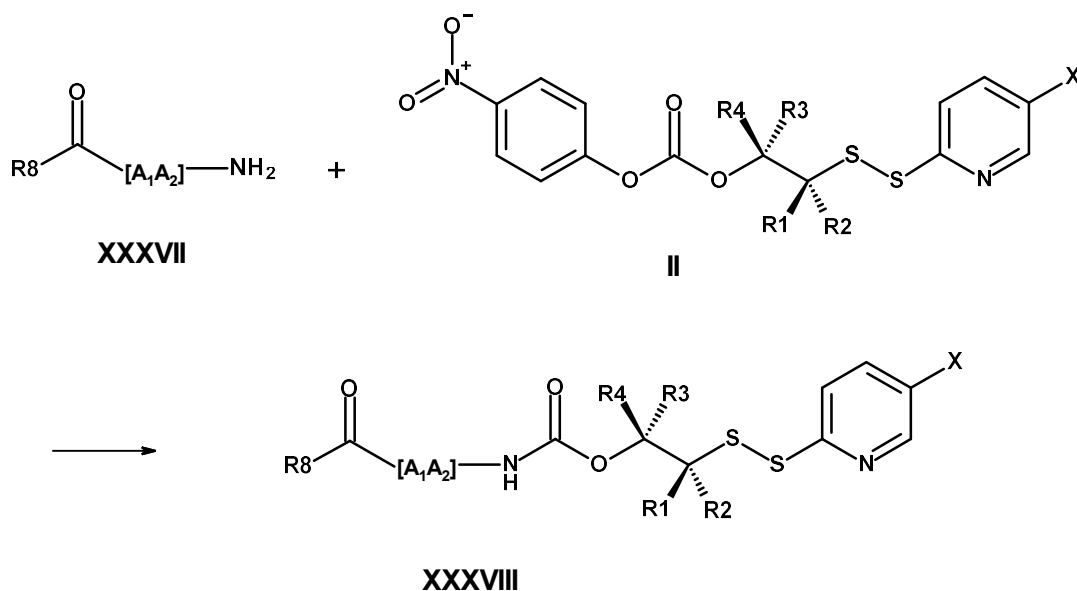
carbamato (141 mg, 0,24 mmol, rendimiento: 50.0 %) se continuó como estaba. MS m/z 478,2 (M+H menos BOC)⁺.

Etapas 2. Síntesis de (2S)-1-(2-aminoacetil)-N-[[4-(6-fluoro-9-oxo-3,10-diazatriciclo[6.4.1.04,13]trideca-1,4,6,8(13)-tetraen-2-il)fenil]metil]-N-metil-pirrolidina-2-carboxamida

El terc-butil-N-[2-[2-[[4-(6-fluoro-9-oxo-3,10-diazatriciclo[6.4.1.04,13]trideca-1,4,6,8(13)-tetraen-2-il)fenil]metil-metil-carbamoi]pirrolidin-1-il]-2-oxo-etil]carbamato (141 mg, 0,24 mmol) se disolvió en DCM y se agregó 1 mL de HCl (4,00 M, 0,12 mL, 0,48 mmol) en dioxano. La mezcla de reacción se agitó a RT durante la noche. La LC-MS indicó una reacción completa. La mezcla de reacción se concentró y se purificó mediante cromatografía de fase inversa (20-85 % de ACN/H₂O) para dar 68 mg de 1-(2-aminoacetil)-N-[[4-(6-fluoro-9-oxo-3,10-diazatriciclo[6.4.1.04,13]trideca-1,4,6,8(13)-tetraen-2-il)fenil]metil]-N-metil-pirrolidina-2-carboxamida (68,0 mg, 0,142 mmol, rendimiento: 58.3 %). MS m/z 478,2 (M+H)⁺.

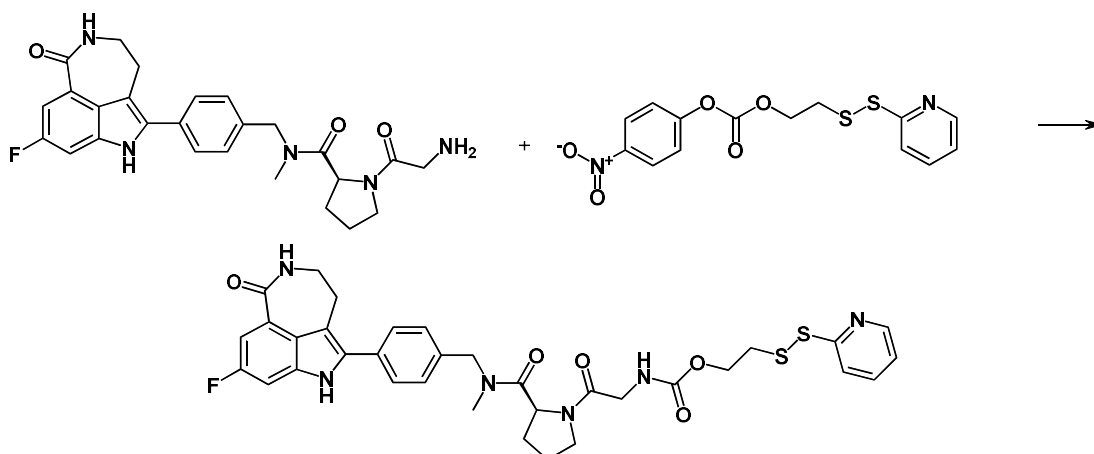
Intermedios XXXVIII

Tabla 22. Intermedios XXXVIII



Int.	R8	R ₁ , R ₂ , R ₃ , R ₄ ,	A ₁ , A ₂	X	MH ⁺
XXXVIII-1	R ₈ H-16	H, H, H, H	Pro, Gly	H	691,2

5 **Síntesis de XXXVIII-1: N-[2-[(2S)-2-[[4-(6-fluoro-9-oxo-3,10-diazatriciclo[6.4.1.0⁴,13]trideca-1,4,6,8(13)-tetraen-2-il)fenil]metil-metil-carbamoyl]pirrolidin-1-il]-2-oxo-etil]carbamato de 2-(2-piridildisulfanil)etilo**



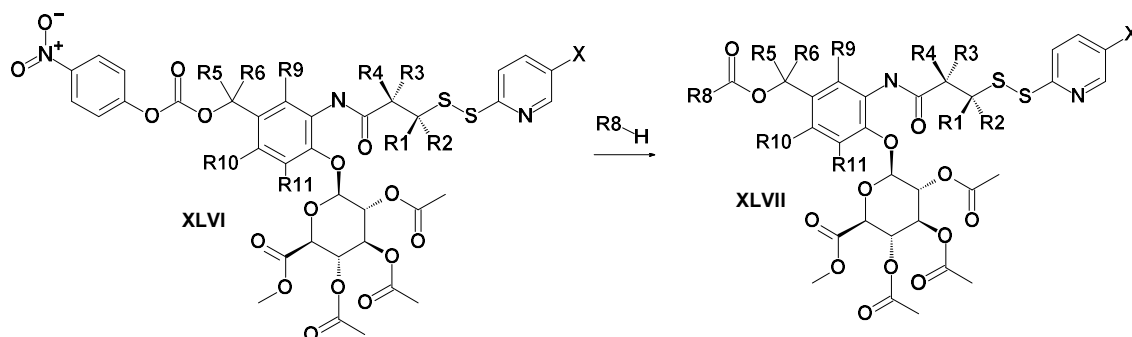
A 1-(2-aminoacetil)-N-[[4-(6-fluoro-9-oxo-3,10-diazatriciclo[6.4.1.0⁴,13]trideca-1,4,6,8(13)-tetraen-2-il)fenil]metil]-N-metil-pirrolidina-2-carboxamida (68,0 mg, 0,142 mmol) en 2 mL de DMF seca se le agregaron DMAP (17,4 mg, 0,142 mmol),

carbonato de (4-nitrofenil) 2-(2-piridildisulfanil)etilo (50,2 mg, 0,142 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (27,6 mg, 0,214 mmol). La mezcla se agitó durante 16 h y luego se diluyó con 50 ml de EtOAc, se lavó con 1 x 20 mL de NH₄Cl sat., 3 x 30 mL de H₂O y 1 x 20 mL de salmuera saturada. La mezcla se secó con MgSO₄, se filtró y se concentró. El residuo bruto se purificó en una columna de SiO₂ (0-3 % MeOH/DCM) para dar 30 mg de N-[2-[2-[[4-(6-fluoro-9-oxo-3,10-diazatriciclo[6.4.1.0⁴,13]trideca-1,4,6,8(13)-tetraen-2-il)fenil]metil-metil-carbamoi]pirrolidin-1-il]-2-oxo-etil]carbamato de 2-(2-piridildisulfanil)etilo (30,0 mg, 0,0434 mmol, rendimiento: 30.5 %). MS m/z 691,2 (M+H)⁺.

10

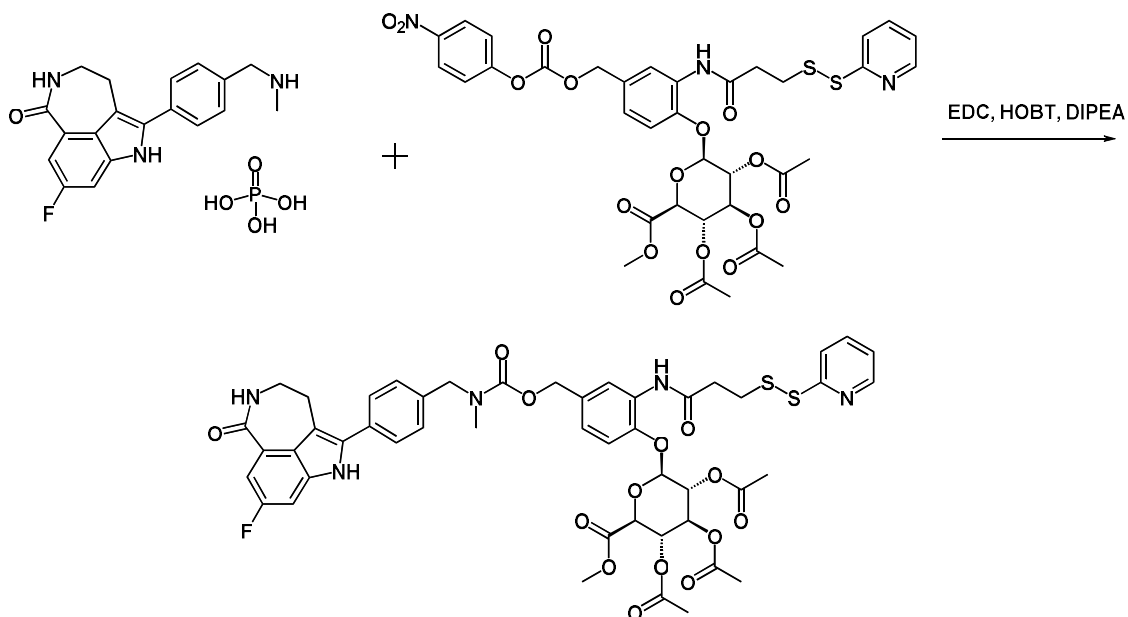
Intermedios XLVIII a partir de XLVI

Tabla 23. Intermedios XLVIII



Int.	R8	R ₁ , R ₂ , R ₃ , R ₄ ,	R ₅ , R ₆	R ₉ , R ₁₀ , R ₁₁ , R ₁₂	X	MH ⁺
XLVII-1	R ₈ H-16	H, H, H, H	H, H	H, H, H, H	H	1002,1

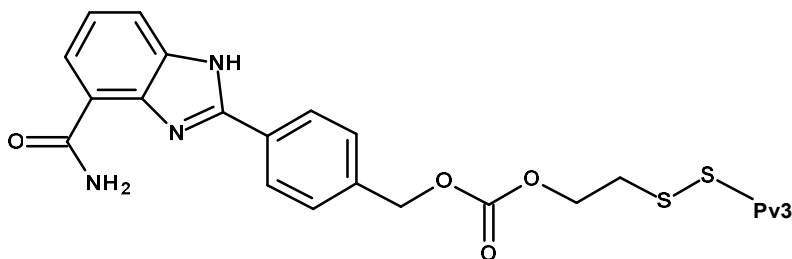
15 **Síntesis de XLVII-1: (2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-triacetoxi-6-[3-R10-2-R11-4-[[[4-(6-fluoro-9-oxo-3,10-diazatriciclo[6.4.1.0⁴,13]trideca-1,4,6,8(13)-tetraen-2-il)fenil]metil-metil-carbamoi]oximetil]-6-[3-(2-piridildisulfanil)propanoilamino]fenoxi]tetrahidropiran-2-carboxilato de metilo**



A una mezcla de hidrato de 1-hidroxibenzotriazol (13,0 mg, 0,0851 mmol), tamiz molecular finamente molido 4 Å (100 mg), y 6-fluoro-2-[4-(metilaminometil)fenil]-3,10-diazatriciclo[6.4.1.0⁴,13]trideca-1,4,6,8(13)-tetraen-9-ona; ácido fosfórico (35,9 mg, 0,0851 mmol) en 2 mL de DMF anhidro se le agregó (2S,3S,4S,5R)-3,4,5-triacetoxi-6-[4-[(4-nitrofenoxi)carboniloximetil]-2-[3-(2-piridildisulfanil)propanoilamino]fenoxi]tetrahidropiran-2-carboxilato de metilo (58,0 mg, 0,0709 mmol). Después de agitar durante 16 h a temperatura ambiente, el tamiz molecular se retiró mediante filtración y el disolvente se eliminó al vacío. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc, se lavó con NH₄Cl sat., agua y salmuera. La capa orgánica se secó con NaSO₄ y se concentró. El residuo bruto se purificó mediante cromatografía en columna (0-3 % de MeOH/DCM) para dar 35 mg de (2S,3S,4S,5R)-3,4,5-triacetoxi-6-[4-[[[4-(6-fluoro-9-oxo-3,10-diazatriciclo[6.4.1.0⁴,13]trideca-1,4,6,8(13)-tetraen-2-il)fenil]metil-metil-carbamoil]oximetil]-2-[3-(2-piridildisulfanil)propanoilamino]fenoxi]tetrahidropiran-2-carboxilato de metilo (43,0 mg, 0,0429 mmol, rendimiento: 60,5 %) con una ligera impureza desconocida. MS m/z 1002,1 (M+H).⁺.

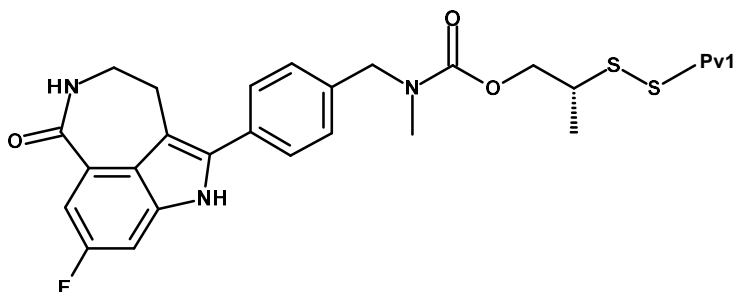
Compuestos conjugados

Ejemplo 3



Un matraz de 8 ml con PBS y un matraz de 8 ml con DMF se desgasificaron con burbujeo de N₂ durante 1 h. En un matraz separado, se colocó el péptido variante 3 ("Pv3", 50,0 mg, 1.31e-5mol). Se añadieron 1,0 mL de PBS desgasificado y una porción de 3,0 mL de DMF a [4-(4-carbamoil-1H-bencimidazol-2-il)fenil]metil 2-(2-piridildisulfanil)etil carbonato (18,9 mg, 3.92e-5 mol). A la mezcla se le añadió CH₃CO₂H (0,05 mL, 0,000873 mol). La mezcla se colocó en una atmósfera de N₂ y se agitó a RT durante 16 h. Se controló el progreso de la mezcla con RP HPLC hasta el consumo completo del péptido de partida y el disulfuro de piridilo restante (Ace Equivalence 250 x 4,6 mm, 50 % isocrático, 25 minutos de ejecución). La mezcla de reacción bruta se purificó mediante HPLC RP preparativa (Sunfire 30 x 150 mm; gradiente de CH₃CN/H₂O (TFA al 0,1 %), 16 min de ejecución) para dar 28,6 mg, 54 % de rendimiento del ejemplo 3.

Ejemplo 18

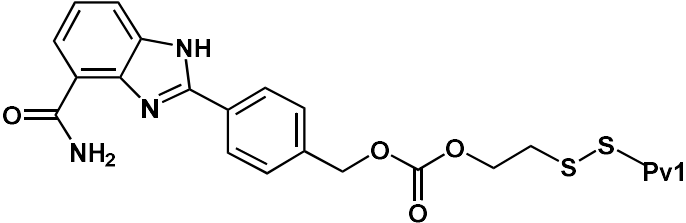
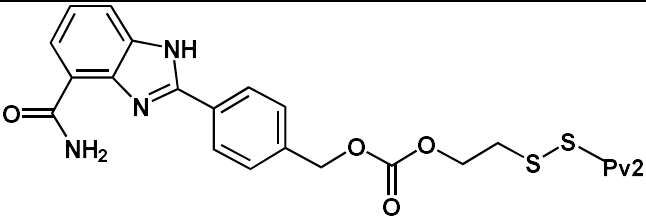
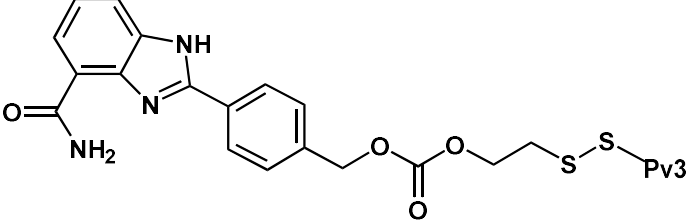


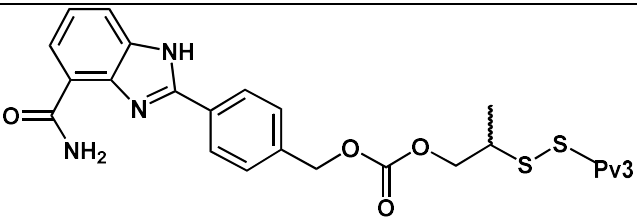
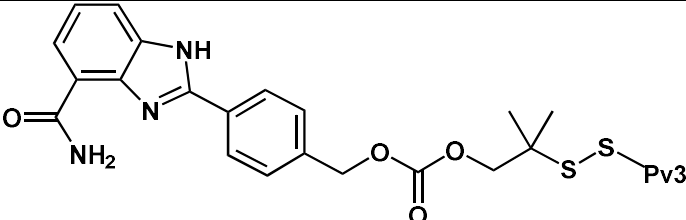
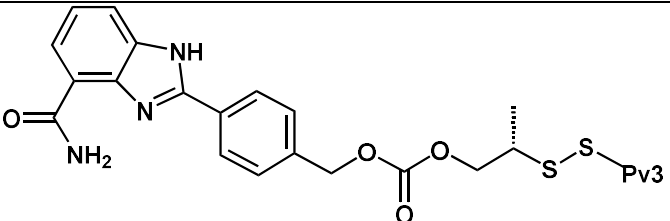
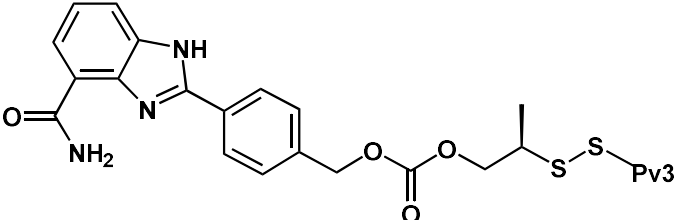
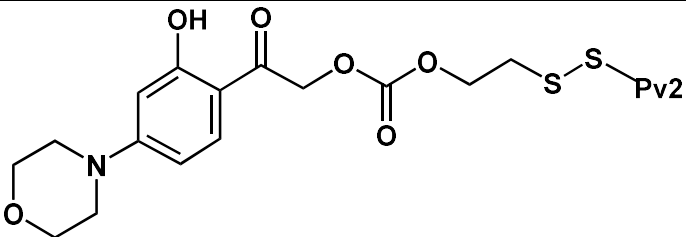
Dos matraces separados de 8 mL con PBS y DMF, respectivamente, se desgasificaron con burbujeo de N₂ durante 1 h. En un matraz separado se colocó Pv1 (50,0 mg, 0,02 mmol). A este matraz se le agregó N-[[4-(6-fluoro-3,10-diazatriciclo[6.4.1.0^{4,13}]trideca-1,4,6,8(13)-tetraen-2-il)fenil]metil]-N-metil-

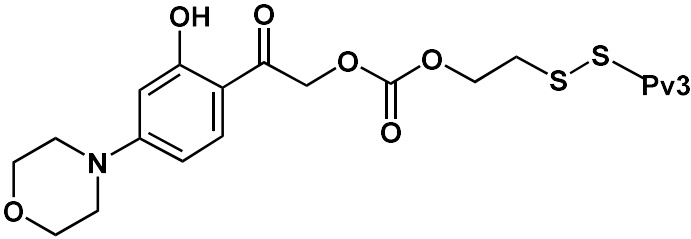
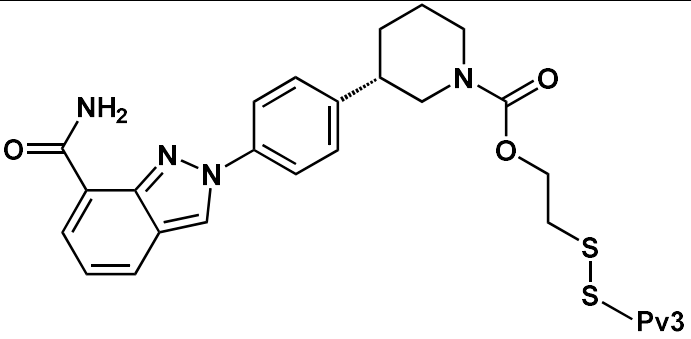
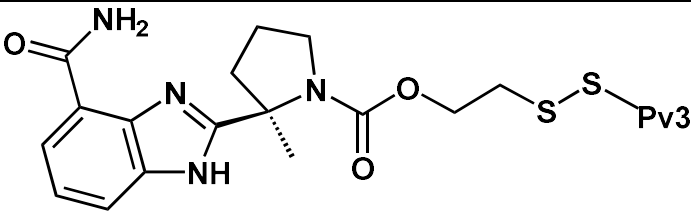
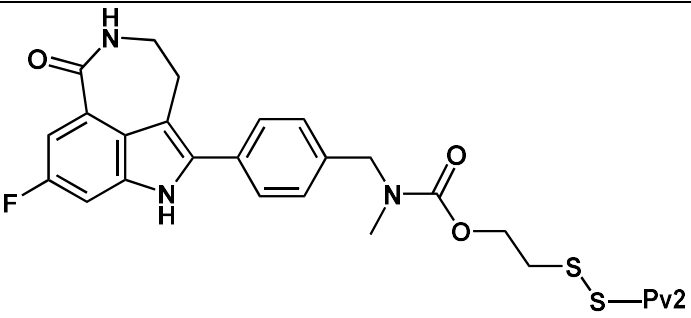
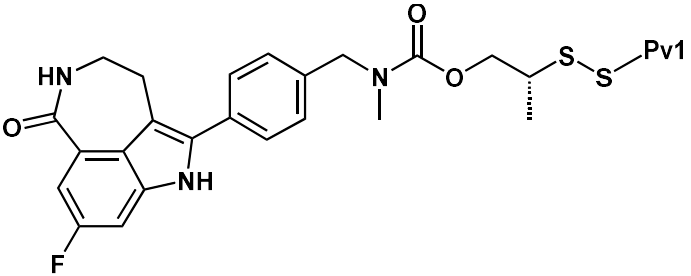
carbamato de [(2R)-2-(2-piridildisulfanil)propilo] [intermedio III-4] (16,2 mg, 0,03 mmol), 1,33 mL de PBS y 4 mL de DMF, seguido de ácido acético (4,2 μ L, 0,08 mmol). La mezcla se colocó en N₂ y se agitó a RT durante la noche. La mezcla se purificó mediante HPLC prep (40-72 % de CH₃CN/H₂O, 15 min) para dar 29,0 mg, 5 0,008 mmol, 53 % del ejemplo 18.

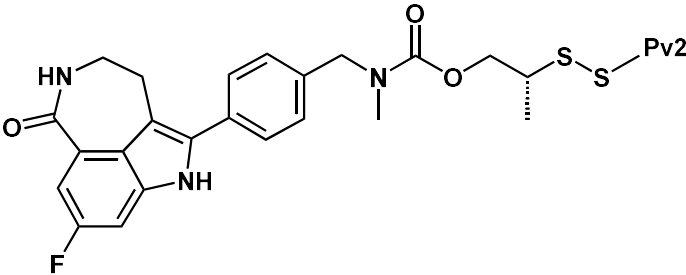
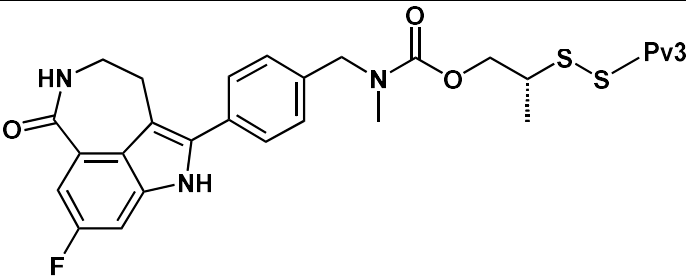
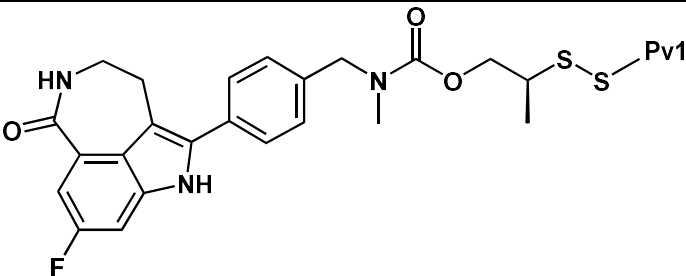
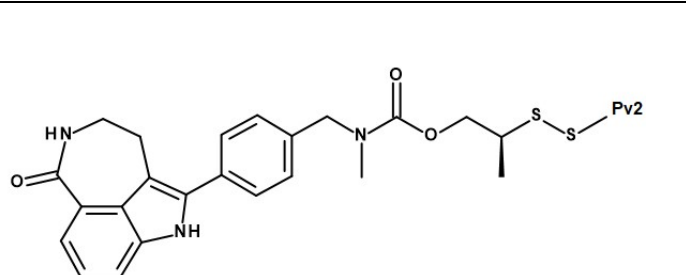
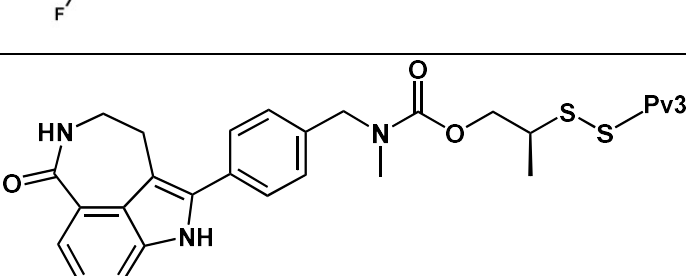
Los siguientes compuestos se prepararon de manera análoga al ejemplo 18, usando los intermedios y péptidos apropiados.

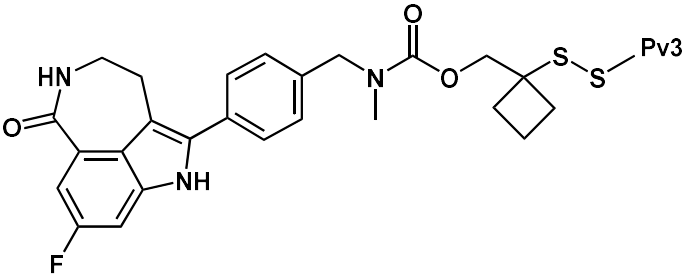
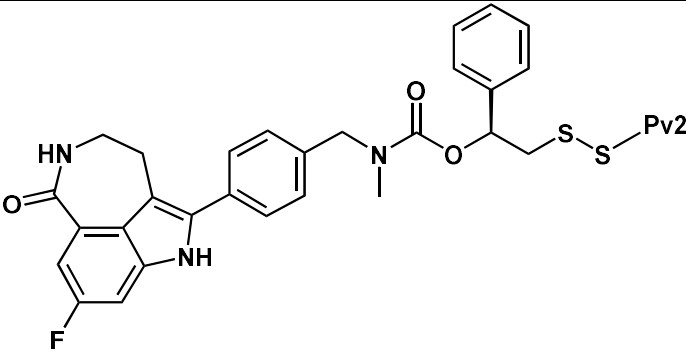
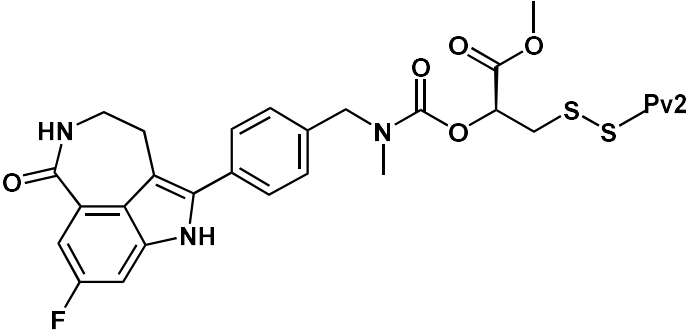
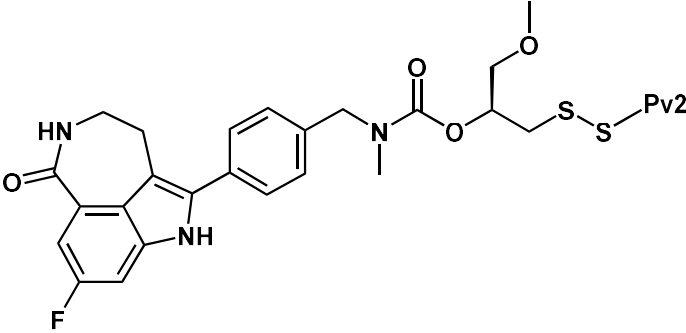
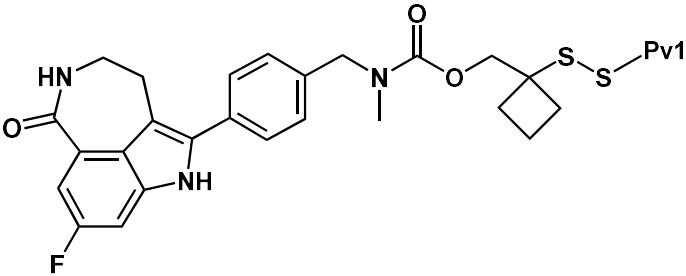
Tabla 24. Compuestos de ejemplo

Ejemplo	Estructura	MS A: Maldi-TOF B: m/z=3	Columna % de ACN/H ₂ O Tiempo de ejecución RT
1		A: 3649,5	A 25-75 % 10 min 6,9 min
2		A: 4381,8	A 25-75 % 10 min 7,7 min
3		A: 4081,8	B 20-80 % 15 min 15,6 min

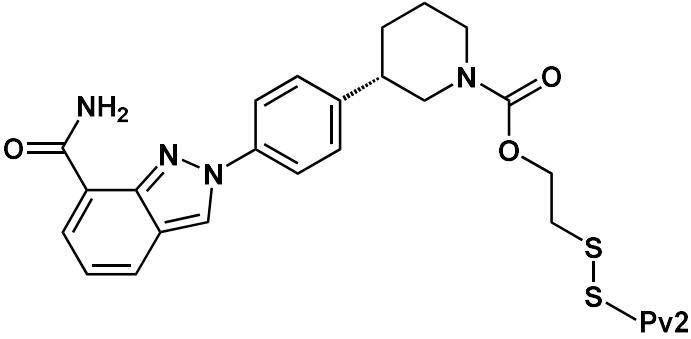
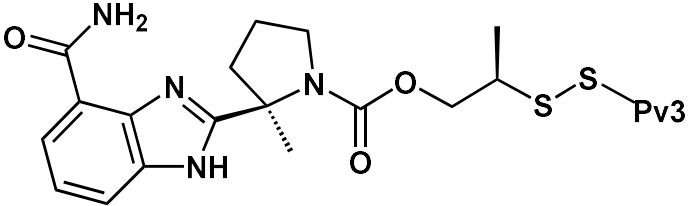
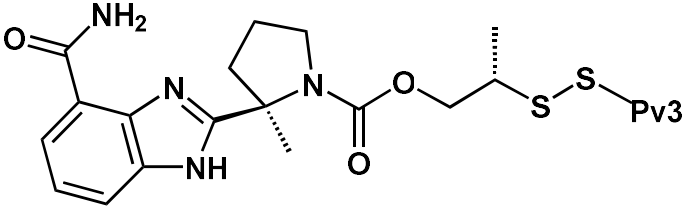
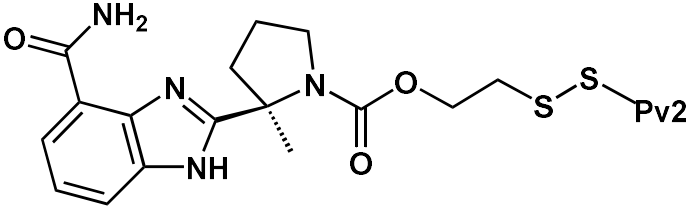
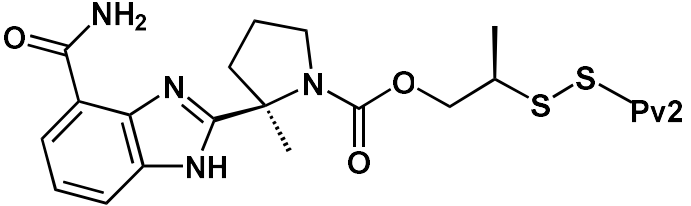
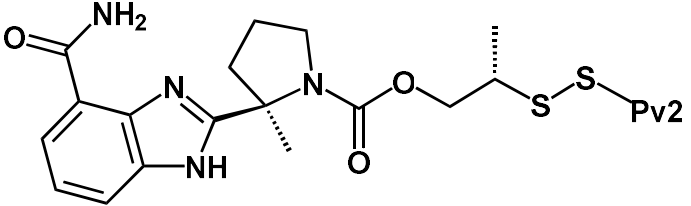
4		A: 4094,2	<u>Diastereómero 1</u> A 45-55 % 10 min 6,3 min
5		A: 4107,7	A 30-50 % 10 min 6,6 min
6		A: 4095,0	A 45-55 % 10 min 6,3 min
7		A: 4094,7	A 45-55 % 10 min 6,6 min
8		A: 4350,8	A 50 % iso 10 min 5,5 min

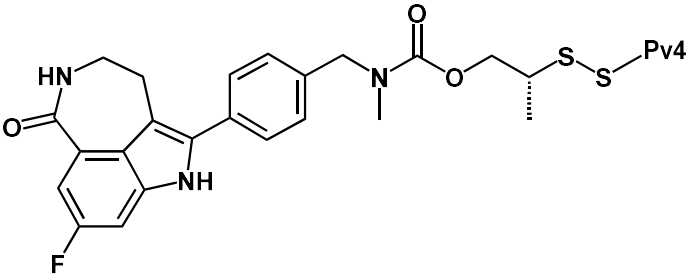
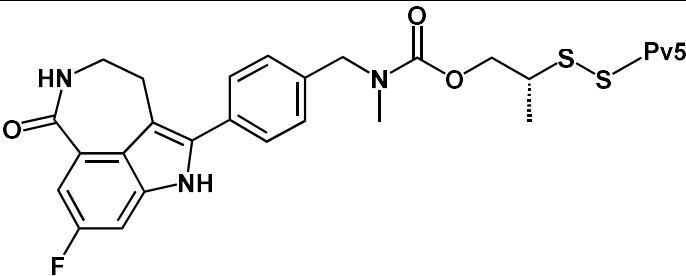
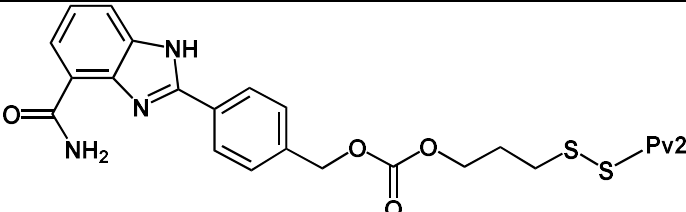
9		A: 4049,6	A 25-75 % 10 min 8,5 min
10		A: 4133,0	A 50 % iso 10 min 6,5 min
11		A: 4055,3	A 25-75 % 10 min 6,7 min
15		A: 4436,2	A 10-95 % 10 min 9,1 min
18		A: 3718,3	C 40-80 % 15 min 7,4 min

19		A: 4450,3	C 45-71 % 11 min 7,9 min
20		A: 4147,2	C 40-80 % 15 min 6,9 min
21		A: 3718,6	C 30-45 % 15 min 6,0 min
22		A: 4449,8	C 45-71 % 11 min 8,3 min
23		A: 4148,9	C 40-72 % 12 min 7,0

24		A: 4477,3	C 30-50 % 13 min 6,3 min
25		A: 4511,8	C 30-50 % 11 min 7,5 min
26		A: 4493,8	C 48-64 % 11 min 8,0 min
27		A: 4478,6	C 52-60 % 11 min 8,5 min
44		A: 3744,3	C 50-85 % 13 min 4.4 min

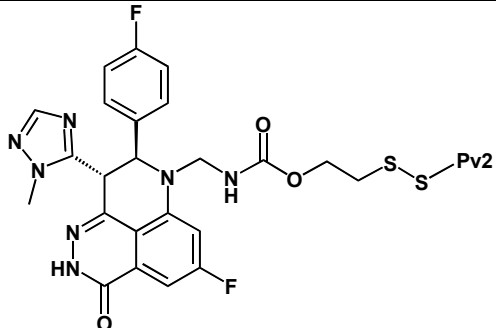
45		A: 4145,3	C 25-95 % 15 min 8,5 min
46		A: 4146,0	C 25-95 % 15 min 8,5 min
47		A: 4446,5	C 35-95 % 12 min 7,3 min
48		A: 4446,5	C 35-95 % 12 min 7,3 min

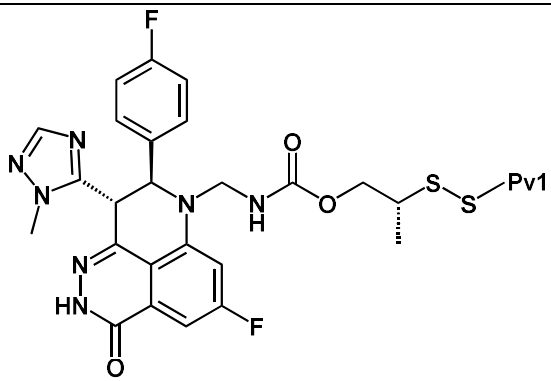
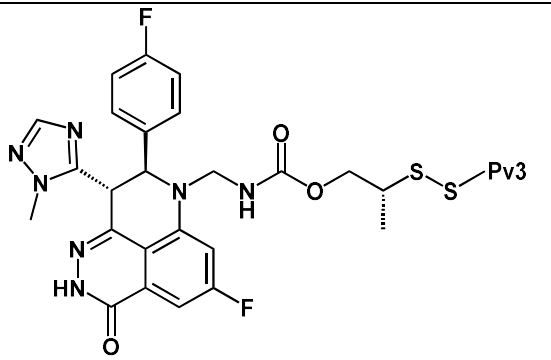
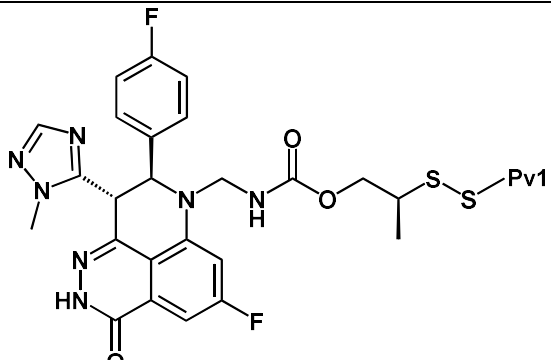
49		A: 4434,2	C 35-91 % 11 min 7,2 min
51		A: 4069,7	C 20-65 % 10 min 8,2 min
52		A: 4070,3	C 20-65 % 10 min 8,2 min
53		A: 4357,6	C 35-91 % 12 min 7,3 min
54		A: 4370,6	C 35-70 % 11 min 7,4 min
55		A: 4369,9	C 35-70 % 11 min 7,4 min

57		B: 1617,1	C 25-75 % 15 min 11,5 min
58		B: 1542,1	C 25-75 % 15 min 11,7 min
61		B: 1465,5	C 40-64 % 10 min 6,3 min

Los siguientes compuestos se prepararon de manera análoga al ejemplo 18, a partir de los intermedios VII y péptidos apropiados.

Tabla 25. Compuestos de ejemplo

Ejemplo	Estructura	MS A: Maldi-TOF B: m/z=3	Columna % de ACN/H ₂ O Tiempo de ejecución RT
12		A: 4522,3	A 40-80 % 8,2 min

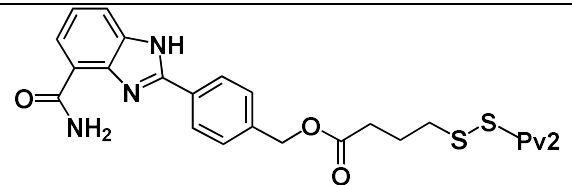
40		A: 3804,0	C 40-62 % 12 min 8,6 min
41		A: 4234,7	C 40-70 % 11 min 6,5 min
42		A: 3805,3	C 40-62 % 12 min 8,5 min

Síntesis de los compuestos finales a partir de los intermedios XII

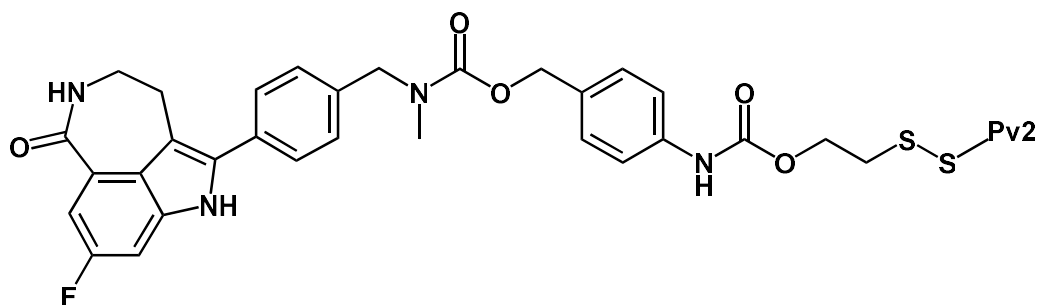
El siguiente compuesto se sintetizó a partir del Intermedio XII-1.

Tabla 26. Ejemplos adicionales

Ejemplo	Estructura	MS A: Maldi-TOF B: m/z=3	Columna % de ACN/H ₂ O Tiempo de ejecución RT

60		B: 1460,8	C 20-65 % 2 min 11,1 min
----	---	-----------	-----------------------------------

Ejemplo 32

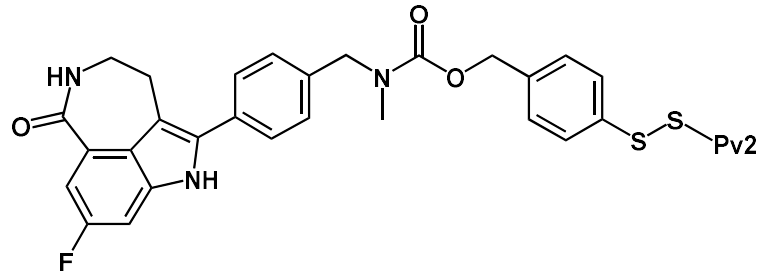


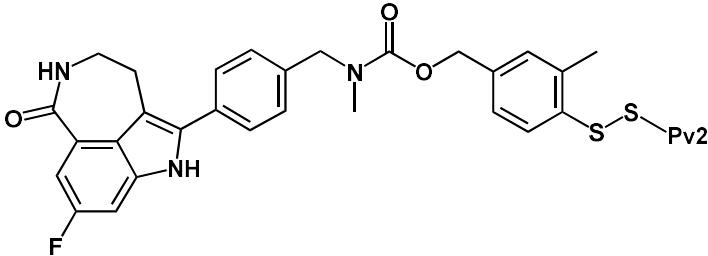
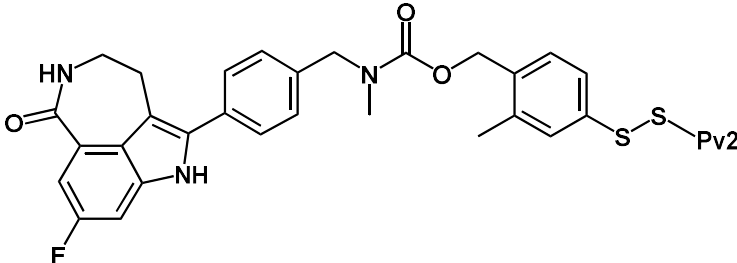
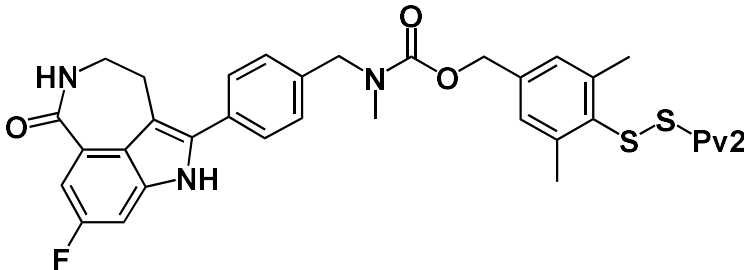
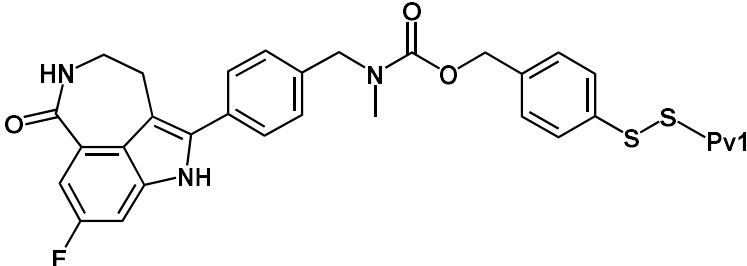
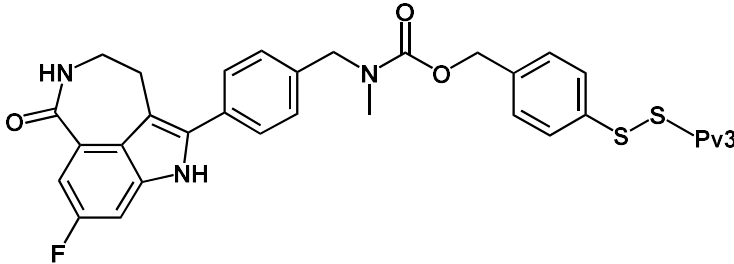
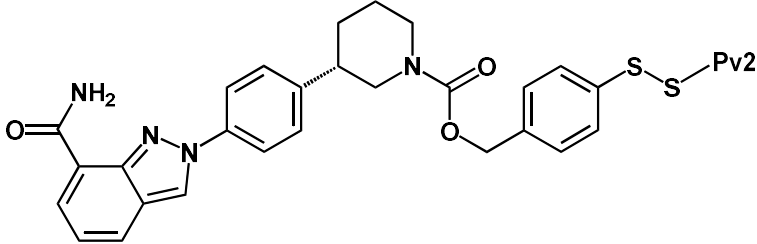
El Ejemplo 32 se sintetizó a partir del intermedio XXI y el péptido Pv2. La MS (Maldi-
5 TOF) hallada fue de 4582,9. El compuesto se purificó usando acetonitrilo al 30-50
% en agua, condiciones 3, con elución a los 11 y 8,3 min.

Síntesis de compuestos a partir de los intermedios XXV

Los siguientes compuestos se sintetizaron de manera análoga al ejemplo 18, a partir
10 de los intermedios XXV.

Tabla 27. Compuestos de ejemplo

Ejempl o	Estructura	MS A: Maldi- TOF B: m/z=3	Columna % de ACN/H ₂ O RT
28		A: 4497,8	C 50-80 % 15 min 6,5 min

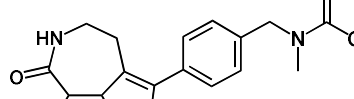
29		A: 4510,9	C 50-100 % 20 minutos 7,4 min
30		A: 4510,3	C 50-100 % 20 min 7,3 min
31		A: 4526,2	C 50-100 % 20 min 7,0 min
36		A: 3767,3	C 40-90 % 15 min 7,0
37		A: 4196,8	C 40-90 % 15 min 6,4 min
50		B: 1397,6	C 20-95 % 16 min 9,5 min

56		B: 1373,5	C 35-60 % 15 min 9,3 min
----	--	-----------	-----------------------------------

Síntesis de los compuestos finales a partir de los intermedios XXV

Los siguientes compuestos se sintetizaron de manera análoga al ejemplo 18, a partir del intermedio XXV.

5 Tabla 28. Compuestos de ejemplo

Ejemplo	Estructura	MS A: Maldi-TOF B: m/z=3	Columna % ACN/H ₂ O RT
59	 The chemical structure shows a benzimidazole ring system. At position 2, there is a substituent consisting of a methylene group attached to a para-substituted phenyl ring, which has a dimethylamino group (-N(CH₃)₂) at the other para position. At position 6 of the benzimidazole, there is a substituent consisting of a methylene group attached to an ester linkage (-COO-), which is further connected to another methylene group and finally to a phenyl ring.	B: 1499,8	C 50-92 % 16 min 6,1 min

Síntesis de los compuestos finales a partir de los intermedios XXXV

Los siguientes compuestos se sintetizaron de manera análoga al ejemplo 18, a partir
10 del intermedio XXXV-1.

Tabla 29. Compuestos de ejemplo

Ejemplo	Estructura	MS A: Maldi-TOF B: m/z=3	Columna % de ACN/H ₂ O RT
---------	------------	--------------------------------	--

solución 100 μM . Esta mezcla se calentó a 37 °C con momentos tomados en intervalos de 15 minutos para medir la integridad del conjugado. Se observa una pérdida constante de conjugado con apariencia acorde de 2-[4-(hidroximetil)fenil]-1~{H}-bencimidazol-4-carboxamida. La escisión se completó a los 60 minutos tal como observó/confirmó la MSD. Condiciones de HPLC: ES Industries Sonoma 4.6 x 50 mm; 5-100 % de $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (TFA al 0.1 %); 5,5 minutos de ejecución; conjugado RT: 3,71, producto RT: 2,24.

Otros compuestos se escindieron de manera similar para dar las moléculas R_8H apropiadas.

La solución de escisión bruta que contenía los compuestos escindidos de la invención se analizó como se describe a continuación en los ejemplos B y C para evaluar la cantidad de R_8H escindido. Además de los compuestos escindidos, también se realizaron ensayos en varios de los materiales de partida R^8 indicados en la tabla 2.

Ejemplo B. Ensayo enzimático 1 de compuestos escindidos (PARP)

El análisis se realizó utilizando el kit de ensayo de inhibición de PARP homogéneo HT F de Trevigen (n.º 4690-096-K) de la siguiente forma: la enzima PARP purificada se incubó en presencia de un inhibidor de PARP diluido en serie (por ejemplo, un compuesto de los ejemplos escindidos de acuerdo con el ejemplo A) en duplicado y NAD 1 μM durante treinta minutos a temperatura ambiente en placas negras de fondo redondo de 96 pocillos. Se añadió un volumen igual de mezcla de ciclado a cada pocillo y la reacción se incubó durante una hora a temperatura ambiente. Las reacciones se detuvieron con la adición de solución de detención y las placas se leyeron en un lector de placas BioTek Cytation 5, utilizando el criterio de valoración de la fluorescencia (excitación a 544 nm y emisión a 590 nm). Los resultados se graficaron en GraphPad Prism y se proporcionan a continuación.

Tabla 31. Ensayo de inhibición de PARP homogéneo en HT F de compuestos escindidos

Compuesto analizado	IC_{50} en el ensayo enzimático 1 (nM)
$\text{R}_8\text{H}-1$	96,8

Ejemplo 3 (escindido)	104
Ejemplo 6 (escindido)	202
Ejemplo 7 (escindido)	111

Ejemplo C. Ensayo enzimático 2 de compuestos escindidos (PARP)

El análisis se realizó utilizando el kit de ensayo de inhibición de PARP quimioluminiscente universal HT de Trevigen (n.º 4676-096-K) de la siguiente forma:

- 5 la enzima PARP purificada se incubó en presencia de un inhibidor de PARP diluido en serie (por ejemplo, un compuesto de los ejemplos escindidos de acuerdo con el ejemplo A) en duplicado durante diez minutos a temperatura ambiente en placas Stripwell rehidratadas de 96 pocillos con histonas enlazadas. Se añadió un volumen igual de cóctel de 1x PARP con ADN activado a cada pocillo y la reacción se incubó
- 10 durante una hora a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron dos veces con 1x PBS + Triton X-100 al 0.1 % y dos veces con PBS. Se añadieron 50 ul/pocillo de estreptavidina diluida - HRP y los pocillos se incubaron durante una hora a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron dos veces con 1x PBS + Triton X-100 al 0,1 % y se lavaron dos veces con PBS. El líquido se eliminó, se agregaron 100
- 15 ul/pocillo de 1:1 PeroxyGlow A/PeroxyGlow B y se midieron las lecturas quimioluminiscentes en un lector de placas BioTek Cytation 5 usando el criterio de valoración de la luminiscencia. Los resultados se graficaron en GraphPad Prism y se muestran a continuación.

Tabla 32. Ensayo universal de quimioluminiscencia PARP en HT de compuestos escindidos

Compuesto analizado	IC₅₀ en el ensayo enzimático 2 (nM)
R ⁸ H -1	6,4
R ⁸ H-3	3,9
R ⁸ H-4	1,3
R ⁸ H-15	1,0
R ⁸ H-16	0,8
R ⁸ H-17	1,0

Ejemplo 1 (escindido)	12,1
Ejemplo 2 (escindido)	9,52
Ejemplo 3 (escindido)	9,15
Ejemplo 6 (escindido)	9,29
Ejemplo 7 (escindido)	6,45
Ejemplo 10 (escindido)	64,9
Ejemplo 11 (escindido)	1,08
Ejemplo 12 (escindido)	0,47
Ejemplo 13 (escindido)	1,0
Ejemplo 14 (escindido)	0,5
Ejemplo 15 (escindido)	6,47
Ejemplo 16 (escindido)	0,61
Ejemplo 17 (escindido)	0,41
Ejemplo 18 (escindido)	1,1
Ejemplo 19 (escindido)	2,2
Ejemplo 20 (escindido)	1,7
Ejemplo 21 (escindido)	2,2
Ejemplo 22 (escindido)	1,8
Ejemplo 23 (escindido)	2,5
Ejemplo 24 (escindido)	7,6
Ejemplo 25 (escindido)	3,4
Ejemplo 26 (escindido)	2,0
Ejemplo 27 (escindido)	3,9
Ejemplo 28 (escindido)	2,4
Ejemplo 29 (escindido)	6,4
Ejemplo 30 (escindido)	2,9
Ejemplo 31 (escindido)	3,3
Ejemplo 32 (escindido)	43,9
Ejemplo 33 (escindido)	2,3
Ejemplo 34 (escindido)	2,5

Ejemplo 35 (escindido)	3,1
Ejemplo 36 (escindido)	2,2
Ejemplo 37 (escindido)	3,1
Ejemplo 38 (escindido)	2,8
Ejemplo 39 (escindido)	3,0
Ejemplo 40 (escindido)	1,1
Ejemplo 41 (escindido)	1,9
Ejemplo 42 (escindido)	1,4
Ejemplo 43 (escindido)	1,4
Ejemplo 44 (escindido)	1,5
Ejemplo 45 (escindido)	3,2
Ejemplo 46 (escindido)	3,7
Ejemplo 47 (escindido)	2,4
Ejemplo 48 (escindido)	2,1
Ejemplo 49 (escindido)	26
Ejemplo 50 (escindido)	2,0
Ejemplo 51 (escindido)	0,9
Ejemplo 52 (escindido)	1,1
Ejemplo 53 (escindido)	1,0
Ejemplo 54 (escindido)	0,6
Ejemplo 55 (escindido)	0,7
Ejemplo 56 (escindido)	0,8

Ejemplo D. Ensayo de parilación mediante ELISA

Se inocularon placas de cultivo de tejidos de doce pocillos con células HeLa y se incubaron a 37 °C en CO₂ al 5 % para producir monocapas de células con 80 % de confluencia al día siguiente. Las monocapas se trataron con una serie de dilución
5 trile de cualquiera de los fármacos libres o conjugados a un pH deseado durante 1 hora a 37 °C. Las monocapas se aspiraron y cada pocillo recibió 150 ul de tampón de lisis RIPA complementado con inhibidores de proteasa y fosfatasa. Las placas se incubaron en hielo durante 10 minutos y luego se congelaron. Tras la

descongelación, los lisados se complementaron con Mg y se incubaron con ADNasa durante 90 minutos a 37 °C. Las muestras se aclararon mediante centrifugado a 12 000 x g durante 5' a 4 °C y el lisado aclarado se transfirió a un tubo limpio y se realizaron determinaciones de proteínas usando un ensayo de proteína BCA.

- 5 El análisis se realizó utilizando el ensayo farmacodinámico in vivo de PARP HT de Trevigen II (n.º 4520-096-K) de la siguiente manera: se cargaron duplicados de 25 ul de lisados de muestra en placas Stripwell para ELISA previamente cubiertas/previamente bloqueadas y se incubaron durante 16 horas a 4 °C en tándem con estándares de PAR purificados y diluidos en serie. Los pocillos se
- 10 lavaron 4 veces con PBST y se incubaron con 50 ul/pocillo del anticuerpo policlonal de detección de PAR en diluyente de anticuerpos durante 2 horas a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron 4 veces con PBST y se incubaron con 50 ul/pocillo de conjugado de HRP-IgG de cabra anticonejo en diluyente de anticuerpo durante 1 hora a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron 4 veces con PBST, se
- 15 incubaron con 100 ul/pocillo de 1:1 PARP PeroxyGlow A y PARP PeroxyGlow B y se leyeron en un BioTek Cytation 5 utilizando el criterio de valoración de la luminiscencia. Los resultados se graficaron como unidades de luminiscencia sin procesar o como PAR (pg/ml) utilizando valores calculados a partir de la curva estándar y se presentan a continuación.

- 20 Tabla 33. Resultados del ensayo de parilación

Ejemplo	IC₅₀ de inhibición de PARP en ELISA (nM) pH 5,5	IC₅₀ de inhibición de PARP en ELISA (nM) pH 6,2	IC₅₀ de inhibición de PARP en ELISA (nM) pH 7,4	IC₅₀ de inhibición de PARP en ELISA (nM) pH 8,0
1	115			587
2	93, 135			1290, 1400
3	151			616
6	239			456
7	282			542
10	785			3075

11	IC			9102
12	101	159	186	116

Las células se tratan como se describió previamente a pH 7,4 y se incubaron durante 16 h.

Tabla 34. Resultados del ensayo de parilación

Compuesto	IC₅₀ de inhibición de PARP en ELISA (nM) pH 7,4 células (BRCA-/-) DLD-1, 16 h	IC₅₀ de inhibición de PARP en ELISA (nM) pH 7,4; células SW620, 16 H
18	2401	
19	2381	
20	2196	2767
21	3545	
22	3877	
23	1425	
28	712	2197
29	1314	
30	497	
31	1140	
32	4995	
34	2092	
35	1580	
36	271	1174
37	439	1386
40	522	
41	459	
42	540	
43	380	
51	4178	

54	1857	
55	2928	
56	103	

Ejemplo E. Ensayo de retraso del crecimiento

Las células se colocaron en placas de fondo transparente y paredes negras de 96 pocillos (Griener); células DLD-1 WT a 2500 células por pocillo, células DLD-1 BRCA2-/- a 5000 células por pocillo, en medios de crecimiento con FBS al 10 %. Se permitió que las células se adhirieran a temperatura ambiente durante 60 minutos antes de volver a 37 C, incubadora con CO₂ al 5 %. Después de 24 horas, se retiraron los medios y se remplazaron con medios de crecimiento frescos que contenían diversas concentraciones de fármaco. Cada concentración de fármaco se añadió en triplicado. Los controles no tratados con fármaco contenían solo medios de crecimiento. Las células retornaron a la incubadora. Noventa y seis horas después de la adición del fármaco, las células se fijaron con paraformaldehído al 4 % durante 20 minutos y se tiñeron con Hoechst a 1 ug/mL. Las placas se fotografiaron en un generador de imágenes automático Cytation 5 (BioTek) y se contaron las células usando CellProfiler (<http://cellprofiler.org>). Se calculó el porcentaje de retraso en el crecimiento celular y los datos se graficaron utilizando GraphPad Prism.

Tabla 35. Resumen del ensayo de retraso del crecimiento

Ejemplo	IC₅₀ de retraso del crecimiento (nM), pH 7,4, BRCA (-/-) DLD-1, 96 h
12	162
13	51
14	72
16	84
17	50

39	104
40	64
41	43
42	53
43	46

Los resultados anteriores demuestran que los compuestos de la invención se escinden para liberar R⁸H libre cuando se someten a condiciones que replican las que se encuentran dentro de una célula y exhiben inhibición del objetivo biológico, que en este ensayo particular es PARP. En función de estos resultados, un experto en la materia reconocería fácilmente que los compuestos de la invención son útiles para el tratamiento de enfermedades que involucren tejido con enfermedad ácida o hipóxica y, particularmente, para tratar cánceres con mutación de PARP.

10

Ejemplo F. Retraso del crecimiento tumoral in vivo

Diseño del estudio (R⁸H-15, ejemplo 12)

Los ratones atímicos hembra llegaron a las instalaciones a las 6 semanas de edad y se colocaron de a 5 por jaula en camas Alpha-Dri en un sistema de jaulas IVC desechable (Innovive). Después de un período de aclimatación de 5-10 días, las células DLD-1 BRACA2^{-/-} fueron diluidas 1:1 en Matrigel libre de rojo fenol y se implantaron por vía subcutánea en el flanco izquierdo de cada ratón a una densidad de 5x10⁶ células en 100 µL. Se controló el crecimiento tumoral del xenoinjerto y se obtuvieron mediciones con calibrador dos veces por semana. Cuando los xenoinjertos alcanzaron un volumen mínimo de 100 mm³, se les administró a los ratones una dosis intraperitoneal (IP) del vehículo, ejemplo 12 (6,4, 20 o 50 mg/kg) o una dosis oral de R⁸H-15 (0,3 mg/kg) una vez al día durante 8 días. Todos los ratones recibieron una dosis oral de 10 mg/kg de temozolomida (TMZ) preparada en glucosa al 20 % inmediatamente después de la dosificación. Se obtuvieron mediciones con calibrador dos veces por semana para evaluar el efecto del compuesto sobre el crecimiento tumoral. El control del crecimiento tumoral continuó

después del período de dosificación de 8 días durante otras 7 semanas (período de eliminación). Se sacrificó a los ratones si la pérdida de peso corporal excedía el 20 % o si el volumen del tumor aumentaba hasta 4 veces el tamaño original. Se utilizó el análisis de Kaplan-Meier para evaluar la tasa de supervivencia en función de la muerte o el retiro del estudio.

Diseño del estudio (R⁸H-16, ejemplo 18)

Los ratones atímicos hembra llegaron a las instalaciones a las 6 semanas de edad y se colocaron de a 5 por jaula en camas Alpha-Dri en un sistema de jaulas IVC desechable (Innovive). Después de un período de aclimatación de 5-10 días, las células DLD-1 BRCA2^{-/-} fueron diluidas 1:1 en Matrigel libre de rojo fenol y se implantaron por vía subcutánea en el flanco izquierdo de cada ratón a una densidad de 5×10^6 células en 100 μ L. Se controló el crecimiento tumoral del xenoinjerto y se obtuvieron mediciones con calibrador dos veces por semana. Cuando los xenoinjertos alcanzaron un volumen mínimo de 100 mm³, se les administró a los ratones una dosis intraperitoneal (IP) del vehículo, ejemplo 18 (8,8, 17,7 o 44,2 mg/kg) o R⁸H-16 (1, 2, 5 mg/kg), una vez al día durante 8 días. Todos los ratones recibieron una dosis oral de 10 mg/kg de temozolomida (TMZ) preparada en glucosa al 20 % inmediatamente después de la dosificación durante 5 días. Se obtuvieron mediciones con calibrador dos veces por semana para evaluar el efecto del compuesto sobre el crecimiento tumoral. El control del crecimiento tumoral continuó después del período de dosificación de 8 días durante otros 8 días (período de eliminación). Se sacrificó a los ratones si la pérdida de peso corporal excedía el 20 % o si el volumen del tumor aumentaba hasta 4 veces el tamaño original.

Preparación celular de DLD-1 BRCA2^{-/-} para implante (R⁸H-15, ejemplo 12; R⁸H-16, ejemplo 18)

Se descongeló Matrigel durante la noche en hielo a 4 °C antes de prepararse para el implante celular de DLD-1 BRCA2^{-/-} y se mantuvo en hielo durante todas las etapas preparatorias. Las células se pasaron entre uno y tres días antes de la preparación para el implante. El medio de crecimiento se reemplazó cada 2-3 días según fuera necesario para mantener la viabilidad celular. El día del implante, las células se tripsinizaron, se lavaron con medio completo y se sedimentaron mediante

centrifugado a 1200 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se decantó y las células se lavaron tres veces con PBS estéril y se sedimentaron mediante centrifugado. Durante el centrifugado final, se determinó la viabilidad usando exclusión con azul de tripano. Las células se resuspendieron en PBS estéril a una

5 concentración de 5×10^6 células/50 μ L. Antes del implante, las células se mezclaron 1:1 con Matrigel para una concentración final de 5×10^6 células/100 μ L. La mezcla de Matrigel/células se mantuvo en hielo en un tubo cónico hasta que se usó para el implante.

Implante celular con DLD-1 BRCA2^{-/-} (R⁸H-15, ejemplo 12; R⁸H-16, ejemplo 18)

10 El Matrigel/células DLD-1 BRCA2^{-/-} (5×10^6 células/100 μ L) mantenido en hielo en un tubo cónico se extrajo en jeringas estériles de 1 cc con agujas estériles calibre 27. El exceso de mezcla de Matrigel/célula se expulsó nuevamente hacia el tubo cónico, lo cual dejó un volumen de inyección de 100 μ L en cada jeringa. Las jeringas rellenas se mantuvieron en hielo hasta el momento del implante para evitar la

15 polimerización del Matrigel en la jeringa. Las células se implantaron por vía subcutánea en el flanco izquierdo de cada ratón y, tras el desarrollo de xenoinjertos palpables, se obtuvieron mediciones con calibrador dos veces por semana. La evaluación del compuesto continuó cuando los xenoinjertos alcanzaron un volumen mínimo de 100 mm³.

20 *Administración de los compuestos (R⁸H-15, ejemplo 12)*

Se prepararon dosis intraperitoneales de 6,4, 20 y 50 mg/kg del ejemplo 12 en PEG400 al 8 % + Tween 80 al 2 % en PBS como se describió anteriormente y se administraron una vez al día durante 8 días. Los ratones recibieron dosis en un volumen de 12 mL/kg (300 μ L por 25 g de ratón). Se prepararon dosis orales de 0,3

25 mg/kg de R⁸H-15 (BMN673) en metilcelulosa al 0,5 % y se administraron una vez al día durante 8 días en un volumen de 10 mL/kg (250 μ L por 25 g de ratón) para comparación. Inmediatamente después de la administración del compuesto, todos los ratones recibieron una dosis oral de 10 mg/kg de temozolomida (TMZ) en glucosa al 20 %.

30 *Administración de los compuestos (R⁸H-16, ejemplo 18)*

El ejemplo 18 se disolvió en dimetilsulfóxido al 100 % (DMSO) para producir 0,1

mg/ μ L de solución madre. Se prepararon dosis intraperitoneales (IP) frescas de 8,83, 17,66 o 44,15 mg/kg diariamente mediante dilución de 14, 29 o 72 μ L de la solución madre, respectivamente, con 1950 μ L de un vehículo compuesto por PEG400 al 8 % + Tween 80 al 2 % en PBS. Las dosis se agitaron en vórtex para

5 lograr suspensiones homogéneas y se administraron a una concentración de 12 mg/mL (300 μ L por 25 g de ratón), una vez al día durante 8 días. Cada día, se suspendieron 2,5 mg de R⁸H-16 en 6 mL de un vehículo compuesto por PEG400 al 8 % + Tween 80 al 2 % en PBS. La suspensión se homogeneizó con ultrasonidos durante 10 minutos para dar como resultado una dosis intraperitoneal homogénea

10 de 5 mg/kg que se diluyó adicionalmente 1 a 5 y 1 a 2,5 con vehículo para dar como resultado dosis de 1 y 2 mg/kg, respectivamente. Todas las dosis se agitaron en vórtex y se administraron a una concentración de 12 mL/kg (300 μ L por 25 g de ratón), una vez al día durante 8 días. Se prepararon dosis orales frescas de 50 mg/kg de temozolomida (TMZ) diariamente suspendiendo 70 mg de compuesto en

15 14 mL de un vehículo de glucosa al 20 %. Las dosis de 5 mg/mL finales se homogeneizaron con ultrasonidos durante 15 minutos hasta que se lograron suspensiones homogéneas. A los ratones se les administró TMZ por vía oral a 10 mL/kg (250 μ L por 25 g de ratón) una vez al día durante 5 días inmediatamente después de la administración del ejemplo 18 o R⁸H-16.

20 *Crecimiento tumoral*

Se controló el crecimiento tumoral y se obtuvieron mediciones con calibrador dos veces por semana durante un período de dosificación de 8 días para evaluar la eficacia del compuesto frente a la tasa de crecimiento tumoral. Las mediciones de crecimiento continuaron durante otras 7 semanas después de cesar la dosificación.

25 Los ratones fueron retirados del estudio cuando el volumen del tumor excedió 4 veces su tamaño original.

Análisis estadístico

Se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) para evaluar las diferencias significativas entre los grupos. Se utilizó el análisis de prueba de comparación múltiple Bonferroni

30 post-hoc para determinar diferencias significativas entre las medias. Todo el análisis estadístico se realizó utilizando el software Graph Pad Prism 7.03. Se utilizó el

análisis de Kaplan-Meier para evaluar la tasa de supervivencia en función de la muerte o el retiro del estudio cuando la pérdida de peso superó el 20 % con respecto al peso corporal inicial.

La figura 1 muestra el retraso del crecimiento tumoral de R⁸ H-15 y el ejemplo 12 en ratones BRCA^{-/-}.

La figura 2 muestra la supervivencia de R⁸ H-15 y el ejemplo 12 en ratones BRCA^{-/-}.

La figura 3 muestra el retraso del crecimiento tumoral de R⁸ H-16 y el ejemplo 18 en ratones BRCA^{-/-}.

Ejemplo G. Parilación tumoral

Diseño del estudio (R⁸H-16, ejemplo 18)

Los ratones atómicos hembra llegaron a las instalaciones a las 6 semanas de edad y se colocaron de a 5 por jaula en camas Alpha-Dri en un sistema de jaulas IVC desechable (Innovive). Se diluyeron las células DLD-1 BRACA2^{-/-} 1:1 en Matrigel libre de rojo fenol y se implantaron por vía subcutánea en el flanco izquierdo de cada ratón a una densidad de 5x10⁶ células en 100 µL. Las mediciones con calibrador se obtuvieron dos veces por semana y el tratamiento comenzó cuando los xenoinjertos alcanzaron un volumen mínimo de 250 mm³. Se administraron dosis intraperitoneales (IP) del ejemplo 18 (8,83, 17,66 o 44,15 mg/kg) o R⁸H-16 (2 o 10 mg/kg) una vez al día durante 9 días en un vehículo de PEG400 al 8 % + Tween 80 al 2 %. A los ratones también se les administró una dosis oral de glucosa al 20 %. La octava dosis se administró por la tarde, aproximadamente 12 horas antes de la novena dosis. Se recogieron muestras de suero y tejido 2 horas después de la administración de la novena dosis. Se determinó el efecto compuesto contra la PARilación en tumor y médula ósea.

Administración de los compuestos (R⁸H-16, ejemplo 18)

El ejemplo 18 se disolvió en dimetilsulfóxido al 100 % (DMSO) para producir 0,1 mg/µL de solución madre. Se prepararon dosis intraperitoneales (IP) frescas de 8,8, 17,7 o 44,2 mg/kg diariamente mediante dilución de 13, 26 o 66 µl de la solución madre, respectivamente, con 1800 µL de un vehículo compuesto por PEG400 al 8

% + Tween 80 al 2 % en PBS. Las dosis se agitaron en vórtice para lograr suspensiones homogéneas. Se prepararon dosis intraperitoneales (IP) frescas de 10 mg/kg de R⁸H-16 diariamente suspendiendo 5 mg de R⁸ H-16 en 6 mL de un vehículo compuesto por PEG400 al 8 % + Tween 80 al 2 % en PBS. Las dosis se

5 agitaron en vórtice para lograr suspensiones homogéneas. Se prepararon dosis IP de 2 mg/kg diluyendo dosis de 10 mg/kg 1:5 con vehículo. Se administraron dosis intraperitoneales (IP) del ejemplo 18 o R⁸H-16 una vez al día durante 9 días en un volumen de 12 mL/kg (300 µl por 25 g de ratón).

Recolección de tejidos (R⁸H-16, ejemplo 18)

10 Después de la extracción de sangre, los ratones fueron sacrificados mediante dislocación cervical bajo anestesia. Se extrajeron los tumores de xenoinjerto, se pesaron y cortaron en trozos más pequeños con una hoja de bisturí. Se recogieron muestras de tumor aleatorias de 100 mg en tubos criogénicos, se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta su

15 procesamiento. Se tomaron medidas de PARilación en homogenados tumorales.

PARilación en homogenados tumorales (R⁸H-16, ejemplo 18)

Las muestras de tumor congeladas se homogeneizaron en un tampón RIPA que contenía inhibidores de proteasa y fosfatasa (1 mg/mL) y se llevaron alícuotas de 300 µL hasta una concentración final de 1 % de SDS. Las muestras se calentaron

20 a 100 °C durante 5 minutos, se inactivaron en hielo y se aclararon con centrifugado a 14.000 x g durante 5 minutos. Las muestras tumorales fueron diluidas 1:10 en tampón RIPA/HALT para la cuantificación de proteínas usando un kit de ensayo de proteínas BCA Pierce Rapid Gold. Las muestras fueron diluidas hasta 200 µg/mL (10 µg/pocillo) en tampón de muestra y se cargaron alícuotas de 50 µL (10µg/pocillo)

25 en pocillos Stripwell de ELISA previamente recubiertos/previamente bloqueados. Después de una incubación de 16 horas a 4 °C, las muestras se lavaron 4 veces con PBST (1 L de PBS + 1 mL de Tween 20) y se incubaron con 50 µL de anticuerpo de detección de PAR durante 2 horas a temperatura ambiente. Las muestras se lavaron 4 veces con PBST y se incubaron con 50 µL de conjugado de HRP-IgG de

30 cabra anticonejo durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de un lavado final de 4 veces con PBST, se agregaron 100 µL de PeroxyGlow™ a cada muestra

y se determinó la luminiscencia en un BioTek Cytation 5 usando el criterio de valoración de la fibra de luminiscencia y la definición de área de placa de Stripwell. La figura 4 muestra el efecto de la administración intraperitoneal durante 9 días del ejemplo 18 y R⁸H-16 sobre la PARilación tumoral en un modelo de xenoinjerto de BRCA2^{-/-} DLD-1 murino.

Ejemplo H. Selectividad de médula ósea

Diseño del estudio (R⁸H-15, ejemplo 12)

Los ratones atímicos hembra llegaron a las instalaciones a las 6 semanas de edad y se colocaron de a 5 por jaula en camas Alpha-Dri en un sistema de jaulas IVC desechable (Innovive). Después de un período de aclimatación de 5-10 días, las células tumorales DLD-1 BRCA2^{-/-} fueron diluidas 1:1 en Matrigel libre de rojo fenol y se implantaron por vía subcutánea en el flanco izquierdo de cada ratón a una densidad de 5×10^6 células en 100 μ L. Se controló el crecimiento tumoral y se obtuvieron mediciones con calibrador dos veces por semana. Cuando los tumores alcanzaron un volumen mínimo de 100 mm³, los ratones recibieron una dosis oral de 50 mg/kg de Temozolomida (TMZ) sola o en combinación con una dosis oral de 0,3 mg/kg de R⁸H-15 o una dosis intravenosa de 10 mg/kg del ejemplo 12, una vez al día durante 2 días. En el día 3, los ratones alimentados fueron sacrificados mediante dislocación cervical bajo anestesia y se retiraron los tumores, se pesaron y congelaron rápidamente en nitrógeno líquido. Se retiraron los fémures y se realizó extrusión de la médula ósea con PBS en tubos cónicos de 50 mL para aislar las células de la médula ósea mediante centrifugado. La mielotoxicidad se evaluó mediante el recuento de células de médula ósea e inhibición de la PARilación según lo determinado en el ELISA. La efectividad del compuesto contra la viabilidad de las células tumorales se determinó mediante un ensayo de PARilación ELISA.

Diseño del estudio (R⁸H-16, ejemplo 18)

Los ratones atímicos hembra llegaron a las instalaciones a las 6 semanas de edad y se colocaron de a 5 por jaula en camas Alpa-Dri en un sistema de jaulas IVC desechable (Innovive). Se diluyeron las células DLD-1 BRCA2^{-/-} 1:1 en Matrigel libre de rojo fenol y se implantaron por vía subcutánea en el flanco izquierdo de cada

ratón a una densidad de 5×10^6 células en 100 μL . Las mediciones con calibrador se obtuvieron dos veces por semana y el tratamiento comenzó cuando los xenoinjertos alcanzaron un volumen mínimo de 250 mm^3 . Se administraron dosis intraperitoneales (IP) del ejemplo 18 (8,83, 17,66 o 44,15 mg/kg) o $\text{R}^8\text{H-16}$ (2 o 10 mg/kg) una vez al día durante 9 días en un vehículo de PEG400 al 8 % + Tween 80 al 2 %. A los ratones también se les administró una dosis oral de glucosa al 20 %. La octava dosis se administró por la tarde, aproximadamente 12 horas antes de la novena dosis. Se recogieron muestras de suero y tejido 2 horas después de la administración de la novena dosis. Se determinó el efecto compuesto contra la PARilación en médula ósea.

Administración de los compuestos ($\text{R}^8\text{H-15}$, ejemplo 12)

Se disolvieron 5 mg del ejemplo 12 en 50 μL de dimetilsulfóxido al 100 % (DMSO) para producir 0,1 $\text{mg}/\mu\text{L}$ de solución madre. La dosis intravenosa final de 10 mg/kg se preparó diluyendo 25 μL de la solución madre con 2475 μL de PBS estéril. La dosis se mezcló suavemente para dar como resultado una solución de dosificación inyectable transparente de 1 mg/mL . Las dosis se administraron una vez al día durante 2 días mediante inyección en la vena de la cola a 10 mL/kg (200 μL por 20 g de ratón). Los ratones recibieron las dosis en combinación con un oral de 50 g/kg de temozolomida. Se preparó una dosis oral de 3 mg/kg de $\text{R}^8\text{H-15}$ suspendiendo 1,5 mg de compuesto en 5 mL de un vehículo de dimetil acetamida (DMAc) al 10 % + Solutol al 6 % + PBS al 84 %. La suspensión se diluyó adicionalmente 1:10 en el vehículo. Las dosis finales de 0.3 mg/mL se homogeneizaron con ultrasonidos durante 15 minutos hasta que se logró una suspensión homogénea de 0.3 mg/mL . Los ratones recibieron dosis orales de 10 mL/kg (200 μL por 20 g de ratón) una vez al día durante 2 días en combinación con una dosis oral de 50 mg/kg de temozolomida.

Administración de los compuestos ($\text{R}^8\text{H-16}$, ejemplo 18)

La administración de los compuestos fue como se describió en la sección *Administración de los compuestos ($\text{R}^8\text{H-16}$, ejemplo 18)* del ejemplo F.

Recolección de médula ósea ($\text{R}^8\text{H-15}$, ejemplo 12)

Después de la extracción del tumor, se extrajeron los fémures y se realizó extrusión

de la médula ósea en tubos cónicos de 50 mL y se enjuagaron los huesos con una aguja calibre 23 colocada en una jeringa de 5 cc que contenía RPMI + suero bovino fetal (FBS por sus siglas en inglés) al 2 %. La médula ósea se homogeneizó mediante pipeteo suave y se filtró a través de filtros de malla de nylon de 100 μ m.

- 5 Las células de la médula ósea se sedimentaron mediante centrifugado a 1200 rpm durante 5 minutos a 4 °C. Las células se lavaron con 5 mL de PBE (PBS + albúmina de suero bovino al 0,2 % + EDTA 2 mM) y se volvieron a sedimentar mediante centrifugado como se describió anteriormente. Las células se resuspendieron en 3 mL de tampón de lisis RBC 1X y se incubaron a temperatura ambiente durante 2-5
- 10 minutos. Se añadió PBE hasta un volumen final de 25 mL y las células se sedimentaron mediante centrifugado. Las células se resuspendieron en 5 mL de PBE, se pasaron a través de un filtro de malla de nylon de 40 μ m y se extrajeron mediante centrifugado. Las células se resuspendieron en 1 mL de PBE. La concentración y la viabilidad celulares se determinaron utilizando exclusión con azul
- 15 de tripano en un contador de células TC-20 (Biorad) antes de la preparación para el análisis de PARilación. Tras el conteo celular, se sedimentaron 1.5 mL de células de la médula ósea mediante centrifugado a 1200 rpm (300 rcf) durante 5 minutos a 4 °C. Se recogió el sobrenadante y se almacenó a -80 °C para un posible análisis de concentración del fármaco. Los 2,5 mL restantes de células de la médula ósea
- 20 se sedimentaron mediante centrifugado a 1200 rpm (300 rcf) durante 5 minutos a 4 °C. Las células sedimentadas se lisaron en tampón RIPA que contenía inhibidores de proteasa y fosfatasa (100 μ L de tampón por cada 10^6 células) y se almacenaron a -20 °C para la medición de la PARilación en células de médula ósea como se determinó mediante un ensayo Elisa de PARilación.

25 *PARilación en células de médula ósea (R⁸H-15, ejemplo 12)*

- Las células de médula ósea aisladas de fémures en el día 3 se lisaron en tampón RIPA que contenía inhibidores de proteasa/fosfatasa. Las muestras homogeneizadas llevaron a una concentración final de SDS al 1 %, se calentaron a 100 °C durante 5 minutos, se inactivaron en hielo y se aclararon con centrifugado a
- 30 12.000 x g durante 5 minutos a 4 °C. El análisis de PARilación se realizó utilizando el ensayo farmacodinámico II de PARP in vivo HT de Trevigen. Brevemente, se

cargaron muestras en duplicado de 10 µg en pocillos Stripwell de ELISA previamente recubiertos/previamente bloqueados como volúmenes de 50 µL en tampón de muestra y se incubaron durante 16 horas a 4 °C en tándem con estándares de PAR purificados diluidos en serie. Los pocillos se lavaron 4 veces con PBST y se incubaron con 50 µL/pocillo del anticuerpo policlonal de detección de PAR en diluyente de anticuerpos durante 2 horas a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron 4 veces con PBST y se incubaron con 50 µL/pocillo de conjugado de HRP-IgG de cabra anticonejo en diluyente de anticuerpo durante 1 hora a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron 4x con PBST, se incubaron con 100 µg/pocillo de 1:1 PARP PeroxyGlow A y PARP PeroxyGlow B y se leyeron en un BioTek Cytation 5 utilizando el criterio de valoración de la luminiscencia. Los datos se graficaron como PAR (pg/mL) utilizando valores calculados a partir de la curva estándar.

Recolección de médula ósea (R⁸H-16, ejemplo 18)

Después de la extracción del tumor, se extrajeron los fémures y se realizó extrusión de la médula ósea en tubos cónicos de 50 mL y se enjuagaron los huesos con una aguja calibre 23 colocada en una jeringa de 5 cc que contenía PBS + suero bovino fetal (FBS por sus siglas en inglés) al 2 %. La médula ósea se homogeneizó mediante pipeteo suave y se filtró a través de filtros de malla de nylon de 100 µm y se sedimentaron las células mediante centrifugado a 1200 rpm durante 5 minutos a 4 °C. Los glóbulos rojos se lisaron con 3 mL de tampón de lisis durante 2 minutos a temperatura ambiente. Se añadió PBS hasta un volumen final de 25 mL y las células se volvieron a sedimentar mediante centrifugado como se describió anteriormente. Los sedimentos celulares se suspendieron en 5 mL de PBS y el conteo celular se evaluó mediante exclusión con azul de tripano en un contador celular TC-20 (BioRad). Se recogió un subconjunto de $2,5 \times 10^6$ células de cada muestra en un tubo de microcentrífuga para mediar la PARilación.

PARilación en células de médula ósea (R⁸H-16, ejemplo 18)

Se lisaron células de médula ósea (2.5×10^6 células por gránulo) en 500 µL de tampón RIPA/HALT y se incubaron en hielo durante 15 minutos con agitación en vórtex periódica. Los lisados celulares se llevaron hasta una concentración final de

SDS al 1 %, se calentaron a 100 °C durante 5 minutos y se enfriaron en hielo. Los restos celulares se eliminaron mediante centrifugado a 14.000 x g durante 5 minutos a 4 °C y las células sedimentadas se resuspendieron en tampón a una concentración de 250.000 células/50 µL. Las muestras de células de médula ósea se cargaron en placas Stripwell previamente recubiertas/previamente bloqueadas para ELISA y se incubaron durante 16 horas a 4 °C. Las muestras se lavaron 4 veces con PBST (1 L de PBS + 1 mL de Tween 20) y se incubaron con 50 µL de anticuerpo de detección de PAR durante 2 horas a temperatura ambiente. Las muestras se lavaron 4 veces con PBST y se incubaron con 50 µL de conjugado de HRP-IgG de cabra anticonejo durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de un lavado final de 4 veces con PBST, se agregaron 100 µL de PeroxyGlow™ a cada muestra y se determinó la luminiscencia en un BioTek Cytation 5 usando el criterio de valoración de la fibra de luminiscencia y la definición de área de placa de Stripwell.

15 *Análisis estadístico*

Se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) para evaluar las diferencias significativas entre los grupos. Se utilizó el análisis de prueba de comparación múltiple Bonferroni post-hoc para determinar diferencias significativas entre las medias. Todo el análisis estadístico se realizó utilizando el software Graph Pad Prism 7.03.

20 La figura 5 muestra la PARilación en células de médula ósea después de la administración intravenosa del ejemplo 12 o la administración oral de R⁸H-15 en combinación con la administración oral de temozolomida (TMZ) a ratones atímicos. La figura 6 muestra la PARilación en células de médula ósea después de la administración intraperitoneal del ejemplo 18 o R⁸H-16 a ratones atímicos.

25

Varias modificaciones de la invención, además de las descritas en la presente, serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción anterior. Se espera que dichas modificaciones también caigan dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. Cada referencia, incluidas, entre otras, todas las patentes, solicitudes de patentes y publicaciones citadas en la presente solicitud, se incorporan en la presente mediante esta referencia en su totalidad.

30