

CONJUGADOS PEPTÍDICOS DE CITOTOXINAS COMO TERAPÉUTICOS

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a conjugados peptídicos de citotoxinas tales como inhibidores de topoisomerasa I que son útiles para el tratamiento de enfermedades tal como cáncer.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

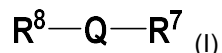
El cáncer es un grupo de enfermedades caracterizadas por un control aberrante del crecimiento celular. Se estima que la incidencia anual del cáncer excede los 1.6 millones solo en los Estados Unidos. Si bien la cirugía, radiación, quimioterapia y hormonas se usan para tratar el cáncer, sigue siendo la segunda causa principal de muerte en los Estados Unidos. Se estima que aproximadamente 600,000 estadounidenses morirán de cáncer cada año.

El tratamiento del cáncer en humanos mediante la administración sistémica de agentes farmacéuticos a menudo funciona ralentizando o interrumpiendo la replicación no controlada que es una característica de las células cancerosas. Una clase de tales agentes son los inhibidores de topoisomerasa I. Las enzimas topoisomerasa I funcionan para relajar el ADN superenrollado y aliviar las restricciones helicoidales del ADN y juegan un papel en la regulación transcripcional. Ver Li, M., Genomics Proteomics Bioinformatics 14 (2016), 166-171. La topoisomerasa I es esencial para el desarrollo en el sistema mamario debido a sus funciones dinámicas en la replicación y transcripción del ADN. Sin embargo, debido a su papel directo en la regulación transcripcional, la disfunción de la topoisomerasa I puede conducir a funciones celulares anormales. Ver Li, M., Genomics Proteomics Bioinformatics 14 (2016), 166-171. Por lo tanto, varias enfermedades humanas, tales como cáncer, enfermedades neurodegenerativas y enfermedades autoinmunes, están vinculadas con la regulación y actividad de la topoisomerasa I.

Los inhibidores de topoisomerasa I se han desarrollado y continúan desarrollándose como agentes anticancerígenos. En particular, los inhibidores de topoisomerasa I se usan ampliamente para el tratamiento de cánceres colorrectales, gástricos y otros. Ver Ogitani, Bioorg. Med. Chem. Lett. 26 (2016), 5069-5072. Aunque los inhibidores de topoisomerasa I son útiles en el tratamiento del cáncer, los compuestos también exhiben efectos secundarios, incluyendo neutropenia y diarrea severa. El suministro preferencial de inhibidores de topoisomerasa a estos tejidos enfermos podría evitar estos efectos secundarios serios. Por lo tanto, existe la necesidad de un suministro más selectivo de inhibidores de topoisomerasa I al tejido enfermo.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente descripción proporciona, *inter alia*, un compuesto de Fórmula (I):



5 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde las variables constituyentes se definen en la presente.

La presente descripción proporciona adicionalmente una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la descripción, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y al menos un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.

10 La presente descripción también proporciona métodos para tratar una enfermedad o afección (por ejemplo, cáncer) administrando a un humano u otro mamífero en necesidad de tal tratamiento una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la descripción. En algunas modalidades, la enfermedad o afección se caracteriza por tejidos enfermos ácidos o hipóxicos.

15 La presente descripción también proporciona el uso de un compuesto descrito en la presente en la manufactura 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 intermediarios útiles en estos métodos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

20 La FIG. 1 muestra un diagrama de la concentración en plasma del Compuesto 11 y exatecán liberado después de una dosis IV única de 5 mg/kg del Compuesto 11 en una rata (los datos se expresan como media $\pm$ SEM).

25 La FIG. 2 muestra un diagrama de la concentración de péptidos en tumor y médula ósea después de una dosis IP única de 10 mg/kg del Compuesto 11 en un ratón (los datos se expresan como media $\pm$ SEM).

30 La FIG. 3 muestra una gráfica de los recuentos totales de médula ósea de los fémures de ratones desnudos portadores de tumor después de la dosificación de 2.6 y 5.2 μ moles/kg ya sea del Compuesto 11 (equivalente a 10, 20 mg/kg de conjugado) o exatecán libre (equivalente a 1.15 y 2.3 mg/kg de exatecán) dosificado una vez al día durante cuatro días (los datos se expresan como media $\pm$ SEM).

La FIG. 4A muestra los estómagos de ratones desnudos portadores de tumor extirpados después de la dosificación de vehículo o 5.2 $\mu\text{moles/kg}$ ya sea del Compuesto 11 (equivalente a 20 mg/kg de conjugado) o exatecán libre (equivalente a 2.3 mg/kg de exatecán) dosificado una vez al día durante cuatro días.

- 5 La FIG. 4B shows los estómagos de ratones desnudos portadores de tumor in situ después de la dosificación de 5.2 $\mu\text{moles/kg}$ ya sea del Compuesto 11 (equivalente a 20 mg/kg de conjugado) o exatecán libre (equivalente a 2.3 mg/kg de exatecán) dosificado una vez al día durante cuatro días.

- La FIG. 5A muestra un diagrama del volumen medio de tumor que resulta de las cantidades equimolares de dosificación ya sea de exatecán libre o Compuesto 11 en ratones desnudos que
10 portan tumores en flanco colorrectal HCT116. Los animales fueron dosificados una vez al día cuatro veces a la semana de manera intraparenteral durante tres semanas.

La FIG. 5B exhibe una curva de supervivencia Kaplan Meier para cantidades equimolares de dosificación ya sea de exatecán libre o Compuesto 11 en ratones desnudos que portan tumores en flanco colorrectal HCT116.

- 15 La FIG. 6A muestra la eficacia de agente único del Compuesto 11 en ratones desnudos que portan tumores en flanco de cáncer gástrico HER2 negativos MKN45. Los animales fueron dosificados una vez al día cuatro veces a la semana de manera intraparenteral durante dos semanas.

- La FIG. 6B exhibe una curva de supervivencia Kaplan Meier para cantidades equimolares de dosificación ya sea de exatecán libre o Compuesto 11 en ratones desnudos que portan tumores en
20 flanco de cáncer gástrico HER2 negativos MKN45.

La FIG. 7A muestra un diagrama del volumen medio de tumor que resulta de la dosificación del Compuesto 11 en ratones SCID que portan tumores en flanco de cáncer de mama HER2 intermedios JIMT-1. Los animales fueron dosificados una vez al día cuatro veces a la semana de manera intraparenteral durante tres semanas.

- 25 La FIG. 7B muestra un diagrama del cambio porcentual del peso corporal en ratones SCID que portan tumores en flanco de cáncer de mama HER2 intermedios JIMT-1 dosificados con el Compuesto 11.

- La FIG. 8A muestra un diagrama del volumen medio de tumor en ratones desnudos que portan tumores en flanco de cáncer de mama MDA-MB-231 triple negativos dosificados con el Compuesto
30 11. Los animales fueron dosificados una vez al día cuatro veces a la semana de manera intraparenteral durante tres semanas.

La FIG. 8B muestra un diagrama del cambio porcentual del peso corporal con relación al día 0 en ratones desnudos que portan tumores en flanco de cáncer de mama MDA-MB-231 triple negativos

dosificados con el Compuesto 11.

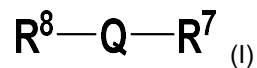
La FIG. 9A muestra un diagrama del volumen medio de tumor de ratones desnudos que portan tumores en flanco de cáncer de mama MDA-MB-231 triple negativos dosificados con el Compuesto 11 y talazoparib. Los animales fueron dosificados una vez al día cuatro veces a la semana de manera intraparenteral durante tres semanas con el Compuesto 11 y una vez al día durante 18 días oralmente con talazoparib.

La FIG. 9B muestra un diagrama del cambio porcentual del peso corporal con relación al día 0 de ratones desnudos que portan tumores en flanco de cáncer de mama MDA-MB-231 triple negativos dosificados con el Compuesto 11 y talazoparib.

La FIG. 10 muestra una gráfica de la degradación del Compuesto 11 y Compuesto 29 que resulta del tratamiento con glutatona 10 mM durante 16 h. Como se muestra en la FIG. 10, el Compuesto 29 se libre mucho más rápido que el Compuesto 11 bajo exposición similar a la glutatona.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En la presente se proporciona un compuesto de Fórmula (I):



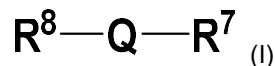
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

R^7 es un péptido;

R^8 es una porción dirigida a topoisomerasa I de molécula pequeña, que se une a la topoisomerasa I; y

Q es un enlazador, que se enlaza covalentemente a la porción R^7 y R^8 .

En la presente también se proporciona un compuesto de Fórmula (I):



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

R^7 es un péptido capaz de suministrar selectivamente R^8Q - a través de una membrana celular que tiene un manto ácido o hipóxico que tiene un pH menor de aproximadamente 6.0;

R⁸ es una porción dirigida a topoisomerasa I de molécula pequeña, que se une a la topoisomerasa I; y

Q es un enlazador, que se enlaza covalentemente a la porción R⁷ y R⁸.

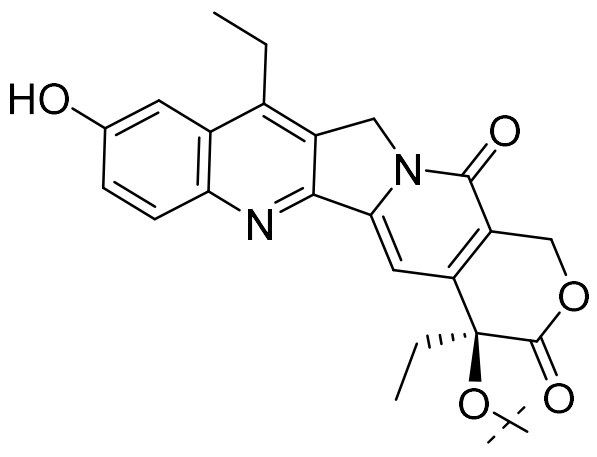
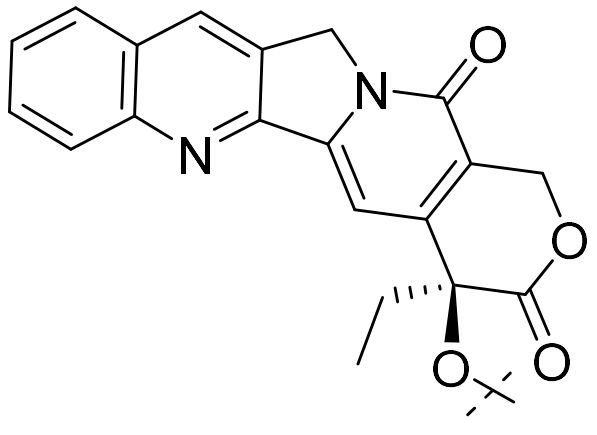
En la presente se proporciona un compuesto de Fórmula (I):

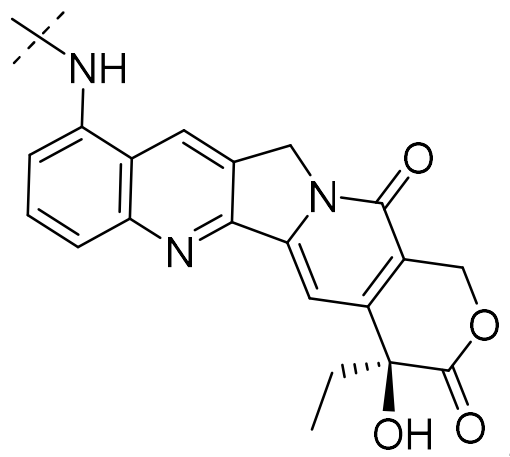
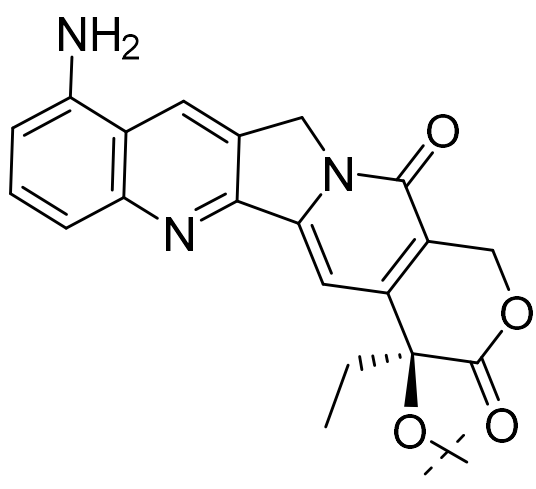
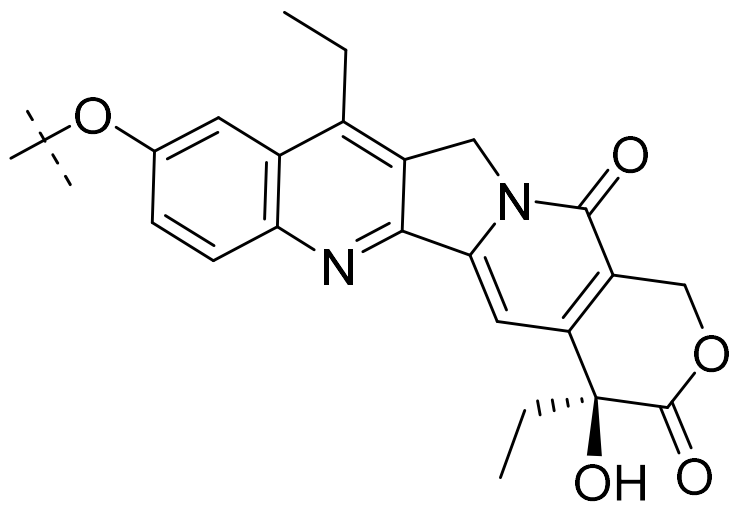


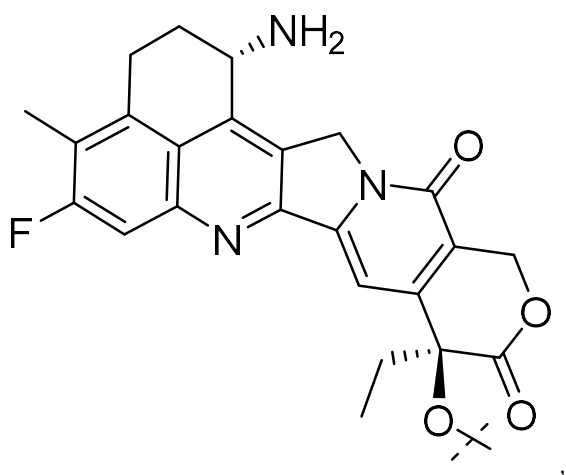
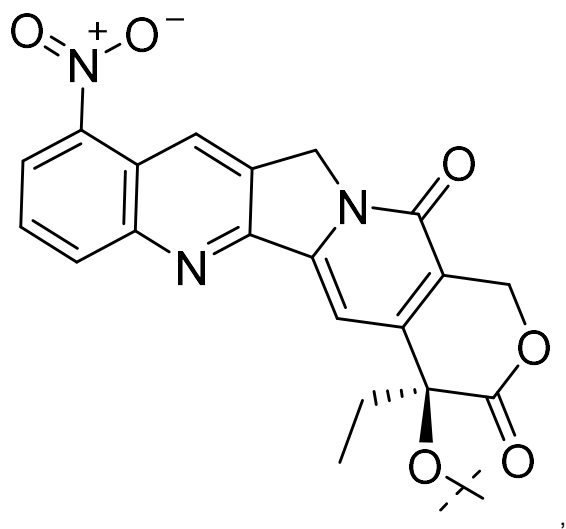
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

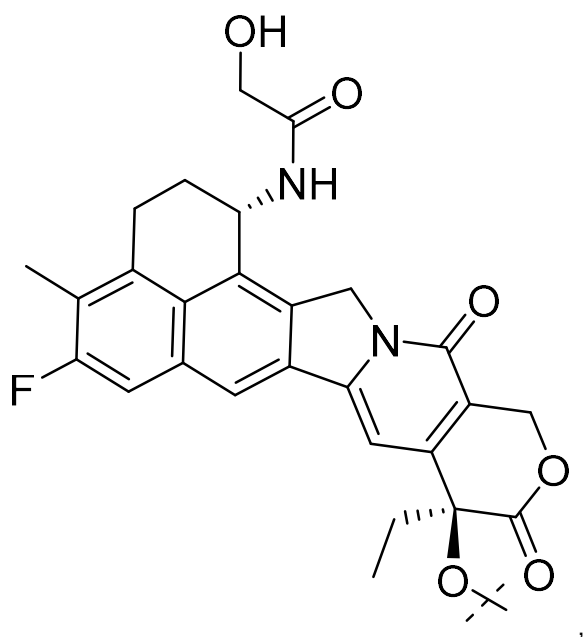
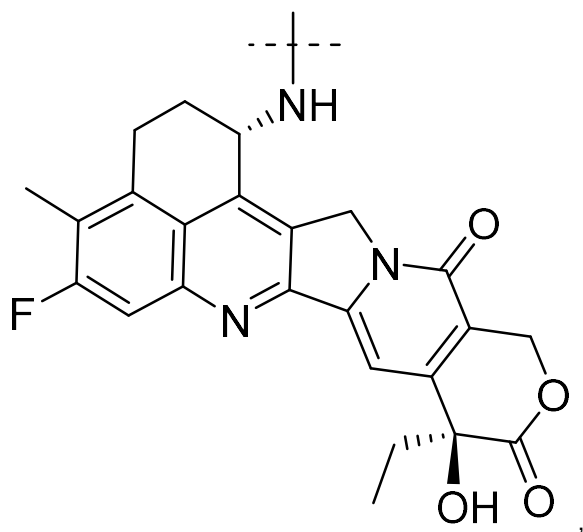
R⁷ es un péptido;

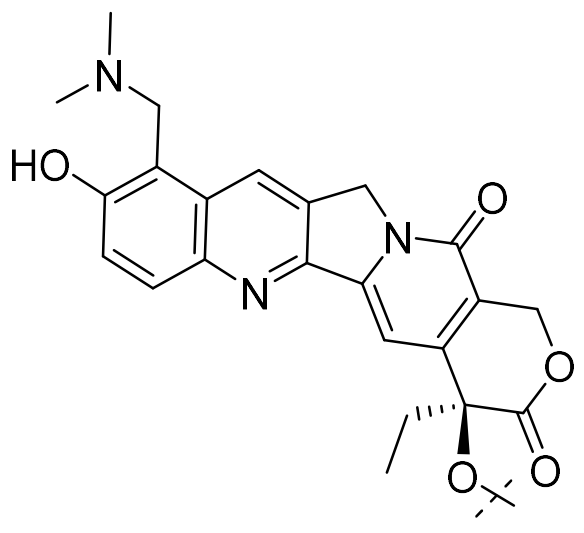
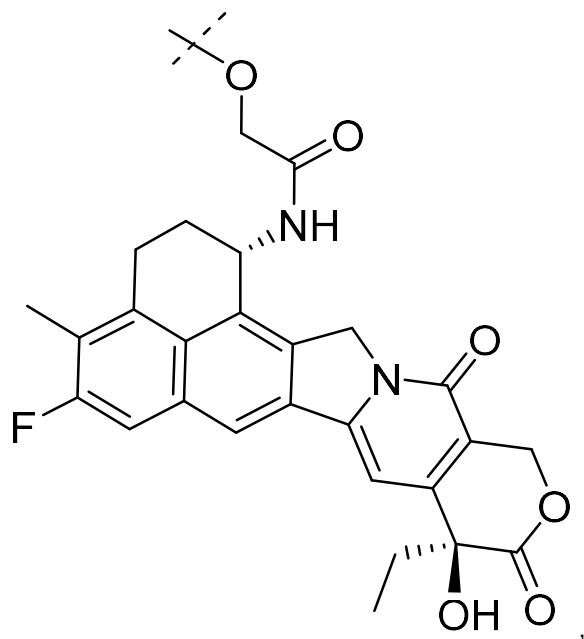
R⁸ se selecciona a partir del grupo que consiste en:

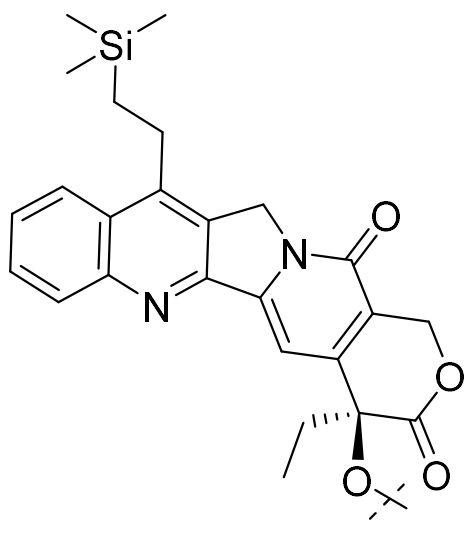
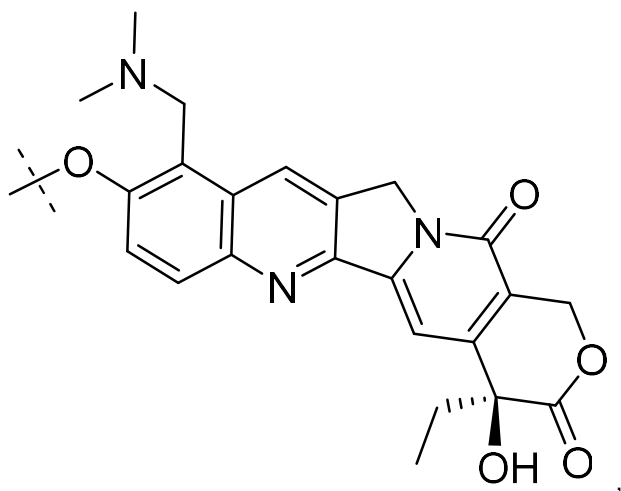


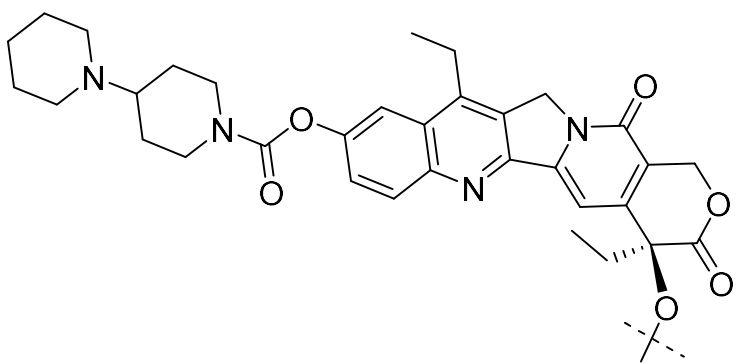
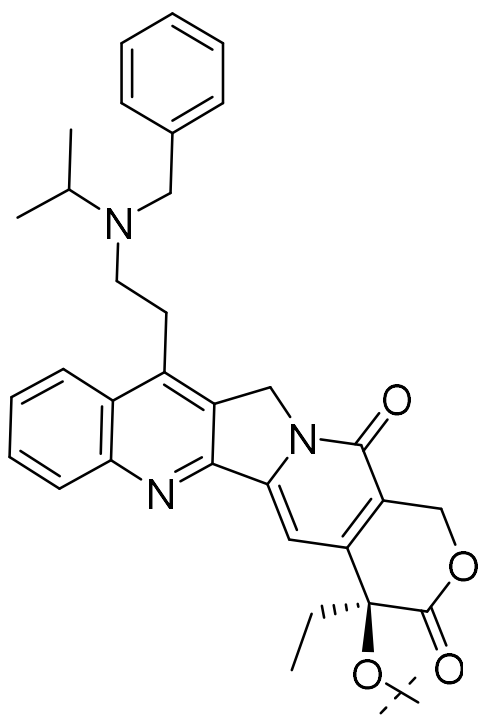
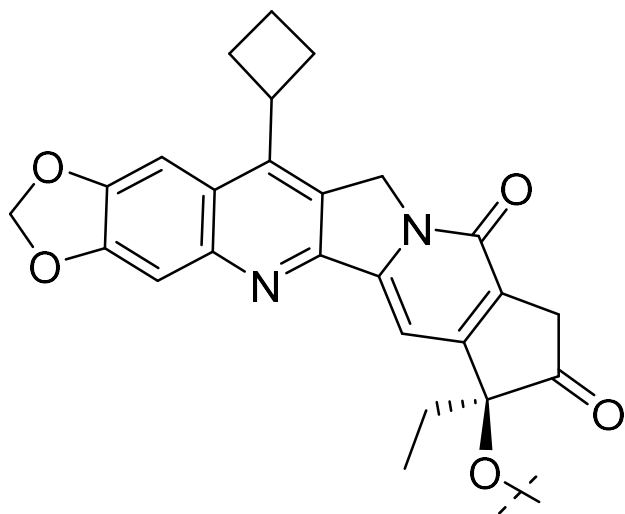


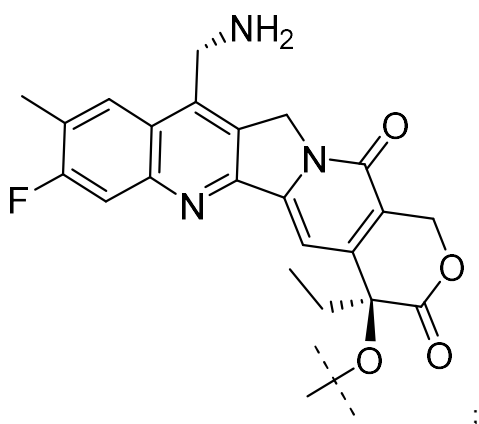
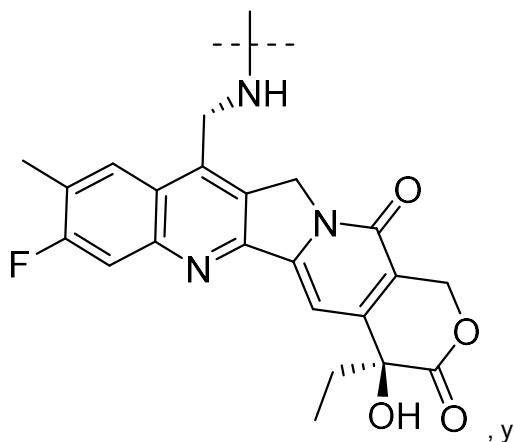












Q es un enlazador, que se enlaza covalentemente a la porción R⁷ y R⁸.

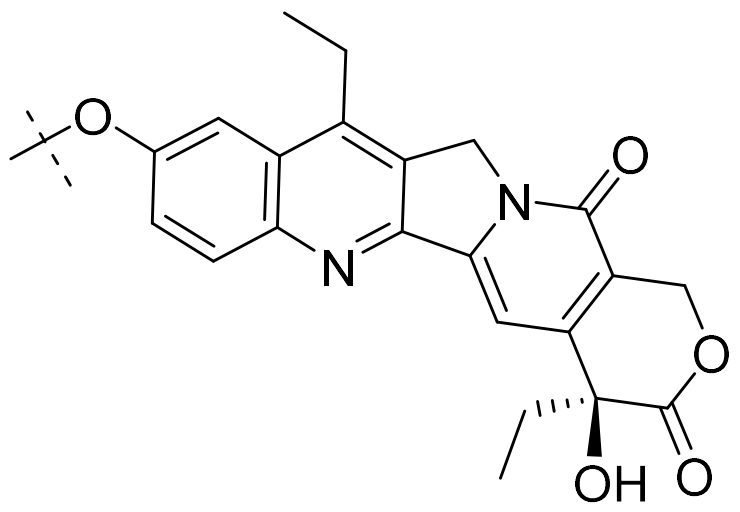
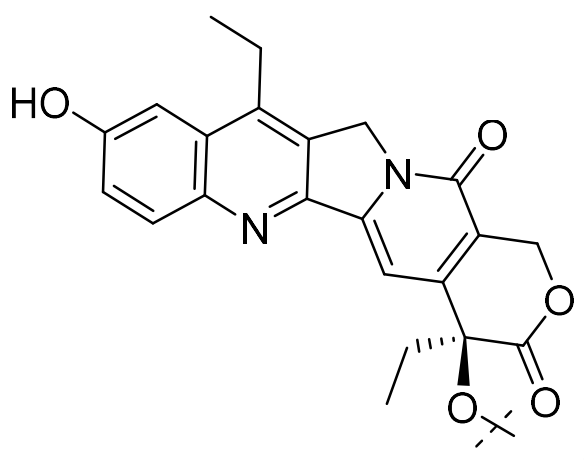
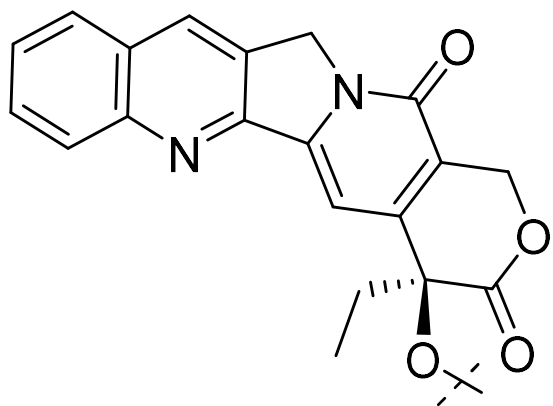
En la presente se proporciona un compuesto de Fórmula (I):

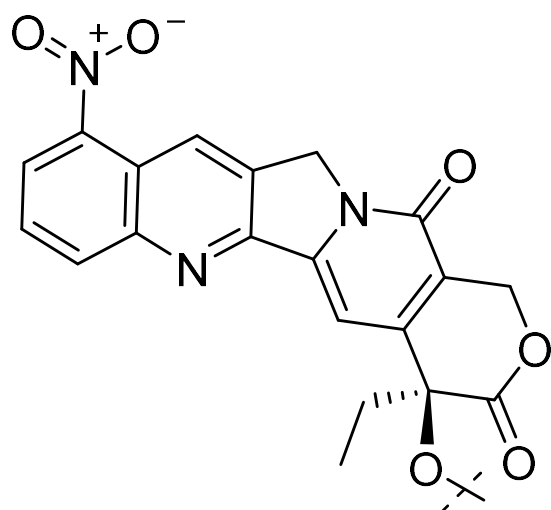
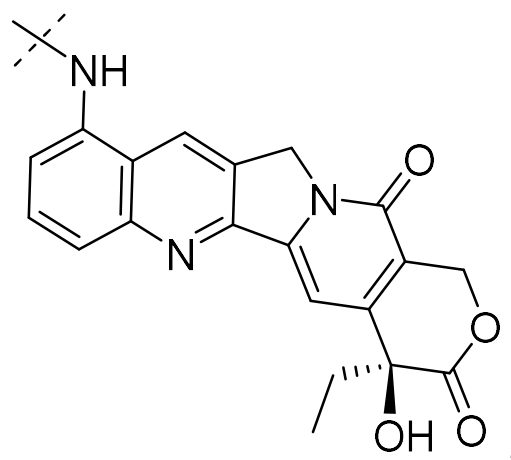
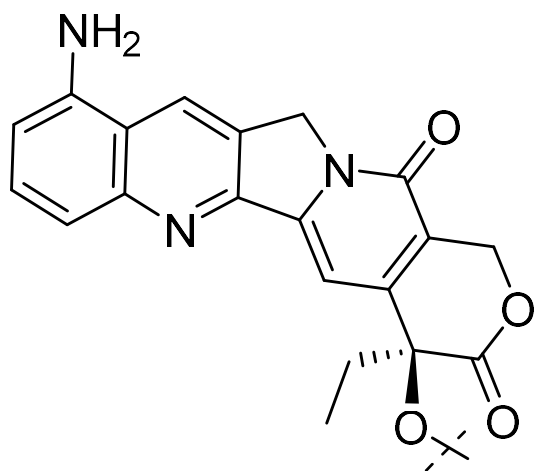


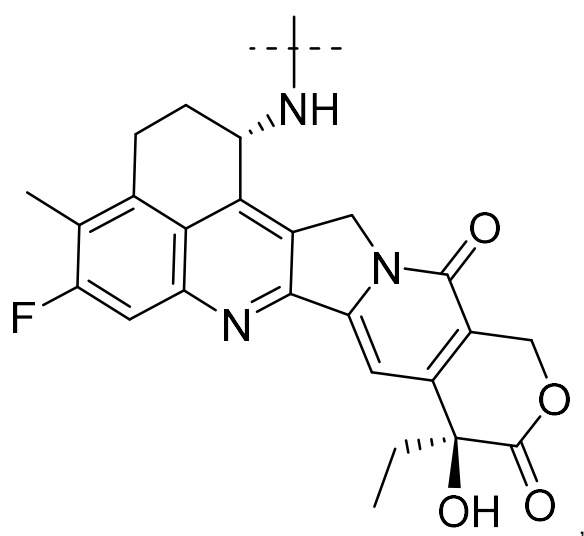
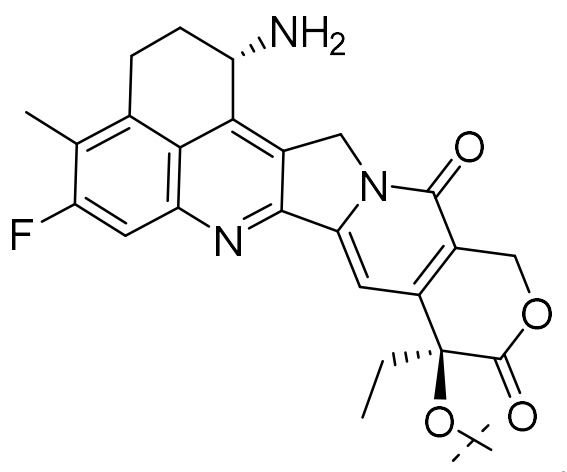
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

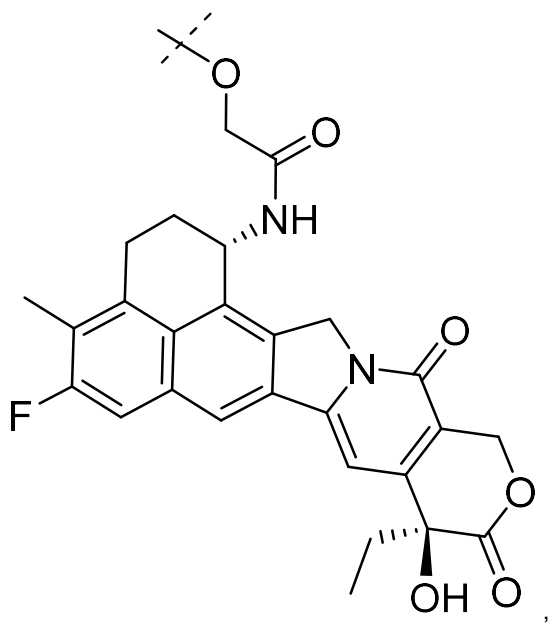
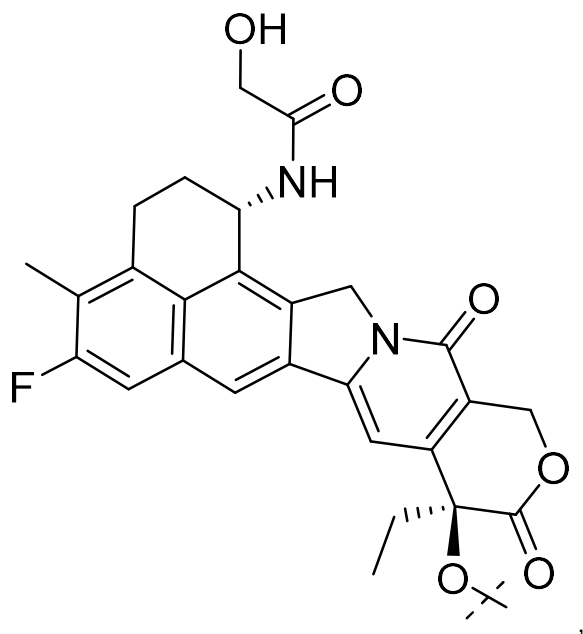
R⁷ es un péptido;

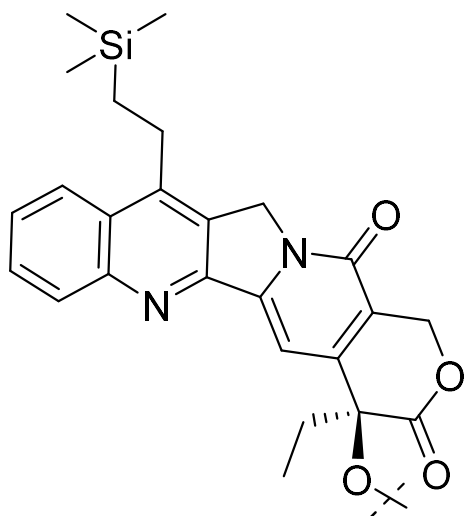
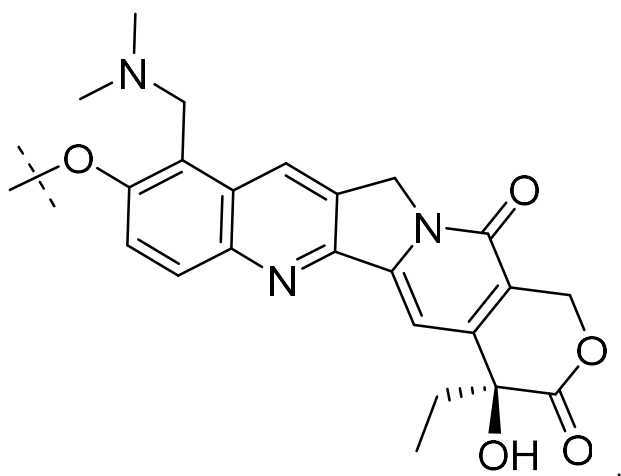
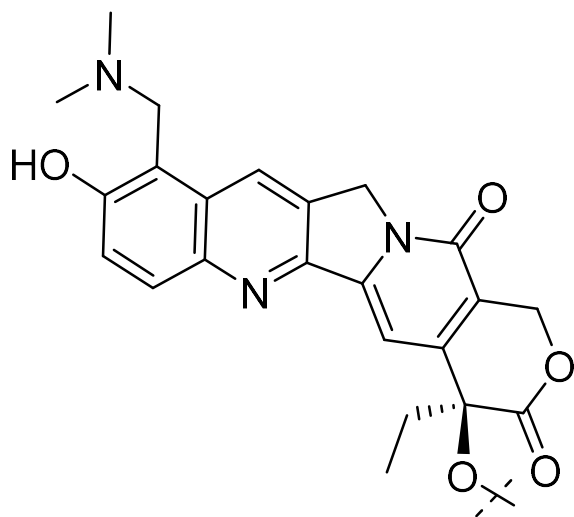
R⁸ se selecciona a partir del grupo que consiste en:

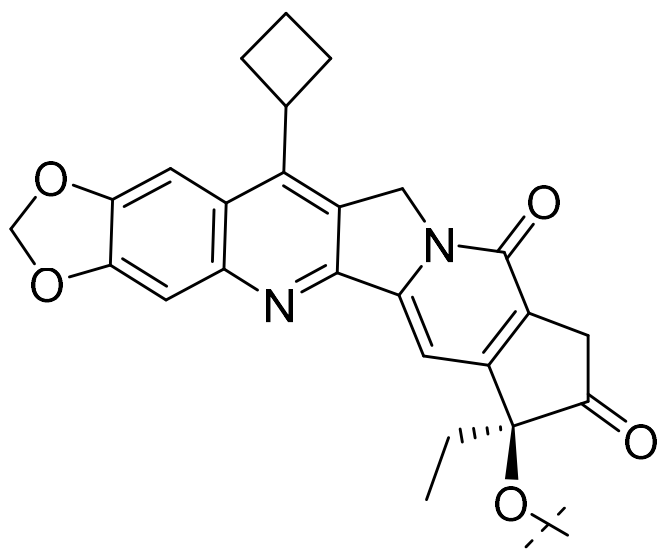




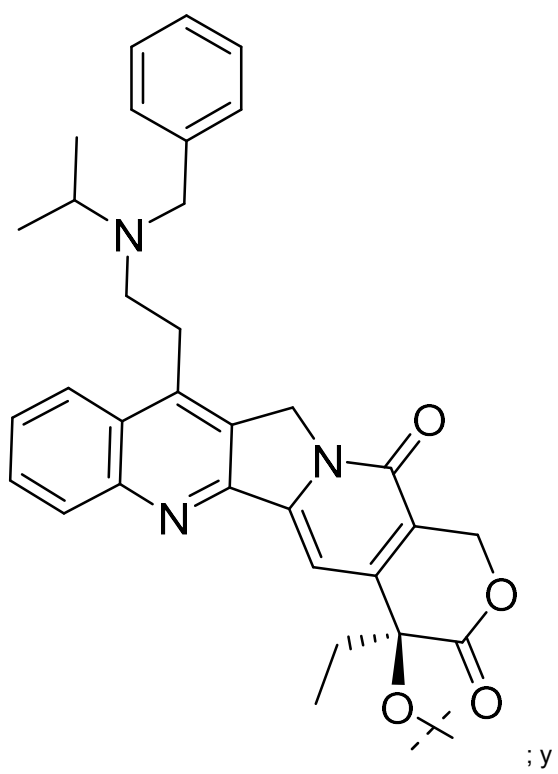






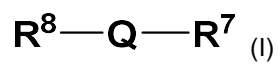


5



Q es un enlazador, que se enlaza covalentemente a la porción R^7 y R^8 .

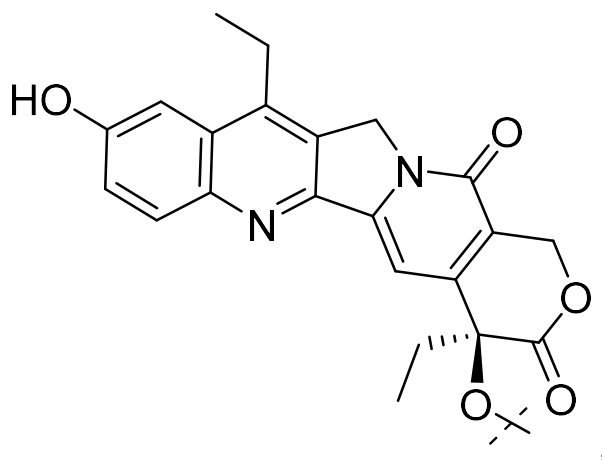
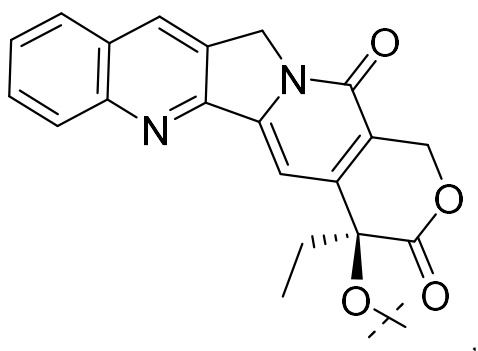
En la presente se proporciona un compuesto de Fórmula (I):

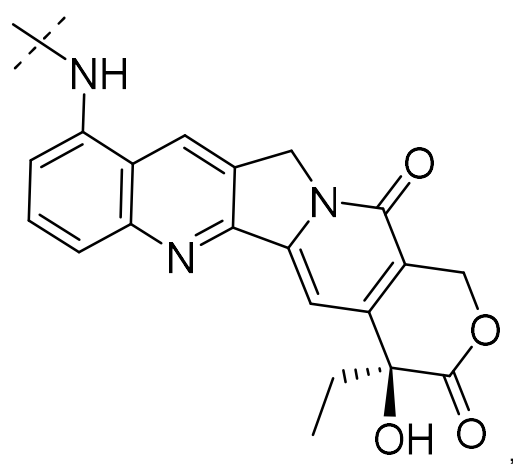
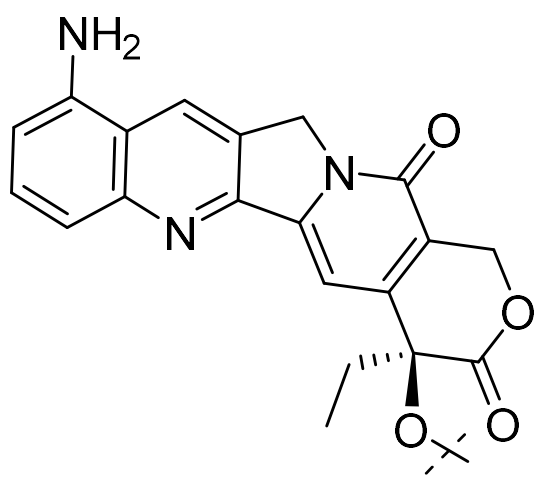
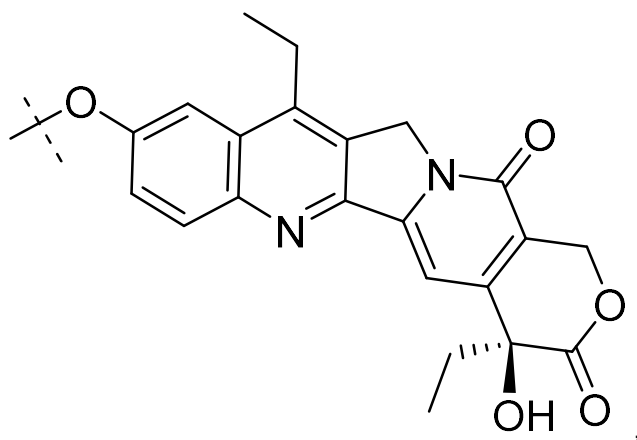


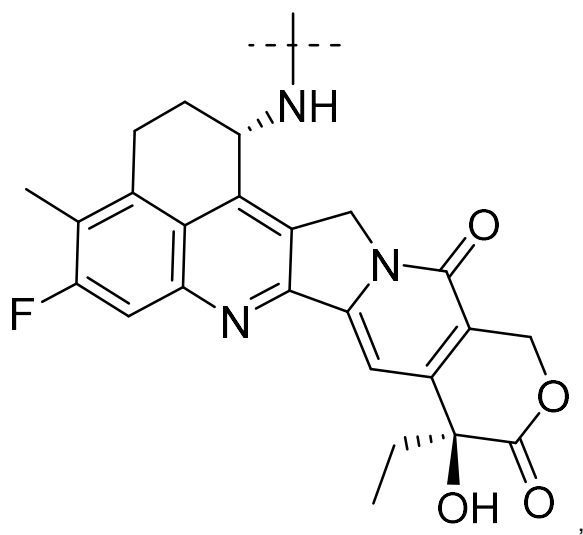
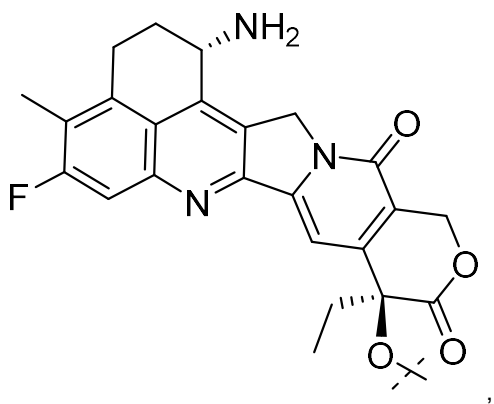
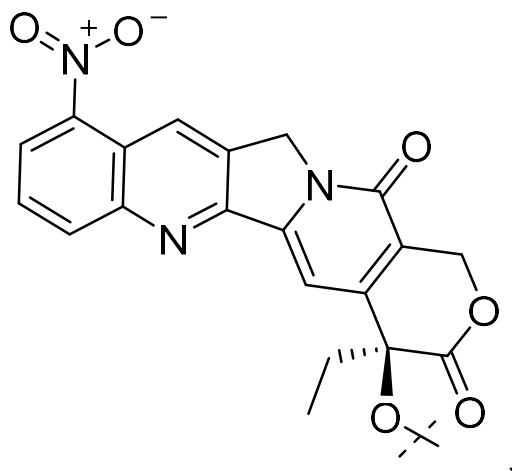
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

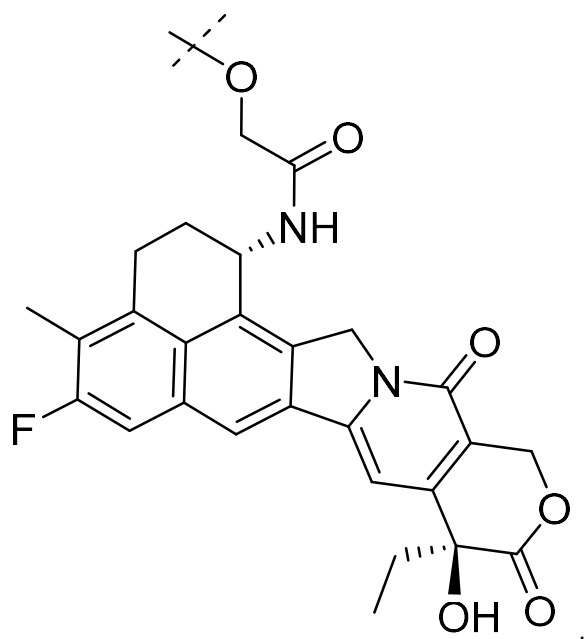
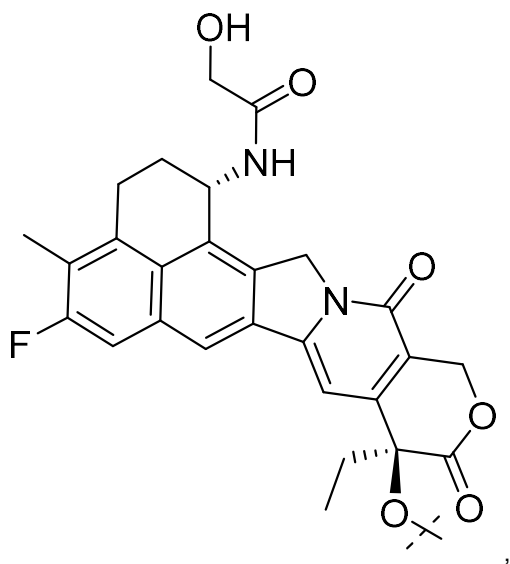
5 R^7 es un péptido;

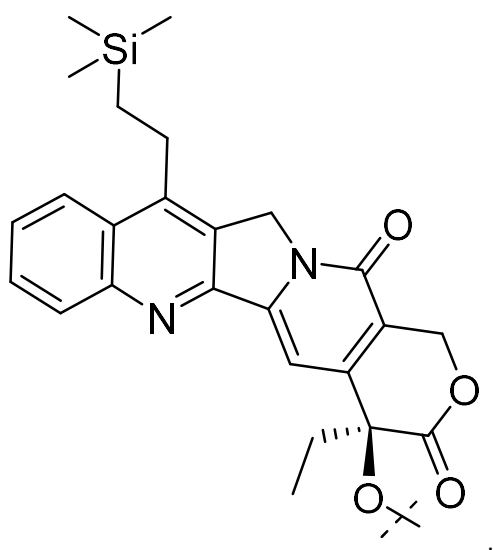
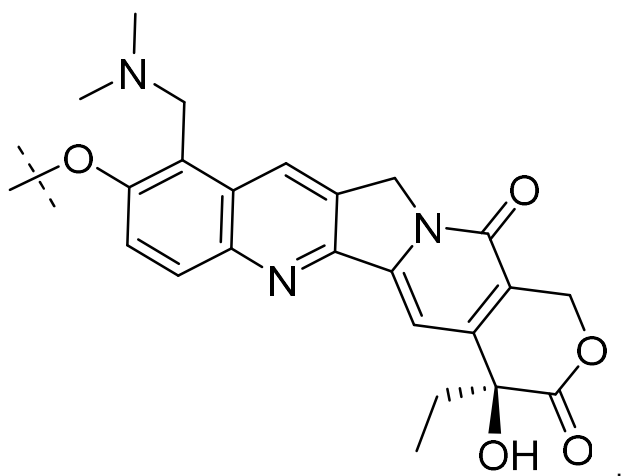
R^8 se selecciona a partir del grupo que consiste en:

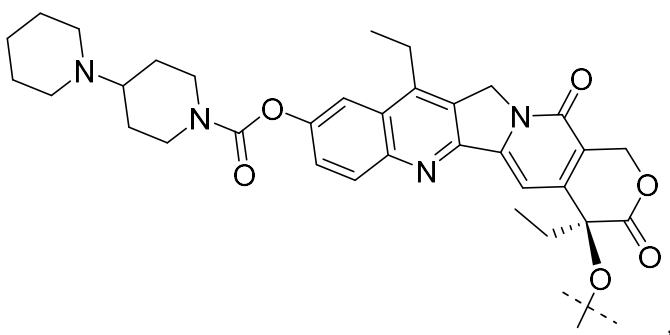
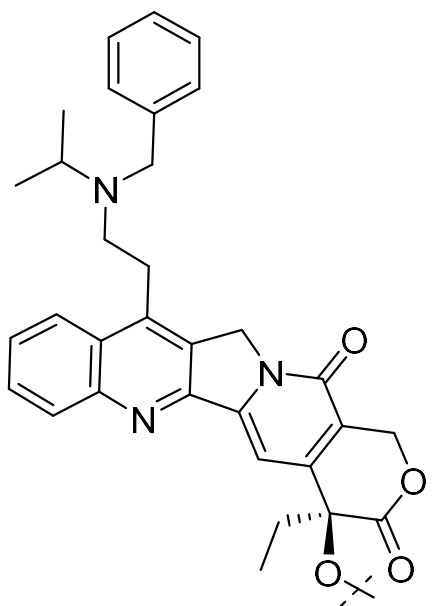
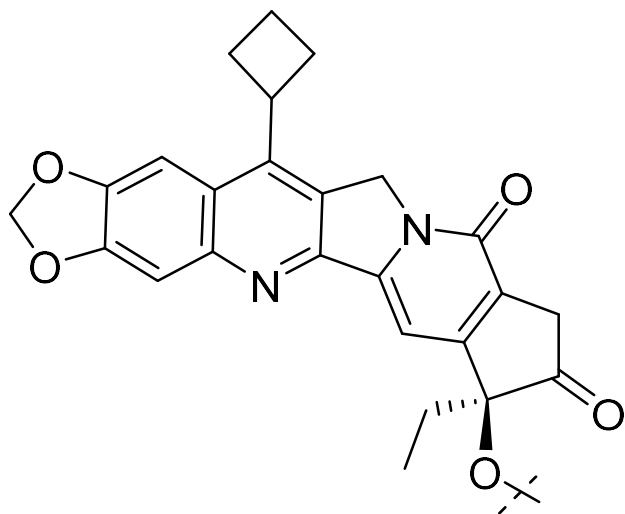


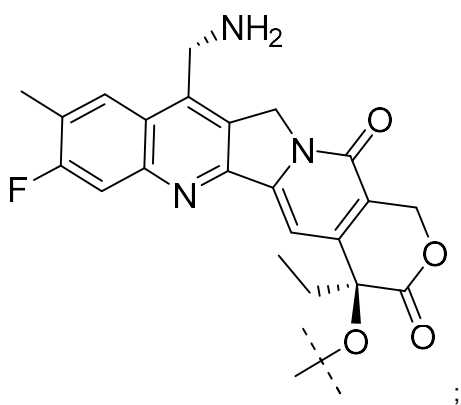
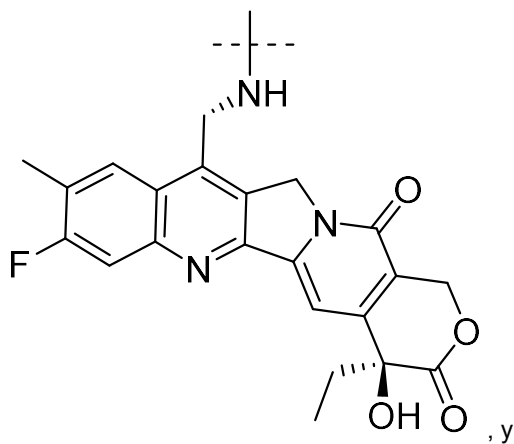




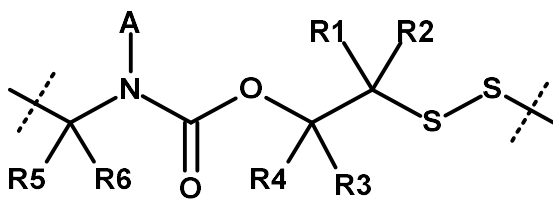
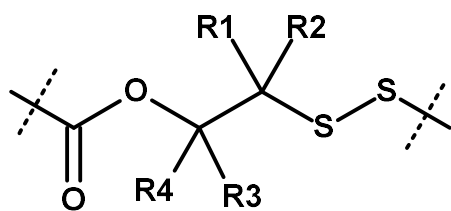


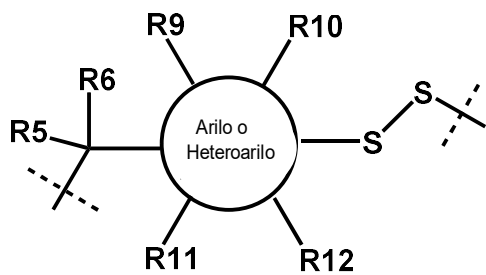
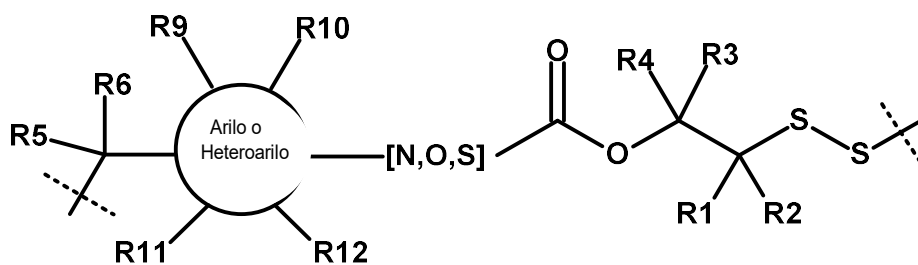
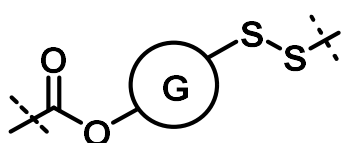
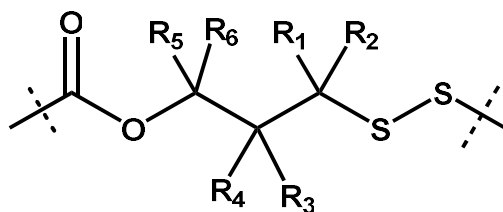
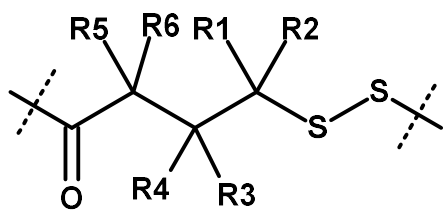


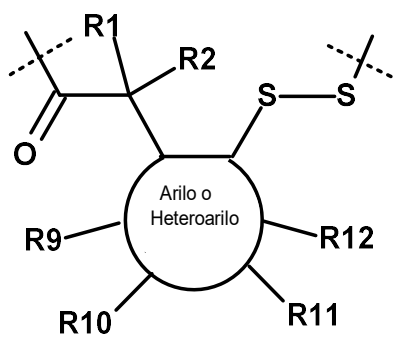
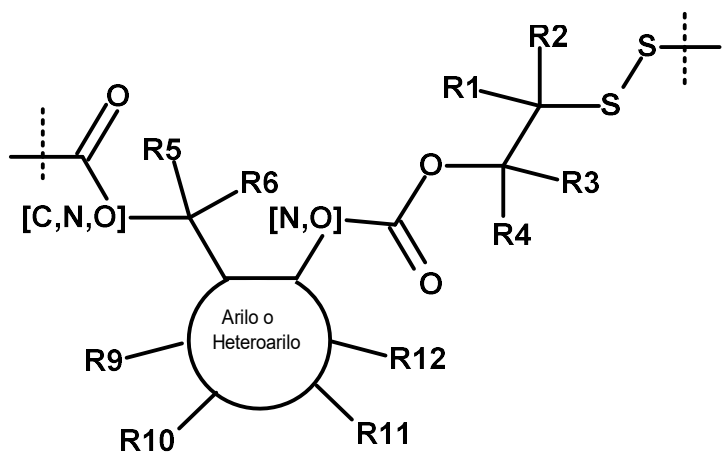
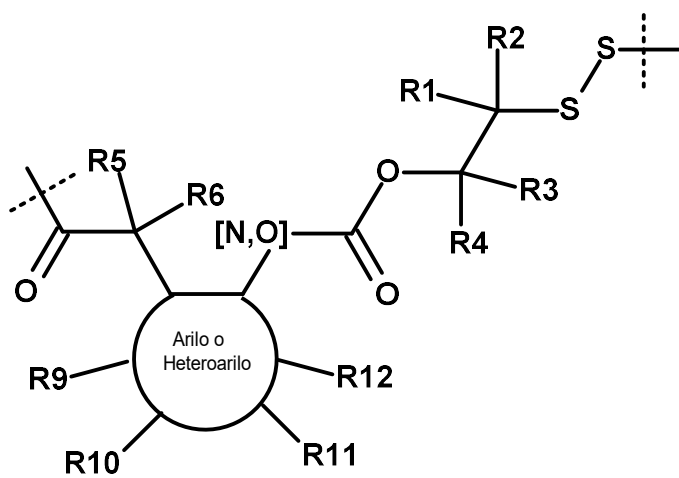


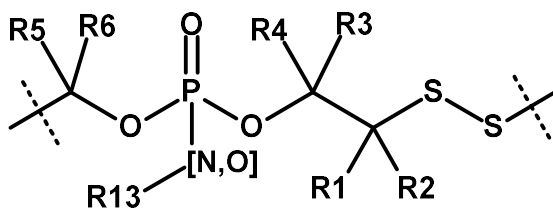
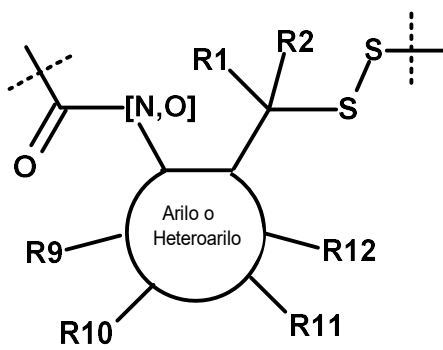
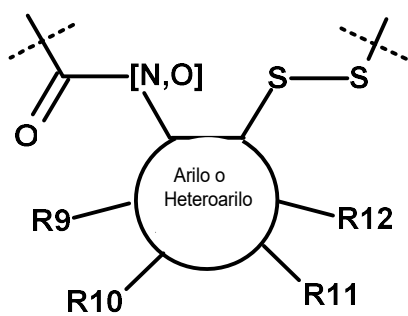
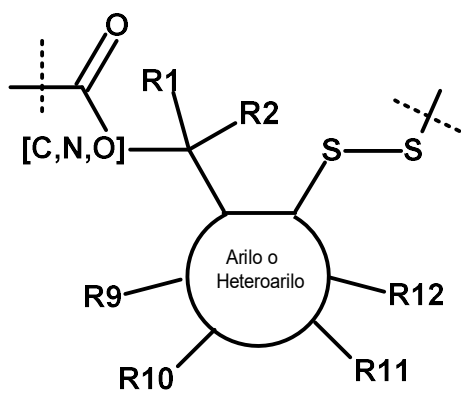


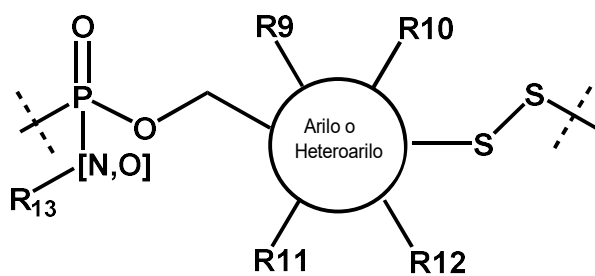
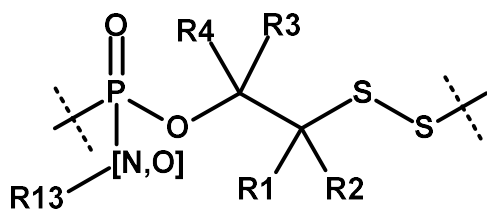
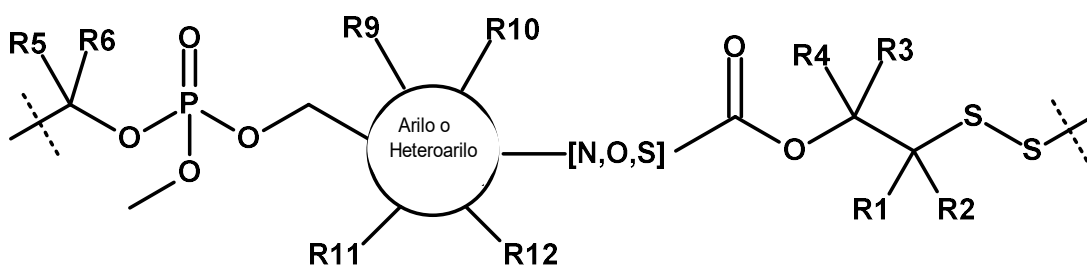
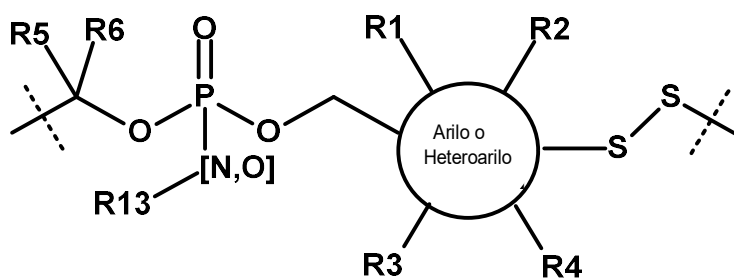
Q se selecciona a partir del grupo que consiste en



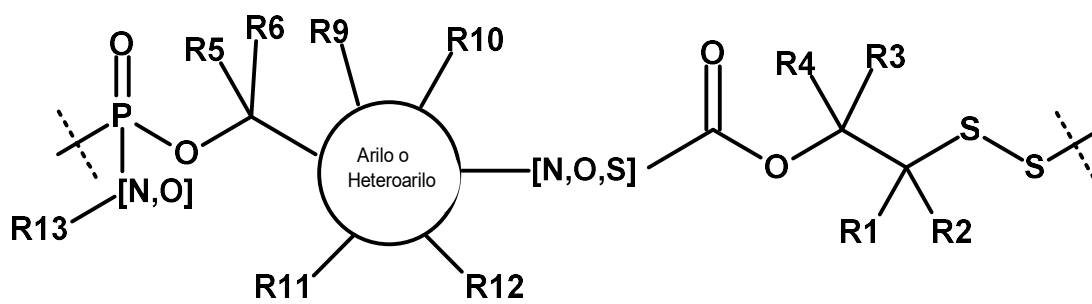








5



- R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁹, R¹⁰, R¹¹, y R¹² son cada uno seleccionados independientemente a partir de H, alquilo C₁₋₄, alquenilo C₁₋₄, arilo C₆₋₁₀, cicloalquilo C₃₋₁₀, heteroarilo de 5-10 miembros, heterocicloalquilo de 4-10 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}, en donde
- 5 dicho alquilo C₁₋₄, alquenilo C₁₋₄, arilo C₆₋₁₀, cicloalquilo C₃₋₁₀, heteroarilo de 5-10 miembros, y heterocicloalquilo de 4-10 miembros, son cada uno opcionalmente sustituidos con 1, 2, o 3 sustituyentes seleccionados independientemente a partir 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 cual se unen forman un grupo cicloalquilo C₃₋₁₄ o grupo heterocicloalquilo de 4-14 miembros, cada uno opcionalmente sustituido con 1, 2, o 3 sustituyentes seleccionados independientemente a partir de alquilo C₁₋₄, 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};
- 15 o R¹ y R³ junto con los átomos de carbono a los cuales se unen forman un grupo cicloalquilo C₃₋₁₄ o grupo heterocicloalquilo de 4-14 miembros, cada uno opcionalmente sustituido con 1, 2, o 3 sustituyentes seleccionados independientemente a partir de alquilo C₁₋₄, 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};
- 20 o R² y R³ junto con los átomos de carbono a los cuales se unen forman un grupo cicloalquilo C₃₋₁₄ o grupo heterocicloalquilo de 4-14 miembros, cada uno opcionalmente sustituido con 1, 2, o 3 sustituyentes seleccionados independientemente a partir de alquilo C₁₋₄, 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};
- 25 o R³ y R⁴ junto con el átomo de carbono al cual se unen forman un grupo cicloalquilo C₃₋₁₄ o grupo heterocicloalquilo de 4-14 miembros, cada uno opcionalmente sustituido con 1, 2, o 3 sustituyentes seleccionados independientemente a partir de alquilo C₁₋₄, 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};
- 30 o R⁵ y R⁶ junto con el átomo de carbono al cual se unen forman un grupo cicloalquilo C₃₋₁₄ o grupo heterocicloalquilo de 4-14 miembros, cada uno opcionalmente sustituido con 1, 2, o 3 sustituyentes seleccionados independientemente a partir de alquilo C₁₋₄, 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};
- 35 R¹³ es H o alquilo C₁₋₆;

A es H o alquilo C₁₋₄;

R^{a1}, R^{b1}, R^{c1}, y R^{d1} son cada uno seleccionados independientemente a partir de H, alquilo C₁₋₆, alquenilo C₂₋₆, alquinilo C₂₋₆, haloalquilo C₁₋₆, OH, CN, NO₂, y CO₂CH₃; en donde dicho alquilo C₁₋₆ y alquenilo C₂₋₆ son cada uno opcionalmente sustituidos con OH, CN, NO₂, o CO₂CH₃;



- 5 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, o 4 heteroátomos formadores de anillo seleccionados independientemente a partir de N, O, y S;

- 10 El Anillo G es un grupo cicloalquilo C₃₋₁₄ o grupo heterocicloalquilo de 4-14 miembros, cada uno opcionalmente sustituido con 1, 2, o 3 sustituyentes seleccionados independientemente a partir de alquilo C₁₋₄, 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};

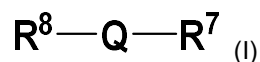
[N, O, S] es NH, O, o S;

[N, O] es NH u O;

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

- 15 cada R^X y R^Y se seleccionan independientemente a partir de H y alquilo C₁₋₄.

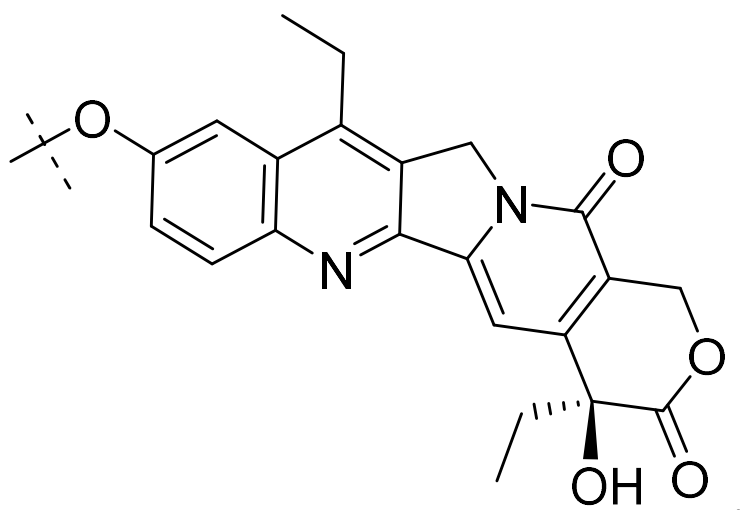
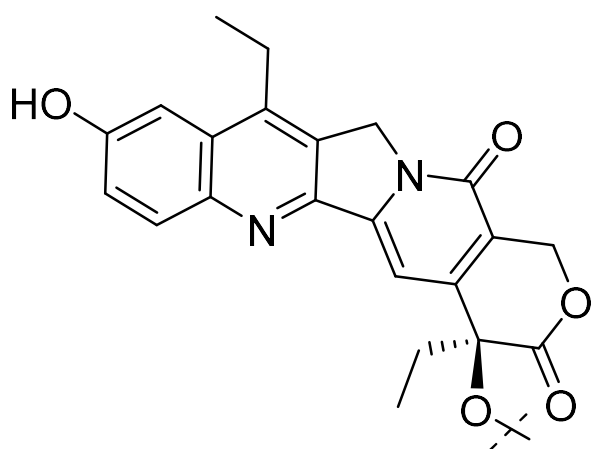
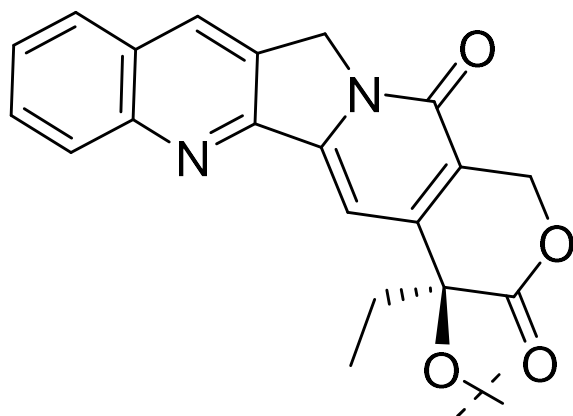
En la presente se proporciona un compuesto de Fórmula (I):

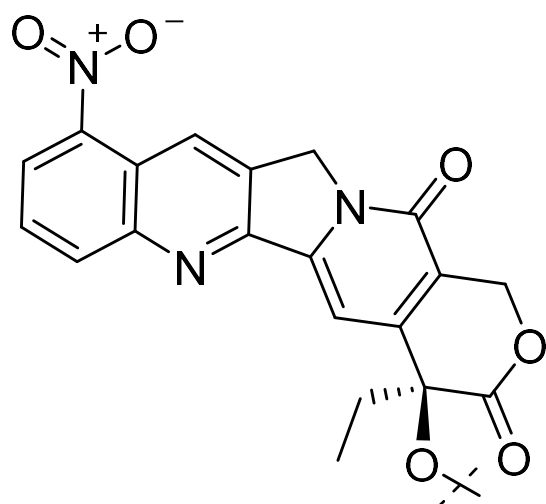
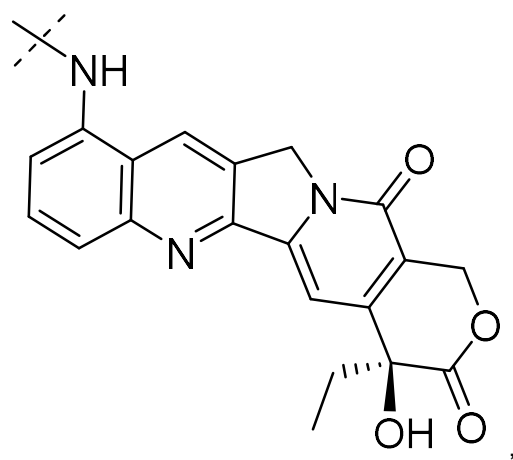
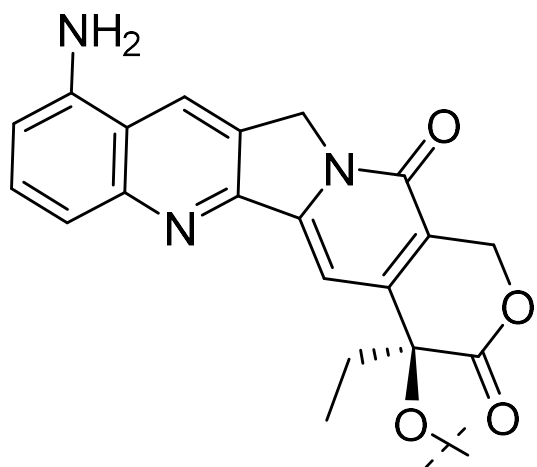


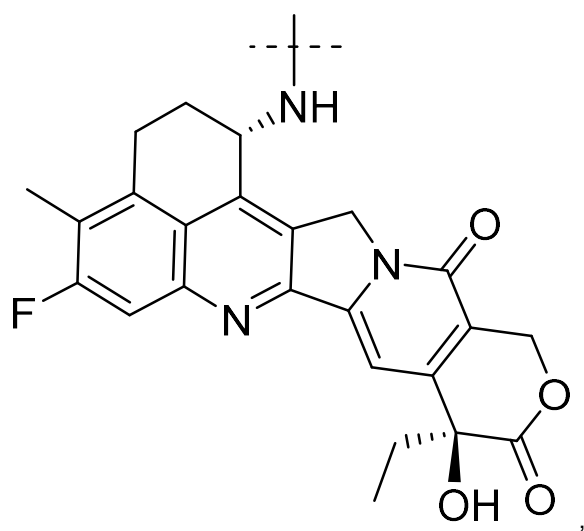
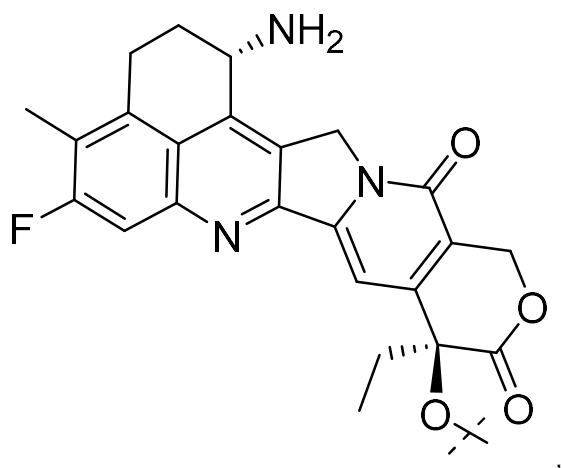
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

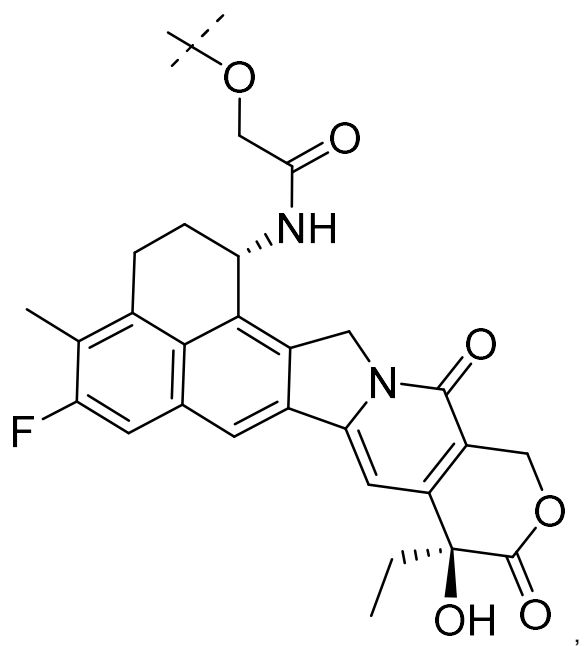
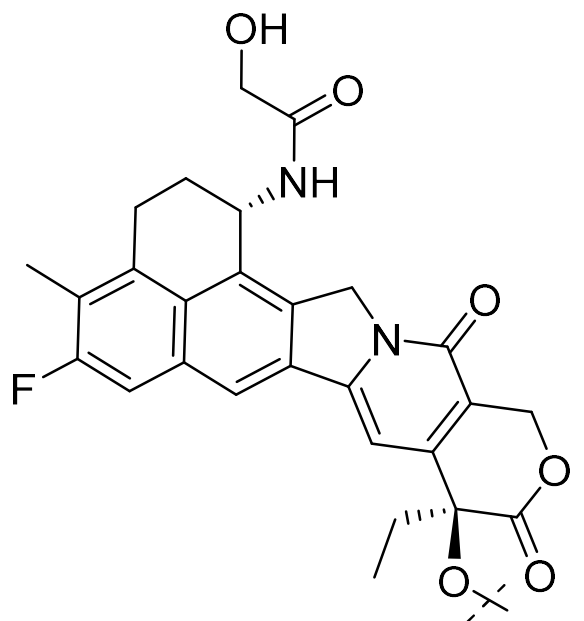
R⁷ es un péptido;

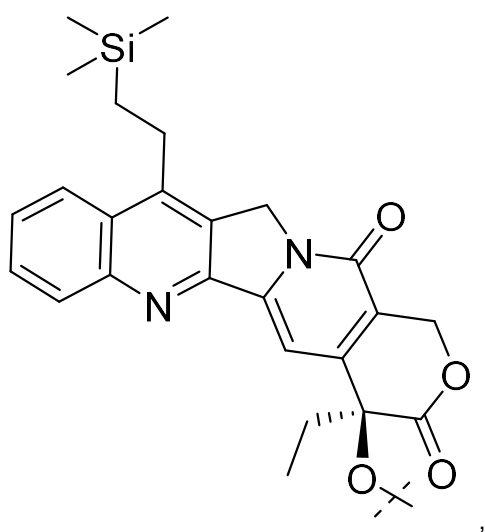
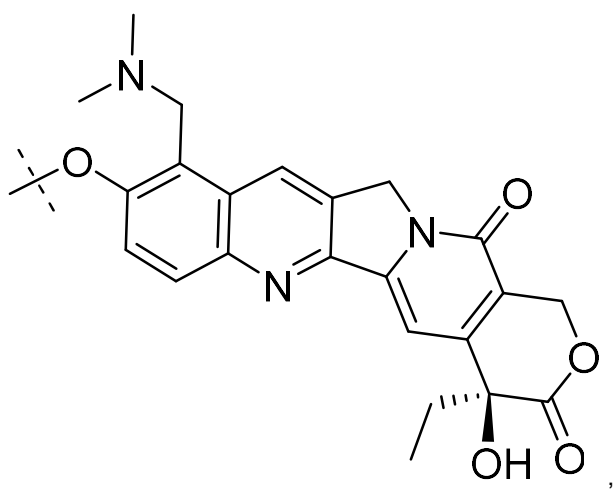
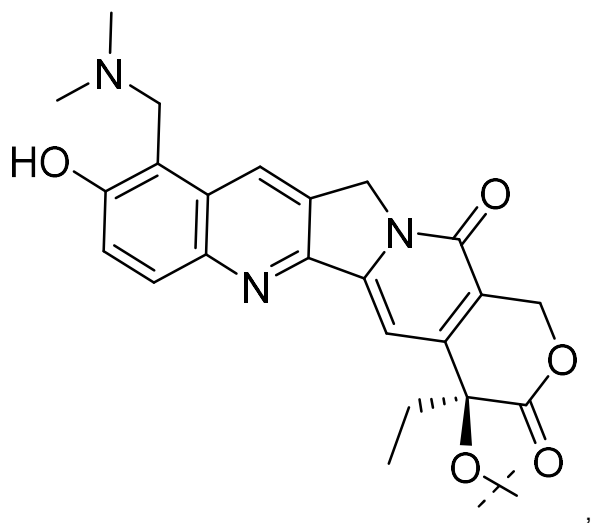
- 20 R⁸ se selecciona a partir del grupo que consiste en:

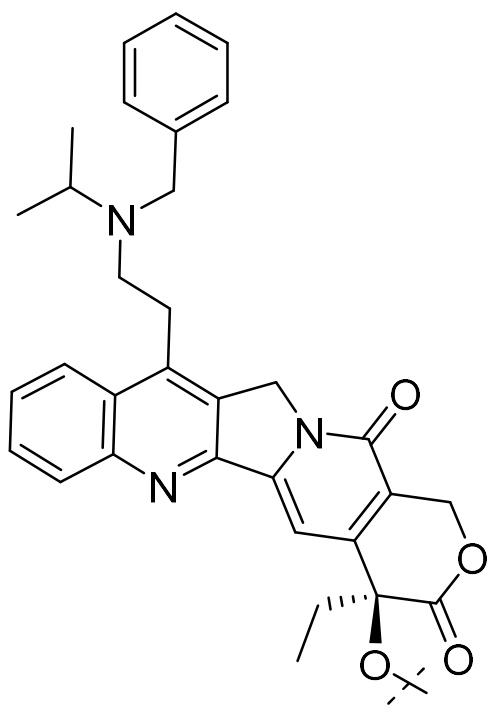
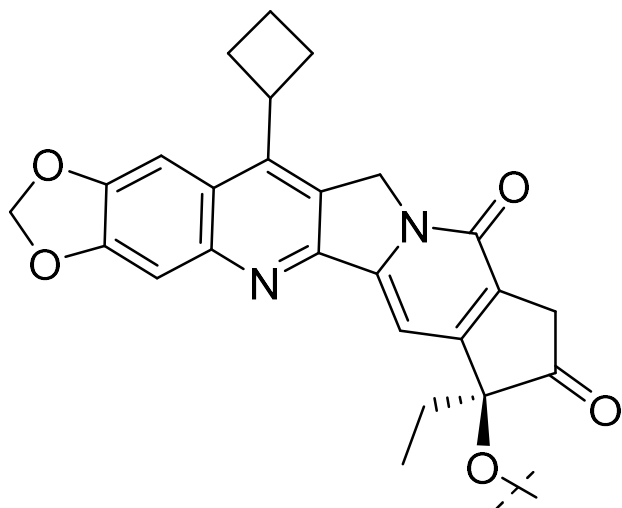




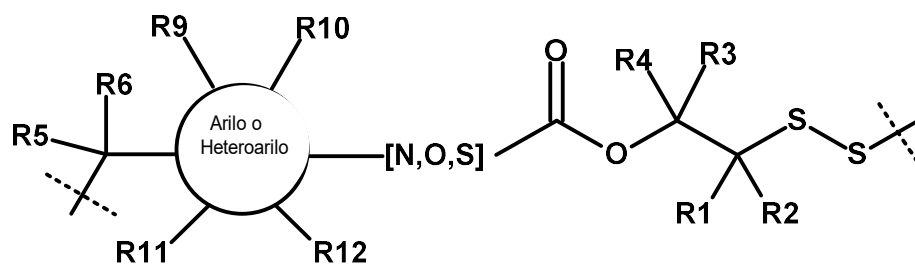
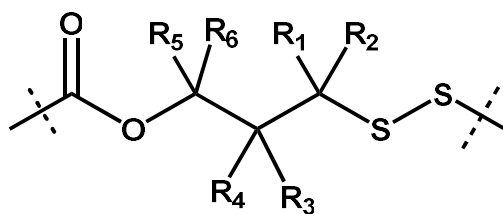
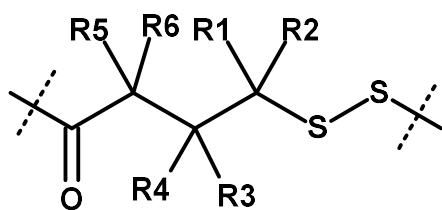
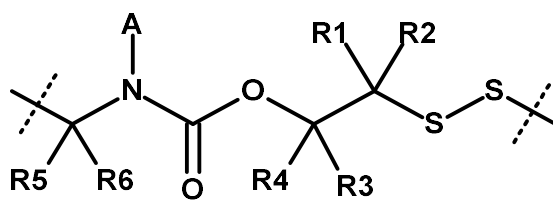
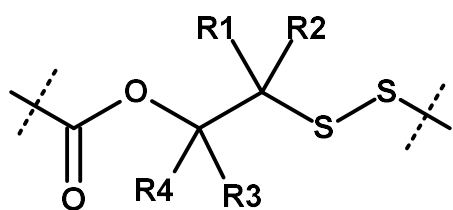




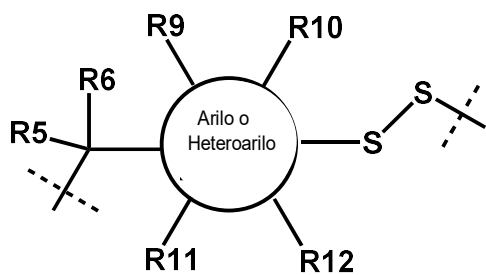


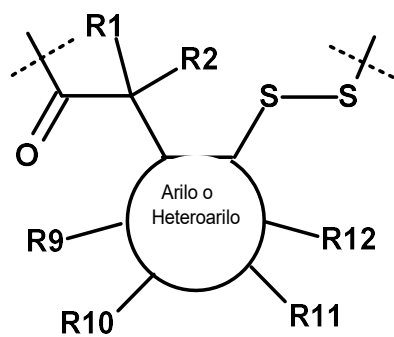
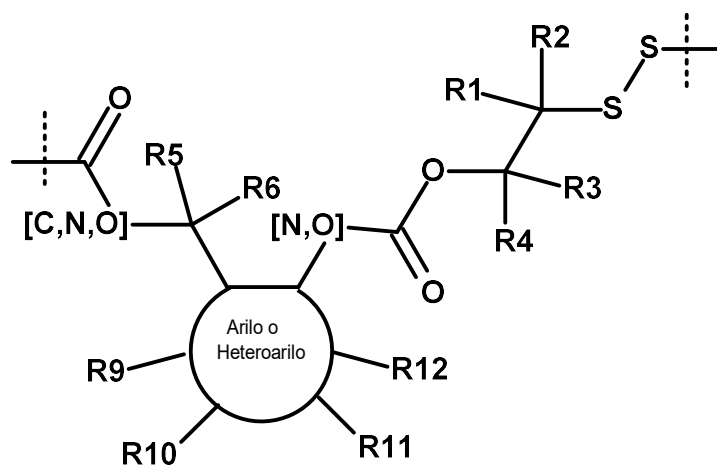
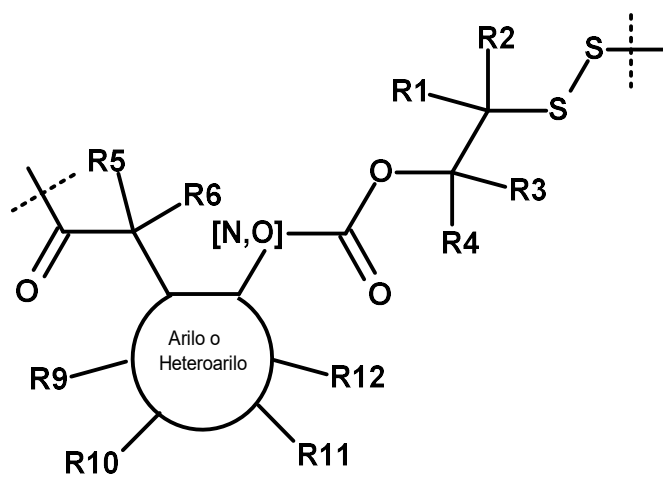


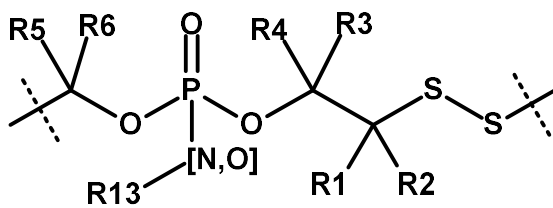
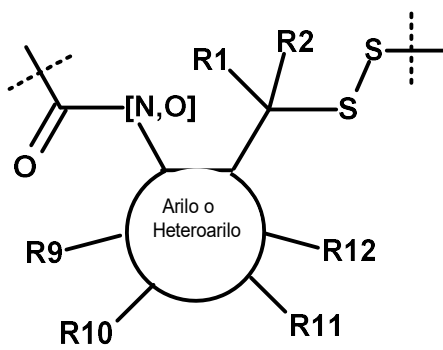
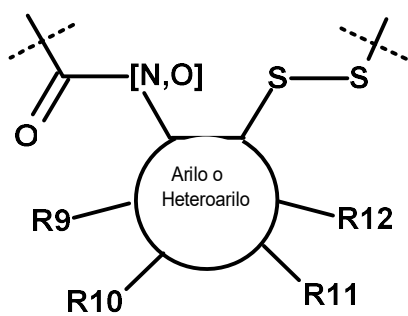
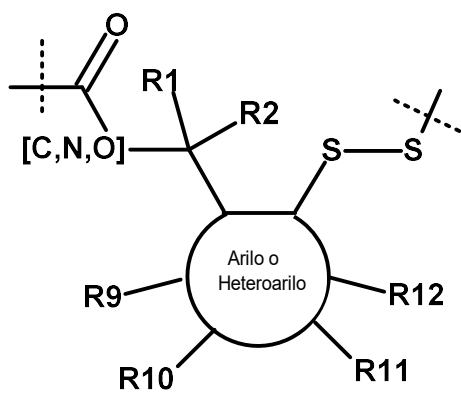
5 Q se selecciona a partir del grupo que consiste en

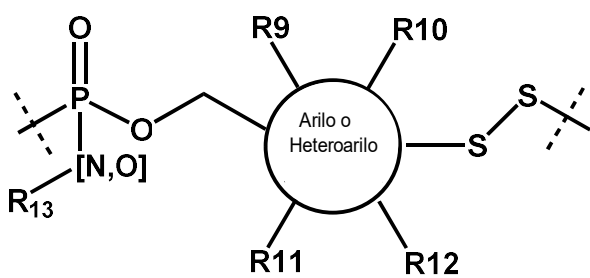
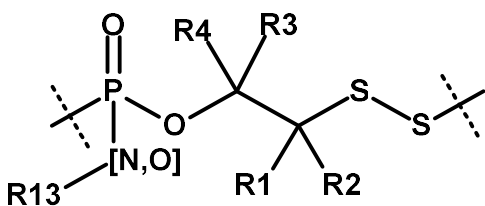
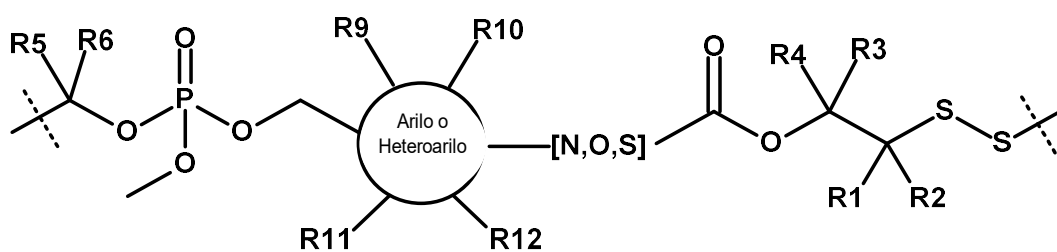
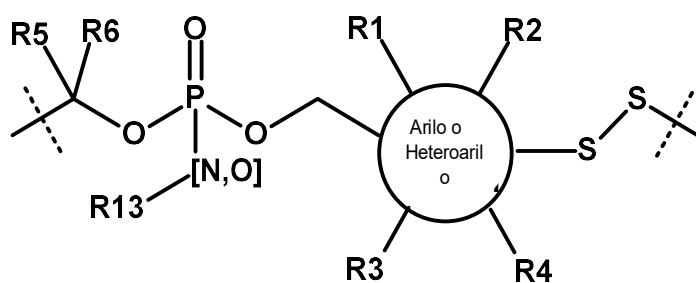


5



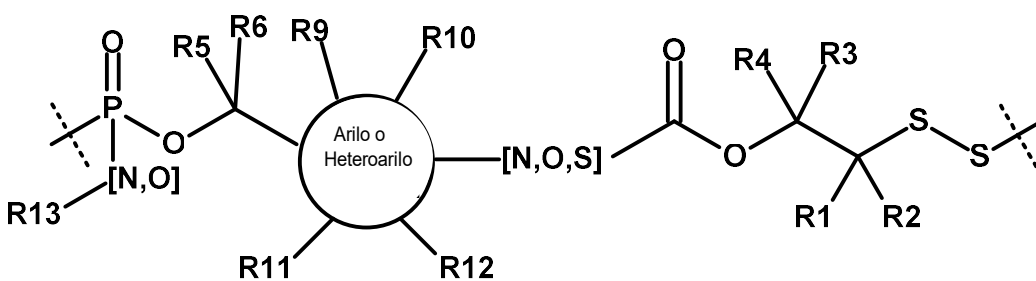






5

, y



;

R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁹, R¹⁰, R¹¹, y R¹² son cada uno seleccionados independientemente a partir

de H, alquilo C₁₋₄, alqueno 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}, en donde dicho alquilo C₁₋₄, alqueno C₁₋₄, arilo C₆₋₁₀, y heteroarilo de 5-10 miembros son cada uno opcionalmente sustituidos con 1, 2, o 3 sustituyentes seleccionados independientemente a partir 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};

o R¹ y R² junto con el átomo de carbono al cual se unen forman un grupo cicloalquilo C₃₋₇ opcionalmente sustituido con 1, 2, o 3 sustituyentes seleccionados independientemente a partir 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};

o R¹ y R³ junto con el átomo de carbono al cual se unen forman un grupo cicloalquilo C₃₋₇ opcionalmente sustituido con 1, 2, o 3 sustituyentes seleccionados independientemente a partir 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};

o R² y R³ junto con el átomo de carbono al cual se unen forman un grupo cicloalquilo C₃₋₇ opcionalmente sustituido con 1, 2, o 3 sustituyentes seleccionados independientemente a partir 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};

o R³ y R⁴ junto con el átomo de carbono al cual se unen forman un grupo cicloalquilo C₃₋₇ opcionalmente sustituido con 1, 2, o 3 sustituyentes seleccionados independientemente a partir 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};

o R⁵ y R⁶ junto con el átomo de carbono al cual se unen forman un grupo cicloalquilo C₃₋₇ opcionalmente sustituido con 1, 2, o 3 sustituyentes seleccionados independientemente a partir 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};

R¹³ es H o alquilo C₁₋₆;

A es H o alquilo C₁₋₄;

R^{a1}, R^{b1}, R^{c1}, y R^{d1} son cada uno seleccionados independientemente a partir de H, alquilo C₁₋₆, alqueno C₂₋₆, alquino C₂₋₆, haloalquilo C₁₋₆, OH, CN, NO₂, y CO₂CH₃; en donde dicho alquilo C₁₋₆ y alqueno C₂₋₆ son cada uno opcionalmente sustituidos con OH, CN, NO₂, o CO₂CH₃;



es anillo C_{6-10} 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, o 4 heteroátomos formadores de anillo seleccionados independientemente a partir de N, O, y S;

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

5 [N, O] es NH u O;

[C, N, O] es $CR^X R^Y$, NH, u O; y

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

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

10 En algunas modalidades, un átomo de azufre de la porción disulfuro de Q es parte de un residuo cisteína de R^7 .

Como se usa en la presente, "péptido" se refiere a una porción de objetivo que comprende una secuencia de 10-50 aminoácidos, integrada de residuos aminoácidos de origen natural y opcionalmente uno o más aminoácidos no de origen natural. En algunas modalidades, el péptido de R^7 es un péptido de 20 a 40, 20 a 30 aminoácidos, o 30 a 40 residuos. Los péptidos adecuados para

15 uso en los compuestos de la invención son aquellos que pueden insertarse a través de una membrana celular vía un cambio conformacional o un cambio en una estructura secundaria en respuesta a los cambios de pH ambientales. De esta manera, el péptido se puede dirigir al tejido ácido y translocar de manera selectiva las moléculas polares impermeables a células a través de membranas celulares en respuesta al bajo pH extracelular. En algunas modalidades, el péptido es

20 capaz de suministrar selectivamente una porción conjugada (por ejemplo, R^8Q^-) a través de una membrana celular que tiene un manto ácido o hipóxico que tiene un pH menor de aproximadamente 6.0. En algunas modalidades, el péptido es capaz de suministrar selectivamente una porción conjugada (por ejemplo, R^8Q^-) a través de una membrana celular que tiene un manto ácido o hipóxico que tiene un pH menor de aproximadamente 6.5. En algunas modalidades, el péptido es

25 capaz de suministrar selectivamente una porción conjugada (por ejemplo, R^8Q^-) a través de una membrana celular que tiene un manto ácido o hipóxico que tiene un pH menor de aproximadamente 5.5. En algunas modalidades, el péptido es capaz de suministrar selectivamente una porción conjugada (por ejemplo, R^8Q^-) a través de una membrana celular que tiene un manto ácido o hipóxico que tiene un pH entre aproximadamente 5.0 y aproximadamente 6.0.

30 En ciertas modalidades, el péptido de R^7 incluye un residuo cisteína que puede formar el sitio de unión a una porción de carga útil (por ejemplo, R^8Q^-) que se suministra a través de una membrana

celular. En algunas modalidades, R⁷ se une a Q mediante un residuo cisteína de R⁷. En algunas modalidades, el átomo de azufre del residuo cisteína puede formar parte del enlace de disulfuro del enlazador Q que contiene enlace de disulfuro.

Los péptidos adecuados, que pueden cambiar de manera conformacional con base en el pH e
 5 insertar a través de una membrana celular, se describen, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos 8,076,451 y 9,289,508 (cada una de las cuales se incorpora en la presente como referencia en su totalidad). Otros péptidos adecuados se describen, por ejemplo, en Weerakkody, *et al.*, PNAS 110 (15), 5834-5839 (abril 9, 2013), que también se incorpora en la presente como referencia en su totalidad.

10 En algunas modalidades, R⁷ es un péptido que comprende al menos una de las siguientes secuencias:

ADDQNPWRAYLDLLFPTDTLLLDLLWCG (SEQ ID NO. 1; Pv1),

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

ADDQNPWRAYLDLLFPTDTLLLDLLWDADECG (SEQ ID NO. 3; Pv3);

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

AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLDDLALLVDADEGTC (SEQ ID No. 5; Pv5);

en donde R⁷ se une a Q mediante un residuo cisteína de R⁷.

En algunas modalidades, R⁷ es un péptido que comprende al menos una de las siguientes secuencias:

20 ADDQNPWRAYLDLLFPTDTLLLDLLWCG (SEQ ID NO. 1; Pv1),

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

ADDQNPWRAYLDLLFPTDTLLLDLLWDADECG (SEQ ID NO. 3; Pv3),

en donde R⁷ se une a Q mediante un residuo cisteína de R⁷.

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

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

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

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

En algunas modalidades, R⁷ es un péptido que comprende la secuencia

AAEQNPYIWAYADWLFTTPLLDDLALLVDADEGTC (SEQ ID NO. 5; Pv5).

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

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

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

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

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

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

Tabla 1. Secuencias de R⁷ Adicionales

SEQ ID NO.	Secuencia
6	AAEQNPYIWAYADWLFTTPLLDDLALLVDADEGTCG
7	AEQNPIYWAYADWLFTTPLLDDLALLVDADEGT
8	GGEQNPIYWAYADWLFTTPLLDDLALLVDADEGT
9	AEQNPIYWAYADWLFTTPLLDDLALLVDADEGT
10	AAEQNPYIWAYADWLFTTPLLDDLALLVDADEGTCG
11	GGEQNPIYWAYADWLFTTPLLDDLALLVDADEGTCG
12	ACEQNPIYWAYADWLFTTPLLDDLALLVDADEGTG
13	ACEQNPIYWAYADWLFTTPLLDDLALLVDADEGT
14	AKEQNPIYWAYADWLFTTPLLDDLALLVDADEGT
15	AAEQNPYIWAYADWLFTTPLLDDLALLVDADEGTCG
16	AKEQNPIYWAYADWLFTTPLLDDLALLVDADECT

17	ACEQNPIYWARYANWLFTTPLLLLLNLALLVDADEGTG
18	ACEQNPIYWARYAKWLFTTPLLLLLKLALLVDADEGTG
19	GGEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLDLALLVNANQGT
20	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLALALLVDADEGT
21	AAEQNPIYWARYAAWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGT
22	AAEQNPIYWARYADWLFTTALLLLDLALLVDADEGT
23	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLELALLVDADEGT
24	AAEQNPIYWARYAEWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGT
25	AAEQNPIYWARYADWLFTDLPLLLLDLLALLVDADEGT
26	GEQNPIYWAQYADWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGTGCG
27	GGEQNPIYWARYADWLFTTPLLLDLLALLVDADEGTGCG
28	GGEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLDALLVDADEGTGCG
29	GGEQNPIYWARYDAWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGTGCG
30	GGEQNPIYWARYAWDLFTTPLLLLLDLALLVDADEGTGCG
31	AAEQNPIYWARYADWLFTTGLLLLDLALLVDADEGT
32	DDDEDNPIYWARYADWLFTTPLLLHLGALLVDADECT
33	DDDEDNPIYWARYAHLFTTPLLLHLGALLVDADEGCT
34	DDDEDNPIYWARYAHLFTTPLLLHLGALLVNADECT
35	DDDEDNPIYWARYAHLFTTPLLLHLGALLVNANECT
36	AEQNPIYWARYADFLFTTPLLLLLDLALLVDADET
37	AEQNPIYFARYADWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGT
38	AEQNPIYFARYADFLFTTPLLLLLDLALLWDADET
39	AKEDQNPYWARADWLFTTPLLLLLDLALLVDG

40	ACEDQNPYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDG
41	AEDQNPYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDCG
42	AEDQNPYWARYADWLFTTPLLLLELALLVECG
43	AKEDQNPYWRAYADLFTPLTLLDLLALWDG
44	ACEDQNPYWRAYADLFTPLTLLDLLALWDG
45	ACDDQNPWRAYLDLLFPTDTLLLDLLW
46	TEDADVLLALDLLLLPTTFLWD
47	AEQNPIYWARYADWLFTTPL
48	AEQNPIYWARYADWLFTTPCL
49	ACEQNPIYWARYADWLFTTPL
50	AEQNPIYFARYADWLFTTPL
51	KEDQNPWARYADLLFPTTLAW
52	ACEDQNPWARYADLLFPTTLAW
53	ACEDQNPWARYADWLFPTTLLLD
54	ACEEQNPWARYAELLFPTTLAW
55	ACEEQNPWARYAEWLFPTTLLLE
56	ACEEQNPWARYLEWLFPTETLLEL
57	GGEQNPIY WARYADWLFTTPLLLLDLALLV DADEGT
58	ACEQNPIY WARYADWLFTTPLLLLDLALLV
59	WARYADWLFTTPLLLLDLALLV DADEGTCG
60	WARYADWLFTTPLLLLDLALLV DADEGCT
61	GGEQNPIY WARYADWLFTTPLLLLDLALLV DADEGTCG
62	ACEQNPIY WARYADWLFTTPLLLLDLALLV DADEGT

63	AKEQNPIY WARYADWLFTTPLLLLDLALLV DADEGT
64	AKEQNPIY WARYADWLFTTPLLLLDLALLV DADECT
65	AAEQNPIY WARYADWLFTTALLLLDLALLV DADEGT
66	ACAEQNPIY WARYADWLFTTGLLLLDLALLV DADEGT
67	AEQNPIY WARYADFLFTTALLLLDLALLV DADE_T
68	AEQNPIY FARYADWLFTTPLLLLDLALLV DADEGT
69	AEQNPIY FARYADFLFTTPLLLLDLALLW DADE_T
70	AKEDQNP_Y WARYADWLFTTPLLLLDLALLV DG_____
71	ACEDQNP_Y WARYADWLFTTPLLLLDLALLV DG_____
72	AEDQNP_Y WARYADWLFTTPLLLLDLALLV DG_____
73	AEDQNP_Y WARYADWLFTTPLLLLELALLV ECG_____
74	AKEDQNP_Y WRAYAD_LFT_PLTLLDLLALW DG_____
75	ACEDQNP_Y WRAYAD_LFT_PLTLLDLLALW DG_____
76	AKEDQNDP_Y WARYADWLFTTPLLLLDLALLV G_____
77	TEDADVLLALDLLLLPTTFLWDAYRAWYPNQECA
78	GGEQNPIY WARYADWLFTTPLLLLDLALLV DADEGT
79	AEQNPIY WARYADWLFTTPL
80	AEQNPIY WARYADWLFTTPCL
81	ACEQNPIY WARYADWLFTTPL
82	ACEQNPIY FARYADWLFTTPL
83	ACDDQNP WRAYLDLLFPTDTLLLDLLW
84	ACEEQNP WRAYLELLFPTETLLLELLW
85	ACDDQNP WARYLDWLFTDTLLLDL

86	CDNNNP WRAYDLLFPTDTLLLDW
87	ACEEQNP WARYLEWLFPTETLLEL
88	ACEDQNP WARYADWLFPTTLLLLD
89	ACEEQNP WARYAEWLFPTTLLLE
90	ACEDQNP WARYADLLFPTTLAW
91	ACEDQNP WARYAELLFPTTLW
92	KEDQNP WARYADLLFPTTLW
93	DDDEDNP IYWARYAHWLFTTPLLLLHGALLVDADECT
94	DDDEDNPIYWARYAHWLFTTPLLLLDGALLVDADECT
95	DDDEDNPIYWARYAHWLFTTPLLLLHGALLVNADECT
96	DDDEDNPIYWARYAHWLFTTPLLLLHGALLVNANECT
97	DDDEDNPIYWARYADWLFTTPLLLLHGALLVDADECT
98	ACEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGIG
99	ACEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADET
100	ACEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGT
101	GGEQNPIYWARYADWLFTTPLLLDLLALLVDADEGTCG
102	GGEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDALLVDADEGTCG
103	GGEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCG
104	AAEQNPIYWARYAEWLFPTPLLLLDLALLVDADEGTCG
105	AAEQNPIYWARYAEWLFPTPLLLLELALLVDADEGTCG
106	GGEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCG
107	GGEQNPIYWAQYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCG
108	GGEQNPIYWAQDYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCG

109	AAEQNPIYWARYAAWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCG
110	ACEQNPIYWARYANWLFTTPLLLLNALLVDADEGTG
111	DDDEDNPIYWARYAHWLFTTPLLLHALLVNANECT
112	DDDEDNPIYWARYAHWLFTTPLLLHALLVNADECT
113	DDDEDNPIYWARYADWLFTTPLLLHALLVDADECT
114	DDDEDNPIYWARYAHWLFTTPLLLHALLVDADECT
115	DDDEDNPIYWARYAHWLFTTPLLLLDGALLVDADECT
116	GGEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVNANQGT
117	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLELALLVDADEGTCG
118	AAEQNPIYWARYAEWLFTTPLLLELALLVDADEGTCG
119	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLELALLVDADEGTKCG
120	GGEQNPIYWAQYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCG
121	GGEQNPIYWAQYDAWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCG
122	GGEQNPIYWAQDYAWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCG
123	GGEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDALLVNANQGT
124	DDDEDNPIYWARYAHWLFTTPLLLHALLVNADECT
125	DDDEDNPIYWARYAHWLFTTPLLLHALLVNANECT
126	ACEQNPIYWARYAKWLFTTPLLLKLALLVDADEGTG
127	GGEQNPIYWAQDYAWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCG
128	GGEQNPIYWAQYDAWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCG
129	GGEQNPIYWAQYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCG
130	AAEQNPIYWARYAAWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCG
131	AAEQNPIYWARYADWLFTDLPLLLDLLALLVDADEGT

132	GGEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLDALLVDADEGTCG
133	GGEQNPIYWARYADWLFTTPLLLDLLALLVDADEGTCG
134	AAEQNPIYWARYADWLFTTGLLLLDLALLVDADEGT
135	AEQNPIYWARYAAWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGTCG
136	GGEQNPIYWAQYDAWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGTCG
137	GGEQNPIYWAQDYAWLFTTPLLLLLDLALLDADEGTCG
138	GGEQNPIYWARYDAWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGTCG
139	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLALALLVDADEGTCG
140	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGTCGEGTK(rodamina)C(faloidina)G
141	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLELALLDADEGTCG
142	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGTCG
143	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGTC(faloidina)G
144	GGEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGTCG
145	ACEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLDLALLVDADET
146	ACEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGTG
147	ACEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGT
148	GGEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLDLALLVNANQGT
149	DDDEDNPIYWARYAHLFTTPLLLHALLVNADECT
150	DDDEDNPIYWARYAHLFTTPLLLHALLVNANECT
151	GGEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGTCG
152	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGTC(faloidina)G
153	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLELALLVDADEGTCG

154	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTKCG
155	DDDEDNPIYWARYAHLFTTPLLLLBGALLVDADECT
156	DDDEDNPIYWARYAHLFTTPLLLLDGALLVDADECT
157	DDDEDNPIYWARYAHLFTTPLLLLBGALLVNADECT
158	DDDEDNPIYWARYAHLFTTPLLLLBGALLVNANECT
159	DDDEDNPIYWARYADWLFTTPLLLLIBGALLVDADECT
160	DDDEDNPIYWARYADWTFPTPLLLHALLVDADECT
161	DDDEDNPIYWARYAHLFTTPLLLLDGALLVDADECT
162	DDDEDNPIYWARYAHLFTTPLLLHALLVDADECT
163	DDDEDNPIYWARYAHLFTTPLLLHALLVNADECT
164	DDDEDNPIYWARYHWFPTPLLLHALLVNANECT
165	DDDEDNPIYWARYAHLFTTPLLLHALLVNANECT
166	DDDEDNPIYWARYAHLFTTPLLLHALLVNADECT
167	DDDEDNPIYWARYADWLFTTPLLLHALLVDADECT
168	DDDEDNPIYWARYAHLFTTPLLLHALLVDADECT
169	DDDEDNPIYWARYAHLFTTPLLLDGALLVDADECT
170	GGEQNPIYWARYADWLFTTPLLLDLALLVNANQGT
171	DDDEDNPIYWARYAHLFTTPLLLHALLVNADECT
172	DDDEDNPIYWARYADWLFTTPLLLHALLVDADECT
173	DDDEDNPIYWARYAHLFTTPLLLHALLVDADECT
174	DDDEDNPIYWARYAHLFTTPLLLDGALLVDADECT
175	DDDEDNPIYWARYAHLFTTPLLLHALLVNANECT
176	DDDEDNPIYWARYAHLFTTPLLLDGALLVDADECT

177	DDDEDNPIYWARYADWLFTTPLLLLHGALLVDADECT
178	DDDEDNPIYWARYAHWLFTTPLLLLHGALLVDADECT
179	DDDEDNPIYWARYAHWLFTTPLLLLHGALLVNADECT
180	DDDEDNPIYWARYAHWLFTTPLLLLHGALLVNANECT
181	AAEQNPIYWARYADWLFTTGLLLLDLALLVDADEGT
182	GGEQNPIYWARYAWDLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCG
183	GGEQNPIYWARYDAWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCG
184	GGEQNPIYWAQYDAWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCG
185	GGEQNPIYWAQDYAWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCG
186	AAEQNPIYWARYAAWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCG
187	GGEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDALLVDADEGTCG
188	GGEQNPIYWARYADWLFTTPLLLDLLALLVDADEGTCG
189	GGEQNPIYWARYADWLFTTPLLLDLLALLVDADEGTCG
190	GGEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLDALLVDADEGTCG
191	GGEQNPIYWAQYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCG
192	GGEQNPIYWAQYDAWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCG
193	GGEQNPIYWAQDYAWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCG
194	GGEQNPIYWAQYDAWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCG
195	GGEQNPIYWAQDYAWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCG
196	GGEQNPIYWAQYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCG
197	AAEQNPIYWARYAAWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCG
198	GGEQNPIYWAQDYAWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCG
199	GGEQNPIYWAQYDAWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCG

200	GGEQNPIYWAQYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCG
201	AAEQNPIYWARYAAWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCG
202	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLELALLVDADEGTKCG
203	EGTK(ridamina)C(faloidina)G
204	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTKCG
205	ACEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTG
206	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTC(faloidina)G
207	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTKCG
208	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLELALLVDADEGTKCG
209	AAEQNPIYWARYADWLFTDLPLLLLDLALLVDADEGT
210	AAEQNPIYWARYAAWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCG
211	GGEQNPIYWAQYDAWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCG
212	GGEQNPIYWAQDYAWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCG
213	GGEQNPIYWARYDAWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCG
214	AAEQNPIYWARYAEWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCG
215	AAEQNPIYWARYAEWLFTTPLLLLELALLVDADEGTCG
216	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLALALLVDADEGTCG
217	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLELALLVDADEGTCG
218	AAEQNPIYWARYAEWLFTTPLLLLELALLVDADEGTCG
219	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLELALLVDADEGTKCG
220	ACEQNPIYWARYAKWLFTTPLLLKLALLVDADEGTG
221	ACEQNPIYWARYANWLFTTPLLLNLALLVDADEGTG
222	AAEQNPIYWARYADWLFTTALLLDLALLVDADEGT

223	AEQNPIYFARYADLLFPTTLAW
224	AEQNPIYWARYADLLFPTTLAF
225	AEQNPIYWARYADLLFPTTLAW
226	ACEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADET
227	GGEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGT
228	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTGCG
229	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTKCG
230	AKEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADECT
231	CCTCTTACCTCAGTTACA
232	D-Arg8 D-Arg8-CCTCTTACCTCAGTTACA
233	D-Lys4 D-Lys4-CCTCTTACCTCAGTTACA
234	S-S-CCTCTTACCTCAGTTACA
235	S-S-CCTCTGACCTCATTACA
236	D-Arg8-Deca D-Arg8-Deca-CCTCTTACCTCAGTTACA
237	D-Arg8-Deca-mal apareamiento D-Arg8-Deca-CCTCTGACCTCATTACA
238	S-S-CCTCTTACCTCAGTTACA
239	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTGCG
240	AEDQNPYWARYDWLFTTPLLLLDLALLVDCG
241	AEDQNPYWARYADWLFTTPLLLLELALLVECG
242	AEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGCT
243	ACEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADET
244	AE-QN-PI YWARYADWLFTTPLLLLDLALLV DADEGT-COOH
245	AEDQN-P- YWARYADWLFTTPLLLLDLALLV D---G--COOH

246	AEDQNDP-YWARYADWLFTTPLLLLDLALLV----G--COOH
247	AEQNPI YWARYADFLFTTPLLLLDLALLV DADET-COOH
248	AEQNPI YFARYADWLFTTPLLLLDLALLV DADET-COOH
249	AEQNPI YFARYADFLFTTPLLLLDLALLW DADET-COOH
250	AE-QN-PI YWARYADWLFTTPLLLLDLALLV DADEGCT-COOH
251	AEDQN-PI YWARYADWLFTTPLLLLDLALLV DC--G-T-COOH
252	AEDQNDPI YWARYADWLFTTPLLLLELALLV EC--G-T-COOH
253	Quelato-ACEEQNPWARYLEWLFPTETLLEL
254	AEQNPIY WARYADWLFTTPLLLLDLALLV DADEGT-COOH
255	AKEDQNPY WARYADWLFTTPLLLLDLALLV DG-COOH
256	AKEDQNDPY WARYADWLFTTPLLLLDLALLV G-COOH
257	AEQNPI YWARYADWLFTTPLLLLDLALLV DADEGC-Biotina-T-COO H
258	AEDQNP YWARYADWLFTTPLLLLDLALLV DC-Biotina-G-COOH
259	AEDQNP YWARYADWLFTTPLLLLELALLV EC-Biotina-G-COOH
260	ACEQNPIY WARYADWLFTTPLLLLDLALLV DADEGT
261	ACEDQNPY WARYADWLFTTPLLLLDLALLV DG
262	ACEDQNPY WRAYADLFTPLTLLDLLALW DG
263	ACDDQNP WRAYDLLFPTDTLLLDLLW
264	WRAYLELLFPTETLLELLW
265	WARYLDWLFPTDTLLLDL
266	WRAYDLLFPTDTLLLDW
267	WARYLEWLFPTETLLEL
268	WAQYLELLFPTETLLEW

269	WRAYLELLFPTETLLLEW
270	WARYADWLFPTTLLLLD
271	WARYAEWLFPTTLLLLE
272	ACEDQNP WARYADLLFPTTLAW
273	ACEEQNP WARYAELLFPTTLAW
274	Ac-TEDAD VLLALDLLLLPTTFLWDAYRAW YPNQECA-Am
275	CDDDDDNPNY WARYANWLFTTPLLNGALLV EAEET
276	CDDDDDNPNY WARYAPWLFTTPLLPGALLV EAEET
277	Ac-AEQNPY WARYADWLFTTPLLDDLALLVDADEGCT
278	Ac-AKEQNPY WARYADWLFTTPLLDDLALLVDADEGTG
279	ACEQNPY WARYANWLFTTPLLNLALLVDADEGT
280	Ac-AAEQNPY WARYADWLFTTPLLLELALLVDADEGTKCG
281	DDDEDNPIY WARYADWLFTTPLLHALLVDADET
282	CDDDEDNPIY WARYAHLFTTPLLHALLVDADET
283	DDDEDNPIY WARYAHLFTTPLLHALLVDADEGT
284	DDDEDNPIY WARYAHLFTTPLLHALLVNADEGT
285	DDDEDNPIY WARYAHLFTTPLLHALLVNANEGT
286	AKEDQNDPY WARYADWLFTTPLLDDLALLVG
287	AEDQNPY WARYADWLFTTPLLLELALLVCG
288	AKDDQNPWRAYLDLLFPTDTLLLDLLWC
289	ACEEQNPWRAYLELLFPTETLLLELLW
290	ACDDQNPWARYLDWLFPTDTLLLDL
291	CDNNNPWRAYLDLLFPTDTLLLDW

292	CEEQQPWAQYLELLFPTETLLEW
293	EEQQPWRAYLELLFPTETLLEW
294	CDDDDNPNYWARYANWLFTTPLLLLNGALLVEAEET
295	CDDDDNPNYWARYAPWLFTTPLLLPGALLVEAEE
296	AEQNPIYFARYADLLFPTTLAW
297	AEQNPIYWARYADLLFPTTLAF
298	AEQNPIYWARYADLLFPTTLAW
299	KEDQNPWARYADLLFPTTLW
300	ACEEQNPQAEYAEWLFTPTLLLE
301	AAEEQNPWARYLEWLFTPTETLLEL
302	AKEEQNPWARYLEWLFTPTETLLEL
303	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTGG
304	XXEXNPIYWAXXXXLFTXXLLXXXALLVXAXXTXG
305	DAAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLLALLVDADEGTKGG
306	GGEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTGG
307	XXEXNPIYWAXXXXLFTXXLLXXXALLVXAXXTGG
308	DGGEQNDPIYWARYADWLFTTPLLLLDLLALLVDADEGCTXGG
309	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCG
310	AEDQNPYWARYDWLFTTPLLLLDLALLVDCG
311	GLAGLAGLLGLEGLLGLPLGLLEGLWLGLELEGN

Cualquiera de los péptidos citados útiles en la presente invención se puede modificar para incluir un residuo cisteína reemplazando un residuo no cisteína con cisteína, o anexando un residuo cisteína ya sea al extremo N-terminal o extremo C-terminal.

En algunas modalidades, el péptido de R^7 es un péptido conformacionalmente restringido. Un péptido conformacionalmente restringido puede incluir, por ejemplo, péptidos macrocíclicos y péptidos grapado. Un péptido grapado es un péptido restringido por un enlace covalente entre dos cadenas laterales de aminoácidos, formando un péptido macrociclo. Los péptidos conformacionalmente restringidos se describen, por ejemplo, en Guerlavais et al., Annual Reports in Medicinal Chemistry 2014, 49, 331-345; Chang et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States de America (2013), 110(36), E3445-E3454; Tesauro et al., Molecules 2019, 24, 351-377; Dougherty et al., Journal of Medicinal Chemistry (2019), 62(22), 10098-10107; y Dougherty et al., Chemical Reviews (2019), 119(17), 10241-10287, cada una de las cuales se incorpora en la presente como referencia en su totalidad.

El término “porción dirigida a topoisomerasa I de molécula pequeña” o “inhibidor de topoisomerasa I” se refiere a un grupo químico que se une a la topoisomerasa I. La porción dirigida a topoisomerasa I de molécula pequeña puede ser un grupo derivado de un compuesto que inhibe la actividad de la topoisomerasa I. Los inhibidores de topoisomerasa incluyen camptotecina y derivados y análogos de la misma tales como opotecán, irinotecán (CPT-11), silatecán (DB-67, AR-67), cositecán (BNP-1350), lurtotecán, gimitecán (ST1481), belotecán (CKD-602), rubitecán, topotecán, deruxtecán, y exatecán. Los inhibidores de topoisomerasa se describen en, por ejemplo, Ogitan, Bioorg. Med. Chem. Lett. 26 (2016), 5069-5072; Kumazawa, E., Cancer Chemother Pharmacol 1998, 42: 210-220; Tahara, M, Mol Cancer Ther 2014, 13(5): 1170-1180; Nakada, T., Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 2016, 26: 1542-1545.

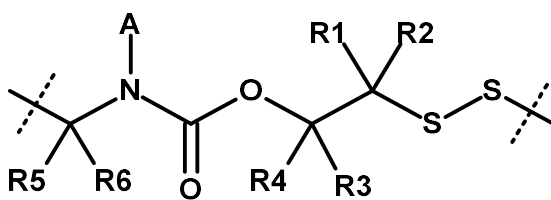
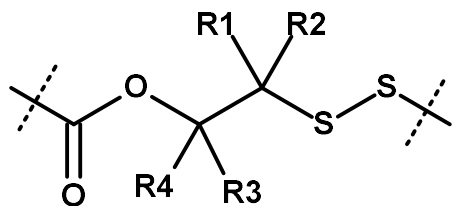
La porción Q es un grupo enlazante, que conecta covalentemente R^7 y R^8 que sirve como una atadura entre el péptido e inhibidor de topoisomerasa I que se puede escindir cuando el conjugado o porción del mismo está dentro de una célula. En algunas modalidades, Q es una cadena 1 a 40, 1 a 30, 1 a 25, 1 a 20, 1 a 15, 1 a 10, o 1 a 5 átomos en la cadena, que es opcionalmente sustituido con sustituyentes 1-10 R^q , y en donde uno o más átomos de carbono de Q se puede oxidar para formar un carbonilo ($C=O$), y en donde uno o más átomos de N y S en la cadena pueden ser cada uno opcionalmente oxidado para formar un grupo óxido de amina, sulfóxido o sulfonilo; en donde

cada R^q se selecciona independientemente a partir de OH, CN, $-COOH$, NH_2 , halo, haloalquilo C_{1-6} , alquilo C_{1-6} , alcoxi C_{1-6} , haloalcoxi C_{1-6} , alquiltio C_{1-6} , fenilo, heteroarilo de 5-6 miembros, heterocicloalquilo de 4-6 miembros, cicloalquilo C_{3-6} , $NH(alquilo C_{1-6})$ y $N(alquilo C_{1-6})_2$, en donde el alquilo C_{1-6} , fenilo, cicloalquilo C_{3-6} , heterocicloalquilo de 4-6 miembros, y heteroarilo de 5-6 miembros de R^q son cada uno opcionalmente sustituidos con halo, OH, CN, $-COOH$, NH_2 , alquilo C_{1-4} , alcoxi C_{1-4} , haloalquilo C_{1-4} , haloalcoxi C_{1-4} , fenilo, cicloalquilo C_{3-10} , heteroarilo de 5 o 6 miembros o heterocicloalquilo de 4-6 miembros; y

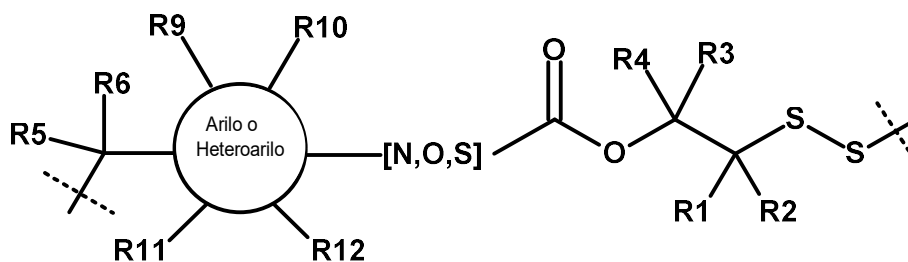
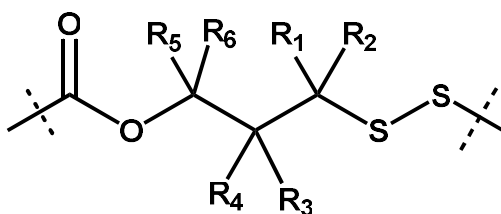
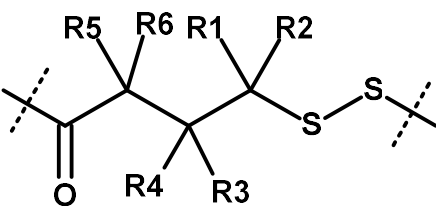
dos grupos R^q junto con los átomos en la cadena a los cuales se unen pueden formar un fenilo, heteroarilo de 5-6 miembros, heterocicloalquilo de 4-6 miembros, o anillo cicloalquilo C_{3-6} .

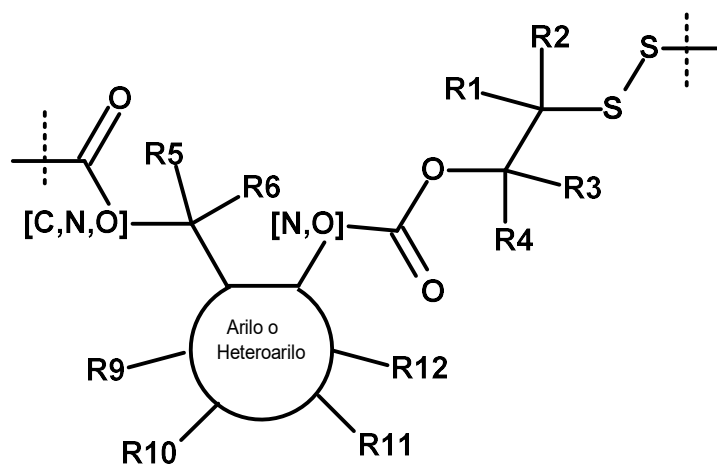
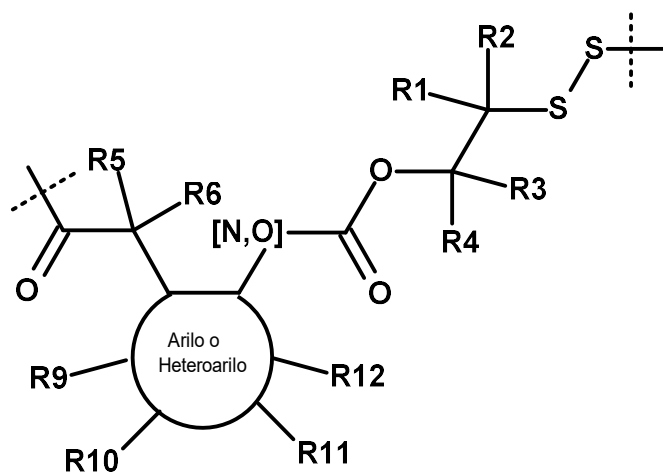
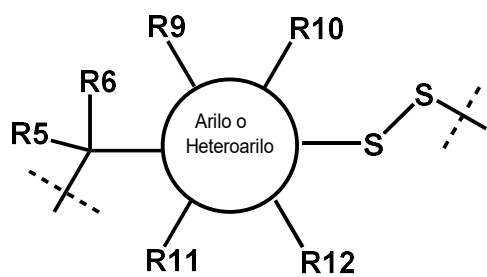
En algunas modalidades, R^q se selecciona independientemente a partir de OH, CN, -COOH, NH₂, halo, haloalquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆, haloalcoxi C₁₋₆, NH(alquilo C₁₋₆) y N(alquilo C₁₋₆)₂.

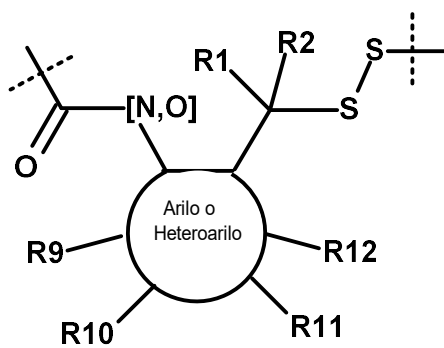
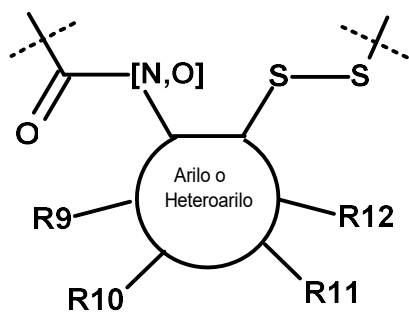
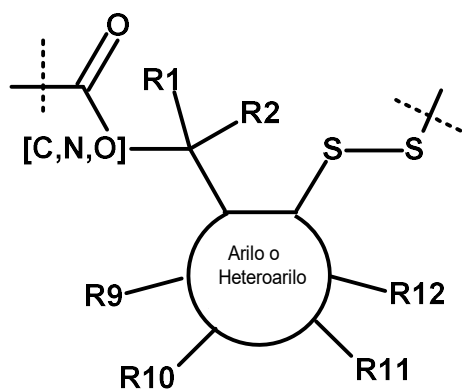
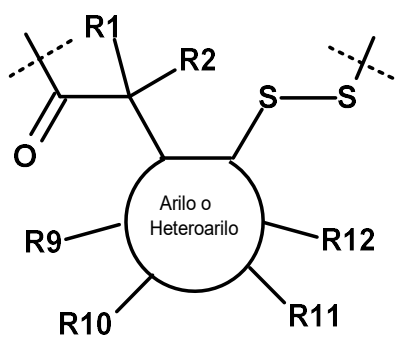
En algunas modalidades, Q se selecciona a partir de:

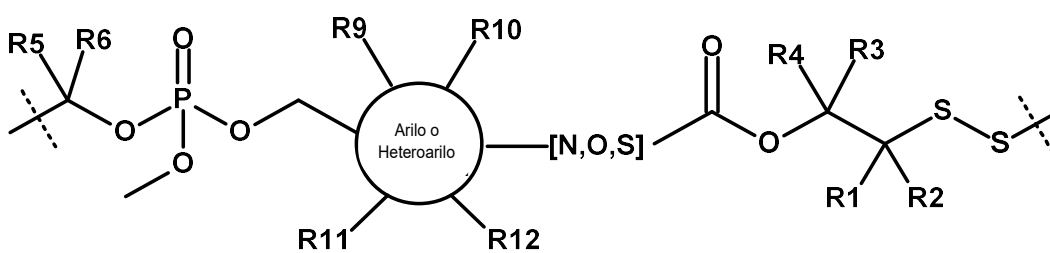
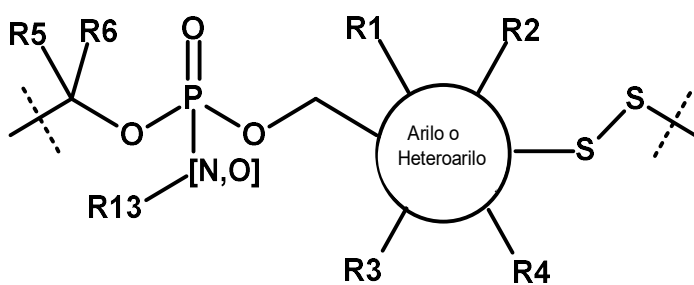
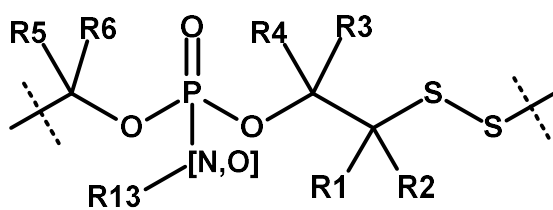


5

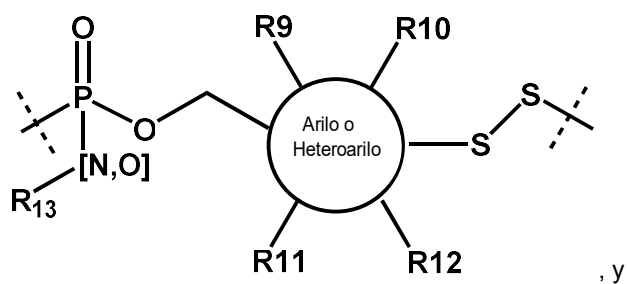
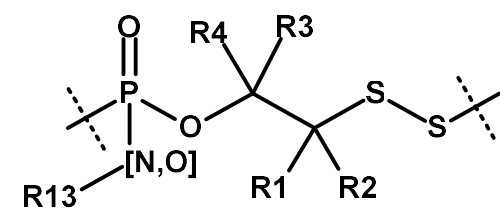




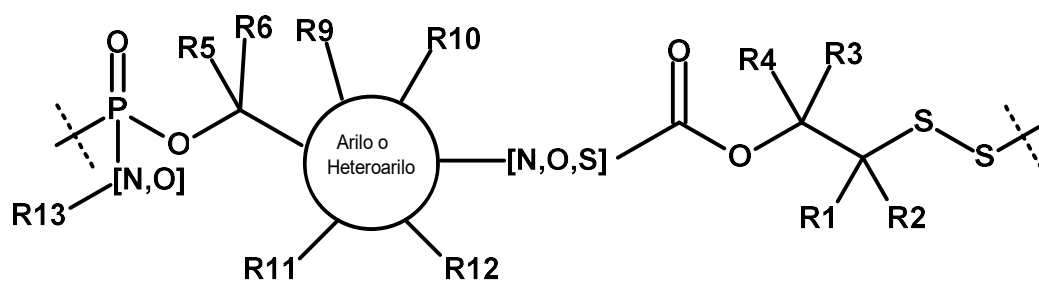




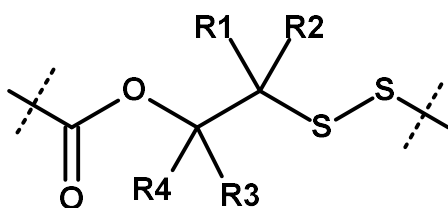
5



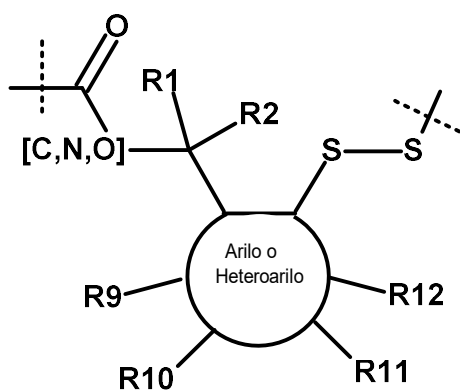
, y



En algunas modalidades, Q es:

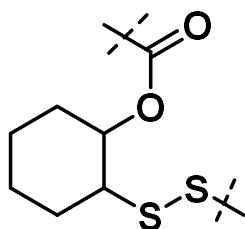


En algunas modalidades, Q es:

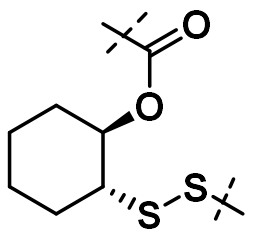


5

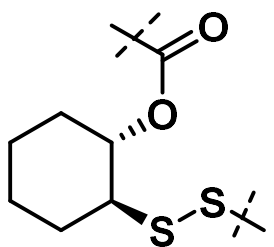
En algunas modalidades, Q es:



En algunas modalidades, Q es:



En algunas modalidades, Q es:



En algunas modalidades:

- 5 R^1 , R^2 , R^3 , y R^4 son cada uno seleccionados independientemente a partir de H y alquilo C_{1-4} , halo, CN, 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 $NR^{c1}C(O)NR^{c1}R^{d1}$, en donde dicho alquilo C_{1-4} es opcionalmente sustituido con 1, 2, o 3 sustituyentes seleccionados independientemente a partir de halo, CN, NO_2 , 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 R^1 y R^2 junto con el átomo de carbono al cual se unen forman un grupo cicloalquilo C_{3-10} o grupo heterocicloalquilo de 4-10 miembros, cada uno opcionalmente sustituido con 1, 2, o 3 sustituyentes seleccionados independientemente a partir de halo, CN, NO_2 , 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 $NR^{c1}C(O)NR^{c1}R^{d1}$;

- 15 o R^1 y R^3 junto con el átomo de carbono al cual se unen forman un grupo cicloalquilo C_{3-10} o grupo heterocicloalquilo de 4-10 miembros, cada uno opcionalmente sustituido con 1, 2, o 3 sustituyentes seleccionados independientemente a partir de halo, CN, NO_2 , 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 $NR^{c1}C(O)NR^{c1}R^{d1}$;

- 20 o R^1 y R^4 junto con el átomo de carbono al cual se unen forman un grupo cicloalquilo C_{3-10} o grupo heterocicloalquilo de 4-10 miembros, cada uno opcionalmente sustituido con 1, 2, o 3 sustituyentes seleccionados independientemente a partir de halo, CN, NO_2 , 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 $NR^{c1}C(O)NR^{c1}R^{d1}$;

o R^2 y R^3 junto con el átomo de carbono al cual se unen forman un grupo cicloalquilo C_{3-10} o grupo heterocicloalquilo de 4-10 miembros, cada uno opcionalmente sustituido con 1, 2, o 3 sustituyentes

seleccionados independientemente a partir 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};

o R² y R⁴ junto con el átomo de carbono al cual se unen forman un grupo cicloalquilo C₃₋₁₀ o grupo heterocicloalquilo de 4-10 miembros, cada uno opcionalmente sustituido con 1, 2, o 3 sustituyentes seleccionados independientemente a partir 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};

o R³ y R⁴ junto con el átomo de carbono al cual se unen forman un grupo cicloalquilo C₃₋₁₀ o grupo heterocicloalquilo de 4-10 miembros, cada uno opcionalmente sustituido con 1, 2, o 3 sustituyentes seleccionados independientemente a partir 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}.

En algunas modalidades:

R¹, R², R³, y R⁴ son cada uno seleccionados independientemente a partir de H y alquilo C₁₋₄;

o R¹ y R² junto con el átomo de carbono al cual se unen forman un grupo cicloalquilo C₃₋₁₀ o grupo heterocicloalquilo de 4-10 miembros, cada uno opcionalmente sustituido con 1, 2, o 3 sustituyentes seleccionados independientemente a partir 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};

o R¹ y R³ junto con el átomo de carbono al cual se unen forman un grupo cicloalquilo C₃₋₁₀ o grupo heterocicloalquilo de 4-10 miembros, cada uno opcionalmente sustituido con 1, 2, o 3 sustituyentes seleccionados independientemente a partir 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};

o R³ y R⁴ junto con el átomo de carbono al cual se unen forman un grupo cicloalquilo C₃₋₁₀ o grupo heterocicloalquilo de 4-10 miembros, cada uno opcionalmente sustituido con 1, 2, o 3 sustituyentes seleccionados independientemente a partir 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}.

En algunas modalidades, R¹ y R² son cada uno seleccionados independientemente a partir de H y metilo, y R³, R⁴, R⁵, y R⁶ son cada uno hidrógeno.

En algunas modalidades, R¹, R², R³, y R⁴ son cada uno seleccionados independientemente a partir de H y metilo, y R⁵, y R⁶ son cada uno hidrógeno.

En algunas modalidades, R¹ y R² son cada uno seleccionados independientemente a partir de H y metilo.

En algunas modalidades, R³ y R⁴ son cada uno seleccionados independientemente a partir de H y metilo.

En algunas modalidades, R¹ y R² son cada uno H.

En algunas modalidades, R¹ y R² junto con el átomo de carbono al cual se unen forman un grupo cicloalquilo C₃₋₇ opcionalmente sustituido con 1, 2, o 3 sustituyentes seleccionados

independientemente a partir 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}.

En algunas modalidades, R¹ y R² junto con el átomo de carbono al cual se unen forman un grupo cicloalquilo C₃₋₇.

- 5 En algunas modalidades, R¹ y R² junto con el átomo de carbono al cual se unen forman un grupo ciclobutilo.

En algunas modalidades, R³ y R⁴ son cada uno H.

En algunas modalidades, R¹ y R³ junto con el átomo de carbono al cual se unen forman un grupo cicloalquilo C₃₋₇ opcionalmente sustituido con 1, 2, o 3 sustituyentes seleccionados

- 10 independientemente a partir 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}.

En algunas modalidades, R¹ y R³ junto con el átomo de carbono al cual se unen forman un ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, 1,2,3,4-tetrahidronaftilo, tetrahidrofuranilo, o tetrahidropiranilo.

En algunas modalidades, R¹ y R³ junto con el átomo de carbono al cual se unen forman un grupo cicloalquilo C₃₋₇.

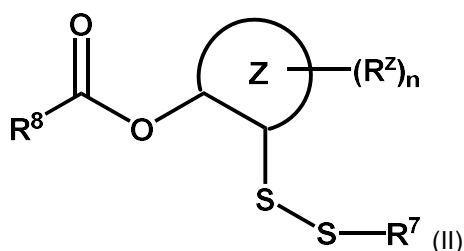
- 15 En algunas modalidades, R¹ y R³ junto con el átomo de carbono al cual se unen forman un grupo ciclohexilo.

En algunas modalidades, R² y R⁴ son cada uno H.

En algunas modalidades, R⁵ y R⁶ son cada uno H.

- 20 En algunas modalidades, R⁹, R¹⁰, R¹¹, y R¹² son cada uno seleccionados independientemente a partir de H y metilo.

En algunas modalidades, el compuesto de la invención es un compuesto de Fórmula (II):



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

- 25 R⁷ es un péptido;

R⁸ es un inhibidor de topoisomerasa I;

Ring Z es un anillo cicloalquilo C₅₋₇ monocíclico o un anillo heterocicloalquilo de 5-7 miembros monocíclico;

cada R² se selecciona independientemente a partir de alquilo C₁₋₄, halo, CN, NO₂, OR^{a1}, SR^{a1},

- 30 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},

$\text{NR}^{\text{c1}}\text{C}(\text{O})\text{OR}^{\text{a1}}$, y $\text{NR}^{\text{c1}}\text{C}(\text{O})\text{NR}^{\text{c1}}\text{R}^{\text{d1}}$;

o dos R^{Z} adyacentes junto con los átomos a los cuales se unen forman un anillo cicloalquilo C_{5-7} monocíclico fusionado, un anillo heterocicloalquilo de 5-7 miembros monocíclico fusionado, un anillo arilo C_{6-10} fusionado, o un anillo heteroarilo de 6-10 miembros fusionado, cada uno de los cuales es
 5 opcionalmente sustituido con 1, 2, o 3 sustituyentes seleccionados independientemente a partir de alquilo C_{1-4} , halo, CN, NO_2 , OR^{a1} , SR^{a1} , $\text{C}(\text{O})\text{R}^{\text{b1}}$, $\text{C}(\text{O})\text{NR}^{\text{c1}}\text{R}^{\text{d1}}$, $\text{C}(\text{O})\text{OR}^{\text{a1}}$, $\text{OC}(\text{O})\text{R}^{\text{b1}}$, $\text{OC}(\text{O})\text{NR}^{\text{c1}}\text{R}^{\text{d1}}$, $\text{NR}^{\text{c1}}\text{R}^{\text{d1}}$, $\text{NR}^{\text{c1}}\text{C}(\text{O})\text{R}^{\text{b1}}$, $\text{NR}^{\text{c1}}\text{C}(\text{O})\text{OR}^{\text{a1}}$, y $\text{NR}^{\text{c1}}\text{C}(\text{O})\text{NR}^{\text{c1}}\text{R}^{\text{d1}}$;

R^{a1} , R^{b1} , R^{c1} , y R^{d1} son cada uno seleccionados independientemente a partir de H, alquilo C_{1-4} , alquenilo C_{2-4} , alquínilo C_{2-4} , cada uno opcionalmente sustituido con 1, 2, o 3 sustituyentes
 10 seleccionados independientemente a partir de halo, OH, CN, y NO_2 ; y

n es 0, 1, 2, o 3.

En algunas modalidades de los compuestos de Fórmula (II), R^7 es un péptido que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, o SEQ ID NO:5.

En algunas modalidades de los compuestos de Fórmula (II), R^7 es Pv1, Pv2, Pv3, Pv4, o Pv5.

15 En algunas modalidades de los compuestos de Fórmula (II), R^7 se une al núcleo vía un residuo cisteína de R^7 en donde uno de los átomos de azufre de la porción de disulfuro en la Fórmula II se deriva del residuo cisteína.

En algunas modalidades de los compuestos de Fórmula (II), R^8 es camptotecina, opotecán, irinotecán (CPT-11), silatecán (DB-67, AR-67), cositecán (BNP-1350), lurtotecán, gimatacán
 20 (ST1481), belotecán (CKD-602), rubitecán, topotecán, deruxtecán, o exatecán.

En algunas modalidades de los compuestos de Fórmula (II), R^8 es exatecán.

En algunas modalidades de los compuestos de Fórmula (II), R^8 se une al núcleo a través de un átomo de N.

En algunas modalidades de los compuestos de Fórmula (II), el Anillo Z es un anillo cicloalquilo C_{5-7} monocíclico.
 25

En algunas modalidades de los compuestos de Fórmula (II), el Anillo Z es un anillo ciclopentilo.

En algunas modalidades de los compuestos de Fórmula (II), el Anillo Z es un anillo ciclohexilo.

En algunas modalidades de los compuestos de Fórmula (II), el Anillo Z es un anillo cicloheptilo.

En algunas modalidades de los compuestos de Fórmula (II), el Anillo Z es un anillo heterocicloalquilo de 5-7 miembros monocíclico.
 30

En algunas modalidades de los compuestos de Fórmula (II), el Anillo Z es un anillo heterocicloalquilo de 5 miembros.

En algunas modalidades de los compuestos de Fórmula (II), el Anillo Z es un anillo heterocicloalquilo de 6 miembros.

- 5 En algunas modalidades de los compuestos de Fórmula (II), el Anillo Z es un anillo heterocicloalquilo de 7 miembros.

- En algunas modalidades de los compuestos de Fórmula (II), dos R^Z adyacentes junto con los átomos a los cuales se unen forman un anillo cicloalquilo C_{5-7} monocíclico fusionado, un anillo heterocicloalquilo de 5-7 miembros monocíclico fusionado, un anillo arilo C_{6-10} fusionado, o un anillo heteroarilo de 6-10 miembros fusionado, cada uno de los cuales es opcionalmente sustituido con 1, 2, o 3 sustituyentes seleccionados independientemente a partir de alquilo C_{1-4} , halo, CN, NO_2 , 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

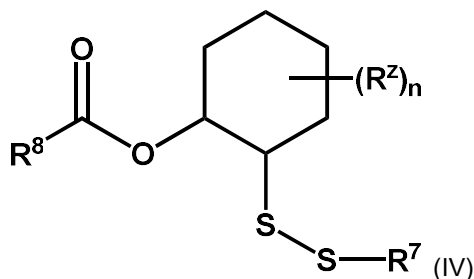
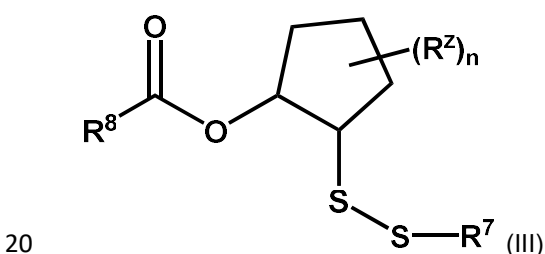
En algunas modalidades de los compuestos de Fórmula (II), n es 0.

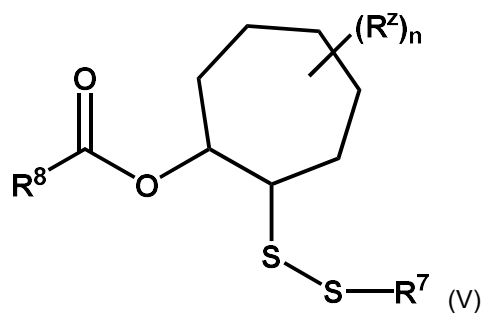
- 15 En algunas modalidades de los compuestos de Fórmula (II), n es 1.

En algunas modalidades de los compuestos de Fórmula (II), n es 2.

En algunas modalidades de los compuestos de Fórmula (II), n es 3.

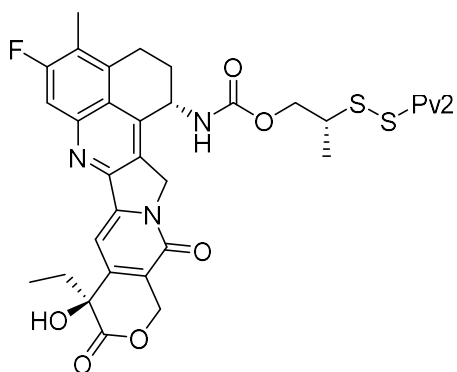
En algunas modalidades, los compuestos de la invención es un compuesto de Fórmula (III), Fórmula (IV), o Fórmula (V):



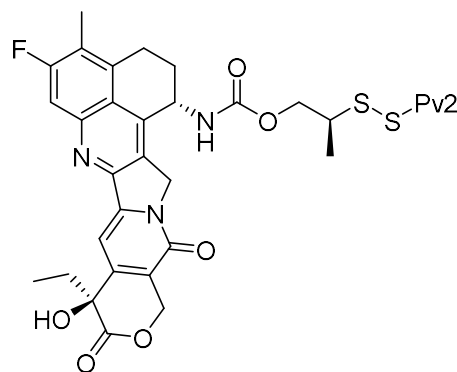


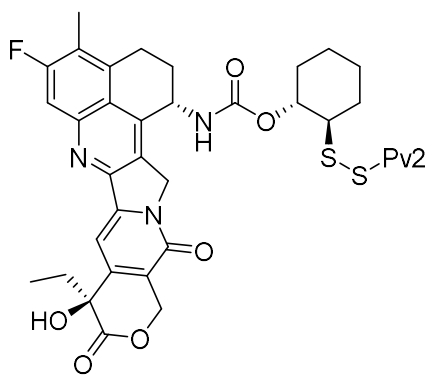
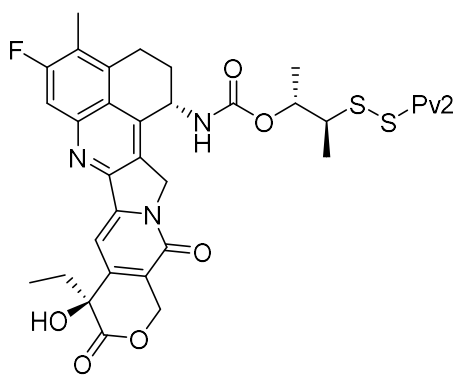
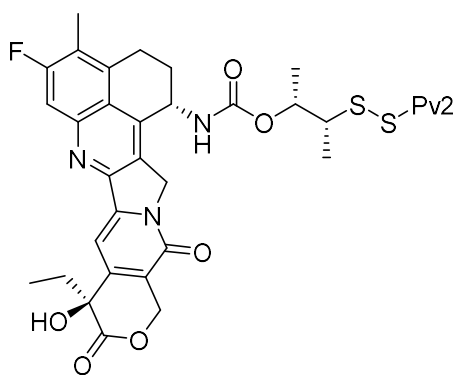
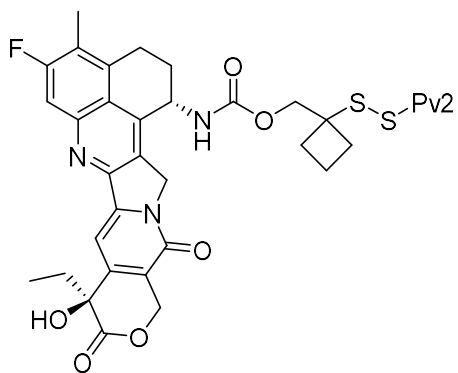
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde R^7 , R^8 , R^Z y n se definen como en cualquiera de las modalidades anteriores para la Fórmula (II).

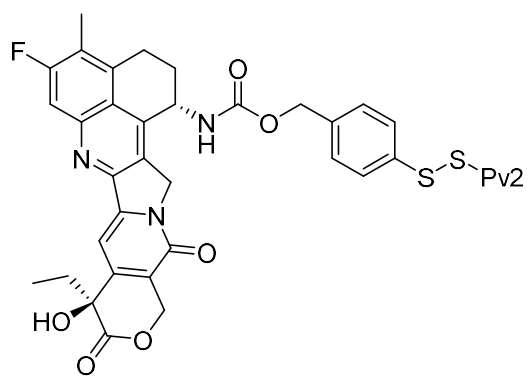
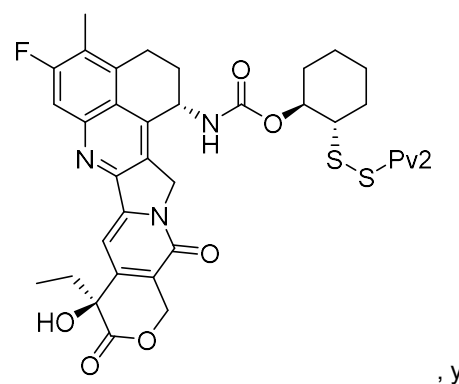
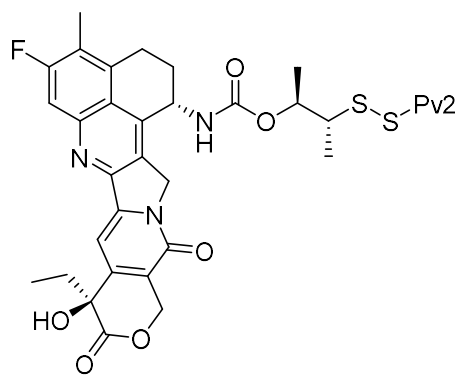
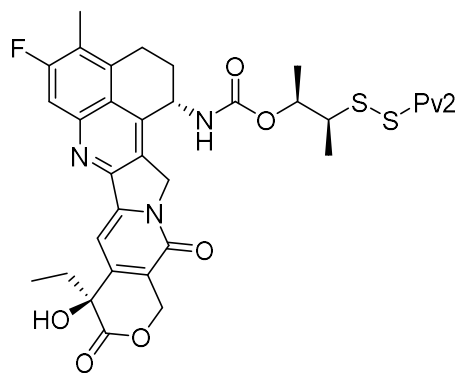
En algunas modalidades, el compuesto de Fórmula (I) se selecciona a partir de:



5

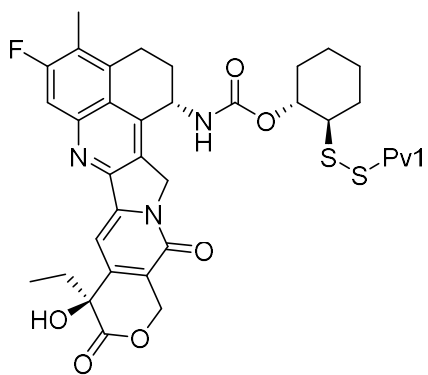
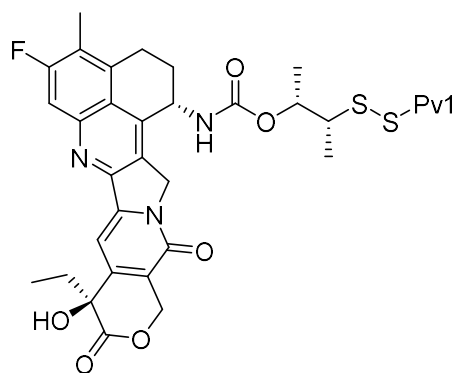
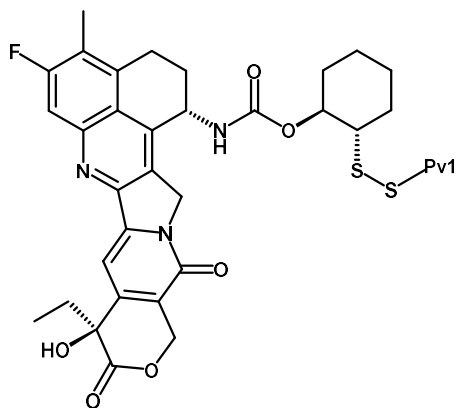


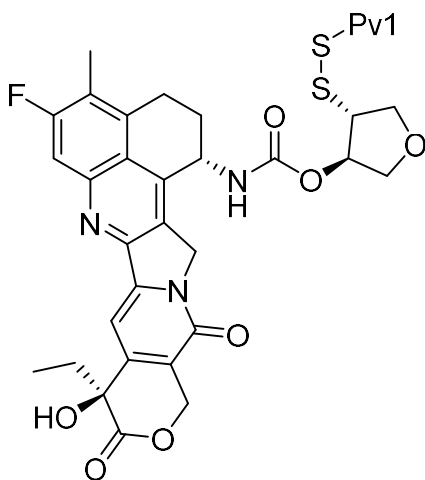
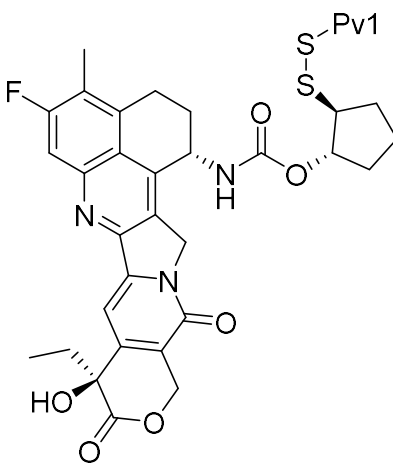


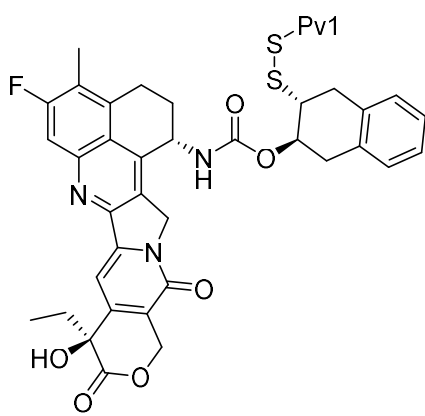
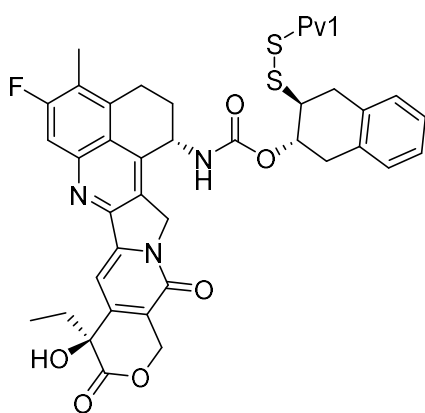
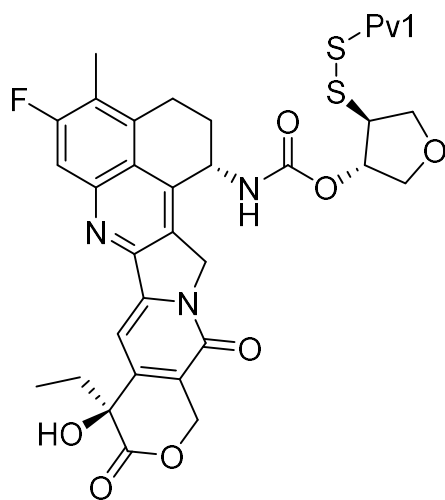


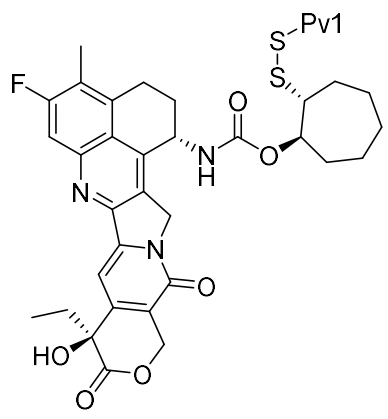
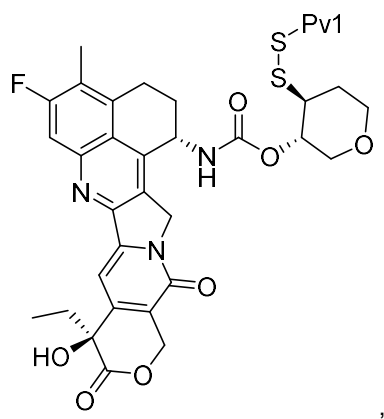
5 o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de los mencionados anteriormente.

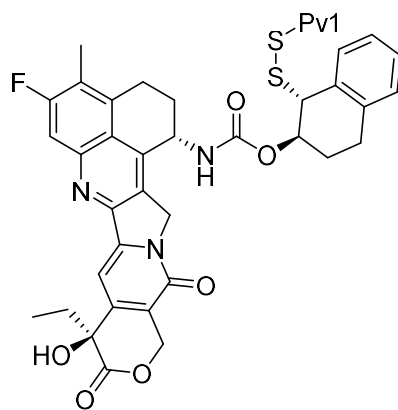
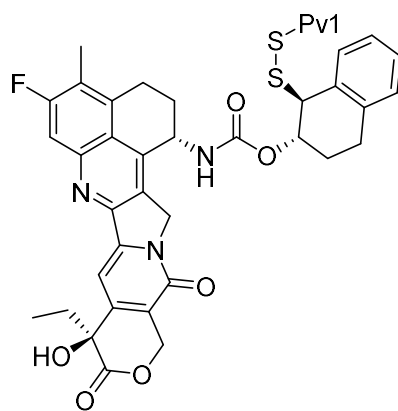
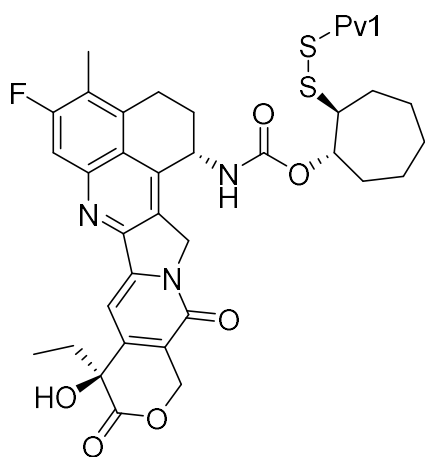
En algunas modalidades, el compuesto de Fórmula (I) se selecciona a partir de:

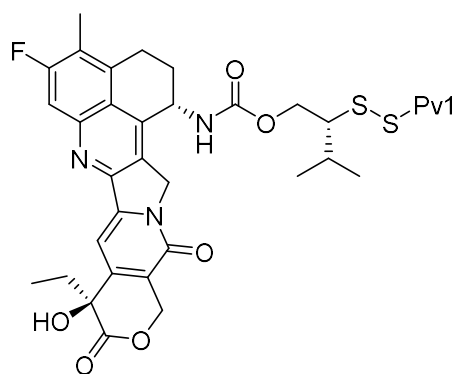
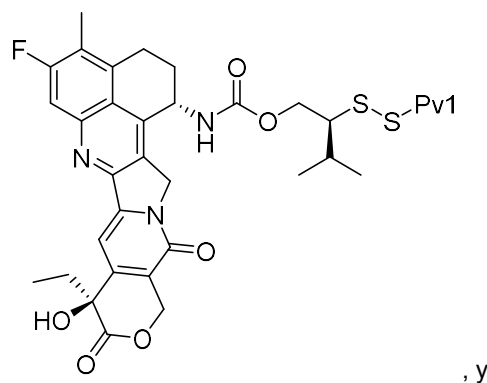
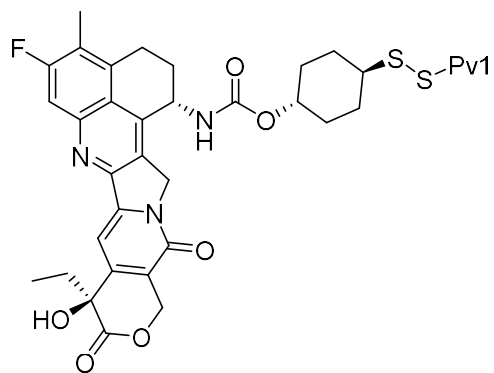




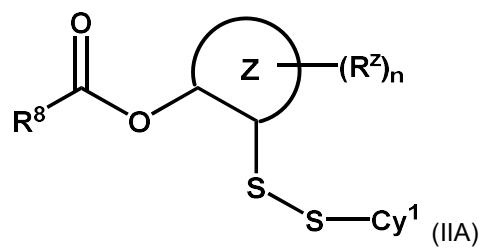








En algunas modalidades, En la presente se proporciona un compuesto que tiene la Fórmula (IIA):



5

o una sal del mismo, en donde:

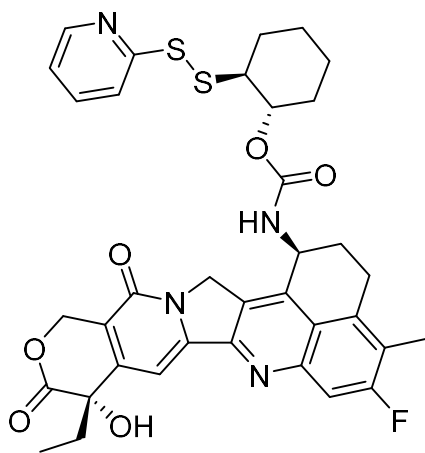
Cy¹ es arilo C₆₋₁₀ o heteroarilo de 5-10 miembros; en donde el heteroarilo de 5-10 miembros tiene al

menos un átomo de carbono formador de anillo y 1, 2, 3, o 4 heteroátomos formadores de anillo seleccionados independientemente a partir de N, O, y S; y en donde dicho arilo C₆₋₁₀ y heteroarilo de 5-10 miembros son cada uno opcionalmente sustituidos con 1, 2, o 3 sustituyentes seleccionados independientemente a partir de alquilo C₁₋₄, halo, OH, alcoxi C₁₋₆, CN, y NO₂;

5 y R⁸, el Anillo Z, R^Z, y n son como se definen en la presente.

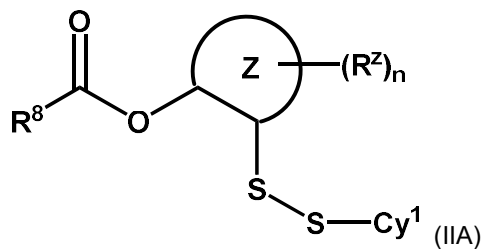
En algunas modalidades, Cy¹ es heteroarilo de 5-10 miembros. En algunas modalidades, Cy¹ es piridinilo. En algunas modalidades, Cy¹ es fenilo.

En algunas modalidades, el compuesto de Fórmula (IIA) tiene la estructura:



10 o una sal del mismo.

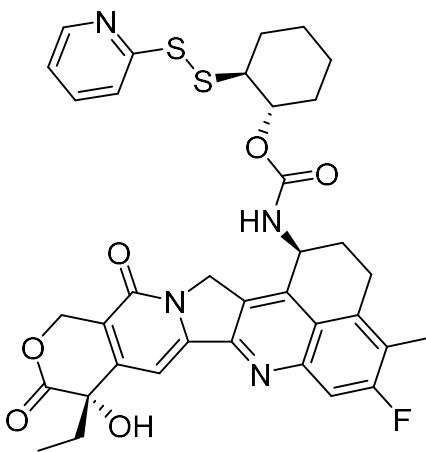
En algunas modalidades, En la presente se proporciona un compuesto de Fórmula (IIA):



o una sal del mismo, para uso en la preparación de un compuesto de la invención (por ejemplo, un compuesto de Fórmula (I) o Fórmula (II)), en donde Cy¹, R⁸, el Anillo Z, R^Z, R^{a1}, R^{b1}, R^{c1}, R^{d1}, y n son como se definen en la presente.

15

En algunas modalidades, En la presente se proporciona un compuesto que tiene la estructura:



o una sal del mismo, para uso en la preparación de un compuesto de la invención (por ejemplo, un compuesto de Fórmula (I) o Fórmula (II)).

Las moléculas de la invención se pueden marcar, 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 porción que pueda reemitir luz tras la excitación de luz (por ejemplo, un fluoróforo).

Los aminoácidos se representan por las abreviaturas de IUPAC, como sigue: 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 (SEQ ID NO:1).

El término “Pv2” significa AEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADECG (SEQ ID NO:2).

El término “Pv3” significa ADDQNPWRAYLDLLFPTDTLLLDLLWDADECG (SEQ ID NO:3).

El término “Pv4” significa AcAAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTKCG (SEQ ID NO:4).

El término “Pv5” significa AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTC (SEQ ID NO:5).

En los compuestos de la invención, los péptidos R⁷ se unen a la porción de disulfuro en el enlazador Q por un residuo de aminoácido que comprende un átomo de azufre, tal como un residuo de cisteína. Normalmente, el átomo de azufre de la porción de disulfuro en el enlazador Q que es el punto de unión al péptido R⁷ se deriva de un residuo de aminoácido del péptido, tal como de un residuo de cisteína.

El término “manto ácido y/o hipóxico” se refiere al entorno de la célula en el tejido enfermo en

cuestión que tiene un pH menor de 7.0 y preferiblemente menor de 6.5. Un manto ácido o hipóxico tiene más preferiblemente un pH de aproximadamente 5.5 y muy preferiblemente tiene un pH de aproximadamente 5.0. Los compuestos de fórmula (I) se insertan a través de una membrana celular que tiene un manto ácido y/o hipóxico de una manera dependiente del pH para insertar R⁸Q en la
 5 célula, después de lo cual el enlazador de disulfuro se escinde para liberar R⁸H. Dado que los compuestos de fórmula (I) son dependientes del pH, se insertan preferentemente a través de una membrana celular solo en la presencia de un manto ácido o hipóxico que rodea la célula y no a través de la membrana celular de las células “normales”, que no tienen un manto ácido o hipóxico. Un ejemplo de una célula que tiene un manto ácido o hipóxico es una célula cancerosa.

10 Los términos “sensible al pH” o “dependiente del pH” como se usan en la presente para referirse al péptido R⁷ o al modo de inserción del péptido R⁷ o de los compuestos de la invención a través de una membrana celular, significan que el péptido tiene una mayor afinidad por una bicapa lipídica de membrana celular que tiene un manto ácido o hipóxico que una bicapa lipídica de membrana a pH neutro. Por lo tanto, los compuestos de la invención se insertan preferentemente a través de la
 15 membrana celular para insertar R⁸Q en el interior de la célula (y así suministrar R⁸ H como se describió anteriormente) cuando la bicapa lipídica de 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 membrana celular) no es ácido o hipóxico (una célula “normal”). Se cree que esta inserción preferencial se logra como resultado de que el péptido R⁷
 20 forma una configuración helicoidal, lo que facilita la inserción de la membrana.

Se aprecia además que ciertas características de la invención que, para mayor claridad, se describen en el contexto de modalidades separadas, también se pueden proporcionar en combinación en una sola modalidad (mientras que las modalidades están destinadas a combinarse como si estuvieran escritas en múltiples formas dependientes). A la inversa, diversas características
 25 de la invención que, por razones 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 Fórmula (I) se pueden combinar en cualquier combinación adecuada.

En varios lugares en la presente especificación, ciertas características de los compuestos se describen en grupos o en rangos. Se pretende específicamente que tal descripción incluya todas y
 30 cada una de las subcombinaciones individuales de los miembros de tales grupos y rangos. Por ejemplo, el término “alquilo C₁₋₆” está destinado específicamente a describir individualmente (sin limitación) metilo, etilo, alquilo C₃, alquilo C₄, alquilo C₅ y alquilo C₆.

El término “n miembros”, donde n es un número entero, describe típicamente el número de átomos formadores de anillos en una porción donde el número de átomos formadores de anillos es n. Por
 35 ejemplo, piperidinilo es un ejemplo de un anillo 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 varios lugares en la presente especificación, se pueden describir variables que definen grupos de enlace divalentes. Se pretende específicamente que cada sustituyente de enlace incluya tanto la forma directa como la inversa del sustituyente de enlace. Por ejemplo, $-\text{NR}(\text{CR}'\text{R}'')_n-$ incluye tanto $-\text{NR}(\text{CR}'\text{R}'')_n-$ como $-(\text{CR}'\text{R}'')_n\text{NR}-$ y pretende describir cada una de las formas individualmente. Cuando la estructura requiera un grupo de enlace, las variables de Markush listadas para ese grupo se entenderán como grupos de enlace. Por ejemplo, si la estructura requiere un grupo de enlace y la definición de grupo de Markush para esa variable lista “alquilo” o “arilo”, entonces se entiende que el “alquilo” o “arilo” representa un grupo de enlace alquilenilo o arilenilo, respectivamente.

- 5
- 10 El término “sustituido” significa que un átomo o grupo de átomos reemplaza formalmente al hidrógeno como “sustituyente” unido a otro grupo. El término “sustituido”, a menos que se indique lo contrario, se refiere a cualquier nivel de sustitución, *por ejemplo*, mono-, di-, tri-, tetra- o penta-sustitución, donde tal sustitución está permitida. Los sustituyentes se seleccionan independientemente y la sustitución puede estar en cualquier posición químicamente accesible.
- 15 Debe 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 sustituido o no sustituido. El término “sustituido” significa que se elimina un átomo de hidrógeno y se reemplaza por un sustituyente. Un sustituyente divalente único, *por ejemplo*, oxo, puede reemplazar dos átomos de hidrógeno.
- 20 El término “ C_{n-m} ” indica un rango que incluye los puntos finales, en donde n y m son números 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 hidrocarburo saturado que puede ser de cadena recta o ramificada. El término “alquilo C_{n-m} ” se refiere a un grupo alquilo que tiene n a m átomos de carbono. Un grupo alquilo corresponde
- 25 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 desde 1 a 6 átomos de carbono, desde 1 a 4 átomos de carbono, desde 1 a 3 átomos de carbono o 1 a 2 átomos de carbono. Los ejemplos de porciones alquilo incluyen, pero no se limitan a, grupos químicos tales como metilo, etilo, *n*-propilo, isopropilo, *n*-butilo, *tert*-butilo, isobutilo, *sec*-butilo; homólogos superiores tales como
 - 30 2-metil-1-butilo, *n*-pentilo, 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 hidrocarburo de cadena recta o ramificada correspondiente a un grupo alquilo que tiene 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
- 35 término “alquenilo C_{n-m} ” se refiere a un grupo alquenilo que tiene n a m carbonos. En algunas modalidades, la porción alquenilo contiene 2 a 6, 2 a 4 o 2 a 3 átomos de carbono. Los grupos

alquenilo ejemplares incluyen, pero no se limitan a, 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 hidrocarburo de cadena recta o ramificada correspondiente a un grupo alquilo que tiene uno o más enlaces triples carbono-carbono. Un grupo alquinilo 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 grupos alquinilo ejemplares incluyen, pero no se limitan a, etinilo, propin-1-ilo, propin-2-ilo y similares. En algunas modalidades, la porción alquinilo contiene 2 a 6, 2 a 4 o 2 a 3 átomos de carbono.
- 10 El término “alquilenilo”, empleado solo o en combinación con otros términos, se refiere a un grupo de enlace alquilo divalente. Un grupo alquilenilo corresponde formalmente a un alcano con dos enlaces C-H reemplazados 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, pero no se limitan a, 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 –NH₂.

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

- 20 El término “ciano” o “nitrilo” se refiere a un grupo de fórmula -C≡N, que también se puede escribir 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.

- 25 El término “haloalquilo”, como se usa en la presente, se refiere a un grupo alquilo en el que uno o más de los átomos de hidrógeno se ha reemplazado 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 desde al menos uno hasta {2(*n* 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 grupos haloalquilo ejemplares incluyen CF₃, C₂F₅, CHF₂, CH₂F, CCl₃, CHCl₂, C₂Cl₅ y similares. En algunas modalidades, el grupo haloalquilo es un grupo fluoroalquilo.
- 30

El término “haloalcoxi”, empleado solo o en combinación con otros términos, se refiere a un grupo de fórmula -O-haloalquilo, en donde el grupo haloalquilo es como se definió anteriormente. El

término “haloalcoxi C_{n-m} ” se refiere a un grupo haloalcoxi, cuyo grupo haloalquilo tiene n a m carbonos. Los grupos haloalcoxi ejemplares incluyen trifluorometoxi y similares. En algunas modalidades, el grupo haloalcoxi tiene 1 a 6, 1 a 4 o 1 a 3 átomos de carbono.

- 5 El término “oxo” se refiere a un átomo de oxígeno como un sustituyente divalente, que forma un grupo carbonilo cuando está unido al carbono, o unido a un heteroátomo que forma 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.

- 10 El término “oxidado” en referencia a un átomo de S formador de anillo se refiere a un sulfonilo formador de anillo o sulfinilo formador de anillo.

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

- 15 El término “arilo”, empleado solo o en combinación con otros términos, se refiere a un grupo hidrocarburo aromático, que puede ser monocíclico o policíclico (*por ejemplo*, que tiene 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 desde 6 a aproximadamente 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.
- 20

- El término “heteroarilo” o “heteroaromático”, empleado solo o en combinación con otros términos, se refiere a un heterociclo aromático monocíclico o policíclico que tiene 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 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, azufre y oxígeno. En algunas modalidades, cualquier N formador de anillo en una porción de heteroarilo puede ser un N -óxido. En algunas modalidades, el heteroarilo tiene 5-14 átomos en el anillo que incluyen átomos de carbono y 1, 2, 3 o 4 miembros del anillo heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, azufre y oxígeno. En algunas modalidades, el heteroarilo tiene 5-10 átomos en el anillo que incluyen átomos de carbono y 1, 2, 3 o 4 miembros del anillo heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, azufre y oxígeno. En algunas modalidades, el heteroarilo tiene 5-6 átomos en el anillo y 1 o 2 miembros del anillo heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, azufre y oxígeno. En algunas modalidades, el heteroarilo es un anillo de heteroarilo de cinco o seis miembros. En otras modalidades, el heteroarilo es un anillo heteroarilo bicíclico fusionado de ocho miembros, nueve
- 25
- 30
- 35

miembros o diez miembros.

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

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

- El término “cicloalquilo”, empleado solo o en combinación con otros términos, se refiere a un sistema de anillo de hidrocarburo no aromático (monocíclico, bicíclico o policíclico), que incluye grupos alquilo y alqueno ciclados. El término “cicloalquilo C_{n-m} ” se refiere a un cicloalquilo que tiene n a m átomos de carbono en los miembros del anillo. Los grupos cicloalquilo pueden incluir grupos mono o policíclicos (*por ejemplo*, que tienen 2, 3 o 4 anillos fusionados) y espirociclos. Los grupos cicloalquilo pueden tener 3, 4, 5, 6 o 7 carbonos formadores de anillos (C_{3-7}). En algunas modalidades, el grupo cicloalquilo tiene 3 a 6 miembros en el anillo, 3 a 5 miembros en el anillo o 3 a 4 miembros en el 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 C_{3-6} monocíclico. Los átomos de carbono formadores de anillos 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 porciones que tienen uno o más anillos aromáticos fusionados (*es decir*, que tienen un enlace en común) con el anillo cicloalquilo, *por ejemplo*, derivados de benzo o tienilo de ciclopentano, ciclohexano y similares. Un grupo cicloalquilo que contiene un anillo aromático fusionado se puede unir a través de cualquier átomo formador de anillo, incluyendo 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.
- 10
- 15
- 20
- 25

- El término “heterocicloalquilo”, empleado solo o en combinación con otros términos, se refiere a un anillo o sistema de anillos no aromático, que puede contener opcionalmente uno o más grupos alqueno 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 en el anillo, 4-7 miembros en el anillo o 4-6 miembros en el anillo. Incluidos dentro del término “heterocicloalquilo” están los grupos heterocicloalquilo de 4, 5, 6 y 7 miembros monocíclico. Los grupos heterocicloalquilo pueden incluir sistemas de anillos monocíclicos o bicíclicos (*por ejemplo*, que tienen dos anillos fusionados o puenteados) o espirocíclicos. En algunas modalidades, el grupo heterocicloalquilo es un grupo monocíclico que tiene 1, 2 o 3 heteroátomos seleccionados independientemente a partir de nitrógeno, azufre y oxígeno. Los átomos de carbono
- 30
- 35

formadores de anillos y 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 un átomo de nitrógeno se puede cuaternizar. El grupo heterocicloalquilo se puede unir a través de un átomo de carbono formador de anillo o un heteroátomo formador de anillo. En algunas modalidades, el grupo heterocicloalquilo contiene 0 a 3 enlaces dobles. En algunas modalidades, el grupo heterocicloalquilo contiene 0 a 2 enlaces dobles. También se incluyen en la definición de heterocicloalquilo porciones 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 piperidina, morfolina, azepina, *etc.* Un grupo heterocicloalquilo que contiene un anillo aromático fusionado se puede unir a través de cualquier átomo formador de anillo, incluyendo un átomo formador de anillo del anillo aromático fusionado. Los ejemplos de grupos heterocicloalquilo incluyen 2-pirrolidinilo; morfolinul; azetidino; y piperazinilo.

En ciertos lugares, las definiciones o modalidades se refieren a anillos específicos (*por ejemplo*, un anillo de azetidina, un anillo de 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 de azetidina se puede unir en cualquier posición del anillo, mientras que un anillo azetidin-3-ilo se une en la posición 3.

Los compuestos descritos en la presente pueden ser asimétricos (*por ejemplo*, tener uno o más estereocentros). Todos los estereoisómeros, tales como enantiómeros y diastereómeros, están destinados a menos que se indique lo contrario. Los compuestos de la presente invención que contienen átomos de carbono asimétricamente sustituidos se pueden aislar en formas ópticamente activas o racémicas. Se conocen en la técnica métodos sobre cómo preparar formas ópticamente activas a partir de materiales de partida ópticamente inactivos, tales como por resolución de mezclas racémicas o por síntesis estereoselectiva. Muchos isómeros geométricos de olefinas, enlaces dobles C=N y similares también pueden estar presentes en los compuestos descritos en la presente, y todos estos isómeros estables se contemplan en la presente invención. Los isómeros geométricos *cis* y *trans* de los compuestos de la presente invención se describen y se pueden aislar como una mezcla de isómeros o como formas isoméricas separadas.

La resolución de mezclas racémicas de compuestos se puede realizar por cualquiera de los numerosos métodos conocidos en la técnica. Un método incluye la recristalización fraccionada usando un ácido de resolución quiral que es un ácido orgánico formador de sal, ópticamente activo. Los agentes de resolución adecuados para los métodos de recristalización fraccionada 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 tales como β-ácido canforsulfónico. Otros agentes de resolución adecuados para los métodos de cristalización fraccionada 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 realizar por elución en una columna empaquetada con un agente de resolución ópticamente activo (*por ejemplo*,
 5 dinitrobenzoilfenilglicina). Un experto en la técnica puede determinar la composición del solvente de elución adecuada.

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

Los compuestos de la invención también incluyen formas tautoméricas. Las formas tautoméricas resultan del intercambio de un enlace sencillo con un enlace doble adyacente junto con la migración concomitante de un protón. Las formas tautoméricas incluyen tautómeros prototrópicos que son estados de protonación isoméricos que tienen la misma fórmula empírica y carga total. Los
 15 tautómeros prototrópicos ejemplares incluyen pares de cetona-enol, pares de amida-ácido imídico, pares de lactama-lactima, pares de enamina-imina y formas anulares donde un protón 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 por sustitución apropiada.

Los compuestos de la invención también pueden incluir todos los isótopos de átomos que se presentan en los compuestos intermediarios o finales. Los isótopos incluyen aquellos 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 se pueden reemplazar o sustituir con isótopos de los átomos en abundancia natural o no
 20 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 reemplazar o sustituir por 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 de síntesis para incluir isótopos en compuestos orgánicos son conocidos
 30 en la técnica (Deuterium Labeling in Organic Chemistry by Alan F. Thomas (New York, N.Y., Appleton-Century-Crofts, 1971; The Renaissance of H/D Exchange by Jens Atzrodt, Volker Derdau, Thorsten Fey and Jochen Zimmermann, Angew. Chem. Int. Ed. 2007, 7744-7765; The Organic Chemistry of Isotopic Labeling by James R. Hanson, Royal Society of Chemistry, 2011). Los compuestos marcados isotópicamente se pueden usar en varios estudios tales como
 35 espectroscopía de NMR experimentos de metabolismo y/o ensayos.

La sustitución con isótopos más pesados tal como deuterio, puede proporcionar ciertas ventajas

terapéuticas que resultan de una mayor estabilidad metabólica, por ejemplo, un aumento de la semivida in vivo o una reducción de los requisitos de dosificación y, por lo tanto, puede ser preferible en algunas circunstancias. (A. Kerekes et. al. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 201-210; R. Xu et. al. *J. Label Compd. Radiopharm.* **2015**, *58*, 308-312).

- 5 El término “compuesto”, como se usa en la presente, pretende incluir todos los estereoisómeros, isómeros geométricos, tautómeros e isótopos de las estructuras representadas. El término también se refiere a los compuestos de la invención, independientemente de cómo se preparen, por ejemplo, sintéticamente, a través de un proceso biológico (por ejemplo, metabolismo o conversión enzimática), o una combinación de los mismos.
- 10 Todos los compuestos, y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se pueden encontrar junto con otras sustancias tales como agua y solventes (*por ejemplo*, hidratos y solvatos) o se pueden aislar. Cuando están en estado sólido, los compuestos descritos en la presente y las sales de los mismos se pueden presentar en diversas formas y pueden, *por ejemplo*, tomar la forma de solvatos, incluyendo hidratos. Los compuestos pueden estar en cualquier forma de estado sólido,
- 15 tal como un polimorfo o solvato, por lo que, a menos que se indique claramente lo contrario, la referencia en la especificación a compuestos y sales de los mismos debe entenderse que abarca cualquier forma de estado sólido del compuesto.

- En algunas modalidades, los compuestos de la invención, o sales de los mismos, se aíslan sustancialmente. Por “sustancialmente aislado” se entiende que el compuesto está al menos parcial
- 20 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 contienen al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 97%,
 - 25 o al menos al menos aproximadamente 99% en peso de los compuestos de la invención, o sal de los mismos.

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

- Las expresiones “temperatura ambiental” y “temperatura ambiente”, como se usan en la presente, se entienden en la técnica y se refieren generalmente a una temperatura, *por ejemplo*, una temperatura de reacción, que es aproximadamente la temperatura de la habitación en la que se realiza la reacción. *por ejemplo*, una temperatura desde aproximadamente 20°C a aproximadamente
- 35 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 una porción ácida o base existente en su forma de sal. Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, 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 orgánicos o inorgánicos no tóxicos. Las sales farmacéuticamente aceptables de la presente invención se pueden sintetizar a partir del compuesto original que contiene una porción básica o ácida por métodos químicos convencionales. Generalmente, tales sales se pueden preparar haciendo reaccionar las formas de ácido o base libre de estos compuestos con una cantidad estequiométrica de la base o ácido apropiado en agua o en un solvente orgánico, o en una mezcla de los dos; generalmente, se prefieren medios no acuosos como éter, acetato de etilo, alcoholes (*por ejemplo*, metanol, etanol, isopropanol o butanol) o acetonitrilo (MeCN). Las listas de sales adecuadas se encuentran en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 17th Ed., (Mack Publishing Company, Easton, 1985), p. 1418, Berge *et al.*, *J. Pharm. Sci.*, **1977**, 66(1), 1-19 y en Stahl *et al.*, *Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use*, (Wiley, 2002). En algunas modalidades, los compuestos descritos en la presente incluyen las formas de N-óxido.

20 *Síntesis*

Los compuestos de la invención, incluyendo las sales de los mismos, se pueden preparar usando técnicas de síntesis orgánica conocidas y se pueden sintetizar de acuerdo con cualquiera de las numerosas rutas de síntesis posibles, como las de los Esquemas de reacción siguientes.

Las reacciones para preparar compuestos de la invención se pueden realizar en solventes adecuados que un experto en la técnica de síntesis orgánica puede seleccionar fácilmente. Los solventes adecuados pueden ser sustancialmente no reactivos con los materiales de partida (reactivos), los intermediarios o productos a las temperaturas a las que se realizan las reacciones, *por ejemplo*, temperaturas que pueden variar desde la temperatura de congelación del solvente hasta la temperatura de ebullición del solvente. Una reacción determinada se puede realizar en un solvente o en una mezcla de más de un solvente. Dependiendo de la etapa de reacción particular, el experto en la materia puede seleccionar los solventes adecuados para una etapa de reacción particular.

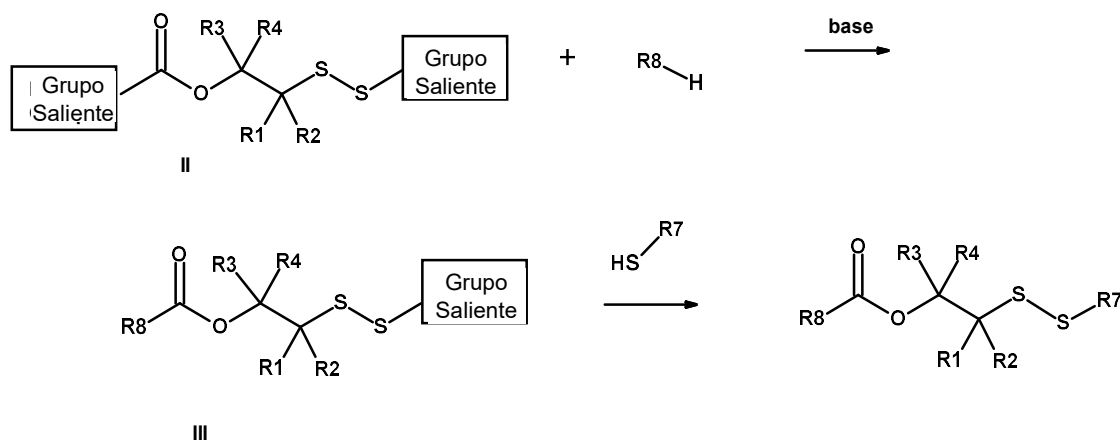
La preparación de compuestos de la invención puede involucrar la protección y desprotección de diversos grupos químicos. La necesidad de protección y desprotección, y la selección de grupos protectores apropiados, se puede determinar fácilmente por un experto en la técnica. La química de los grupos protectores se describe, *por ejemplo*, en Kocienski, *Protecting Groups*, (Thieme, 2007); Robertson, *Protecting Group Chemistry*, (Oxford University Press, 2000); Smith *et al.*, *March's*

Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure, 6th Ed. (Wiley, 2007); Petursson *et al.*, "Protecting Groups in Carbohydrate Chemistry," *J. Chem. Educ.*, 1997, 74(11), 1297; and Wuts *et al.*, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 4th Ed., (Wiley, 2006).

- Las reacciones se pueden monitorear de acuerdo con cualquier método adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, la formación de productos se puede monitorear por medios espectroscópicos, tal como espectroscopia de resonancia magnética nuclear (*por ejemplo*, ^1H o ^{13}C), espectroscopia infrarroja, espectrofotometría (*por ejemplo*, UV-visible), espectrometría de masas o por métodos cromatográficos tal como cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) o cromatografía en capa delgada (TLC).
- Los siguientes Esquemas de reacción proporcionan una guía general en relación con la preparación de los compuestos de la invención. Un experto en la técnica comprenderá que las preparaciones mostradas en los Esquemas de reacción se pueden modificar u optimizar usando el conocimiento general de la química orgánica para preparar varios compuestos de la invención.

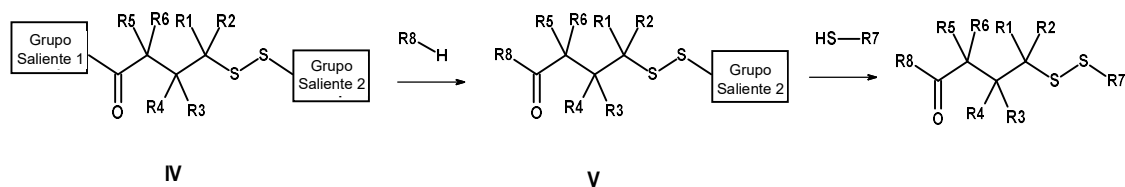
- Los compuestos de Fórmula (I) se pueden preparar, *por ejemplo*, usando un proceso como se ilustra en los esquemas de reacción siguientes.

Esquema de reacción 1: Síntesis de Compuestos Enlazados a Carbonato y Carbamato



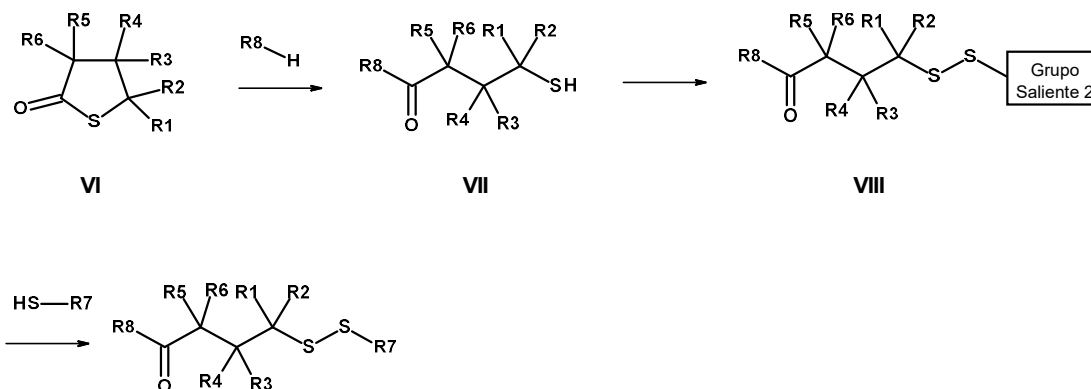
- El intermediario II, que está flanqueado por grupos salientes ortogonales, se puede hacer reaccionar con un compuesto R^8H nucleofílico para producir el intermediario III. Después, el intermediario III se puede hacer reaccionar con un péptido que contiene tior (HS- R^7) que participa en una reacción de intercambio de disulfuro para producir el compuesto final. Los grupos salientes adecuados se describen a continuación.

Esquema de reacción 2: Síntesis 1 de Conjugados Enlazados a Tio Propionato



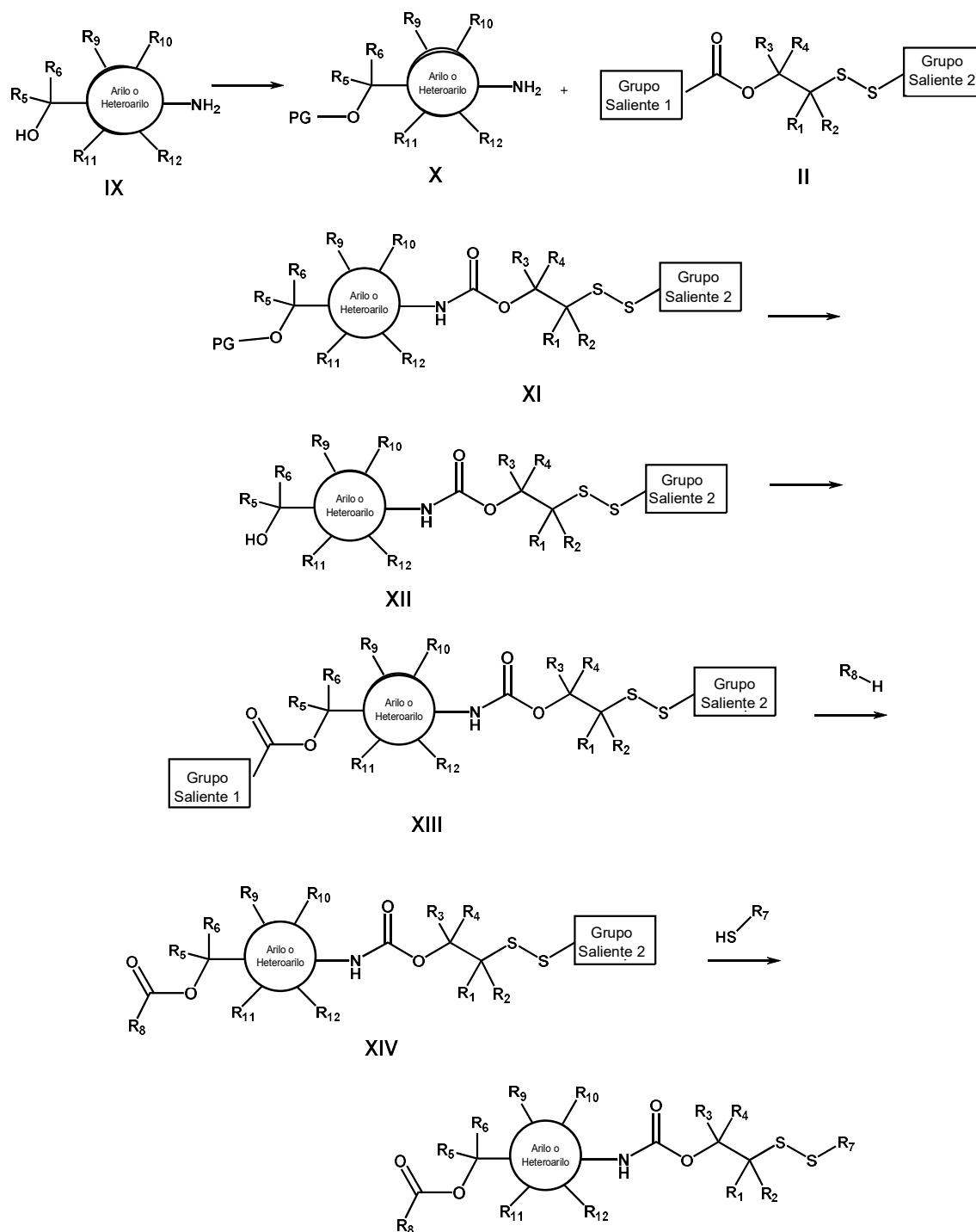
Propionato disulfuro IV con Grupos Salientes previamente instalados 1 y 2 se puede hacer reaccionar selectivamente con R^8-H nucleofílico para producir V. Este compuesto luego se puede hacer reaccionar con R^7-SH para proporcionar el conjugado deseado.

Esquema de reacción 3: Síntesis 2 de Conjugados Enlazados a Tio Propionato



El tionoéster VI se puede hacer reaccionar con R^8-H nucleofílico para producir propionato tiol VII. Este compuesto puede participar en una reacción de intercambio de disulfuro para proporcionar el Intermediario VIII. Este compuesto se puede tratar con R^7-SH para proporcionar el conjugado deseado.

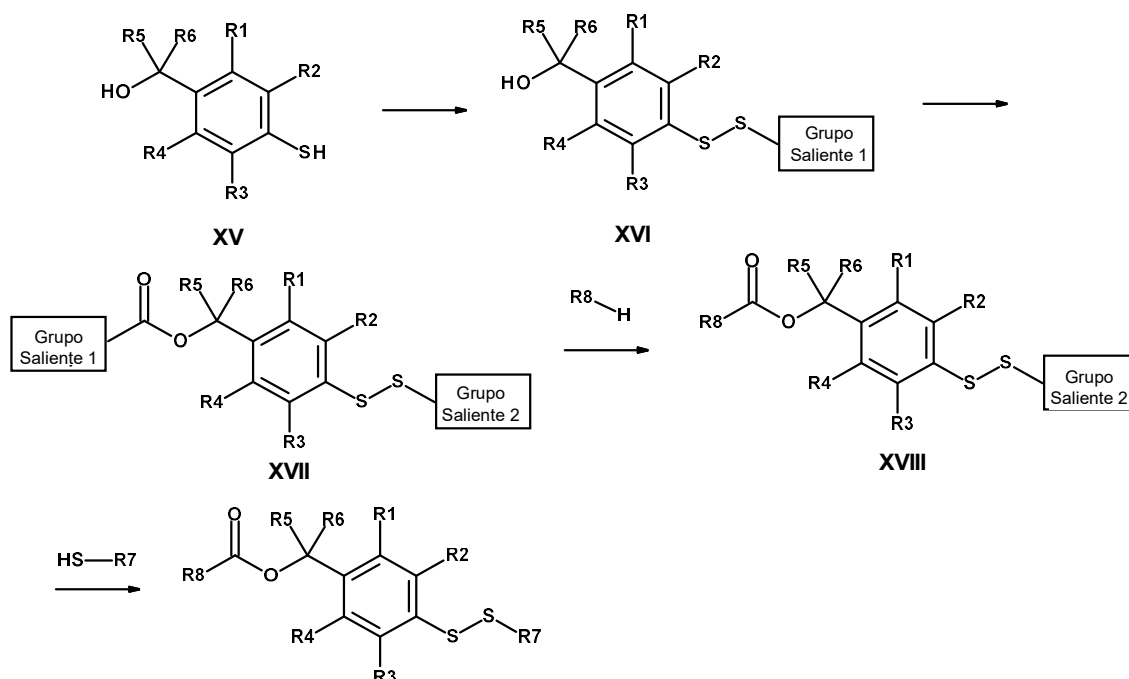
Esquema de reacción 4: Síntesis 1 de Conjugados Enlazados a Para Bencilo



El grupo alcohol del alcohol para aminobencílico IX se puede proteger selectivamente para producir el Intermediario X. Este intermediario luego se puede hacer reaccionar en la posición de la anilina con el Intermediario II para proporcionar carbamato de arilo XI. El grupo protector se puede eliminar produciendo alcohol XII libre, que se puede tratar con un agente activador para proporcionar el

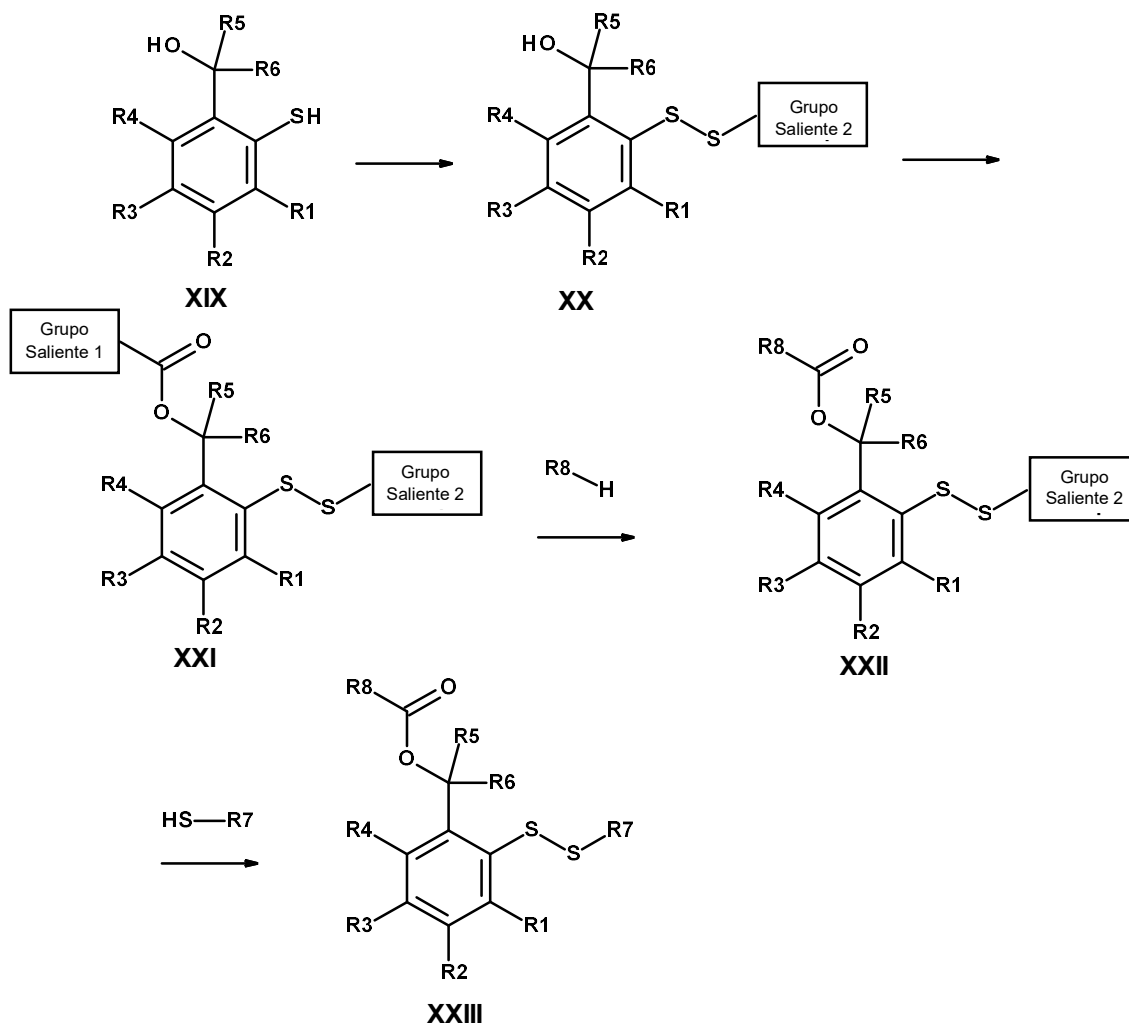
Intermediario XIII, que contiene grupos salientes ortogonales. La reacción del Intermediario XIII con R^8-H puede proporcionar el Intermediario XIV, seguido por el tratamiento con R^7-SH puede producir el conjugado enlazado a para bencilo deseado.

5 Esquema de reacción 5: Síntesis de Conjugados Enlazados a Para Bencilo



El alcohol 4-mercaptobencílico XV se puede hacer reaccionar en una reacción de intercambio de disulfuro para producir el disulfuro de alcohol 4-mercaptobencílico XVI que contiene el Grupo Saliente 2. El alcohol bencílico restante se puede tratar con un compuesto carbonílico apropiado para proporcionar el compuesto XVII activado. Este intermediario se puede hacer reaccionar adicionalmente de manera selectiva con R^8-H nucleofílico para proporcionar el Intermediario XVIII, que se puede tratar con R^7-SH para producir el conjugado deseado.

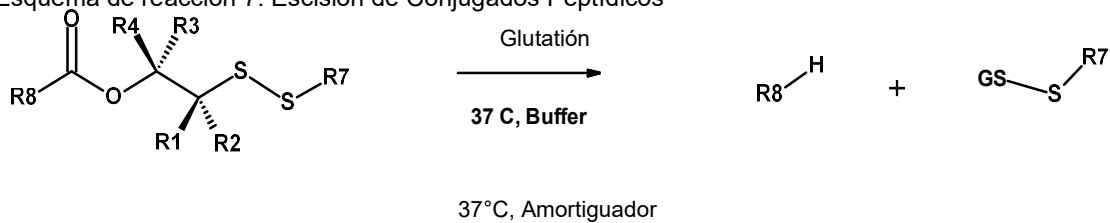
Esquema de reacción 6: Síntesis de Conjugados Enlazados a Orto Bencilo



El alcohol 2-mercapto bencílico XXIII se puede hacer reaccionar como se describió previamente para producir el conjugado deseado.

5

Esquema de reacción 7: Escisión de Conjugados Peptídicos



La escisión del compuesto final para liberar R⁸-H se puede lograr tratando el compuesto con un exceso de glutatión (GSH) en un amortiguador con incubación a 37°C. El análisis de HPLC de fase inversa en un curso de tiempo deseado se usa para seguir el curso de la escisión.

Los péptidos R⁷ se pueden preparar usando el método de síntesis en fase sólida descrito por primera vez por Merrifield en J.A.C.S., Vol. 85, págs. 2149-2154 (1963), aunque también se pueden emplear otros métodos conocidos en la técnica. La técnica de Merrifield se conoce bien y es un método común para la preparación de péptidos. En varios libros se describen técnicas útiles para la síntesis de péptidos en fase sólida, tal como el texto "Principles of Peptide Synthesis" de Bodanszky, Springer Verlag 1984. Este método de síntesis involucra la adición escalonada de aminoácidos protegidos a una cadena de péptidos en crecimiento que estaba unida por enlaces covalentes a una partícula de resina sólida. Mediante este procedimiento, los reactivos y subproductos se eliminan por filtración, eliminando así la necesidad de purificar intermediarios. El concepto general de este método depende de la unión del primer aminoácido de la cadena a un polímero sólido por un enlace covalente, seguido de la adición de los siguientes aminoácidos protegidos, uno a la vez, de manera escalonada hasta que se ensambla la secuencia deseada. Finalmente, el péptido protegido se elimina del soporte de resina sólida y los grupos protectores se escinden.

Los péptidos R⁷ también se pueden producir por fermentación, por ejemplo, por modificación de *E. coli*. La producción de proteínas en *E. coli* se puede controlar para producir polipéptidos recombinantes que tienen una secuencia de un péptido R⁷ descrito en la presente. La producción de polipéptidos recombinantes en *E. coli* se describe en las siguientes referencias: Zhao, Q., Xu, W., Xing, L. *et al.* Recombinant production of medium- to large-sized peptides in *Escherichia coli* using a cleavable self-aggregating tag. *Microb Cell Fact* 15, 136 (2016); de Marco, Recombinant polypeptide production in *E. coli*: towards a rational approach to improve the yields of functional proteins; *Microbial Cell Factories* 2013, 12:101; and Kleiner-Grote G.M., Risse, J.M., Friehs, K; Secretion of recombinant proteins from *E. coli*; *Eng. Life Sci.* 2018, 18, 532–550, cada una de las cuales se incorpora como referencia en su totalidad.

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

Métodos de Uso

En la presente se proporciona el uso de los compuestos de fórmula (I) en el tratamiento de enfermedades, tales como cáncer o enfermedades neurodegenerativas. Otro aspecto de la presente

invención es el uso de los compuestos de fórmula (I) en el tratamiento de enfermedades que involucran tejido enfermo ácido o hipóxico, tales como cáncer o enfermedad neurodegenerativa. La hipoxia y acidosis son marcadores fisiológicos de muchos procesos patológicos, incluyendo el cáncer. En el cáncer, la hipoxia es un mecanismo responsable del desarrollo de un ambiente ácido

5 dentro de los tumores sólidos. Como resultado, los iones de hidrógeno se deben eliminar de la célula (por ejemplo, por 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 a menudo tienen un gradiente de pH aumentado a través de la bicapa lipídica de la membrana celular y un pH menor en el medio extracelular en comparación con las células normales. Un enfoque para mejorar la

10 eficacia e índice terapéutico de agentes citotóxicos es aprovechar esta característica fisiológica para proporcionar el suministro selectivo del compuesto a las células hipóxicas sobre el tejido sano.

En los métodos de tratamiento de la invención, se puede administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como un agente único o en combinación con otras formas de terapia, tal como radiación ionizante o agentes

15 citotóxicos en el caso del cáncer. En la terapia de combinación, el compuesto de fórmula (I) se puede administrar antes, al mismo tiempo o después de la otra modalidad terapéutica, como apreciarán los expertos en la técnica. Cualquier método de tratamiento (agente único o combinación con otras formas de terapia) se puede administrar como un curso de tratamiento que involucra múltiples dosis o tratamientos durante un periodo de tiempo.

20 Los ejemplos de cánceres que se pueden tratar usando los compuestos de la presente descripción incluyen, pero no se limitan a, cáncer colorrectal, cáncer gástrico, cáncer de hueso, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, melanoma maligno cutáneo o intraocular, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer de recto, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer testicular, cáncer de útero, carcinoma de las trompas de Falopio, carcinoma de endometrio,

25 cáncer de endometrio, carcinoma de cuello uterino, carcinoma de vagina, carcinoma de la vulva, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, cáncer de esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroides, cáncer de la glándula paratiroidea, cáncer de la glándula suprarrenal, sarcoma de tejido blando, cáncer de uretra, cáncer de pene, leucemias crónicas o agudas que incluyen leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica,

30 leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, tumores sólidos de la infancia, linfoma linfocítico, cáncer de la vejiga, cáncer del riñón o uretra, carcinoma de la pelvis renal, neoplasia del sistema nervioso central (CNS), linfoma primario del CNS, angiogénesis tumoral, tumor del eje espinal, glioma de tronco encefálico, adenoma pituitario, sarcoma de Kaposi, cáncer epidermoide, cáncer de células escamosas, linfoma de células T, cánceres inducidos por el medio ambiente,

35 incluyendo los inducidos por asbestos, y combinaciones de dichos cánceres.

En algunas modalidades, los cánceres tratables con compuestos de la presente descripción incluyen cáncer de vejiga, cáncer de hueso, glioma, cáncer de mama (por ejemplo, cáncer de mama triple negativo), cáncer de cuello uterino, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de endometrio,

cáncer epitelial, cáncer de esófago., Sarcoma de Ewing, cáncer de páncreas, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico, tumores gastrointestinales, cáncer de cabeza y cuello (cáncer aerodigestivo superior), cánceres intestinales, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, cáncer de laringe, cáncer de hígado (por ejemplo, carcinoma hepatocelular), cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma), melanoma, cáncer de próstata, cáncer de recto, carcinoma renal de células claras, cáncer de piel, cáncer de estómago, cáncer de testículo, cáncer de tiroides y cáncer de útero.

En algunas modalidades, los cánceres tratables con compuestos de la presente descripción incluyen melanoma (por ejemplo, melanoma maligno metastásico), cáncer de riñón (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 ejemplo, cáncer de pulmón de células no pequeñas y cáncer de pulmón de células pequeñas). Además, la descripción incluye neoplasias malignas refractarias o recurrentes cuyo crecimiento se puede inhibir usando los compuestos de la descripción.

En algunas modalidades, los cánceres que se pueden tratar usando los compuestos de la presente descripción incluyen, pero no se limitan a, tumores sólidos (*por ejemplo*, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer de esófago, cáncer de endometrio, cáncer de ovario, cáncer de útero, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cánceres de la cabeza y cuello, cáncer de tiroides, glioblastoma, sarcoma, cáncer de vejiga, etc.), cánceres hematológicos (*por ejemplo*, linfoma, leucemia tal como leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia mielógena aguda (AML), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia mielógena crónica (CML), DLBCL, linfoma de células del manto, linfoma no Hodgkin (incluyendo NHL recidivante o refractario y folicular recurrente), linfoma de Hodgkin o mieloma múltiple) y combinaciones de dichos cánceres.

Los compuestos de la invención (por ejemplo, un compuesto de fórmula (I)) que comprenden una porción de direccionamiento de topoisomerasa I derivado de un inhibidor de topoisomerasa I (por ejemplo, exatecán) pueden exhibir ciertas ventajas terapéuticas sobre el inhibidor de topoisomerasa I en sí. Por ejemplo, la administración de un compuesto de fórmula (I) puede mostrar una toxicidad reducida (por ejemplo, toxicidad gástrica o de médula ósea) en comparación con la administración del inhibidor de topoisomerasa I correspondiente (por ejemplo, exatecán). En algunas modalidades, la toxicidad de la médula ósea se mide por recuento total de médula ósea de muestras del sujeto (por ejemplo, recuento total de médula ósea en fémures de un ratón). En algunas modalidades, la toxicidad de la médula ósea se mide por PARilación en tejido de médula ósea. En algunas modalidades, la toxicidad de la médula ósea se mide de acuerdo con el total de células de médula ósea nucleadas. En algunas modalidades, la toxicidad gástrica se evalúa usando fotografías de los estómagos del sujeto (por ejemplo, un ratón) tomadas tanto *in situ* como *ex vivo*.

En ciertas modalidades, se puede usar un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente

aceptable del mismo en combinación con un agente quimioterapéutico, una terapia contra el cáncer dirigida, una inmunoterapia o radioterapia. Los agentes se pueden combinar con los presentes compuestos en una forma de dosificación única, o los agentes se pueden administrar simultánea o secuencialmente como formas de dosificación separadas. En algunas modalidades, el agente

5 quimioterapéutico, la terapia contra el cáncer dirigida, inmunoterapia o radioterapia es menos tóxico para el paciente, por ejemplo, al mostrar una reducción de la toxicidad gástrica o de la médula ósea, cuando se administra junto con un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en comparación con cuando se administra en combinación con el inhibidor de topoisomerasa correspondiente (por ejemplo, R⁸-H).

10 Los agentes quimioterapéuticos u otros anticancerígenos adecuados incluyen, por ejemplo, agentes alquilantes (que incluyen, sin limitación, mostazas de nitrógeno, derivados de etilenimina, alquil sulfonatos, nitrosoureas y triazenos) tales como mostaza de uracilo, clorometina, ciclofosfamida (CytosanTM), ifosfamida, melfalán, clorambucilo, pipobromano, trietilen-melamina, trietilenotiofosforamina, busulfán, carmustina, lomustina, estreptozocina, dacarbazina, y

15 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

20 de acuerdo con la invención también se pueden combinar con fármacos de inmunoterapia, incluyendo citocinas tales como interferón alfa, interleucina 2 y factor de necrosis tumoral (TNF).

Los agentes quimioterapéuticos u otros 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,

25 floxuridina, citarabina, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, fosfato de fludarabina, pentostatina y gemcitabina.

Los agentes quimioterapéuticos adecuados u otros anticancerígenos incluyen además, por ejemplo, ciertos productos naturales y sus derivados (por ejemplo, vinca alcaloides, antibióticos antitumorales, enzimas, linfocinas y epipodofilotoxinas) tales como vinblastina, vincristina, vindesina, bleomicina,

30 dactinomicina, daunorrubicina, doxorrubicina, epirubicina, idarrubicina, ara-C, paclitaxel (TAXOLTM), mitramicina, desoxicoformicina, mitomicina-C, L-asparaginasa, interferones (especialmente IFN- α), etopósido y tenipósido.

Otros agentes citotóxicos que se pueden administrar en combinación con los compuestos de la invención incluyen, por ejemplo, navelbino, CPT-11, anastrozol, letrozol, capecitabina, reloxafina,

35 ciclofosfamida, ifosamida y droloxafina.

- También son adecuados agentes citotóxicos tales como, por ejemplo, epidofilotoxina; una enzima antineoplásica; un inhibidor de topoisomerasa; procarbazona; mitoxantrona; complejos de coordinación de platino tales como cis-platino y carboplatino; modificadores de la respuesta biológica; inhibidores del crecimiento; agentes terapéuticos antihormonales; leucovorina; tegafur; y factores de crecimiento hematopoyético.
- Otros agentes anticancerígenos incluyen agentes terapéuticos de anticuerpos tales como trastuzumab (Herceptin), anticuerpos contra moléculas coestimuladoras tales como CTLA-4, 4-1BB y PD-1, o anticuerpos contra citocinas (IL-10, TGF- α , etc.).
- Otros agentes anticancerígenos también incluyen los que bloquean la migración de células inmunes, tales como antagonistas para receptores de quimiocinas, incluyendo CCR2 y CCR4.
- Otros agentes anticancerígenos también incluyen aquellos que aumentan el sistema inmune, tales como adyuvantes o transferencia de células T adoptivas.
- 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 unidas 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. Los ejemplos adecuados son agentes antiestrógenos, incluyendo, pero no limitado a, tamoxifeno y toremifeno, inhibidores de aromatasa, incluyendo, pero no limitado a, letrozol, anastrozol y exemestano, adrenocorticosteroides (por ejemplo, prednisona), progestágenos (por ejemplo, acetato de megastrol) y antagonistas de los receptores de estrógenos (por ejemplo, fulvestrant). Los agentes antihormonales adecuados usados para el tratamiento de cánceres de próstata y otros también se pueden combinar con compuestos de la presente invención. Estos incluyen antiandrógenos incluyendo, pero no limitado a, flutamida, bicalutamida y nilutamida, análogos de la hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH) incluyendo leuprolida, goserelina, triptorelina e histrelina, antagonistas de LHRH (por ejemplo, degarelix), bloqueadores del receptor de andrógeno (por ejemplo, enzalutamida) y agentes que inhiben la producción de andrógenos (por ejemplo, abiraterona).
- Los compuestos de la presente invención se pueden combinar o administrar en secuencia con otros agentes contra las cinasas receptoras de membrana, especialmente para pacientes que han

- 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 proteínas cinasas de fusión asociadas al cáncer, tales como Bcr-Abl y EML4-Alk. Los inhibidores contra EGFR incluyen gefitinib y erlotinib, y los inhibidores contra EGFR/Her2 incluyen, pero no se limitan a, dacomitinib, afatinib, lapatinib y neratinib. Los anticuerpos contra el EGFR incluyen, pero no se limitan a, cetuximab, panitumumab y necitumumab. Los inhibidores de c-Met se pueden usar en combinación con los compuestos de la invención. Estos incluyen onartumzumab, tivantinib 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.
- 5
- 10 Los inhibidores de la angiogénesis pueden ser eficaces en algunos tumores en combinación con compuestos de la invención. Estos incluyen anticuerpos contra VEGF o VEGFR o inhibidores de cinasas de VEGFR. Los anticuerpos u otras proteínas terapéuticas contra VEGF incluyen bevacizumab y aflibercept. Los inhibidores de las cinasas de VEGFR y otros inhibidores anti-angiogénesis incluyen, pero no se limitan a, sunitinib, sorafenib, axitinib, cediranib, pazopanib,
- 15 regorafenib, brivanib y vandetanib.

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

- Los agentes contra la cinasa PI3 incluyen, pero no se limitan a topilralisib, idelalisib, buparlisib. Los inhibidores de mTOR tales como rapamicina, sirolimus, temsirolimus y everolimus se pueden combinar con compuestos de la invención. Otros ejemplos adecuados incluyen, pero no se limitan a, 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), cinasas 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 compuestos de la presente invención. Un ejemplo
- 25
- 30 adicional de un inhibidor de PARP que se puede combinar con un compuesto de la invención es talazoparib.

- 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
- 35 en la "Physicians' Desk Reference" (PDR, por ejemplo, edición de 1996, Medical Economics Company, Montvale, NJ), cuya descripción se incorpora en la presente como referencia como si estuviera descrita 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 administrará a un sujeto que necesita terapia o tratamiento que alivia un síntoma, mejora una afección, o ralentiza la aparición de las afecciones de la enfermedad, de acuerdo con los estándares clínicamente aceptables para el trastorno o afección que se va a tratar. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente efectiva puede ser una cantidad que se ha demostrado que tiene un efecto terapéutico deseado en un ensayo *in vitro*, un ensayo en animal *in vivo* o un ensayo clínico. La cantidad terapéuticamente efectiva puede variar con base en la forma de dosificación particular, método de administración, protocolo de tratamiento, enfermedad o afección específica a tratar, relación beneficio/riesgo, etc., entre muchos otros factores.

Dicha cantidad terapéuticamente efectiva se puede obtener a partir 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 se puede calcular a partir de la cantidad efectiva determinada a partir de un modelo animal o un ensayo de cultivo celular *in vitro*. Por ejemplo, como se reporta por Reagan-Shaw et al., FASEB J. 2008: 22(3) 659-61, “ $\mu\text{g/ml}$ ” (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 ser humano se puede calcular a partir de la cantidad efectiva para un ratón con base 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 que usa un compuesto de fórmula (I) en combinación con un agente citotóxico, se puede administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de fórmula (I) a un paciente que padece cáncer como parte de un régimen de tratamiento que también involucra 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 el campo del tratamiento del cáncer entenderán cómo ajustar las dosis para lograr el resultado terapéutico óptimo.

De manera similar, los expertos en la técnica médica 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 la presente incluye la administración de un compuesto o composición que reduce la frecuencia, retrasa el inicio o reduce la progresión de los síntomas de una enfermedad que involucra tejido enfermo ácido o hipóxico, tal como cáncer, apoplejía, infarto de miocardio, o enfermedad neurodegenerativa a largo plazo, en un sujeto en relación con un sujeto que no recibe el compuesto o la composición. Esto puede incluir revertir, reducir o detener los síntomas, signos clínicos o patología subyacente de una afección de una manera para mejorar o estabilizar la afección de un sujeto (por ejemplo, regresión del crecimiento de tumor, para el cáncer o disminuir o mejorar la lesión por reperusión de isquemia miocárdica en infarto de miocardio,

apoplejía o enfermedad cardiovascular similar). Los términos “inhibir” o “reducir” se usan para el cáncer en referencia a los métodos para inhibir o reducir el crecimiento de tumor (por ejemplo, disminuir el tamaño de un tumor) en una población en comparación con una población de control no tratada.

- 5 Todas las publicaciones (incluyendo las patentes) mencionadas en la presente se incorporan en la presente como referencia con el propósito de describir y divulgar, por ejemplo, las construcciones y metodologías que se describen en las publicaciones, que se podrían usar en relación con la descripción descrita en la presente. Las publicaciones discutidas a lo largo del texto se proporcionan únicamente para su descripción antes de la fecha de presentación de la presente solicitud.
- 10 En la presente se describen varios tipos de rangos. Cuando se describe o reivindica un rango de cualquier tipo, la intención es describir o reivindicar individualmente cada número posible que tal rango podría abarcar razonablemente, incluyendo los puntos finales del rango, así como cualquier subrango y combinación de subrangos abarcados. en esto. Cuando se describe o reivindica un rango de cantidades terapéuticamente efectivas de un ingrediente activo, por ejemplo, la intención
- 15 es describir o reivindicar individualmente cada número posible que tal rango pudiera abarcar, consistente con la descripción en la presente. Por ejemplo, mediante una descripción de que la cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto puede estar en un rango de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg (del peso corporal del sujeto).

20 *Formulación, Formas de Dosificación y Administración*

- Para preparar las composiciones farmacéuticas de la presente invención, se combina un compuesto de Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como el ingrediente activo en una mezcla íntima con un portador farmacéutico de acuerdo con las técnicas de composición farmacéutica convencionales, el portador puede tomar una amplia una variedad de formas
- 25 dependiendo de la forma de preparación deseada para la administración, por ejemplo, oral o parenteral. Al preparar 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 saborizantes, conservadores, agentes colorantes y similares en el caso de preparaciones líquidas orales tales como, por ejemplo, suspensiones, elixires y soluciones; o
 - 30 portadores tales como almidones, azúcares, diluyentes, agentes de granulación, lubricantes, aglutinantes, agentes desintegrantes y similares en el caso de preparaciones sólidas orales, tales como, por ejemplo, polvos, cápsulas y tabletas. Debido a su facilidad de administración, las tabletas y cápsulas representan la forma unitaria de dosificación oral más ventajosa, en cuyo caso obviamente se emplean portadores farmacéuticos sólidos. Si se desea, las tabletas se pueden
 - 35 recubrir con azúcar o recubrir entéricamente mediante técnicas estándar. Para los parenterales, el portador comprenderá normalmente agua estéril, aunque se pueden incluir otros ingredientes, por

ejemplo, para ayudar a la solubilidad o con fines de conservación. También se pueden preparar suspensiones inyectables, en cuyo caso se pueden emplear portadores líquidos apropiados, agentes de suspensión y similares. Un experto en las técnicas farmacéutica y médica podrá determinar fácilmente una dosis adecuada de las composiciones farmacéuticas de la invención para la enfermedad o afección particular a tratar.

EJEMPLOS

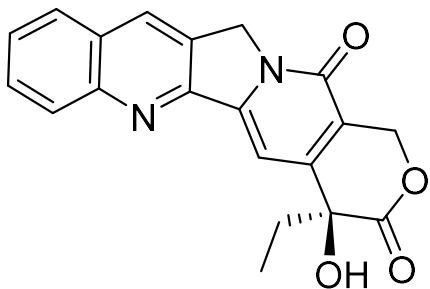
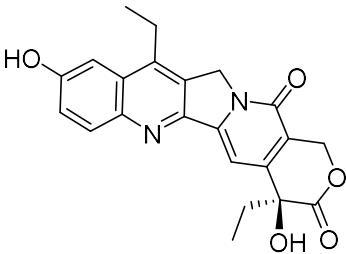
Como se usa en la presente, todas las abreviaturas, símbolos y convenciones son consistentes con los usados en la literatura científica contemporánea. Ver, por ejemplo, Janet S. Dodd, ed., *The ACS Style Guide: A Manual for Authors and Editors*, 2nd Ed., Washington, DC: American Chemical Society, 1997. Las siguientes definiciones describen términos y abreviaturas usados en la presente:

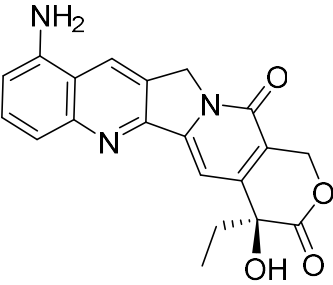
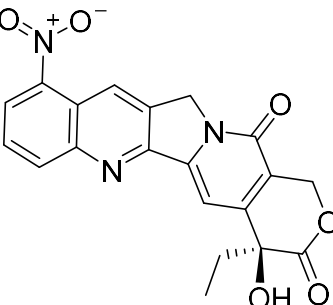
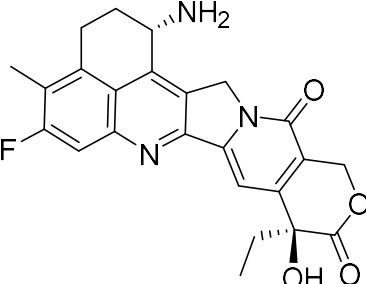
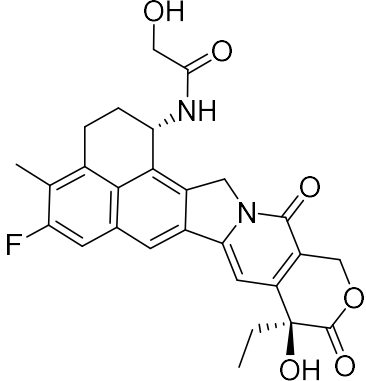
- Salmuera: una solución saturada de NaCl en agua
- DCM: diclorometano
- TFA: ácido trifluoroacético
- 15 • DIPEA: diisopropiletilamina
- DMA: dimetilacetamida
- DME: dimetoxietano
- DMF: dimetilformamida
- DMSO: metilsulfóxido
- 20 • DTT: ditioneitol
- MSD: detector de espectrometría de masas
- Et₂O: éter etílico
- EtOAc: acetato de etilo
- EtOH: alcohol etílico
- 25 • HATU: hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio
- HOBt: 1-hidroxibenzotriazol

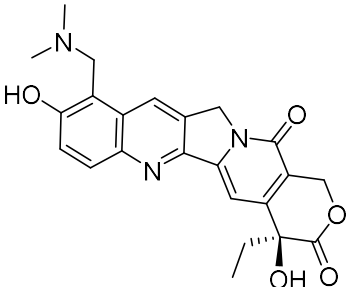
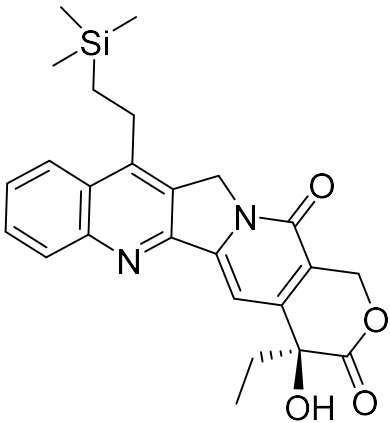
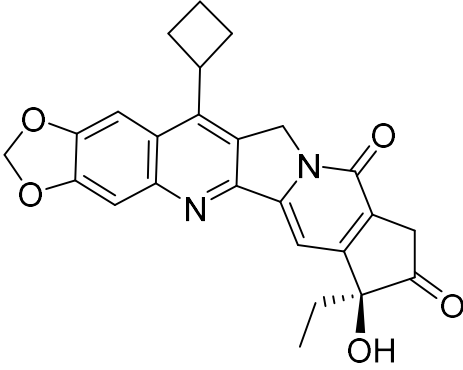
- RP: fase inversa
 - HPLC: cromatografía líquida de alta resolución
 - IPA: isopropanol
 - LAH: hidruro de litio y aluminio
- 5
- N-BuLi: n-butil litio
 - LC-MS: cromatografía líquida-espectrometría de masas
 - LDA: diisopropiletilamida de litio
 - Me: metilo
 - MeOH: metanol
- 10
- MTBE: metil t-butil éter
 - NMP: N-metilpirrolidina
 - Ph: fenilo
 - PNPC: para-nitrofenilcloroformiato
 - RT o rt: temperatura ambiente
- 15
- SFC: cromatografía de fluidos supercríticos
 - TBAI: yoduro de tetrabutilamonio
 - TBME: terc-butilmetil éter
 - tBu: butilo terciario
 - THF: tetrahidrofurano
- 20
- TEA: trietilamina
 - TMEDA: tetrametiletilendiamina
 - GSH: Glutación
 - GS: Glutación unido a azufre

- LiOH: hidróxido de litio
 - DPPA: difenil fosforil azida
 - $\text{Sn}(\text{Bu})_2(\text{laurato})_2$: dilaurato de dibutilestaño
 - PBS: solución salina amortiguada con fosfato
- 5
- ACN: acetonitrilo
 - AcOH: ácido acético
 - EEDQ: *N*-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinolina
 - DMAP: 4-dimetilaminopiridina
 - EDC: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
- 10
- La fuente de los materiales de partida empleados en los Ejemplos se describe a continuación en las siguientes tablas.

Tabla 2. Materiales de partida para R⁸

Código de R ⁸	Estructura de R ⁸ H	Referencia de Síntesis o Adquirido
R ⁸ H-1		Medchem Express HY-16560
R ⁸ H-2		MedKoo 406280

R ⁸ H-3		AstaTech F11420
R ⁸ H-4		AstaTech 42333
R ⁸ H-5		Medchem Express HY-13631A
R ⁸ H-6		Medchem Express HY-13631D

R ⁸ H-7		AstaTech 21428
R ⁸ H-8		Medchem Express HY-14812
R ⁸ H-9		US 20030105109 A1

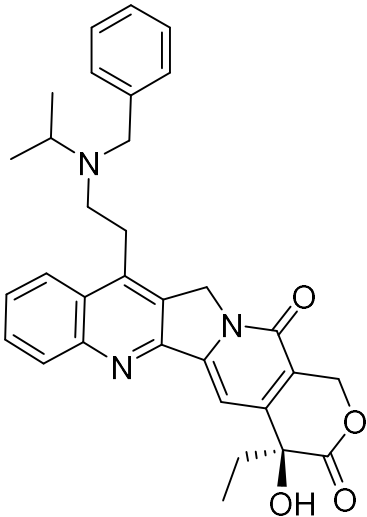
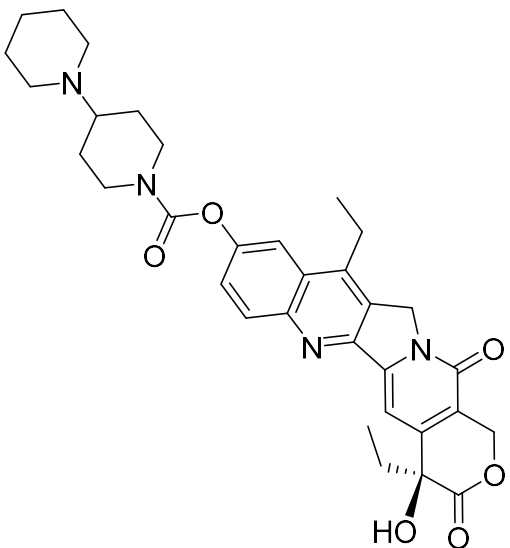
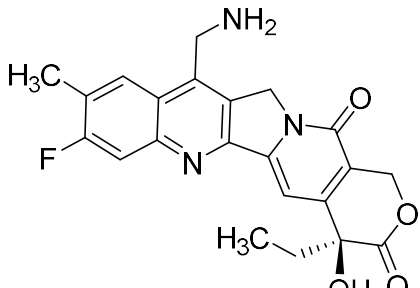
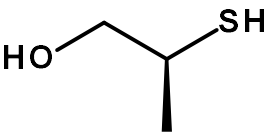
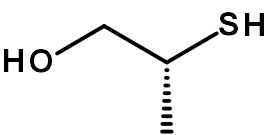
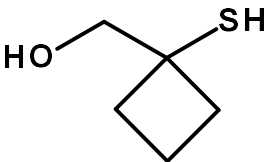
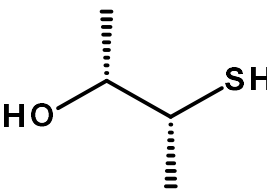
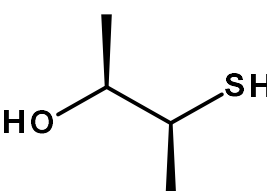
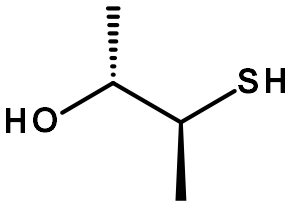
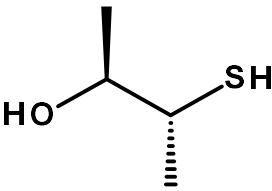
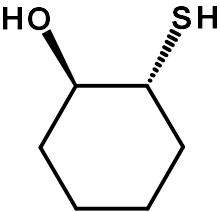
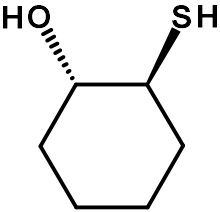
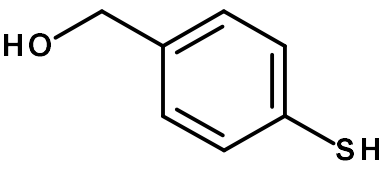
R ⁸ H-10		WO 9902530 A1
R ⁸ H-11		Medchem Express: Cat. No.: HY-16562
R ⁸ H-12		Widdison et al., ACS Medicinal Chemistry Letters 2019 10 (10), 1386-1392

Tabla 3. Materiales de Partida para Enlazadores

Código de Enlazador	Estructura del Enlazador	Referencia de Síntesis o Adquirido
L-1		Sintetizado WO2013055987A1
L2		Sintetizado WO2013055987A1
L3		Sintetizado ACS Med. Chem. Lett. 2016, 7, 988–993
L4		R, R*
L5		S, S*

L6		R, S*
L7		S, R*
L8		R, R*
L9		S, S*
XV-1		Combiblocks OR-5865

*Configuración absoluta asignada aleatoriamente

Los métodos de HPLC empleados se describen a continuación:

Métodos de HPLC

A: Sunfire C18 150x4.6mm; H₂O/Acetonitrilo con modificador de TFA (0.05%); Velocidad de flujo: 1ml/min; Longitud de onda = 217 nM.

5 B: Ace Equivalence 250x4.6mm; H₂O/Acetonitrilo con modificador de TFA (0.05%); Velocidad de flujo: 1ml/min; Longitud de onda = 217 nM.

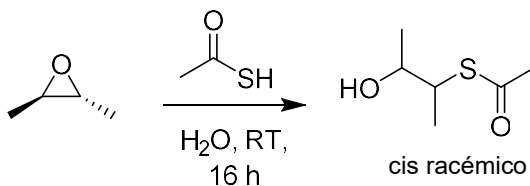
C: Sunfire C18 150x30mm; H₂O/Acetonitrilo con modificador de TFA (0.05%); Velocidad de flujo: 30ml/min; Longitud de onda = 217 nM.

Métodos de Espectrometría de Masas

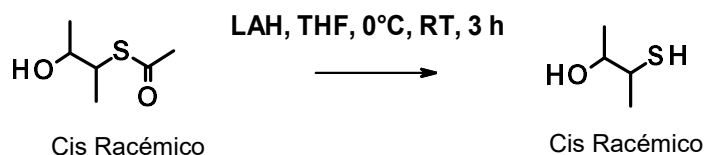
10 La espectrometría de masas Maldi-TOF (Desorción/ionización láser asistida por matriz – Tiempo de Vuelo) se midió en un Applied Biosystems Voyager System 6268. La muestra se preparó como una matriz de ácido α -ciano hidroxí cinámico en una placa AB Science (Pieza # V700666).

La espectrometría de masas por ESI (Ionización por Electrorroció) se midió ya sea en LC-MS serie Agilent 1100 con un 1946 MSD o una MS de alta resolución Waters Xevo Qtof, ambas
15 proporcionaron una masa/carga de especie ($m/z=3$).

Síntesis de *cis*-S-(3-hidroxibutan-2-il) etanotioato (L-4 y L-5)

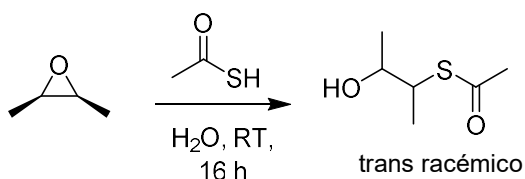


20 A una solución agitada de trans-2,3-dimetiloxirano (5.0 g, 69.3 mmol) en agua (50 ml) se añadió ácido tioacético (5.8 ml, 76.2 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. La mezcla de reacción se apagó con solución saturada de bicarbonato de sodio (10 ml) y se extrajo con acetato de etilo (200 ml). La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y luego se evaporó bajo presión reducida para proporcionar *cis*-S-(3-hidroxibutan-2-il) etanotioato como un compuesto aceitoso (4.0 g, crudo). MS m/z 149.0 $[M+H]^+$.

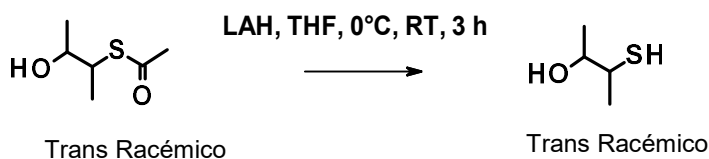
Síntesis de *cis*-3-Mercaptobutan-2-ol

5 A una solución agitada de S-(3-hidroxibutan-2-il) etanotioato (4 g, 26.9 mmol) en THF (40 ml) se añadió hidruro de litio y aluminio (solución 1 M en THF) (27 ml, 26.9 mmol) por goteo a 0°C. La mezcla de reacción se dejó entibiar gradualmente a temperatura ambiente y se agitó durante 3 horas. La mezcla de reacción se apagó lentamente con HCl 1 N a 0°C y el pH se ajustó a 2-3. La mezcla de reacción se extrajo en acetato de etilo (50 ml) y la capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se evaporó para obtener *cis*-3-mercaptobutan-2-ol como un compuesto aceitoso crudo.

10

Síntesis de *trans*-S-(3-hidroxibutan-2-il) etanotioato (L-6 y L-7)

15 A una solución agitada de *cis*-2,3-dimetiloxirano (1.0 g, 13.9 mmol) en agua (15 ml) se añadió ácido tioacético (1.1 ml, 15.6 mmol) a temperatura ambiente y se agitó durante 16 h. La mezcla de reacción se apagó con solución de bicarbonato de sodio (10 ml) y se extrajo con acetato de etilo (20 ml). La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y luego se evaporó bajo presión reducida para proporcionar *trans*-S-(3-hidroxibutan-2-il) etanotioato como aceite amarillo (0.7 g crudo).

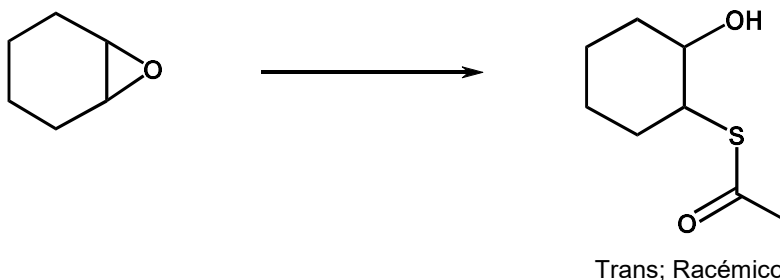
Síntesis de *trans*-3-mercaptobutan-2-ol

20

A una solución agitada de *trans*-S-(3-hidroxibutan-2-il) etanotioato (700 mg, 4.72 mmol) en THF (10 ml) se añadió hidruro de litio y aluminio (solución 1 M en THF) (4.8 ml, 4.72 mmol) por goteo a 0°C y se agitó a la misma temperatura durante 3 h. La mezcla de reacción se apagó con HCl 1 N a 0°C

luego el pH se ajustó a 2-3. La mezcla de reacción se extrajo con CH_2Cl_2 (10 ml). La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se tomó directamente para el siguiente paso.

Síntesis de *trans*-S-(2-hidroxiciclohexil) etanotioato (L-8 y L-9)

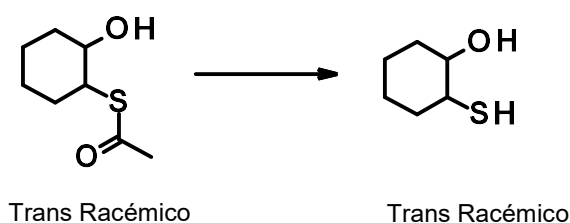


5

A una solución agitada de 7-oxabicyclo[4.1.0]heptano (5.0 g, 51.0 mmol) en agua (50.0 ml) se añadió ácido tioacético (4.92 ml, 61.0 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 16 h a temperatura ambiente. El progreso de la reacción se monitoreó por TLC (20% EtOAc/Hexano). Después de la terminación de la reacción, la mezcla de reacción se diluyó con éter dietílico. La capa orgánica se separó y se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró bajo presión reducida para proporcionar *trans*-S-(2-hidroxiciclohexil) etanotioato como un líquido color marrón (3.8 g crudo).

10

Síntesis de *trans*-2-mercaptociclohexan-1-ol

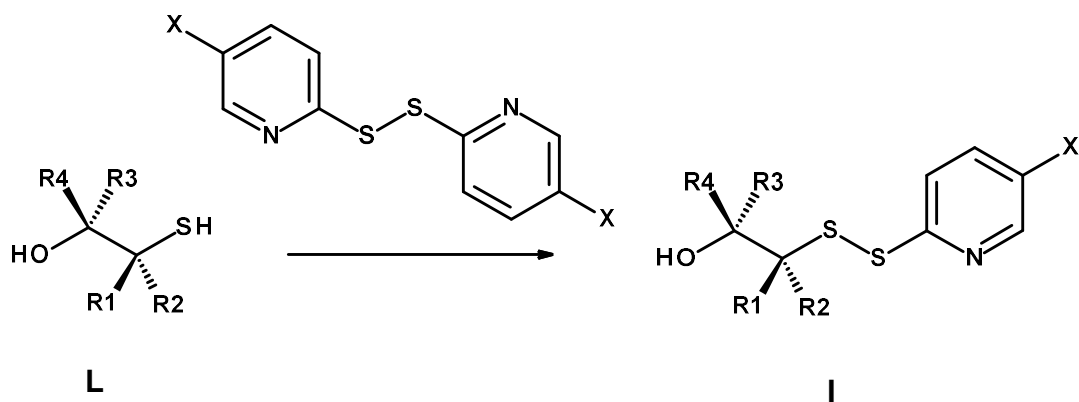


15

A una solución agitada de *trans*-S-(2-hidroxiciclohexil) etanotioato (3.8 g, 21.8 mmol) en THF (20.0 ml) se añadió LiAlH_4 1 M en THF (21.8 ml, 21.8 mmol) a 0°C . La mezcla de reacción se dejó entibiar gradualmente a temperatura ambiente y se agitó durante 1 h. El progreso de la reacción se monitoreó por TLC (20% EtOAc/Hex). Tras la terminación de la reacción, la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se apagó con HCl 1.0 N (30 ml). La mezcla de reacción se extrajo en CH_2Cl_2 (30.0 ml). La capa orgánica se lavó con solución de salmuera (30.0 ml), se concentró y el *trans*-2-sulfanilciclohexanol crudo se tomó para el siguiente paso. (2.88 g, crudo).

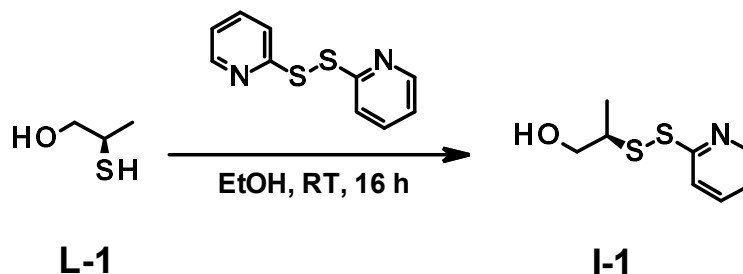
20

Síntesis del Intermediario I a partir del L



Int.	R ¹ , R ²	R ³ , R ⁴	X	Método/Ref.	MH ⁺
I-1	H, Me	H, H	H	WO2013055987A1	202.1
I-2	Me, H	H, H	H	WO2013055987A1	202.1
I-3	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ -	H, H	NO ₂	ACS Med. Chem. Lett. 2016, 7, 988–993	272.9
I-4	H, Me	Me, H	H		216.1
I-5	Me, H	H, Me	H		216.1
I-6	Me, H	Me, H	H		215.9
I-7	H, Me	H, Me	H		216.2
I-8	$\begin{array}{cc} \text{CH}_2, \text{H} & \text{CH}_2, \text{H} \\ & \\ \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2 & \end{array}$		H		
I-9	$\begin{array}{cc} \text{H}, \text{CH}_2 & \text{H}, \text{CH}_2 \\ & \\ \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2 & \end{array}$		H		

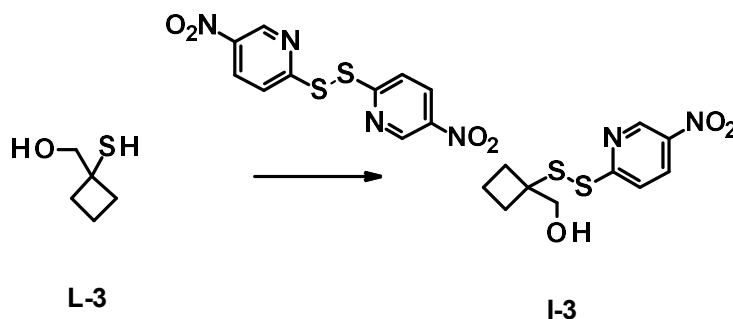
Síntesis del Intermediario I-1: (2R)-2-(2-piridildisulfanil)propan-1-ol



A la 2-(2-piridildisulfanil)piridina (5.00 g, 22.7 mmol) en 40 ml de MeOH desgasificado con N₂ se añadió (2R)-2-sulfanilpropan-1-ol (0.75 g, 8.14 mmol) en una manera por goteo. La mezcla se agitó durante 2 h bajo N₂. La mezcla se concentró hasta sequedad y se cargó directamente sobre una columna instantánea de SiO₂ y se eluyó con 0-50% EtOAc/Hexanos para producir 1.17 g, 71% de (2R)-2-(2-piridildisulfanil)propan-1-ol. MS m/z 202.1 [M+H]⁺.

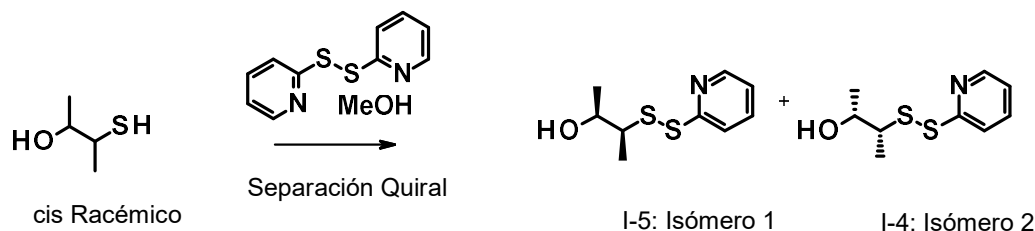
El Intermediario I-2 se preparó a partir de L-2 de una manera análoga

10 Síntesis del Intermediario I-3: [1-[(5-nitro-2-piridil)disulfanil]ciclobutil]metanol



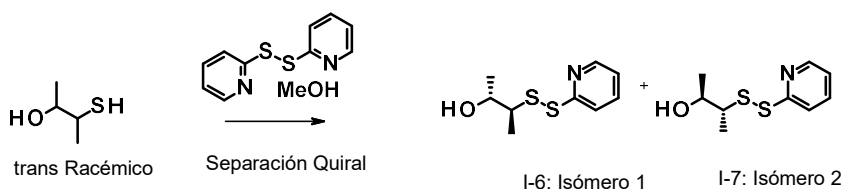
A una solución de 5-nitro-2-[(5-nitro-2-piridil)disulfanil]piridina (17.4 g, 56.0 mmol) en MeOH desgasificado (N₂) (100 ml) se añadió (1-mercaptociclobutil)metanol (8.3 ml, 70.0 mmol) (desgasificado con N₂) en una manera por goteo y se agitó durante 16 h a temperatura ambiente bajo atmósfera de N₂. La mezcla de reacción se concentró hasta sequedad bajo vacío. El crudo resultante se purificó por cromatografía de columna usando 30% EtOAc/hexanos para proporcionar [1-[(5-nitro-2-piridil)disulfanil]ciclobutil]metanol como un líquido amarillo (9.0 g, 46% de rendimiento). MS m/z 272.9 [M+H]⁺.

20 Síntesis del I-4 e I-5: 3-(piridin-2-ildisulfanil)butan-2-ol Isómero 1 e Isómero 2



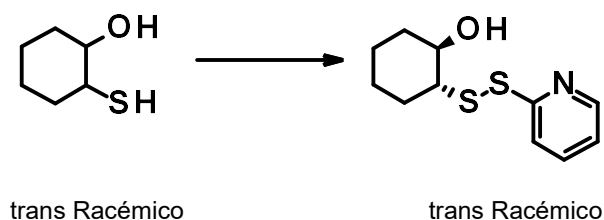
Una solución agitada de 2,2-dipiridildisulfuro (520 mg, 2.35 mmol) en MeOH (15 ml) se purgó con gas nitrógeno durante 5 min. La solución purgada con gas nitrógeno de *cis*-3-mercaptobutan-2-ol (500 mg) en CH₂Cl₂ (10 ml) se añadió a esta a 0°C. La mezcla de reacción se dejó entibiar gradualmente a temperatura ambiente y se agitó durante 16h. La mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida para proporcionar material crudo que se purificó por cromatografía de columna usando 30-40% EA/hexano. El producto racémico se separó con HPLC Preparativa Quiral (CHIRALPAK IG; 100mm X 4.6mm X 3mic; Fase móvil : nHexano :Etanol 80:20 con 0.1% DEA; Velocidad de flujo : 1.0 ml/min) para separar los enantiómeros respectivos. Los solventes se removieron para obtener (2S,3S)-3-(2-piridildisulfanil)butan-2-ol* (140 mg, Isómero-1) MS m/z 216.1 [M+H]⁺ y (2R,3R)-3-(2-piridildisulfanil)butan-2-ol (140 mg, Isómero-2). MS m/z 216.1 [M+H]⁺.

Síntesis del I-6 e I-7: 3-(piridin-2-ildisulfanil)butan-2-ol Isómero 1 e Isómero 2

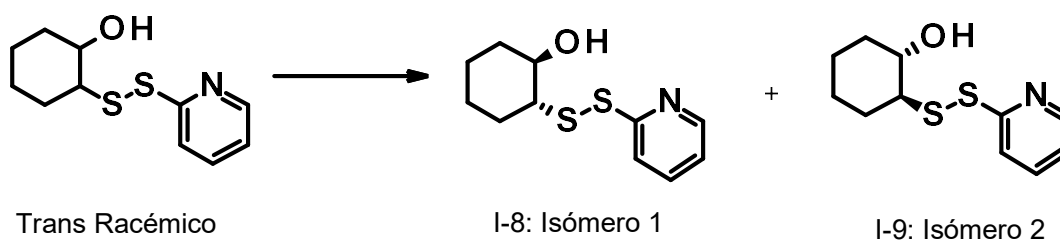


Una solución agitada de 2,2-dipiridildisulfuro (520 mg, 2.35 mmol) en MeOH (15 ml) se purgó con gas nitrógeno durante 5 min. La solución purgada con gas nitrógeno de *cis*-3-mercaptobutan-2-ol (500 mg) en CH₂Cl₂ (10 ml) se añadió a esta a 0°C. La mezcla de reacción se dejó entibiar gradualmente a temperatura ambiente y se agitó durante 16h. La mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida para proporcionar material crudo que se purificó por cromatografía de columna usando 30-40% EA/hexano. El producto racémico se separó con HPLC Preparativa Quiral (Columna: CHIRALPAK IG (100mm X 4.6mm X 3mic) Fase móvil : nHexano :Etanol con 0.1% DEA (80:20) Velocidad de flujo : 1.0 ml/min) para separar los enantiómeros respectivos. Los solventes se removieron para obtener (2R,3S)-3-(2-piridildisulfanil)butan-2-ol* (0.6 g, Isómero-I) MS m/z 215.9 [M+H]⁺ y (2S,3R)-3-(2-piridildisulfanil)butan-2-ol* (0.6 g, Isómero-II) MS m/z 216.2 [M+H]⁺ como compuestos aceitosos.

Síntesis del Intermediario I-6: Trans-2-(piridin-2-ildisulfanil)ciclohexan-1-ol

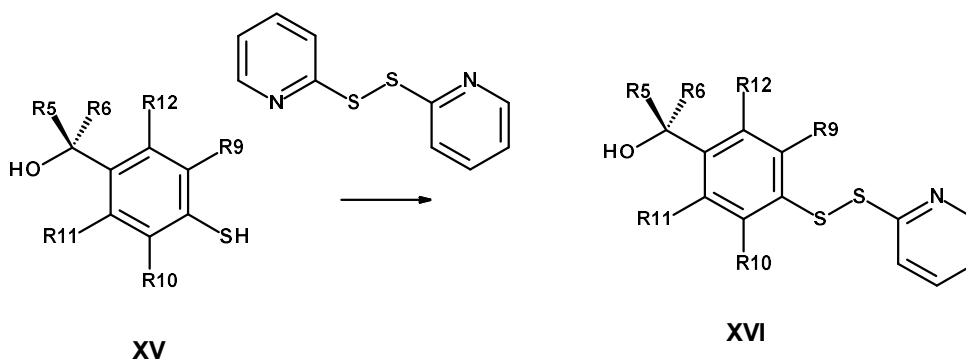


- 5 A una solución de 1,2-di(piridin-2-il)disulfano (2.41 g, 10.9 mmol) en MeOH (desgasificado con N₂) (30 ml) se añadió *trans*-2-sulfanilciclohexanol (2.88 g, 21.0 mmol) (desgasificado con N₂) por goteo y se agitó durante 16 h a temperatura ambiente bajo atmósfera de N₂. La mezcla de reacción se concentró hasta sequedad bajo vacío. El crudo resultante se purificó por cromatografía de columna usando 30% de EtOAc/hexanos para proporcionar *trans*-2-(piridin-2-ildisulfanil)ciclohexan-1-ol como un líquido de color amarillo.



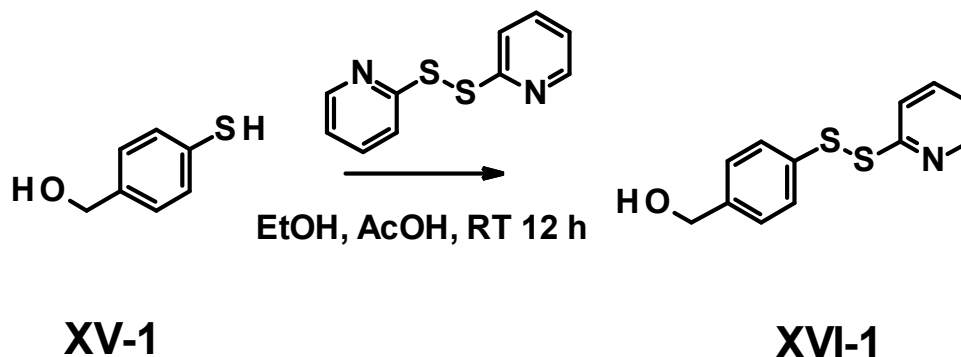
- 10 La separación quiral se realizó por chiralpak IG (100 mm X 4.6 mm X 3 mic) usando n-hexano: IPA con 0.1% dietilamina (80:20) para proporcionar (1R,2R)-2-(2-piridildisulfanil)ciclohexanol* Isómero-1 (350 mg) y (1S,2S)-2-(2-piridildisulfanil)ciclohexanol* Isómero-2 (400 mg).

Intermediario XV a partir del XXI



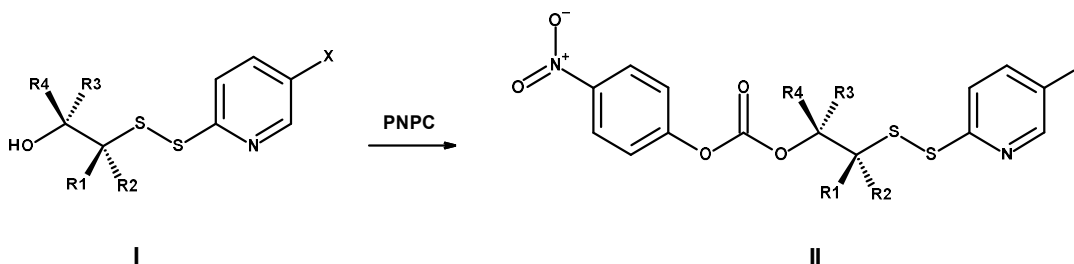
Int.	R ⁵ , R ⁶	R ⁹ , R ¹⁰ , R ¹¹ , R ¹²	MH ⁺
XV-1	H, H	H, H, H, H	250.1

Síntesis del Intermediario XV-1: [4-(2-piridildisulfanil)fenil]metanol



Una solución agitada de 1,2-di(piridin-2-il)disulfano (2.68 g, 12.1 mmol) en mezcla de solvente de AcOH : etanol (5 ml, 1:10) se desgasificó bajo N₂. Esto fue seguido por la adición de 4-mercaptofenil]metanol (0.74 g, 5.2 mmol) en mezcla de solvente de AcOH/etanol (5 ml) por goteo durante 20 min y se agitó durante 12 h bajo atmósfera de N₂ a temperatura ambiente. La reacción se concentró bajo presión reducida para proporcionar el producto crudo que se purificó por cromatografía de columna (SiO₂, 60-70% EtOAc/hexanos) para proporcionar [4-(2-piridildisulfanil)fenil]metanol como un líquido incoloro (800 mg, 61% de rendimiento).

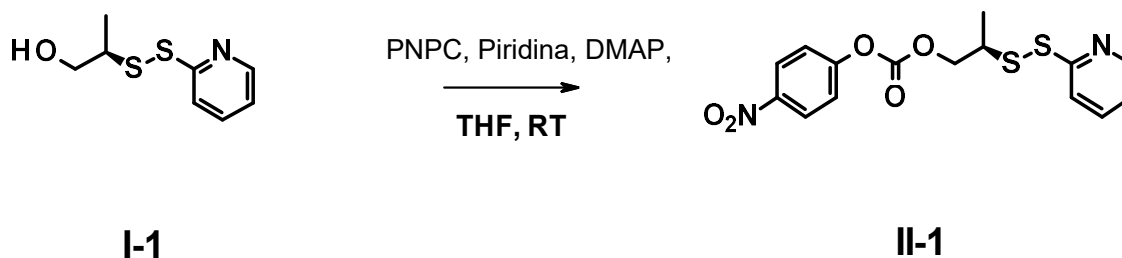
Intermediario II de Grupo Saliente de Carbonato a partir del Intermediario I



Int.	R ¹ , R ²	R ³ , R ⁴	X	MH ⁺
II-1	H, Me	H, H	H	367.1

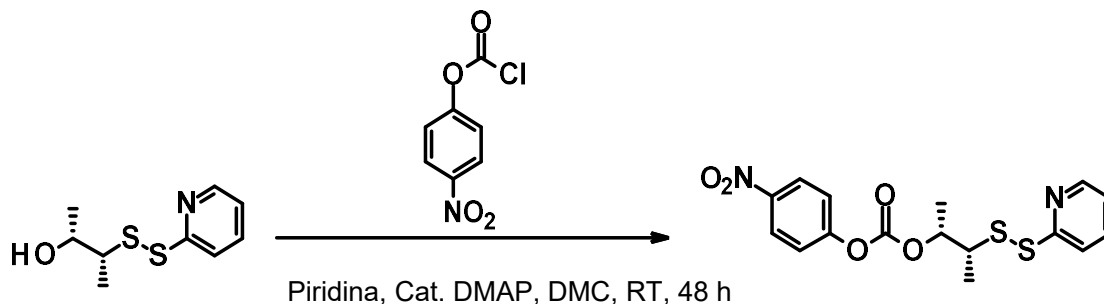
II-2	Me, H	H, H	H	367.1
II-3	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ -	H, H	NO ₂	438.0
II-4	H, Me	Me, H	H	381.0
II-5	Me, H	H, Me	H	381.0
II-6	Me, H	Me, H	H	381.0
II-7	H, Me	H, Me	H	381.0
II-8	$\begin{array}{c} \text{CH}_2, \text{H} \quad \text{CH}_2, \text{H} \\ \quad \\ \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2 \end{array}$		H	407.0
II-9	$\begin{array}{c} \text{H}, \text{CH}_2 \quad \text{H}, \text{CH}_2 \\ \quad \\ \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2 \end{array}$		H	406.7

Síntesis del II-1: (4-nitrofenil) [(2R)-2-(2-piridildisulfanil)propil] carbonato



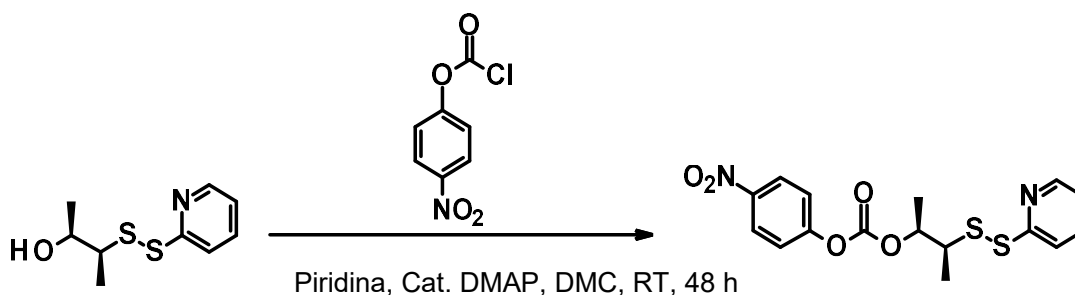
- 5 A (2R)-2-(2-piridildisulfanil)propan-1-ol (0.39 g, 1.94 mmol) en THF bajo N₂ se añadió piridina (0.16 ml, 1.94 mmol) y el (4-nitrofenil) carbonocloridato (0.59 g, 2.91 mmol). La mezcla se agitó durante 16 h bajo N₂. La mezcla se diluyó con EtOAc y se apagó con 20 ml de NH₄Cl sat.. La mezcla se lavó con agua y salmuera y la capa orgánica se concentró. La mezcla cruda se purificó por cromatografía de columna (SiO₂, 0-50% EtOAc/Hexanos) para proporcionar 0.59 g, 83% de (4-nitrofenil) [(2R)-2-(2-piridildisulfanil)propil] carbonato. MS m/z encontrado 367.1 [M+H]⁺.
- 10 Los Intermediarios II-2 y II-3 se sintetizaron de manera análoga al II-1.

Síntesis del II-4: 4-nitrofenil((2R,3R)-3-(piridin-2-ildisulfanil)butan-2-il) carbonato



A una solución agitada de (2R,3R)-3-(piridin-2-ildisulfanil) butan-2-ol (140mg, 0.651 mmol) en CH_2Cl_2 (2.0 ml) se añadió piridina (0.11 ml, 1.43 mmol), 4-nitrofenil carbonocloridato (150 mg, 0.781 mmol) y cantidad catalítica de 4-dimetilaminopiridina a temperatura ambiente. El recipiente de reacción se selló y se agitó a RT durante 48 h. La mezcla de reacción se diluyó con CH_2Cl_2 (10 ml) y luego se lavó con agua (10 ml). La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró bajo presión reducida para proporcionar el crudo que se purificó por cromatografía de columna usando 30-40% acetato de etilo/hexano. Las fracciones se concentraron para obtener el crudo que se purificó adicionalmente sobre columna de fase inversa C18. Las fracciones puras se concentraron para obtener 4-nitrofenil((2R,3R)-3-(piridin-2-ildisulfaneil)butan-2-il) carbonato (70 mg, 28%) como un compuesto aceitoso. MS m/z 381.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

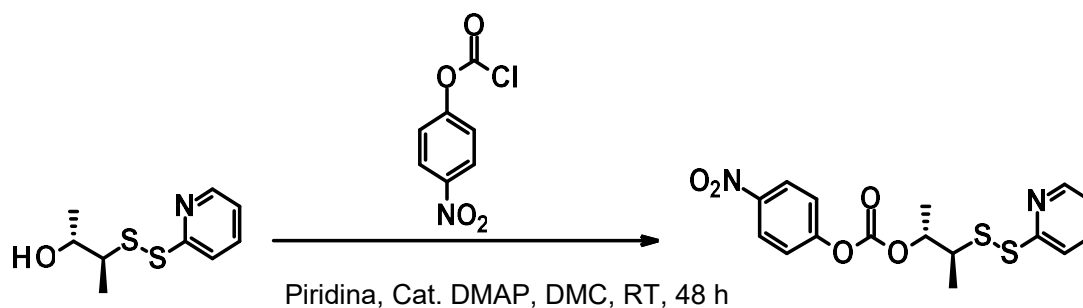
Síntesis del II-5: 4-nitrofenil((2S,3S)-3-(piridin-2-ildisulfanil)butan-2-il) carbonato



A una solución agitada de (2S,3S)-3-(piridin-2-ildisulfanil)butan-2-ol (80mg, 0.372 mmol) en CH_2Cl_2 (1.0 ml) se añadió piridina (0.066 ml, 0.818 mmol), 4-nitrofenilcarbonocloridato (89 mg, 0.446 mmol) y cantidad catalítica de 4-dimetilaminopiridina a temperatura ambiente. El recipiente de reacción se selló y se agitó a RT durante 48h. La mezcla de reacción se diluyó con CH_2Cl_2 (5 ml) y luego se lavó con agua (5 ml). La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró bajo presión reducida para proporcionar el producto del título crudo que se purificó por cromatografía de columna usando 30-40% acetato de etilo/Hexano. Las fracciones se concentraron para obtener el crudo que se purificó adicionalmente sobre columna de fase inversa C18. Las fracciones puras se concentraron para obtener 4-nitrofenil ((2S,3S)-3-(piridin-2-ildisulfanil)butan-2-il) carbonato (140 mg, 58%) como

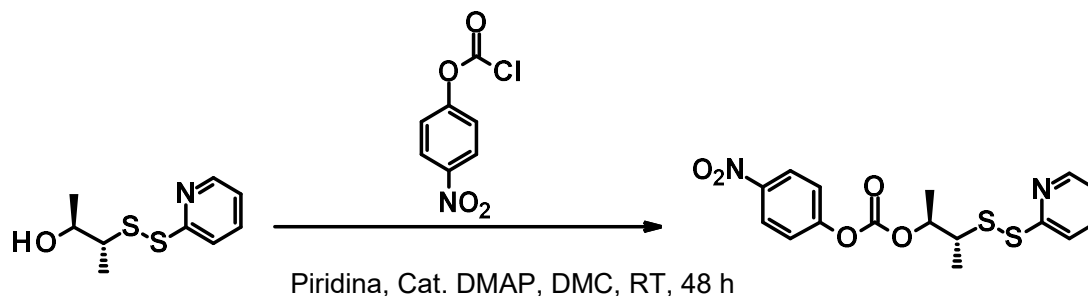
un compuesto aceitoso. MS m/z 381,0 [M+H]⁺.

Síntesis del II-6: 4-nitrofenil((2R,3S)-3-(piridin-2-ildisulfanil)butan-2-il) carbonato



- 5 A una solución agitada de (2R,3S)-3-(piridin-2-ildisulfanil)butan-2-ol (0.4 g, 1.86 mmol) en CH₂Cl₂ (10 ml) se añadió piridina (0.36 ml, 4.09 mmol), 4-nitrofenil carbonocloridato (0.44 g, 2.32 mmol) y cantidad catalítica de 4-dimetilaminopiridina a 0°C. El recipiente de reacción se selló y se agitó a temperatura ambiente durante 48h. La mezcla de reacción se diluyó con CH₂Cl₂ (20 ml) y se lavó con agua (20 ml). La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró bajo
- 10 presión reducida para proporcionar el crudo que se purificó por cromatografía de columna instantánea en gel de sílice usando 30-40% acetato de etilo/hexano. El compuesto se eluyó como una mezcla en 30% EtOAc:Hexano. Las fracciones se concentraron para obtener el crudo que se purificó adicionalmente sobre columna de fase inversa C18. Las fracciones puras se evaporaron para obtener 4-nitrofenil ((2R,3S)-3-(piridin-2-ildisulfanil)butan-2-il) carbonato (0.17 g, 24.2%) como
- 15 un compuesto aceitoso. MS m/z 381.0 [M+H]⁺.

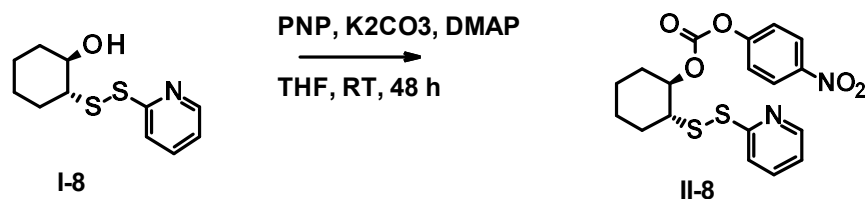
Síntesis del II-7: 4-nitrofenil((2S,3R)-3-(piridin-2-ildisulfanil)butan-2-il) carbonato



- 20 A una solución agitada de (2S,3R)-3-(piridin-2-ildisulfanil)butan-2-ol (0.4 g, 1.86 mmol) en CH₂Cl₂ (10 ml) se añadió piridina (0.36 ml, 4.09 mmol), 4-nitrofenil carbonocloridato (0.44 g, 2.32 mmol) y cantidad catalítica de 4-dimetilaminopiridina a 0°C. El recipiente de reacción se selló y se agitó a

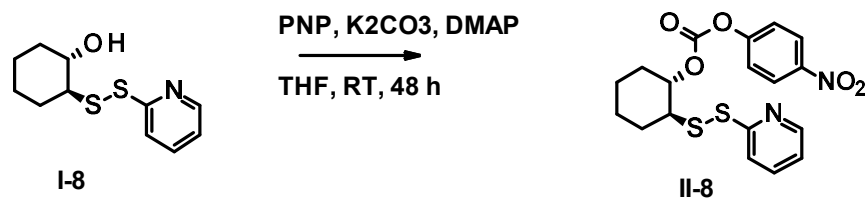
temperatura ambiente durante 48h. La mezcla de reacción se diluyó con CH₂Cl₂ (20 ml) y se lavó con agua (20 ml). La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró bajo presión reducida para proporcionar el crudo que se purificó por cromatografía de columna instantánea en gel de sílice usando 30-40% acetato de etilo/hexano. El compuesto se eluyó como una mezcla en 30% EtOAc:Hexano. Las fracciones se concentraron para obtener el crudo que se purificó adicionalmente sobre columna de fase inversa C18. Las fracciones puras se concentraron para obtener 4-nitrofenil ((2S,3R)-3-(piridin-2-ildisulfanil)butan-2-il) carbonato (0.18 g, 26%) como un compuesto aceitoso. MS m/z 381.0 [M+H]⁺.

10 Síntesis del II-8: (4-nitrofenil) [(1R,2R)-2-(2-piridildisulfanil)ciclohexil] carbonato



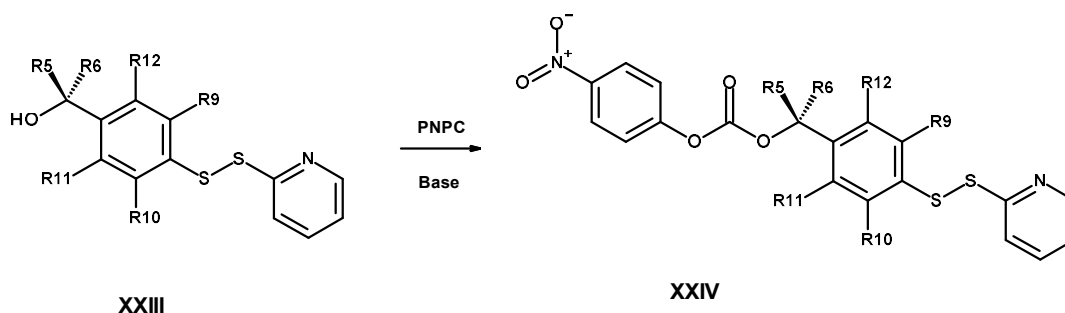
A una solución de (1R,2R)-2-(2-piridildisulfanil)ciclohexanol* (130.0 mg, 0.5 mmol) en THF (3.0 ml) se añadió carbonato de potasio (0.20 g, 1.5 mmol), cantidad catalítica de DMAP y 4-nitrofenil cloroformiato (0.21 g, 0.10 mmol) a temperatura ambiente. El recipiente de reacción se selló y se agitó a RT durante 48 h. El progreso de la reacción se monitoreó por TLC (20% EtOAc/Hex). Después de la terminación de la reacción, la mezcla de reacción se apagó con agua (20.0 ml) y se extrajo con EtOAc (20.0 ml). La capa orgánica se separó, se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró bajo presión reducida para proporcionar el producto crudo que se purificó por cromatografía de columna usando 20-30% de EtOAc/hexanos para proporcionar 4-nitrofenil ((1R,2R)-2-(2-piridildisulfanil)ciclohexil) carbonato* como un sólido blanquecino (89 mg, 40% de rendimiento). MS m/z 407.0 [M+H]⁺.

Síntesis del II-9: (4-nitrofenil) [(1S,2S)-2-(2-piridildisulfanil)ciclohexil] carbonato



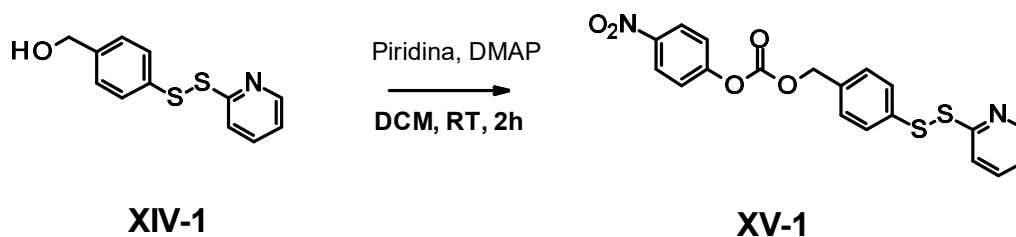
- A una solución de (1S,2S)-2-(2-piridildisulfanil)ciclohexanol* (0.42 g, 1.7 mmol) en THF (10.0 ml) se añadió carbonato de potasio (0.70g, 5.1 mmol), cantidad catalítica de DMAP y 4-nitrofenil cloroformiato (0.69 g, 3.4 mmol) a temperatura ambiente. El recipiente de reacción se selló y se agitó a RT durante 48 h. El progreso de la reacción se monitoreó por TLC (20% EtOAc/Hex).
- 5 Después de la terminación de la reacción, la mezcla de reacción se apagó con agua (20.0 ml) y se extrajo con EtOAc (20.0 ml). La capa orgánica se separó, se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró bajo presión reducida para proporcionar el producto crudo que se purificó por cromatografía de columna usando 20-30% de EtOAc/hexanos para proporcionar 4-nitrofenil (4-nitrofenil) [(1R,2R)-2-(2-piridildisulfanil)ciclohexil] carbonato* como un sólido
- 10 blanquecino (250 mg, 35% de rendimiento). MS m/z 406.7 [M+H]⁺.

Intermediario XV de Grupo Saliente de Carbonato a partir del XIV



Intermediario	R ⁵ , R ⁶	R ⁹ , R ¹⁰ , R ¹¹ , R ¹²	X	MH ⁺
XV-1	H, H	H, H, H, H	H	415.0

- 15 Síntesis del XV-1: (4-nitrofenil) [4-(2-piridildisulfanil)fenil]metil carbonato

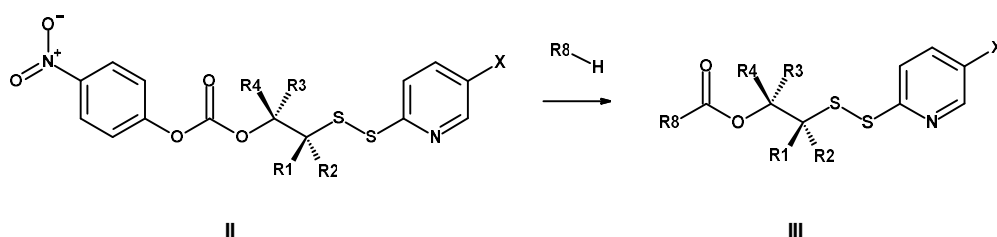


A una solución agitada de (4-(piridin-2-ildisulfanil)fenil)metanol (0.40 g, 1.60 mmol) en CH₂Cl₂ (10 ml) se añadieron 4-nitrofenil cloroformiato (0.65 g, 3.2 mmol), piridina (0.25 ml, 3.20 mmol), cantidad catalítica de DMAP (0.005 g) a 0°C. La mezcla se dejó agitar durante 2 h a temperatura ambiente.

La mezcla de reacción se apagó con solución de HCl 1.5 N. La capa orgánica se separó y se lavó con salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentró. El producto crudo se purificó por cromatografía de columna (SiO₂, 20-30% de EtOAc/hexanos) para proporcionar (4-nitrofenil) [4-(2-piridildisulfanil)fenil]metil carbonato como un líquido incoloro (600 mg, 91% de rendimiento); MS m/z

5 415.0 [M+H]⁺.

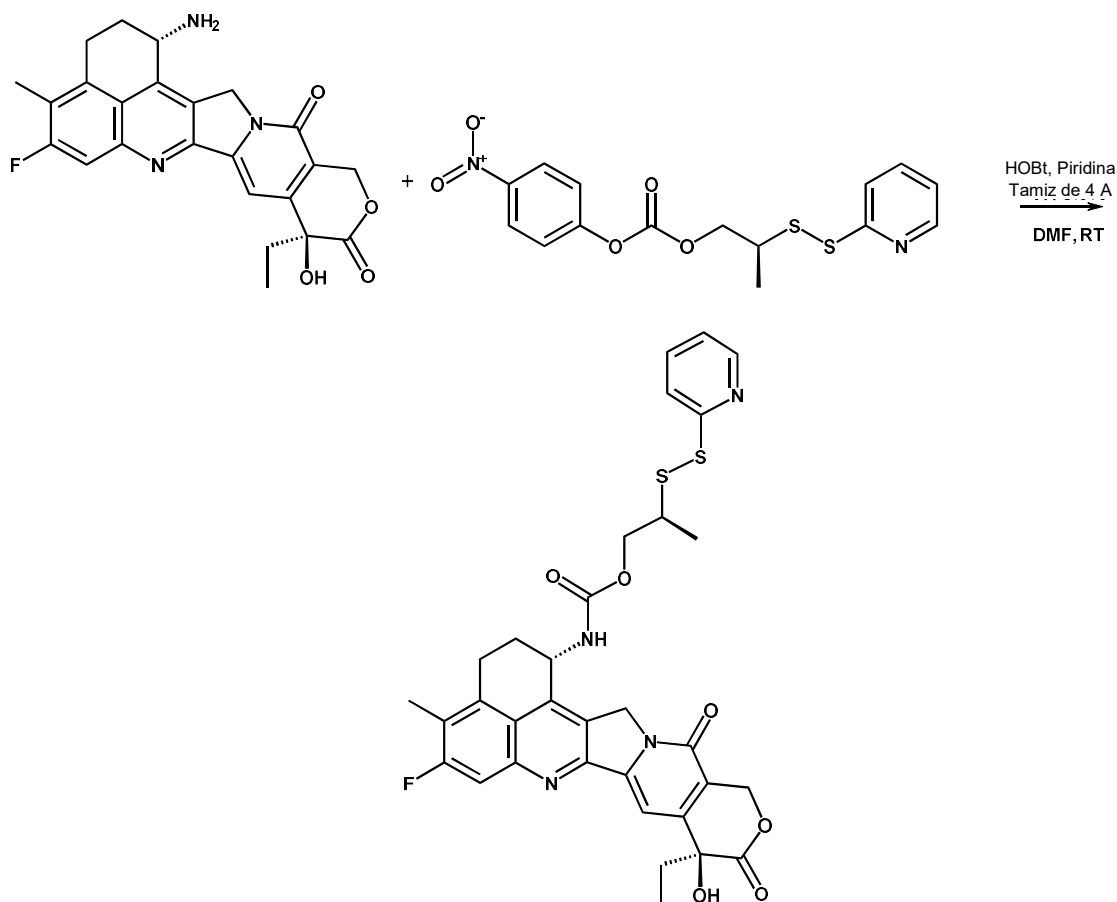
Intermediarios III Enlazados a Carbonato y Carbamato



Intermediario	R ⁸ H	R ¹ , R ²	R ³ , R ⁴	X	MH ⁺
III-1	R ⁸ H-5	H, Me	H, H	H	663.0
III-2	R ⁸ H-5	Me, H	H, H	H	663.0
III-3	R ⁸ H-5	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ -	H, H	NO ₂	734.0
III-4	R ⁸ H-5	H, Me	Me, H	H	677.0
III-5	R ⁸ H-5	Me, H	H, Me	H	677.1
III-6	R ⁸ H-5	Me, H	Me, H	H	677.0
III-7	R ⁸ H-5	H, Me	H, Me	H	677.1
III-8	R ⁸ H-5	$\begin{array}{cc} \text{CH}_2, \text{H} & \text{CH}_2, \text{H} \\ & \\ \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2 & \end{array}$		H	703.0

III-9	R ⁸ H-5	$\begin{array}{c} \text{H, CH}_2 \quad \text{H, CH}_2 \\ \quad \quad \\ \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2 \end{array}$	H	703.1
-------	--------------------	---	---	-------

Síntesis del III-1: [(2S)-2-(2-piridildisulfanil)propil] N-[(10S,23S)-10-etil-18-fluoro-10-hidroxi-19-metil-5,9-dioxo-8-oxa-4,15-diazahexaciclo[14.7.1.0.2,14.0.4,13.0.6,11.0.20,24]tetracosa-1,6(11),12,14,16(24),17,19-heptaen-23-il]carbamato



5

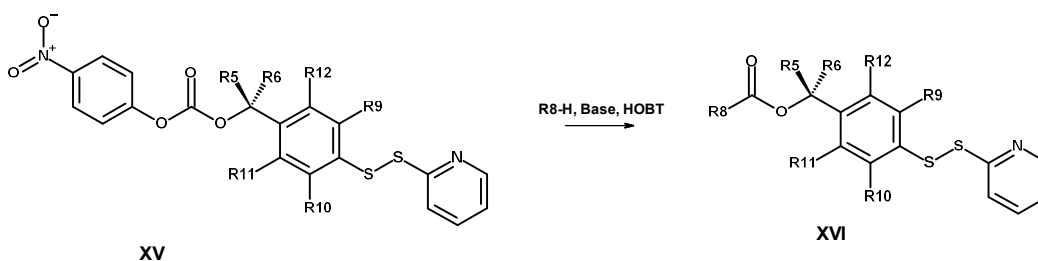
10

A una mezcla de hidrato de 1-hidroxibenzotriazol (8.64 mg, 0.0564 mmol), tamiz molecular finamente triturado de 4 Å (50 mg) de ácido metansulfónico de (10S,23S)-23-amino-10-etil-18-fluoro-10-hidroxi-19-metil-8-oxa-4,15-diazahexaciclo[14.7.1.0.2,14.0.4,13.0.6,11.0.20,24]tetracosa-1,6(11),12,14,16(24),17,19-heptaeno-5,9-diona (25.0 mg, 0.0470 mmol) y Piridina (0.0190 ml, 0.235 mmol) en 2 ml de DMF anhidra se añadió (4-nitrofenil) [(2S)-2-(2-piridildisulfanil)propil] carbonato (19.0 mg, 0.0517 mmol). Después de la agitación durante 16 h a temperatura ambiente la mezcla se filtró y la solución se concentró. El residuo se purificó por cromatografía de columna (0-5% MeOH/DCM) para producir [(2S)-2-(2-piridildisulfanil)propil] N-[(10S,23S)-10-etil-18-fluoro-10-

hidroxi-19-metil-5,9-dioxo-8-oxa-4,15 diazahexaciclo[14.7.1.02,14.04,13.06,11.020,24]tetracosa-1,6(11),12,14,16(24),17,19-heptaen-23-il]carbamato (29.0 mg, rendimiento: 93.0%). MS m/z 663.0 [M+H]⁺.

Los Intermediarios III-2 hasta III-9 se prepararon a partir del II-2 hasta II-9 de manera análoga al III-1.

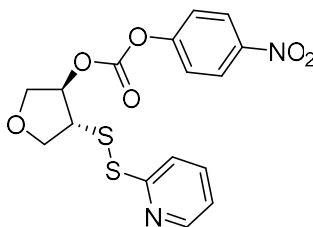
Intermediarios XVI Enlazados a Carbonato y Carbamato



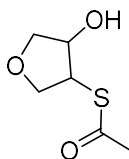
Int.	R ⁸ H	R ⁵ , R ⁶	R ⁹ , R ¹⁰ , R ¹¹ , R ¹²	X	MH ⁺
XVI-1	R ⁸ H-5	H, H	H, H, H, H	H	711.0

10 El Intermediario XVI-1 se preparó a partir del XV-1 de manera análoga al III-1.

Síntesis de 4-nitrofenil (*trans*-(3*RS*,4*RS*)-4-(piridin-2-ildisulfanil)tetrahidrofuran-3-il) carbonato



Paso 1: Síntesis de *trans*-(4-hidroxitetrahidrofuran-3-il) etanoato racémico

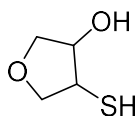


15 A una solución agitada de 3,6-dioxabicyclo[3.1.0]hexano (5.0 g, 0.051 mol) en agua (40.0 ml) se

añadió ácido tioacético (4.98 ml, 0.069 mol) y la mezcla de reacción resultante se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. El progreso de la reacción se monitoreó por TLC (20% EtOAc/Hexano). Tras la terminación de la reacción, la mezcla de reacción se diluyó con éter dietílico y se lavó con 10% solución de bicarbonato de sodio. La capa orgánica se separó y se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró bajo presión reducida para proporcionar el producto crudo, que se purificó por cromatografía de columna usando 20% EtOAc : *n*-Hexano para obtener el producto del título como un líquido color marrón (4.0 g , 42% de rendimiento). ¹HNMR (400 MHz, CDCl₃): δ 4.35 - 4.28 (m, 2H), 4.02 - 3.98 (m, 1H), 3.81 - 3.73 (m, 2H), 3.69 - 3.62 (m, 1H), 2.73 (s, 3H).

10

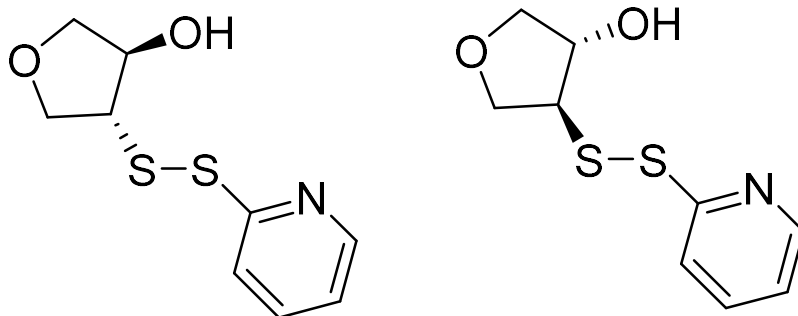
Paso 2: Síntesis de Trans-4-mercaptotetrahidrofuran-3-ol racémico



A una solución agitada de trans-(4-hidroxitetrahidrofuran-3-il) etanotioato racémico (4.0 g, 24.7 mmol) en THF seco (20.0 ml) bajo atmósfera de nitrógeno se añadió LAH (1 M en THF) (27.1 ml, 27.1 mmol) en forma de goteo a 0°C. La mezcla de reacción se dejó entibiar gradualmente a temperatura ambiente y se agitó durante 2 h. El progreso de la reacción se monitoreó por TLC (20% EtOAc : *n*-Hexano). Tras la terminación de la reacción, la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se apagó con HCl 1.0 N (50 ml). La mezcla de reacción se extrajo en DCM (3 x 20 ml), la capa orgánica se lavó con solución de salmuera (20 ml), se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró, se destiló parcialmente y se tomó como tal para el siguiente paso. (2.9 g, crudo).

20

Paso 3: Síntesis de trans-(4RS,3RS)-4-(piridin-2-ildisulfanil)tetrahidrofuran-3-ol y trans-(4SR,3SR)-4-(piridin-2-ildisulfanil)tetrahidrofuran-3-ol



Isómero 1 trans (1RS,2RS)

Isómero 2 trans (1SR, 2SR)

A una solución de 2-(piridin-2-ildisulfanil)piridina (0.9 g, 21.7 mmol) en MeOH (desgasificado con N₂) (10 ml) se añadió 4-sulfaniloxolan-3-ol (2.9 g, 24.1 mmol) (desgasificado con N₂) por goteo y se agitó a temperatura ambiente bajo atmósfera de nitrógeno durante 16 h. La mezcla de reacción se concentró hasta sequedad bajo vacío. El crudo resultante se purificó por cromatografía de columna instantánea usando 30% de EtOAc : *n*-Hexano para proporcionar el compuesto del título 4-(piridin-2-ildisulfanil)oxolan-3-ol (mezcla racémica) como un aceite amarillo. Los isómeros se separaron por HPLC preparativa Quiral.

10 Condiciones de la HPLC preparativa Quiral:

Columna : Chiralpak IA (250 mm X 20 mm X 5 mic)

Fase móvil : EtOH con 0.1% DEA (90:10)

Velocidad de flujo : 19 ml/min

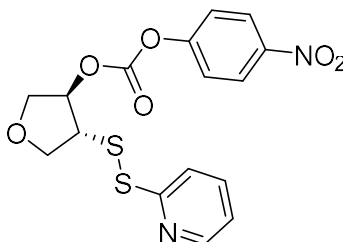
Las fracciones separadas de los isómeros resueltos se recolectaron de la HPLC preparativa quiral y se evaporaron bajo presión reducida para proporcionar los compuestos del título como Isómero 1 (600mg) e Isómero 2 (620 mg).

15 **Isómero 1:** (*trans*-(4*RS*,3*RS*)-4-(piridin-2-ildisulfanil)tetrahidrofuran-3-ol): LC-MS m/z calculada para C₉H₁₁NO₂S₂, 229; encontrado 230 [M+H]⁺. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.53 - 8.52 (m, 1H), 7.67 - 7.63 (m, 1H), 7.56 (d, *J* = 8.0Hz, 1H), 7.23 - 7.19 (m, 1H), 4.45 - 4.48 (m, 1H), 4.25 (t, *J* = 8.8Hz, 1H), 4.12 (t, *J* = 6.8Hz, 1H), 3.74 - 3.67 (m, 2H), 3.48 - 3.41 (m, 1H).

20 **Isómero 2:** (*trans*-(4*SR*,3*SR*)-4-(piridin-2-ildisulfanil)tetrahidrofuran-3-ol): LC-MS m/z calculada para C₉H₁₁NO₂S₂, 229; encontrado 230 [M+H]⁺. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.54 - 8.53 (m, 1H), 7.68 - 7.64 (m, 1H), 7.56 (d, *J* = 8.0Hz, 1H), 7.23 - 7.20 (m, 1H), 4.49 - 4.45 (m, 1H), 4.25 (t, *J* = 7.6Hz, 1H), 4.12 - 4.10 (m, 1H), 3.74 - 3.67 (m, 2H), 3.47 - 3.44 (m, 1H).

La estereoquímica absoluta de los isómeros se asignó de manera arbitraria.

Paso 4: Síntesis de 4-nitrofenil (trans-(3RS,4RS)-4-(piridin-2-ildisulfanil)tetrahidrofuran-3-il) carbonato

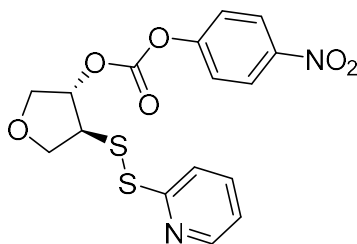


5

A una solución agitada de *trans*-(3RS,4RS)-4-(piridin-2-ildisulfanil)tetrahidrofuran-3-ol (0.61g, 2.69 mmol) en DMF (10 ml) bajo atmósfera de nitrógeno se añadió DIPEA (1.45 ml, 8.08 mmol) y bis(4-nitrofenil) carbonato (1.64 g, 5.38 mmol) a temperatura ambiente. El recipiente de reacción se selló y se agitó a temperatura ambiente durante 12 h. El progreso de la reacción se monitoreó por TLC (20% EtOAc : *n*-Hexano). Tras la terminación de la reacción, la mezcla de reacción se apagó con agua (20 ml) y se extrajo con EtOAc (3 x 10 ml). La capa orgánica se separó, se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró bajo presión reducida para proporcionar el producto crudo que se purificó por cromatografía de columna instantánea usando 20-30% de EtOAc : *n*-Hexano para proporcionar 4-nitrofenil (*trans*-(3RS,4RS)-4-(piridin-2-ildisulfanil)tetrahidrofuran-3-il) carbonato como un sólido blanquecino (790 mg, 77% de rendimiento). ¹HNMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.50 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H), 8.27 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.67 - 7.59 (m, 2H), 7.36 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.15 (t, *J* = 5.2 Hz, 1H), 5.44 - 5.43 (m, 1H), 4.40 - 4.25 (m, 2H), 4.03 (d, *J* = 11.2 Hz, 1H), 3.92 - 3.86 (m, 1H), 3.85 - 3.79 (m, 1H); LC-MS *m/z* calculada para C₁₆H₁₄N₂O₆S₂, 394; encontrado 395 [M+H]⁺.

20

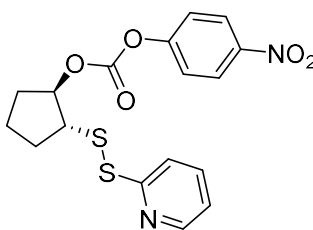
Síntesis de 4-nitrofenil (*trans*-(3SR,4SR)-4-(piridin-2-ildisulfanil)tetrahidrofuran-3-il) carbonato



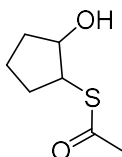
A una solución agitada de *trans*-(3SR,4SR)-4-(piridin-2-ildisulfanil)tetrahidrofuran-3-ol (550 mg, 2.46 mmol) en DMF (10.0 ml) bajo nitrógeno se añadió DIPEA (1.32 ml, 7.38 mmol) y bis(4-nitrofenil)

carbonato (1.5 g, 4.92 mmol) a temperatura ambiente. El recipiente de reacción se selló y se agitó a temperatura ambiente durante 12 h. El progreso de la reacción se monitoreó por TLC (20% EtOAc : *n*-Hexano). Tras la terminación de la reacción, la mezcla de reacción se apagó con agua (20 ml) y se extrajo con EtOAc (3 x 10 ml). La capa orgánica se separó, se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró bajo presión reducida para proporcionar el producto
 5 crudo que se purificó por cromatografía de columna instantánea usando 20-30% de EtOAc : *n*-Hexano para proporcionar 4-nitrofenil (*trans*-(3SR,4SR)-4-(piridin-2-ildisulfanil)tetrahidrofuran-3-il) carbonato como un sólido blanquecino (0.6 g, 70% de rendimiento). ¹HNMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.85 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H), 8.26 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.68 - 7.59 (m, 2H), 7.35 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.14
 10 (t, *J* = 5.2 Hz, 1H), 5.44 - 5.43 (m, 1H), 4.40 - 4.25 (m, 2H), 4.03 (d, *J* = 11.2 Hz, 1H), 3.92 - 3.86 (m, 1H), 3.85 - 3.79 (m, 1H); LC-MS *m/z* calculada para C₁₆H₁₄N₂O₆S₂, 394; encontrado 395 [M+H]⁺.

Síntesis de 4-nitrofenil (*trans*-(1RS,2RS)-2-(piridin-2-ildisulfanil)ciclopentil) carbonato

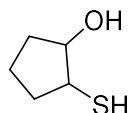


15 *Paso 1: Síntesis de trans*-(5-hidroxiciclopentan-1-il) etanotioato racémico



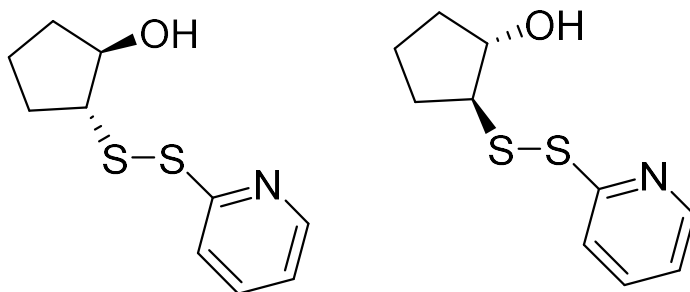
A una solución agitada de 6-oxabicyclo[3.1.0]hexano (3.0 g, mmol) en agua (30 ml) se añadió ácido
 tioacético (3 ml, 39.2 mmol) a temperatura ambiente y se agitó durante 16 h. La mezcla de reacción
 se apagó con solución saturada de bicarbonato de sodio y se extrajo con acetato de etilo (3 x 10
 20 ml). La capa orgánica se separó y se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se
 filtró y se concentró bajo presión reducida para proporcionar *trans*-(5-hidroxiciclopentan-1-il)
 etanotioato racémico como un compuesto aceitoso (2.6 g, crudo). LC-MS *m/z* calculada para
 C₇H₁₂O₂S, 160.2; encontrado 143.3 [M+H - 17]⁺.

Paso 2: Síntesis de Trans-2-mercaptociclopentan-1-ol racémico



A una solución agitada de trans-(5-hidroxyciclopentan-1-il) etanoato racémico (2.6 g, 16.2 mmol) en THF (20 ml) a 0°C bajo atmósfera de nitrógeno, se añadió LAH (1 M en THF) (24 ml, 24.3 mmol) en forma de goteo. La mezcla de reacción se dejó entibiar gradualmente a temperatura ambiente y se agitó durante 2 h. El progreso de la reacción se monitoreó por TLC (20% EtOAc : *n*-Hexano). Tras la terminación de la reacción, la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se apagó con solución de HCl 1 N y se extrajo en DCM. La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se evaporó parcialmente y el trans-2-mercaptociclopentan-1-ol racémico crudo se llevó al siguiente paso (1.9 g, crudo).

Paso 3: Síntesis de trans-(1RS, 2RS)-2-(piridin-2-ildisulfanil)ciclopentan-1-ol y trans-(1SR, 2SR)-2-(piridin-2-ildisulfanil)ciclopentan-1-ol



15 **Isómero 1 trans (1RS,2RS) Isómero 2 trans (1SR, 2SR)**

A una solución agitada de 2-(piridin-2-ildisulfanil)piridina (2.1 g, 9.65 mmol) en MeOH (10 ml) bajo atmósfera de nitrógeno se añadió trans-2-mercaptociclopentan-1-ol racémico (1.9 g, 16.1 mmol) en una manera por goteo a 0°C. La mezcla de reacción se dejó entibiar gradualmente a temperatura ambiente y se agitó durante 16 h. Después de la terminación de la reacción, la mezcla de reacción se concentró hasta sequedad bajo vacío. El crudo resultante se purificó por cromatografía de columna instantánea en gel de sílice. El compuesto se eluyó en 15% EtOAc : *n*-Hexano. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se evaporaron bajo presión reducida para proporcionar el compuesto del título (mezcla racémica) como un líquido amarillo. Los isómeros se separaron por HPLC preparativa Quiral.

Condiciones de la HPLC preparativa Quiral:

Columna : Chiralpak IA (250 mm X 20 mm X 5 mic)

Fase móvil : EtOH con 0.1% DEA (70:30)

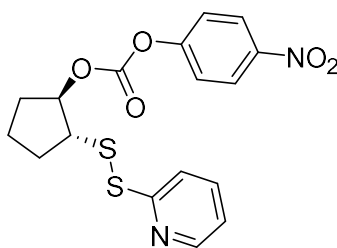
Velocidad de flujo : 19 ml/min

- 5 Las fracciones separadas de los isómeros separados se recolectaron de la HPLC preparativa quiral y se evaporaron bajo presión reducida para proporcionar los compuestos del título como Isómero 1 (300mg) e Isómero 2 (300 mg) como un aceite incoloro.

Isómero 1 (*trans*-(1*RS*, 2*RS*)-2-(piridin-2-ildisulfanil)ciclopentan-1-ol): LC-MS *m/z* calculada para C₁₀H₁₃NOS₂, 227.34; encontrado 228.1 [M+H]⁺. ¹HNMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.51 - 8.50 (m, 1H), 7.61 - 7.57 (m, 1H), 7.48 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.17 - 7.14 (m, 1H), 4.03 - 3.97 (m, 1H), 3.0 - 2.87 (m, 1H), 2.11 - 2.02 (m, 3H), 1.75 - 1.65 (m, 4H).

Isómero 2 (*trans*-(1*SR*, 2*SR*)-2-(piridin-2-ildisulfanil)ciclopentan-1-ol): LC-MS *m/z* calculada para C₁₀H₁₃NOS₂, 227.34; encontrado 228.1 [M+H]⁺. ¹HNMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.51 - 8.50 (m, 1H), 7.61 - 7.57 (m, 1H), 7.48 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.17 - 7.14 (m, 1H), 4.03 - 3.97 (m, 1H), 3.0 - 2.87 (m, 1H), 2.11 - 2.02 (m, 3H), 1.75 - 1.65 (m, 4H).

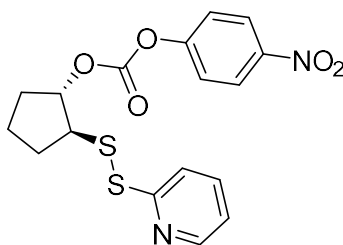
La estereoquímica absoluta de los isómeros se asignó de manera arbitraria.

*Paso 4: Síntesis de 4-nitrofenil ((1*R*,2*R*)-2-(piridin-2-ildisulfanil)ciclopentil)carbonato*

- 20 A una solución agitada de *trans*-(1*RS*,2*RS*)-2-(piridin-2-ildisulfanil)ciclopentan-1-ol (0.3g, 1.34 mmol) en DMF (10 ml) bajo atmósfera de nitrógeno se añadió DIPEA (0.65 ml, 3.96 mmol) y Bis(4-nitrofenil) carbonato (0.8 g, 2.64 mmol) a temperatura ambiente. El recipiente de reacción se selló y se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. La mezcla de reacción se apagó con agua (20 ml) y se extrajo con EtOAc (3 x 10 ml). La capa orgánica se separó, se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró bajo presión reducida para proporcionar el producto crudo que se purificó por cromatografía de columna instantánea en gel de sílice. El compuesto se eluyó en 10% EtOAc : *n*-Hexano como una mezcla. Las fracciones se evaporaron para obtener el compuesto

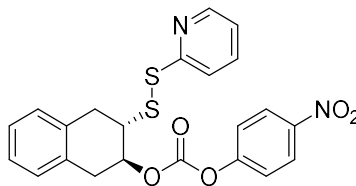
crudo que se purificó sobre cromatografía de columna de fase inversa. Las fracciones que contenían el producto se evaporaron bajo presión reducida para obtener 4-nitrofenil (*trans*-(1*RS*,2*RS*)-2-(piridin-2-ildisulfanil)ciclopentil) carbonato como un aceite incoloro (305 mg, 59%). ¹HNMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.46 (d, *J* = 4.1 Hz, 1H), 8.25 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H), 7.66 - 7.62 (m, 2H), 7.34 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H), 7.10 - 7.08 (m, 1H), 5.29 - 5.10 (m, 1H), 3.52 - 3.45 (m, 1H), 2.32 - 2.28 (m, 2H), 1.9 - 1.76 (m, 4H). LC-MS *m/z* calculada para C₁₇H₁₆N₂O₅S₂, 392.44; encontrado 393.0 [M+H]⁺.

Síntesis de 4-nitrofenil (*trans*-(1*SR*,2*SR*)-2-(piridin-2-ildisulfanil)ciclopentil) carbonato

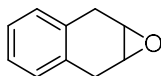


A una solución agitada de (1*SR*,2*SR*)-2-(piridin-2-ildisulfanil)ciclopentan-1-ol (0.26 g, 1.14 mmol) en DMF (10.0 ml) bajo atmósfera de nitrógeno se añadió DIPEA (0.57 ml, 3.43 mmol) y bis(4-nitrofenil) carbonato (0.7 g, 2.29 mmol) a temperatura ambiente. El recipiente de reacción se selló y se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. La mezcla de reacción se apagó con agua (20.0 ml) y se extrajo con EtOAc (3 x 10 ml). La capa orgánica se separó, se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró bajo presión reducida para proporcionar el producto crudo que se purificó por cromatografía de columna instantánea en gel de sílice. El compuesto se eluyó en 10% EtOAc : *n*-Hexano como una mezcla. Las fracciones se evaporaron para obtener el compuesto crudo que se purificó sobre cromatografía de columna de fase inversa. Las fracciones que contenían el producto se evaporaron bajo presión reducida para obtener 4-nitrofenil (*trans*-(1*SR*,2*SR*)-2-(piridin-2-ildisulfanil)ciclopentil) carbonato (330 mg, 73.5%) como un aceite incoloro. ¹HNMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.46 (d, *J* = 4 Hz, 1H), 8.25 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H), 7.66 - 7.62 (m, 2H), 7.34 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H), 7.10 - 7.08 (m, 1H), 5.29 - 5.10 (m, 1H), 3.52 - 3.45 (m, 1H), 2.32 - 2.28 (m, 2H), 1.9 - 1.76 (m, 4H). LC-MS *m/z* calculada para C₁₇H₁₆N₂O₅S₂, 392.44; encontrado 393.0 [M+H]⁺.

Síntesis del 4-nitrofenil (*trans*-(2*RS*,3*RS*)-3-(piridin-2-ildisulfanil)-1,2,3,4-tetrahidronaftal en-2-il) carbonato



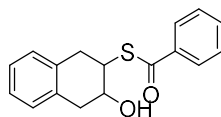
Paso 1: Síntesis de 1aH,2H,7H,7aH-nafto [2,3-b] oxireno



A una solución agitada de 1,4-dihidronaftaleno (100 mg, 768 μ mol) en diclorometano (2.00 ml) bajo
 5 atmósfera de nitrógeno a 0°C se añadió ácido 3-clorobenceno-1-carboperoxoico (199 mg, 1.5 eq., 1.15 mmol) por lotes y se agitó durante 16 h a RT. El progreso de la reacción se monitoreó por TLC. Después de la terminación de la reacción, la masa de reacción se filtró y se extrajo con diclorometano, se lavó con solución de bicarbonato de sodio, seguido de agua y salmuera. Las dos
 10 capas se separaron y la capa orgánica combinada se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó para obtener el producto crudo, que se purificó por cromatografía de columna instantánea en gel de sílice. El producto se eluyó en 10% EtOAc y *n*-Hexano, (el producto es inactivo por UV), las fracciones se recolectaron y se secaron bajo el vacío para obtener 1aH,2H,7H,7aH-nafto[2,3-b]oxireno (85.0 mg, 581 μ mol) como un compuesto aceitoso.

¹HNMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.14 (t, *J* = 3.2 Hz, 2H), 7.05 (t, *J* = 3.2 Hz, 2H), 3.48 (s, 2H), 3.32 (d,
 15 *J* = 17.6 Hz, 2H), 3.19 (d, *J* = 17.6 Hz, 2H).

Paso 2: Síntesis de [trans-(3-hidroxi-1,2,3,4-tetrahidronaftalen-2-il) sulfanil] (fenil) metanona racémica



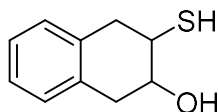
A una solución agitada de 1aH,2H,7H,7aH-nafto[2,3-b]oxireno (100 mg, 684 μ mol) en etoxietano
 (4.00 ml), bajo atmósfera de nitrógeno se añadió óxido de aluminio (1.00 g) (ácido). La solución se
 enfrió a 0°C. Luego, ácido tiobenzoico (482 mg, 5.1 eq., 3.49 mmol) se añadió a la mezcla de
 20 reacción y se agitó a RT durante 24 h. Después de la terminación de la reacción (el progreso de la
 reacción se monitoreó por TLC), la mezcla de reacción se filtró y se lavó con solución de bicarbonato
 25 de sodio, seguido de lavado con agua y solución de salmuera para producir el producto crudo. El
 producto crudo se purificó por cromatografía de columna instantánea en gel de sílice y el producto
 se eluyó en 20% EtOAc : *n*-Hexano para obtener [trans-(3-hidroxi-1,2,3,4-tetrahidronaftalen-2-

il)sulfanil](fenil)metanona racémica (125 mg, 440 μmol) como un líquido incoloro.

^1H NMR (400 MHz, DMSO): δ 7.89 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 7.66 (t, 1H), 7.53 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 7.09 (m, 4H), 5.39 (s, 1H), 4.00 (s, 2H), 3.42 (d, J = 17.6 Hz, 1H), 3.12 (t, J = 16 Hz, 1H), 2.81 (t, J = 18.4 Hz, 2H).

5

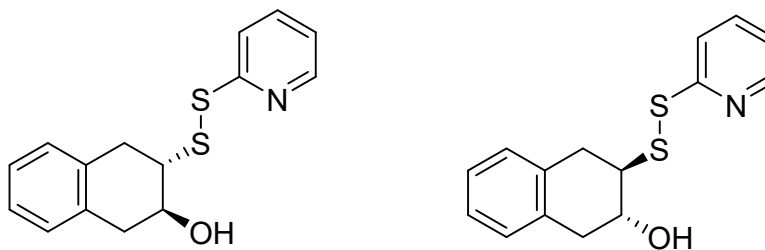
Paso 3: Síntesis de Trans-3-sulfanil-1,2,3,4-tetrahidronaftalen-2-ol racémico



A una solución agitada de [(3-hidroxi-1,2,3,4-tetrahidronaftalen-2-il)sulfanil] (fenil) metanona (115 mg, 404 μmol) en metanol (3.00 ml) se añadió K_2CO_3 (113 mg, 2 eq., 809 μmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 0.5 h a RT. El progreso de la reacción se monitoreó por TLC. Después de la terminación de la reacción, la masa de reacción se concentró (para remover el metanol) y luego se acidificó con solución de HCl 1 N hasta que el pH alcanzó 2-3, para obtener trans-3-sulfanil-1,2,3,4-tetrahidronaftalen-2-ol racémico (70.0 mg, 388 μmol) que se tomó adicionalmente como tal para el siguiente paso.

15

Paso 4: Síntesis de trans-(2RS, 3RS)-3-(piridin-2-ildisulfanil)-1,2,3,4-tetrahidronaftalen-2-ol y trans-(2SR, 3SR)-3-(piridin-2-ildisulfanil)-1,2,3,4-tetrahidronaftalen-2-ol



| Isómero 1 trans (2RS,3RS) Isómero 2 trans (2SR, 3SR)

A una solución agitada de trans-3-sulfanil-1,2,3,4-tetrahidronaftalen-2-ol racémico (350 mg, 1.94 mmol) en metanol (2.50 ml) bajo atmósfera de nitrógeno se añadió 2-(piridin-2-ildisulfanil)piridina (428 mg, 1 eq., 1.94 mmol) y se agitó a RT durante 16 h. El progreso de la reacción se monitoreó por TLC y LC-MS. Después de la terminación de la reacción, la masa de reacción se concentró y luego se diluyó con DCM, se lavó con agua seguido de salmuera y se secó sobre sulfato de sodio.

20

El producto crudo obtenido se purificó por cromatografía de columna instantánea en gel de sílice. El producto deseado se eluyó en 20% EtOAc : Hexano. El producto se volvió a purificar por cromatografía de columna de fase inversa (10-20% de 0.1% Ácido fórmico en agua/ Acetonitrilo). Las fracciones que contenían el producto deseado se recolectaron y se evaporaron bajo vacío para obtener 3-(piridin-2-ildisulfanil)-1,2,3,4-tetrahidronaftalen-2-ol (350 mg, 1.21 mmol) como un sólido amarillo. Los isómeros se separaron por HPLC preparativa Quiral.

¹HNMR (400 MHz, DMSO): δ 8.44 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H), 7.79 (d, *J* = 3.2 Hz, 2H), 7.26 - 7.24 (m, 1H), 7.06 (s, 4H), 5.61 (s, 1H), 3.91 - 3.80 (m, 1H), 3.31 - 3.19 (m, 2H), 3.13 - 3.07 (m, 1H), 2.92 - 2.84 (m, 1H), 2.75 - 2.65 (m, 1H).

10 Condiciones preparativas:

Columna : CHIRALPAK IA (250 mm X 420 mm X 5 mic)

Fase móvil : *n*-Hexano : Etanol con 0.1% DEA (50:50)

Velocidad de flujo : 19 ml/min

Los isómeros se separaron y las fracciones respectivas recolectadas de la HPLC preparativa quiral se combinaron y se evaporaron para proporcionar los isómeros respectivos. El Isómero 1 se recolectó en primer lugar y se asignó como *trans*-(2RS, 3RS)-3-(piridin-2-ildisulfanil)-1,2,3,4-tetrahidronaftalen-2-ol. El Isómero 2 se recolectó en segundo lugar y se asignó como *trans*-(2SR, 3SR)-3-(piridin-2-ildisulfanil)-1,2,3,4-tetrahidronaftalen-2-ol. La estereoquímica absoluta de los isómeros se asignó de manera arbitraria.

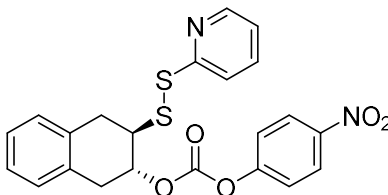
20

Paso 5: Síntesis de 4-nitrofenil (trans-(2RS, 3RS)-3-(piridin-2-ildisulfanil)-1,2,3,4-tetrahidronaftalen-2-il) carbonato

A una solución agitada de *trans*-(2RS, 3RS)-3-(piridin-2-ildisulfanil)-1,2,3,4-tetrahidronaftalen-2-ol (150 mg, 518 μmol) en Dimetilformamida (3.00 ml, 38.7 mmol) se añadió bis(4-nitrofenil) carbonato (315 mg, 2 eq., 1.04 mmol) seguido de N,N-Diisopropiletilamina (271 μL, 3 eq., 1.55 mmol). La mezcla de reacción se agitó a RT durante 12 h. Después de la terminación de la reacción, la masa de reacción se apagó con agua, se extrajo con DCM (3 x 5), la fase orgánica combinada se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó bajo presión reducida para proporcionar el producto crudo. El producto crudo se purificó por cromatografía de columna instantánea en gel de sílice (0-40% EtOAc : *n*-Hexano) y también se volvió a purificar por cromatografía de columna de fase inversa (10-50% de 0.1% ácido fórmico en agua : ACN), para producir (*trans*-(2RS, 3RS)-3-(piridin-2-ildisulfanil)-1,2,3,4-tetrahidronaftalen-2-il) carbonato (133 mg, 293 μmol) como un sólido blanquecino.

¹HNMR (400 MHz, DMSO): δ 8.44 (d, 1H), 8.30 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 7.80 - 7.76 (m, 2H), 7.54 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 7.26 - 7.24 (m, 1H), 7.14 - 7.06 (m, 4H), 5.21 - 5.19 (m, 1H), 3.78 - 3.77 (m, 1H), 3.45 - 3.25 (m, 2H), 3.10 - 3.01 (m, 2H).

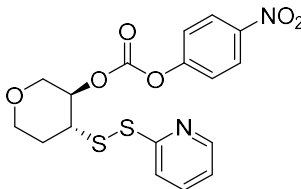
5 Síntesis de 4-nitrofenil (*trans*-(2*SR*,3*SR*)-3-(piridin-2-ildisulfanil)-1,2,3,4-tetrahidronaftalen-2-il) carbonato



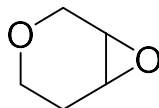
A una solución agitada de *trans*-(2*SR*, 3*SR*)-3-(piridin-2-ildisulfanil)-1,2,3,4-tetrahidronaftalen-2-ol (130 mg, 449 μmol) en dimetilformamida (2.60 ml, 33.6 mmol) se añadió bis(4-nitrofenil) carbonato (273 mg, 2 eq., 898 μmol) seguido de diisopropiletilamina (13.0 ml, 3 eq., 74.6 mmol). La mezcla de reacción se agitó a RT durante 12 h. Después de la terminación de la reacción (el progreso de la reacción se monitoreó por TLC), la masa de reacción se apagó con agua, se extrajo con DCM (3 x 5), la fase orgánica combinada se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó bajo presión reducida para proporcionar el producto crudo que se purificó por cromatografía de columna instantánea (0-40% EtOAc : *n*-Hexano). El producto se volvió a purificar por cromatografía de columna de fase inversa (10-50% de 0.1% ácido fórmico en agua: ACN) para producir 4-nitrofenil (*trans*-(2*SR*,3*SR*)-3-(piridin-2-ildisulfanil)-1,2,3,4-tetrahidronaftal en-2-il) carbonato (30.0 mg, 66.0 μmol) como un sólido blanquecino.

¹HNMR (400 MHz, DMSO): δ 8.44 (d, 1H), 8.30 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 7.80 - 7.76 (m, 2H), 7.54 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 7.26 - 7.24 (m, 1H), 7.14 - 7.06 (m, 4H), 5.21 - 5.19 (m, 1H), 3.78 - 3.77 (m, 1H), 3.45 - 3.25 (m, 2H), 3.10 - 3.01 (m, 2H).

Síntesis de 4-nitrofenil (*trans*-(3*RS*,4*RS*)-4-(piridin-2-ildisulfanil)oxan-3-il) carbonato

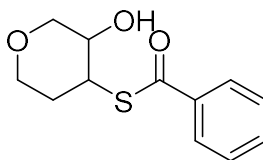


25 *Paso 1: Síntesis de 3,7-dioxabicyclo[4.1.0]heptano*



A una solución agitada de 3,6-dihidro-2H-piran (2.0 g, 23.8 mmol) en diclorometano (20.0 ml) a 0°C se añadió ácido 3-clorobenceno-1-carboperoxoico (4.92 g, 1.2 eq., 28.5 mmol) lentamente en porciones y se agitó bajo atmósfera de nitrógeno durante 16 h a temperatura ambiente. El progreso de la reacción se monitoreó por TLC. Después de la terminación de la reacción, la masa de reacción se apagó con solución saturada de bicarbonato de sodio, y la capa orgánica se separó y se lavó con agua seguido de solución de salmuera, se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se evaporó para producir el compuesto del título 3,7-dioxabicyclo[4.1.0]heptano (1.00 g, 9.99 mmol) como un aceite incoloro. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : 4.03 - 3.94 (m, 2H), 3.55 - 3.49 (m, 1H), 3.46 - 3.41 (m, 1H), 3.35 (m, 1H), 3.18 (m, 1H), 2.00 (m, 2H).

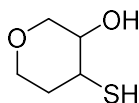
Paso 2: Síntesis de [trans-(3-hidroxitetrahidropiran-4-il) sulfanil](fenil)metanona racémica:



A una solución agitada de 3,7-dioxabicyclo[4.1.0]heptano (1.00 g, 9.99 mmol) en etoxietano (40 ml) a temperatura ambiente se añadió S-ácido bencenocarbotioico (5.88 ml, 5 eq., 49.9 mmol) seguido de silanodiona (3.00 g, 5 eq., 49.9 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 12 h. El progreso de la reacción se monitoreó por TLC, tras la terminación del material de partida, la masa de reacción se apagó con solución saturada de bicarbonato de sodio y luego se extrajo con acetato de etilo (2 x 10 ml). Las capas orgánicas combinadas se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y luego se evaporó bajo presión reducida para proporcionar el producto crudo que se purificó por cromatografía de columna instantánea (0-30% EtOAc : *n*-Hexano). El compuesto se eluyó a 20% EtOAc : *n*-Hexano. Las fracciones puras se recolectaron y se evaporaron para producir [trans-(3-hidroxitetrahidropiran-4-il) sulfanil](fenil)metanona racémica (2.0 g, 8.39 mmol).

LC-MS *m/z* calculada para C₁₂H₁₄O₃S; 238.3, encontrado 239.1 [M+H]⁺; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.43 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.09 (t, *J* = 17.2 Hz, 1H), 6.93 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 3.55 (dd, *J* = 4.0 Hz, 4.0 Hz, 1H), 3.37 (d, *J* = 11.2 Hz, 1H), 3.28 - 3.24 (m, 1H), 3.22 - 3.18 (m, 1H), 3.01 (t, *J* = 10.8 Hz, 1H), 2.83 (t, *J* = 12.4 Hz, 1H), 1.36 - 1.27 (m, 1H), 1.27 (s, 2H).

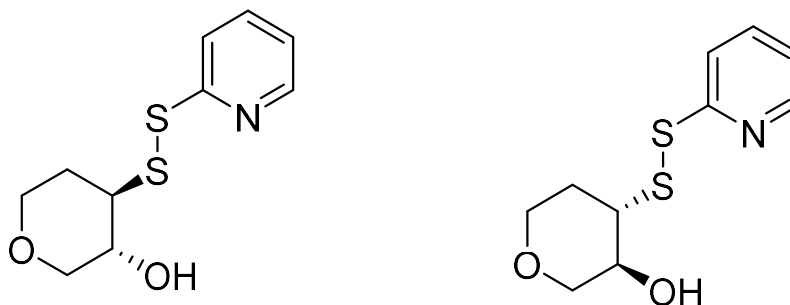
Paso 3: Síntesis de Trans-4-sulfaniloxan-3-ol racémico



A una solución agitada de [*trans*-3-hidroxitetrahidropiran-4-il)sulfanil](fenil)metanona racémica (2.50 g, 10.5 mmol) en diclorometano (25 ml) a temperatura ambiente se añadió hidrazine hidrate (5.15 ml, 10 eq., 105 mmol) lentamente y la mezcla de reacción se agitó durante 1 h. El progreso de la reacción se monitoreó por TLC, tras la terminación de la reacción, la masa de reacción se apagó con HCl 1 N de modo que el pH se ajustó a 2-3. Las dos capas se separaron y la capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó parcialmente y el *trans*-4-sulfaniltetrahidropiran-3-ol racémico crudo se tomó para el siguiente paso.

10

Paso 4: Síntesis de trans-(3RS,4RS)-4-(piridin-2-ildisulfanil)tetrahidropiran-3-ol y trans-(3SR,4SR)-4-(piridin-2-ildisulfanil)tetrahidropiran-3-ol



Isómero 1 trans (2RS,3RS)

Isómero 2 trans (2SR, 3SR)

A una solución agitada de 2-(piridin-2-ildisulfanil)piridina (1.85 g, 0.8 eq., 8.41 mmol) en Metanol (40 ml) se añadió *trans*-4-sulfaniltetrahidropiran-3-ol racémico (1.41 g, 10.5 mmol) en DCM a 0°C y luego la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 12 h. Tras la terminación de la reacción, la masa de reacción completa se evaporó bajo presión reducida para proporcionar el crudo que se purificó por cromatografía de columna instantánea. El producto se eluyó en 20% EtOAc : *n*-Hexano, las fracciones puras se recolectaron y se evaporaron para proporcionar el producto del título 4-(piridin-2-ildisulfanil)oxan-3-ol (mezcla racémica). Los isómeros se separaron por HPLC preparativa Quiral.

Condiciones de la HPLC preparativa Quiral:

Columna : CHIRALPAK IA (250 mm X 20 mm X 5 mic)

Fase móvil : *n*-Hexano : IPA con 0.1% DEA (90:10)

Velocidad de flujo : 19 ml/min

- 5 Los isómeros se separaron y las fracciones respectivas se recolectaron de la HPLC preparativa quiral. Las fracciones se combinaron y se evaporaron para proporcionar los isómeros respectivos.

(Isómero 1- 350 mg, Isómero 2 - 350 mg) LC-MS *m/z* calculada para C₁₀H₁₃NO₂S₂; 243.34, encontrado 244 [M+H]⁺.

Isómero 1 (*trans*-(3RS,4RS)-4-(piridin-2-ildisulfanil)tetrahidropiran-3-ol):

- 10 ¹H-NMR (400 MHz, DMSO): δ 8.53 (s, 1H), 7.60 (t, *J* = 6.40 Hz, 1H), 7.40 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.23 (t, *J* = 20.8 Hz, 1H), 4.28 - 4.06 (m, 1H), 3.94 (d, *J* = 12 Hz, 1H), 3.54 - 3.40 (m, 3H), 3.33 - 3.21 (m, 1H), 3.07 - 2.74 (m, 1H), 2.04 - 1.94 (m, 2H).

Isómero 2 (*trans*-(3SR,4SR)-4-(piridin-2-ildisulfanil)tetrahidropiran-3-ol)

- 15 ¹H-NMR (400 MHz, DMSO): δ 8.52 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 7.61 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H), 7.39 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.18 (t, *J* = 5.2 Hz, 1H), 4.12 - 4.09 (m, 1H), 3.94 (d, *J* = 12 Hz, 1H), 3.53 - 3.47 (m, 1H), 3.47 - 3.37 (m, 1H), 3.25 (t, *J* = 10.4 Hz, 1H), 2.80 - 2.73 (m, 1H), 1.96 - 1.42 (m, 1H), 1.20 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H).

La estereoquímica absoluta de los isómeros se asignó de manera arbitraria.

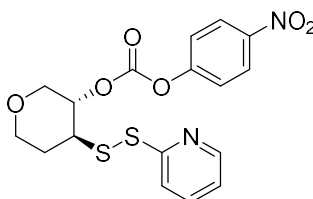
- 20 *Paso 5: Síntesis de 4-nitrofenil (trans-(3RS,4RS)-4-(piridin-2-ildisulfanil)tetrahidropiran-3-il)carbonato*

A una solución agitada de (*trans*-(3RS,4RS)-4-(piridin-2-ildisulfanil)tetrahidropiran-3-ol) (300 mg, 1.23 mmol) en DMF (8 ml) se añadió bis(4-nitrofenil) carbonato (750 mg, 2 eq., 2.47 mmol) y luego seguido de di-isopropiletilramina (644 µL, 3 eq., 3.70 mmol) a temperatura ambiente durante 12 h.

- 25 Tras la terminación de la reacción, la masa de reacción se dividió entre agua y DCM. La capa orgánica se separó y se lavó con solución de salmuera y se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó bajo presión reducida para proporcionar el crudo que se purificó por cromatografía de columna instantánea. El compuesto deseado se eluyó a 25% EtOAc : *n*-Hexano como una mezcla. La mezcla se purificó por cromatografía de columna de fase inversa (10-60% de 0.1% ácido fórmico en agua/ ACN). Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se evaporaron para proporcionar 4-nitrofenil (*trans*-(3RS,4RS)-4-(piridin-2-ildisulfanil)tetrahidropiran-3-il)carbonato
- 30

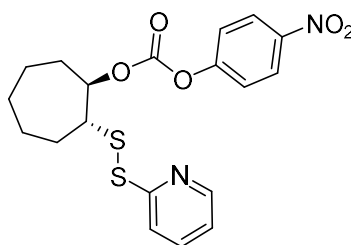
(270 mg, 0.66 mmol). LC-MS m/z calculada para $C_{17}H_{16}N_2O_6S_2$; 408.4, encontrado 409.1 $[M+H]^+$; 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 8.46 (d, 1H), 8.28 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.64 - 7.52 (m, 2H), 7.41 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.09 (s, 1H), 4.87 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 4.25 - 4.18 (m, 1H), 3.91 (d, J = 11.6 Hz, 1H), 3.52 - 3.42 (m, 1H), 3.20 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 2.21 (d, J = 12.4 Hz, 1H), 1.98 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 1.25 (s, 1H).

Síntesis de 4-nitrofenil (*trans*-(3SR,4SR)-4-(piridin-2-ildisulfanil)tetrahidropiran-3-il) carbonato

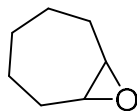


A una solución agitada de (*trans*-(3SR,4SR)-4-(piridin-2-ildisulfanil)tetrahidropiran-3-ol) (340 mg, 1.40 mmol) en DMF (8 ml) se añadió bis(4-nitrofenil) carbonato (850 mg, 2 eq., 2.79 mmol) seguido de di-isopropiletilamina (730 μ L, 3 eq., 4.19 mmol) a temperatura ambiente durante 12 h. Tras la terminación del material de partida, la mezcla de reacción se dividió entre agua y DCM. La capa orgánica se separó y se lavó con solución de salmuera, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó bajo presión reducida para proporcionar el producto crudo que se purificó por cromatografía de columna instantánea (0-40% EtOAc : *n*-Hexano). El producto deseado se eluyó como mezcla y luego se volvió a purificar por cromatografía de columna de fase inversa (10-50% de 0.1% ácido fórmico en agua/ ACN). Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se evaporaron para proporcionar 4-nitrofenil (*trans*-(3SR,4SR)-4-(piridin-2-ildisulfanil)tetrahidropiran-3-il) carbonato (300 mg, 735 μ mol). LC-MS m/z calculada para $C_{17}H_{16}N_2O_6S_2$; 408.4, encontrado 409.1 $[M+H]^+$; 1H -NMR (400 MHz, DMSO): δ 8.46 (d, 1H), 8.28 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.66 - 7.58 (m, 2H), 7.40 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.09 (s, 1H), 4.87 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 4.25 - 4.22 (m, 1H), 3.91 (d, J = 11.6 Hz, 1H), 3.52 - 3.42 (m, 2H), 3.20 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 2.21 (d, J = 12.0 Hz, 1H), 1.98 - 1.95 (m, 1H).

Síntesis de 4-nitrofenil (*trans*-(1RS,2RS)-2-(piridin-2-ildisulfanil) cicloheptil) carbonato

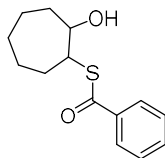


Paso 1: Síntesis de 8-oxabicyclo[5.1.0]octano



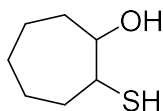
A una solución agitada de ciclohepteno (1.0 g, 10.4 mmol) en diclorometano (10 ml) se añadió ácido 3-clorobenceno-1-carboperoxoico (2.15 g, 1.2 eq., 12.5 mmol) a 0°C. La mezcla de reacción se agitó a 0°C durante 1 h y luego durante 16 h a temperatura ambiente. El progreso de la reacción se monitoreó por TLC. Tras la terminación de la reacción, la mezcla de reacción se apagó lentamente con solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio y la mezcla se agitó vigorosamente durante aproximadamente 30 min. Las dos capas se separaron, la capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se evaporó bajo presión reducida para proporcionar el producto deseado como un líquido incoloro (700 mg, 6.24 mmol). ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 3.07 (s, 2H), 1.93 - 1.86 (m, 4H), 1.60 - 1.43 (m, 4H), 1.21 - 1.17 (m, 2H).

Paso 2: Síntesis de [trans-(2-hidroxicicloheptil)sulfanil](fenil)metanona racémica



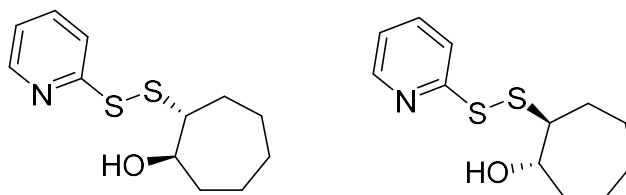
A una solución agitada de 8-oxabicyclo[5.1.0]octano (3.00 g, 26.7 mmol) en tolueno (60 ml) a temperatura ambiente bajo atmósfera de nitrógeno se añadió S-ácido bencenocarbotioico (4.72 ml, 1.5 eq., 40.1 mmol), seguido de cloruro de 2-metilpropan-2-aminio (293 mg, 0.1 eq., 2.67 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 50°C durante 16 h (el progreso de la reacción se monitoreó por TLC). Tras la terminación de la reacción, la mezcla de reacción se apagó con solución saturada de bicarbonato de sodio y luego se extrajo con acetato de etilo (3 x 20 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se evaporaron bajo presión reducida para proporcionar el producto crudo, que se purificó por cromatografía de columna instantánea. El producto deseado se eluyó en 20% EtOAc : *n*-Hexano, las fracciones puras se recolectaron y se evaporaron para proporcionar el compuesto del título [trans-(2-hidroxicicloheptil)sulfanil](fenil)metanona racémica (3.0 g, 12.0 mmol). LC-MS *m/z* calculada para C₁₄H₁₈O₂S; 250.4, ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.96 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.57 (t, *J* = 6.8 Hz, 1H), 7.4 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 3.88 - 3.85 (m, 1H), 3.81 - 3.77 (m, 1H), 2.09 - 2.05 (m, 1H), 2.04 - 1.62 (m, 8H), 1.55 - 1.53 (m, 2H).

Paso 3: Síntesis de Trans-4-sulfanilcicloheptan-3-ol racémico



A una solución agitada de [*trans*-(2-hidroxicicloheptil)sulfanil](fenil)metanona racémica (2.80 g, 11.2 mmol) en diclorometano (25 ml) a temperatura ambiente, bajo atmósfera de nitrógeno se añadió 1,4-disulfanilbutano-2,3-diol (173 mg, 0.1 eq., 1.12 mmol), seguido de hidrato de hidrazina (1.37 ml, 2.5 eq., 28.0 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 h (el progreso de la reacción se monitoreó por TLC). Tras la terminación de la reacción, la mezcla de reacción se apagó con HCl 1 N y se extrajo con DCM (2 x 30 ml). Las capas orgánicas se combinaron y se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron, la capa orgánica se evaporó parcialmente y el *trans*-4-sulfanilcicloheptan-3-ol racémico crudo se tomó directamente para el siguiente paso.

Paso 4: Síntesis de trans-(1RS, 2RS)-2-(piridin-2-ildisulfanil)cicloheptan-1-ol y trans-(1SR, 2SR)-2-(piridin-2-ildisulfanil)cicloheptan-1-ol



Isómero 1 *trans* (1RS, 2RS) Isómero 2 *trans* (1SR, 2SR)

15

A una solución agitada de 2-(piridin-2-ildisulfanil)piridina (1.73 g, 0.7 eq., 7.85 mmol) en metanol (25 ml) bajo atmósfera de nitrógeno a 0°C se añadió *trans*-4-sulfanilcicloheptan-3-ol racémico (1.64 g, 11.2 mmol) en DCM y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 12 h. El progreso de la reacción se monitoreó por TLC y LCMS y la masa de reacción se evaporó bajo presión reducida. El producto crudo se purificó por cromatografía de columna instantánea y el producto deseado se eluyó en 20% EtOAc : *n*-Hexano. Como el producto se recolectó como una mezcla, se volvió a purificar por cromatografía de columna de fase inversa (10-50% de 0.1% ácido fórmico en agua : acetonitrilo) para proporcionar *trans*-2-(piridin-2-ildisulfanil)cicloheptan-1-ol racémico (1.5 g, 52%) (Mezcla racémica). Los isómeros se separaron por HPLC preparativa Quiral.

(Isómero-1: 550 mg, Isómero-2: 550 mg).

25

Condiciones de la HPLC preparativa Quiral:

Columna : CHIRALPAK IA (250 mm X 20 mm X 5 mic)

Fase móvil : *n*-Hexano : IPA con 0.1% DEA (90:10)

Velocidad de flujo : 19 ml/min

- 5 Los isómeros se separaron y las fracciones respectivas se recolectaron de la HPLC preparativa quiral. Las fracciones se evaporaron por separado, para proporcionar los isómeros respectivos.

Isómero 1 (*trans*-(1RS, 2RS)-2-(piridin-2-ildisulfanil)cicloheptan-1-ol):

LC-MS *m/z* calculada para C₁₂H₁₇NOS₂; 255.4, encontrado 256.2 [M+H]⁺; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 8.49 (s, 1H), 7.56 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 7.38 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.13 (s, 1H), 6.17 (s, 1H), 3.51 (m, 1H), 2.75 - 2.73 (m, 1H), 2.08 - 1.95 (m, 2H), 1.82 - 1.67 (m, 4H), 1.57 - 1.25 (m, 4H).

Isómero 2 (*trans*-(1SR, 2SR)-2-(piridin-2-ildisulfanil)cicloheptan-1-ol):

LC-MS *m/z* calculada para C₁₂H₁₇NOS₂; 255.4, encontrado 256.2 [M+H]⁺; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.50 (d, *J* = 4.40 Hz, 1H), 7.58 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.38 (d, *J* = 8.40 Hz, 1H), 7.13 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H), 6.18 (s, 1H), 3.53 - 3.49 (m, 1H), 2.77 - 2.72 (m, 1H), 2.11 - 2.08 (m, 1H), 2.00 - 1.96 (m, 1H), 1.84 - 1.67 (m, 4H), 1.59 - 1.45 (m, 4H).

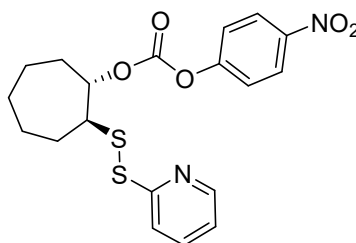
La estereoquímica absoluta de los isómeros se asignó de manera arbitraria.

Paso 5: Síntesis de 4-nitrofenil (trans-(1RS,2RS)-2-(piridin-2-ildisulfanil) cicloheptil) carbonato

A una solución agitada de *trans*-(1RS, 2RS)-2-(piridin-2-ildisulfanil)cicloheptan-1-ol (500 mg, 1.96 mmol) en DMF (10 ml) bajo atmósfera de nitrógeno se añadió bis(4-nitrofenil) carbonato (1.49 g, 2.5 eq., 4.89 mmol) seguido de diisopropiletilamina (1.02 ml, 3 eq., 5.87 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó durante 12 h. Tras la terminación de la reacción, la mezcla de reacción se dividió entre agua y DCM. Las dos capas se separaron y la capa orgánica se lavó con solución de salmuera, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó bajo presión reducida para proporcionar el producto crudo que se purificó por cromatografía de columna instantánea. El producto deseado se eluyó en 23% EtOAc : *n*-Hexano como una mezcla. La mezcla se volvió a purificar por cromatografía de columna de fase inversa (10-60% de 0.1% ácido fórmico en agua/ACN) para proporcionar el producto del título 4-nitrofenil (*trans*-(1RS,2RS)-2-(piridin-2-ildisulfanil) cicloheptil) carbonato (450 mg, 1.07 mmol). LC-MS *m/z* calculada para C₁₉H₂₀N₂O₅S₂; 420.5, encontrado 421.3 [M+H]⁺; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.45 (s, 1H), 8.27 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.73 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.62 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.39 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.09 (m, 1H), 5.04 - 5.03 (m,

1H), 3.22 (m, 1H), 2.15 - 2.00 (m, 3H), 1.87 - 1.79 (m, 2H), 1.72 - 1.63 (m, 4H), 1.54 - 1.49 (m, 2H).

Síntesis de 4-nitrofenil (*trans*-(1SR,2SR)-2-(piridin-2-ildisulfanil) cicloheptil) carbonato



5

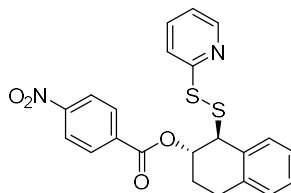
A una solución agitada de *trans*-(1SR,2SR)-2-(piridin-2-ildisulfanil)cicloheptan-1-ol (580 mg, 2.27 mmol) en DMF (10 ml) bajo atmósfera de nitrógeno se añadió bis(4-nitrofenil) carbonato (1.73 g, 2.5 eq., 5.68 mmol) seguido de di-isopropiletilamina (1.38 ml, 3.5 eq., 7.95 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 12 h. Tras la terminación de la reacción, se monitoreó por

10 TLC, la mezcla de reacción se dividió entre agua y DCM. Las dos capas se separaron y la capa orgánica combinada se lavó con solución de salmuera, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó bajo presión reducida. El producto crudo se purificó por cromatografía de columna instantánea. El producto deseado se eluyó en 23 - 25% EtOAc : *n*-Hexano como una mezcla. El producto se volvió a purificar por cromatografía de columna de fase inversa (10-60% de 0.1% ácido

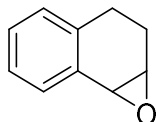
15 fórmico en agua/ ACN) para proporcionar el compuesto del título 4-nitrofenil (*trans*-(1SR,2SR)-2-(piridin-2-ildisulfanil) cicloheptil) carbonato (450 mg, 1.07 mmol)). LC-MS *m/z* calculada para C₁₉H₂₀N₂O₅S₂; 420.5, encontrado 421.3 [M+H]⁺; 1H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.46 (s, 1H), 8.27 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.76 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.66 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.40 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.12 (m, 1H), 5.04 - 5.03 (m, 1H), 3.23 (m, 1H), 2.12 - 2.00 (m, 2H), 1.87 - 1.79 (m, 3H), 1.63 - 1.49 (m, 6H).

20

Síntesis de 4-nitrofenil (*trans*-(1RS,2RS)-1-(piridin-2-ildisulfanil)-1,2,3,4-tetrahidronaftalen-2-il) carbonato



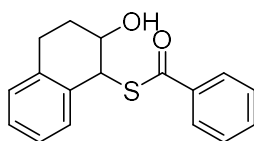
Paso 1: Síntesis de 1aH,2H,3H,7bH-nafto[1,2-b]oxireno



A una solución agitada de 1,2-dihidronaftaleno (2.0 g, 15.4 mmol) en diclorometano (75 ml) se añadió una solución saturada de carbonato ácido de sodio saturado (75 ml). La mezcla se enfrió a 0°C. A esta mezcla se añadió en porciones ácido 3-clorobenceno-1-carboperoxoico (5.30 g, 2 eq., 30.7 mmol) durante un periodo de 30 min. Después de la adición, la masa de reacción se dejó agitar a temperatura ambiente durante 16 h. La reacción se monitoreó por TLC. Después de la terminación de la reacción, las dos capas se separaron y la capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio y se concentró bajo presión reducida para proporcionar 1aH,2H,3H,7bH-nafto[1,2-b]oxireno (2.77 g). El crudo obtenido se utilizó directamente en el siguiente paso sin alguna purificación adicional.

10

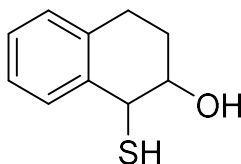
Paso 2: Síntesis de [trans-(2-hidroxi-1,2,3,4-tetrahidronaftalen-1-il)sulfanil] (fenil) metanona racémica



A una solución agitada de 1aH,2H,3H,7bH-nafto[1,2-b]oxireno (2.25 g, 15.4 mmol) en etoxietano (20 ml) se añadió silanodiona (4.50 g, 74.9 mmol) y S-ácido bencenocarbotoico por goteo (9.06 ml, 5 eq., 77.0 mmol). La mezcla se dejó agitar a temperatura ambiente durante 16 h. El progreso de la reacción se monitoreó por TLC y LCMS. Después de la terminación de la reacción, la mezcla de reacción se apagó con solución saturada de carbonato de sodio (25 ml) y se extrajo con acetato de etilo (2 x 20 ml). La capa orgánica combinada se lavó con agua, salmuera y se secó sobre sulfato de sodio y se concentró bajo presión reducida para obtener un crudo que se purificó por cromatografía de columna para proporcionar [trans-(2-hidroxi-1,2,3,4-tetrahidronaftalen-1-il)sulfanil] (fenil) metanona racémica como un líquido amarillo (1.57 mg, 35.87%)

20

Paso 3: Síntesis de Trans-1-sulfanil-1,2,3,4-tetrahidronaftalen-2-ol racémico

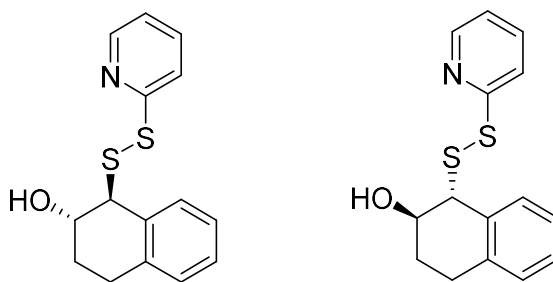


25

A una solución agitada de trans-[(2-hidroxi-1,2,3,4-tetrahidronaftalen-1-il)sulfanil](fenil)metanona racémica (1.40 g, 4.92 mmol) en diclorometano (25.0 ml) se añadió (2R,3R)-1,4-disulfanilbutano-2,3-diol (144 mg, 0.19 eq., 935 μ mol) e hidrato de hidrazina (60.4 μ L, 0.25 eq., 1.23 mmol). La masa de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. La reacción se monitoreó por TLC.

- 5 Después de la terminación de la reacción, la mezcla de reacción se apagó con solución de HCl (pH=1~2). La capa de DCM se separó y se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró bajo presión reducida para proporcionar trans-1-sulfanil-1,2,3,4-tetrahidronaftalen-2-ol racémico que se tomó como tal para el siguiente paso.

- 10 *Paso 4: Síntesis de trans-(1RS,2RS)-1-(piridin-2-ildisulfanil)-1,2,3,4-tetrahidronaftalen-2-ol y trans-(1SR,2SR)-1-(piridin-2-ildisulfanil)-1,2,3,4-tetrahidronaftalen-2-ol*



Isómero 1 trans (1RS, 2RS) Isómero 2 trans (1SR, 2SR)

- A una solución agitada de 2-(piridin-2-ildisulfanil)piridina (867 mg, 0.8 eq., 3.94 mmol) en metanol (5 ml) a 0°C. A esta, se añadió por goteo trans-1-sulfanil-1,2,3,4-tetrahidronaftalen-2-ol racémico en DCM tomado del paso previo. La reacción se dejó agitar a RT durante 16 h. La reacción se monitoreó por LCMS y TLC. Después de la terminación de la reacción, la masa de reacción se concentró bajo presión reducida para proporcionar un crudo que se purificó por cromatografía de columna para proporcionar 1-(piridin-2-ildisulfanil)-1,2,3,4-tetrahidronaftalen-2-ol racémico como un aceite amarillo que se purificó adicionalmente por cromatografía de columna de fase inversa para proporcionar un aceite incoloro (380 mg, 26.69%). El producto racémico obtenido se separó por cromatografía quiral para proporcionar el Isómero-1: 130 mg; Isómero-2: 190 mg.

Condiciones preparativas:

Columna : CHIRALPAK IA (250 mm X 420 mm X 5 mic)

Fase móvil : *n*-Hexano : Etanol con 0.1% DEA (50:50)

- 25 Velocidad de flujo : 19 ml/min

Isómero-1(*trans*-(1*RS*,2*RS*)-1-(piridin-2-ildisulfanil)-1,2,3,4-tetrahidronaftalen-2-ol):

LC-MS *m/z* calculada para C₁₅H₁₅NOS₂; 289.4, encontrado 290.1 [M+H]⁺; 1H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.07(d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 7.61 - 7.57(m, 1H), 7.48 - 7.44 (m, 2H), 7.36 - 7.34 (m, 1H), 7.18-7.13 (m, 3H), 4.98 (d, *J*=4.4 Hz, 1H), 4.24 (m, 1H), 3.07-2.99 (m, 1H), 2.91-2.80 (m, 1H).

5 Isómero-2(*trans*-(1*SR*,2*SR*)-1-(piridin-2-ildisulfanil)-1,2,3,4-tetrahidronaftalen-2-ol)

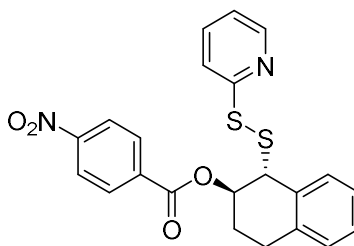
LC-MS *m/z* calculada para C₁₅H₁₅NOS₂; 289.4, encontrado 290.1 [M+H]⁺; 1H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.55 (d, *J*=4.0 Hz, 1H), 7.77 (d, *J*=8.0 Hz, 1H), 7.58 (t, *J*=7.6 Hz, 1H), 7.37(d, *J*=8.4 Hz, 1H), 7.26-7.17 (m, 3H), 7.08 (d, *J*=7.2 Hz, 1H), 4.15 (d, *J*=8.0 Hz, 1H), 3.97-3.93 (m, 1H), 2.89 (d, *J*=4.8 Hz, 2H), 2.32-2.28 (m, 1H), 1.97-1.87 (m, 2H).

10 La estereoquímica absoluta de los isómeros se asignó de manera arbitraria.

Paso 5. Síntesis de 4-nitrofenil (trans-(1*RS*,2*RS*)-1-(piridin-2-ildisulfanil)-1,2,3,4-tetrahidronaftalen-2-il) carbonato

A una solución agitada de *trans*-(1*RS*,2*RS*)-1-(piridin-2-ildisulfanil)-1,2,3,4-tetrahidronaftalen-2-ol (170 mg, 587 μmol) en N,N-dimetilformamida (2.50 ml) se añadió bis(4-nitrofenil) carbonato (447 mg, 2.5 eq., 1.47 mmol) seguido de diisopropiletilamina (307 μL, 3 eq., 1.76 mmol) por goteo a RT. La mezcla de reacción se agitó a RT durante 12 h en un tubo sellado. La reacción se monitoreó por TLC y LCMS. Después de la terminación de la reacción, la masa de reacción se dividió entre agua (5 ml) y DCM (5 ml). La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio y se evaporó bajo presión reducida para proporcionar el crudo, que se purificó por cromatografía de columna instantánea (0-40% EA en hexano) y también se volvió a purificar por cromatografía de columna de fase inversa (10-70% de 0.1% ácido fórmico en agua/ ACN) para producir 4-nitrofenil (*trans*-(1*RS*,2*RS*)-1-(piridin-2-ildisulfanil)-1,2,3,4-tetrahidronaftalen-2-il) carbonato (70.0 mg, 154 μmol) como un sólido gomoso incoloro (70 mg, 26.22%). LC-MS *m/z* calculada para C₂₂H₁₈N₂O₄S₂; 454.5 encontrado 455.3 [M+H]⁺; 1H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.73(d, *J*=20.4 Hz, 1H), 8.22(d, *J*=8.4 Hz, 2H), 7.67(s, 2H), 7.50(m, 1H), 7.32(d, *J*=8.4 Hz, 2H), 7.25-7.16(m, 4H), 5.51(s, 1H), 4.52(s, 1H), 3.01-2.85(m, 2H), 2.63(m, 1H), 2.26-2.22(m, 1H).

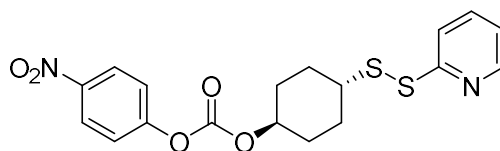
30 Síntesis de 4-nitrofenil (*trans*-(1*SR*,2*SR*)-1-(piridin-2-ildisulfanil)-1,2,3,4-tetrahidronaftalen-2-il) carbonato



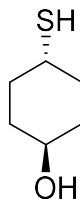
- A una solución agitada de *trans*-(1SR,2SR)-1-(piridin-2-ildisulfanil)-1,2,3,4-tetrahidronaftalen-2-ol (120 mg, 415 μ mol) en N,N-dimetilformamida (1.50 ml) se añadió bis(4-nitrofenil) carbonato (315 mg, 2.5 eq., 1.04 mmol) seguido de diisopropiletilamina (217 μ L, 3 eq., 1.24 mmol) por goteo a RT.
- 5 La mezcla de reacción se agitó a RT durante 12 h en un tubo sellado. El progreso de la reacción se monitoreó por TLC y LCMS. Después de la terminación de la reacción, la masa de reacción se dividió entre agua (5 ml) y DCM (5 ml), la capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio y se evaporó bajo presión reducida para proporcionar el crudo que se purificó por cromatografía de columna instantánea (0-40% EA en hexano) y también se volvió a purificar por cromatografía de columna de
- 10 fase inversa (10-70% de 0.1% ácido fórmico en agua/ ACN) para producir 4-nitrofenil (*trans*-(1SR,2SR)-1-(piridin-2-ildisulfanil)-1,2,3,4-tetrahidronaftalen-2-il) carbonato (65.0 mg, 143 μ mol)) como un sólido gomoso incoloro (65mg, 34.49%).

- LC-MS m/z calculada para $C_{22}H_{18}N_2O_4S_2$; 454.5 encontrado 455.3 $[M+H]^+$; 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 8.55(m, 1H), 8.22(d, J=7.6 Hz, 2H), 7.69(s, 2H), 7.51(m, 1H), 7.32(d, J=7.6 Hz, 2H), 7.25-7.16(m, 4H), 5.51(s, 1H), 4.52(s, 1H), 3.01-2.86(m, 2H), 2.62(m, 1H), 2.26(m, 1H).
- 15

Síntesis de 4-nitrofenil (*trans*-4-(piridin-2-ildisulfanil)ciclohexil) carbonato



Paso 1: Síntesis de trans-4-mercaptociclohexan-1-ol

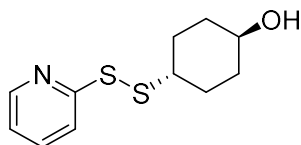


20

A una solución agitada de 7-oxabicyclo[2.2.1]heptano (1.00 g, 10.2 mmol) en etanol (10 ml) se añadió ácido 4-metilbenceno-1-sulfónico (2.63 g, 1.5 eq., 15.3 mmol), tiourea (1.16 g, 1.5 eq., 15.3 mmol) y

la masa de reacción se calentó a 80°C durante 24 h. Luego, la masa de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se añadió 50% solución acuosa de hidróxido de sodio (1.30 g, 3.2 eq., 32.6 mmol) a la masa de reacción y se calentó a 100°C durante 2 h. Después de la terminación de la reacción, la masa de reacción se enfrió a temperatura ambiente, se concentró bajo presión reducida y se acidificó con 10% solución de H₂SO₄. Luego, la masa de reacción se extrajo con DCM y se recuperó para el siguiente paso como tal.

Paso 2: Síntesis de trans-4-(piridin-2-ildisulfanil)ciclohexan-1-ol



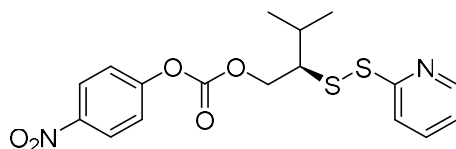
Una solución agitada de 2-(piridin-2-ildisulfanil)piridina (1.60 g, 0.8 eq., 7.26 mmol) en metanol (10.0 ml) a 0°C se añadió la capa orgánica de (paso 1) 4-sulfanilciclohexan-1-ol (1.20 g, 9.08 mmol). Tras la terminación de la adición, la masa de reacción se dejó agitar a temperatura ambiente durante 16 h. Después de la terminación de la reacción, la masa de reacción se concentró y el producto crudo se purificó por cromatografía de columna (usando 0-40% EtOAc : *n*-Hexano) para producir el producto deseado. El producto se volvió a purificar por cromatografía de columna de fase inversa usando 0.1% ácido fórmico y ACN. Las fracciones que contenían el producto deseado se recolectaron y se concentraron bajo presión reducida para proporcionar el producto del título como un aceite amarillo (1.60 g, 73% de rendimiento). LC-MS *m/z* calculada para C₁₁H₁₅NOS₂, 241; encontrado 242 [M+H]⁺.

Paso 3: Síntesis de 4-nitrofenil (trans-4-(piridin-2-ildisulfanil)ciclohexil) carbonato

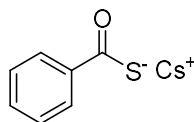
A una solución agitada de trans-4-(piridin-2-ildisulfanil)ciclohexan-1-ol (400 mg, 1.66 mmol) en N,N-dimetilformamida (3 ml) bajo atmósfera de nitrógeno se añadió bis(4-nitrofenil) carbonato (907 mg, 1.8 eq., 2.98 mmol), etilbis(propan-2-il)amina (892 µL, 3 eq., 4.97 mmol) y se agitó a una temperatura ambiente durante 16 h. El progreso de la reacción se monitoreó por TLC. Después de la terminación de la reacción, la masa de reacción se apagó con agua (15 ml) y se extrajo con DCM (3 x 10 ml). Las dos capas se separaron y la capa orgánica combinada se lavó con agua seguido de solución de salmuera, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró bajo presión reducida. El producto crudo obtenido se purificó por cromatografía de columna instantánea (0-30% EtOAc : *n*-Hexano). El producto se volvió a purificar por cromatografía de columna de fase inversa usando 0.1% ácido fórmico y ACN. Las fracciones que contenían el producto deseado se recolectaron y se concentraron bajo presión reducida para proporcionar 4-nitrofenil (trans-4-(piridin-2-

ildisulfanil)ciclohexil) carbonato como un aceite amarillo (0.3 g, 73% de rendimiento). LC-MS m/z calculada para $C_{18}H_{18}N_2O_5S_2$, 407; encontrado 407 $[M+H]^+$; 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 8.49 - 8.42 (m, 1H), 8.26 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.71 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.65 - 7.60 (m, 1H), 7.35 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.12 - 7.05 (m, 1H), 4.75 - 4.65 (m, 1H), 2.98 - 2.87 (m, 1H), 2.28 - 2.18 (m, 4H), 1.68 - 1.50 (m, 4H).

Síntesis de (2R)-3-metil-2-(piridin-2-ildisulfanil) butil 4-nitrofenil carbonato



Paso 1. Síntesis de benzoilsulfanuro de cesio

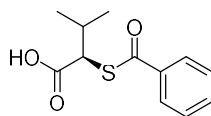


10

A una solución agitada de S-ácido bencenocarbotioico (5.00 g, 36.2 mmol) en metanol (40.0 ml) se añadió carbonato de cesio (7.72 g, 1.1 eq., 39.8 mmol) en porciones durante 10-15 min, bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se agitó a RT durante 2 h. Después de la terminación de la reacción (como se juzgó por TLC), la mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida.

El residuo sólido se diluyó con 10 ml de acetona y el sólido blanco ($CsHCO_3$) se filtró. Este proceso se repitió dos veces para asegurar que todo el $CsHCO_3$ se removió. La acetona luego se concentró para proporcionar benzoilsulfanuro de cesio (9.50 g, 35.2 mmol) como un sólido incoloro. 1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 8.08 (d, $J = 6.8$ Hz, 2H), 7.37 - 7.27 (m, 3H).

Paso 2. Síntesis del ácido (2R)-2-(benzoilsulfanil)-3-metilbutanoico



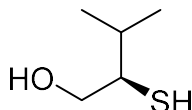
A una solución agitada de ácido (2S)-2-bromo-3-metilbutanoico (2.00 g, 11.0 mmol) en N,N-dimetilformamida (14.0 ml) se añadió benzoilsulfanuro de cesio (2.98 g, 11.0 mmol). La mezcla de reacción se agitó a RT durante 20 h. El progreso de la reacción se monitoreó por TLC, después de la terminación de la reacción, la mezcla de reacción se diluyó con éter dietílico (3 x 15 ml) y se lavó con agua (3 x 15 ml). La capa etérea se separó, se secó sobre sulfato de sodio, y se concentró bajo

25

presión reducida. El residuo obtenido se recrystalizó a partir de *n*-hexanos para proporcionar ácido (2*R*)-2-(benzoilsulfanil)-3-metilbutanoico (2.50 g, 10.5 mmol) como un compuesto aceitoso. ¹HNMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 12.93 (s, 1H), 7.92 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 7.69 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.55 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 4.14 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 2.30 – 2.22 (m, 1H), 1.01 – 0.89 (m, 6H).

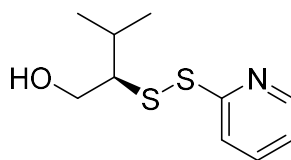
5

Paso 3. Síntesis de (2R)-3-metil-2-sulfanilbutan-1-ol



A una solución agitada de ácido (2*R*)-2-(benzoilsulfanil)-3-metilbutanoico (2.50 g, 10.5 mmol) en etoxietano (50.0 ml) a 0°C se añadió hidruro de litio-aluminio (52.5 ml, 5 eq., 52.5 mmol) en manera por goteo bajo atmósfera de nitrógeno. Después de la terminación de la adición, el baño de hielo se removi6 y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. El progreso de la reacción se monitore6 por TLC. Después de la terminación del material de partida, la mezcla de reacción se enfri6 en un baño de hielo y se apag6 con HCl 1.0 N (30 ml) a 0°C. La mezcla de reacción se extrajo con DCM (20 ml) y el material tipo gel restante de la reducción de LAH se lav6 con éter dietílico (10 ml). La capa orgánica combinada se sec6 sobre sulfato de sodio, se filtr6 y se llev6 adicionalmente al siguiente paso.

Paso 4. Síntesis de (2R)-3-metil-2-(piridin-2-ildisulfanil) butan-1-ol



A una solución agitada de (2*R*)-3-metil-2-sulfanilbutan-1-ol (1.20 g, 9.98 mmol) en MeOH (5 ml) se añadió 2-(piridin-2-ildisulfanil)piridina (1.76 g, 0.8 eq., 7.99 mmol) bajo atmósfera de nitrógeno y se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. El progreso de la reacción se monitore6 por TLC y LC-MS. Después de la terminación de la reacción, la masa de reacción se concentr6, y luego se extrajo con DCM. Las dos capas se separaron y la capa orgánica combinada se lav6 con agua seguido de salmuera y se sec6 sobre sulfato de sodio, se filtr6 y se evapor6. El producto crudo se purific6 por cromatografía de columna instantánea en gel de sílice (usando columna de 12 g), que se eluy6 en 50% EtOAc : *n*-Hexanos y también se volvió a purificar por cromatografía de columna de fase inversa (10-20% de 0.1% ácido fórmico en agua/ Acetonitrilo). Las fracciones que contenían el producto se recolectaron y se evaporaron bajo vacío para obtener el producto del título. El producto se volvió a

25

purificar por HPLC Preparativa.

Condiciones de HPLC Preparativa:

Columna : X-BridgeC-18 (250mm X 4.6mm X 5mic)

Fase móvil (A) : 0.1% Amoníaco en agua

5 Fase móvil (B) : Acetonitrilo

Velocidad de flujo : 19 ml/min

Gradiente B: 0/10,12/60,22/95,25/95,27/10,30/10

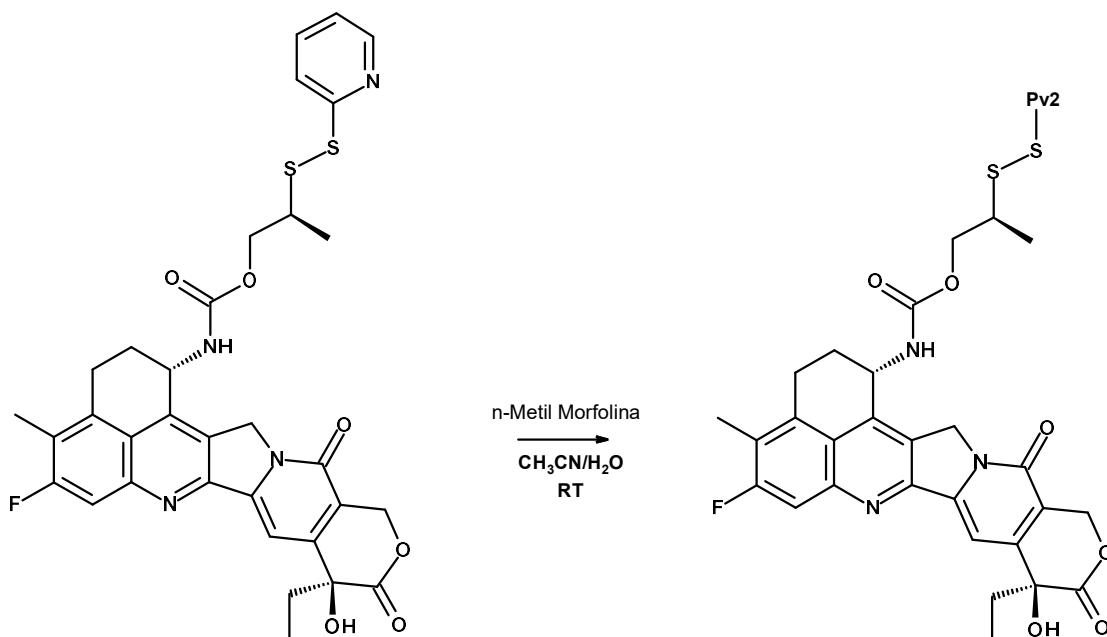
Las fracciones recolectadas de la HPLC Preparativa se combinaron y se evaporaron para proporcionar el producto del título 3-(piridin-2-ildisulfanil)-1,2,3,4-tetrahidronaftalen-2-ol (350 mg, 1.21 mmol) como un sólido amarillo. ¹HNMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.49 (d, *J* = 4 Hz, 1H), 7.55 - 7.54 (m, 1H), 7.36 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.13 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H), 3.82 (dd, *J* = 12.4 Hz, 1H), 3.66 - 3.60 (m, 1H), 2.75 - 2.70 (m, 1H), 2.01 - 1.92 (m, 1H), 1.10 - 1.01 (m, 7H).

Paso 5. Síntesis de (2R)-3-metil-2-(piridin-2-ildisulfanil) butil 4-nitrofenil carbonato

15 A una solución agitada de (2R)-3-metil-2-(piridin-2-ildisulfanil)butan-1-ol (800 mg, 3.49 mmol) en N,N-dimetilformamida (2.50 ml) se añadió bis(4-nitrofenil) carbonato (2.12 g, 2 eq., 6.98 mmol) seguido de diisopropiletilamina (1.82 ml, 3 eq., 10.5 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 12 h. Después que se completó la reacción, la masa de reacción se dividió entre agua y DCM. Las dos capas se separaron y la capa orgánica se
20 secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó bajo presión reducida para proporcionar el producto crudo, que se purificó por cromatografía de columna instantánea (0-40% EtOAc : *n*-Hexanos). El producto se volvió a purificar por cromatografía de fase inversa (10-70% de 0.1% ácido fórmico en agua/ ACN) para obtener el producto del título (2R)-3-methril-2-(piridin-2-ildisulfanil)butil 4-nitrofenil carbonato (600 mg, 1.52 mmol) como una goma incolora. ¹HNMR (400 MHz, CDCl₃): δ
25 8.45 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H), 8.26 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 7.72 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.63 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.35 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 7.08 (t, *J* = 6.8 Hz, 1H), 4.59 - 4.48 (m, 2H), 3.08 (q, *J* = 6.0 Hz, 1H), 2.21 - 2.13 (m, 1H), 1.14 - 1.06 (m, 6H).

Del paso 2, se siguió el mismo procedimiento para sintetizar (2S)-3-metil-2-(piridin-2-ildisulfanil) butil 4-nitrofenil carbonato usando ácido (2R)-2-bromo-3-metilbutanoico.

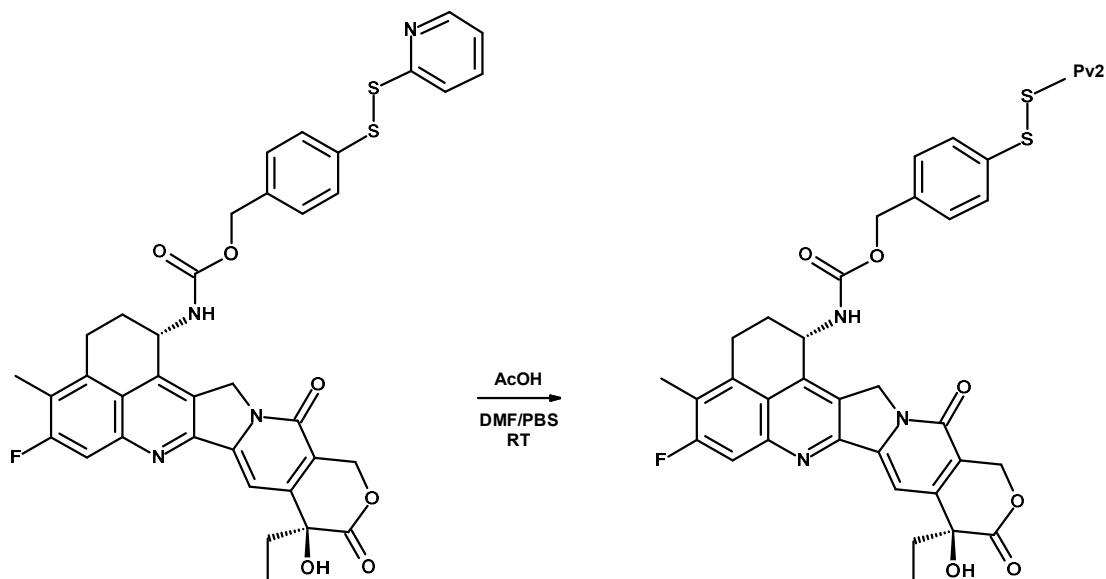
Síntesis del compuesto del Ejemplo 2 a partir del Intermediario III-2



En un vial con Pv2 (25.0 mg, 0.061 mmol; como un sólido que fluye libremente), [(2S)-2-(2-
 5 piridildisulfanil)propil]N-[(10S,23S)-10-etil-18-fluoro-10-hidroxi-19-metil-5,9-dioxo-8-oxa-4,15-
 diazahexaciclo[14.7.1.02,14.04,13.06,11.020,24]tetracosa-1,6(11),12,14,16(24),17,19-heptaen-23-
 il]carbamato (6.03 mg, 0.091 mmol), se añadió 1 ml de CH₃CN y 0.5 ml de agua. A este se añadió N-
 Metil morfolina (22.7 mg, 0.224 mmol). La mezcla se agitó durante la noche a RT. La LC-MS indicó
 una reacción completa. La mezcla de reacción se purificó directamente por HPLC de fase
 inversa (Waters SunfirePrep C18, PrepSlope_4 min, 20-85% CH₃CN/H₂O+0.05% TFA, 15 min) para
 10 producir el producto deseado (13.0 mg, rendimiento: 47.0%).

Los compuestos de los Ejemplos 1 y 3-9 (ver Tabla 4 a continuación) se sintetizaron de manera
 análoga como el compuesto del Ejemplo 2, a partir de los Intermediarios III-1 y III-3 hasta III-9,
 respectivamente.

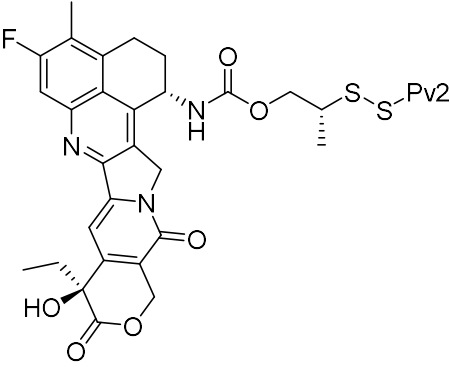
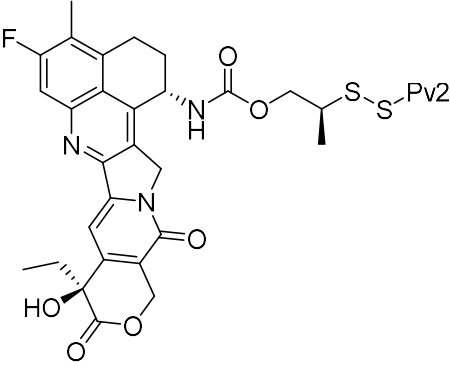
15 Síntesis del compuesto del Ejemplo 10 a partir del Intermediario XVI-1

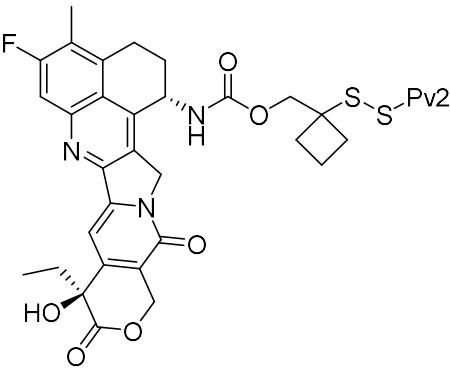
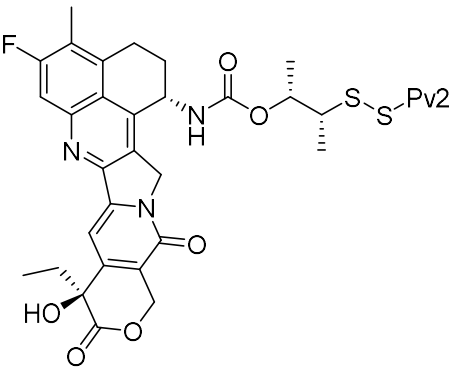
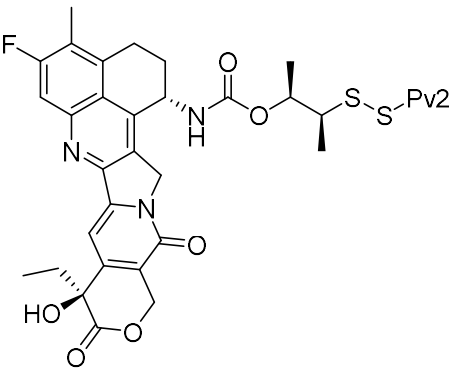


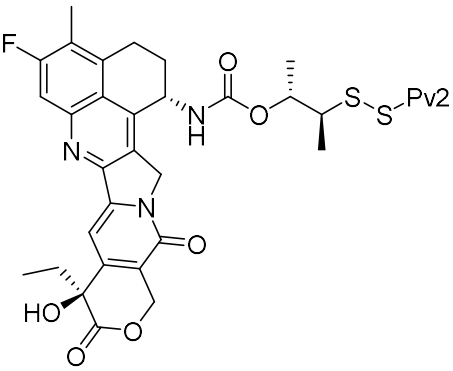
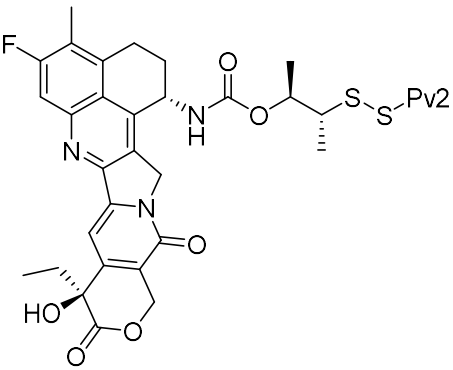
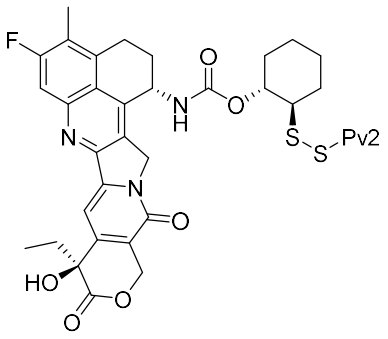
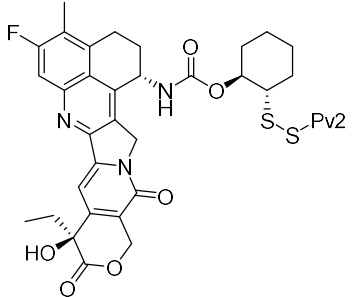
DMF y PBS se desgasificaron usando una corriente de N₂ durante 30 min. en un vial separado se colocó Pv2 (25.0 mg, 0.061 mmol; como un sólido que fluye libremente), [4-(2-piridildisulfanil)fenil]metil N-[(10S,23S)-10-etil-18-fluoro-10-hidroxi-19-metil-5,9-dioxo-8-oxa-4,15-diazahexaciclo[14.7.1.02,14.04,13.06,11.020,24]tetracosa-1,6(11),12,14,16(24),17,19-heptaen-23-il]carbamato (6.5 mg, 0.09 mmol), 1.5 ml de DMF y 0.5 ml de PBS. A esto se añadió CH₃CO₂H (0.0347 ml, 0.606 mmol). La mezcla se agitó a RT durante la noche. La LC-MS indicó una reacción completa. La mezcla de reacción se purificó por HPLC de fase inversa (PrepSlope_4min, 30-100% CH₃CN/H₂O+0.05%TFA,18 min) para producir el producto deseado (3.0 mg, rendimiento: 10.7%).

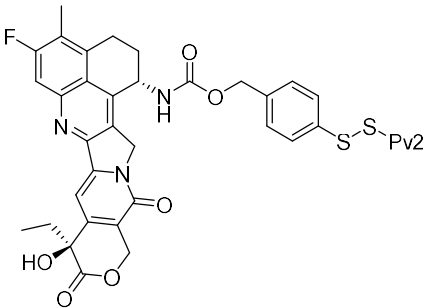
Los compuestos de la invención y los datos analíticos se presentan a continuación.

Tabla 4. Compuestos Ejemplares

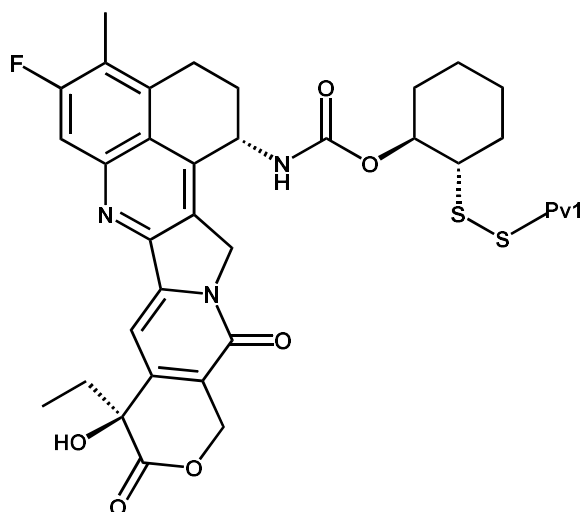
Ejemplo	Estructura	MS A: Maldi-TOF (M+) B: ESI (m/z=3)	Columna % ACN/H ₂ O Tiempo de Corrida Tiempo de Retención
1		B: 1521.3	A 2-95% 11 min 7.4 min
2		B: 1521.7	A 2-95% 11 min 7.4 min

3		B: 1530.6	A 2-95% 11 min 7.5 min
4		B: 1526.5	A 2-95% 11 min 7.5 min
5		B: 1526.1	A 2-95% 11 min 7.5 min

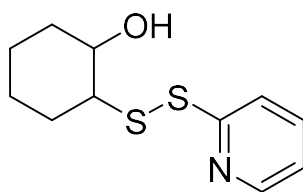
6		B: 1525.8	A 2-95% 11 min 7.4 min
7		B: 1526.4	A 2-95% 11 min 7.5 min
8		B: 1534.8	A 2-95% 11 min 7.6 min
9		B: 1534.6	A 2-95% 11 min 7.7 min

10		B: 1537.6	A 2-95% 11 min 7.5 min
----	---	-----------	--

Ejemplo 11: Síntesis del Compuesto 11



Paso 1. Síntesis de 2-(piridin-2-ildisulfanil)ciclohexan-1-ol



5

A una solución de 1,2-di(piridin-2-il)disulfano (15.2 g, 68.9 mmol) en MeOH (desgasificado con N₂) (30 ml) se añadió (1-mercaptociclobutil)metanol (11.4 g, 86.2 mmol) (desgasificado con N₂) por goteo y se agitó durante 16 h a temperatura ambiente bajo una atmósfera de N₂. La mezcla de reacción se concentró hasta sequedad bajo vacío. El crudo resultante material se purificó por cromatografía de columna usando 30% EtOAc/hexanos para proporcionar el compuesto del título como un líquido amarillo. ¹HNMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.54-8.53 (m, 1H), 7.60-7.56 (m, 1H), 7.40-

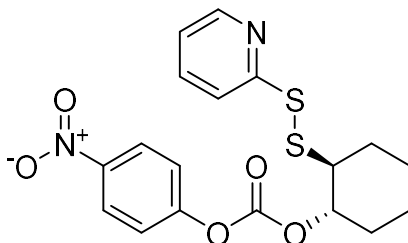
10

7.38 (m, 1H), 7.17-7.14 (m, 1H), 3.38-3.34 (m, 1H), 2.62-2.57 (m, 1H), 2.11-2.02 (m, 1H), 1.75-1.74 (m, 2H), 1.61-1.60 (m, 1H), 1.42-1.24 (m, 4H).

El compuesto del título se sometió a condiciones de HPLC preparativa quiral (Chiralpak IG : 250 mm x 20 mm x 5 mic; *n*-Hexano : IPA con 0.1% Dietilamina (80:20); 19 ml/min; 25°C (Temperatura ambiente). (1R,2R)-2-(piridin-2-ildisulfanil)ciclohexan-1-ol (4.5 g, 18.6 mmol) se eluyó primero (tiempo de retención: 3.9 minutos), seguido de (1S,2S)-2-(piridin-2-ildisulfanil)ciclohexan-1-ol (tiempo de retención: 11.3 minutos). La estereoquímica absoluta se confirmó por comparación del producto del Paso 2 con material quiral que tiene una estereoquímica absoluta reportada (ver Monaco, M. R.; J. Am. Chem. Soc. 2014, 136, 49, 16982-16985).

10

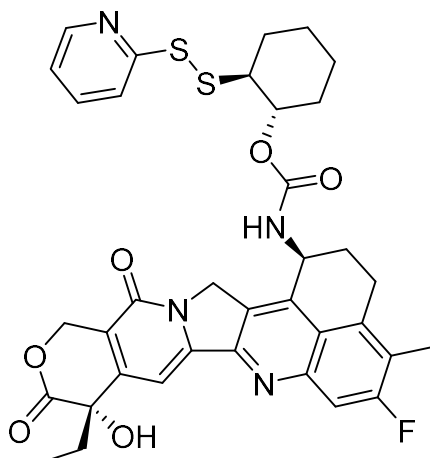
Paso 2. Síntesis de 4-nitrofenil ((1S,2S)-2-(piridin-2-ildisulfanil)ciclohexil) carbonato.



A una solución de (1R,2R)-2-(piridin-2-ildisulfanil)ciclohexan-1-ol (4.5 g, 18.6 mmol) en DMF (90.0 ml) se añadió DIPEA (10.3 ml, 56.0 mmol) y bis(4-nitrofenil) carbonato (11.35 g, 27.3 mmol) a temperatura ambiente. El recipiente de reacción se selló y se agitó a temperatura ambiente durante 12 h. El progreso de la reacción se monitoreó por TLC (20% EtOAc/hexanos). Después de la terminación de la reacción, la mezcla de reacción se apagó con agua (20.0 ml) y se extrajo con EtOAc (20.0 ml). La capa orgánica se separó, se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró bajo presión reducida para proporcionar el producto crudo, que se purificó por cromatografía de columna usando 20-30% EtOAc/hexanos para proporcionar el producto del título como un sólido blanquecino (5.0 g, 66% de rendimiento). ¹HNMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.44 (d, *J* = 4 Hz, 1H), 8.28 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.72 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.61-7.57 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.41 (d, *J* = 9.6 Hz, 2H), 7.08-7.05 (t, *J* = 5.2 Hz, 1H), 4.85-4.74 (m, 1H), 3.03-2.92 (m, 1H), 2.28 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H), 2.20-2.12 (m, 1H), 1.85-1.62 (m, 3H), 1.45-1.25 (m, 3H). LC-MS *m/z* calculada para: 406.7; encontrado: 407.4 [M+H]⁺.

25

Paso 3. Síntesis de [(1S,2S)-2-(2-piridildisulfanil)ciclohexil]N-[(10S,23S)-10-etil-18-fluoro-10-hidroxi-19-metil-5,9-dioxo-8-oxa-4,15-diazahexaciclo[14.7.1.02,14.04,13.06,11.020,24]tetracosa-1,6(11),12,14,16(24),17,19-heptaen-23-il]carbamato.

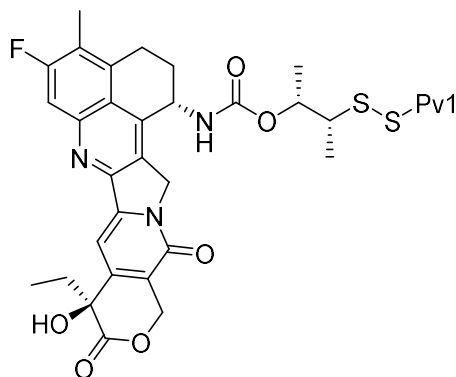


A ácido metansulfónico de (10S,23S)-23-amino-10-etil-18-fluoro-10-hidroxi-19-metil-8-oxa-4,15-diazahexaciclo[14.7.1.02,14.04,13.06,11.020,24]tetracosa-1,6(11),12,14,16(24),17,19-heptaeno-5,9-diona (250 mg, 0.470 mmol) en 10 ml de DMF seca se añadió (1R,2R)-2-(piridin-2-ildisulfanil)ciclohexan-1-ol (del paso 2; 191 mg, 0.470 mmol), N,N-diisopropiletilamina (122 mg, 0.941 mmol) y DMAP (115 mg, 0.941 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La LC-MS indicó que el producto de acoplamiento deseado se había formado. La mezcla de reacción luego se diluyó con EtOAc, se lavó con NH₄Cl acuoso saturado, H₂O, y salmuera. La mezcla se secó sobre sulfato de sodio, se filtró, y se concentró. El residuo crudo se purificó por cromatografía de columna usando 0-5% MeOH/diclorometano para producir 240 mg del producto deseado en 72.6% de rendimiento (240 mg).

Paso 4. Acoplamiento con Pv1 (Compuesto 11)

En un vial se añadió Pv1 (275 mg, .0811 mmol), el compuesto del Paso 3 (74.1 mg, 0.105 mmol), acetonitrilo (10 ml) y agua (5 ml). n-Metilmorfolina (0.303 g, .0030 mol) se añadió a esta mezcla. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La LC-MS indicó que el producto acoplado deseado se había formado.

La mezcla de reacción se purificó directamente por HPLC de fase inversa (20-85% acetonitrilo/agua, 0.5% ácido acético en una columna Sunfire Prep C18 (10 µm, 50x150 mm), tiempo de retención: 7.022 min) para producir 213 mg del producto deseado en 68% de rendimiento (213 mg). ESI (M+3H/3)³⁺: 1291.6

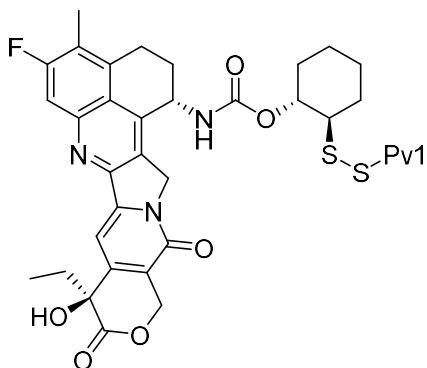
Ejemplo 12: Síntesis del Compuesto 12

Paso 1. Síntesis de [(1R,2R)-1-metil-2-(2-piridildisulfanil)propil] N-[(10S,23S)-10-etil-18-fluoro-10-hidroxi-19-metil-5,9-dioxo-8-oxa-4,15-diazahexaciclo[14.7.1.02,14.04,13.06,11.020,24]tetracosa-1,6(11),12,14,16(24),17,19-heptaen-23-il]carbamato

A una mezcla de hidrato de 1-hidroxibenzotriazol (8.64 mg, 0.0564 mmol), tamiz molecular finamente triturado de 4 Å (50 mg), y ácido metansulfónico de (10S,23S)-23-amino-10-etil-18-fluoro-10-hidroxi-19-metil-8-oxa-4,15-diazahexaciclo[14.7.1.02,14.04,13.06,11.020,24]tetracosa-1,6(11),12,14,16(24),17,19-heptaen-5,9-diona (25.0 mg, 0.0470 mmol) y piridina (0.0190 ml, 0.235 mmol) en 2 ml de DMF anhidra se añadió [(1R,2R)-1-metil-2-(2-piridildisulfanil)propil] (4-nitrofenil) carbonato (19.7 mg, 0.470 mmol) (ver Síntesis del II-4: 4-nitrofenil((2R,3R)-3-(piridin-2-ildisulfanil)butan-2-il) carbonato). Después de la agitación durante 16 h a temperatura ambiente la mezcla se filtró, y la solución se concentró. El residuo luego se purificó por cromatografía de columna (0-5% MeOH/DCM) para producir el compuesto del título (35.0 mg, 0.0517 mmol, rendimiento: 110%).

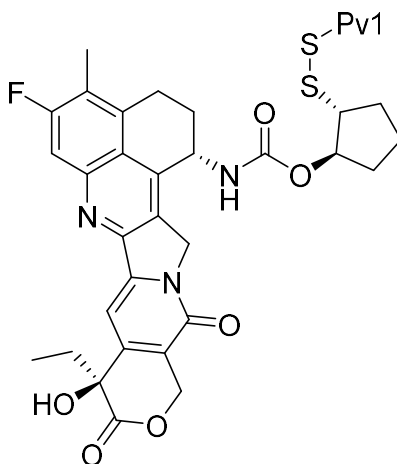
Paso 2. Acoplamiento con el Péptido Pv1 (Compuesto 12)

En un vial se colocó el péptido Pv1 (50.0 mg, 14.7e-5 mol), [(1R,2R)-1-metil-2-(2-piridildisulfanil)propil]N-[(10S,23S)-10-etil-18-fluoro-10-hidroxi-19-metil-5,9-dioxo-8-oxa-4,15-diazahexaciclo[14.7.1.02,14.04,13.06,11.020,24]tetracosa-1,6(11),12,14,16(24),17,19-heptaen-23-il]carbamato (0.013 g, 1.92e-5 mol), 2 ml de ACN y 1 ml de agua. A esto se añadió N-metilmorfolina (0.060 ml, 0.000545 mol). La mezcla se agitó durante la noche a RT. La LC-MS indicó una reacción completa. La mezcla de reacción se purificó directamente por HPLC de fase inversa (Waters SunfirePrep C18, PrepSlope_4 min, 20-85% ACN/H₂O+0.05% TFA, 13 min; tiempo de retención: 6.95 min) para producir el Compuesto 12 (0.0350 g, 9.10e-6 mol, rendimiento: 61.8%). ESI (M+3H/3)³⁺: 1281.9

Ejemplo 13: Síntesis del Compuesto 13

El Compuesto 13 se hizo de una forma análoga al Compuesto 11, reemplazando ((1*S*,2*S*)-2-(piridin-2-ildisulfanil)ciclohexil) carbonato con ((1*R*,2*R*)-2-(piridin-2-ildisulfanil)ciclohexil) carbonato en el

5 Paso 2. Columna Sunfire Prep C18 (10 μ m, 50x150 mm) (20-85% acetonitrilo/agua, 0.5% ácido acético); tiempo de retención: 6.609 minutos. ESI (M+3H/3)³⁺: 1290.3

Ejemplo 14: Síntesis del Compuesto 14

10 *Paso 1. Síntesis de (4-Nitrofenil) [trans-(1*RS*,2*RS*)-2-(2-piridildisulfanil)ciclopentil] carbonato*

El compuesto del título se sintetizó de acuerdo con los métodos de síntesis análogos descritos en la síntesis del Compuesto 11, usando el primer estereoisómero que se eluyó a partir de la separación por cromatografía quiral de trans-2-(2-piridildisulfanil)ciclopentilo racémico asignado como *trans*-(1*RS*,2*RS*)-2-(2-piridildisulfanil)ciclopentan-1-ol.

15

*Paso 2. Síntesis de [trans-(1*RS*,2*RS*)-2-(2-piridildisulfanil)ciclopentil]N-[(10*S*,23*S*)-10-etil-18-fluoro-*

10-hidroxi-19-metil-5,9-dioxo-8-oxa-4,15-

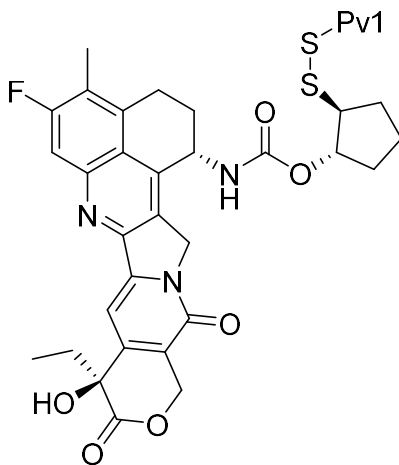
diazahexaciclo[14.7.1.02,14.04,13.06,11.020,24]tetracosa-1,6(11),12,14,16(24),17,19-heptaen-23-il]carbamato

A una mezcla de mesilato de exatecán [CAS: 169869-90-3] (50 mg, 0.0941 mmol), DMAP (23.0 mg, 0.188 mmol), y (4-nitrofenil) [trans-(1RS,2RS)-2-(2-piridildisulfanil)ciclopentil] carbonato (40.6 mg, 0.103 mmol) en 2 ml de DMF anhidra se añadió N,N-diisopropiletilamina (35 μ L, 0.188 mmol). Después de la agitación durante 16 h a temperatura ambiente la mezcla se diluyó con EtOAc (50 ml), se lavó con 30 ml de NH₄Cl saturado, 30 ml de agua, y 20 ml de salmuera. La capa orgánica se concentró y el residuo se purificó por cromatografía de columna (0-5% MeOH/DCM) para producir el compuesto del título (33.0 mg, 0.0479 mmol, rendimiento: 50.9%).

Paso 3. Acoplamiento con el Péptido Pv1 (Compuesto 14)

En un vial se colocó el péptido Pv1 (50.0 mg, 1.47e-5 mol), [trans-(1RS,2RS)-2-(2-piridildisulfanil)ciclopentil]N-[(10S,23S)-10-etil-18-fluoro-10-hidroxi-19-metil-5,9-dioxo-8-oxa-4,15-diazahexaciclo[14.7.1.02,14.04,13.06,11.020,24]tetracosa-1,6(11),12,14,16(24),17,19-heptaen-23-il]carbamato (0.0124 g, 1.80e-5 mol), 2 ml de ACN y 1 ml de agua. A esto se añadió N-metilmorfolina (0.060 ml, 0.000545 mol). La mezcla se agitó durante la noche a RT. La LC-MS indicó una reacción completa. La mezcla de reacción se purificó directamente por HPLC de fase inversa (Waters SunfirePrep C18, PrepSlope_4 min, 20-90% ACN/H₂O+0.05% TFA, 16 min; tiempo de retención: 6.761 min) para producir el Compuesto 14 (0.0360 g, 9.34e-6 mol, rendimiento: 63.3%). ESI (M+3H/3)³⁺: 1286.3.

Ejemplo 15: Síntesis del Compuesto 15



Paso 1. Síntesis de (4-nitrofenil) [trans-(1SR,2SR)-2-(2-piridildisulfanil)ciclopentil] carbonato

El compuesto del título se sintetizó a partir del segundo estereoisómero que se eluyó a partir de la separación por cromatografía quiral de trans-2-(2-piridildisulfanil)ciclopentilo racémico, asignado como *trans*-(1SR,2SR)-2-(2-piridildisulfanil)ciclopentan-1-ol, usando los métodos de síntesis análogos descritos en la síntesis del Compuesto 11.

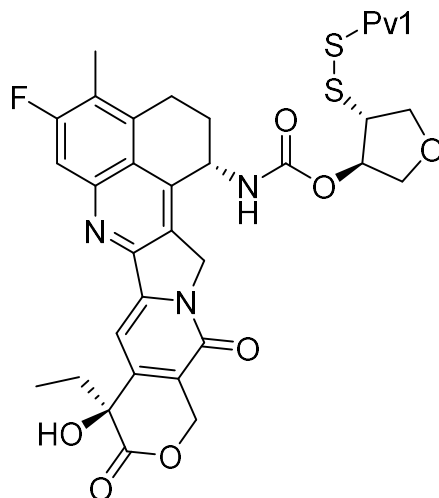
Paso 2. Síntesis de [trans-(1SR,2SR)-2-(2-piridildisulfanil)ciclopentil] N-[(10S,23S)-10-etil-18-fluoro-10-hidroxi-19-metil-5,9-dioxo-8-oxa-4,15-diazahexaciclo[14.7.1.02,14.04,13.06,11.020,24]tetracosa-1,6(11),12,14,16(24),17,19-heptaen-23-il]carbamato

A una mezcla de mesilato de exatecán [CAS: 169869-90-3] (50 mg, 0.0941 mmol), DMAP (23.0 mg, 0.188 mmol), y (4-nitrofenil) [trans-(1SR,2SR)-2-(2-piridildisulfanil)ciclopentil] carbonato (38.2 mg, 0.0974 mmol) en 2 ml de DMF anhidra se añadió N,N-diisopropiletilamina (35 µL, 0.188 mmol). Después de la agitación durante 16 h a temperatura ambiente la mezcla se diluyó con EtOAc (50 ml), se lavó con 30 ml de NH₄Cl saturado, 30 ml de agua, y 20 ml de salmuera. La capa orgánica se concentró y el residuo se purificó por cromatografía de columna (0-5% MeOH/DCM) para producir el compuesto del título (29.0 mg, 0.0421 mmol, rendimiento: 44.8%).

Paso 3. Acoplamiento con el Péptido Pv1 (Compuesto 15)

En un vial se colocó el péptido Pv1 (50.0 mg, 1.47e-5 mol), *trans*-[(1SR,2SR)-2-(2-piridildisulfanil)ciclopentil]N-[(10S,23S)-10-etil-18-fluoro-10-hidroxi-19-metil-5,9-dioxo-8-oxa-4,15-diazahexaciclo[14.7.1.02,14.04,13.06,11.020,24]tetracosa-1,6(11),12,14,16(24),17,19-heptaen-23-il]carbamato (0.0124 g, 1.80e-5 mol), 2 ml de ACN y 1 ml de agua. A esto se añadió N-metilmorfolina (0.060 ml, 0.000545 mol). La mezcla se agitó durante la noche a RT. La LC-MS indicó una reacción completa. La mezcla de reacción se purificó directamente por HPLC de fase inversa (Waters SunfirePrep C18, PrepSlope_4 min, 20-90% ACN/H₂O+0.05% TFA, 16 min; tiempo de retención: 6.883 min) para producir el Compuesto 15 (0.0280 g, 7.26e-6 mol, rendimiento: 49.3%). ESI (M+3H/3)³⁺: 1285.9.

Ejemplo 16: Síntesis del Compuesto 16



Paso 1. Síntesis de (4-nitrofenil) [trans-(3RS,4RS)-4-(2-piridildisulfanil)tetrahidrofuran-3-il] carbonato

El compuesto del título se sintetizó a partir del primer estereoisómero que se eluyó a partir de la separación por cromatografía quiral de trans-4-(2-piridildisulfanil)tetrahidrofuran-3-ol racémico, asignado como *trans*-(3RS,4RS)-4-(2-piridildisulfanil)tetrahidrofuran-3-ol, usando los métodos de síntesis análogos descritos en la síntesis del Compuesto 11.

Paso 2. Síntesis de [trans-(3RS,4RS)-4-(2-piridildisulfanil)tetrahidrofuran-3-il]N-[(10S,23S)-10-etil-18-fluoro-10-hidroxi-19-metil-5,9-dioxo-8-oxa-4,15-diazahexaciclo[14.7.1.02,14.04,13.06,11.020,24]tetracosa -1,6(11),12,14,16(24),17,19-heptaen-23-il]carbamato

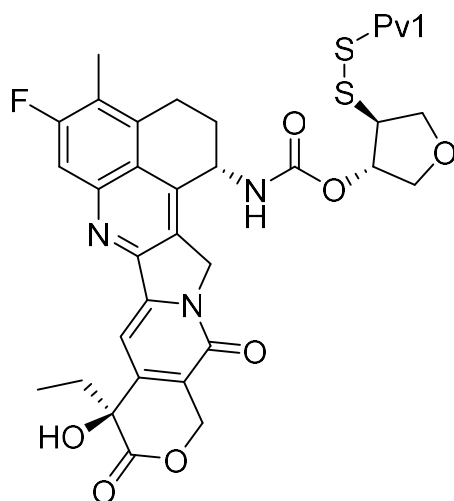
A una mezcla de mesilato de exatecán [CAS: 169869-90-3] (50 mg, 0.0941 mmol), DMAP (23.0 mg, 0.188 mmol), y (4-nitrofenil) [trans-(3RS,4RS)-4-(2-piridildisulfanil)tetrahidrofuran-3-il] carbonato (38.2 mg, 0.0969 mmol) en 2 ml de DMF anhidra se añadió N,N-diisopropiletilamina (35 µL, 0.188 mmol). Después de la agitación durante 16 h a temperatura ambiente la mezcla se diluyó con EtOAc (50 ml), se lavó con 30 ml de NH₄Cl saturado, 30 ml de agua, y 20 ml de salmuera. La capa orgánica se concentró y el residuo se purificó por cromatografía de columna (0-5% MeOH/DCM) para producir el compuesto del título (40.0 mg, 0.0579 mmol, rendimiento: 61.6%).

Paso 3. Acoplamiento con el Péptido Pv1 (Compuesto 16)

En un vial se colocó el péptido Pv1 (50.0 mg, 1.47e-5 mol), [trans-(3RS,4RS)-4-(2-

piridildisulfanil)tetrahidrofuran-3-il] N-[(10S,23S)-10-etil-18-fluoro-10-hidroxi-19-metil-5,9-dioxo-8-oxa-4,15-diazahexaciclo[14.7.1.02,14.04,13.06,11.020,24]tetracosa-1,6(11),12,14,16(24),17,19-heptaen-23-il]carbamato (0.0124 g, 1.80e-5 mol), 2 ml de ACN y 1 ml de agua. A esto se añadió N-Metilmorfolina (0.060 ml, 0.000545 mol). La mezcla se agitó durante la noche a RT. La LC-MS indicó una reacción completa. La mezcla de reacción se purificó directamente por HPLC de fase inversa (Waters SunfirePrep C18, PrepSlope_4 min, 20-80% ACN/H₂O+0.05% TFA, 15 min; tiempo de retención: 6.633 min) para producir el Compuesto 16 (0.0290 g, 7.52e-6 mol, rendimiento: 51.0%). ESI (M+3H/3)³⁺: 1286.4.

10 Ejemplo 17: Síntesis del Compuesto 17



Paso 1. Síntesis de (4-nitrofenil) [trans-(3SR,4SR)-4-(2-piridildisulfanil)tetrahidrofuran-3-il] carbonato

El compuesto del título se sintetizó a partir del segundo estereoisómero que se eluyó a partir de la separación por cromatografía quiral de trans-4-(2-piridildisulfanil)tetrahidrofuran-3-ol racémico, asignado como *trans*-(3SR,4SR)-4-(2-piridildisulfanil)tetrahidrofuran-3-ol, usando los métodos de síntesis análogos descritos en la síntesis del Compuesto 11.

Paso 2. Síntesis de [trans-(3SR,4SR)-4-(2-piridildisulfanil)tetrahidrofuran-3-il] N-[(10S,23S)-10-etil-18-fluoro-10-hidroxi-19-metil-5,9-dioxo-8-oxa-4,15-diazahexaciclo[14.7.1.02,14.04,13.06,11.020,24] tetracosa-1,6(11),12,14,16(24),17,19-heptaen-23-il]carbamato

A una mezcla de mesilato de exatecán [CAS: 169869-90-3] (50 mg, 0.0941 mmol), DMAP (23.0 mg, 0.188 mmol), y (4-nitrofenil) [trans-(3SR,4SR)-4-(2-piridildisulfanil)tetrahidrofuran-3-il] carbonato

(38.2 mg, 0.0969 mmol) en 2 ml de DMF anhidra se añadió N,N-diisopropiletilamina (35 μ L, 0.188 mmol). Después de la agitación durante 16 h a temperatura ambiente la mezcla se diluyó con EtOAc (50 ml), se lavó con 30 ml de NH_4Cl saturado, 30 ml de agua, y 20 ml de salmuera. La capa orgánica se concentró y el residuo se purificó por cromatografía de columna (0-5% MeOH/DCM) para producir

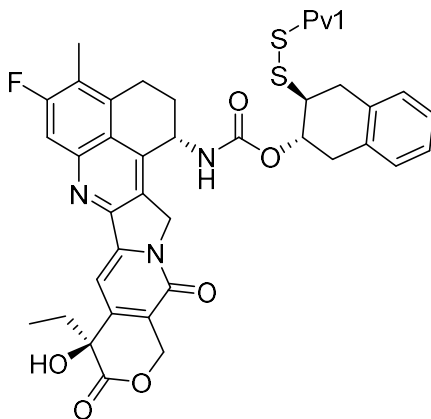
5 *[trans-(3SR,4SR)-4-(2-piridildisulfanil)tetrahydrofuran-3-il]N-[(10S,23S)-10-etil-18-fluoro-10-hidroxi-19-metil-5,9-dioxo-8-oxa-4,15-diazahexaciclo[14.7.1.02,14.04,13.06,11.020,24]tetracosa-1,6(11),12,14,16(24),17,19-heptaen-23-il]carbamato* (31.0 mg, 0.0449 mmol, rendimiento: 47.7%).

Paso 3. Acoplamiento con el Péptido Pv1 (Compuesto 17)

10 En un vial se colocó el péptido Pv1 (50.0 mg, 1.47×10^{-5} mol), *[trans-(3SR,4SR)-4-(2-piridildisulfanil)tetrahydrofuran-3-il] N-[(10S,23S)-10-etil-18-fluoro-10-hidroxi-19-metil-5,9-dioxo-8-oxa-4,15-diazahexaciclo[14.7.1.02,14.04,13.06,11.020,24]tetracosa-1,6(11),12,14,16(24),17,19-heptaen-23-il]carbamato* (0.0124 g, 1.80×10^{-5} mol), 2 ml de ACN y 1 ml de agua. A esto se añadió N-metilmorfolina (0.060 ml, 0.000545 mol). La mezcla se agitó durante la noche a RT. La LC-MS indicó

15 una reacción completa. La mezcla de reacción se purificó directamente por HPLC de fase inversa (Waters SunfirePrep C18, PrepSlope_4 min, 20-85% ACN/ H_2O +0.05% TFA, 13 min; tiempo de retención: 6.670 min) para producir el Compuesto 17 (0.0170 g, 4.41×10^{-6} mol, rendimiento: 29.9%). ESI ($\text{M}+3\text{H}/3$) $^{3+}$: 1286.7.

20 Ejemplo 18: Síntesis del Compuesto 18



Paso 1. Síntesis de (4-nitrofenil) *[trans-(2RS,3RS)-3-(2-piridildisulfanil)tetralin-2-il] carbonato*

El compuesto del título se sintetizó a partir del primer estereoisómero que se eluyó a partir de la separación por cromatografía quiral de *trans*-3-(2-piridildisulfanil)tetralin-2-ol racémico, asignado

25 como *trans*-(2RS,3RS)-3-(2-piridildisulfanil)tetralin-2-ol, usando los métodos de síntesis análogos

descritos en la síntesis del Compuesto 11.

Paso 2. Síntesis de [trans-(2RS,3RS)-3-(2-piridildisulfanil)tetralin-2-il] N-[(10S,23S)-10-etil-18-fluoro-10-hidroxi-19-metil-5,9-dioxo-8-oxa-4,15-

5 *diazahexaciclo[14.7.1.02,14.04,13.06,11.020,24]tetracosa-1,6(11),12,14,16(24),17,19-heptaen-23-il]carbamato*

A una mezcla de mesilato de exatecán [CAS: 169869-90-3] (25 mg, 0.0470 mmol), DMAP (11.5 mg, 0.0941 mmol), y (4-nitrofenil) [*trans*-(2RS,3RS)-3-(2-piridildisulfanil)tetralin-2-il] carbonato (32.1 mg, 0.0705 mmol) en 2 ml de DMF anhidra se añadió N,N-diisopropiletilamina (18 µL, 0.941 mmol).

10 Después de la agitación durante 16 h a temperatura ambiente la mezcla se diluyó con EtOAc (50 ml), se lavó con 30 ml de NH₄Cl saturado, 30 ml de agua, y 20 ml de salmuera. La capa orgánica se concentró y el residuo se purificó por cromatografía de columna (0-3% MeOH/DCM) para producir el compuesto del título (26.0 mg, 0.0346 mmol, rendimiento: 73.6%).

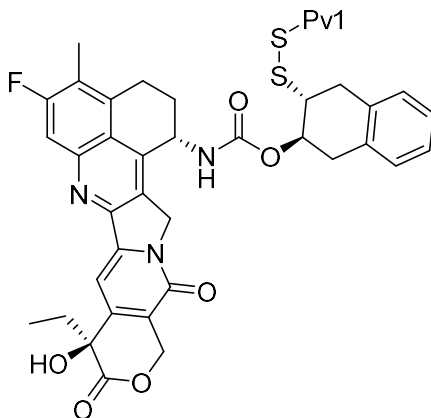
15 *Paso 3. Acoplamiento con el Péptido Pv1 (Compuesto 18)*

En un vial se colocó el péptido Pv1 (25.0 mg, 7.37e-6 mol), [*trans*-(2RS,3RS)-3-(2-piridildisulfanil)tetralin-2-il] N-[(10S,23S)-10-etil-18-fluoro-10-hidroxi-19-metil-5,9-dioxo-8-oxa-4,15-diazahexaciclo[14.7.1.02,14.04,13.06,11.020,24]tetracosa-1,6(11),12,14,16(24),17,19-heptaen-23-il]carbamato (0.00719 g, 9.58e-6 mol), 1 ml de ACN y 0.5 ml de agua. A esto se añadió N-

20 metilmorfolina (0.030 ml, 0.000273 mol). La mezcla se agitó durante 65h a RT. La LC-MS indicó una reacción completa. La mezcla de reacción se purificó directamente por HPLC de fase inversa (Waters SunfirePrep C18, PrepSlope_4 min, 20-95% ACN/H₂O+0.05% TFA, 20 min; tiempo de retención: 6.851 min) para producir el Compuesto 18 (0.0080 g, 2.04e-6 mol, rendimiento: 27.7%). ESI (M+3H/3)³⁺: 1307.4.

25

Ejemplo 19: Síntesis del Compuesto 19



Paso 1. Síntesis de (4-nitrofenil) [trans-(2SR,3SR)-3-(2-piridildisulfanil)tetralin-2-il] carbonato

El compuesto del título se sintetizó a partir del segundo estereoisómero que se eluyó a partir de la separación por cromatografía quiral de trans-3-(2-piridildisulfanil)tetralin-2-ol racémico, asignado como *trans*-(2SR,3SR)-3-(2-piridildisulfanil)tetralin-2-ol, usando los métodos de síntesis análogos descritos en la síntesis del Compuesto 11.

Paso 2. Síntesis de [trans-(2SR,3SR)-3-(2-piridildisulfanil)tetralin-2-il] N-[(10S,23S)-10-etil-18-fluoro-10-hidroxi-19-metil-5,9-dioxo-8-oxa-4,15-diazahexaciclo[14.7.1.02,14.04,13.06,11.020,24]tetracosa-1,6(11),12,14,16(24),17,19-heptaen-23-il]carbamato

A una mezcla de mesilato de exatecán [CAS: 169869-90-3] (25 mg, 0.0470 mmol), DMAP (11.5 mg, 0.0941 mmol), y (4-nitrofenil) [trans-(2SR,3SR)-3-(2-piridildisulfanil)tetralin-2-il] carbonato (32.1 mg, 0.0705 mmol) en 2 ml de DMF anhidra se añadió N,N-diisopropiletilamina (18 µL, 0.941 mmol). Después de la agitación durante 16 h a temperatura ambiente la mezcla se diluyó con EtOAc (50 ml), se lavó con 30 ml de NH₄Cl saturado, 30 ml de agua, y 20 ml de salmuera. La capa orgánica se concentró y el residuo se purificó por cromatografía de columna (0-3% MeOH/DCM) para producir [trans-(2SR,3SR)-3-(2-piridildisulfanil)tetralin-2-il]N-[(10S,23S)-10-etil-18-fluoro-10-hidroxi-19-metil-5,9-dioxo-8-oxa-4,15-diazahexaciclo[14.7.1.02,14.04,13.06,11.020,24]tetracosa-1,6(11),12,14,16(24),17,19-heptaen-23-il]carbamato (10.0 mg, 0.0133 mmol, rendimiento: 28.3%).

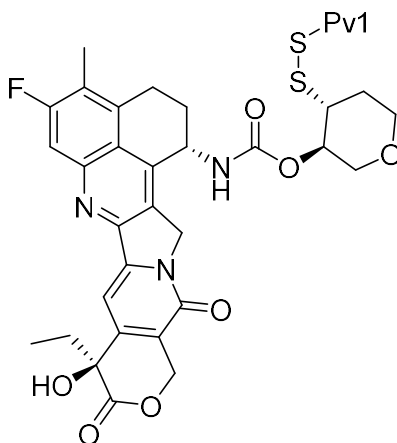
Paso 3. Acoplamiento con el Péptido Pv1 (Compuesto 19)

En un vial se colocó el péptido Pv1 (25.0 mg, 7.37e-6 mol), [trans-(2SR,3SR)-3-(2-piridildisulfanil)tetralin-2-il]N-[(10S,23S)-10-etil-18-fluoro-10-hidroxi-19-metil-5,9-dioxo-8-oxa-4,15-diazahexaciclo[14.7.1.02,14.04,13.06,11.020,24]tetracosa-1,6(11),12,14,16(24),17,19-heptaen-23-

il]carbamato (0.010 g, 1.33e-5 mol), 1 ml de ACN y 0.5 ml de agua. A esto se añadió N-metilmorfolina (0.030 ml, 0.000273 mol). La mezcla se agitó durante 65 h a RT. La LC-MS indicó una reacción completa.

- La mezcla de reacción se purificó directamente por HPLC de fase inversa (Waters SunfirePrep C18, PrepSlope_4 min, 20-95% ACN/H₂O+0.05% TFA, 20 min; tiempo de retención: 6.855) para producir el Compuesto 19 (0.0060 g, 1.33e-5 mol, rendimiento: 20.8%). ESI (M+3H/3)³⁺: 1307.6.

Ejemplo 20: Síntesis de Compuesto 20



- 10 **Paso 1. Síntesis de (4-nitrofenil) [trans-(3RS,4RS)-4-(2-piridildisulfanil)tetrahidropiran-3-il] carbonato**

El compuesto del título se sintetizó a partir del primer estereoisómero que se eluyó a partir de la separación por cromatografía quiral de trans-4-(2-piridildisulfanil)tetrahidropiran-3-ol racémico, asignado como *trans*-(2RS,3RS)-4-(2-piridildisulfanil)tetrahidropiran-3-ol, usando los métodos de síntesis análogos descritos en la síntesis del Compuesto 11.

15

Paso 2. Síntesis de [trans-(3RS,4RS)-4-(2-piridildisulfanil)tetrahidropiran-3-il] N-[(10S,23S)-10-etil-18-fluoro-10-hidroxi-19-metil-5,9-dioxo-8-oxa-4,15-diazahexaciclo[14.7.1.02,14.04,13.06,11.020,24]tetracosa -1,6(11),12,14,16(24),17,19-heptaen-23-il]carbamato

- 20 A una mezcla de mesilato de exatecán [CAS: 169869-90-3] (25 mg, 0.0470 mmol), DMAP (11.5 mg, 0.0941 mmol), y (4-nitrofenil) [trans-(3RS,4RS)-4-(2-piridildisulfanil)tetrahidropiran-3-il] carbonato (23.1 mg, 0.0564 mmol) en 2 ml de DMF anhidra se añadió N,N-diisopropiletilamina (18 µL, 0.941 mmol). Después de la agitación durante 16 h a temperatura ambiente la mezcla se diluyó con EtOAc (50 ml), se lavó con 30 ml de NH₄Cl saturado, 30 ml de agua, y 20 ml de salmuera. La capa orgánica

se concentró y el residuo se purificó por cromatografía de columna (0-3% MeOH/DCM) para producir [trans-(3RS,4RS)-4-(2-piridildisulfanil)tetrahidropiran-3-il]N-[(10S,23S)-10-etil-18-fluoro-10-hidroxi-19-metil-5,9-dioxo-8-oxa-4,15-diazahexaciclo[14.7.1.02,14.04,13.06,11.020,24]tetracosa-1,6(11),12,14,16(24),17,19-heptaen-23-il]carbamato (30.0 mg, 0.0426 mmol, rendimiento: 90.5%).

5

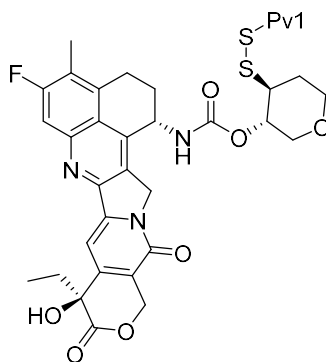
Paso 3. Acoplamiento con el Péptido Pv1 (Compuesto 20)

En un vial se colocó el péptido Pv1 (25.0 mg, 7.37e-6 mol), [trans-(3RS,4RS)-4-(2-piridildisulfanil)tetrahidropiran-3-il] N-[(10S,23S)-10-etil-18-fluoro-10-hidroxi-19-metil-5,9-dioxo-8-oxa-4,15-diazahexaciclo[14.7.1.02,14.04,13.06,11.020,24]tetracosa-1,6(11),12,14,16(24),17,19-heptaen-23-il]carbamato (0.00779 g, 1.11e-5 mol), , 1 ml de ACN y 0.5 ml de agua. A esto se añadió N-metilmorfolina (0.030 ml, 0.000273 mol). La mezcla se agitó durante 65 h a RT. La LC-MS indicó una reacción completa. La mezcla de reacción se purificó directamente por HPLC de fase inversa (Waters SunfirePrep C18, PrepSlope_4 min, 30-85% ACN/H2O+0.05% TFA, 13 min; tiempo de retención: 6.380) para producir el Compuesto 20 (0.0060 g, 1.55e-6 mol, rendimiento: 21.0%).

ESI (M+3H/3)³⁺: 1292.3.

15

Ejemplo 21: Síntesis de Compuesto 21



Paso 1. Síntesis de (4-nitrofenil) [trans-(3SR,4SR)-4-(2-piridildisulfanil)tetrahidropiran-3-il] carbonato

El compuesto del título se sintetizó a partir del segundo estereoisómero que se eluyó a partir de la separación por cromatografía quiral de trans-4-(2-piridildisulfanil)tetrahidropiran-3-ol racémico, asignado como trans-(2SR,3SR)-4-(2-piridildisulfanil)tetrahidropiran-3-ol, usando los métodos de síntesis análogos descritos en la síntesis del Compuesto 11.

Paso 2. Síntesis de [trans-(3SR,4SR)-4-(2-piridildisulfanil)tetrahidropiran-3-il] N-[(10S,23S)-10-etil-

25

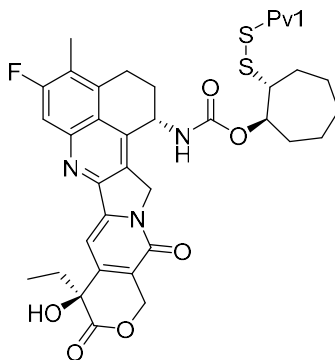
18-fluoro-10-hidroxi-19-metil-5,9-dioxo-8-oxa-4,15-diazahexaciclo[14.7.1.02,14.04,13.06,11.020,24]tetracosa-1,6(11),12,14,16(24),17,19-heptaen-23-il]carbamato

A una mezcla de mesilato de exatecán [CAS: 169869-90-3] (25 mg, 0.0470 mmol), DMAP (11.5 mg, 0.0941 mmol), y (4-nitrofenil) [*trans*-(3SR,4SR)-4-(2-piridildisulfanil)tetrahidropiran-3-il] carbonato (23.1 mg, 0.0564 mmol) en 2 ml de DMF anhidra se añadió N,N-Diisopropiletilamina (18 µL, 0.941 mmol). Después de la agitación durante 16 h a temperatura ambiente la mezcla se diluyó con EtOAc (50 ml), se lavó con 30 ml de NH₄Cl saturado, 30 ml de agua, y 20 ml de salmuera. La capa orgánica se concentró y el residuo se purificó por cromatografía de columna (0-3% MeOH/DCM) para producir [*trans*-(3SR,4SR)-4-(2-piridildisulfanil)tetrahidropiran-3-il]N-[(10S,23S)-10-etil-18-fluoro-10-hidroxi-19-metil-5,9-dioxo-8-oxa-4,15-diazahexaciclo[14.7.1.02,14.04,13.06,11.020,24]tetracosa-1,6(11),12,14,16(24),17,19-heptaen-23-il]carbamato (25.0 mg, 0.0355 mmol, rendimiento: 75.4%).

Paso 3. Acoplamiento con el Péptido Pv1 (Compuesto 21)

En un vial se colocó el péptido Pv1 (25.0 mg, 7.37e-6), [*trans*-(3SR,4SR)-4-(2-piridildisulfanil)tetrahidropiran-3-il] N-[(10S,23S)-10-etil-18-fluoro-10-hidroxi-19-metil-5,9-dioxo-8-oxa-4,15-diazahexaciclo[14.7.1.02,14.04,13.06,11.020,24]tetracosa-1,6(11),12,14,16(24),17,19-heptaen-23-il]carbamato (0.00779 g, 1.11e-5 mol), 1 ml de ACN y 0.5 ml de agua. A esto se añadió N-metilmorfolina (0.030 ml, 0.000273 mol). La mezcla se agitó durante 65 h a RT. La LC-MS indicó una reacción completa. La mezcla de reacción se purificó directamente por HPLC de fase inversa (Waters SunfirePrep C18, PrepSlope_4 min, 20-70% ACN/H₂O+0.05% TFA, 17 min; tiempo de retención: 6.765 min) para producir el Compuesto 21 (0.021 g, 5.42e-6 mol, rendimiento: 73.6%). ESI (M+3H/3)³⁺: 1291.1.

Ejemplo 22: Síntesis de Compuesto 22



Paso 1. Síntesis de (4-nitrofenil) [trans-(1RS,2RS)-2-(2-piridildisulfanil)cicloheptil] carbonato

El compuesto del título se sintetizó a partir del primer estereoisómero que se eluyó a partir de la separación por cromatografía quiral de trans-2-(2-piridildisulfanil)cicloheptan-1-ol racémico, asignado como *trans*-(1RS,2RS)-2-(2-piridildisulfanil)cicloheptan-1-ol, usando los métodos de

5

Paso 2. Síntesis de [trans-(1RS,2RS)-2-(2-piridildisulfanil)cicloheptil]N-[(10S,23S)-10-etil-18-fluoro-10-hidroxi-19-metil-5,9-dioxo-8-oxa-4,15-diazahexaciclo[14.7.1.02,14.04,13.06,11.020,24]tetracosa-1,6(11),12,14,16(24),17,19-heptaen-23-il]carbamato

10

A una mezcla de mesilato de exatecán [CAS: 169869-90-3] (25 mg, 0.0470 mmol), DMAP (11.5 mg, 0.0941 mmol), y (4-nitrofenil) [trans-(1RS,2RS)-2-(2-piridildisulfanil)cicloheptil] carbonato (23.7 mg, 0.0564 mmol) en 2 ml de DMF anhidra se añadió N,N-diisopropiletilamina (18 µL, 0.941 mmol). Después de la agitación durante 16 h a temperatura ambiente la mezcla se diluyó con EtOAc (50

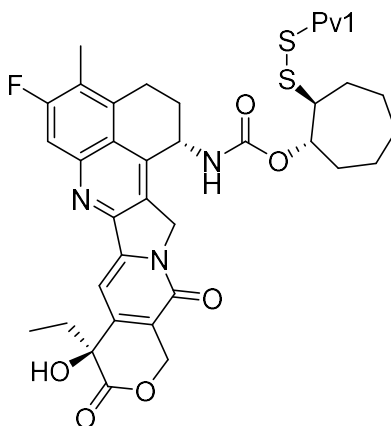
15

ml), se lavó con 30 ml de NH₄Cl saturado, 30 ml de agua, y 20 ml de salmuera. La capa orgánica se concentró y el residuo se purificó por cromatografía de columna (0-3% MeOH/DCM) para producir el compuesto del título (29.0 mg, 0.0405 mmol, rendimiento: 86.0%).

Paso 3. Acoplamiento con el Péptido Pv1 (Compuesto 22)

En un vial se colocó el péptido Pv1 (25.0 mg, 7.37e-6), [trans-(1RS,2RS)-2-(2-piridildisulfanil)cicloheptil]N-[(10S,23S)-10-etil-18-fluoro-10-hidroxi-19-metil-5,9-dioxo-8-oxa-4,15-diazahexaciclo[14.7.1.02,14.04,13.06,11.020,24]tetracosa-1,6(11),12,14,16(24),17,19-heptaen-23-il]carbamato (0.00792 g, 1.11e-5 mol), 1 ml de ACN y 0.5 ml de agua. A esto se añadió N-metilmorfolina (0.030 ml, 0.000273 mol). La mezcla se agitó durante 65 h a RT. La LC-MS indicó una reacción completa. La mezcla de reacción se purificó directamente por HPLC de fase inversa (Waters SunfirePrep C18, PrepSlope_4 min, 20-70% ACN/H₂O+0.05% TFA, 17 min; tiempo de retención: 6.868 min) para producir el Compuesto 22 (0.020 g, 5.15e-6 mol, rendimiento: 69.9%). ESI (M+3H/3)³⁺: 1296.3.

25

Ejemplo 23: Síntesis de Compuesto 23**Paso 1. Síntesis de (4-nitrofenil) [trans-(1SR,2SR)-2-(2-piridildisulfanil)cicloheptil] carbonato**

El compuesto del título se sintetizó a partir del segundo estereoisómero que se eluyó a partir de la separación por cromatografía quiral de trans-2-(2-piridildisulfanil)cicloheptan-1-ol racémico, asignado como *trans*-(1SR,2SR)-2-(2-piridildisulfanil)cicloheptan-1-ol, usando los métodos de síntesis análogos descritos en la síntesis del Compuesto 11.

Paso 2. Síntesis de [trans-(1SR,2SR)-2-(2-piridildisulfanil)cicloheptil]N-[(10S,23S)-10-etil-18-fluoro-10-hidroxi-19-metil-5,9-dioxo-8-oxa-4,15-diazahexaciclo[14.7.1.02,14.04,13.06,11.020,24]tetracosa-1,6(11),12,14,16(24),17,19-heptaen-23-il]carbamato

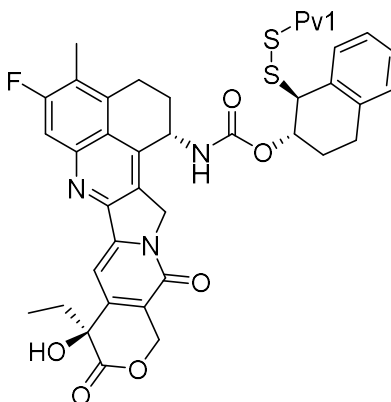
A una mezcla de mesilato de exatecán [CAS: 169869-90-3] (25 mg, 0.0470 mmol), DMAP (11.5 mg, 0.0941 mmol), y (4-nitrofenil) [trans-(1SR,2SR)-2-(2-piridildisulfanil)cicloheptil] carbonato (23.7 mg, 0.0564 mmol) en 2 ml de DMF anhidra se añadió N,N-diisopropiletilamina (18 μ L, 0.941 mmol). Después de la agitación durante 16 h a temperatura ambiente la mezcla se diluyó con EtOAc (50 ml), se lavó con 30 ml de NH₄Cl saturado, 30 ml de agua, y 20 ml de salmuera. La capa orgánica se concentró y el residuo se purificó por cromatografía de columna (0-3% MeOH/DCM) para producir el compuesto del título (31.0 mg, 0.0432 mmol, rendimiento: 91.9%).

Paso 3. Acoplamiento con el Péptido Pv1 (Compuesto 23)

En un vial se colocó el péptido Pv1 (25.0 mg, 7.37e-6), [trans-(1SR,2SR)-2-(2-piridildisulfanil)cicloheptil]N-[(10S,23S)-10-etil-18-fluoro-10-hidroxi-19-metil-5,9-dioxo-8-oxa-4,15-diazahexaciclo[14.7.1.02,14.04,13.06,11.020,24]tetracosa-1,6(11),12,14,16(24),17,19-heptaen-23-

il]carbamato (0.00792 g, 1.11e-5 mol), 1 ml de ACN y 0.5 ml de agua. A esto se añadió N-metilmorfolina (0.030 ml, 0.000273 mol). La mezcla se agitó durante 65 h a RT. La LC-MS indicó una reacción completa. La mezcla de reacción se purificó directamente por HPLC de fase inversa (Waters SunfirePrep C18, PrepSlope_4 min, 20-88% ACN/H₂O+0.05% TFA, 17 min; tiempo de retención 7.178 min) para producir el Compuesto 23 (0.020 g, 5.15e-6 mol, rendimiento: 69.9%). ESI (M+3H/3)³⁺: 1296.0.

Ejemplo 24: Síntesis de Compuesto 24



10 Paso 1. Síntesis de (4-nitrofenil) [trans-1-(1RS,2RS)-1-(2-piridildisulfanil)tetralin-2-il] carbonato

El compuesto del título se sintetizó a partir del primer estereoisómero que se eluyó a partir de la separación por cromatografía quiral de trans-1-(2-piridildisulfanil)tetralin-2-ol racémico, asignado como trans-(1RS,2RS)-1-(2-piridildisulfanil) tetralin-2-ol, usando los métodos de síntesis análogos descritos en la síntesis del Compuesto 11.

15

Paso 2. Síntesis de [trans-(1RS,2RS)-1-(2-piridildisulfanil)tetralin-2-il]N-[(10S,23S)-10-etil-18-fluoro-10-hidroxi-19-metil-5,9-dioxo-8-oxa-4,15-diazahexaciclo[14.7.1.02,14.04,13.06,11.020,24]tetracosa-1,6(11),12,14,16(24),17,19-heptaen-23-il]carbamato

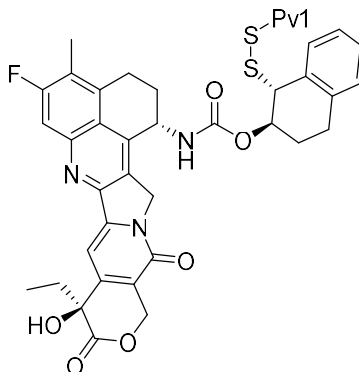
20 A una mezcla de mesilato de exatecán [CAS: 169869-90-3] (25 mg, 0.0470 mmol), DMAP (11.5 mg, 0.0941 mmol), y (4-nitrofenil) [trans-1-(1RS,2RS)-2-piridildisulfanil)tetralin-2-il] carbonato (32.1 mg, 0.0705 mmol) en 2 ml de DMF anhidra se añadió N,N-diisopropiletilamina (18 µL, 0.941 mmol). Después de la agitación durante 16 h a temperatura ambiente la mezcla se diluyó con EtOAc (50 ml), se lavó con 30 ml de NH₄Cl saturado, 30 ml de agua, y 20 ml de salmuera. La capa orgánica se
25 concentró y el residuo se purificó por cromatografía de columna (0-3% MeOH/DCM) para producir

el compuesto del título (20.0 mg, 0.0266 mmol, rendimiento: 56.6%).

Paso 3. Acoplamiento con el Péptido Pv1 (Ejemplo 24)

En un vial se colocó el péptido Pv1 (25.0 mg, 7.37e-6), [*trans*-1-(1RS,2RS)-1-(2-
 5 piridildisulfanil)tetralin-2-il]N-[(10S,23S)-10-etil-18-fluoro-10-hidroxi-19-metil-5,9-dioxo-8-oxa-4,15-
 diazahexaciclo[14.7.1.02,14.04,13.06,11.020,24]tetracosa-1,6(11),12,14,16(24),17,19-heptaen-23-
 il]carbamato (0.0083 g, 1.11e-5 mol), 1 ml de ACN y 0.5 ml de agua. A esto se añadió N-
 metilmorfolina (0.030 ml, 0.000273 mol). La mezcla se agitó durante 65 h a RT. La LC-MS indicó
 una reacción completa. La mezcla de reacción se purificó directamente por HPLC de fase
 10 inversa (Waters SunfirePrep C18, PrepSlope_4 min, 20-95% ACN/H₂O+0.05% TFA, 20 min; tiempo
 de retención 6.968) para producir el Compuesto 24 (0.012 g, 3.06e-6 mol, rendimiento: 41.6%). ESI
 (M+3H/3)³⁺: 1307.2

Ejemplo 25: Síntesis de Compuesto 25



15

Paso 1. Síntesis de (4-nitrofenil) [*trans*-(1SR,2SR)-1-(2-piridildisulfanil)tetralin-2-il] carbonato

El compuesto del título se sintetizó a partir del segundo estereoisómero que se eluyó a partir de la
 separación por cromatografía quiral de *trans*-1-(2-piridildisulfanil)tetralin-2-ol racémico, asignado
 como *trans*-(1SR,2SR)-1-(2-piridildisulfanil) tetralin-2-ol, usando los métodos de síntesis análogos
 20 descritos en la síntesis del Compuesto 11.

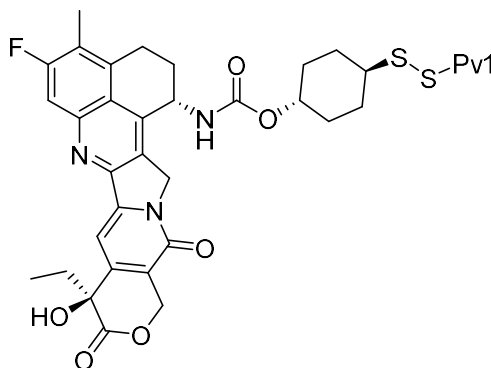
Paso 2. Síntesis de [*trans*-(1SR,2SR)-1-(2-piridildisulfanil)tetralin-2-il]N-[(10S,23S)-10-etil-18-fluoro-
 10-hidroxi-19-metil-5,9-dioxo-8-oxa-4,15-
 diazahexaciclo[14.7.1.02,14.04,13.06,11.020,24]tetracosa-1,6(11),12,14,16(24),17,19-heptaen-23-
 25 il]carbamato

A una mezcla de mesilato de exatecán [CAS: 169869-90-3] (25 mg, 0.0470 mmol), DMAP (11.5 mg, 0.0941 mmol), y (4-nitrofenil) [*trans*-(1SR,2SR)-1-(2-piridildisulfanil)tetralin-2-il]carbonato (32.1 mg, 0.0705 mmol) en 2 ml de DMF anhidra se añadió N,N-diisopropiletilamina (18 µL, 0.941 mmol). Después de la agitación durante 16 h a temperatura ambiente la mezcla se diluyó con EtOAc (50 ml), se lavó con 30 ml de NH₄Cl saturado, 30 ml de agua, y 20 ml de salmuera. La capa orgánica se concentró y el residuo se purificó por cromatografía de columna (0-3% MeOH/DCM) para producir el compuesto del título (22.0 mg, 0.0293 mmol, rendimiento: 62.3%).

Paso 3. Acoplamiento con el Péptido Pv1 (Compuesto 25)

En un vial se colocó el péptido Pv1 (25.0 mg, 7.37e-6), [*trans*-(1SR,2SR)-1-(2-piridildisulfanil)tetralin-2-il]N-[(10S,23S)-10-etil-18-fluoro-10-hidroxi-19-metil-5,9-dioxo-8-oxa-4,15-diazahexaciclo[14.7.1.02,14.04,13.06,11.020,24]tetracosa-1,6(11),12,14,16(24),17,19-heptaen-23-il]carbamato (0.0083 g, 1.11e-5 mol), 1 ml de ACN y 0.5 ml de agua. A esto se añadió N-metilmorfolina (0.030 ml, 0.000273 mol). La mezcla se agitó durante 65 h a RT. La LC-MS indicó una reacción completa. La mezcla de reacción se purificó directamente por HPLC de fase inversa (Waters SunfirePrep C18, PrepSlope_4 min, 20-95% ACN/H₂O+0.05% TFA, 20 min; tiempo de retención: 6.944) para producir el Compuesto 25 (0.013 g, 3.32e-6 mol, rendimiento: 45.0%). ESI (M+3H/3)³⁺: 1307.0

Ejemplo 26: Síntesis de Compuesto 26



Paso 1. Síntesis de [*trans*-4-(2-piridildisulfanil)ciclohexil]N-[(10S,23S)-10-etil-18-fluoro-10-hidroxi-19-metil-5,9-dioxo-8-oxa-4,15-diazahexaciclo[14.7.1.02,14.04,13.06,11.020,24]tetracosa-1,6(11),12,14,16(24),17,19-heptaen-23-il]carbamato

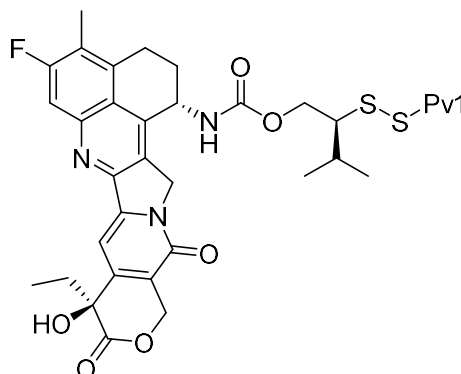
A una mezcla de mesilato de exatecán [CAS: 169869-90-3] (50 mg, 0.0941 mmol) y (4-nitrofenil) [4-(2-piridildisulfanil)ciclohexil]carbonato (Sintetizado a partir del *trans*-4-mercaptociclohexan-1-ol

comercial) (42.1 mg, 0.103 mmol) en 2 ml de DMF anhidra se añadió N,N-diisopropiletilamina (35 μ L, 0.188 mmol). Después de la agitación durante 16 h a temperatura ambiente la mezcla se diluyó con EtOAc (50 ml), se lavó con 30 ml de NH₄Cl saturado, 30 ml de agua, y 20 ml de salmuera. La capa orgánica se concentró y el residuo se purificó por cromatografía de columna (0-3% MeOH/DCM) para producir el compuesto del título (45.0 mg, 0.0640 mmol, rendimiento: 68.1%).

Paso 2. Acoplamiento con el Péptido Pv1 (Compuesto 26)

En un vial se colocó el péptido Pv1 (25.0 mg, 7.37e-6), [*trans*-4-(2-piridildisulfanil)ciclohexil] N-[(10S,23S)-10-etil-18-fluoro-10-hidroxi-19-metil-5,9-dioxo-8-oxa-4,15-diazahehexaciclo[14.7.1.0²,14.0⁴,13.0⁶,11.0²⁰,24]tetracosa-1,6(11),12,14,16(24),17,19-heptaen-23-il]carbamato (0.00777 g, 1.11e-5 mol), 1 ml de ACN y 0.5 ml de agua. A esto se añadió N-metilmorfolina (0.030 ml, 0.000273 mol). La mezcla se agitó durante 65 h a RT. La LC-MS indicó una reacción completa. La mezcla de reacción se purificó directamente por HPLC de fase inversa (Waters SunfirePrep C18, PrepSlope_4 min, 20-95% ACN/H₂O+0.05% TFA, 20 min; tiempo de retención: 6.593 min) para producir el Compuesto 26 (0.028 g, 7.23e-6 mol, rendimiento: 98.2%). ESI (M+3H/3)³⁺: 1291.0.

Ejemplo 27: Síntesis de Compuesto 27



Paso 1. Síntesis de [(2S)-3-metil-2-(2-piridildisulfanil)butil] N-[(10S,23S)-10-etil-18-fluoro-10-hidroxi-19-metil-5,9-dioxo-8-oxa-4,15-diazahehexaciclo[14.7.1.0²,14.0⁴,13.0⁶,11.0²⁰,24]tetracosa-1,6(11),12,14,16(24),17,19-heptaen-23-il]carbamato

A una mezcla de mesilato de exatecán [CAS: 169869-90-3] (50 mg, 0.0941 mmol) y [(2S)-3-metil-2-(2-piridildisulfanil)butil] (4-nitrofenil) carbonato (Sintetizado a partir de L-valina, cf J. Org. Chem. 1990,55, 2286-2288) (40.8 mg, 0.103 mmol) en 2 ml de DMF anhidra se añadió N,N-diisopropiletilamina (35 μ L, 0.188 mmol). Después de la agitación durante 16 h a temperatura

ambiente la mezcla se diluyó con EtOAc (50 ml), se lavó con 30 ml de NH₄Cl saturado, 30 ml de agua, y 20 ml de salmuera. La capa orgánica se concentró y el residuo se purificó por cromatografía de columna (0-3% MeOH/DCM) para producir el compuesto del título (48.0 mg, 0.0695 mmol, rendimiento: 73.9%).

5

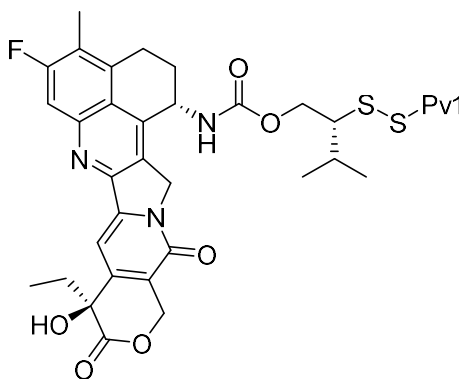
Paso 2. Acoplamiento con el Péptido Pv1 (Compuesto 27)

En un vial se colocó el péptido Pv1 (25.0 mg, 7.37e-6 mol), [(2S)-3-metil-2-(2-piridildisulfanil)butil]N-[(10S,23S)-10-etil-18-fluoro-10-hidroxi-19-metil-5,9-dioxo-8-oxa-4,15-diazahexaciclo[14.7.1.02,14.04,13.06,11.020,24]tetracosa-1,6(11),12,14,16(24),17,19-heptaen-23-il]carbamato (0.00764 g, 1.11e-5 mol), 1 ml de ACN y 0.5 ml de agua. A esto se añadió N-metilmorfolina (0.030 ml, 0.000273 mol). La mezcla se agitó durante 65 h a RT. La LC-MS indicó una reacción completa. La mezcla de reacción se purificó directamente por HPLC de fase inversa (Waters SunfirePrep C18, PrepSlope_4 min, 20-95% ACN/H₂O+0.05% TFA, 20 min; tiempo de retención: 6.773 min) para producir el Compuesto 27 (0.024 g, 6.22e-6 mol, rendimiento: 84.4%).

ESI (M+3H/3)³⁺: 1286.8.

15

Ejemplo 28: Síntesis de Compuesto 28



20

Paso 1. Síntesis de [(2R)-3-metil-2-(2-piridildisulfanil)butil]N-[(10S,23S)-10-etil-18-fluoro-10-hidroxi-19-metil-5,9-dioxo-8-oxa-4,15-diazahexaciclo[14.7.1.02,14.04,13.06,11.020,24]tetracosa-1,6(11),12,14,16(24),17,19-heptaen-23-il]carbamato

25

A una mezcla de mesilato de exatecán [CAS: 169869-90-3] (50 mg, 0.0941 mmol) y (4-nitrofenil) (2R)-3-metil-2-(2-piridildisulfanil)butil]carbonato (Sintetizado a partir de D-valina, cf J. Org. Chem. 1990,55, 2286-2288) (40.8 mg, 0.103 mmol) en 2 ml de DMF anhidra se añadió N,N-diisopropiletilamina (35 µL, 0.188 mmol). Después de la agitación durante 16 h a temperatura ambiente la mezcla se diluyó con EtOAc (50 ml), se lavó con 30 ml de NH₄Cl saturado, 30 ml de

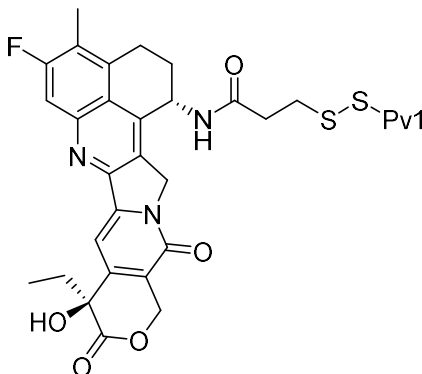
agua, y 20 ml de salmuera. La capa orgánica se concentró y el residuo se purificó por cromatografía de columna (0-3% MeOH/DCM) para producir el compuesto del título (41.0 mg, 0.0594 mmol, rendimiento: 63.1%).

5 Paso 2. Acoplamiento con el Péptido Pv1 (Compuesto 28)

En un vial se colocó el péptido Pv1 (25.0 mg, 7.37e-6), [(2R)-3-metil-2-(2-piridildisulfanil)butil]N-[(10S,23S)-10-etil-18-fluoro-10-hidroxi-19-metil-5,9-dioxo-8-oxa-4,15-diazahexaciclo[14.7.1.02,14.04,13.06,11.020,24]tetracosa-1,6(11),12,14,16(24),17,19-heptaen-23-il]carbamato (0.00764 g, 1.11e-5 mol), 1 ml de ACN y 0.5 ml de agua. A esto se añadió N-metilmorfolina (0.030 ml, 0.000273 mol). La mezcla se agitó durante 65 h a RT. La LC-MS indicó una reacción completa. La mezcla de reacción se purificó directamente por HPLC de fase inversa (Waters SunfirePrep C18, PrepSlope_4 min, 20-95% ACN/H₂O+0.05% TFA, 20 min; tiempo de retención: 6.708 min) para producir el Compuesto 28 (0.012 g, 3.08e-6 mol, rendimiento: 41.8%). ESI (M+3H/3)³⁺: 1287.8.

15

Ejemplo 29: Síntesis de Compuesto 29



Métodos analíticos: Las purezas cromatográficas se determinaron en un sistema de LC/MS Agilent Serie 1200, Serie 1100 o Serie 6130 usando una columna de HPLC analítica Merck Chromolith RP-18e (monolítica, 50 × 2 mm) y el siguiente método de HPLC analítica: volumen de inyección 5 µl; velocidad de flujo 1 ml/min; 5→95% acetonitrilo en agua con 0.05% AcOH (Método A) o 0.05% TFA (Método B) durante 5 minutos; detector de matriz de diodos Agilent a λ = 254, 220 o 195 nm; temperatura ambiente.

25

Paso 1. Preparación de N-((1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il)-3-(piridin-2-ildisulfaneil)propanamida

Una solución de 2,5-dioxopirrolidin-1-il 3-(piridin-2-ildisulfaneil)propanoato (180 mg, 0.576 mmol), en
 5 DMF (4 ml) se añadió a mesilato de exatecán sólido [CAS: 169869-90-3] (80 mg, 0.150 mmol) luego
 se añadió amortiguador de PBS acuoso (4 ml, pH=7.4, 50 mM) y se sometió a sonicación ~5
 minutos. La mezcla turbia se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas, y la reacción se
 determinó como aproximadamente 25% completa. Se añadió acetato de amonio (11 mg, 0.143
 10 mmol) con unos 2 ml adicionales de DMF, y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente
 durante 18 horas. La mezcla se hizo ácida con TFA (80 ml, 0.98 mmol), y se dividió en 2 porciones
 iguales. Cada porción individual se purificó en un cartucho a Redi-Sep C₁₈ de 50 g y se eluyó con
 un gradiente de acetonitrilo (5% hasta 95%) en agua con TFA (0.05% v/v). Las fracciones
 combinadas se congelaron y se liofilizaron para proporcionar el compuesto del título como un sólido
 amarillo pálido (42 mg, 44%). Pureza por HPLC a 254 nm: 97%. Tiempo de retención: 2.50 min
 15 (Método A). MS data, 633.2 (M+H)⁺.

Paso 2. Acoplamiento con el Péptido Pv1 (Compuesto 29)

El péptido Pv1 sólido (168.4 mg, 0.0480 mmol) se añadió a N-((1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-
 metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-
 20 b]quinolin-1-il)-3-(piridin-2-ildisulfaneil)propanamida sólida (30.5 mg, 0.0482 mmol) y se disolvió en
 DMF (2 ml) con sonicación (~1 minuto) y se lavó a chorro con nitrógeno. Se añadió 4-metilmorfolina
 (20 ml, 0.182 mmol) y la solución se mantuvo a temperatura ambiente durante 18 h. La solución se
 hizo ácida con ácido acético (17 ml, 0.296 mmol), se aplicó a una columna de fase inversa Biotage
 C₁₈ 300A de 25 g, y se eluyó con un gradiente de acetonitrilo (25% hasta 95%) en agua con TFA
 25 (0.05% v/v). Las fracciones combinadas se congelaron y se liofilizaron para proporcionar un sólido
 amarillo pálido. El producto se disolvió en DMSO (3 ml) y porciones de 1 ml de la solución se
 purificaron individualmente en una columna de fase inversa Biotage C₁₈ 300A de 25 g, se eluyó con
 un gradiente (25% hasta 95%) de una solución (acetonitrilo/agua/2-propanol, 3/2/1) en agua con
 acetato de amonio (10 mM). Las fracciones combinadas se congelaron y se liofilizaron para
 30 proporcionar un sólido amarillo pálido, que se disolvió en agua/acetonitrilo (2/1) con 0.4% TFA, se
 transfirió en un vial tarado y se liofilizó a un sólido, Compuesto 29 (128 mg, 66%). Pureza por HPLC
 a 254 nm: >95%. Tiempo de retención: 3.19 min (Método B) MS data: 1900.6 (M+2H/2)²⁺, 1267.3
 (M+3H/3)³⁺.

Ejemplo A. Ensayo de Retraso del Crecimiento

Las células se sembraron en placas de fondo claro de pared negra de 96 cavidades (Griener), células DLD-1 WT a 2500 células por cavidad, células FaDu y HeLa a 5000 células por cavidad, y HCT116 a 3000 células por cavidad, en medio de crecimiento que contenía 10% FBS. Las células se dejaron adherir a temperatura ambiente durante 60 minutos antes de regresar a un incubador a 37C, 5% CO₂. Después de 24 horas, el medio se removió y se reemplazó con medio de cultivo reciente que contenía diversas concentraciones de fármaco. Cada concentración de fármaco se añadió por triplicado. Los controles no tratados con fármaco contenían solo medio de crecimiento. Las células se regresaron al incubador. Noventa y seis horas después de la adición del fármaco, las células se fijaron con 4% paraformaldehído durante 20 minutos y se tiñeron con Hoechst a 1 ug/ml. Se tomaron imágenes de las placas en un generador de imágenes automático Cytation 5 (BioTek) y las células se contaron usando CellProfiler (<http://cellprofiler.org>). El porcentaje de retraso de crecimiento celular se calculó y los datos se graficaron usando GraphPad Prism.

Compuesto	DLD-1 (IC ₅₀ , nM)	HCT116 (IC ₅₀ , nM)	FaDu (IC ₅₀ , nM)	HeLa (IC ₅₀ , nM)
R ⁸ H-5	0.13	0.05	0.04	0.12
1	1.8	0.38	0.21	0.3
2	4.0	0.66	0.39	0.51
3	IC*	8.33	5.9	7.6
6	13.9	1.0	0.76	0.62
5	0.83	0.12	0.06	0.07
4	0.80	0.10	0.06	0.07

*IC = Curva incompleta.

Compuesto	HCT-116 (IC ₅₀ , nM)
11	22.6
12	2.6
13	21.0
14	4.7
15	1.7
16	1.7
17	0.7
18	2.9
19	1.8
20	7.9
21	3.1
22	5.9
23	11.9
24	3.4
25	2.9
26	87.0
27	0.7
28	1.1
29	69.0

Ejemplo B: Farmacocinética en Plasma del Compuesto 11 en un Modelo de Rata

Dosificación de Animales

Ratas macho Sprague Dawley se sometieron a la canulación de la vena yugular y a la inserción de un botón de acceso vascular (VAB, Instech Labs Cat # VABR1B/22) en Envigo Labs antes del envío.

5 Se usaron tapas magnéticas de aluminio (Instech Labs Cat # Cat #VABRC) para proteger el orificio de acceso para los catéteres yugulares, lo que permitió que los animales se alojaran 2 por jaula en un lecho de mazorcas de maíz durante 4-5 días antes del estudio. A las ratas se les administró una dosis intravenosa única de 5 mg/kg de Compuesto 11 preparado en un vehículo de 5% manitol en amortiguador de citrato. A las 1, 2, 4, 8, 24 y 30 horas después de la administración del compuesto,

10 se recogió sangre (250 µl) en microtainers llenos de K2EDTA de ratas alimentadas. El plasma se aisló por centrifugación y se transfirieron alícuotas de 100 µl a las placas de polipropileno de 96 cavidades en hielo seco. Las muestras se almacenaron a -80°C hasta su procesamiento para la cuantificación de péptido total por ELISA y el exatecán se liberó por LC-MS/MS.

15 *Medición ELISA de las Concentraciones en Plasma de Péptidos Totales*

Las placas de 96 cavidades se recubrieron con 100 µl/cavidad de péptido marcado con BSA 0.1 µM preparado en amortiguador de carbonato-bicarbonato 0.2 M, pH 9.4 y se incubaron durante la noche a 4°C. Las placas se lavaron 4x con un amortiguador de lavado de ELISA (PBS + 0.05% Tween 20), se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con amortiguador de bloqueo (PBS + 5%

20 leche en polvo + 0.05% Tween 20) (300 µl/cavidad) y se lavaron de nuevo 4x con amortiguador de lavado de ELISA. Concurrentemente, 2x estándares de Compuesto 11 en muestras de plasma de control y plasma de estudio se preincubaron con 1-10 ng/ml de un anticuerpo primario específico para el péptido Pv1 durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las muestras preincubadas se añadieron a placas de ensayo pre-recubiertas y pre-bloqueadas a 100 µl/cavidad y se incubaron

25 durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 4x con amortiguador de lavado de ELISA y se incubaron con 100 µl/cavidad de un anticuerpo HRP de IgG anti-ratón de cabra secundario (1:5,000 en diluyente de anticuerpo) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 4x con amortiguador de lavado de ELISA y se incubaron con 100 µl/cavidad de sustrato SuperSignal a temperatura ambiente con agitación suave durante 1 minuto. La luminiscencia se leyó

30 de la placa en un lector de placas BioTek Cytation 5.

Medición de LC-MS/MS de Concentraciones en Plasma de Exatecán

Para la cuantificación de exatecán, se añadió una muestra de plasma de 20 µl a un vial de muestreador automático de polipropileno. A cada muestra se añadieron 20 µl de PPT-IS (ACN:H2O (50:50) + 0.5% FA que contenía 1000 ng/ml de estándar interno) y 20 µl de diluyente (ACN:H2O

35 (50:50) + 0.5% FA). Seguido de la adición de 120 µl de ACN + 5% FA. Los viales se taparon y se

sometieron a vórtice durante 2 minutos. Las muestras se centrifugaron durante 5-10 minutos a 3700 rpm y luego se analizaron vía espectrometría de masas en tándem con cromatografía líquida (LC-MS/MS).

La FIG. 1 muestra un diagrama de la concentración en plasma del Compuesto 11 y se liberó el exatecán después de una dosis IV única de 5 mg/kg del Compuesto 11 en una rata (los datos se expresaron como media $\pm$ SEM). Como se muestra en la FIG. 1, se liberó menos de 0.002% de la ojiva de exatecán después de 30 h en circulación. La FIG. 1 demuestra que el Compuesto 11 es estable en plasma durante al menos 30 h.

10 **Ejemplo C: Farmacocinética en Tumor y Médula Ósea del Compuesto 11 en un Modelo de Ratón**

Dosificación de Animales

Ratones *Foxn^{nu}* desnudos atímicos hembras de seis semanas de edad se obtuvieron de Taconic Labs (Cat# NCRNU-F) y se alojaron 5 por jaula en lecho Alpha-Dri en un sistema de jaula desechable (Innovive). Las células cancerosas HCT116 humanas derivadas de carcinoma colorrectal se diluyeron 1:1 en Matrigel libre de rojo fenol y se implantaron subcutáneamente en el flanco izquierdo de cada ratón a una densidad de 2.5×10^6 células en 100 μ l. Cuando los xenoinjertos alcanzaron un volumen mínimo de 300 mm³, a los ratones se les administró una inyección intraperitoneal única de 10 mg/kg del Compuesto 11 preparado en un vehículo de 5% manitol en citrato. Se recolectaron muestras de tumor y médula ósea de ratones alimentados y anestesiados 1, 2, 4, 8, 16, 24, 32 y 48 horas después de la administración del compuesto. Las concentraciones de péptidos totales en el tumor y médula ósea se determinaron vía ELISA.

Medición de ELISA de Concentraciones en Tejido de Péptidos Totales

Placas de 96 cavidades se recubrieron con 100 μ l/cavidad de péptido marcado con BSA 0.1 μ M preparado en amortiguador de carbonato-bicarbonato 0.2 M, pH 9.4 y se incubaron durante la noche a 4°C. Las placas se lavaron 4x con un amortiguador de lavado de ELISA (PBS + 0.05% Tween 20), se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con amortiguador de bloqueo (PBS + 5% leche en polvo + 0.05% Tween 20) (300 μ l/cavidad) y se lavaron de nuevo 4x con amortiguador de lavado de ELISA. Concurrentemente, 2x estándares del Compuesto 11 (en la matriz de tejido respectiva) o muestra de homogenados de tumor o muestras de médula ósea diluidas con diluyente de anticuerpo (PBS + 2% leche en polvo + 0.05% Tween 20) se preincubaron con 1-10 ng/ml de un anticuerpo primario específico para el péptido Pv1 durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las muestras preincubadas se añadieron a placas de ensayo pre-recubiertas y pre-bloqueadas a 100

5 μl /cavidad y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 4x con amortiguador de lavado de ELISA y se incubaron con 100 μl /cavidad de un anticuerpo HRP de IgG anti-ratón de cabra secundario (1:5.000 en diluyente de anticuerpo) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 4x con amortiguador de lavado de ELISA y se incubaron con 100 μl /cavidad de sustrato SuperSignal a temperatura ambiente con agitación suave durante 1 minuto. La luminiscencia se leyó de la placa en un lector de placas BioTek Cytation 5.

La FIG. 2 muestra un diagrama de la concentración de péptido en tumor y médula ósea después de una dosis IP única de 10 mg/kg de Compuesto 11 en un ratón (los datos se expresan como media $\pm$ SEM). La FIG. 2 demuestra que el Compuesto 11 se dirige efectivamente a los tumores.

10

Ejemplo D: Estudio de Toxicidad de la Médula Ósea en un Modelo de Ratón

Dosificación de Animales

15 Ratones *Foxn^{nu}* desnudos atímicos hembras de seis semanas de edad se obtuvieron de Taconic Labs (Cat# NCRNU-F) y se alojaron 5 por jaula en lecho Alpha-Dri en un sistema de jaula desechable (Innovive). Las células cancerosas HCT116 humanas derivadas de carcinoma colorrectal se diluyeron 1:1 en Matrigel libre de rojo fenol y se implantaron subcutáneamente en el flanco izquierdo de cada ratón a una densidad de 2.5×10^6 células en 100 μl . Cuando los xenoinjertos alcanzaron un volumen mínimo de 200 mm^3 , a los ratones se les administraron dosis intraperitoneales de vehículo o 2.6 o 5.2 $\mu\text{moles/kg}$ ya sea de exatecán no conjugado (equivalente a 1.15 o 2.3 mg/kg de exatecán, respectivamente) o Compuesto 11 (equivalente a 10 o 20 mg/kg de Compuesto 11, respectivamente). Los compuestos se administraron una vez al día durante 4 días.

20

Recolección de Médula Ósea

25 Los ratones portadores de tumores se sacrificaron por dislocación cervical 6 horas después de la última dosis. Los fémures se extrajeron y la médula ósea se extruyó en tubos cónicos de 50 ml lavando los huesos con una aguja de calibre 23 colocada en una jeringa de 5 cc que contenía PBS + 2% suero bovino fetal. La médula ósea se homogeneizó por pipeteo suave y se filtró a través de filtros de malla de nilón de 100 μm y las células se sedimentaron por centrifugación a 1200 rpm durante 5 minutos a 4°C. Los glóbulos rojos se lisaron con 3 ml de amortiguador de lisis durante 2 minutos a temperatura ambiente. Se añadió PBS a un volumen de 25 ml y las células se volvieron a sedimentar por centrifugación como se describió anteriormente. Los sedimentos celulares se suspendieron en 5 ml de PBS y el recuento de células se evaluó por exclusión con azul tripán. Los recuentos de células de cuatro estudios independientes se promediaron y graficaron.

30

La FIG. 3 muestra un diagrama de los recuentos total de médula ósea de los fémures de ratones desnudos portadores de tumores después de la dosificación de 2.6 y 5.2 μ moles/kg ya sea de Compuesto 11 (equivalente a 10, 20 mg/kg de conjugado) o exatecán libre (equivalente a 1.15 y 2.3 mg/kg de exatecán) dosificado una vez al día durante cuatro días (los datos se expresan como media $\pm$ SEM). El Compuesto 11 no mostró la toxicidad en la médula ósea que limita la utilidad clínica de exatecán.

Ejemplo E: Estudio de Toxicidad Gástrica en un Modelo de Ratón

Dosificación de Animales e Imágenes del Estómago

10 Ratones *Foxn^{nu}* desnudos atímicos hembras de seis semanas de edad se obtuvieron de Taconic Labs (Cat# NCRNU-F) y se alojaron 5 por jaula en lecho Alpha-Dri en un sistema de jaula desechable (Innovive). Las células HCT116 humanas derivadas de carcinoma colorrectal se diluyeron 1:1 en Matrigel libre de rojo fenol y se implantaron subcutáneamente en el flanco izquierdo de cada ratón a una densidad de 2.5×10^6 células en 100 μ l. Cuando los xenoinjertos alcanzaron un
15 volumen mínimo de 300 mm³, a los ratones se les administraron dosis intraperitoneales de vehículo o 5.2 μ moles/kg ya sea de exatecán no conjugado (equivalente a 2.3 mg/kg de exatecán) o Compuesto 11 (equivalente a 20 mg/kg de Compuesto 11). Los compuestos se administraron una vez al día durante 4 días. A 6 horas después de la administración de la última dosis, los ratones se sacrificaron por dislocación cervical y se realizó una necropsia macroscópica. Se tomaron
20 fotografías de los estómagos tanto *in situ* como *ex vivo*.

La FIG. 4A muestra los estómagos de ratones desnudos portadores de tumores, extirpados después de la dosificación de vehículo o 5.2 μ moles/kg de Compuesto 11 (equivalente a 20 mg/kg de conjugado) o exatecán libre (equivalente a 2.3 mg/kg de exatecán) dosificado QDx4. La FIG. 4B muestra los estómagos de ratones desnudos portadores de tumores *in situ* después de la
25 dosificación de 5.2 μ moles/kg de Compuesto 11 (equivalente a 20 mg/kg de conjugado) o exatecán libre (equivalente a 2.3 mg/kg de exatecán) dosificado una vez al día durante cuatro días. El Compuesto 11 no mostró la toxicidad gástrica que limita la utilidad clínica del exatecán.

Ejemplo F: Eficacia del Compuesto 11 en un Modelo de Cáncer Colorrectal HCT116

30 Ratones *Foxn^{nu}* desnudos atímicos hembras de seis semanas de edad se obtuvieron de Taconic Labs (Cat# NCRNU-F) y se alojaron 5 por jaula en lecho Alpha-Dri en un sistema de jaula desechable. Las células HCT116 humanas derivadas de carcinoma colorrectal se diluyeron 1:1 en Matrigel libre de rojo fenol y se implantaron subcutáneamente en el flanco izquierdo de cada ratón a una densidad de 2.5×10^6 células en 100 μ l. Cuando los xenoinjertos alcanzaron un volumen medio

de 100-200 mm³, los ratones se aleatorizaron en grupos y se trataron como se detalla en la tabla a continuación. A los ratones se les administraron dosis intraperitoneales (IP) de vehículo o 2.6 o 5.2 µmol/kg ya sea de exatecán no conjugado (equivalente a 1.15 o 2.3 mg/kg de exatecán, respectivamente) o Compuesto 11 (equivalente a 10 o 20 mg/kg de Compuesto 11, respectivamente). Las dosis se prepararon diluyendo 0.1 mg/µl de soluciones madre de DMSO en 5% manitol en amortiguador de citrato y se administraron QDx4/semana durante tres semanas a un volumen de 12 ml/kg (300 µl por 25 g de ratón). Los tumores de xenoinjerto se midieron por calibradores y el volumen se calculó usando la ecuación para el volumen del elipsoide: Volumen = $\pi/6 \times (\text{largo}) \times (\text{anchura})^2$. Los animales se retiraron del estudio debido a la muerte, el tamaño del tumor que excede 2000 mm³ o pérdida de >20% del peso corporal. La siguiente tabla muestra el programa de dosificación de varios grupos de tratamiento.

Grupo	Tratamiento	Dosis	Programa de Dosificación	Ruta de Administración	Numero de Ratones
1	Vehículo (5% manitol en amortiguador de citrato)	N/A	QDx4/semana x 3	ip	8
2	Compuesto 11	10 mg/kg	QDx4/semana x 3	ip	8
3	Compuesto 11	20 mg/kg	QDx4/semana x 3	ip	8
4	exatecán	1.15 mg/kg	QDx4/semana x 3	ip	8
5	exatecán	2.3 mg/kg	QDx4/semana x 3	ip	8

La FIG. 5A muestra un diagrama del volumen medio de tumor resultante de la dosificación de cantidades equimolares de exatecán libre o Compuesto 11 en ratones desnudos portadores de tumores en flanco colorrectal HCT116. A los animales se les administró una dosis una vez al día cuatro veces a la semana por vía intraparenteral durante tres semanas. La FIG. 5B muestra una curva de supervivencia de Kaplan Meier para la dosificación de cantidades equimolares de exatecán libre o Compuesto 11 en ratones desnudos portadores de tumores en flanco colorrectal HCT116. Los datos se expresan como media ± SEM. Estos datos demuestran que el Compuesto 11 demuestra una potente actividad antitumoral en un modelo de cáncer colorrectal preclínico.

Ejemplo G: Eficacia del Compuesto 11 en un Modelo de Cáncer Gástrico HER2 Negativo MKN45

Ratones *Foxn^{nu}* desnudos atímicos hembras de seis semanas de edad se obtuvieron de Taconic Labs (Cat# NCRNU-F) y se alojaron 5 por jaula en lecho Alpha-Dri en un sistema de jaula desechable. Las células MKN45 humanas derivadas de carcinoma gástrico se diluyeron 1:1 en Matrigel libre de rojo fenol y se implantaron subcutáneamente en el flanco izquierdo de cada ratón a una densidad de 2×10^6 células en 100 μ l. Cuando los xenoinjertos alcanzaron un volumen medio de 100-200 mm³, los ratones se aleatorizaron en grupos y se trataron como se detalla en la tabla a continuación. A los ratones se les administraron dosis intraperitoneales (IP) de vehículo o 2.6 o 5.2 μ mol/kg ya sea de exatecán no conjugado (equivalente a 1.15 o 2.3 mg/kg de exatecán, respectivamente) o Compuesto 11 (equivalente a 10 o 20 mg/kg de Compuesto 11, respectivamente). Las dosis se prepararon diluyendo 0.1 mg/ μ l de soluciones madre de DMSO en 5% manitol en amortiguador de citrato y se administraron QDX4/semana durante dos semanas a un volumen de 12 ml/kg (300 μ l por 25 g de ratón). Los tumores de xenoinjerto se midieron por calibradores y el volumen se calculó usando la ecuación para el volumen del elipsoide: Volumen = $\pi/6 \times (\text{largo}) \times (\text{anchura})^2$. Los animales se retiraron del estudio debido a la muerte, tamaño del tumor que excede 2000 mm³ o pérdida de >20% del peso corporal. La siguiente tabla muestra el programa de dosificación de los diversos grupos de tratamiento.

Grupo	Tratamiento	Dosis	Programa de Dosificación	Ruta de Administración	Numero de Ratones
1	Vehículo (5% manitol en amortiguador de citrato)	N/A	QDx4/semana x 2	ip	8
2	Compuesto 11	2.5 mg/kg	QDx4/semana x 2	ip	8
3	Compuesto 11	5 mg/kg	QDx4/semana x 2	ip	8
4	Compuesto 11	10 mg/kg	QDx4/semana x 2	ip	8
5	Compuesto 11	20 mg/kg	QDx4/semana x 2	ip	8
6	exatecán	1.15 mg/kg	QDx4/semana x 2	ip	8
7	exatecán	2.3 mg/kg	QDx4/semana x 2	ip	8

La FIG. 6A muestra la eficacia de agente único del Compuesto 11 en ratones desnudos portadores de tumores en flanco de cáncer gástrico HER2 negativos MKN45. A los animales se les administró una dosis una vez al día cuatro veces a la semana por vía intraparenteral durante dos semanas. La

5 FIG. 6B muestra una curva de supervivencia de Kaplan Meier para la dosificación de cantidades equimolares de exatecán libre o Compuesto 11 en ratones desnudos portadores de tumores en flanco de cáncer gástrico HER2 negativos MKN45. Los datos se expresan como media $\pm$ SEM. Estos datos demuestran que el Compuesto 11 demuestra una potente actividad antitumoral en un modelo de cáncer gástrico preclínico.

- 10 La Figura 6B. Se utilizó el análisis de Kaplan-Meier para evaluar la tasa de supervivencia con base en la muerte o eliminación del estudio.

Ejemplo H: Eficacia del Compuesto 11 en un Modelo de Cáncer de Mama HER2 Intermedio JIMT-1

- 15 Ratones NOD.SCID hembras de cinco a seis semanas de edad se obtuvieron de Beijing Anikeeper Biotech Co., Ltd (Beijing, China). Células J1MT-1 humanas derivadas de carcinoma de mama se diluyeron 1:1 en Matrigel libre de rojo fenol y se implantaron subcutáneamente en el flanco izquierdo de cada ratón a una densidad de 5×10^6 células en 100 μ l. Cuando los xenoinjertos alcanzaron un volumen medio de 100 mm³, los ratones se aleatorizaron en grupos y se trataron como se detalla
- 20 en la tabla a continuación. A los ratones se les administraron dosis intraperitoneales (IP) de vehículo o 2.6 o 5.2 μ mol/kg de Compuesto 11 (equivalente a 10 o 20 mg/kg de Compuesto 11, respectivamente). Las dosis se prepararon diluyendo 0.1 mg/ μ L de soluciones madre de DMSO en 5% manitol en amortiguador de citrato y se administraron QDX4/semana durante tres semanas a un volumen de 12 ml/kg (300 μ l por 25 g de ratón). Los tumores de xenoinjerto se midieron por
- 25 calibradores y el volumen se calculó usando la ecuación para el volumen del elipsoide: Volumen = $\pi/6 \times (\text{largo}) \times (\text{anchura})^2$. El peso corporal de los animales se midió al mismo tiempo que la evaluación del volumen de tumor. Los animales se retiraron del estudio debido a la muerte, tamaño del tumor que excede 2000 mm³ o pérdida de >20% del peso corporal. La siguiente tabla muestra el programa de dosificación para diversos grupos de tratamiento.

30

Grupo	Tratamiento	Dosis	Programa de Dosificación	Ruta de Administración	Numero de Ratones
1	Vehículo (5% manitol en	N/A	QDx4/semana x 3	ip	8

	amortiguador de citrato)				
2	Compuesto 11	10 mg/kg	QDx4/semana x 3	ip	8
3	Compuesto 11	20 mg/kg	QDx4/semana x 3	ip	8

La FIG. 7A muestra un diagrama del volumen medio de tumor resultante de la dosificación del Compuesto 11 en ratones SCID portadores de tumores en flanco de cáncer de mama HER2 intermedios JIMT-1. A los animales se les administró una dosis una vez al día cuatro veces a la semana por vía intraparenteral durante tres semanas. La FIG. 7B muestra un diagrama del cambio porcentual en el peso corporal en ratones SCID portadores de tumores en flanco de cáncer de mama HER2 intermedios JIMT-1 dosificados con el Compuesto 11. Los datos se expresan como media $\pm$ SEM. Estos datos demuestran que el Compuesto 11 demuestra una potente actividad antitumoral en un modelo de cáncer de mama preclínico.

Ejemplo I: Eficacia del Compuesto 11 en un Modelo de Cáncer de Mama MDA-MB-231 Triple Negativo

Ratones *Foxn^{nu}* desnudos atímicos hembras de tres a cuatro semanas de edad se obtuvieron de Envigo Labs. Las células MDA-MB-231 humanas derivadas de adenocarcinoma de mama se diluyeron 1:1 en Matrigel libre de rojo fenol y se implantaron subcutáneamente en el flanco izquierdo de cada ratón a una densidad de 2×10^6 células en 100 μ l. Cuando los xenoinjertos alcanzaron un volumen medio de 50-100 mm³, los ratones se aleatorizaron en grupos y se trataron como se detalla en la tabla a continuación. A los ratones se les administraron dosis intraperitoneales (IP) de vehículo o 5, 10 o 20 mg/kg del Compuesto 11. Las dosis se prepararon diluyendo 0.1 mg/ μ l de soluciones madre de DMSO en 5% manitol en amortiguador de citrato y se administraron QDX4/semana durante tres semanas a un volumen de 12 ml/kg (300 μ l por 25 g de ratón). Los tumores de xenoinjerto se midieron por calibradores y el volumen se calculó usando la ecuación para el volumen del elipsoide: Volumen = $\pi/6 \times (\text{largo}) \times (\text{anchura})^2$. El peso corporal de los animales se midió al mismo tiempo que la evaluación del volumen de tumor. Los animales se retiraron del estudio debido a la muerte, tamaño del tumor que excede 2000 mm³ o debido a una pérdida de >20% del peso corporal. La siguiente tabla muestra el programa de dosificación de diversos grupos de tratamiento.

Grupo	Tratamiento	Dosis	Programa de Dosificación	Ruta de Administración	Numero de Ratones
1	Vehículo (5% manitol en amortiguador de citrato)	N/A	N/A	ip	8
2	Compuesto 11	5 mg/kg	QDx4/semana x 3	ip	9
3	Compuesto 11	10 mg/kg	QDx4/semana x 3	ip	9
4	Compuesto 11	20 mg/kg	QDx4/semana x 3	ip	9

La FIG. 8A muestra un diagrama del volumen medio de tumor en ratones desnudos portadores de tumores en flanco de cáncer de mama MDA-MB-231 triple negativos dosificados con el Compuesto 11. Los animales se dosificaron una vez al día cuatro veces a la semana por vía intraparenteral durante tres semanas. La FIG. 8B muestra un diagrama del cambio porcentual en el peso corporal con respecto al día 0 en ratones desnudos portadores de tumores en flanco de cáncer de mama MDA-MB-231 triple negativos dosificados con el Compuesto 11. Los datos se expresan como media $\pm$ SEM. Estos datos demuestran que el Compuesto 11 demuestra una potente actividad antitumoral en un modelo de cáncer de mama preclínico.

10

Ejemplo J: Eficacia Combinada del Compuesto 11 y Talazoparib en un Modelo de Cáncer de Mama MDA-MB-231 Triple Negativo

Ratones *Foxn^{nu}* desnudos atímicos hembras de tres a cuatro semanas de edad se obtuvieron de Envigo Labs. Las células MDA-MB-231 humanas derivadas de adenocarcinoma de mama se diluyeron 1:1 en Matrigel libre de rojo fenol y se implantaron subcutáneamente en el flanco izquierdo de cada ratón a una densidad de 2×10^6 células en 100 μ l. Cuando los xenoinjertos alcanzaron un volumen medio de 50-100 mm³, los ratones se aleatorizaron en grupos y se trataron como se detalla en la tabla a continuación. A los ratones se les administraron dosis intraperitoneales (IP) de vehículo o 5 mg/kg del Compuesto 11 solo o en combinación con una dosis oral (PO) de 0.33 mg/kg de talazoparib. Las dosis se prepararon diluyendo soluciones madre de DMSO de 0.1 mg/ μ l en 5% manitol en amortiguador de citrato. El Compuesto 11 se administró QDX4/semana durante tres semanas a un volumen de 12 ml/kg (300 μ l por 25 g de ratón) y se administró talazoparib una vez al día durante 15 días. Los tumores de xenoinjerto se midieron con calibradores y el volumen se

15

20

calculó usando la ecuación para el volumen elipsoide: Volumen = $\pi/6 \times (\text{longitud}) \times (\text{anchura})^2$. El peso corporal de los animales se midió al mismo tiempo que la evaluación del volumen de tumor. Los animales se retiraron del estudio debido a la muerte, tamaño del tumor que excede 2000 mm³ o debido a una pérdida de peso corporal >20%. La siguiente tabla muestra el programa de dosificación de diversos grupos de tratamiento.

Grupo	Tratamiento	Dosis	Programa de Dosificación	Ruta de Administración	Numero de Ratones
1	Ninguna	N/A	N/A	N/A	9
2	Talazoparib	0.33 mg/kg	QDx15	po	9
3	Compuesto 11	5 mg/kg	QDx4/semana x 3	ip	10
4	Talazoparib Compuesto 11	0.33 mg/kg 5 mg/kg	QDx15 QDx4/semana x 3	po ip	8

La FIG. 9A muestra un diagrama del volumen medio de tumor de ratones desnudos portadores de tumores en flanco de cáncer de mama MDA-MB-231 triple negativos dosificados con Compuesto 11 y talazoparib. A los animales se les dosificó una vez al día cuatro veces a la semana por vía intraparenteral durante tres semanas con el Compuesto 11 y una vez al día durante 18 días por vía oral con talazoparib. La FIG. 9B muestra un diagrama del cambio porcentual en el peso corporal en relación con el día 0 de ratones desnudos portadores de tumores en flanco de cáncer de mama MDA-MB-231 triple negativos dosificados con Compuesto 11 y talazoparib.

Ejemplo K: Estudio de Escisión de Glutación

Una solución madre 20 mM de conjugado se preparó en 100% DMSO. Las soluciones madre se diluyeron posteriormente en Tris 100 mM, pH 7.5, para producir una dilución intermedia de 500 μ M seguida de una dilución adicional de 1:5 en Tris 100 mM, pH 7.5 para producir una concentración final de 100 μ M de conjugado. Glutación 100 mM se preparó inmediatamente antes del uso en H₂O y se diluyó 1:10 en muestras de provocación para una concentración final de provocación de glutación de 10 mM. Las muestras se mezclaron por inversión y se incubaron a 37°C por hasta 24 horas. Muestras de 50 μ l se dividieron en alícuotas en tubos de microcentrifuga siliconados en el tiempo 0, 4, y 24 horas y se congelaron inmediatamente a -80°C.

Las muestras se descongelaron y se extrajeron como sigue: a cada muestra se añadieron 8 µl de 25% ácido fosfórico seguido de 117 µl de 100% acetonitrilo/0.1% TFA, se mezclaron y se centrifugaron a 13000xG durante 10 minutos. El sobrenadante se pipeteó en viales de HPLC de 0.2 ml y se colocó en un muestreador automático de HPLC Perkin Elmer Flexar. La siguiente tabla

5 resume las condiciones de HPLC:

HPLC	Bomba Binaria Perkin Elmer Flexar, muestreador automático, detector UV		
Columna	Columna de Polifenilo Waters BioResolve RP mAb, 450 Å, 2.7 µm, 4.6 mm x 150 mm		
Columna de Guarda	Cartucho con soporte VanGuard de Polifenilo Waters BioResolve RP mAb, 450 Å, 2.7 µm, 3.9 mm x 5 mm		
Longitud de Onda de Detección	217 nm		
Temperatura de la columna	37°C		
Límites de Presión	Mín.: 0 PSI, Máx.: 3050 PSI		
Fase móvil			
Fase móvil A	0.05% TFA en agua		
Fase móvil B	0.05% TFA en Acetonitrilo		
Velocidad de flujo	0.8 ml/min		
Volumen de Inyección	10.0 µl		
Tiempo de corrida	14.0 minutos		
Programa de gradiente	Tiempo (minutos)	% de A	% de B
	0.0	80	20
	0.5	80	20
	10.0	0	100

	11.0	80	20
	14.0	80	20

Los datos se analizaron calculando el porcentaje de reducción del compuesto (área del pico del tiempo de retención del conjugado escindido/área del pico del tiempo de retención del conjugado en el tiempo 0) X 100.

- 5 La FIG. 10 muestra una gráfica de la degradación del Compuesto 11 y Compuesto 29 resultante del tratamiento con glutatión 10 mM durante 16 h. Como se muestra en la FIG. 10, el Compuesto 29 se libera mucho más rápido que el compuesto 11 bajo una exposición similar al glutatión.

La tabla a continuación resume los datos de degradación para las condiciones de exposición a glutatión 10 mM descritas anteriormente para los Compuestos 11 hasta Compuesto 29 medida a las 4 h y 24 h.

10

Provocación con Glutatión (10 mM)		
Compuesto	% Restante a las 4 h	% Restante a las 24 h
11	50.1	10.2
12	ND	ND
13	ND	ND
14	14.9	6.5
15	19.4	8.3
16	3.4	2.0
17	3.4	1.7
18	60.1	13.0
19	ND	ND
20	5.2	8.0

21	9.5	12.6
22	65.8	12.3
23	61.4	13.2
24	20.8	4.2
25	42.0	4.1
26	75.8	32.1
27	18.0	0.0
28	40.5	0.0
29	3.1	5.9

Ejemplo L: Estudios de Estabilidad en Plasma

Una solución madre 20 mM de conjugado se preparó en 100% DMSO. Las soluciones madre se diluyeron posteriormente en Tris 100 mM, pH 7.5 para producir una dilución intermedia de 500 μ M y luego se diluyeron 1:5 directamente en plasma de rata para producir una concentración final de 100 μ M de conjugado. Las muestras se mezclaron por inversión y se incubaron a 37°C por hasta 24 h. Muestras de 50 μ l se dividieron en alícuotas en tubos de microcentrífuga siliconizados en el tiempo 0, 4 y 24 h y se congelaron inmediatamente a -80°C.

Las muestras se descongelaron y extrajeron como sigue: a cada muestra se añadieron 8 μ l de 25% ácido fosfórico seguido de 117 μ l de 100% acetonitrilo/0.1% TFA, se mezclaron y se centrifugaron a 13000xG durante 10 minutos. El sobrenadante se pipeteó en viales de HPLC de 0.2 ml y se colocó en un muestreador automático de HPLC Perkin Elmer Flexar. La siguiente tabla resume las condiciones de HPLC:

HPLC	Bomba Binaria Perkin Elmer Flexar, muestreador automático, detector UV
Columna	Columna de Polifenilo Waters BioResolve RP mAb, 450 Å, 2.7 μ m, 4.6 mm x 150 mm

Columna de Guarda	Cartucho con soporte VanGuard de Polifenilo Waters BioResolve RP mAb, 450 Å, 2.7 µm, 3.9 mm x 5 mm		
Longitud de Onda de Detección	217 nm		
Temperatura de la columna	37°C		
Límites de Presión	Mín.: 0 PSI, Máx.: 3050 PSI		
Fase móvil			
Fase móvil A	0.05% TFA en agua		
Fase móvil B	0.05% TFA en Acetonitrilo		
Velocidad de flujo	0.8 ml/min		
Volumen de Inyección	10.0 µl		
Tiempo de corrida	14.0 minutos		
Programa de gradiente	Tiempo (minutos)	% de A	% de B
	0.0	80	20
	0.5	80	20
	10.0	0	100
	11.0	80	20
	14.0	80	20

Los datos se analizaron calculando el porcentaje de reducción del compuesto (área del pico del tiempo de retención del conjugado incubado/área del pico del tiempo de retención del conjugado en el tiempo 0) X 100. Los resultados del estudio se muestran en la tabla a continuación.

	Estabilidad en Plasma	
Compuesto	% Restante a las 4 horas	% Restante a las 24 horas
11	108.2	107.2
12	ND	ND
13	ND	ND
14	106.1	105.9
15	104.9	103.3
16	115.6	106.1
17	106.8	105.0
18	104.0	93.0
19	ND	ND
20	98.7	95.8
21	101.0	98.2
22	106.0	105.0
23	92.0	92.0
24	87.0	87.0
25	103.0	104.0
26	105.0	112.0
27	117.0	109.0
28	106.0	106.0
29	116.0	110.0

Varias modificaciones de la invención, además de las descritas en la presente, resultarán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción anterior. También se pretende que tales modificaciones caigan dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. Cada referencia, que

5 incluye, sin limitación, todas las patentes, solicitudes de patente y publicaciones, citadas en la presente solicitud, se incorpora en la presente como referencia en su totalidad.