

CONJUGADOS PEPTÍDICOS DE AGENTES DIRIGIDOS A MICROTÚBULOS COMO TERAPÉUTICOS

CAMPO DE LA INVENCION

- 5 La presente invención se refiere a conjugados peptídicos de agentes dirigidos a microtúbulos tales como derivados de maitansinoide que son útiles para el tratamiento de enfermedades tal como cáncer.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 10 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.
- 15 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 agentes dirigidos a microtúbulos. La división celular requiere la formación de un aparato del huso mitótico intacto, compuesto de microtúbulos que experimentan cambios de longitud
- 20 aleatorios. Los cambios de longitud aleatorios de los microtúbulos son referidos como inestabilidad dinámica. La alteración de la inestabilidad dinámica de los microtúbulos pueden conducir a la supresión de división celular adicional. Los fármacos que se dirigen a los microtúbulos para suprimir la inestabilidad dinámica se usan actualmente en la clínica como agentes anticancerígenos efectivos para una amplia variedad de cánceres. Ver Lopus, M,
- 25 Cancer Lett., 2011, 307(2): 113-118.

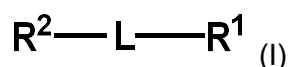
- Los maitansinoides (por ejemplo, mertansina, DM1 o DM4) son una clase de agentes dirigidos a microtúbulos que han surgido como posibles quimioterápicos clínicos. Ver Lopus, M, Cancer Lett., 2011, 307(2): 113-118; y Widdison, W., J. Med. Chem. 2006, 49:4392-4408 Aunque se ha demostrado que DM1 es efectivo en el tratamiento de varios tipos de cáncer, incluyendo
- 30 linfoma y cáncer de mama, los efectos secundarios tóxicos tal como neuropatía periférica han

obstaculizado el desarrollo clínico de agentes dirigidos a tubulina tal como los maitansinoides. El suministro preferencial de compuestos maitansinoides, tal como DM1, a los tejidos enfermos podría evitar estos efectos secundarios serios. Por lo tanto, existe la necesidad de un suministro más selectivo de compuestos maitansinoides al tejido enfermo.

5

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

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



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

10

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.

15

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.

20

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.

25

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La FIG. 1 muestra un diagrama del efecto de DM4 libre y Compuesto 5 en la polimerización de β -tubulina in vitro (en términos de unidades de fluorescencia relativa) a varias concentraciones.

La FIG. 2 representa el análisis cinético de la unión del Compuesto 5 a β -tubulina in vitro como se determinó por resonancia de plasmón superficial Biacore.

La FIG. 3A muestra un diagrama del volumen medio de tumor en ratones desnudos portadores de tumores en flanco colorrectales HCT116 con DM4 o un Compuesto 5.

- 5 La FIG. 3B muestra el porcentaje de cambio de peso corporal de ratones desnudos portadores de tumores en flanco colorrectales HCT116 dosificados con DM4 o Compuesto 5 con relación al día 0.

La FIG. 4 representa un diagrama de Kaplan-Meier de ratones desnudos portadores de tumores en flanco colorrectales HCT116 dosificados con DM4 o Compuesto 5.

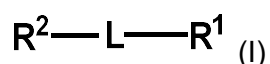
- 10 La FIG. 5A representa la vista ventral y pulmones extraídos de ratones desnudos inoculados con células fluorescentes 4T1-RFP vía inyección en la vena de la cola y fotografiados 11 días después de la inoculación y después de 3 dosis de vehículo o Compuesto 6.

La FIG. 5B representa una gráfica de la señal fluorescente de pulmones extraídos de ratones inoculador 4T1-RFP después de 3 dosis de vehículo o Compuesto 6.

15

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

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



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

- 20 R^1 es un péptido;

R^2 es una porción dirigida a microtúbulo de molécula pequeña; y

L es un enlazador, que se enlaza covalentemente a la porción R^1 y R^2 .

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



- 25 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

R¹ es un péptido que tiene 5 a 50 aminoácidos;

R² es una porción dirigida a microtúbulo de molécula pequeña; y

L es un enlazador, que se enlaza covalentemente a la porción R¹ y R².

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



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

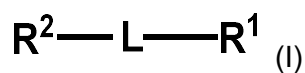
R¹ es un péptido capaz de suministrar selectivamente R²L- a través de una membrana celular que tiene un manto ácido o hipóxico;

R² es una porción dirigida a microtúbulo de molécula pequeña; y

10 L es un enlazador, que se enlaza covalentemente a la porción R¹ y R².

En algunas modalidades, R² es una porción dirigida a microtúbulo derivada de maitansina.

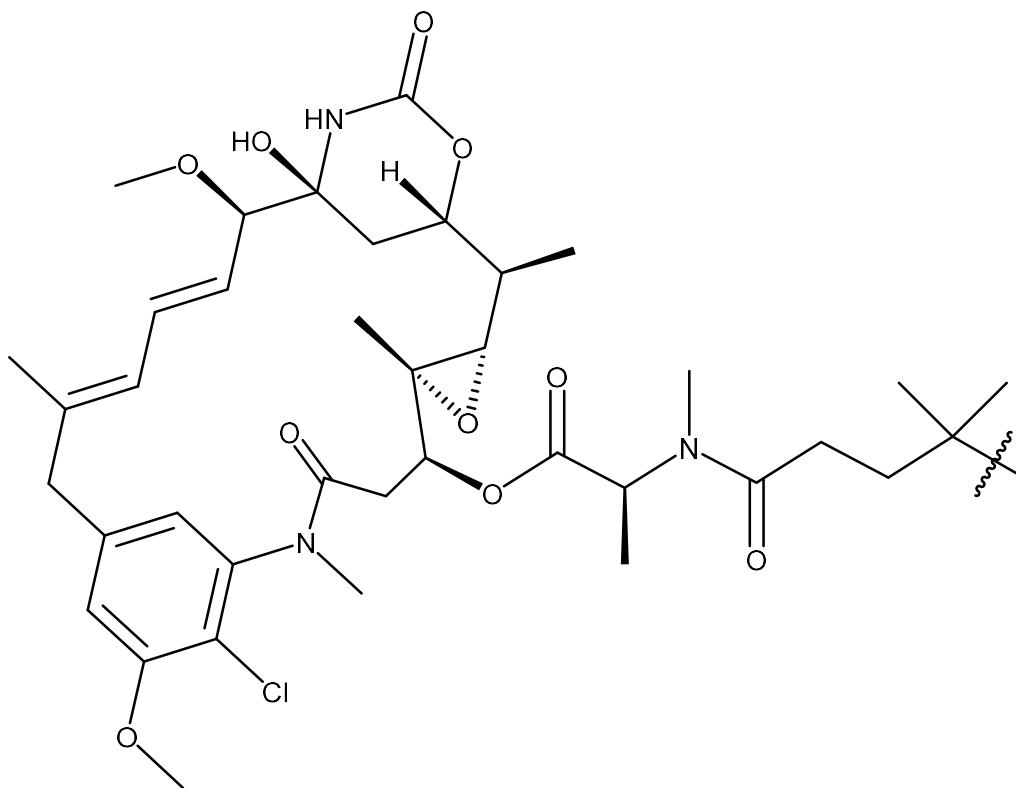
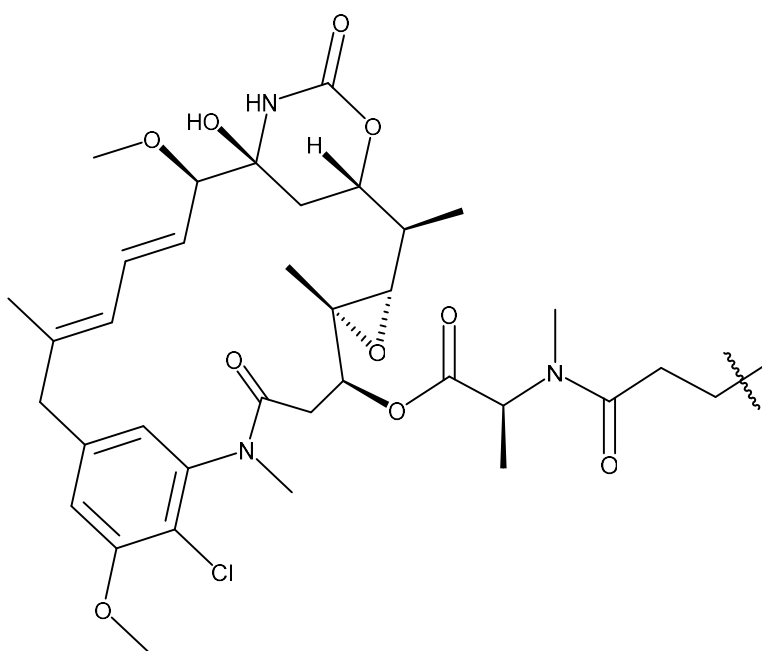
En la presente se proporciona un compuesto de Fórmula (I):

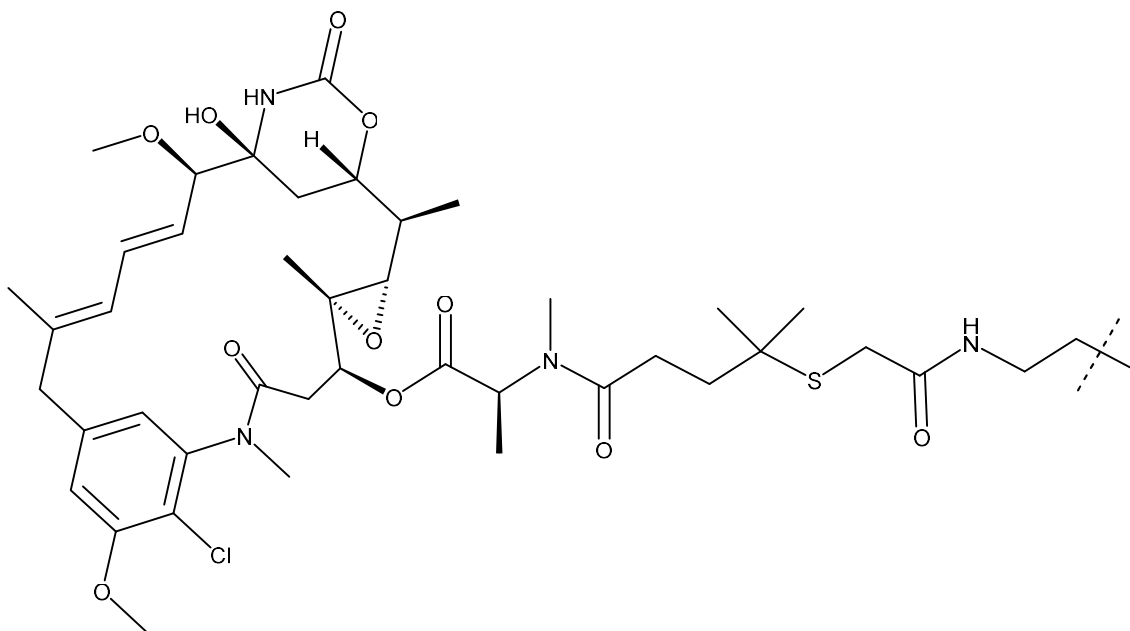
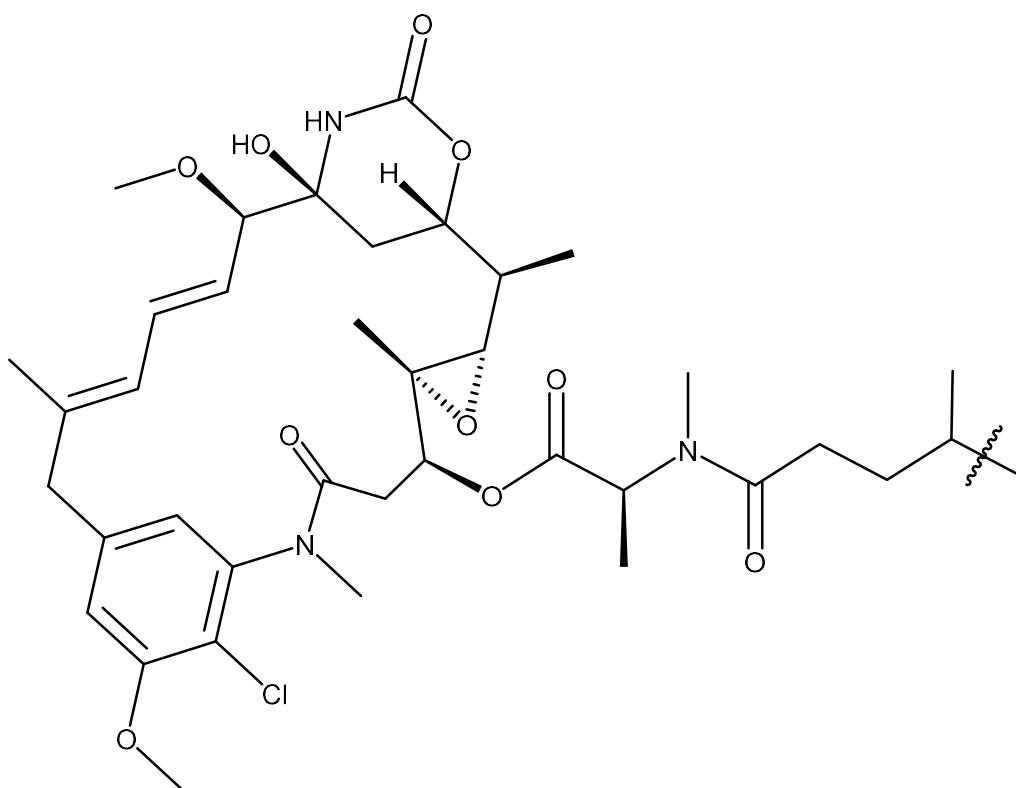


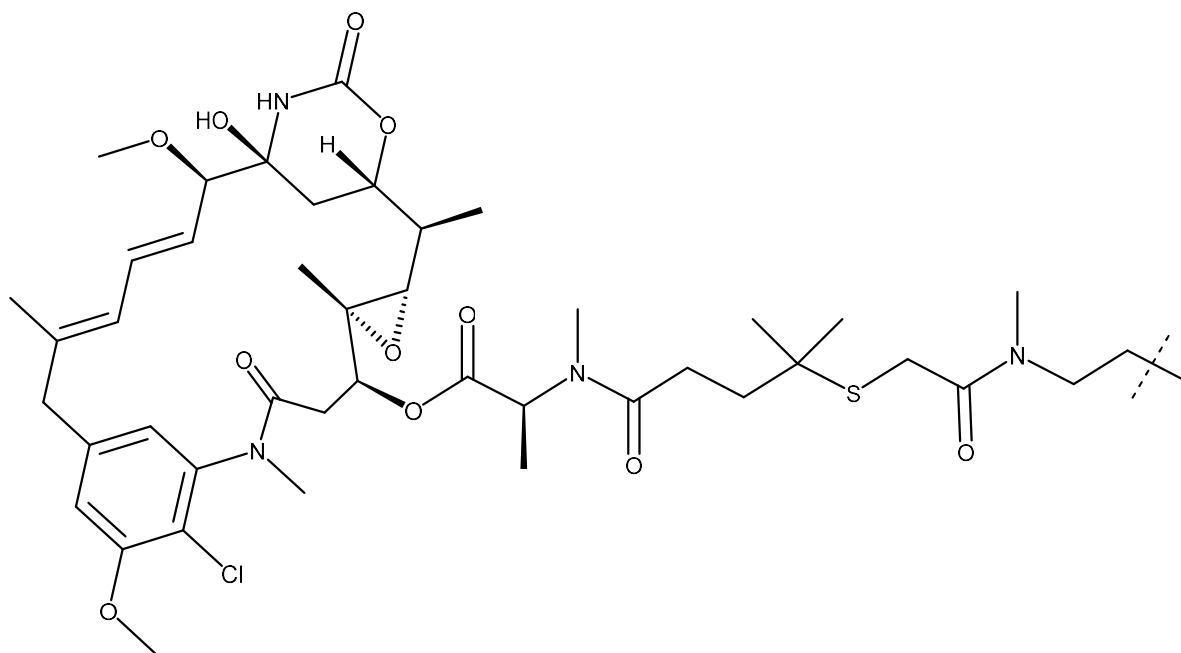
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

15 R¹ es un péptido capaz de suministrar selectivamente R²L- a través de una membrana celular que tiene un manto ácido o hipóxico;

R² se selecciona a partir del grupo que consiste en:



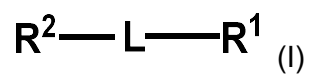




; y

L es un enlazador, que se enlaza covalentemente a la porción R¹ y R².

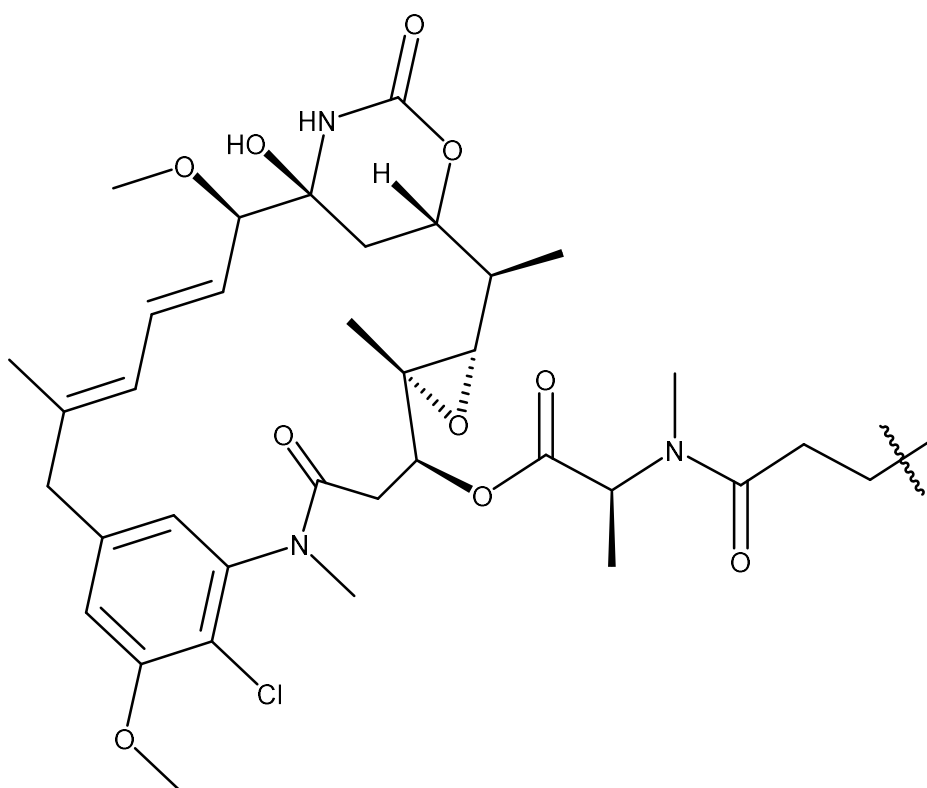
En la presente se proporciona un compuesto de Fórmula (I):



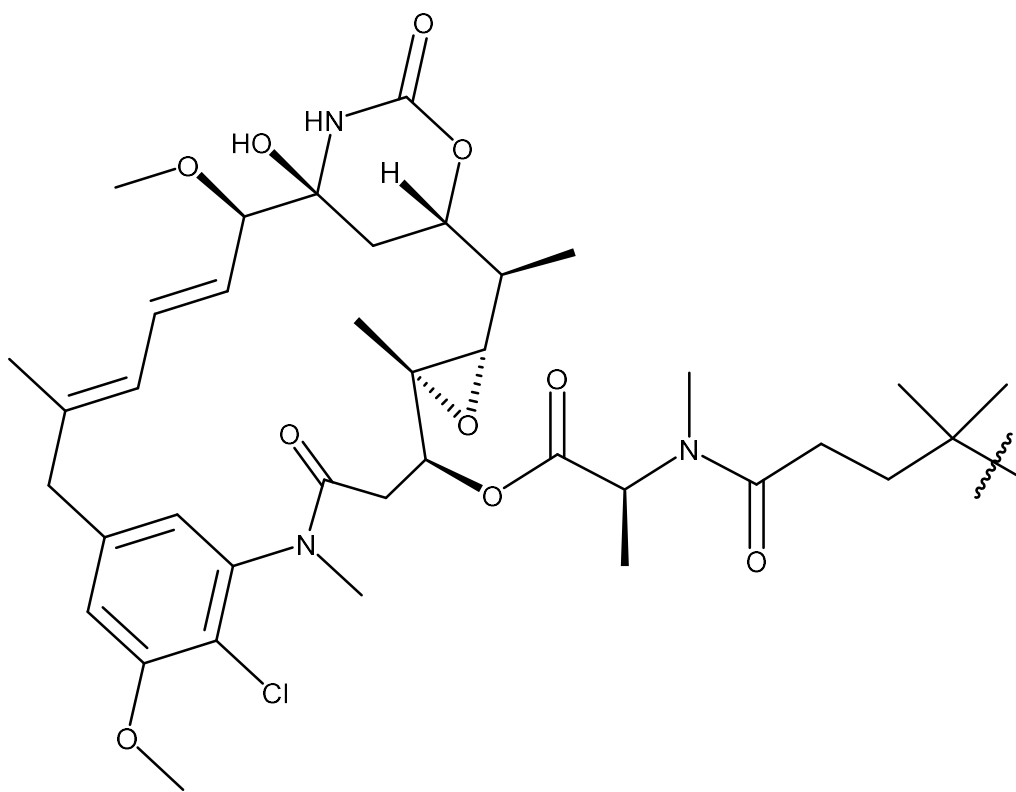
5 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

R¹ es un péptido capaz de suministrar selectivamente R²L- a través de una membrana celular que tiene un manto ácido o hipóxico;

R² se selecciona a partir del grupo que consiste en:

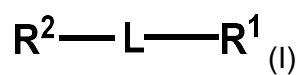


,



, y

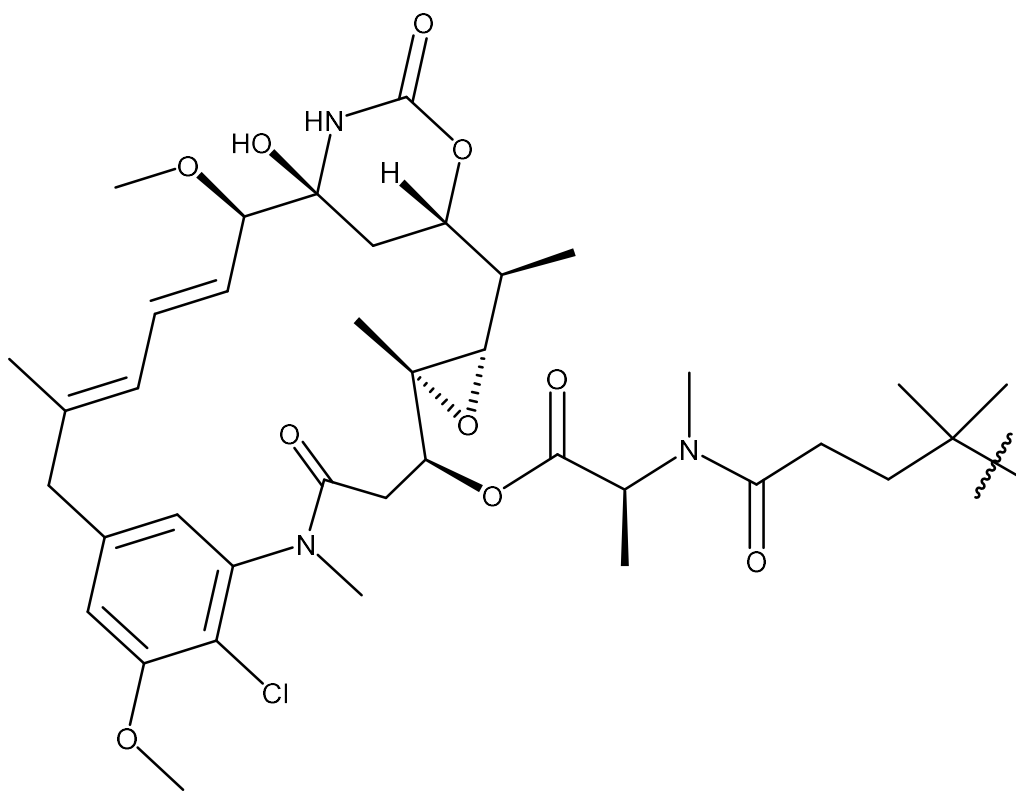
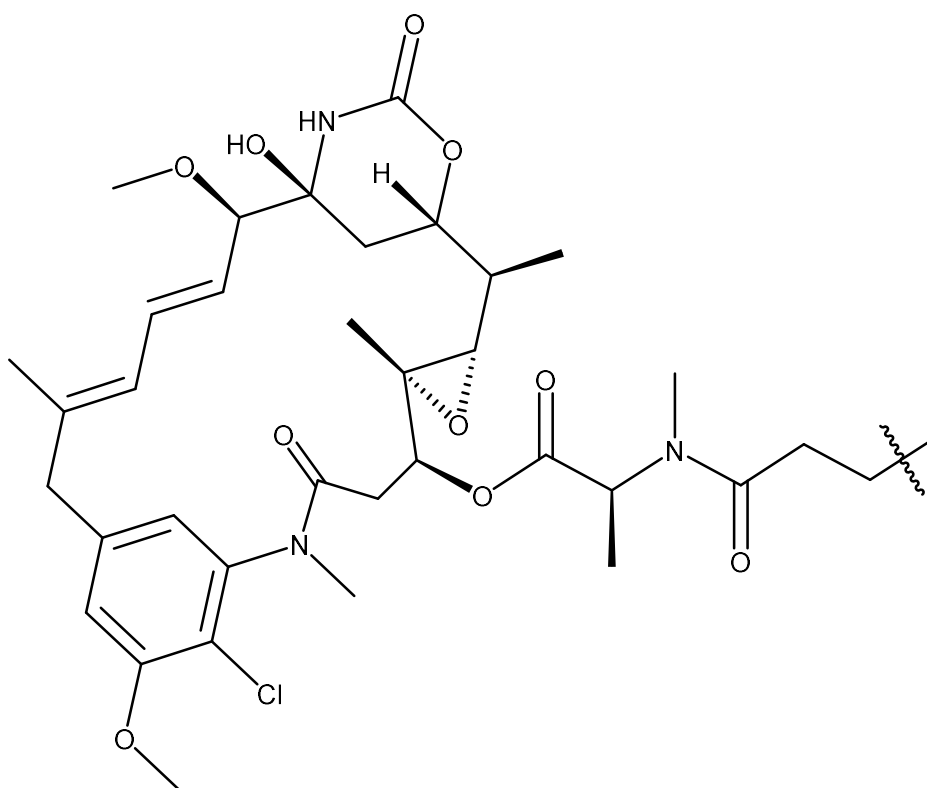
En la presente se proporciona un compuesto de Fórmula (I):

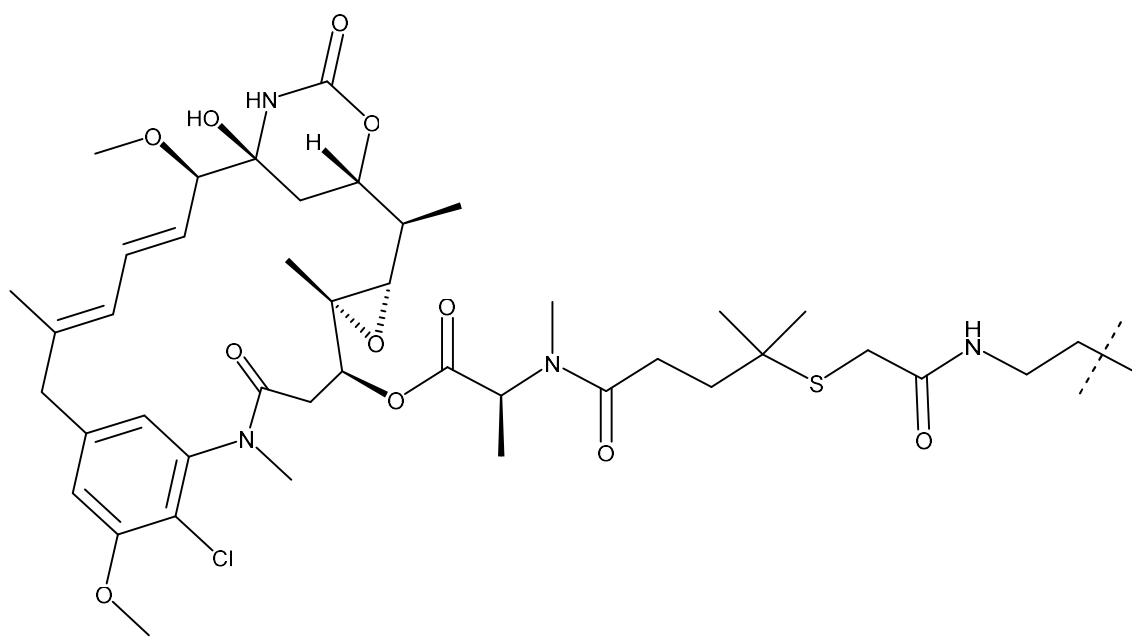
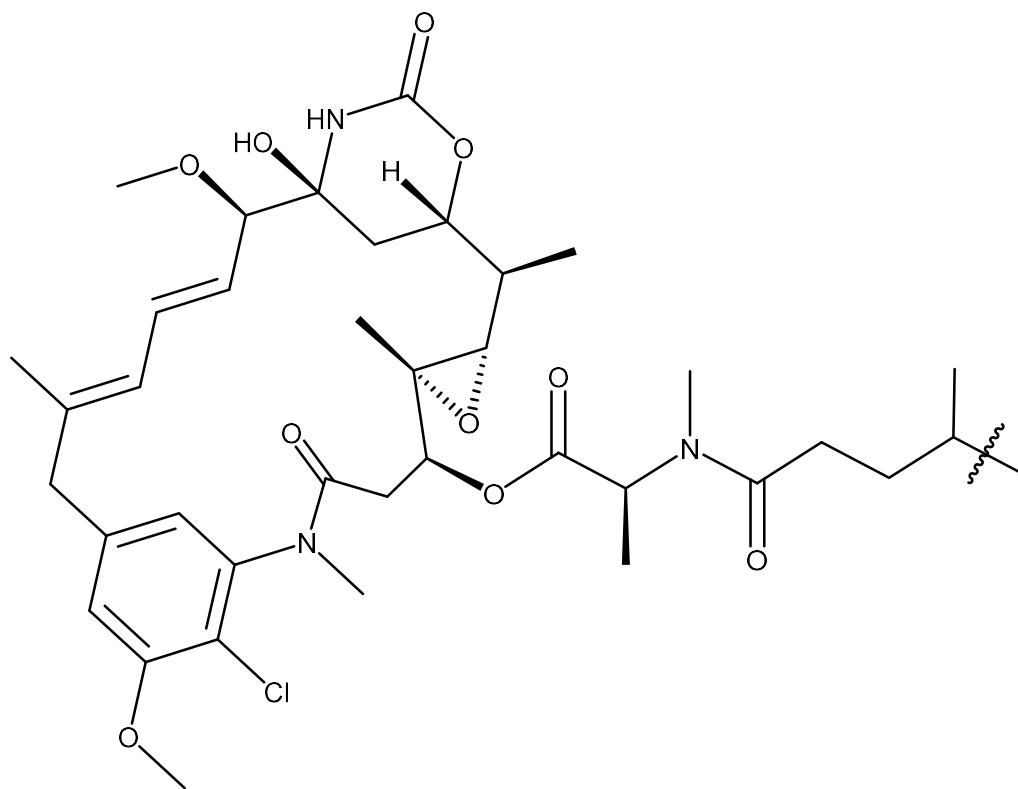


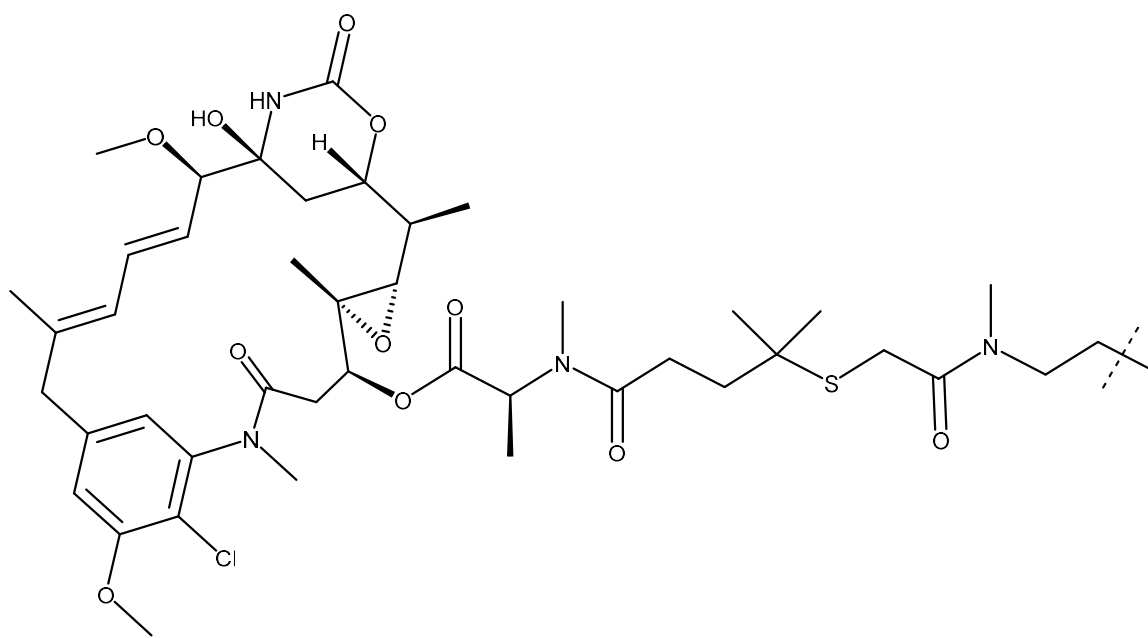
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

R¹ es un péptido capaz de suministrar selectivamente R²L- a través de una membrana celular que tiene un manto ácido o hipóxico;

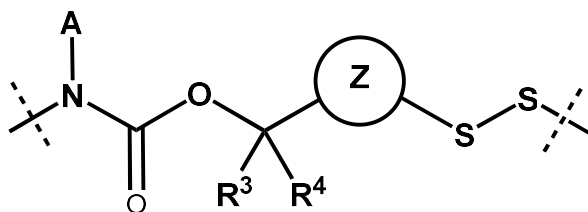
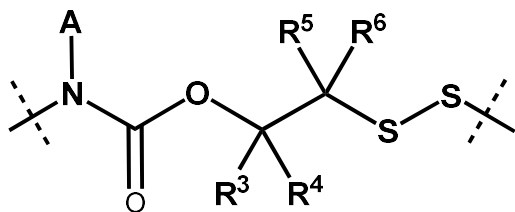
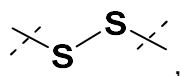
R^2 se selecciona a partir del grupo que consiste en:



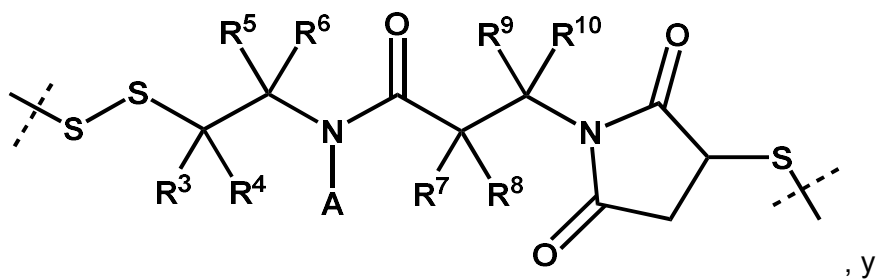


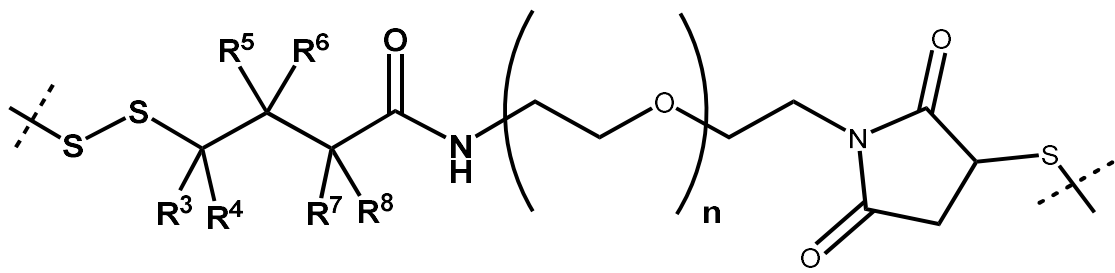


L es un grupo seleccionado a partir de:



5





en donde

R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , R^7 , R^8 , R^9 , y R^{10} son cada uno seleccionados independientemente a partir de H,
 5 alquilo C_{1-4} , alquenilo C_{1-4} , arilo C_{6-10} , cicloalquilo C_{3-10} , heteroarilo de 5-10 miembros, heterocicloalquilo de 4-10 miembros, 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 $NR^{c1}C(O)NR^{c1}R^{d1}$, en donde dicho alquilo C_{1-4} , alquenilo C_{1-4} , arilo C_{6-10} , y heteroarilo de 5-10 miembros, son cada uno opcionalmente sustituidos con 1, 2, o 3 sustituyentes seleccionados
 10 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^3 y R^4 junto con los átomos de carbono a los cuales se unen forman un grupo cicloalquilo C_{3-14} o grupo heterocicloalquilo de 4-14 miembros, cada uno opcionalmente sustituido con 1, 2, o 3 sustituyentes seleccionados independientemente a partir de alquilo C_{1-4} , halo, CN, NO_2 ,
 15 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^3 y R^5 junto con los átomos de carbono a los cuales se unen forman un grupo cicloalquilo C_{3-14} o grupo heterocicloalquilo de 4-14 miembros, cada uno opcionalmente sustituido con 1, 2, o 3 sustituyentes independientemente seleccionados a partir de alquilo C_{1-4} , halo, CN, NO_2 ,
 20 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^4 y R^6 junto con los átomos de carbono a los cuales se unen forman un grupo cicloalquilo C_{3-14} o grupo heterocicloalquilo de 4-14 miembros, cada uno opcionalmente sustituido con 1, 2, o 3 sustituyentes independientemente seleccionados a partir de alquilo C_{1-4} , halo, CN, NO_2 ,
 25 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 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},
 5 NR^{c1}C(O)R^{b1}, NR^{c1}C(O)OR^{a1}, y NR^{c1}C(O)NR^{c1}R^{d1};

o R⁷ y R⁸ 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},
 10 NR^{c1}C(O)R^{b1}, NR^{c1}C(O)OR^{a1}, y NR^{c1}C(O)NR^{c1}R^{d1};

o R⁷ y R⁹ 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},
 15 NR^{c1}C(O)R^{b1}, NR^{c1}C(O)OR^{a1}, y NR^{c1}C(O)NR^{c1}R^{d1};

o R⁸ y R¹⁰ 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},
 20 NR^{c1}C(O)R^{b1}, NR^{c1}C(O)OR^{a1}, y NR^{c1}C(O)NR^{c1}R^{d1};

o R⁹ y R¹⁰ 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 independientemente seleccionados 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},
 25 NR^{c1}C(O)R^{b1}, NR^{c1}C(O)OR^{a1}, y NR^{c1}C(O)NR^{c1}R^{d1};

Z 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 independientemente seleccionados a partir de N, O, y S, en donde el arilo C₆₋₁₀ y el heteroarilo de 5-10 miembros son cada uno opcionalmente sustituidos con 1, 2, o 3
 30 sustituyentes independientemente seleccionados 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},

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

A es H o alquilo C_{1-4} ;

R^{a1} , R^{b1} , R^{c1} , y R^{d1} son cada uno seleccionados independientemente a partir de H, alquilo C_{1-6} , alquenilo C_{2-6} , alquinilo C_{2-6} , haloalquilo C_{1-6} , OH, CN, NO_2 , y CO_2CH_3 ; en donde dicho alquilo

- 5 C_{1-6} y alquenilo C_{2-6} son cada uno opcionalmente sustituidos con OH, CN, NO_2 , o CO_2CH_3 ; y
n es 0, 1, o 2.

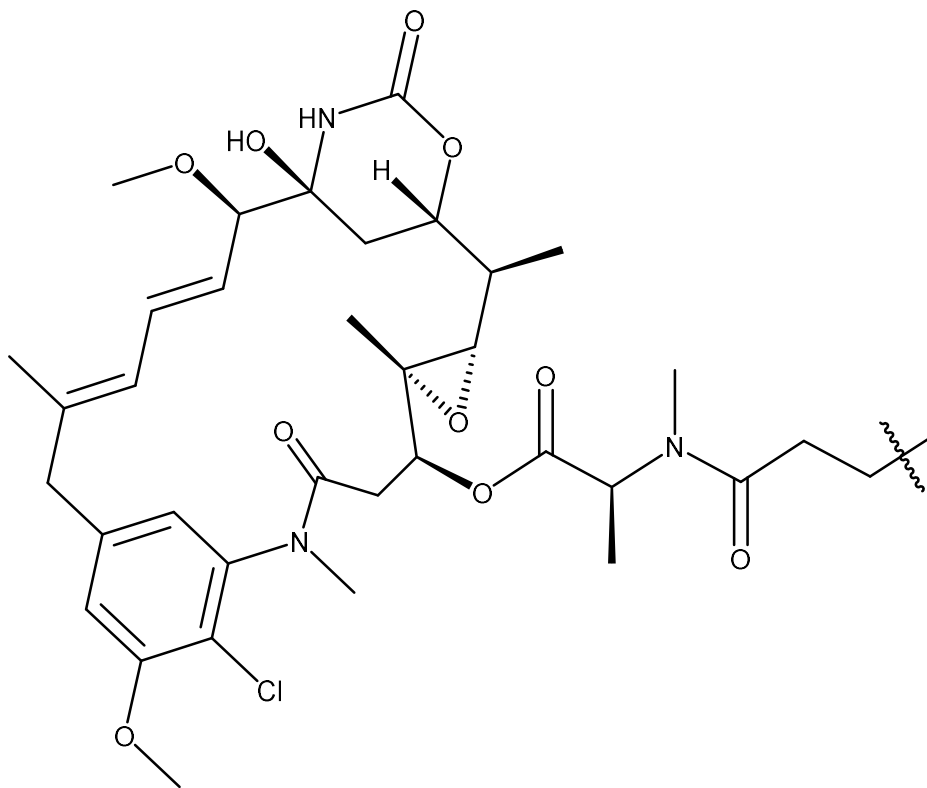
En la presente se proporciona un compuesto de Fórmula (I):

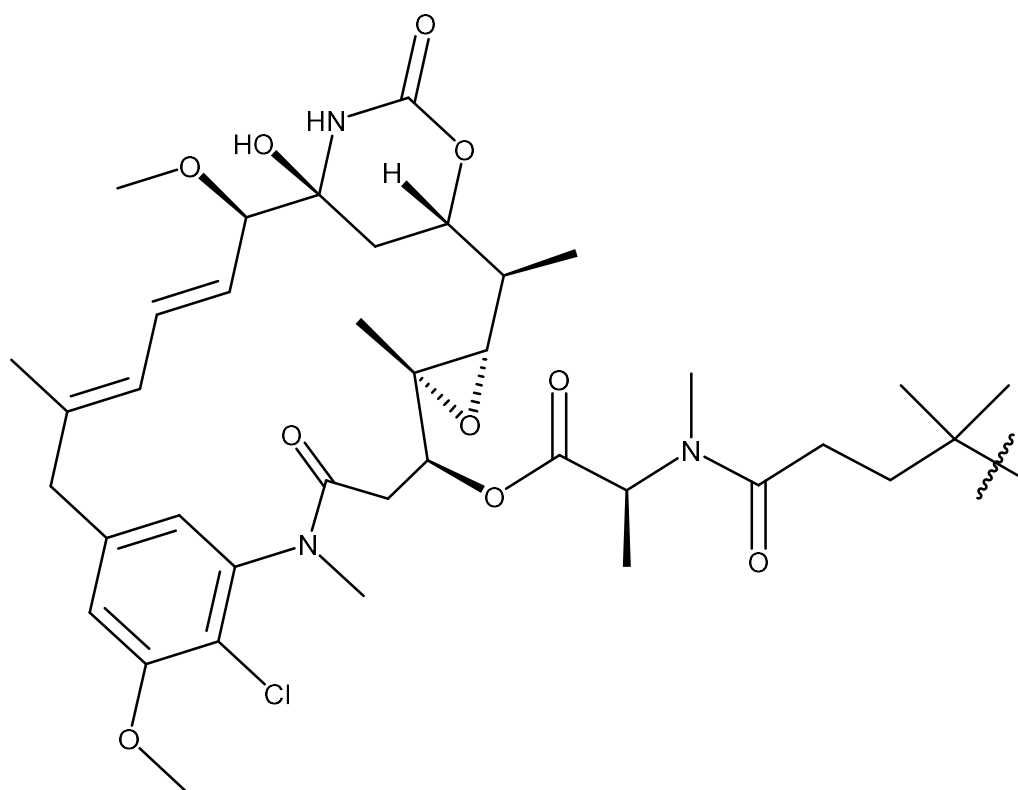


o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

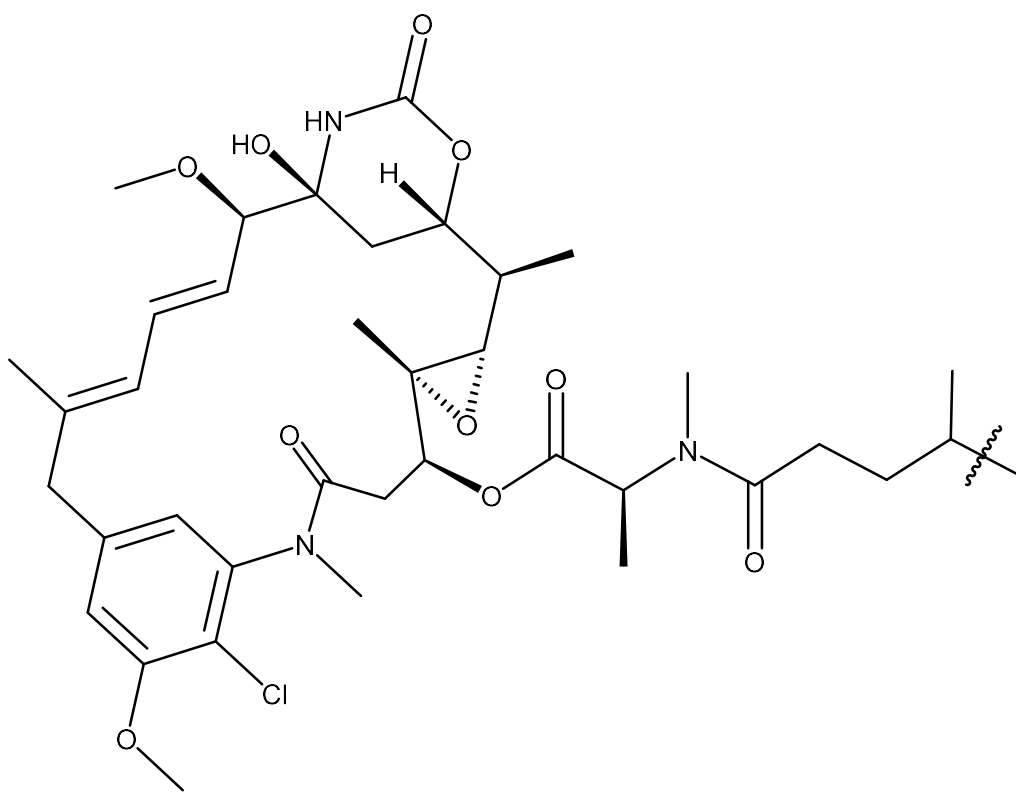
- 10 R^1 es un péptido capaz de suministrar selectivamente $\text{R}^2\text{L-}$ a través de una membrana celular que tiene un manto ácido o hipótico;

R^2 se selecciona a partir del grupo que consiste en:

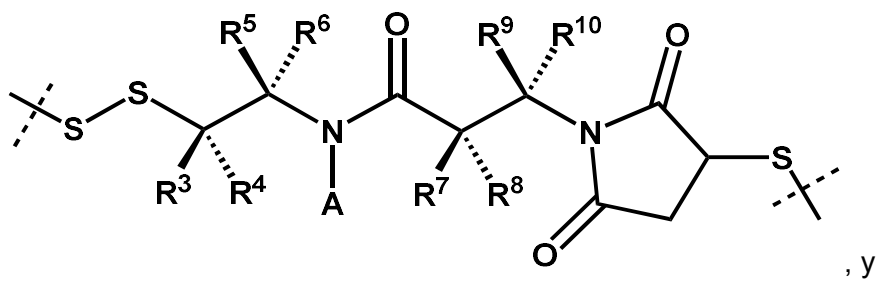
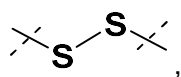


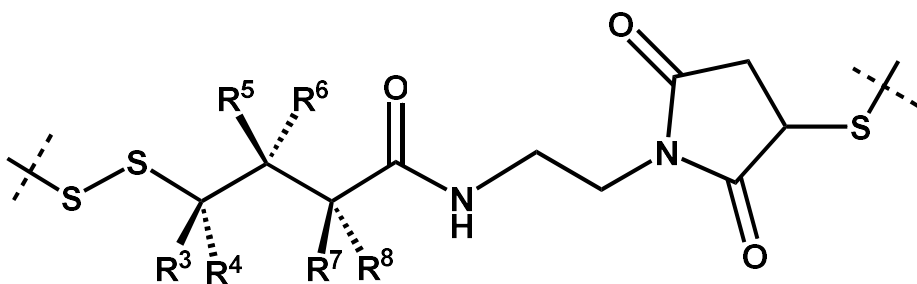


, y



L es un grupo seleccionado a partir de:





; en donde

$R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, R^9$, y R^{10} son cada uno seleccionados independientemente a partir de H, alquilo C_{1-4} , alquenilo C_{1-4} , arilo C_{6-10} , heteroarilo de 5-10 miembros, 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 $NR^{c1}C(O)NR^{c1}R^{d1}$, en donde dicho alquilo C_{1-4} , alquenilo C_{1-4} , arilo C_{6-10} , y heteroarilo de 5-10 miembros son cada uno opcionalmente sustituidos con 1, 2, o 3 sustituyentes seleccionados independientemente a partir de halo, CN, 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^3 y R^4 junto con el átomo de carbono al cual se unen forman un grupo cicloalquilo C_{3-7} 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^3 y R^5 junto con el átomo de carbono al cual se unen forman un grupo cicloalquilo C_{3-7} opcionalmente sustituido con 1, 2, o 3 sustituyentes independientemente seleccionados 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^4 y R^6 junto con el átomo de carbono al cual se unen forman un grupo cicloalquilo C_{3-7} opcionalmente sustituido con 1, 2, o 3 sustituyentes independientemente seleccionados 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^5 y R^6 junto con el átomo de carbono al cual se unen forman un grupo cicloalquilo C_{3-7} 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^7 y R^8 junto con el átomo de carbono al cual se unen forman un grupo cicloalquilo C_{3-7}

opcionalmente sustituido con 1, 2, o 3 sustituyentes independientemente seleccionados 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};

5 o R⁷ y R⁹ junto con el átomo de carbono al cual se unen forman un grupo cicloalquilo C₃₋₇ opcionalmente sustituido con 1, 2, o 3 sustituyentes independientemente seleccionados 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 R⁸ y R¹⁰ junto con el átomo de carbono al cual se unen forman un grupo cicloalquilo C₃₋₇ opcionalmente sustituido con 1, 2, o 3 sustituyentes independientemente seleccionados 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};

15 o R⁹ y R¹⁰ junto con el átomo de carbono al cual se unen forman un grupo cicloalquilo C₃₋₇ opcionalmente sustituido con 1, 2, o 3 sustituyentes independientemente seleccionados 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};

A es H o alquilo C₁₋₄; y

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 CO₂CH.

20 En algunas modalidades, el lado izquierdo de L se une a R² y el lado derecho de L se une a R¹.

En algunas modalidades, un átomo de azufre de la porción disulfuro de L es parte de un residuo cisteína de R¹.

25 Como se usa en la presente, "péptide" 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 R¹ es un péptido de 20 a 40, 20 a 30 aminoácidos, o 30 a 40 residuos. Los péptidos adecuados para 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
30 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 capaz de suministrar selectivamente una porción conjugada (por ejemplo, R²L-) 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, R²L-) 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 capaz de suministrar selectivamente una porción conjugada (por ejemplo, R²L-) 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, R²L-) 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.

En ciertas modalidades, el péptido de R¹ incluye un residuo cisteína que puede formar el sitio de unión a una porción de carga útil (por ejemplo, R²L-) que se suministra a través de una membrana celular. En algunas modalidades, R¹ se une a L mediante un residuo cisteína de R¹. En algunas modalidades, el átomo de azufre del residuo cisteína puede formar parte del enlace de disulfuro del enlazador L que contiene enlace de disulfuro.

Los péptidos adecuados, que pueden cambiar de manera conformacional con base en el pH e 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.

En algunas modalidades, R¹ es un péptido que comprende al menos una de las siguientes secuencias:

ADDQNPWRAYLDLLFPTDTLLLDLLWCG (SEQ ID NO. 1; Pv1),

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

ADDQNPWRAYLDLLFPTDTLLLDLLWDADECG (SEQ ID NO. 3; Pv3);

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

AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLILLDLALLVDADEGTC (SEQ ID No. 5; Pv5); y

AAEQNPWIYWWARYADWLFTTPLLILLDLALLVDADEGTCG (SEQ ID No. 6; Pv6);

en donde R¹ se une a L mediante un residuo cisteína de R¹.

En algunas modalidades, R¹ es un péptido que comprende al menos una de las siguientes secuencias:

- 5 ADDQNPWRAYLDLLFPTDTLLLDLLWCG (SEQ ID NO. 1; Pv1),
AEQNPIYWWARYADWLFTTPLLILLDLALLVDADECG (SEQ ID NO. 2; Pv2), y

ADDQNPWRAYLDLLFPTDTLLLDLLWDADECG (SEQ ID NO. 3; Pv3); y

AAEQNPWIYWWARYADWLFTTPLLILLDLALLVDADEGTCG (SEQ ID No. 6; Pv6);

en donde R¹ se une a L mediante un residuo cisteína de R¹.

- 10 En algunas modalidades, R¹ es un péptido que comprende la secuencia
ADDQNPWRAYLDLLFPTDTLLLDLLWCG (SEQ ID NO. 1; Pv1).

En algunas modalidades, R¹ es un péptido que comprende la secuencia
AEQNPIYWWARYADWLFTTPLLILLDLALLVDADECG (SEQ ID NO. 2; Pv2).

- En algunas modalidades, R¹ es un péptido que comprende la secuencia
15 ADDQNPWRAYLDLLFPTDTLLLDLLWDADECG (SEQ ID NO. 3; Pv3).

En algunas modalidades, R¹ es un péptido que comprende la secuencia
Ac-AAEQNPWIYWWARYADWLFTTPLLILLDLALLVDADEGTCG (SEQ ID NO. 4; Pv4).

En algunas modalidades, R¹ es un péptido que comprende la secuencia
AAEQNPWIYWWARYADWLFTTPLLILLDLALLVDADEGTC (SEQ ID NO. 5; Pv5).

- 20 En algunas modalidades, R¹ es un péptido que comprende la secuencia
AAEQNPWIYWWARYADWLFTTPLLILLDLALLVDADEGTCG (SEQ ID NO. 6; Pv6).

En algunas modalidades, R¹ es un péptido que consiste en la secuencia
ADDQNPWRAYLDLLFPTDTLLLDLLWCG (SEQ ID NO. 1; Pv1).

- En algunas modalidades, R¹ es un péptido que consiste en la secuencia
25 AEQNPIYWWARYADWLFTTPLLILLDLALLVDADECG (SEQ ID NO. 2; Pv2).

En algunas modalidades, R¹ es un péptido que consiste en la secuencia
ADDQNPWRAYLDLLFPTDTLLLDLLWDADECG (SEQ ID NO. 3; Pv3).

En algunas modalidades, R¹ es un péptido que consiste en la secuencia Ac-
AAEQNPWIYWWARYADWLFTTPLLILLDLALLVDADEGTCG (SEQ ID NO. 4; Pv4).

- 30 En algunas modalidades, R¹ es un péptido que consiste en la secuencia
AAEQNPWIYWWARYADWLFTTPLLILLDLALLVDADEGTC (SEQ ID NO. 5; Pv5).

En algunas modalidades, R¹ es un péptido que consiste en la secuencia AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCG (SEQ ID NO. 6; Pv6).

En algunas modalidades, R¹ es un péptido que comprende al menos una secuencia seleccionada a partir de la SEQ ID NO: 7 a la SEQ ID NO: 311 como se muestra en la Tabla

5 1.

En algunas modalidades, R¹ es un péptido que consiste en una secuencia seleccionada a partir de la SEQ ID NO: 7 a la SEQ ID NO: 311 como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Secuencias de R¹ Adicionales

SEQ ID NO.	Secuencia
7	AEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGT
8	GGEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGT
9	AEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGT
10	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCG
11	GGEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCG
12	ACEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTG
13	ACEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGT
14	AKEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGT
15	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTKCG
16	AKEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADECT
17	ACEQNPIYWARYANWLFTTPLLLLNALLVDADEGTG
18	ACEQNPIYWARYAKWLFTTPLLLKLALLVDADEGTG
19	GGEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVNANQGT
20	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLALALLVDADEGT

21	AAEQNPIYWARYAAWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGT
22	AAEQNPIYWARYADWLFTTALLLLDLALLVDADEGT
23	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLELALLVDADEGT
24	AAEQNPIYWARYAEWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGT
25	AAEQNPIYWARYADWLFTDLPLLLLDLLALLVDADEGT
26	GEQNPIYWAQYADWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGTCTG
27	GGEQNPIYWARYADWLFTTPLLLDLLALLVDADEGTCTG
28	GGEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLDALLVDADEGTCTG
29	GGEQNPIYWARYDAWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGTCTG
30	GGEQNPIYWARYAWDLFTTPLLLLLDLALLVDADEGTCTG
31	AAEQNPIYWARYADWLFTTGLLLLDLALLVDADEGT
32	DDDEDNPIYWARYADWLFTTPLLLLHGALLVDADECT
33	DDDEDNPIYWARYAHWLFTTPLLLLHGALLVDADEGCT
34	DDDEDNPIYWARYAHWLFTTPLLLLHGALLVNADECT
35	DDDEDNPIYWARYAHWLFTTPLLLLHGALLVNANECT
36	AEQNPIYWARYADFLFTTPLLLLLDLALLVDADET
37	AEQNPIYFARYADWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGT
38	AEQNPIYFARYADFLFTTPLLLLLDLALLWDADET
39	AKEDQNPYWARYADWLFTTPLLLLLDLALLVDG
40	ACEDQNPYWARYADWLFTTPLLLLLDLALLVDG
41	AEDQNPYWARYADWLFTTPLLLLLDLALLVDCG
42	AEDQNPYWARYADWLFTTPLLLLELALLVECG
43	AKEDQNPYWRAYADLFTPLTLLDLLALWDG

44	ACEDQNPYWRAYADLFTPLTLLDLLALWDG
45	ACDDQNPWRAYLDLLFPTDTLLLDLLW
46	TEDADVLLALDLLLLPTTFLWD
47	AEQNPIYWARYADWLFTTPL
48	AEQNPIYWARYADWLFTTPCL
49	ACEQNPIYWARYADWLFTTPL
50	AEQNPIYFARYADWLFTTPL
51	KEDQNPWARYADLLFPTTLAW
52	ACEDQNPWARYADLLFPTTLAW
53	ACEDQNPWARYADWLFTTLLLD
54	ACEEQNPWARYAELLFPTTLAW
55	ACEEQNPWARYAEWLFTTLLLE
56	ACEEQNPWARYLEWLFTETLLEL
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 WARYADWLFTTALLLDLALLV DADEGT
66	ACAEQNPIY WARYADWLFTTGLLLDLALLV 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 WARYADWLFTTPLLLLLELALLV 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 WARYLDWLFPTDTLLLDL
86	CDNNNP WRAYLDLLFPTDTLLLDW
87	ACEEQNP WARYLEWLFPTETLLLEL
88	ACEDQNP WARYADWLFPTTLLLLD
89	ACEEQNP WARYAEWLFPTTLLLLE

90	ACEDQNP WARYADLLFPTTLAW
91	ACEDQNP WARYAELLFPTTLW
92	KEDQNP WARYADLLFPTTLW
93	DDDEDNP IWARYAHWLFTTPLLLLLHGALLVDADECT
94	DDDEDNPIYWARYAHWLFTTPLLLLLDGALLVDADECT
95	DDDEDNPIYWARYAHWLFTTPLLLLLHGALLVNADECT
96	DDDEDNPIYWARYAHWLFTTPLLLLLHGALLVNANECT
97	DDDEDNPIYWARYADWLFTTPLLLLLHGALLVDADECT
98	ACEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGIG
99	ACEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLDLALLVDADET
100	ACEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGT
101	GGEQNPIYWARYADWLFTTPLLLDLLALLVDADEGTCTG
102	GGEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLDALLVDADEGTCTG
103	GGEQNPIYWARYAWDLFTTPLLLLLDLALLVDADEGTCTG
104	AAEQNPIYWARYAEWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGTCTG
105	AAEQNPIYWARYAEWLFTTPLLLLELALLVDADEGTCTG
106	GGEQNPIYWARYDAWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGTCTG
107	GGEQNPIYWAQYDAWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGTCTG
108	GGEQNPIYWAQDYAWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGTCTG
109	AAEQNPIYWARYAAWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGTCTG
110	ACEQNPIYWARYANWLFTTPLLLLLNLALLVDADEGTG
111	DDDEDNPIYWARYAHWLFTTPLLLLLHGALLVNANECT
112	DDDEDNPIYWARYAHWLFTTPLLLLLHGALLVNADECT

113	DDDEDNPIYWARYADWLFTTPLLLLLHGALLVDADECT
114	DDDEDNPIYWARYAHWLFTTPLLLLLHGALLVDADECT
115	DDDEDNPIYWARYAHWLFTTPLLLLLDGALLVDADECT
116	GGEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLDLALLVNANQGT
117	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLLELALLVDADEGTCG
118	AAEQNPIYWARYAEWLFTTPLLLLLLELALLVDADEGTCG
119	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLLELALLVDADEGTKCG
120	GGEQNPIYWAQYADWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGTCG
121	GGEQNPIYWAQYDAWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGTCG
122	GGEQNPIYWAQDYAWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGTCG
123	GGEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLDALLVNANQGT
124	DDDEDNPIYWARYAHWLFTTPLLLLLHGALLVNADECT
125	DDDEDNPIYWARYAHWLFTTPLLLLLHGALLVNANECT
126	ACEQNPIYWARYAKWLFTTPLLLLLKLALLVDADEGTG
127	GGEQNPIYWAQDYAWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGTCG
128	GGEQNPIYWAQYDAWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGTCG
129	GGEQNPIYWAQYADWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGTCG
130	AAEQNPIYWARYAAWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGTCG
131	AAEQNPIYWARYADWLFTDLPLLLLLDLALLVDADEGT
132	GGEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLDALLVDADEGTCG
133	GGEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCG
134	AAEQNPIYWARYADWLFTTGLLLLDLALLVDADEGT
135	AEQNPIYWARYAAWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGTCG

136	GGEQNPIYWAWQYDAWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCG
137	GGEQNPIYWAWQDYAWLFTTPLLLLDLALLDADEGTCG
138	GGEQNPIYWARYDAWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCG
139	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLALALLVDADEGTCG
140	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTKCG EGTK(rodamina)C(faloidina)G
141	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLELALLDADEGTKCG
142	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCG
143	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTC(faloidina)G
144	GGEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCG
145	ACEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADET
146	ACEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTG
147	ACEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGT
148	GGEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVNANQGT
149	DDDEDNPIYWARYAHWLFTTPLLLLLHGALLVNADECT
150	DDDEDNPIYWARYAHWLFTTPLLLLLHGALLVNANECT
151	GGEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCG
152	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTC(faloidina)G
153	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLELALLVDADEGTKCG
154	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTKCG
155	DDDEDNPIYWARYAHWLFTTPLLLLLBGALLVDADECT
156	DDDEDNPIYWARYAHWLFTTPLLLLLDGALLVDADECT
157	DDDEDNPIYWARYAHWLFTTPLLLLLBGALLVNADECT

158	DDDEDNPIYWARYAHWLFTTPLLLLLBGALLVNANECT
159	DDDEDNPIYWARYADWLFTTPLLLLLIBGALLVDADECT
160	DDDEDNPIYWARYADWTFTTPLLLLLHGALLVDADECT
161	DDDEDNPIYWARYAHWLFTTPLLLLLDGALLVDADECT
162	DDDEDNPIYWARYAHWLFTTPLLLLLHGALLVDADECT
163	DDDEDNPIYWARYAHWLFTTPLLLLLHGALLVNADECT
164	DDDEDNPIYWARYHWLFTTPLLLLLHGALLVNANECT
165	DDDEDNPIYWARYAHWLFTTPLLLLLHGALLVNANECT
166	DDDEDNPIYWARYAHWLFTTPLLLLLHGALLVNADECT
167	DDDEDNPIYWARYADWLFTTPLLLLLHGALLVDADECT
168	DDDEDNPIYWARYAHWLFTTPLLLLLHGALLVDADECT
169	DDDEDNPIYWARYAHWLFTTPLLLLLDGALLVDADECT
170	GGEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLDLALLVNANQGT
171	DDDEDNPIYWARYAHWLFTTPLLLLLHGALLVNADECT
172	DDDEDNPIYWARYADWLFTTPLLLLLHGALLVDADECT
173	DDDEDNPIYWARYAHWLFTTPLLLLLHGALLVDADECT
174	DDDEDNPIYWARYAHMLFTTPLLLLLDGALLVDADECT
175	DDDEDNPIYWARYAHWLFTTPLLLLLHGALLVNANECT
176	DDDEDNPIYWARYAHWLFTTPLLLLLDGALLVDADECT
177	DDDEDNPIYWARYADWLFTTPLLLLLHGALLVDADECT
178	DDDEDNPIYWARYAHWLFTTPLLLLLHGALLVDADECT
179	DDDEDNPIYWARYAHWLFTTPLLLLLHGALLVNADECT
180	DDDEDNPIYWARYAHWLFTTPLLLLLHGALLVNANECT

181	AAEQNPIYWARYADWLFTTGLLLLDLALLVDADEGT
182	GGEQNPIYWARYAWDLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCTG
183	GGEQNPIYWARYDAWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCTG
184	GGEQNPIYWAQYDAWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCTG
185	GGEQNPIYWAQDYAWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCTG
186	AAEQNPIYWARYAAWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCTG
187	GGEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCTG
188	GGEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCTG
189	GGEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCTG
190	GGEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCTG
191	GGEQNPIYWAQYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCTG
192	GGEQNPIYWAQYDAWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCTG
193	GGEQNPIYWAQDYAWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCTG
194	GGEQNPIYWAQYDAWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCTG
195	GGEQNPIYWAQDYAWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCTG
196	GGEQNPIYWAQYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCTG
197	AAEQNPIYWARYAAWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCTG
198	GGEQNPIYWAQDYAWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCTG
199	GGEQNPIYWAQYDAWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCTG
200	GGEQNPIYWAQYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCTG
201	AAEQNPIYWARYAAWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCTG
202	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLELALLVDADEGTKCTG
203	EGTK(ridamina)C(faloidina)G

204	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGTKCG
205	ACEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGTG
206	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGTC(faloidina)G
207	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGTKCG
208	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLLELALLVDADEGTKCG
209	AAEQNPIYWARYADWLFTDPLLLLLDLALLVDADEGT
210	AAEQNPIYWARYAAWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGTGCG
211	GGEQNPIYWAQYDAWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGTGCG
212	GGEQNPIYWAQDYAWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGTGCG
213	GGEQNPIYWARYDAWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGTGCG
214	AAEQNPIYWARYAEWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGTGCG
215	AAEQNPIYWARYAEWLFTTPLLLLLLELALLVDADEGTGCG
216	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLLALLVDADEGTGCG
217	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLLELALLVDADEGTGCG
218	AAEQNPIYWARYAEWLFTTPLLLLLLELALLVDADEGTGCG
219	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLLELALLVDADEGTKCG
220	ACEQNPIYWARYAKWLFTTPLLLLLKLALLVDADEGTG
221	ACEQNPIYWARYANWLFTTPLLLLLNLALLVDADEGTG
222	AAEQNPIYWARYADWLFTTALLLLDLALLVDADEGT
223	AEQNPIYFARYADLLFPTTLAW
224	AEQNPIYWARYADLLFPTTLAF
225	AEQNPIYWARYADLLFPTTLAW
226	ACEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLDLALLVDADET

227	GGEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGT
228	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCTG
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-CCTCTGACCTCATTTACA
236	D-Arg8-Deca D-Arg8-Deca-CCTCTTACCTCAGTTACA
237	D-Arg8-Deca-mal apareamiento D-Arg8-Deca-CCTCTGACCTCATTTACA
238	S-S-CCTCTTACCTCAGTTACA
239	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCTG
240	AEDQNPIYWARYDWLFTTPLLLLDLALLVDCG
241	AEDQNPIYWARYADWLFTTPLLLLELALLVECG
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 YWARYADWLFTTPLLLLLDLALLV DADEGCT-COOH
251	AEDQN-PI YWARYADWLFTTPLLLLLDLALLV DC--G-T-COOH
252	AEDQNDPI YWARYADWLFTTPLLLLLLELALLV EC--G-T-COOH
253	Quelato-ACEEQNPWARYLEWLFPTETLLEL
254	AEQNPIY WARYADWLFTTPLLLLLDLALLV DADEGT-COOH
255	AKEDQNPY WARYADWLFTTPLLLLLDLALLV DG-COOH
256	AKEDQNDPY WARYADWLFTTPLLLLLDLALLV G-COOH
257	AEQNPI YWARYADWLFTTPLLLLLDLALLV DADEGC-Biotina-T-COO H
258	AEDQNP YWARYADWLFTTPLLLLLDLALLV DC-Biotina-G-COOH
259	AEDQNP YWARYADWLFTTPLLLLLLELALLV EC-Biotina-G-COOH
260	ACEQNPIY WARYADWLFTTPLLLLLDLALLV DADEGT
261	ACEDQNPY WARYADWLFTTPLLLLLDLALLV DG
262	ACEDQNPY WRAYADLFTPLTLLDLLALW DG
263	ACDDQNP WRAYLDLLFPTDTLLLDLLW
264	WRAYLELLFPTETLLELLW
265	WARYLDWLFPTDTLLLDL
266	WRAYLDLLFPTDTLLLDW
267	WARYLEWLFPTETLLEL
268	WAQYLELLFPTETLLEW
269	WRAYLELLFPTETLLEW
270	WARYADWLFPTTLLLD
271	WARYAEWLFPTTLLLE
272	ACEDQNP WARYADLLFPTTLAW

273	ACEEQNP WARYAELLFPTTLAW
274	Ac-TEDAD VLLALDLLLLPTTFLWDAYRAW YPNQECA-Am
275	CDDDDDDNP NY WARYANWLFTTPLLLLNGALLV EAEET
276	CDDDDDDNP NY WARYAPWLFTTPLLLLPGALLV EAEET
277	Ac-AEQNPY WARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGCT
278	Ac-AKEQNPY WARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTG
279	ACEQNPY WARYANWLFTTPLLLLNLALLVDADEGT
280	Ac-AAEQNPY WARYADWLFTTPLLLLLELALLVDADEGTKCG
281	DDDEDNPY WARYADWLFTTPLLLLHGALLVDADET
282	CDDDEDNPY WARYAHWLFTTPLLLLHGALLVDADET
283	DDDEDNPY WARYAHWLFTTPLLLLHGALLVDADEGT
284	DDDEDNPY WARYAHWLFTTPLLLLHGALLVNADEGT
285	DDDEDNPY WARYAHWLFTTPLLLLHGALLVNANEGT
286	AKEDQNDPY WARYADWLFTTPLLLLDLALLVG
287	AEDQNPY WARYADWLFTTPLLLLLELALLVCG
288	AKDDQNP WRAYLDLLFPTDTLLLDLLWC
289	ACEEQNP WRAYLELLFPTETLLLELLW
290	ACDDQNP WARYLDWLFTDTLLLDL
291	CDNNNP WRAYLDLLFPTDTLLLDW
292	CEEQQP W A Q Y L E L L F P T E T L L L E W
293	EEQQP W R A Y L E L L F P T E T L L L E W
294	CDDDDDDNP NY WARYANWLFTTPLLLLNGALLVEAEET
295	CDDDDDDNP NY WARYAPWLFTTPLLLLPGALLVEAEE

296	AEQNPIYFARYADLLFPTTLAW
297	AEQNPIYWARYADLLFPTTLAF
298	AEQNPIYWARYADLLFPTTLAW
299	KEDQNPWARYADLLFPTTLW
300	ACEEQNPQAEYAEWLFPTTLLLE
301	AAEEQNPWARYLEWLFPTETLLEL
302	AKEEQNPWARYLEWLFPTETLLEL
303	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTGG
304	XXEXNPIYWAXXXXXLFTXXLLLXXXALLVXAXXTXG
305	DAAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLLALLVDADEGTKGG
306	GGEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTGG
307	XXEXNPIYWAXXXXXLFTXXLLLXXXALLVXAXXTGG
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.

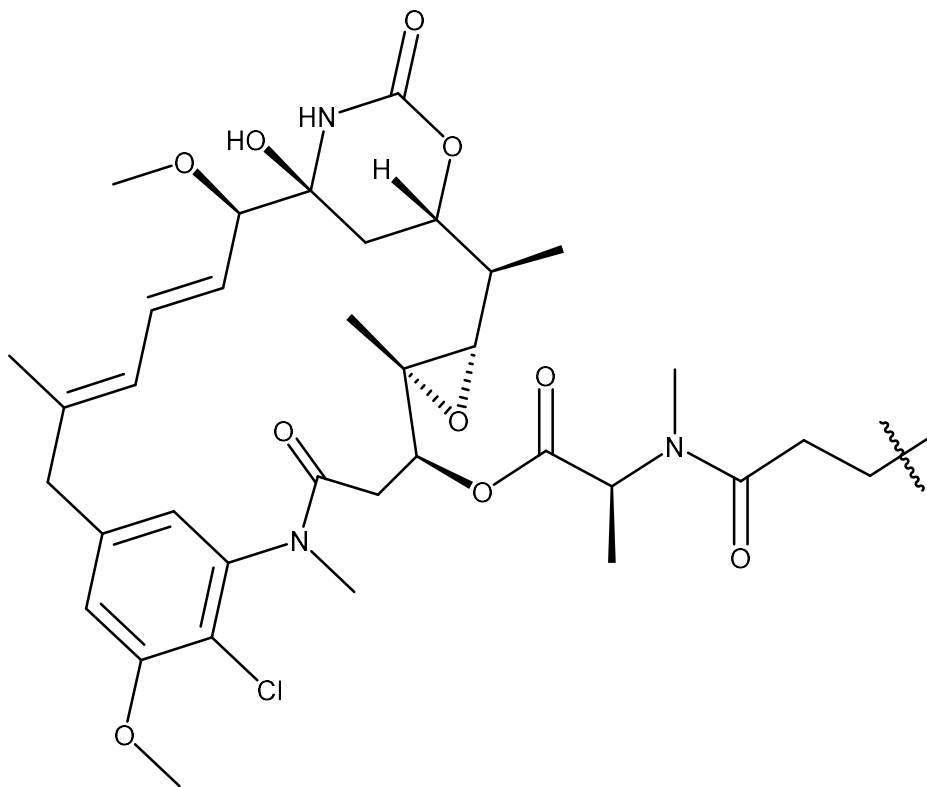
- 5 En algunas modalidades, el péptido de R¹ es un péptido conformacionalmente restringido. Un péptido conformacionalmente restringido puede incluir, por ejemplo, péptidos macrocíclicos y péptidos grapado. Un péptido grapado es un péptido restringido por un enlace covalente entre dos cadenas laterales 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.

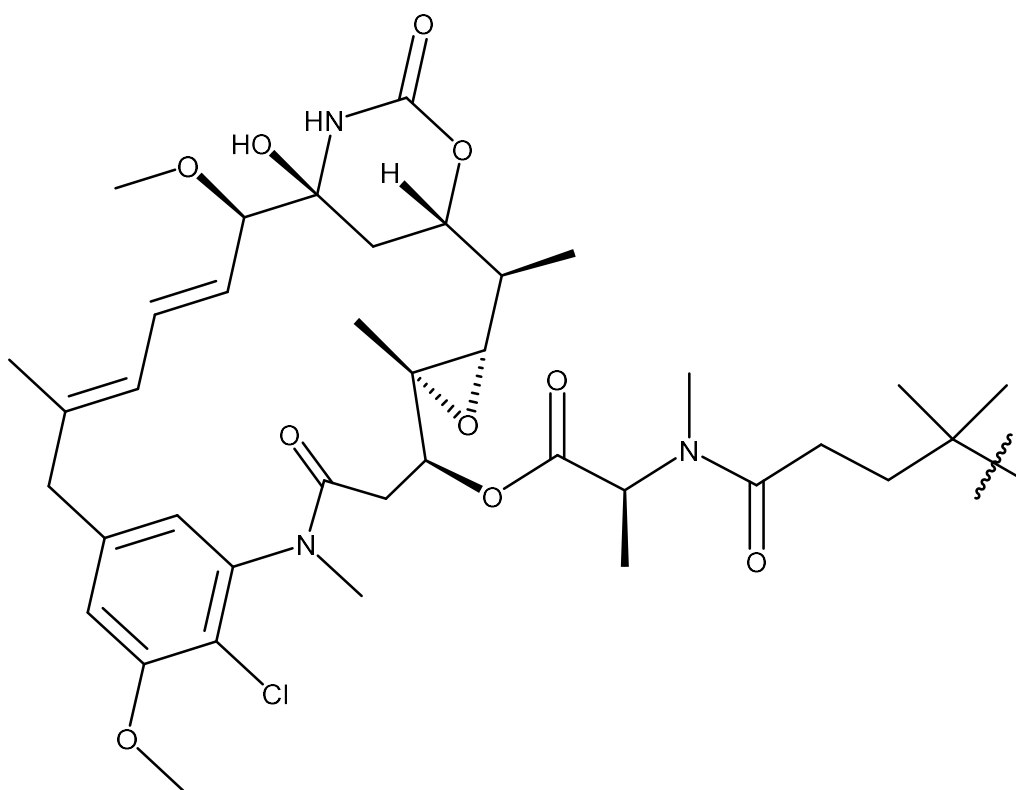
En algunas modalidades, R^1 es un péptido que tiene 10 a 50 aminoácidos. En algunas modalidades, R^1 es un péptido que tiene 20 a 40 aminoácidos. En algunas modalidades, R^1 es un péptido que tiene 20 a 40 aminoácidos. En algunas modalidades, R^1 es un péptido que tiene 10 a 20 aminoácidos. En algunas modalidades, R^1 es un péptido que tiene 20 a 30 aminoácidos. En algunas modalidades, R^1 es un péptido que tiene 30 a 40 aminoácidos.

Las porciones dirigidas a microtúbulo de molécula pequeña adecuadas (por ejemplo, R^2) pueden ser compuestos citotóxicos tipo maitansinoides que pueden tener efectos secundarios indeseables cuando se suministran sistémicamente debido a su posible efecto deletéreo en el tejido normal. Los agentes dirigidos a microtúbulos de molécula pequeña incluyen, pero no se limitan a, maitansinoides, aclitaxel, docetaxel, epotilonas, discodermolida, los vinca alcaloides, colquicina, combretastatinas, y derivados y análogos de los mencionados anteriormente. Los agentes dirigidos a microtúbulos se describen en Tangutur, A. D., *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2017 17(22): 2523-2537. Microtubule-targeting agents also include maytansinoids, such as maytansine (DM1) y derivatives y analogues thereof, which are described in Lopus, M, *Cancer Lett.*, 2011, 307(2): 113-118; y Widdison, W., *J. Med. Chem.* 2006, 49:4392-4408.

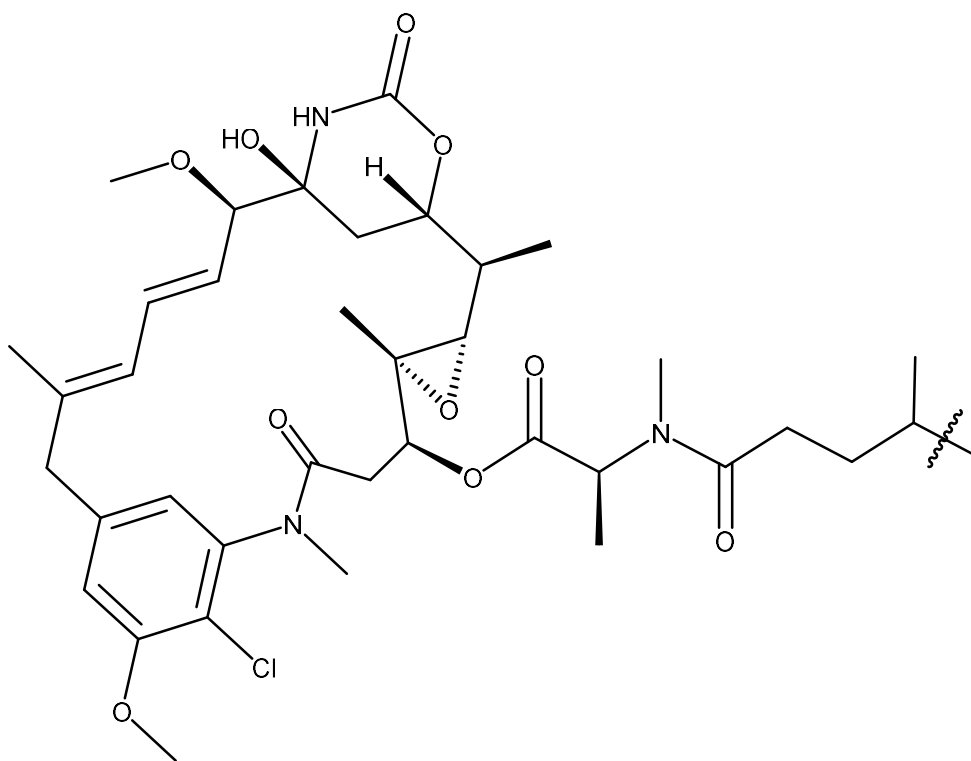
En algunas modalidades, R^2 es el siguiente grupo:

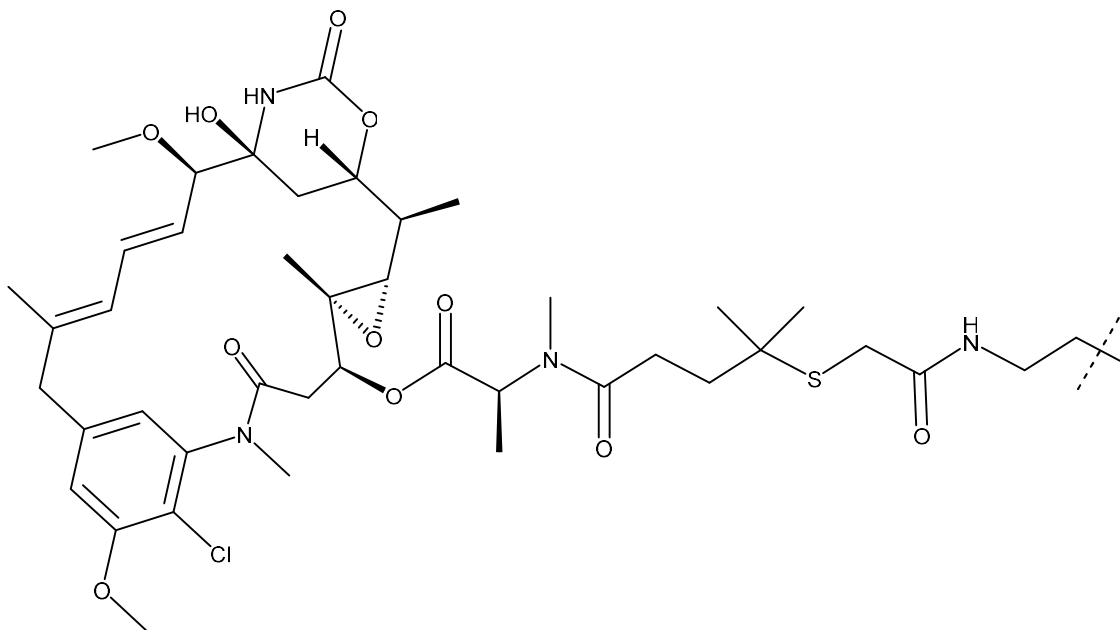


En algunas modalidades, R^2 es el siguiente grupo:



En algunas modalidades, R² es el siguiente grupo:



COC1=CC=C(C=C1C/C=C/C/C=C/C[C@H]2[C@@H](OC)[C@H](NC(=O)O2)C[C@H](C)[C@H](OC(=O)C[C@H](C)N(C)C(=O)CC[C@](C)(C)SCC(=O)N(C)CC)C(=O)N(C)C

- En algunas modalidades, L es una porción enlazante que conecta covalentemente R^1 y R^2 , y funciona para liberar una porción que contiene R^2 en la cercanía del tejido ácido o hipóxico, tal como dentro de una célula de tejido enfermo.

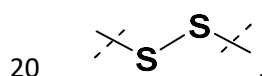
En algunas modalidades, L es una cadena enlazante de 1 a 40, 1 a 30, 1 a 25, 1 a 20, 1 a 15, 1 a 10, o 1 a 5 átomos en la cadena (incluyendo tanto carbono como heteroátomos), que es opcionalmente sustituido con sustituyentes 1-10 R^q, y en donde uno o más átomos de carbono de L se puede oxidar para formar 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, NH₂, halo, haloalquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆, haloalcoxi C₁₋₆, alquiltio C₁₋₆, fenilo, heteroarilo de 5-6 miembros, heterocicloalquilo de 4-6 miembros, cicloalquilo C₃₋₆, NH(alquilo C₁₋₆) y N(alquilo C₁₋₆)₂, en donde el alquilo C₁₋₆, fenilo, cicloalquilo C₃₋₆, heterocicloalquilo de 4-6 miembros, y heteroarilo de 5-6 miembros de R^q son cada uno opcionalmente sustituidos con halo, OH, CN, -COOH, NH₂, alquilo C₁₋₄, alcoxi C₁₋₄, haloalquilo C₁₋₄, haloalcoxi C₁₋₄, fenilo, cicloalquilo C₃₋₁₀, heteroarilo de 5 o 6 miembros o heterocicloalquilo de 4-6 miembros; y

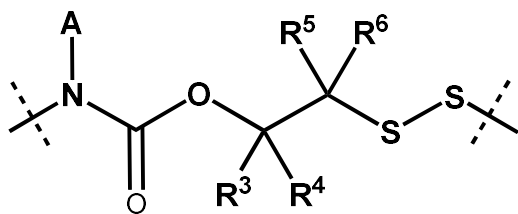
dos grupos R^q junto con los átomos en la cadena a los cuales se unen pueden formar un fenilo, heteroarilo de 5-6 miembros, heterocicloalquilo de 4-6 miembros, o anillo cicloalquilo C₃₋₆.

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.

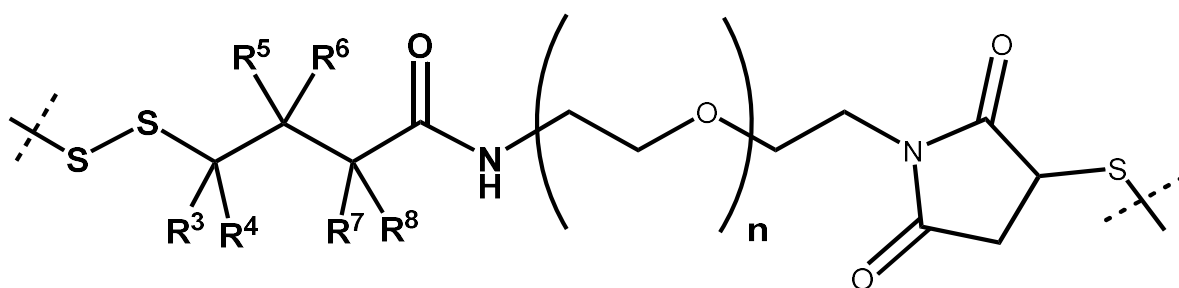
En algunas modalidades, L es el siguiente grupo:



En algunas modalidades, L es el siguiente grupo:

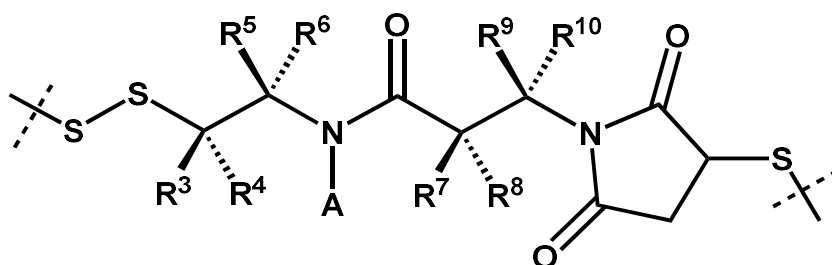


En algunas modalidades, L es el siguiente grupo:

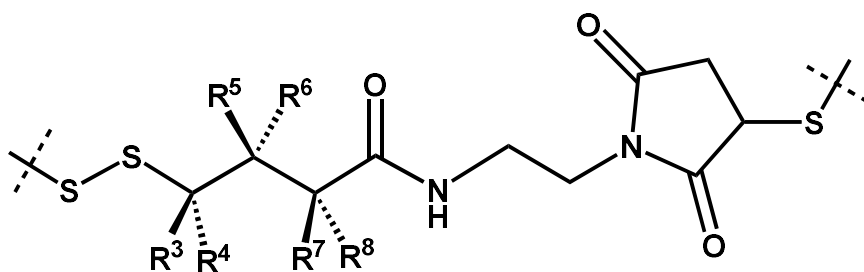


En algunas modalidades, n es 0. En algunas modalidades, n es 1. En algunas modalidades, n es 2.

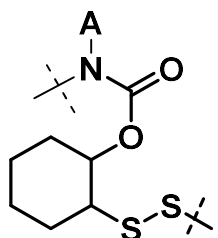
- 5 En algunas modalidades, L es el siguiente grupo:



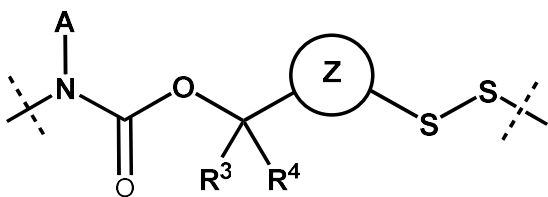
En algunas modalidades, L es el siguiente grupo:



En algunas modalidades, L es el siguiente grupo:



En algunas modalidades, L es el siguiente grupo:



En algunas modalidades, R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , R^7 , R^8 , R^9 , y R^{10} son cada uno independientemente seleccionados a partir de H y alquilo C_{1-4} . En algunas modalidades, R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , R^7 , R^8 , R^9 , y R^{10} son cada uno H.

- 5 En algunas modalidades, R^3 y R^4 son cada uno independientemente seleccionados a partir de H y alquilo C_{1-4} . En algunas modalidades, R^3 y R^4 son cada uno H.

En algunas modalidades, R^5 y R^6 son cada uno independientemente seleccionados a partir de H y alquilo C_{1-4} . En algunas modalidades, R^5 y R^6 son cada uno H.

- 10 En algunas modalidades, R^7 y R^8 son cada uno independientemente seleccionados a partir de H y alquilo C_{1-4} . En algunas modalidades, R^7 y R^8 son cada uno H.

En algunas modalidades, R^9 y R^{10} son cada uno independientemente seleccionados a partir de H y alquilo C_{1-4} . En algunas modalidades, R^9 y R^{10} son cada uno H.

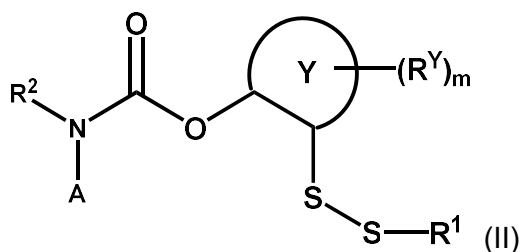
En algunas modalidades, A es H. En algunas modalidades, A es alquilo C_{1-4} . En algunas modalidades, A es CH_3 .

- 15 En algunas modalidades, Z es arilo C_{6-10} , opcionalmente sustituido con 1, 2, o 3 sustituyentes independientemente seleccionados 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 $NR^{c1}C(O)NR^{c1}R^{d1}$.

- 20 En algunas modalidades, Z es fenilo, opcionalmente sustituido con 1, 2, o 3 sustituyentes independientemente seleccionados 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 $NR^{c1}C(O)NR^{c1}R^{d1}$.

En algunas modalidades, Z es fenilo.

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



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

R¹ es un péptido;

R² es una porción dirigida a microtúbulo de molécula pequeña;

5 A es H o alquilo C₁₋₄;

El Anillo Y es un anillo cicloalquilo C₅₋₇ monocíclico o un anillo heterocicloalquilo de 5-7 miembros monocíclico;

10 cada R^Y se selecciona 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 dos R^Y adyacentes junto con los átomos a los cuales se unen forman un anillo cicloalquilo C₅₋₇ monocíclico fusionado, un anillo heterocicloalquilo de 5-7 miembros monocíclico fusionado, un anillo arilo C₆₋₁₀ 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 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 R^{a1}, R^{b1}, R^{c1}, y R^{d1} son cada uno seleccionados independientemente a partir de H, alquilo C₁₋₄, alquenilo C₂₋₄, alquinilo C₂₋₄, cada uno opcionalmente sustituido con 1, 2, o 3 sustituyentes seleccionados independientemente a partir de halo, OH, CN, y NO₂; y

m es 0, 1, 2, o 3.

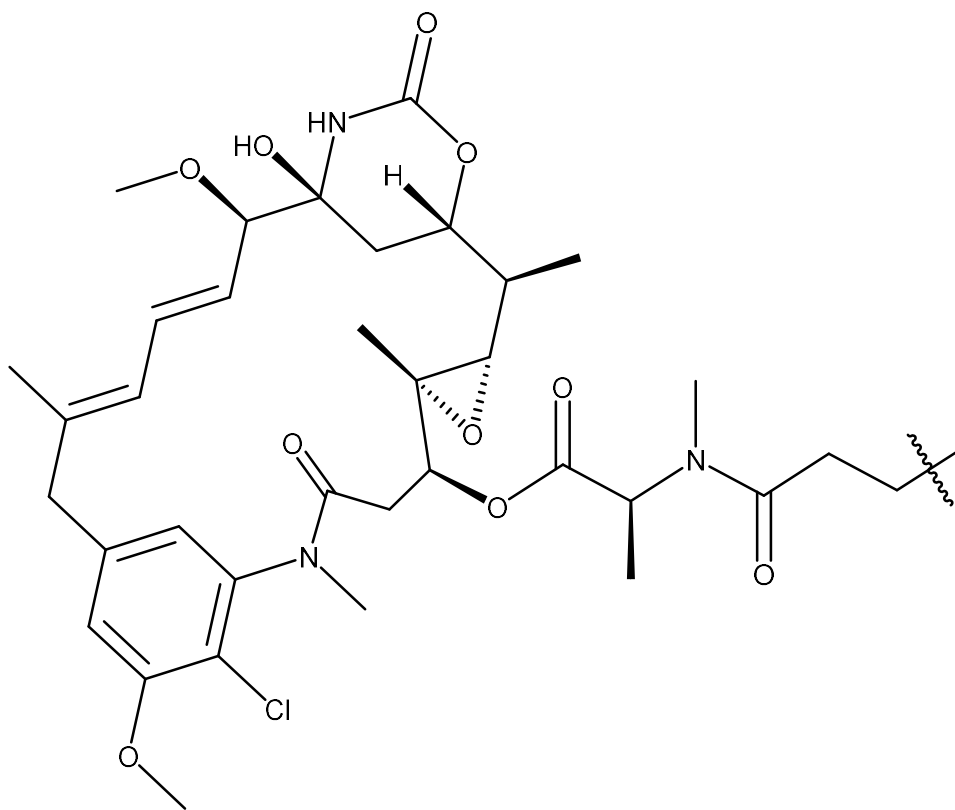
En algunas modalidades de los compuestos de Fórmula (II), R¹ es un péptido que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, o SEQ ID NO:5.

En algunas modalidades de los compuestos de Fórmula (II), R¹ es Pv1, Pv2, Pv3, Pv4, o Pv5.

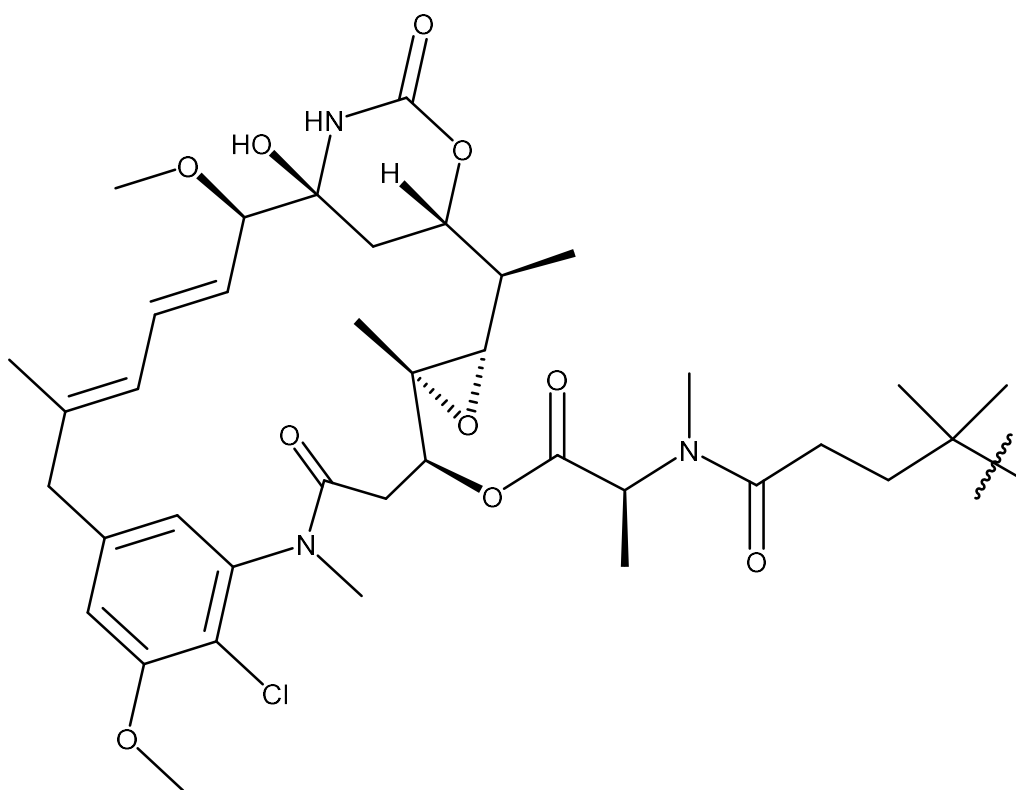
En algunas modalidades de los compuestos de Fórmula (II), R^1 se une al núcleo vía un residuo cisteína de R^1 en donde uno de los átomos de azufre de la porción de disulfuro en la Fórmula II se deriva del residuo cisteína.

- 5 En algunas modalidades de los compuestos de Fórmula (II), R^2 es un maitansinoide. En algunas modalidades de la Fórmula (II), R^2 es DM1 o DM4. En algunas modalidades de la Fórmula (II), R^2 es DM1. En algunas modalidades de la Fórmula (II), R^2 es DM4.

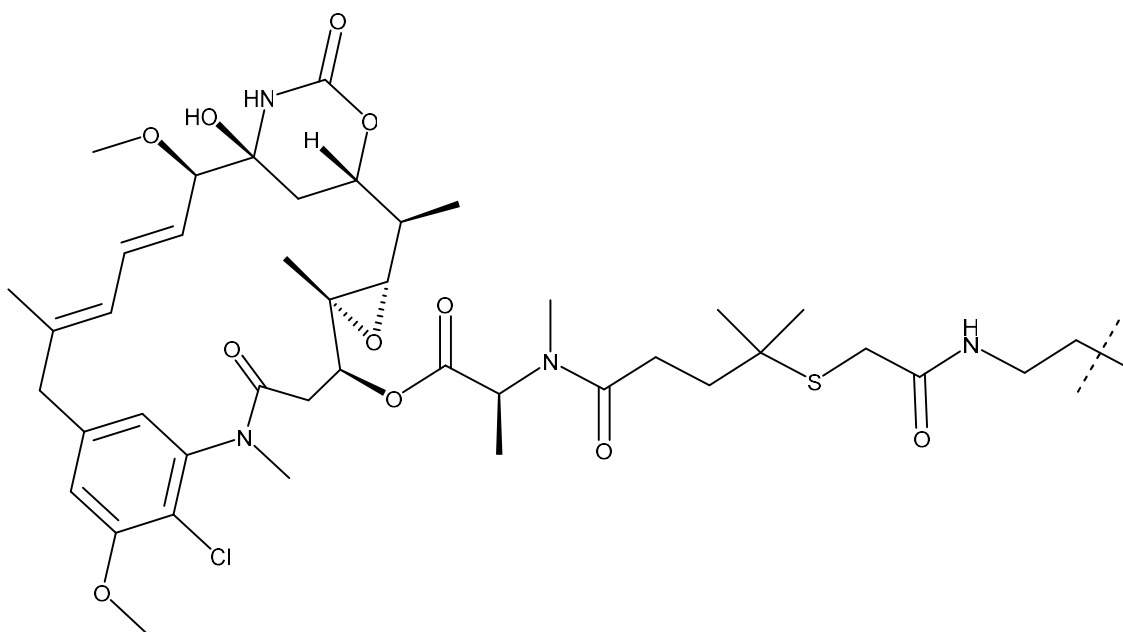
En algunas modalidades de los compuestos de Fórmula (II), R^2 es el siguiente grupo:



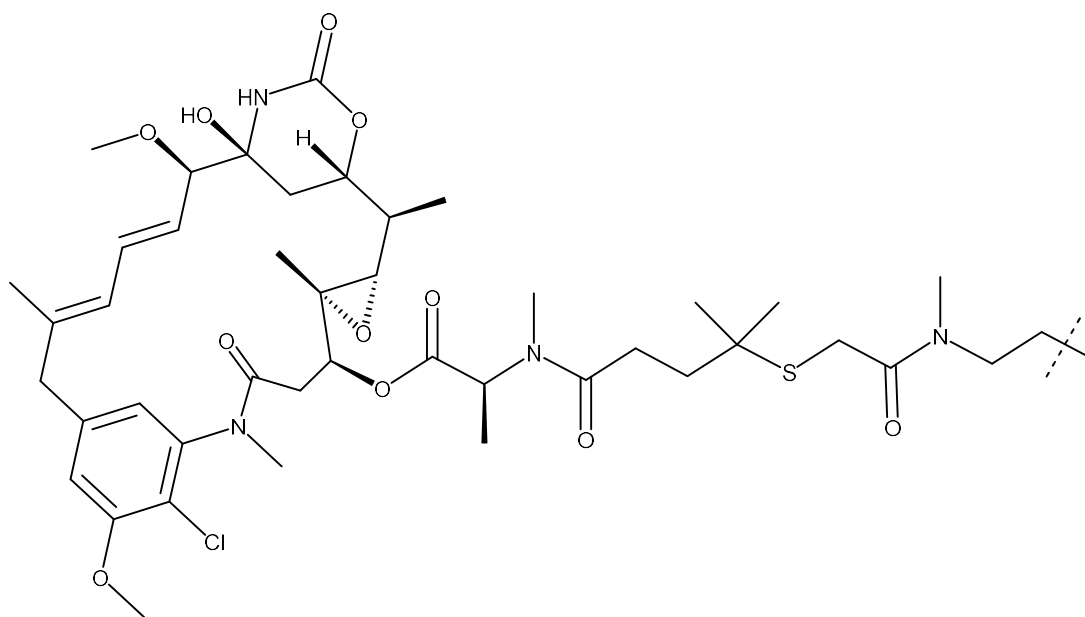
En algunas modalidades de los compuestos de Fórmula (II), R^2 es el siguiente grupo:



En algunas modalidades de los compuestos de Fórmula (II), R^2 es el siguiente grupo:



En algunas modalidades de los compuestos de Fórmula (II), R^2 es el siguiente grupo:



En algunas modalidades de los compuestos de Fórmula (II), A es H. En algunas modalidades de los compuestos de Fórmula (II), A es alquilo C_{1-4} . En algunas modalidades de los compuestos de Fórmula (II), A es CH_3 .

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

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

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

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

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

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

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

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

En algunas modalidades de los compuestos de Fórmula (II), dos R^Y adyacentes junto con los

átomos a los cuales se unen forman un anillo cicloalquilo C₅₋₇ monocíclico fusionado, un anillo heterocicloalquilo de 5-7 miembros monocíclico fusionado, un anillo arilo C₆₋₁₀ 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 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}.

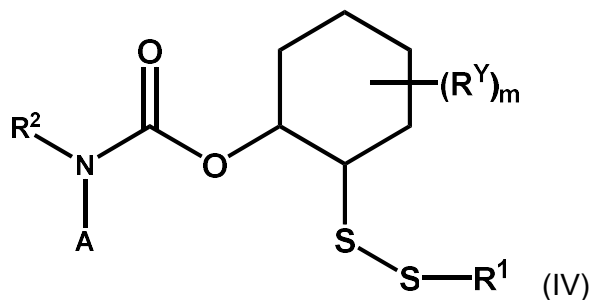
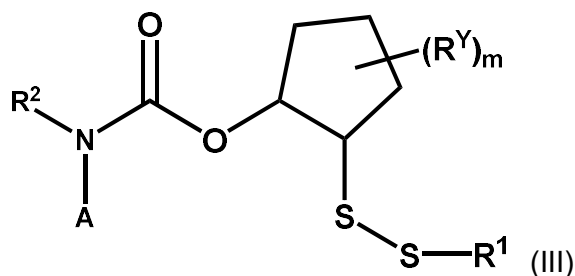
En algunas modalidades de los compuestos de Fórmula (II), m es 0.

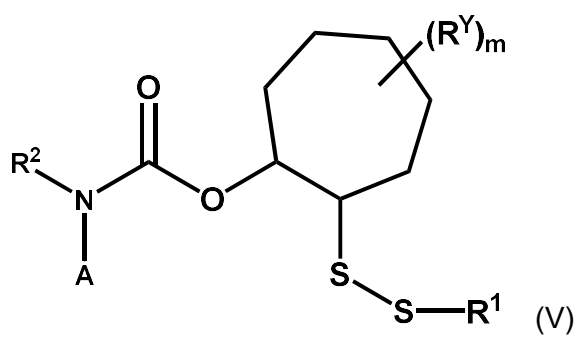
En algunas modalidades de los compuestos de Fórmula (II), m es 1.

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

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

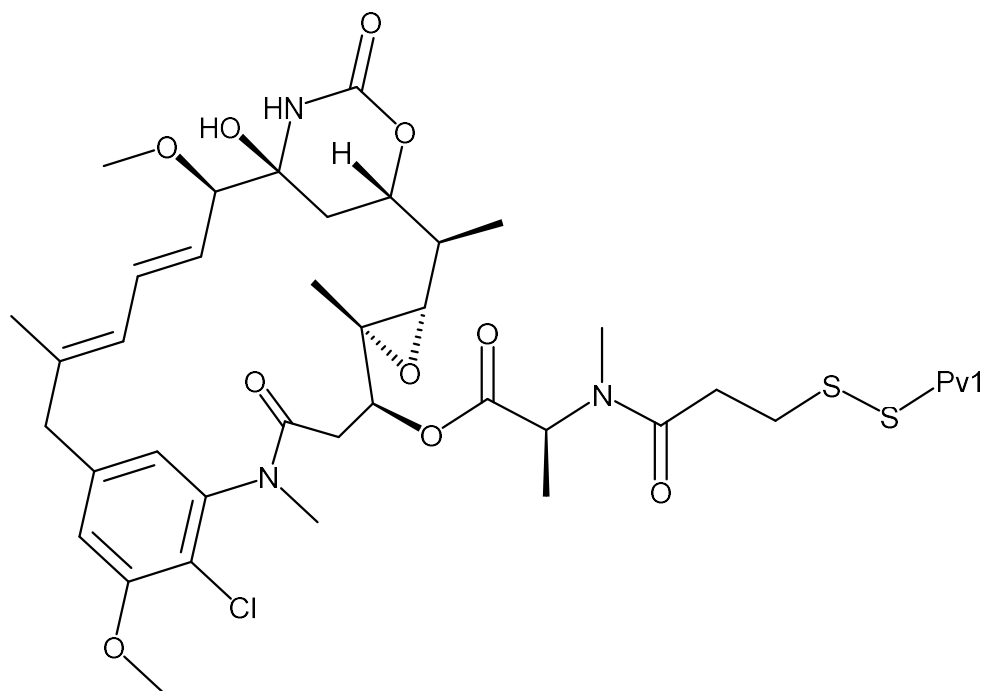
En algunas modalidades, los compuestos de la invención es un compuesto de Fórmula (III), Fórmula (IV), o Fórmula (V):

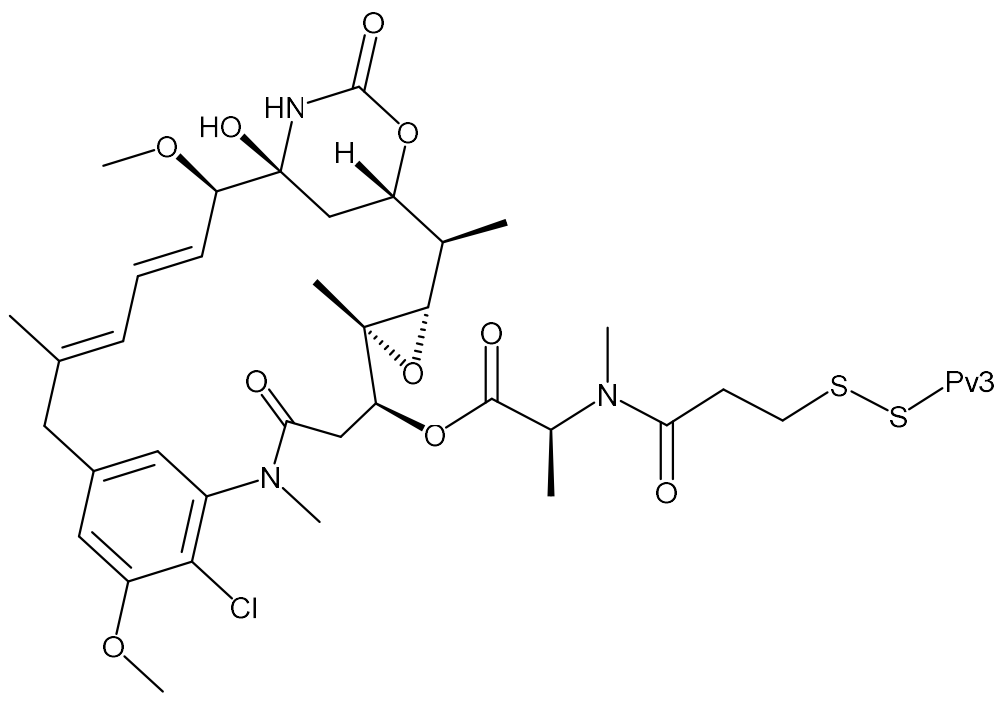
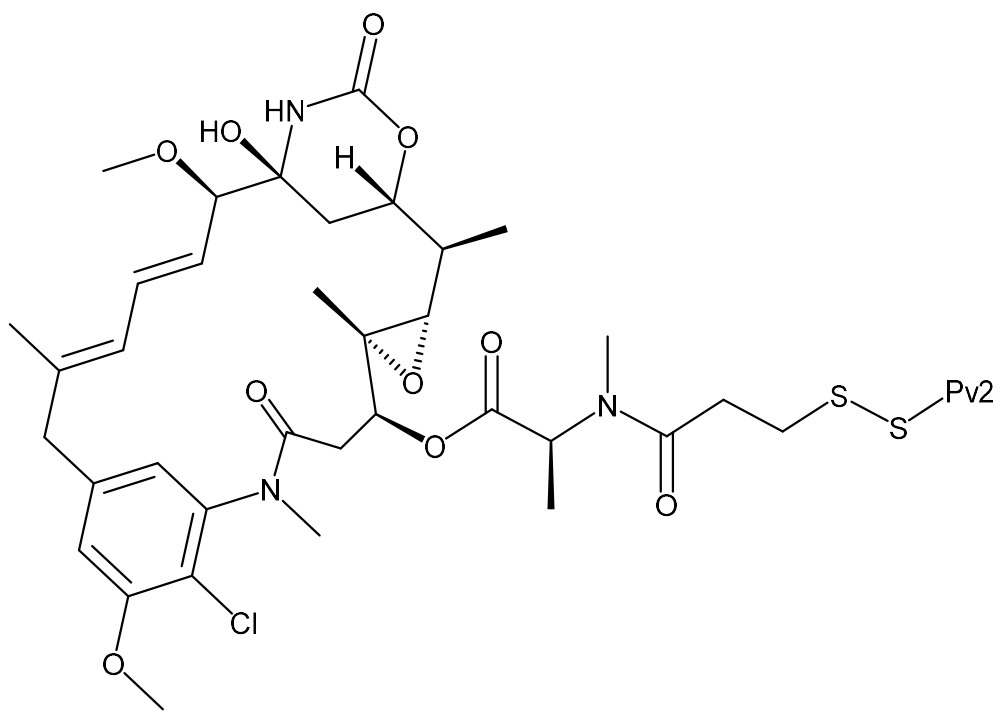


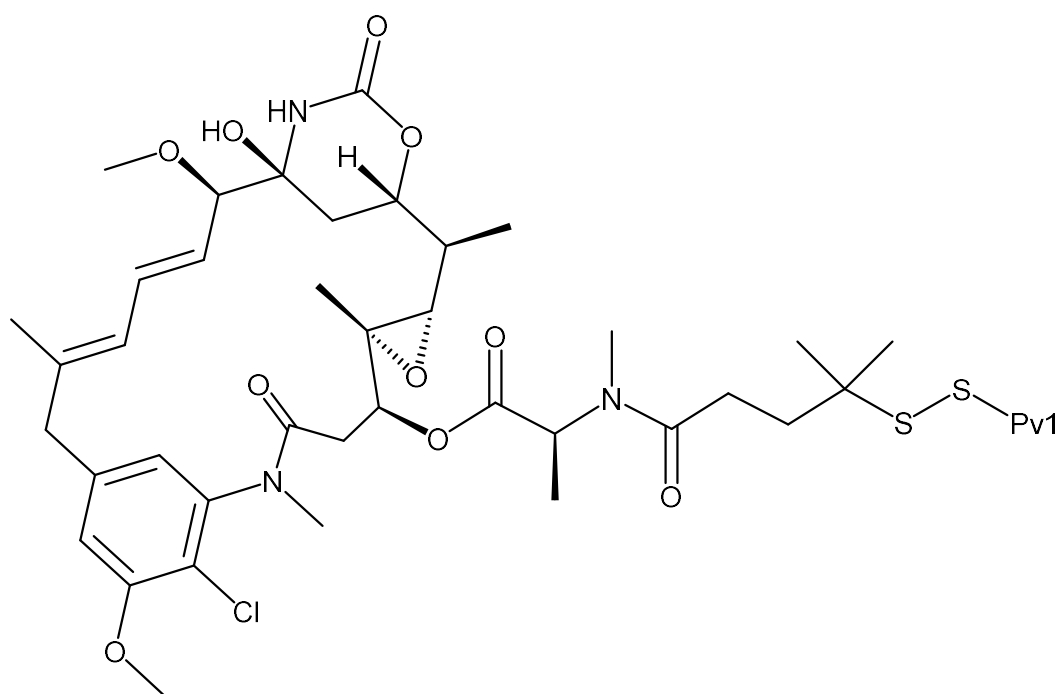
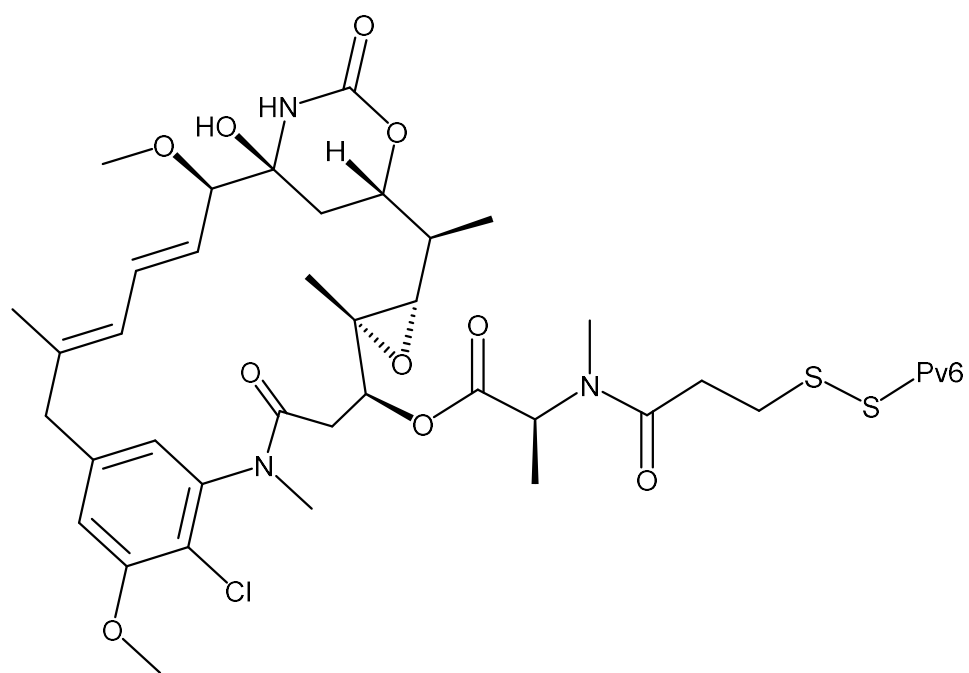


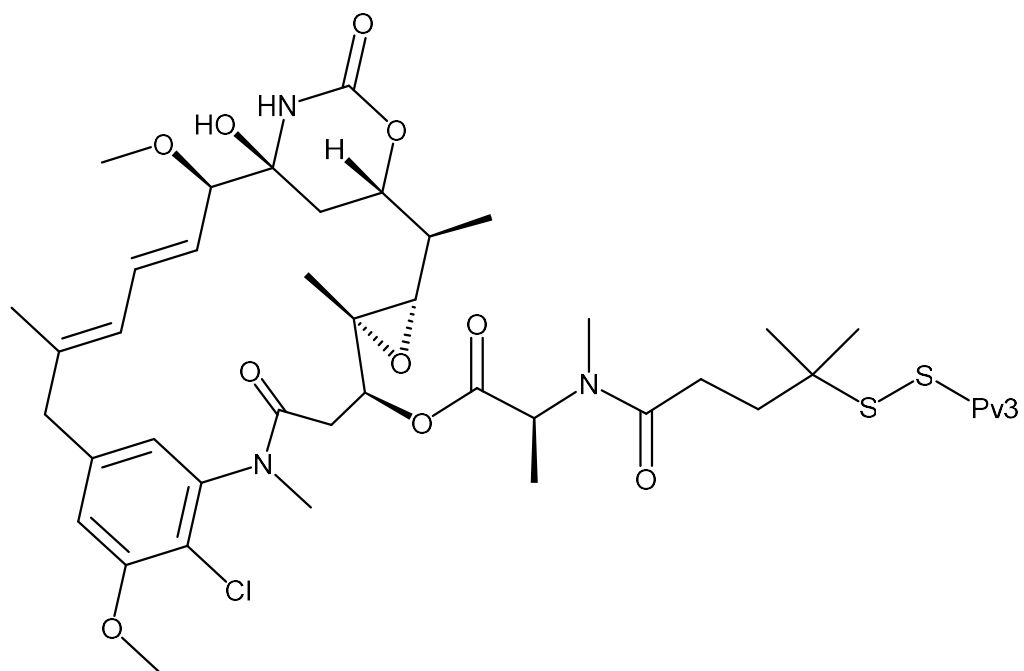
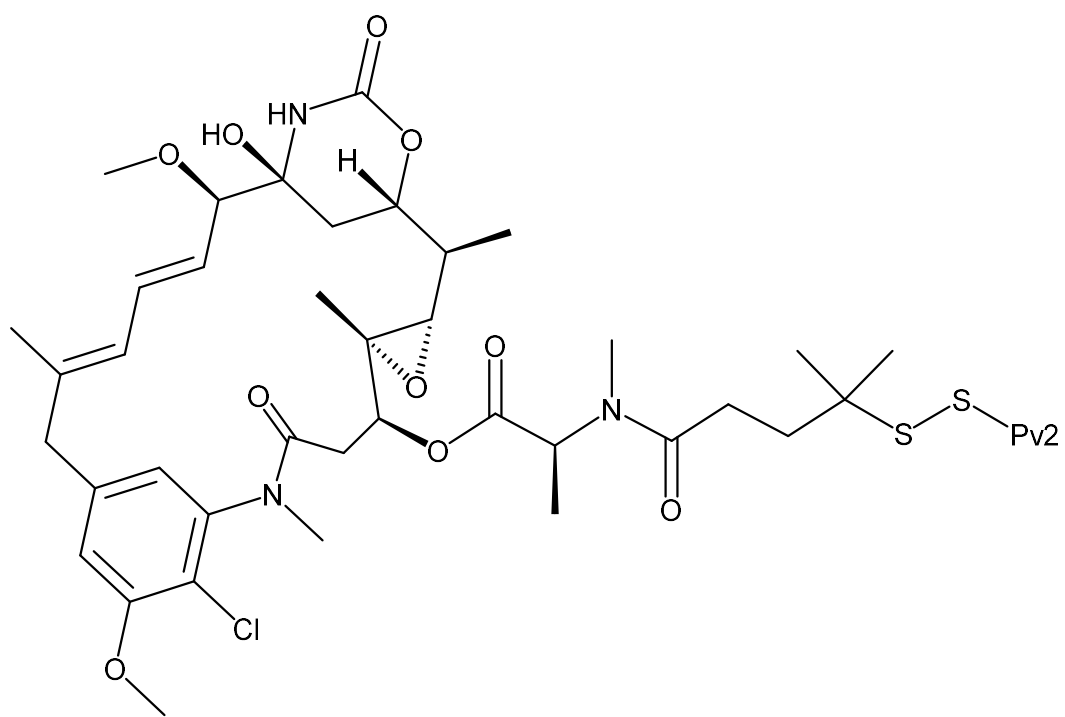
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde R^1 , R^2 , R^Y , A, y m se definen como en cualquiera de las modalidades anteriores para la Fórmula (II).

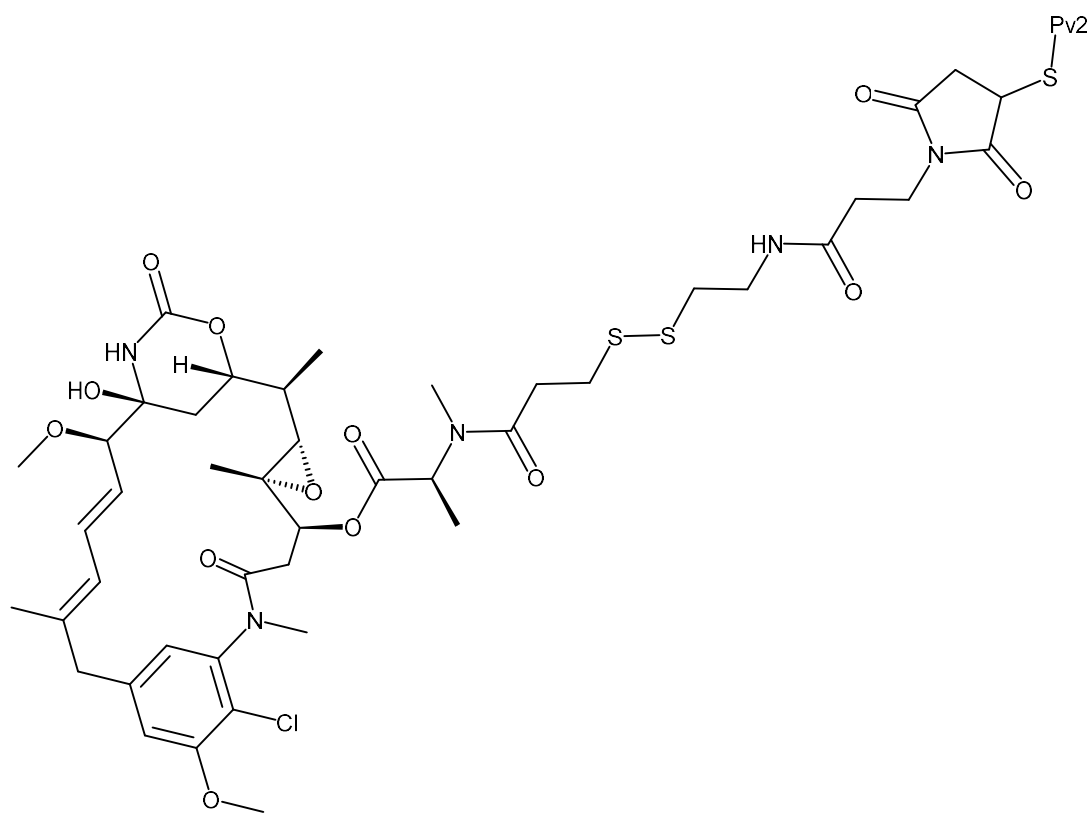
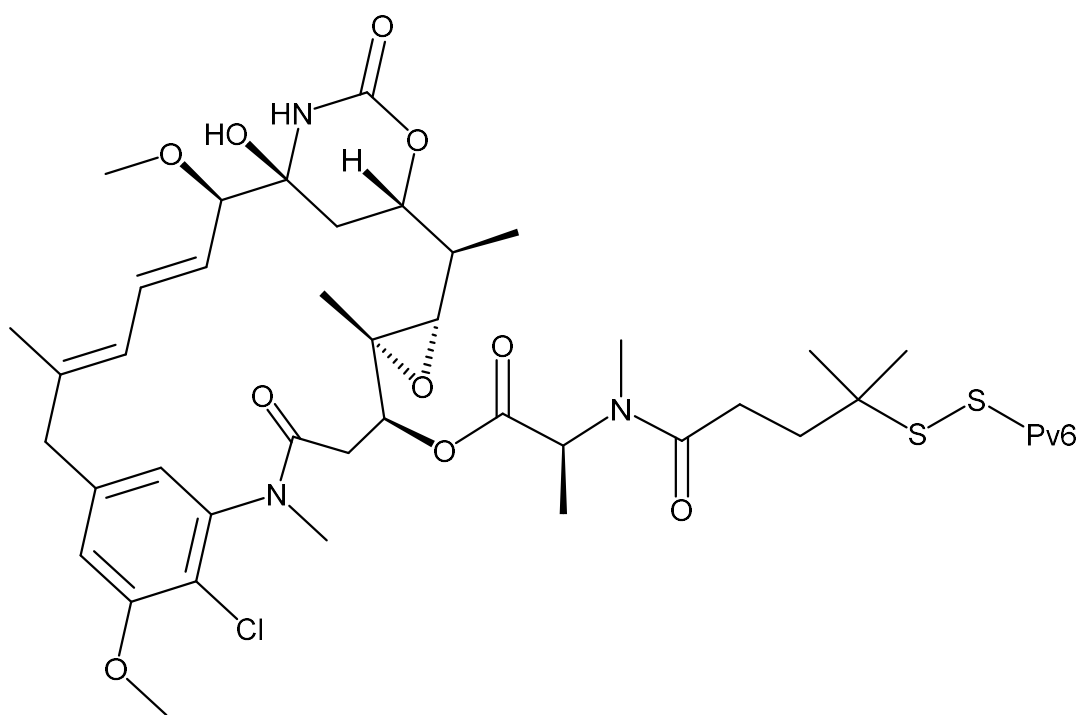
En algunas modalidades, el compuesto de Fórmula (I) se selecciona a partir de:





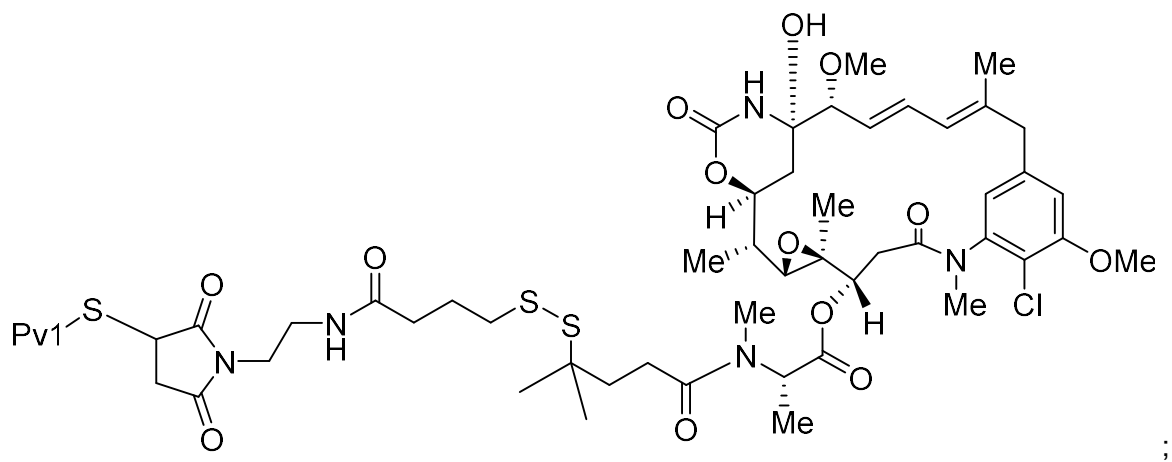
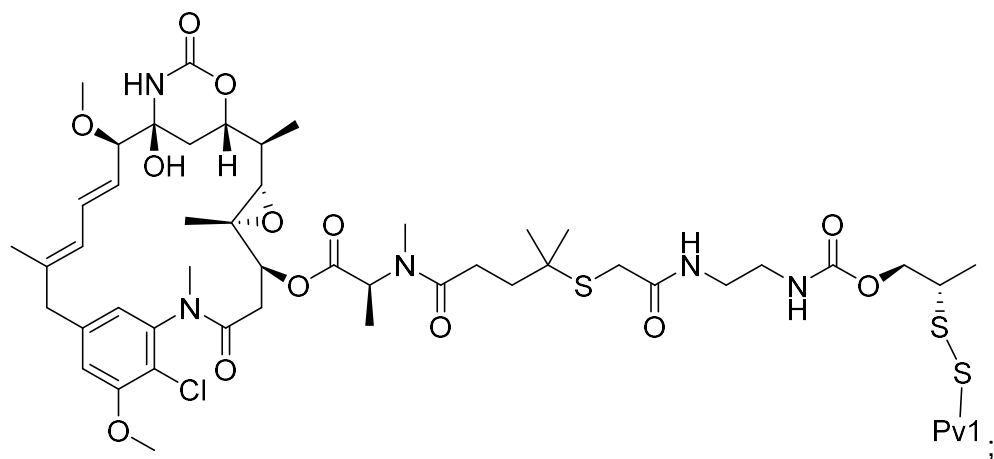


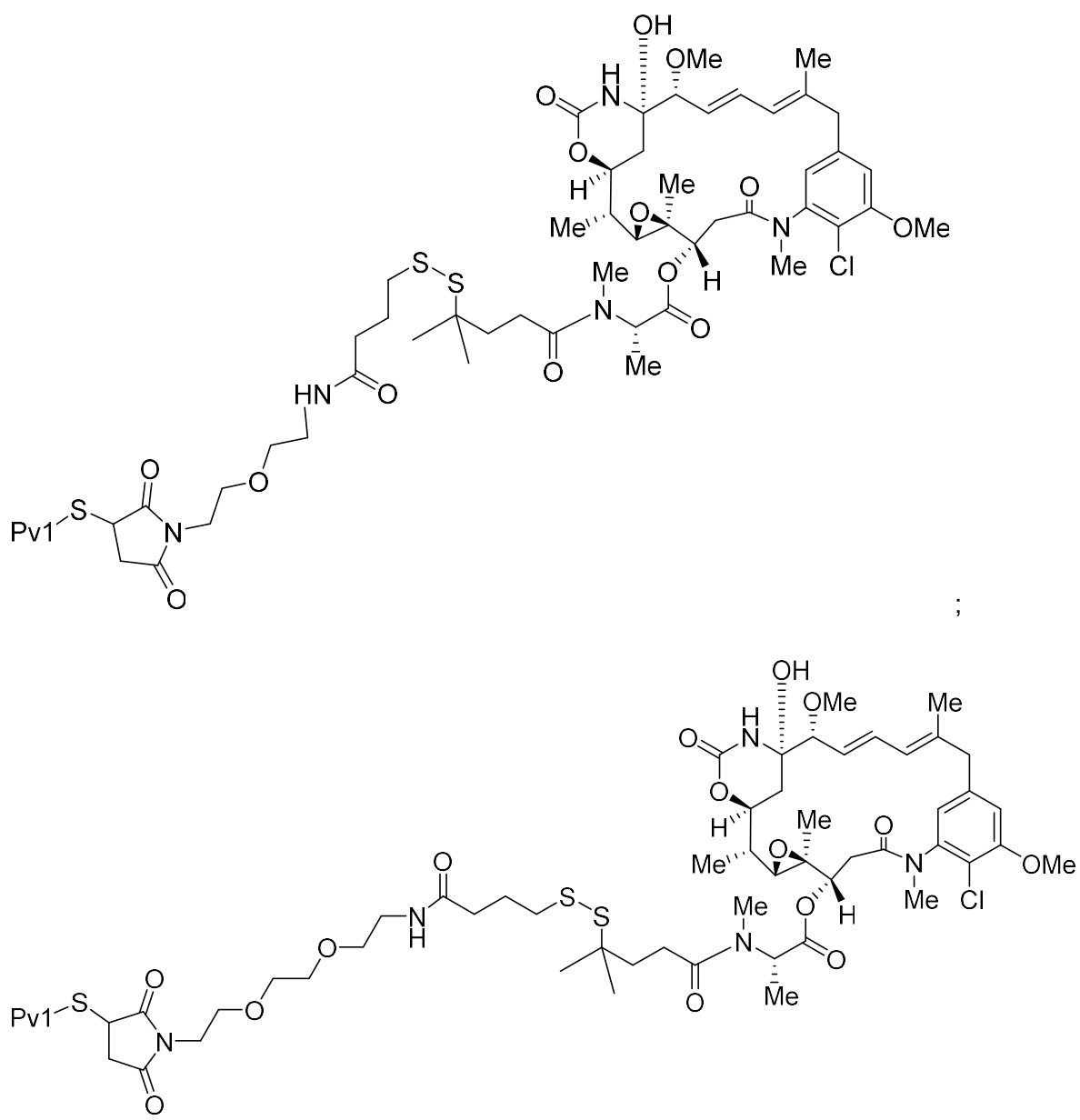


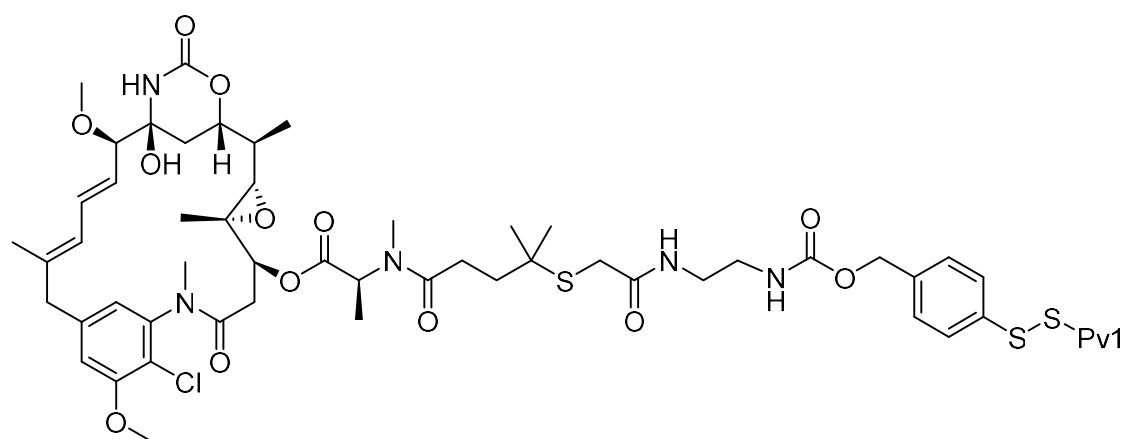
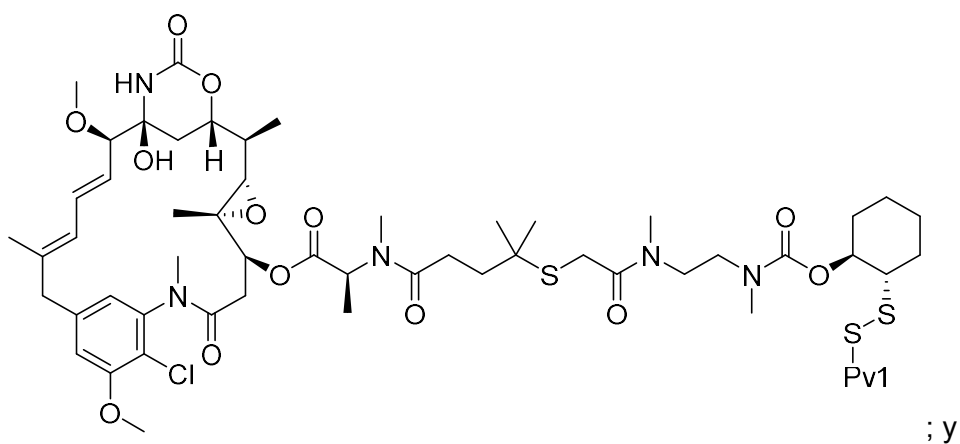
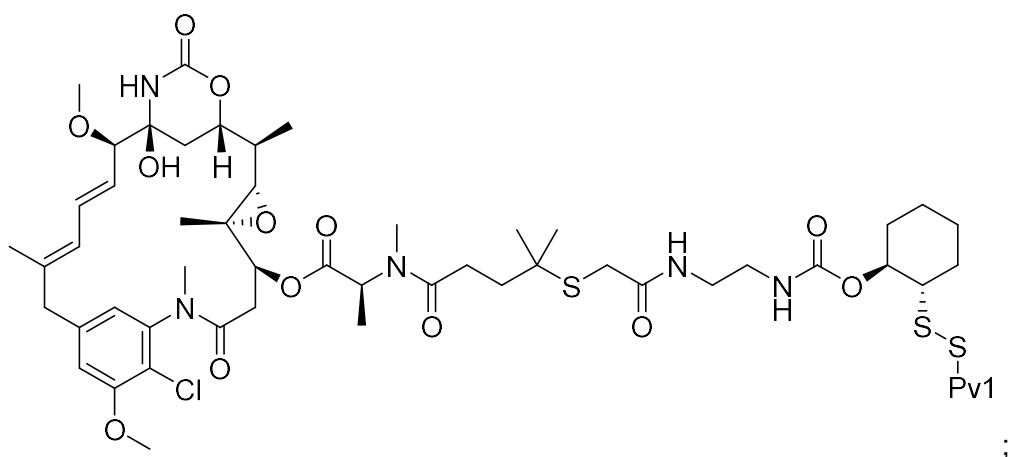


o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de los mencionados anteriormente.

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

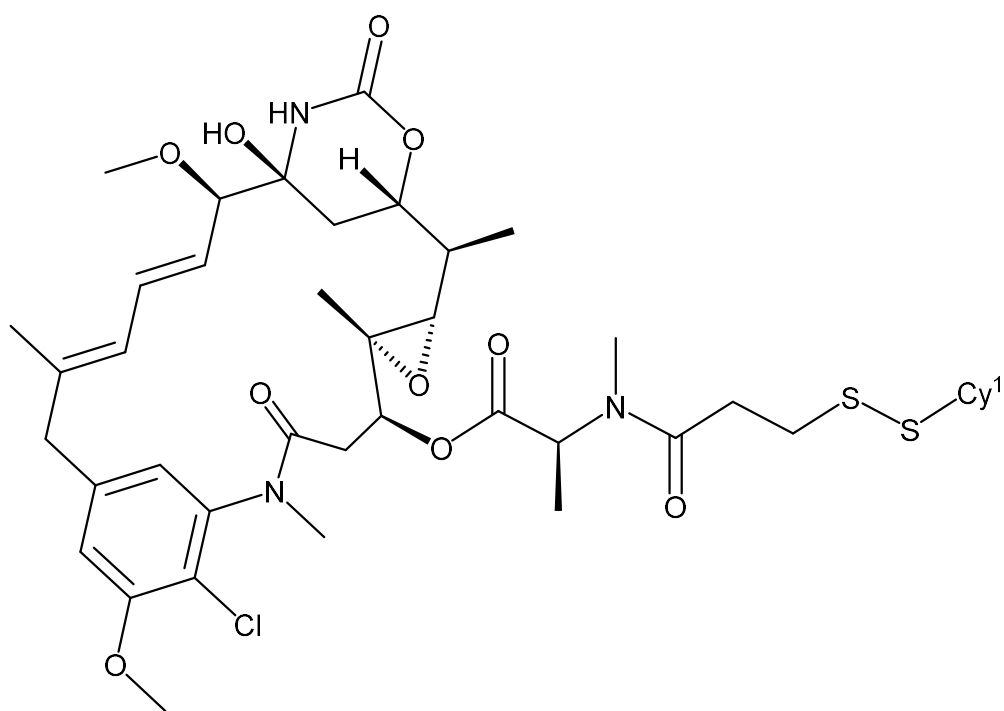






o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de los mencionados anteriormente.

- 5 En algunas modalidades, En la presente se proporciona un compuesto que tiene la Fórmula (I-A):

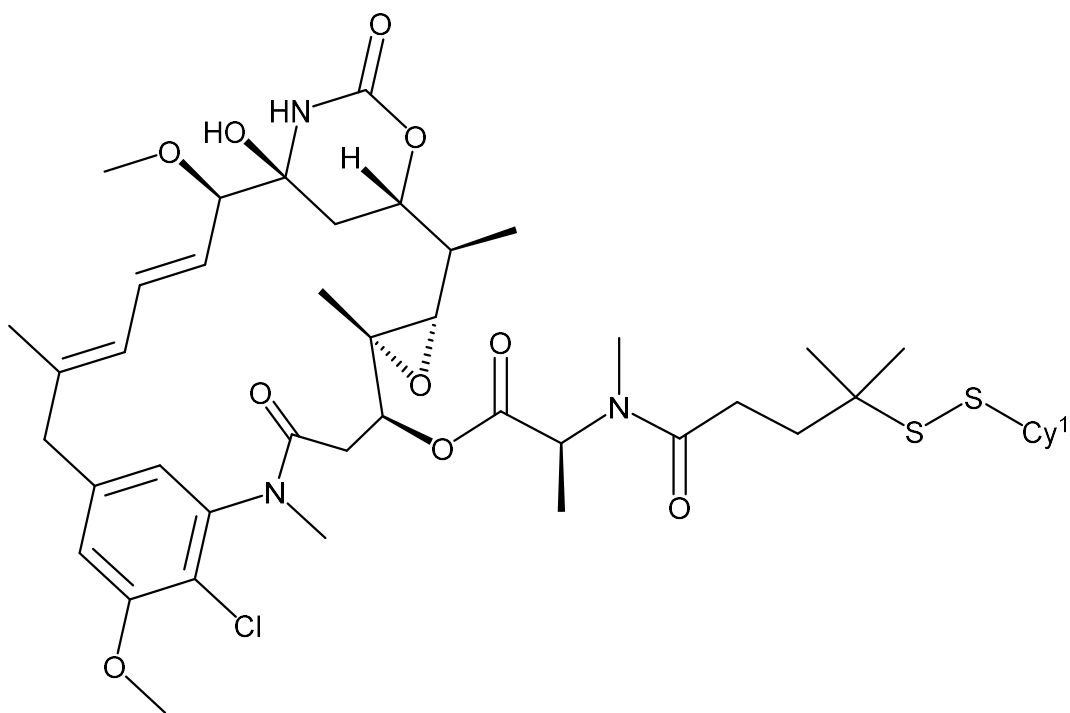


(I-A),

o una sal del mismo, en donde:

Cy¹ es arilo C₆₋₁₀ o heteroarilo de 5-10 miembros. En algunas modalidades, Cy¹ es piridilo.

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



(I-B),
o una sal del mismo, en donde Cy¹ es arilo C₆₋₁₀ o heteroarilo de 5-10 miembros. En algunas modalidades, Cy¹ es piridilo.

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, el cual es el péptido de la SEQ ID NO. 1.

El término "Pv2" significa AEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADECG, el cual es el péptido de la SEQ ID NO. 2.

El término "Pv3" significa ADDQNPWRAYLDLLFPTDTLLLDLLWDADECG, el cual es el péptido de la SEQ ID NO. 3.

El término “Pv4” significa Ac-AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTKCG, el cual es el péptido de la SEQ ID NO. 4.

El término “Pv5” significa AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTC, el cual es el péptido de la SEQ ID NO. 5.

- 5 El término “Pv6” significa AAEQNPIYWWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTGCG, el cual es el péptido de la SEQ ID NO. 6. En los compuestos de la invención, los péptidos R¹ se unen al enlazador de disulfuro por una porción 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
10 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 R²L en la célula, después de lo cual la unión de disulfuro del enlazador se escinde para suministrar R²L libre (o R²L*, en donde L* es un producto de degradación). Dado
15 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.

Los términos “sensible al pH” o “dependiente del pH” como se usan en la presente para
20 referirse al péptido R¹ o al modo de inserción del péptido R¹ 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 membrana celular para insertar R²L en el interior de la
25 célula (y así suministrar R²H 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 R¹ forma una configuración helicoidal,
30 lo que facilita la inserción de la membrana.

El término “porción dirigida a microtúbulo de molécula pequeña” se refiere a un grupo químico

que se une a microtúbulos. La porción dirigida a microtúbulo de molécula pequeña puede ser un grupo derivado de un compuesto que inhibe la actividad de los microtúbulos. Por ejemplo, la porción dirigida a microtúbulo de molécula pequeña puede suprimir la estabilidad dinámica de los microtúbulos. En algunas modalidades, la porción dirigida a microtúbulo de molécula pequeña tiene un peso molecular (DA) de aproximadamente 100-1500, aproximadamente 100-800, aproximadamente 500-1,000, aproximadamente 600-1,000, aproximadamente 100-500, aproximadamente 700-900, o aproximadamente 250-500.

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 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 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 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, -NR(CR'R'')_n- incluye tanto -NR(CR'R'')_n- como -(CR'R'')_nNR- 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 alquilenos o arilenos, respectivamente.

- 5 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
- 10 químicamente accesible. 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
- 15 reemplazar dos átomos de hidrógeno.

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 C₁₋₄, C₁₋₆ 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}”
- 20 se refiere a un grupo alquilo que tiene n a m átomos de carbono. Un grupo alquilo corresponde formalmente a un alcano con un enlace C-H reemplazado por el punto de unión del grupo alquilo al resto del compuesto. En algunas modalidades, el grupo alquilo contiene 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
- 25 químicos tales como metilo, etilo, *n*-propilo, isopropilo, *n*-butilo, *terc*-butilo, isobutilo, *sec*-butilo; homólogos superiores tales como 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
- 30 uno o más enlaces dobles carbono-carbono. Un grupo alquenilo corresponde formalmente a un alqueno con un enlace C-H reemplazado por el punto de unión del grupo alquenilo al resto del compuesto. El término “alquenilo C_{n-m}” se refiere a un grupo alquenilo que tiene n a m

carbonos. En algunas modalidades, la porción alqueno contiene 2 a 6, 2 a 4 o 2 a 3 átomos de carbono. Los grupos alqueno ejemplares incluyen, pero no se limitan a, etenilo, *n*-propenilo, isopropenilo, *n*-butenilo, *sec*-butenilo y similares.

El término “alquino” 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 alquino 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 “alquino C_{n-m} ” se refiere a un grupo alquino que tiene *n* a *m* carbonos. Los grupos alquino ejemplares incluyen, pero no se limitan a, etinilo, propin-1-ilo, propin-2-ilo y similares. En algunas modalidades, la porción alquino contiene 2 a 6, 2 a 4 o 2 a 3 átomos de carbono.

El término “alqueno”, empleado solo o en combinación con otros términos, se refiere a un grupo de enlace alquilo divalente. Un grupo alqueno corresponde formalmente a un alcano con dos enlaces C-H reemplazados por puntos de unión del grupo alqueno al resto del compuesto. El término “alqueno C_{n-m} ” se refiere a un grupo alqueno que tiene *n* a *m* átomos de carbono. Los ejemplos de grupos alqueno 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 $-NH_2$.

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

El término “ciano” o “nitrilo” se refiere a un grupo de fórmula $-C\equiv N$, 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.

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 $\{2(n - m) + 1\}$ átomos de halógeno, que pueden ser iguales o

diferentes. En algunas modalidades, los átomos de halógeno son átomos de fluro. En algunas modalidades, el grupo haloalquilo tiene 1 a 6 o 1 a 4 átomos de carbono. Los grupos haloalquilo ejemplares incluyen CF_3 , C_2F_5 , CHF_2 , CH_2F , CCl_3 , CHCl_2 , C_2Cl_5 y similares. En algunas modalidades, el grupo haloalquilo es un grupo fluoroalquilo.

- 5 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.

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).

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

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

- 20 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 (pi) deslocalizados $(4n + 2)$ donde n es un número entero).

- 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.

- 30 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 miembros o diez miembros.
- 15 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.

- 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.
- 20

- 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 (C₃₋₇). 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 C₃₋₆ 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
- 25
- 30

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.

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 alquilenilo como parte de la estructura del anillo, que tiene al menos un miembro del anillo heteroátomo seleccionado independientemente de nitrógeno, azufre, oxígeno y fósforo, y que tiene 4-10 miembros 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 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; morfolinilo; azetidinilo; tetrahidrofuranoilo,

tetrahidropiraniilo, 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 α -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*, 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*), 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 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 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 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 y 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 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).

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.

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, 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 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%, 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 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 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, y Use*, (Wiley, 2002). En algunas modalidades, los compuestos descritos en la presente incluyen las formas de N-óxido.

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

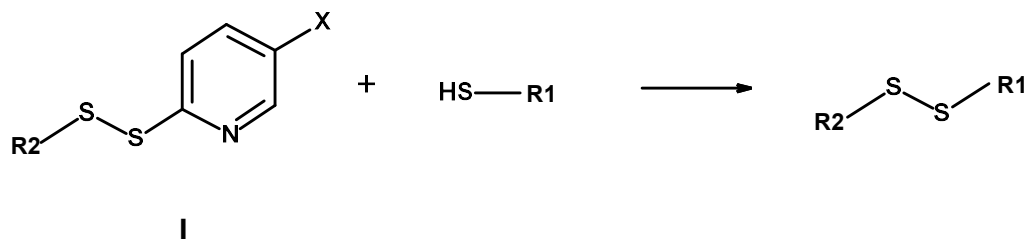
Las reacciones se pueden monitorear de acuerdo con cualquier método adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, la formación de productos se puede monitorear por medios espectroscópicos, tal como espectroscopia de resonancia magnética nuclear (*por ejemplo*, ^1H o ^{13}C), espectroscopia infrarroja, 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.

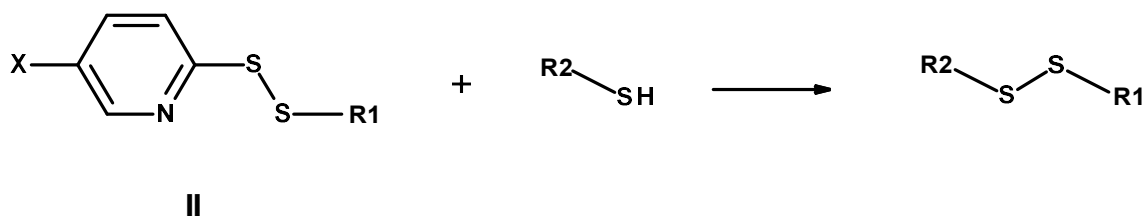
Esquema de reacción 1: Síntesis de Conjugados Directos



- 5 Una porción dirigida a microtúbulo de molécula pequeña que contiene un tio inherente (R^2 -SH), tal como DM1 o DM4, se puede activar por la formación de disulfuro de piridilo (en donde X es, por ejemplo, H, halo, etc.), que se puede desplazar con un péptido R^1 que contiene tior en una reacción de intercambio de disulfuro para producir el conjugado deseado donde -S-S- es la porción enlazante L.

10

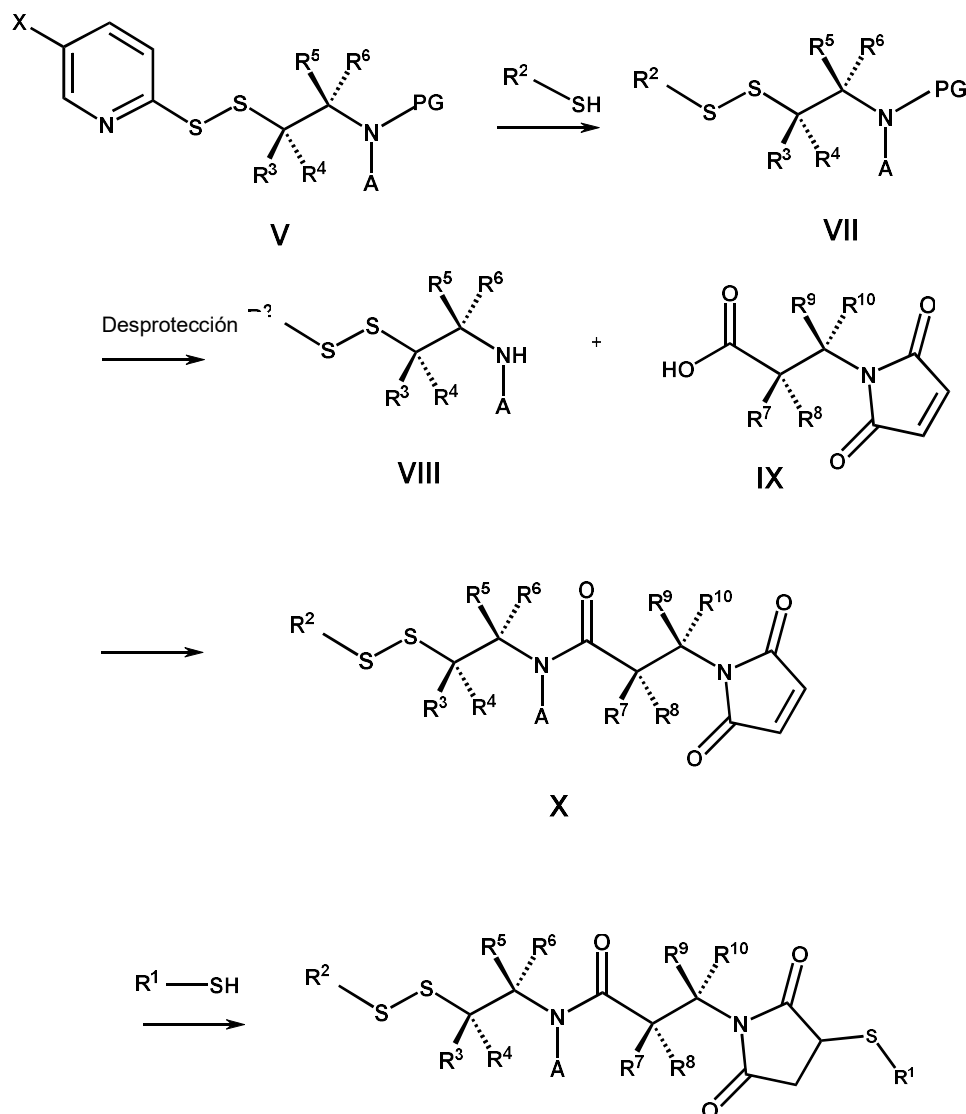
Esquema de reacción 2: Síntesis de Conjugados Directos



- 15 Alternativamente, el péptido R^1 , que tiene un tior inherente, se puede activar por la formación de disulfuro de piridilo (II) que se puede desplazar con un R^2 que contiene tior en una reacción de intercambio de disulfuro para producir el conjugado directo deseado donde L es -S-S-.

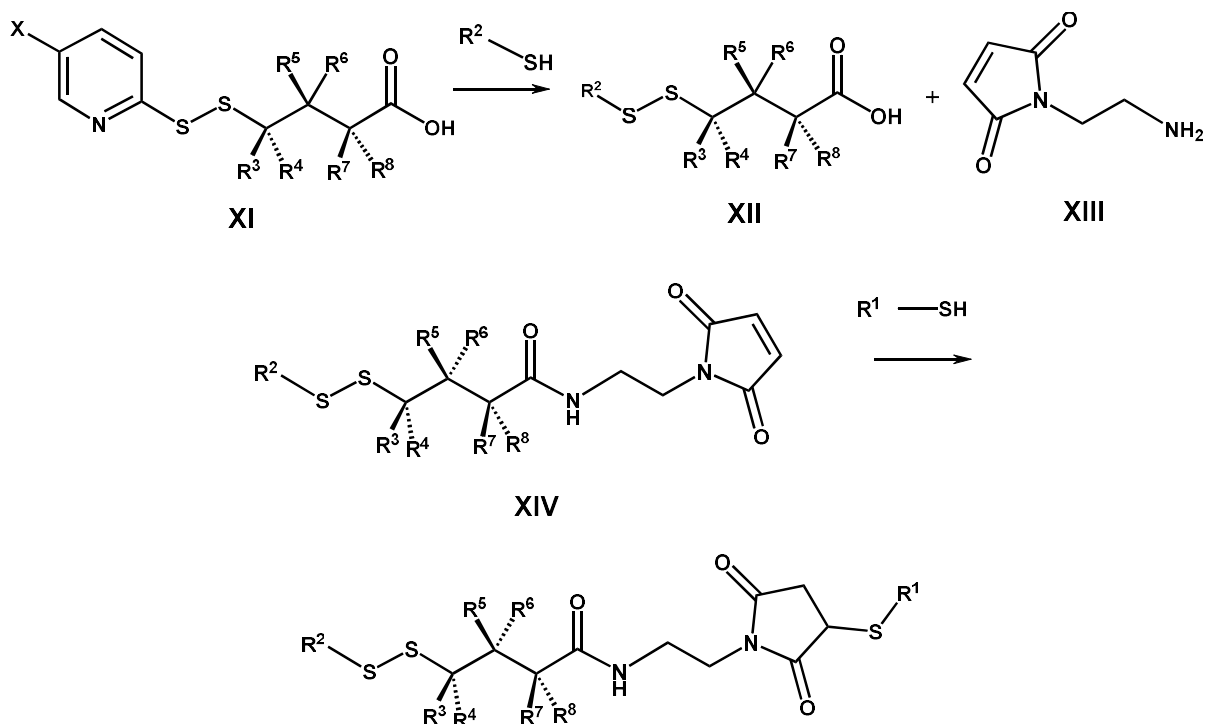
20

Esquema de reacción 3: Síntesis de Conjugados de Tioetil Amina Amida



Una etil amina protegida, que contiene un grupo tiol que se ha activado como disulfuro de piridilo V se puede hacer reaccionar con R^2 que contiene tiol en una reacción de intercambio de disulfuro para producir VII. El disulfuro VII se puede desproteger para producir VIII y hacer reaccionar adicionalmente con una maleimida propiónica IX en una reacción de acoplamiento de ácido para proporcionar la amida X. La amida X se puede hacer reaccionar con un péptido que contiene tiol en una adición de Michael para producir el conjugado deseado.

Esquema de reacción 4: Síntesis de Conjugados de Amida Tiobutíricos



Un ácido butírico que contiene tiol que se ha activado como un disulfuro de piridilo XI se puede hacer reaccionar con R^2 que contiene tiol en una reacción de intercambio de disulfuro para producir XII. El ácido disulfuro XII se puede hacer reaccionar con etilaminomaleimida XIII en una reacción de acoplamiento de ácido para proporcionar la amida XIV. La amida XIV se puede hacer reaccionar con un péptido que contiene tiol en una adición de Michael para producir el conjugado deseado.

Los péptidos R^1 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.

- 5 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.

10

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
- 15 enfermedades que involucran tejido enfermo ácido o hipóxico, tal como cáncer. 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 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
 - 20 célula. Como consecuencia de esta exportación de iones de hidrógeno, las células cancerosas 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 eficacia e índice terapéutico de agentes citotóxicos es aprovechar esta característica fisiológica para proporcionar el suministro selectivo del compuesto a las células
 - 25 hipóxicas sobre el tejido sano.

- En estos métodos de tratamiento, 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 citotóxicos en el caso del cáncer. En la terapia de combinación, el
- 30 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.

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, 5
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, cáncer de endometrio, carcinoma de cuello uterino, carcinoma de 10
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, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, 15
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, incluyendo los inducidos por asbestos, 20
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 25
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 30
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.

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 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 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 agente dirigido a microtúbulo correspondiente (por ejemplo, R²-H).

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, clormetina, ciclofosfamida (CytosanTM), ifosfamida, melfalán, clorambucilo, pipobromano, trietilen-melamina, trietilenotiofosforamina, busulfán, carmustina, lomustina, estreptoizocina,

dacarbazina, y temozolomida.

Otros agentes adecuados para usar en combinación con los compuestos de la presente invención incluyen: dacarbazina (DTIC), opcionalmente, junto con otros fármacos de quimioterapia tales como carmustina (BCNU) y cisplatino; el “régimen de Dartmouth”, que
 5 consiste en DTIC, BCNU, cisplatino y tamoxifeno; una combinación de cisplatino, vinblastina y DTIC; o temozolomida. Los compuestos de acuerdo con la invención también se pueden combinar con fármacos de inmunoterapia, incluyendo citocinas tales como interferón alfa, interleucina 2 y factor de necrosis tumoral (TNF).

Los agentes quimioterapéuticos u otros anticancerígenos adecuados incluyen, por ejemplo,
 10 antimetabolitos (que incluyen, sin limitación, antagonistas de ácido fólico, análogos de pirimidina, análogos de purina e inhibidores de adenosina desaminasa) tales como metotrexato, 5-fluorouracilo, floxuridina, citarabina, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, fosfato de fludarabina, pentostatina y gemcitabina.

Los agentes quimioterapéuticos adecuados u otros anticancerígenos incluyen además, por
 15 ejemplo, ciertos productos naturales y sus derivados (por ejemplo, vinca alcaloides, antibióticos antitumorales, enzimas, linfocinas y epipodofilotoxinas) tales como vinblastina, vincristina, vindesina, bleomicina, dactinomicina, daunorrubicina, doxorubicina, epirubicina, idarrubicina, ara-C, paclitaxel (TAXOL™), mitramicina, desoxicoformicina, mitomicina-C, L-asparaginasa, interferones (especialmente IFN- α), etopósido y tenipósido.

20 Otros agentes citotóxicos que se pueden administrar en combinación con los compuestos de la invención incluyen, por ejemplo, navelbeno, CPT-11, anastrozol, letrozol, capecitabina, reloxafina, ciclofosfamida, ifosamida y droloxafina.

También son adecuados agentes citotóxicos tales como, por ejemplo, epidofilotoxina; una
 25 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
 30 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.

- 5 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.

- 10 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®).

- 15 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).
- 20 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),
- 25 bloqueadores del receptor de andrógeno (por ejemplo, enzalutamida) y agentes que inhiben la producción de andrógenos (por ejemplo, abiraterona).

- 30 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, lapitinib 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.

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, 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 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 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 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, “µg/ml” (cantidad efectiva basada en ensayos de cultivo celular *in vitro*) = “mg/kg de peso corporal/día” (cantidad efectiva para un ratón). Además, la cantidad efectiva para un 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 reperfusión 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.

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.

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 es describir o reivindicar individualmente cada número posible que tal rango podría 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).

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 variedad de formas 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 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 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 y 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
- DIPEA: diisopropiletilamina
- DMA: dimetilacetamida
- 5 • DME: dimetoxietano
- DMF: dimetilformamida
- DMSO: metilsulfóxido
- DTT: ditioneol
- MSD: detector de espectrometría de masas
- 10 • Et₂O: éter etílico
- EtOAc: acetato de etilo
- EtOH: alcohol etílico
- HATU: hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio
- HOBt: 1-hidroxibenzotriazol
- 15 • RP: fase inversa
- HPLC: cromatografía líquida de alta resolución
- IPA: isopropanol
- LAH: hidruro de litio y aluminio
- N-BuLi: n-butil litio
- 20 • LC-MS: cromatografía líquida-espectrometría de masas
- LDA: diisopropiletilamida de litio
- Me: metilo
- MeOH: metanol
- MTBE: metil t-butil éter

- NMP: N-metilpirrolidina
- Ph: fenilo
- PNPC: para-nitrofenilcloroformiato
- RT o rt: temperatura ambiente
- 5 • SFC: cromatografía de fluidos supercríticos
- TBAI: yoduro de tetrabutilamonio
- TBME: terc-butilmetil éter
- tBu: butilo terciario
- THF: tetrahidrofurano
- 10 • TEA: trietilamina
- TMEDA: tetrametiletilendiamina
- GSH: Glutación
- GS: Glutación unido a azufre
- LiOH: hidróxido de litio
- 15 • DPPA: difenil fosforil azida
- $\text{Sn}(\text{Bu})_2(\text{laurato})_2$: dilaurato de dibutilestaño
- PBS: solución salina amortiguada con fosfato
- ACN: acetonitrilo
- AcOH: ácido acético
- 20 • EEDQ: *N*-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinolina
- DMAP: 4-dimetilaminopiridina
- EDC: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida

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.

D: Sunfire C18 150x4.6mm; H₂O/Acetonitrilo con modificador de AcOH (0.5%); Velocidad de flujo: 1ml/min; Longitud de onda = 217 nM

10 E: Sunfire C18 150x30mm; H₂O/Acetonitrilo con modificador de AcOH (0.5%); Velocidad de flujo: 30ml/min; Longitud de onda = 217 nM.

F: Sistemas Agilent 1100/1200/1260 o 1290 (acoplados o no acoplados con MS).

Parámetros de HPLC			
Fase Móvil A	0.1% AcOH en agua		
Fase Móvil B	0.1% AcOH en ACN		
Columna	Merck Chromolith RP-18e		
Temperatura de la Columna	rt		
Temperatura del Muestreador Automático	rt		
Volumen de Inyección	5 µl		
Velocidad de Flujo	1 ml/minuto		
Longitud de Onda	Detector de matriz de diodos Agilent a λ = 254, 220 o 280 nm		
Programa de Gradiente	Tiempo (min)	% de A	% de B
	Inicial	95.00	5.00
	4.00	5.00	95.00

	4.99	5.00	95.00
	5.00	95.00	5.00
	6.00	95.00	5.00
Tiempo de Corrida	6.00		

G: Sistemas Agilent 1100/1200/1260 o 1290 (acoplados o no acoplados con MS).

Parámetros de HPLC			
Fase Móvil A	0.1% TFA en agua		
Fase Móvil B	0.1% TFA en ACN		
Columna	Columna Agilent Eclipse XDB C8 (3.5 μ m, 4.6 x 150 mm)		
Temperatura de la Columna	40 °C		
Temperatura del Muestreador Automático	rt		
Volumen de Inyección	5 μ l		
Velocidad de Flujo	1.5 ml/minuto		
Longitud de Onda	Detector de matriz de diodos Agilent a λ = 254, 220 o 280 nm		
Programa de Gradiente	Tiempo (min)	% de A	% de B
	Inicial	80.00	20.00
	0.20	80.00	20.00
	7.50	20.00	80.00
	8.00	0.00	100.00
	9.00	0.00	100.00
	10.00	80.00	20.00
Tiempo de Corrida	10.00		

5 Métodos de Espectrometría de Masas

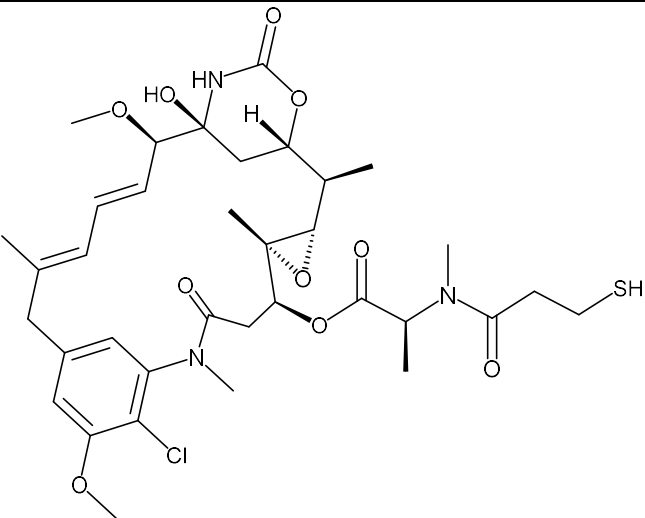
La espectrometría de masas Maldi-TOF (Desorción/ionización láser asistida por matriz –

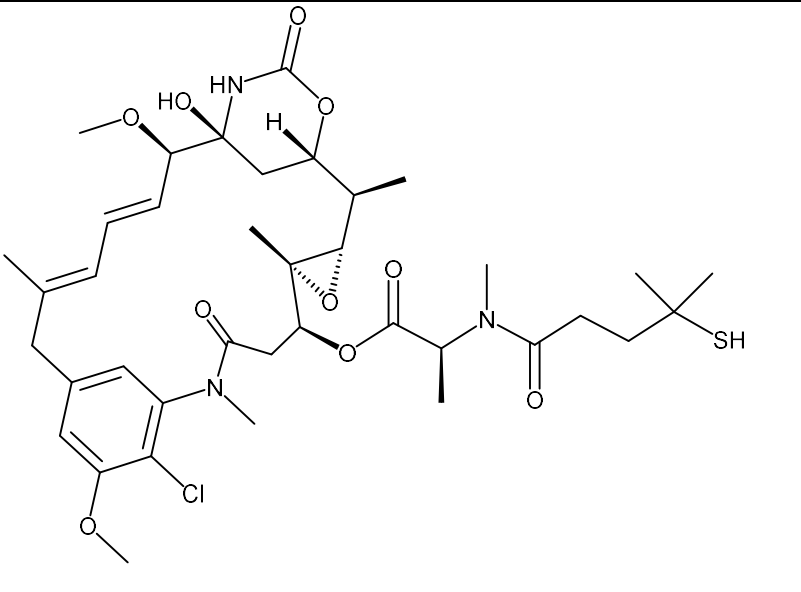
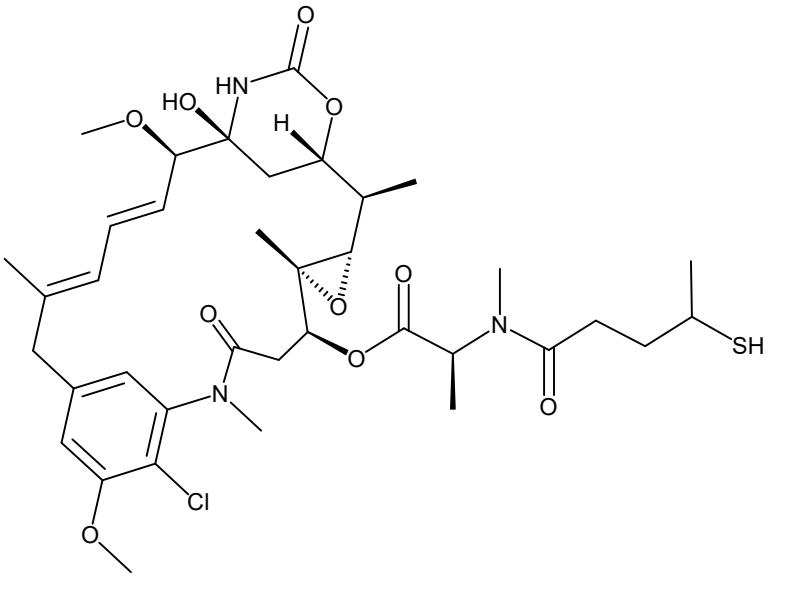
Tiempo de Vuelo) se midió en un Applied Biosystems Voyager System 6268. La muestra se preparó como una matriz de ácido α -ciano hidroxí cinámico en una placa AB Science (Pieza # V700666).

- 5 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 proporcionaron una masa/carga de especie ($m/z=3$).

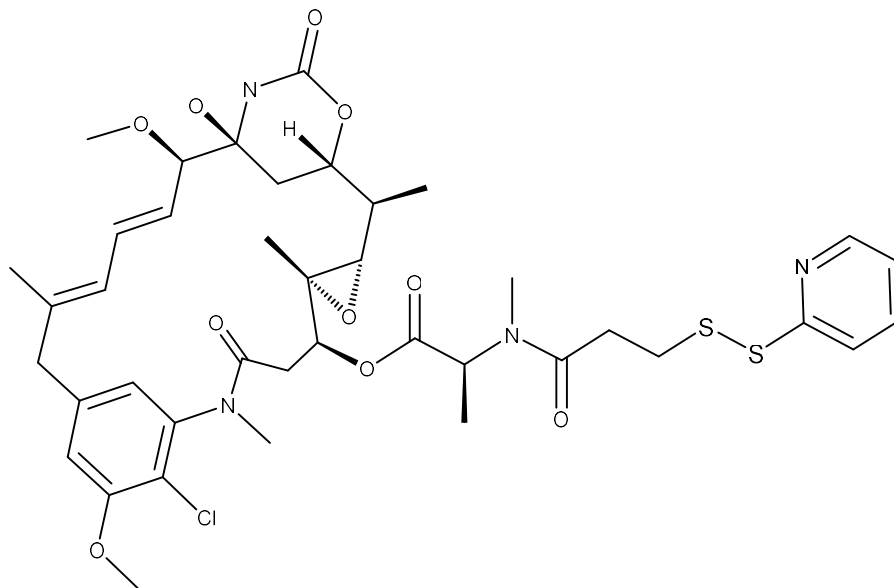
La fuente de los materiales de partida empleados en los Ejemplos se describe a continuación en las siguientes tablas.

10 Tabla 2. Materiales de partida para R²

Código de R ²	Estructura de R ² H	Síntesis, Referencia o Adquirido
R ² SH-1		MedKoo 123212

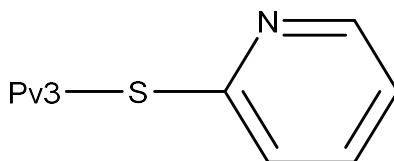
R ² SH-2	 The chemical structure of R²SH-2 is a complex molecule. It features a central bicyclic core with a fused five-membered ring containing an oxygen atom and a carbonyl group. A side chain with a double bond and a methyl group is attached to the core. Another side chain contains a carbonyl group and a methyl group. A third side chain is a 4-chloro-3-methoxyphenyl group. A fourth side chain is a 2-mercapto-3-methylbutyryl group.	MedKoo 206839
R ² SH-3	 The chemical structure of R²SH-3 is similar to R²SH-2, but the side chain containing the thiol group is a 2-mercapto-3-methylbutyryl group, which is different from the 2-mercapto-3-methylbutyryl group in R²SH-2.	US 20040235840 A1

Síntesis del Intermediario I (R²S-S-Pir)



Al [(1S,2R,3S,6S,16E,18E,20R,21S)-11-cloro-21-hidroxi-12,20-dimetoxi-2,5,9,16-tetrametil-8,23-dioxo-4,24-dioxa-9,22-diazatetraciclo[19.3.1.110,14.03,5]hexacosa-10(26),11,13,16,18-pentaen-6-il] (2S)-2-[metil(3-sulfanilpropanoil)amino]propanoato (46.7 mg, 0.06 mmol) en 1 ml de CH₃CN se añadió 2-(2-piridildisulfanil)piridina (20.0 mg, 0.09 mmol). La mezcla se concentró y se purificó (SiO₂, 0-10% MeOH/CH₂Cl₂) para producir [(1S,2R,3S,6S,16E,18E,20R,21S)-11-cloro-21-hidroxi-12,20-dimetoxi-2,5,9,16-tetrametil-8,23-dioxo-4,24-dioxa-9,22-diazatetraciclo[19.3.1.110,14.03,5]hexacosa-10(26),11,13,16,18-pentaen-6-il] (2S)-2-[metil-[3-(2-piridildisulfanil)propanoil]amino]propanoato (53.6 mg, 100 %). MS m/z 847.1 [M+H]⁺.

Síntesis de Pv3-S-Pir (Intermediario II-3)



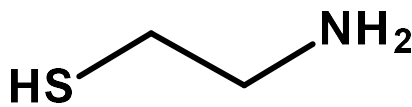
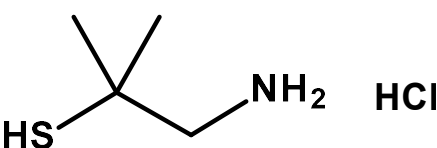
Pv3 (250 mg, 0.06 mmol; como un sólido que fluye libremente) y 2-(2-piridildisulfanil)piridina (0.110 g, 0.5 mol) se disolvieron en MeOH (10 ml) y la reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La LC-MS indica que el producto deseado se formó. La mezcla de

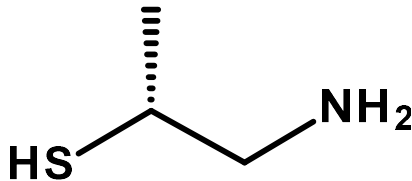
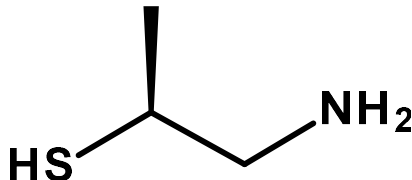
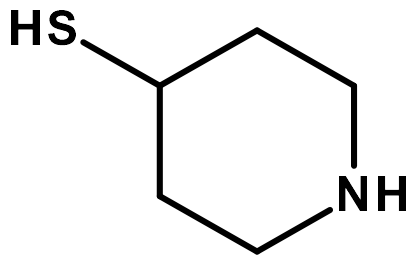
reacción se concentró y el residuo se recuperó en DMSO y se purificó por cromatografía de columna de fase inversa (40-65% CH₃CN/H₂O (0.5% AcOH), 13 min) para producir 212 mg del producto deseado (187 mg, rendimiento: 74.9 %). MS m/z=3 1273.4.

Los Intermediarios II-1, II-2 y II-6 se prepararon de manera análoga al II-3, usando Pv1, Pv2, y Pv6, como se muestra a continuación:

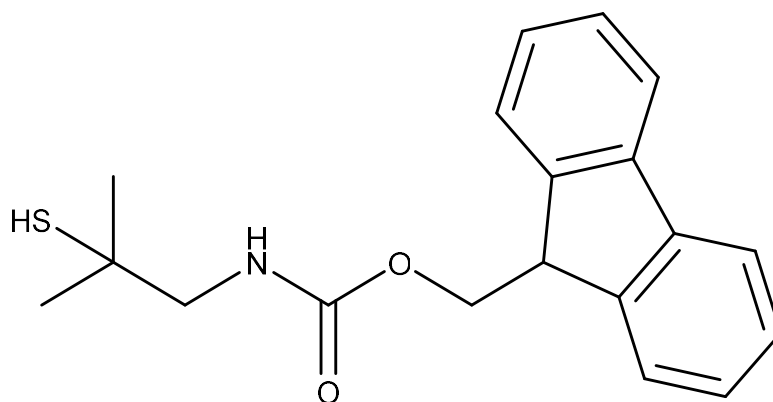
Intermediario	Estructura	MS A: Maldi-TOF B: m/z=3
II-1	Pv1-SPir	B: 1130.1
II-2	Pv2-SPir	B: 1373.9
II-3	Pv3-SPir	B: 1273.4
II-6	Pv6-SPir	B: 1450.3

Tabla 3. Materiales de partida para los grupos L

Intermediario	Estructura	Adquirido, Referencia o Sintetizado
III-1		Enamina EN3000-33931
III-2		Astatech 39541

III-3		Enamina EN3000-6731388
III-4		Enamina EN3000-6731596
III-5		Astatech 39018

Síntesis del Intermediario VI-2

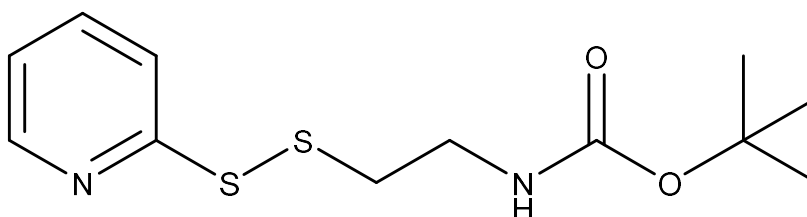


5 Clorhidrato de 1-amino-2-metil-propano-2-tiol (100 mg, 0.706 mmol) se disolvió en CH_2Cl_2 (7 ml) y a esto se añadió 9H-fluoren-9-ilmetil carbonocloridato (274 mg, 1.06 mmol) y *N,N*-diisopropiletilamina (182 mg, 1.41 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura

ambiente durante la noche. La mezcla de reacción se lavó con agua y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía de columna (0-50% EtOAc/hexanos) para producir 9H-fluoren-9-ilmetil N-(2-metil-2-sulfanil-propil)carbamato (213 mg, rendimiento: 92.2 %). MS m/z 350.1 [M+Na]⁺.

5

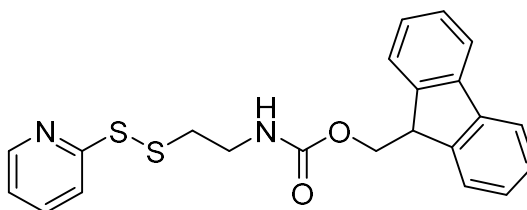
Síntesis del Intermediario V-1



2-(2-Piridildisulfanil)piridina (746 mg, 3.38 mmol) se disolvió en MeOH (15 ml) y a esto se añadió terc-butil N-(2-sulfaniletil)carbamato (200 mg, 1.13 mmol). La reacción se agitó durante 3 h a temperatura ambiente. La mezcla se concentró y el residuo se purificó por cromatografía de columna (0-50% EtOAc/hexanos) para producir terc-butil N-[2-(2-piridildisulfanil)etil]carbamato (200 mg, rendimiento: 61.9 %). MS m/z 287.1 [M+H]⁺.

10

Síntesis del Intermediario V-2

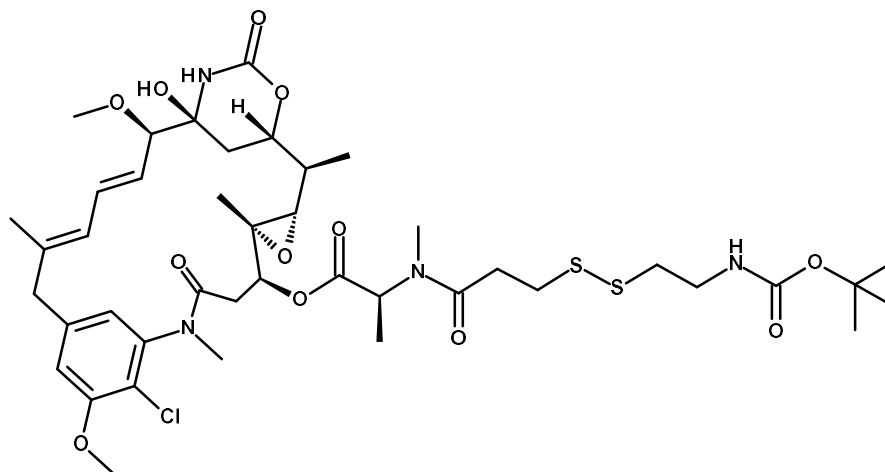


15

Clorhidrato de 2-(2-piridildisulfanil)etanamina (200 mg, 0.898 mmol) se disolvió en CH₂Cl₂ y a esto se añadió 9H-fluoren-9-ilmetil carbonocloridato (348 mg, 1.35 mmol) y *N,N*-diisopropiletilamina (232 mg, 1.80 mmol). La mezcla de reacción se agitó a RT durante 2h, se lavó con agua y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía de columna (0-50% EtOAc/hexanos) para producir 9H-fluoren-9-ilmetil N-[2-(2-piridildisulfanil)etil]carbamato (288 mg, rendimiento: 78.5 %). MS m/z 409.1 [M+H]⁺.

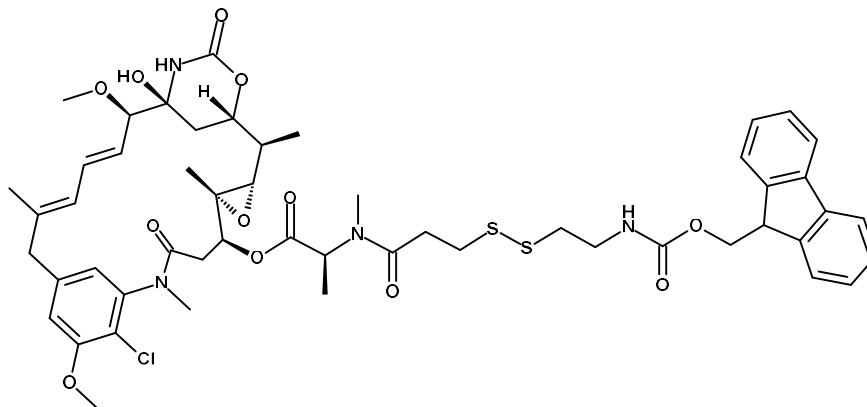
20

Síntesis del Intermediario VII-1



A un vial que contenía [(1S,2R,3S,6S,16E,18E,20R,21S)-11-cloro-21-hidroxi-12,20-dimetoxi-2,5,9,16-tetrametil-8,23-dioxo-4,24-dioxa-9,22-diazatetraciclo[19.3.1.110,14.03,5]hexacosa-10(26),11,13,16,18-pentaen-6-il] (2S)-2-[metil(3-sulfanilpropanoil)amino]propanoato (25.0 mg, 0.03 mmol) en 1 ml de CH₃CN se añadió terc-butil N-[2-(2-piridildisulfanil)etil]carbamato (Intermediario V-1, 14.5 mg, 0.051 mmol) y 4-metilmorfolina (0.138 ml, 1.25 mmol). La mezcla se agitó durante 16h. El análisis de LC-MS indica el material deseado. La mezcla se concentró, se disolvió en 50 ml de EtOAc y se lavó con 1x25 ml de NH₄Cl saturado y 1x25 ml de salmuera saturada. La fase orgánica se secó con MgSO₄, se filtró y se concentró. El residuo crudo se purificó (SiO₂, 0-100% EtOAc/hexanos) para producir [(1S,2R,3S,6S,16E,18E,20R,21S)-11-cloro-21-hidroxi-12,20-dimetoxi-2,5,9,16-tetrametil-8,23-dioxo-4,24-dioxa-9,22-diazatetraciclo[19.3.1.110,14.03,5]hexacosa-10(26),11,13,16,18-pentaen-6-il] (2S)-2-[3-[2-(terc-butoxicarbonilamino)etildisulfanil]propanoil-metil-amino]propanoato (30.9 mg, 100 %). MS m/z 913.2 [M+H]⁺.

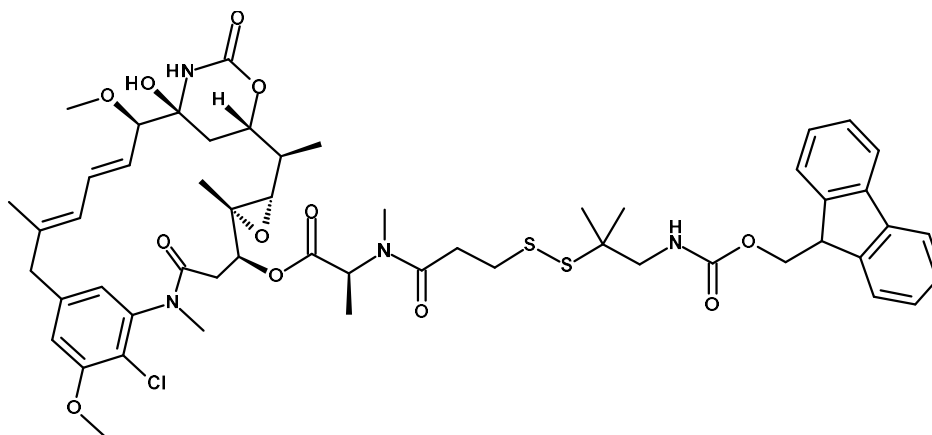
Síntesis del Intermediario VII-2



El Intermediario VII-2 se preparó de manera análoga al VII-1, usando el Intermediario V-2 en lugar del Intermediario V-1.

5

Síntesis del Intermediario VII-3

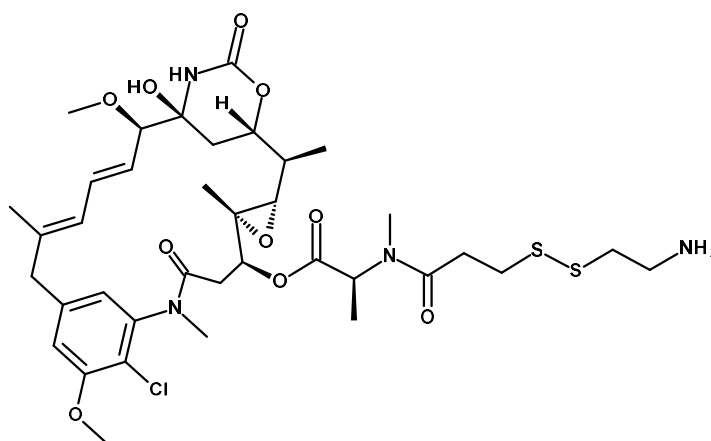


A un vial que contenía [(1S,2R,3S,6S,16E,18E,20R,21S)-11-cloro-21-hidroxi-12,20-dimetoxi-2,5,9,16-tetrametil-8,23-dioxo-4,24-dioxo-9,22-diazatetracyclo[19.3.1.110,14.03,5]hexacosa-

10 10(26),11,13,16,18-pentaen-6-il] (2S)-2-[3-[2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino) etildisulfanil]propanoil-metil-amino]propanoato (25.0 mg, 0.03 mmol) en 1 ml de CH₃CN se añadió 9H-fluoren-9-ilmetil N-(2-metil-2-sulfanil-propil)carbamato (14.5 mg, 0.044 mmol) y 4-metilmorfolina (0.120 ml, 1.09 mmol). La mezcla se agitó durante 16h. El análisis de LC-MS indicó que el material deseado se formó. La mezcla se concentró, se disolvió en 50 ml de
15 EtOAc y se lavó con 1x25 ml de NH₄Cl saturado y 1x25 ml de salmuera saturada. La fase

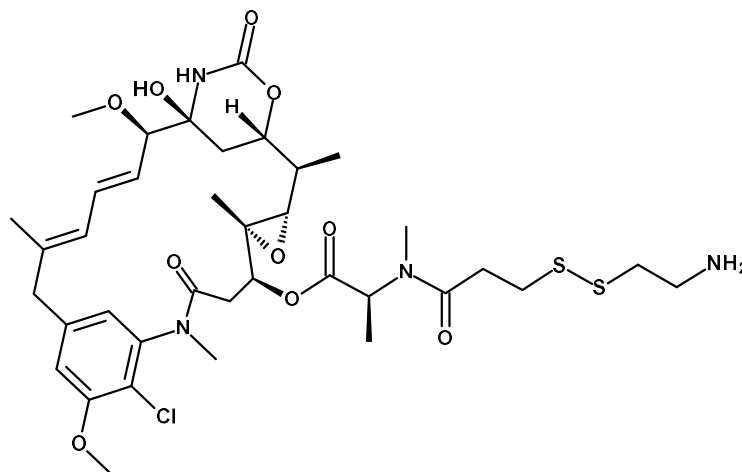
orgánica se secó con MgSO_4 , se filtró y se concentró. El residuo crudo se purificó (SiO_2 , 0-100% EtOAc/hexanos) hasta [(1S,2R,3S,6S,16E,18E,20R,21S)-11-cloro-21-hidroxi-12,20-dimetoxi-2,5,9,16-tetrametil-8,23-dioxo-4,24-dioxa-9,22-diazatetraciclo[19.3.1.110,14.03,5]hexacosa-10(26),11,13,16,18-pentaen-6-il] (2S)-2-[3-[2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-1,1-dimetil-etil]disulfanil]propanoil-metil-amino]propanoato (0.0313 g, rendimiento: 100 %). MS m/z 1085.0 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

Síntesis del Intermediario VIII-1 (Desprotección BOC)



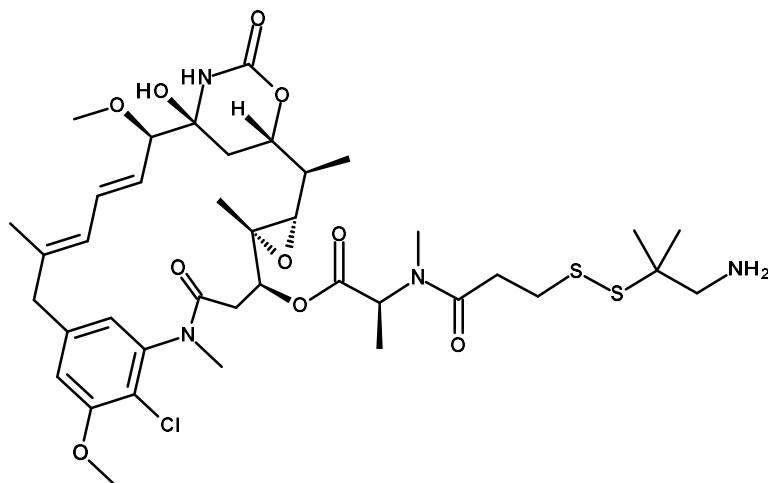
- El [(1S,2R,3S,6S,16E,18E,20R,21S)-11-cloro-21-hidroxi-12,20-dimetoxi-2,5,9,16-tetrametil-8,23-dioxo-4,24-dioxa-9,22-diazatetraciclo[19.3.1.110,14.03,5]hexacosa-10(26),11,13,16,18-pentaen-6-il] (2S)-2-[3-[2-(terc-butoxicarbonilamino)etildisulfanil]propanoil-metil-amino]propanoato (31.9 mg, 0.05 mmol) se disolvió en 0.3/0.1/0.1 ml de $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}/\text{TFA}$. La mezcla se agitó durante 36 h. La LC-MS indicó la desprotección completa. La mezcla se purificó por HPLC preparativa (20-95% $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ con 0.05% TFA) para producir ácido 2,2,2-trifluoroacético de [(1S,2R,3S,6S,16E,18E,20R,21S)-11-cloro-21-hidroxi-12,20-dimetoxi-2,5,9,16-tetrametil-8,23-dioxo-4,24-dioxa-9,22-diazatetraciclo[19.3.1.110,14.03,5]hexacosa-10(26),11,13,16,18-pentaen-6-il] (2S)-2-[3-(2-aminoetildisulfanil]propanoil-metil-amino]propanoato (22.9 mg, rendimiento: 70.7 %). MS m/z 813.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Síntesis Alternativa del Intermediario VIII-1 (Desprotección Fmoc)



A un vial que contenía [(1S,2R,3S,6S,16E,18E,20R,21S)-11-cloro-21-hidroxi-12,20-dimetoxi-2,5,9,16-tetrametil-8,23-dioxo-4,24-dioxa-9,22-diazatetraciclo[19.3.1.110,14.03,5]hexacosa-10(26),11,13,16,18-pentaen-6-il] (2S)-2-[3-[2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino) etildisulfanil]propanoil-metil-amino]propanoato (Intermediario VII-2; 29.6 mg, 0.03 mmol) se añadió 0.5 ml de DMF y 4-metilmorfolina (0.120 ml, 1.09 mmol). La mezcla se calentó durante 16 h a 40°C. La LC-MS confirmó la desprotección completa. La mezcla se purificó por (20-95% CH₃CN/H₂O con 0.05%TFA) para producir trifluoroacetato de [(1S,2R,3S,6S,16E,18E,20R,21S)-11-cloro-21-hidroxi-12,20-dimetoxi-2,5,9,16-tetrametil-8,23-dioxo-4,24-dioxa-9,22-diazatetraciclo[19.3.1.110,14.03,5]hexacosa-10(26),11,13,16,18-pentaen-6-il] (2S)-2-[3-(2-aminoetildisulfanil)propanoil-metil-amino]propanoato (22.9 mg, rendimiento: 86.4 %). MS m/z 813.2 [M+H]⁺.

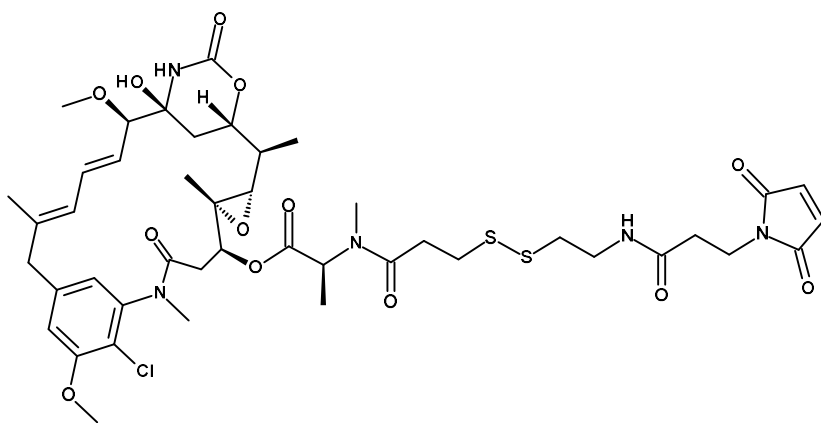
Síntesis del Intermediario VIII-2



El Intermediario VIII-2 se preparó de manera análoga al Intermediario VIII-1. MS m/z 841.2 $[M+H]^+$.

5

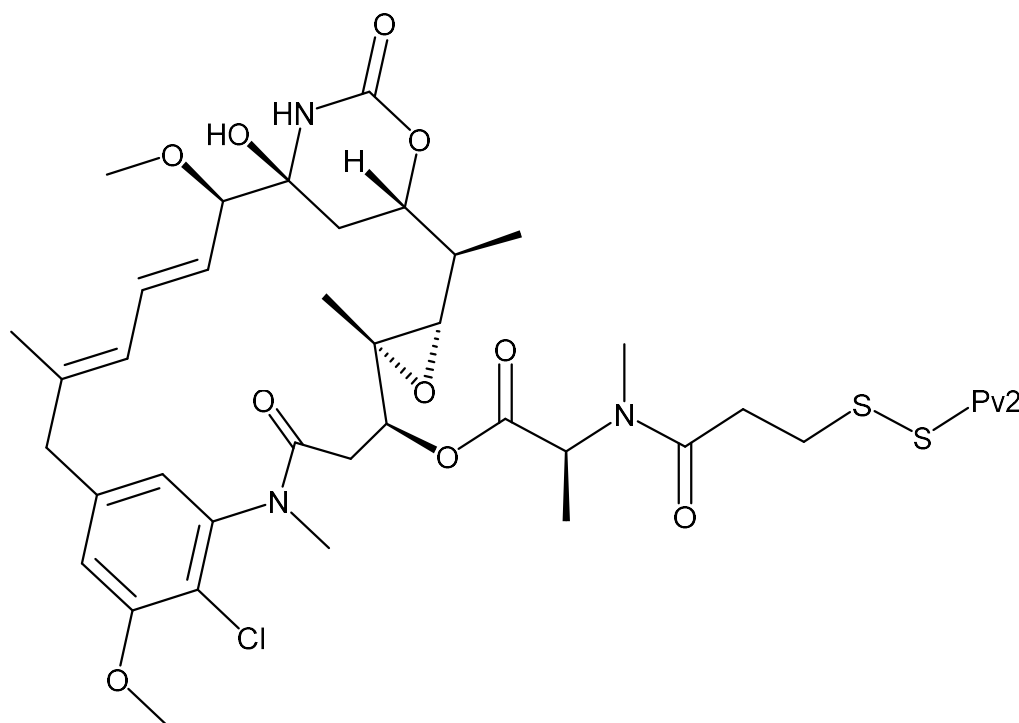
Síntesis del Intermediario X-1



Al trifluoroacetato de [(1S,2R,3S,6S,16E,18E,20R,21S)-11-cloro-21-hidroxi-12,20-dimetoxi-2,5,9,16-tetrametil-8,23-dioxo-4,24-dioxo-9,22-diazatetracyclo[19.3.1.110,14.03,5]hexacos-10(26),11,13,16,18-pentaen-6-il] (2S)-2-[3-(2-aminoetildisulfanil)propanoil-metil-amino]propanoato (Intermediario VIII-1; 45.8 mg, 0.05 mmol) en 1 ml de DMF se añadió ácido 3-(2,5-dioxopirrol-1-il)propanoico (12.5 mg, 0.074 mmol), TBTU (23.8 g, 0.074 mmol) y DIPEA (0.0169 ml, 0.1 mmol). La LC-MS indicó la conversión completa al producto. La mezcla se diluyó con 50 ml de EtOAc. Esta se lavó con 1x25ml de NH_4Cl saturado 4x25ml H_2O y 1x25

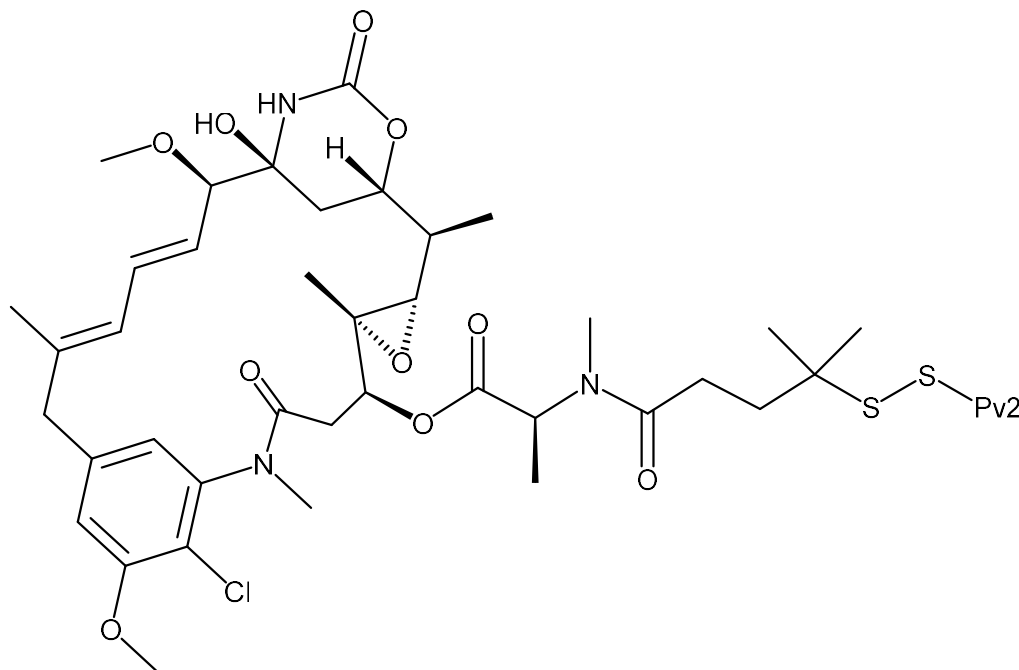
ml de H₂O. La fase orgánica se secó con MgSO₄, se filtró y se concentró. El producto crudo se purificó (SiO₂, 0-10% MeOH/CL₂Cl₂) para producir [(1S,2R,3S,6S,16E,18E,20R,21S)-11-cloro-21-hidroxi-12,20-dimetoxi-2,5,9,16-tetrametil-8,23-dioxo-4,24-dioxa-9,22-diazatetraciclo[19.3.1.110,14.03,5]hexacosa-10(26),11,13,16,18-pentaen-6-il] (2S)-2-[3-[2-[3-(2,5-dioxopirrol-1-il)propanoilamino]etil]disulfanil]propanoil-metil-amino]propanoato (17.3 mg, 5
rendimiento: 36.5 %) MS m/z 986.1 [M+Na]⁺.

Ejemplo 2: Síntesis del Compuesto 2



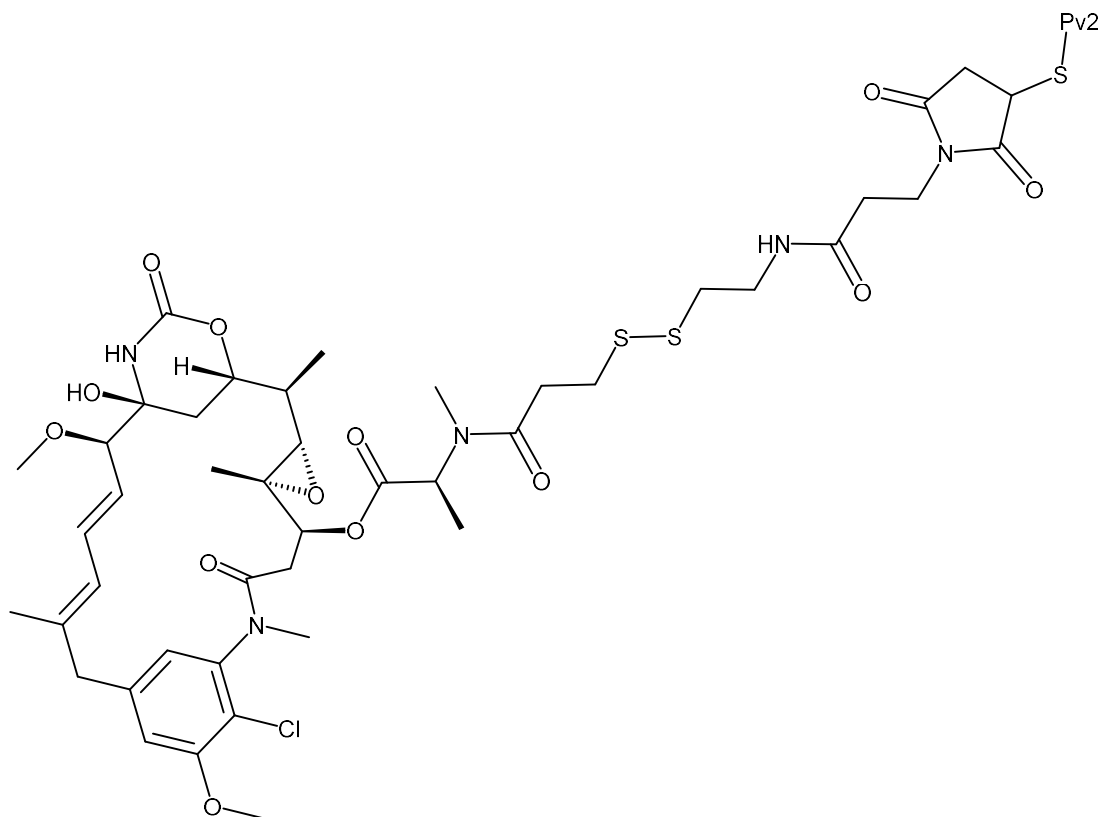
A un vial que contenía Pv2 (25.0 mg, 0.006 mmol; como un sólido que fluye libremente) y
10 [(1S,2R,3S,6S,16E,18E,20R,21S)-11-cloro-21-hidroxi-12,20-dimetoxi-2,5,9,16-tetrametil-
8,23-dioxo-4,24-dioxa-9,22-diazatetraciclo[19.3.1.110,14.03,5]hexacosa-10(26),11,13,16,18-
pentaen-6-il] (2S)-2-[metil-[3-(2-piridildisulfanil)propanoil]amino]propanoato (7.70 mg, 0.009
mmol) se añadió 1 ml de DMF desgasificada y 0.5 ml de H₂O desgasificada. A esto se añadió
CH₃CO₂H (0.0103 ml, 0.180 mmol). La mezcla se agitó durante 72 h. La LC-MS indicó la
15 formación del producto deseado. La mezcla se purificó por HPLC preparativa (Sunfire C18
150x30 mm; 20-77% H₂O/Acetonitrilo con 0.5% modificador de AcOH; corrida de 15 min;
Velocidad de flujo: 30ml/min; Longitud de onda = 217 nM) para producir el conjugado deseado
(17.0 mg, rendimiento: 59.1 %).

Ejemplo 6: Síntesis del Compuesto 6



A un vial que contenía Pv2-SPir (Intermediario II-2; 27.0 mg, 6.55e-6 mol) y
 5 [(1S,2R,3S,6S,16E,18E,20R,21S)-11-cloro-21-hidroxi-12,20-dimetoxi-2,5,9,16-tetrametil-
 8,23-dioxo-4,24-dioxa-9,22-diazatetraciclo[19.3.1.110,14.03,5]hexacosa-10,12,14(26),16,18-
 pentaen-6-il] (2S)-2-[metil-(4-metil-4-sulfanil-pentanoil)amino]propanoato (7.67 mg, 0.01
 mmol). A esto se añadió 1 ml de DMF desgasificada y 0.5 ml de H₂O desgasificada. A esto se
 añadió CH₃CO₂H (0.015 ml, 0.262 mmol). La mezcla se agitó durante 72 h. La LC-MS indicó
 10 la formación del producto deseado. La mezcla se purificó por HPLC preparativa (Sunfire C18
 150x30 mm; 20-80% H₂O/Acetonitrilo con 0.5% Modificador de AcOH; corrida de 16 min;
 Velocidad de flujo: 30ml/min; Longitud de onda = 217 nM) para producir el conjugado deseado
 (11.4 g, rendimiento: 36.6 %).

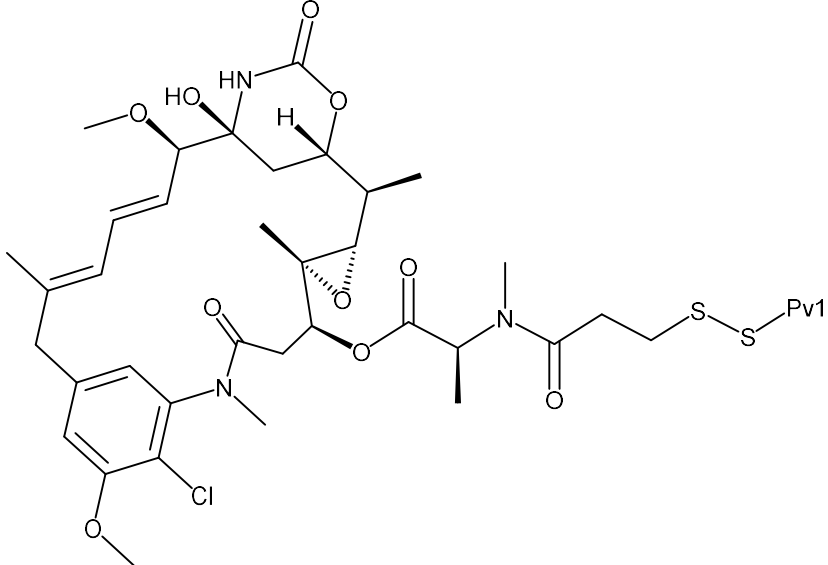
Ejemplo 9. Síntesis del Compuesto 9

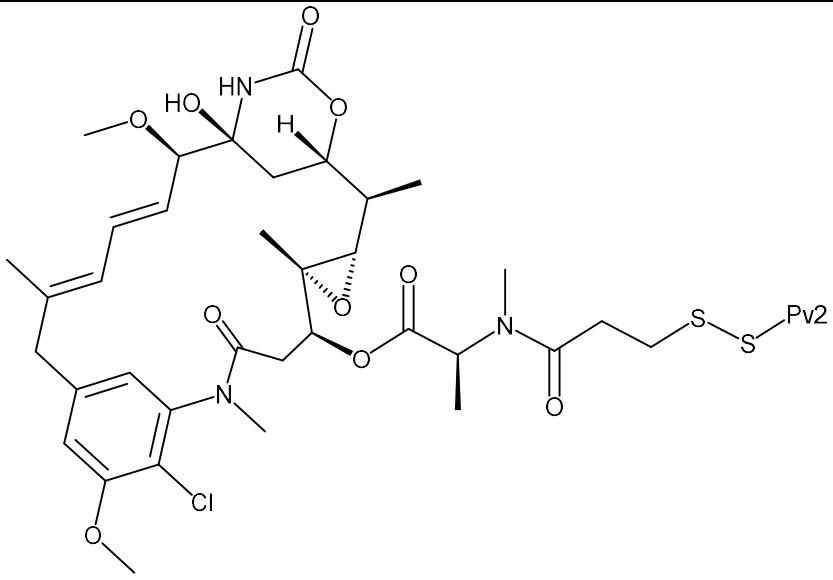
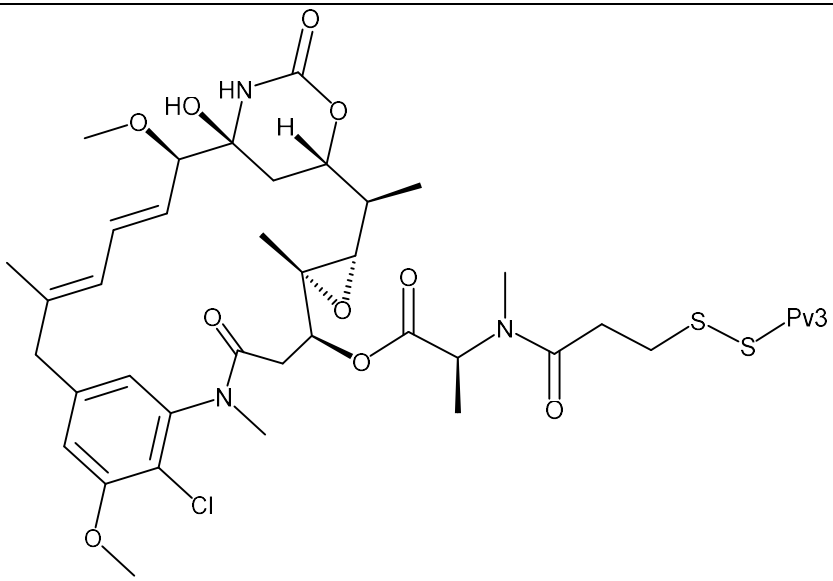


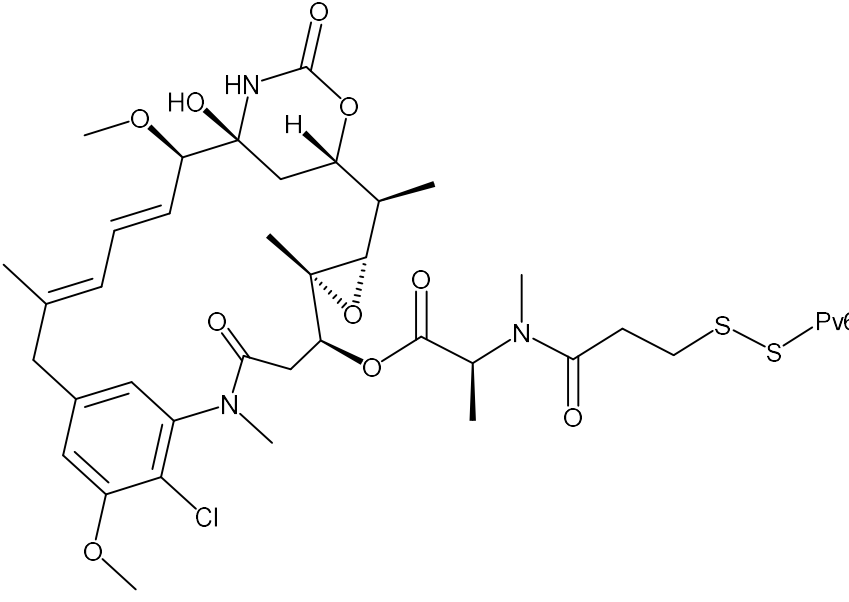
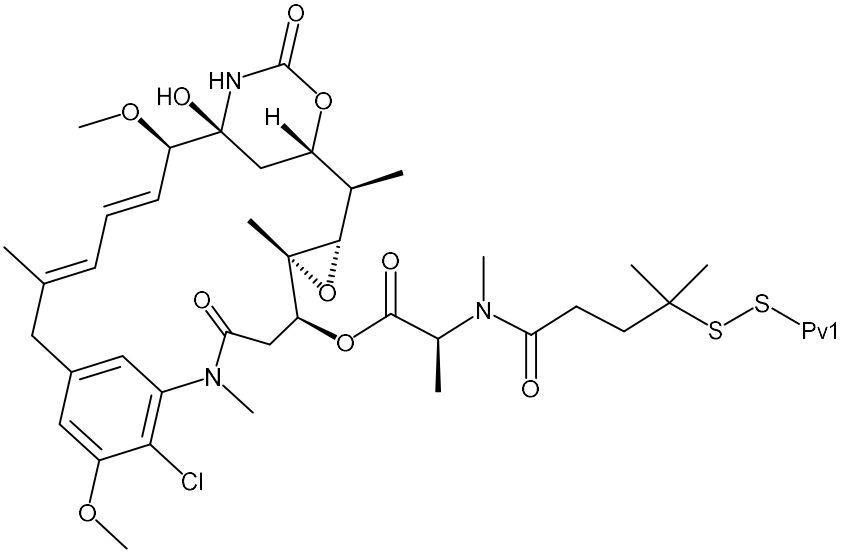
A un vial que contenía Pv2 (25.0 mg, 0.006 mol; como un sólido que fluye libremente) y [(1S,2R,3S,6S,16E,18E,20R,21S)-11-cloro-21-hidroxi-12,20-dimetoxi-2,5,9,16-tetrametil-
 5 8,23-dioxo-4,24-dioxa-9,22-diazatetraciclo[19.3.1.110,14.03,5]hexacosa-10(26),11,13,16,18-pentaen-6-il] (2S)-2-[3-[2-[3-(2,5-dioxopirrol-1-il)propanoilamino]etil]disulfanil]propanoil-metil-amino]propanoato (Intermediario X-1; 0.00877 g, 0.01 mmol) se añadió 1 ml de CH₃CN. La mezcla fue heterogénea. A esto se añadió 0.5 ml de CH₃CN, 0.5 ml de H₂O y 0.5 ml de MeOH. No se logró la homogeneidad. La mezcla se agitó rigurosamente durante 72 h. La LC-MS
 10 indicó la formación del producto deseado. La mezcla se purificó por HPLC preparativa (Sunfire C18 150x30 mm; 45-61% H₂O/Acetonitrilo con 0.05% modificador de TFA; corrida de 13 min; Velocidad de flujo: 30ml/min; Longitud de onda = 217 nM) para producir el conjugado deseado (21.1 mg, rendimiento: 70.0 %).

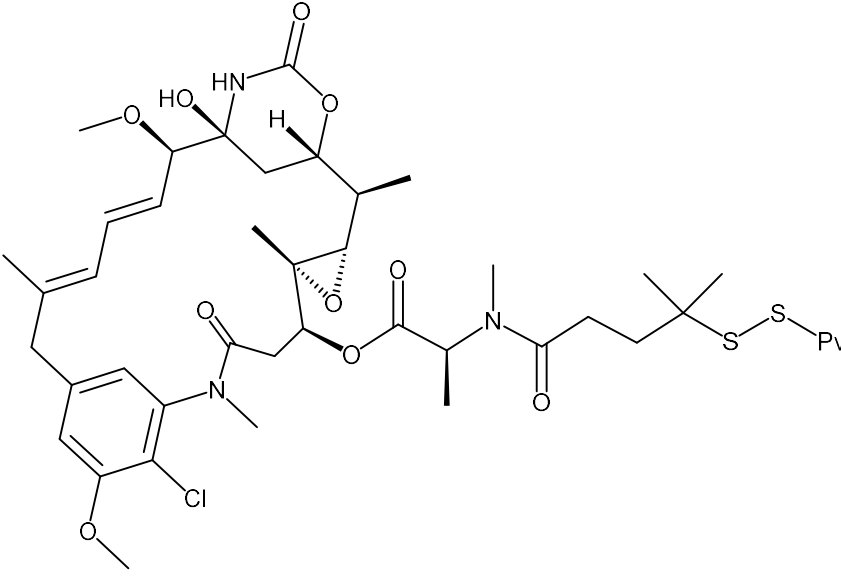
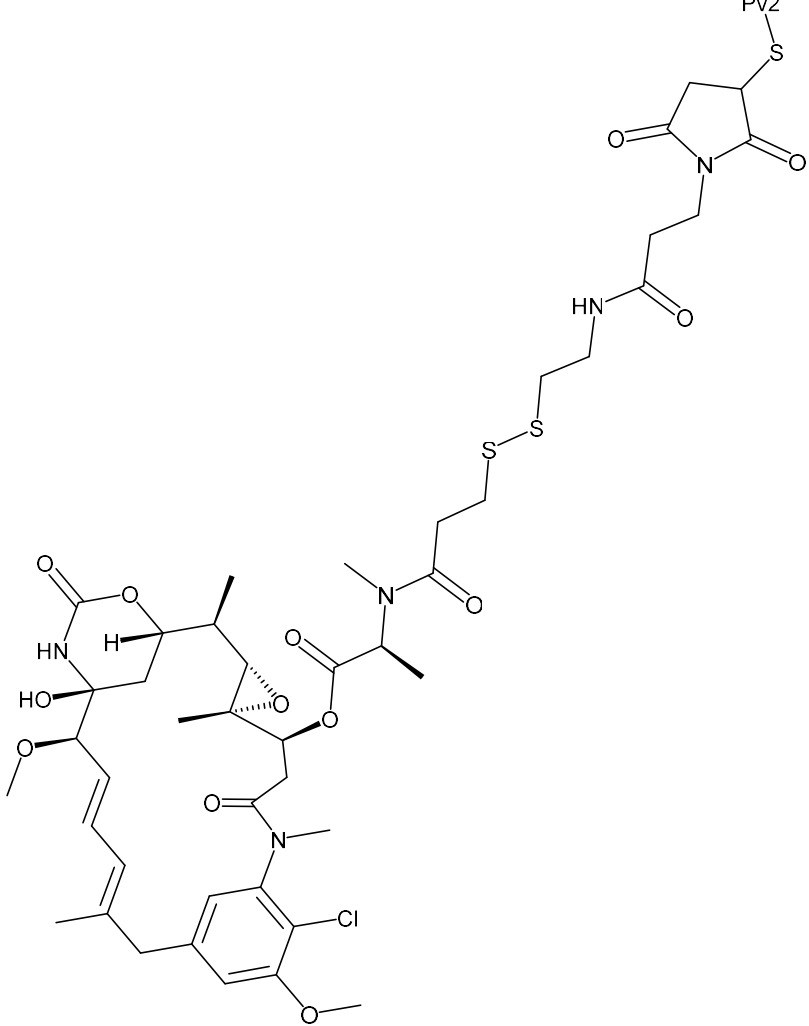
Los Compuestos 1, 3, y 4 se sintetizaron de manera análoga al Compuesto 2, usando Pv1, Pv3, y Pv4, respectivamente. Los Compuestos 5, 7, y 8 se sintetizaron de manera análoga al
 15 Compuesto 6, usando los Intermediarios II-1, II-3, y II-6, respectivamente.

Tabla 4. Compuestos Ejemplares

Com puest o	Estructura	MS A: Maldi- TOF (M+) B: ESI (m/z=3)	Condicio nes % ACN/H ₂ O Tiempo de Corrida RT
1		B: 1339.3	D 20-95% 11min 7.28min

2		B: 1582.7	A 20-95% 11min 7.0min
3		B: 1483.8	D 20-95% 11min 7.82min

4	 Chemical structure of compound 4: A complex molecule featuring a central bicyclic core with a hydroxyl group and a methoxy group. It is substituted with a 3-chloro-4-methoxyphenyl group, a 2-methyl-2-butenoate group, and a 2-methyl-2-butenoate group. The molecule is linked to a 2-methyl-2-butenoate group via an ester linkage, which is further connected to a 2-methyl-2-butenoate group via an amide linkage. The molecule is terminated with a 2-methyl-2-butenoate group via a disulfide linkage (S-S-Pv6).	B: 1659.4	A 20-95% 11min 6.92min
5	 Chemical structure of compound 5: A complex molecule featuring a central bicyclic core with a hydroxyl group and a methoxy group. It is substituted with a 3-chloro-4-methoxyphenyl group, a 2-methyl-2-butenoate group, and a 2-methyl-2-butenoate group. The molecule is linked to a 2-methyl-2-butenoate group via an ester linkage, which is further connected to a 2-methyl-2-butenoate group via an amide linkage. The molecule is terminated with a 2-methyl-2-butenoate group via a disulfide linkage (S-S-Pv1).	B: 1352.8	A 20-95% 11min 6.81min

8		B: 1673.4	A 20-95% 11min 7.14min
9		B: 1659.4	A 20-95% 11min 7.16min

Ejemplo 5: Síntesis Detallada del Compuesto 5

Al Pv1 (50.0 mg, 1.48e-5 mol) y [(1S,2R,3S,6S,16E,18E,20R,21S)-11-cloro-21-hidroxi-12,20-dimetoxi-2,5,9,16-tetrametil-8,23-dioxo-4,24-dioxa-9,22-diazatetraciclo[19.3.1.110,14.03,5]hexacosa-10,12,14(26),16,18-pentaen-6-il] (2S)-2-[metil-(4-metil-4-sulfanil-pentanoil)amino]propanoato (0.0150 g, 1.92e-5 mol) en 3 ml de 2:1 CH₃CN/H₂O se añadió N-metilmorfolina (0.0600 ml, 0.000546 mol). La mezcla se agitó durante 36 h. El análisis de LC-MS indicó la formación del material deseado. La mezcla se purificó por HPLC preparativa Gilson (Sunfire C18 30x150mm; 20-80% CH₃CN/H₂O con 0.05% TFA; corrida de 16 min; 13.5 min) para producir el conjugado deseado. La mezcla se purificó por HPLC preparativa Gilson (Sunfire C18 30x150mm; 20-72% CH₃CN/H₂O con 0.05% TFA; corrida de 15 min; 12.5 min; tiempo de retención: 6.847 min) para producir el Compuesto 5 (0.0322 g, 7.94e-6 mol, rendimiento: 53.8 %). ESI (m/z=3): 1352.8.

Ejemplo 5a: Síntesis Alternativa del Compuesto 5

15 Paso 1. Preparación del Pv1-S-Piridilo

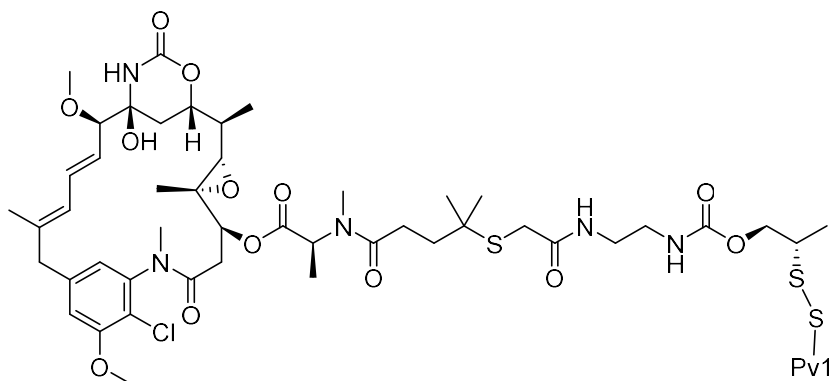
El péptido Pv1 y disulfuro de 2,2'-dipiridilo se disolvieron en MeOH y la reacción se agitó durante la noche. La LC-MS indicó que se formó el producto deseado. La mezcla de reacción se concentró y el residuo se recuperó en DMSO y se purificó por cromatografía de columna de fase inversa (40-75% ACN/H₂O (0.5% AcOH), 15 min) para producir 212 mg del producto deseado.

Paso 2. Preparación del Compuesto 5

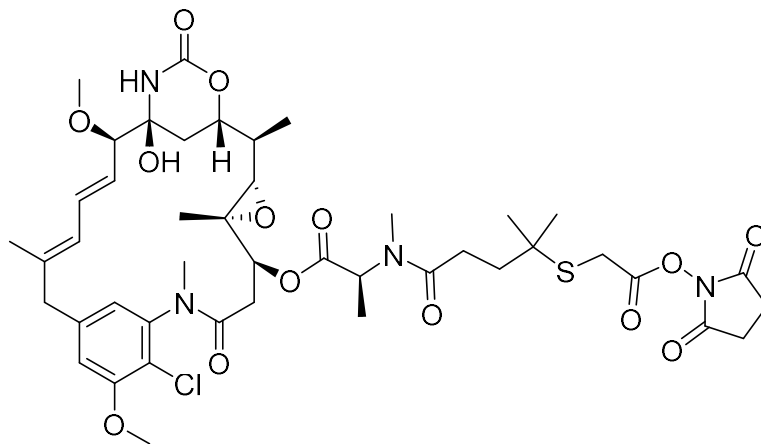
A un vial que contenía Pv1-SPir (25.0 mg, 736e-6 mol) y [(1S,2R,3S,6S,16E,18E,20R,21S)-11-cloro-21-hidroxi-12,20-dimetoxi-2,5,9,16-tetrametil-8,23-dioxo-4,24-dioxa-9,22-diazatetraciclo[19.3.1.110,14.03,5]hexacosa-10,12,14(26),16,18-pentaen-6-il] (2S)-2-[metil-(4-metil-4-sulfanil-pentanoil)amino]propanoato (0.00864 g, 1.11e-5 mol). A esta mezcla se añadió 1 ml de DMF desgasificada y 0.5 ml de H₂O desgasificada. Se añadió CH₃CO₂H (0.017 ml, 0.000295 mol). La mezcla se agitó durante 72 h. La LC-MS indicó la formación del producto deseado. La mezcla se purificó por HPLC preparativa Gilson (Sunfire C18 30x150mm; 20-80 CH₃CN/H₂O con 0.5% AcOH; corrida de 16 min; 12.9 min) para producir el Compuesto 5

(0.00750 g, 1.85e-6 mol, rendimiento: 25.1 %).

Ejemplo 10: Síntesis del Compuesto 10



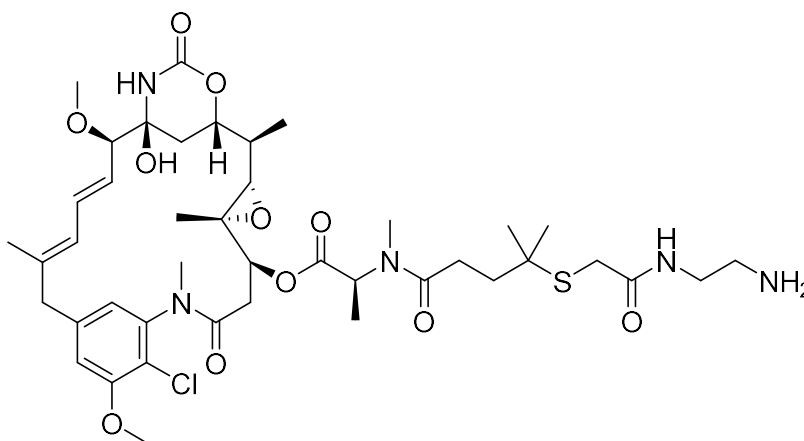
- 5 **Paso 1.** *(1⁴S,1⁶S,3²S,3³S,2R,4S,10E,12E,14R)*-8⁶-cloro-1⁴-hidroxi-8⁵,14-dimetoxi-3³,2,7,10-tetrametil-1²,6-dioxo-7-aza-1(6,4)-oxazinana-3(2,3)-oxirana-8(1,3)-bencenacicotetradecafano-10,12-dien-4-il N-(4-((2-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-2-oxoetil)tio)-4-metilpentanoil)-N-metil-L-alaninato



- 10 Se disolvieron 180 mg de DM4 (0.23 mmol) y 57 mg de éster de hidroxisuccinimida del ácido bromoacético (0.24 mmol) en DMF (4.6 ml) y se enfrió en baño de hielo-agua. 36.2 µl de DBU (0.24 mmol) se añadió una vez y la mezcla se dejó entibiar a RT. En ese momento la LC/MS indicó casi 95% de conversión y la reacción se apagó con adición de 0.1 ml de AcOH. La mezcla de reacción cruda se cargó directamente en una columna C18Aq de 50 g y se purificó
- 15 vía 100-100% gradiente B estándar (A: agua con 0.05% AcOH; B: agua con 0.05% AcOH). Las fracciones que contenían el producto se liofilizaron para proporcionar 160 mg del producto

(77% de rendimiento). Pureza de HPLC a 254 nm: 96%. Tiempo de retención: 2.83 min (Método F). LCMS: 935.4 MH⁺.

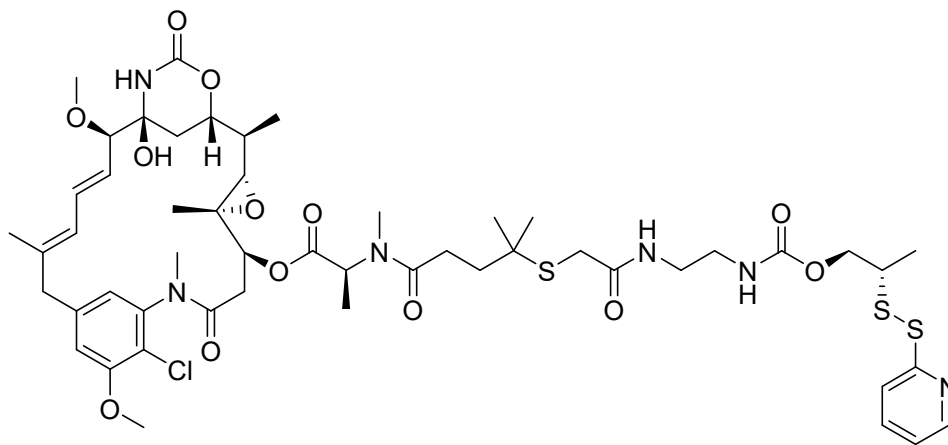
5 *Paso 2. 1⁴S,1⁶S,3²S,3³S,2R,4S,10E,12E,14R*-8⁶-cloro-1⁴-hidroxi-8⁵,14-dimetoxi-3³,2,7,10-tetrametil-1²,6-dioxo-7-aza-1(6,4)-oxazinana-3(2,3)-oxirana-8(1,3)-bencenacicotetradecafano-10,12-dien-4-il *N*-(4-((2-((2-aminoetil)amino)-2-oxoetil)tio)-4-metilpentanoil)-*N*-metil-L-alaninato



10 Se disolvieron 25 mg de 1⁴S,1⁶S,3²S,3³S,2R,4S,10E,12E,14R)-8⁶-cloro-1⁴-hidroxi-8⁵,14-dimetoxi-3³,2,7,10-tetrametil-1²,6-dioxo-7-aza-1(6,4)-oxazinana-3(2,3)-oxirana-8(1,3)-bencenacicotetradecafano-10,12-dien-4-il *N*-(4-((2-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-2-oxoetil)tio)-4-metilpentanoil)-*N*-metil-L-alaninato (0.027 mmol) y 36 mg de N1-((4-metoxifenil)difenilmetil)etano-1,2-diamina (0.11 mmol, 4 eq) en dioxano (1 ml). Después de 3 h, la reacción pareció completarse por LC/MS. La mezcla se concentró hasta sequedad y se disolvió en 80% AcOH en agua (2 ml). La LC/MS mostró la desprotección completa del Intermediario y la mezcla se secó por congelación directamente. El residuo se disolvió en DMSO (1 ml) y se cargó en una columna C18Aq de 15.5 g y se purificó vía 5-100% gradiente B estándar (A: agua con 0.05% AcOH; B: agua con 0.05% AcOH). Las fracciones que contenían el producto se liofilizaron para proporcionar 18 mg del producto. Pureza de HPLC a 20 254 nm: 95%. Tiempo de retención: 2.17 min (Método F). LCMS: 880.4 MH⁺.

Paso 3. (1⁴S,1⁶S,3²S,3³S,2R,4S,10E,12E,14R-8⁶-cloro-1⁴-hidroxi-8⁵,14-dimetoxi-3³,2,7,10-tetrametil-1²,6-dioxo-7-aza-1(6,4)-oxazinana-3(2,3)-oxirana-8(1,3)-

bencenacicotetradecafano-10,12-dien-4-il (2*S*,18*S*)-2,3,7,7-tetrametil-4,10,15-trioxo-18-(piridin-2-ildisulfaneil)-16-oxa-8-tia-3,11,14-triazanonadecanoato



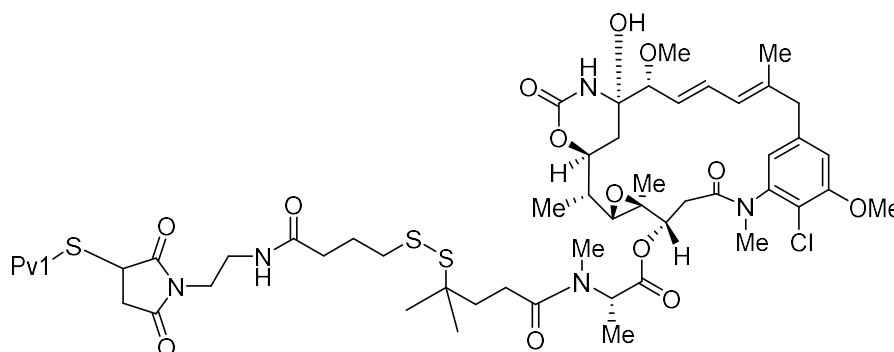
Una solución de (1⁴*S*,1⁶*S*,3²*S*,3³*S*,2*R*,4*S*,10*E*,12*E*,14*R*)-8⁶-cloro-1⁴-hidroxi-8⁵,14-dimetoxi-
 5 3³,2,7,10-tetrametil-1²,6-dioxo-7-aza-1(6,4)-oxazinana-3(2,3)-oxirana-8(1,3)-
bencenacicotetradecafano-10,12-dien-4-il N-(4-((2-((2-aminoetil)amino)-2-oxoetil)tio)-4-
 metilpentanoil)-N-metil-L-alaninato (14 mg, 0.016 mmol) en DMF (0.2 ml) se añadió al (S)-4-
 nitrofenil (2-(piridin-2-ildisulfaneil)propil) carbonato sólido (6.6 mg, 0.018 mmol). HOAt y DIEA
 catalíticos (10 ml, 0.057 mmol) se añadieron a la solución resultante y se agitaron a
 10 temperatura ambiente durante 3 horas. La solución se neutralizó con ácido acético (10 ml) y
 se aplicó a una columna de fase inversa (RediSEP C18 (15.5 g)) y se eluyó con un gradiente
 de acetonitrilo (30% hasta 95%) en agua con ácido acético (0.05%) para proporcionar 18 mg
 (85% de rendimiento) del producto del título. Pureza de HPLC a 254 nm: 99%. Tiempo de
 retención: 2.85 min (Método F). LCMS: 1129.4 MNa⁺.

15

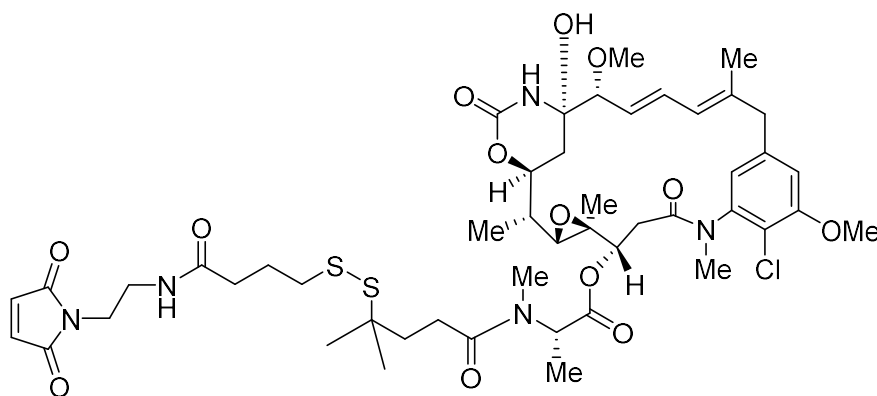
Paso 4. Síntesis del Compuesto 10

Una solución de (1⁴*S*,1⁶*S*,3²*S*,3³*S*,2*R*,4*S*,10*E*,12*E*,14*R*)-8⁶-cloro-1⁴-hidroxi-8⁵,14-dimetoxi-
 3³,2,7,10-tetrametil-1²,6-dioxo-7-aza-1(6,4)-oxazinana-3(2,3)-oxirana-8(1,3)-
bencenacicotetradecafano-10,12-dien-4-il (2*S*,18*S*)-2,3,7,7-tetrametil-4,10,15-trioxo-18-
 20 (piridin-2-ildisulfaneil)-16-oxa-8-tia-3,11,14-triazanonadecanoato (17.7 mg, 0.00857 mmol) en
 DMF (1 ml) se trató con bicarbonato de sodio (1.8 mg, 0.0214 mmol) y agua (50 ml). La solución
 resultante se trató con péptido, Pv1 (31.5 mg, 0.0899 mmol) y se agitó a temperatura ambiente
 durante 3 horas, luego se aplicó a una columna de fase inversa, RediSep C18 (15.5 g) y se

Ejemplo 11: Síntesis del Compuesto 11



10



15

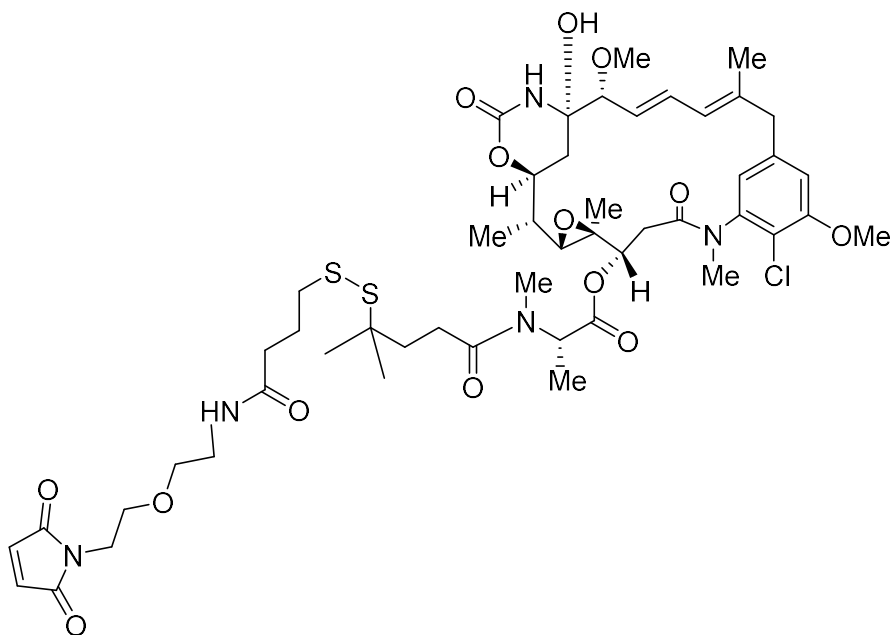
Paso 2. Síntesis del Compuesto 11

Una solución de ($1^4\text{S}, 1^6\text{S}, 3^2\text{S}, 3^3\text{S}, 2\text{R}, 4\text{S}, 10\text{E}, 12\text{E}, 14\text{R}$)- 8^6 -cloro- 1^4 -hidroxi- $8^5, 14$ -dimetoxi- $3^3, 2, 7, 10$ -tetrametil- $1^2, 6$ -dioxo- 7 -aza- $1(6, 4)$ -oxazinana- $3(2, 3)$ -oxirana- $8(1, 3)$ -bencenacicotetradecafano- $10, 12$ -dien- 4 -il N-(4-((4-((2-(2, 5-dioxo-2, 5-dihidro- 1H -pirrol- 1 -il)etil)amino)-4-oxobutil)disulfaneil)-4-metilpentanoil)-N-metil-L-alaninato (6 mg, 0.006 mmol) y péptido Pv1 (22.3 mg, 0.006 mmol) se disolvieron en DMF (0.12 ml) y se trataron con trietilamina (0.001 ml). Después de 30 minutos la mezcla de reacción se cargó directamente en una columna RediSEP C8 (15.5 g) y se eluyó con un gradiente de acetonitrilo (35% hasta 75%) en agua con TFA (0.05%) para proporcionar 16 mg (64% de rendimiento) del compuesto del título. Pureza de HPLC a 254 nm: 98%. Tiempo de retención: 6.19 min (Método G). LCMS: 2150.2 ($\text{M}+2\text{H}$)/ 2^+ , 1433.3 ($\text{M}+3\text{H}$)/ 3^+ .

Chemical structure of compound 10, showing a complex molecule with a pyridine ring, a thiazolidine ring, a sulfonamide group, and a long aliphatic chain with a thioether linkage.

Paso 1. ((1⁴S,1⁶S,3²S,3³S,2R,4S,10E,12E,14R)-8⁶-cloro-1⁴-hidroxi-8⁵,14-dimetoxi-3³,2,7,10-tetrametil-1²,6-dioxo-7-aza-1(6,4)-oxazinana-3(2,3)-oxirana-8(1,3)-

bencenaciclodecatetra-10,12-dien-4-il (S)-1-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-
16,16,20,21-tetrametil-10,19-dioxo-3,6-dioxa-14,15-ditia-9,20-diazadocosan-22-oato



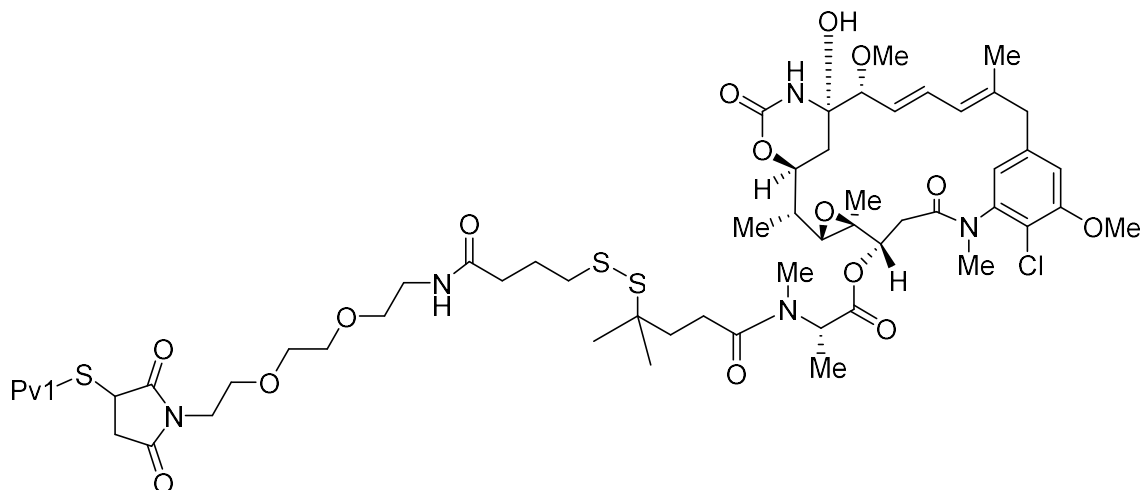
DM4 (20 mg, 0.026 mmol) y succinimidil 4-(2-piridilditio)butanoato (12 mg, 0.04 mmol) se
5 mezclaron en DMF (0.75 ml). Se añadió trietilamina (0.045 ml) y la mezcla se agitó durante 2
h. se añadió clorhidrato de 1-(21-(2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etil)-1H-pirrol-2,5-diona (9 mg,
0.036 mmol) y después de 3 h la mezcla se cargó directamente en una columna RediSEP
C18Aq (15.5 g) y se eluyó con un gradiente de acetonitrilo (30% hasta 95%) en agua con ácido
acético (0.05%) para proporcionar 17 mg (61% de rendimiento). Pureza de HPLC a 254 nm:
10 99%. Tiempo de retención: 2.84 min (Método F). LCMS: 1108.4 MH⁺.

Paso 2. Síntesis del Compuesto 12.

Una solución de (1⁴S,1⁶S,3²S,3³S,2R,4S,10E,12E,14R)-8⁶-cloro-1⁴-hidroxi-8⁵,14-dimetoxi-
3³,2,7,10-tetrametil-1²,6-dioxo-7-aza-1(6,4)-oxazinana-3(2,3)-oxirana-8(1,3)-
15 bencenaciclodecatetra-10,12-dien-4-il (S)-1-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-
16,16,20,21-tetrametil-10,19-dioxo-3,6-dioxa-14,15-ditia-9,20-diazadocosan-22-oato (15 mg,
0.014 mmol) y péptido Pv1 (52 mg, 0.015 mmol) se disolvieron en DMF (0.28 ml) y se trataron
con trietilamina (0.006 ml). Después de 30 minutos la mezcla de reacción se cargó
directamente en una columna RediSEP C8 (15.5 g) y se eluyó con un gradiente de acetonitrilo

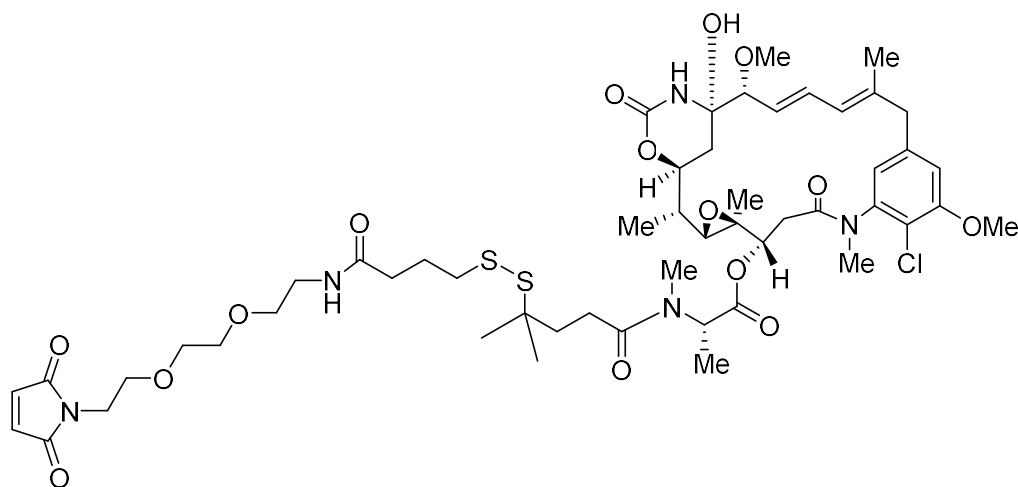
(35% hasta 60%) en agua con TFA (0.05%) para proporcionar 25 mg (34% de rendimiento). Pureza de HPLC a 254 nm: 98%. Tiempo de retención: 6.26 min (Método G). LCMS: 2194.0 (M+2H)/2⁺, 1463.0 (M+3H)/3⁺.

5 Ejemplo 13. Síntesis del Compuesto 13



Paso 1. 1⁴S,1⁶S,3²S,3³S,2R,4S,10E,12E,14R)-8⁶-cloro-1⁴-hidroxi-8⁵,14-dimetoxi-3³,2,7,10-tetrametil-1²,6-dioxo-7-aza-1(6,4)-oxazinana-3(2,3)-oxirana-8(1,3)-bencenacicotetradecafano-10,12-dien-4-il (S)-1-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-

10 13,13,17,18-tetrametil-7,16-dioxo-3-oxa-11,12-ditia-6,17-diazanonadecan-19-oato



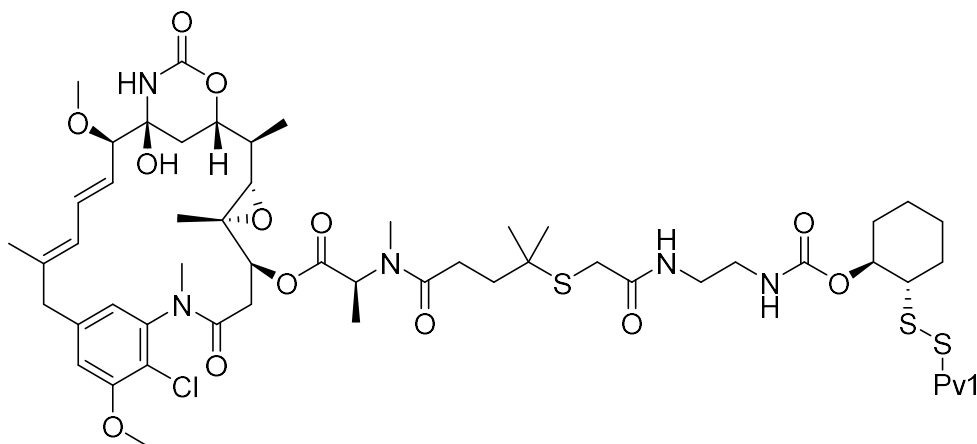
DM4 (20 mg, 0.026 mmol) y succinimidil 4-(2-piridilditio)butanoato (12 mg, 0.04 mmol) se mezclaron en DMF (0.75 ml). Se añadió trietilamina (0.045 ml) y la mezcla se agitó durante 2

h. se añadió clorhidrato de 1-(2-(2-aminoetoxi)etil)-1H-pirrol-2,5-diona (5 mg, 0.024 mmol) y después de 3 h la mezcla se cargó directamente en una columna RediSEP C18Aq (15.5 g) y se eluyó con un gradiente de acetonitrilo (30% hasta 95%) en agua con ácido acético (0.05%) para proporcionar 13 mg (41% de rendimiento) del producto del título. Pureza de HPLC a 254 nm: 94%. Tiempo de retención: 2.85 min (Método F). LCMS: 1064.4 MH⁺.

Paso 2. Síntesis del Compuesto 13

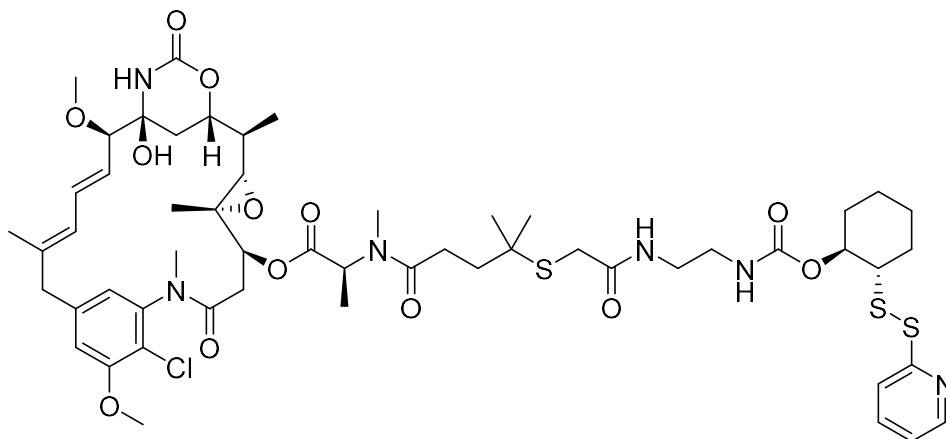
Una solución de (14S,16S,32S,33S,2R,4S,10E,12E,14R)-86-cloro-14-hidroxi-85,14-dimetoxi-33,2,7,10-tetrametil-12,6-dioxo-7-aza-1(6,4)-oxazinana-3(2,3)-oxirana-8(1,3)-bencenacicotetradecafano-10,12-dien-4-il (S)-1-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-16,16,20,21-tetrametil-10,19-dioxo-3,6-dioxa-14,15-ditia-9,20-diazadocosan-22-oato (18 mg, 0.017 mmol) y péptido Pv1 (63 mg, 0.019 mmol) se disolvieron en DMF (0.34 ml) y se trataron con trietilamina (0.007 ml). Después de 30 minutos la mezcla de reacción se cargó directamente en una columna RediSEP C8 (15.5 g) y se eluyó con un gradiente de acetonitrilo (35% hasta 60%) en agua con TFA (0.05%) para proporcionar 25 mg (34% de rendimiento) del compuesto del título. Pureza de HPLC a 254 nm: 99%. Tiempo de retención: 6.24 min (Método G). LCMS: 2172.0 (M+2H)/2⁺, 1448.7 (M+3H)/3⁺.

Ejemplo 14. Síntesis del Compuesto 14



Paso 1. (1⁴S,1⁶S,3²S,3³S,2R,4S,10E,12E,14R)-8⁶-cloro-1⁴-hidroxi-8⁵,14-dimetoxi-3³,2,7,10-tetrametil-1²,6-dioxo-7-aza-1(6,4)-oxazinana-3(2,3)-oxirana-8(1,3)-

bencenacicotetradecafano-10,12-dien-4-il (S)-9,9,13,14-tetrametil-1,6,12-trioxo-1-(((1S,2S)-2-(piridin-2-ildisulfaneil)ciclohexil)oxi)-8-tia-2,5,13-triazapentadecan-15-oato



Una solución de (1⁴S,1⁶S,3²S,3³S,2R,4S,10E,12E,14R)-8⁶-cloro-1⁴-hidroxi-8⁵,14-dimetoxi-
 5 3³,2,7,10-tetrametil-1²,6-dioxo-7-aza-1(6,4)-oxazinana-3(2,3)-oxirana-8(1,3)-
 bencenacicotetradecafano-10,12-dien-4-il N-(4-(((2-((2-aminoetil)amino)-2-oxoetil)tio)-4-
 metilpentanoil)-N-metil-L-alaninato (14 mg, 0.016 mmol; Ejemplo 10, Paso 2) en DMF (0.2 ml)
 se añadió a 4-nitrofenil ((1S,2S)-2-(piridin-2-ildisulfaneil)ciclohexil) carbonato sólido (7.2 mg,
 0.018 mmol). HOAt y DIEA catalíticos (10 ml, 0.057 mmol) se añadieron a la solución resultante
 10 y se agitaron a temperatura ambiente durante 3 horas. La solución se neutralizó con ácido
 acético (10 ml) y se aplicó a una columna de fase inversa, RediSEP C18 (15.5 g) y se eluyó
 con un gradiente de acetonitrilo (30% hasta 95%) en agua con ácido acético (0.05%) para
 proporcionar 15 mg (80% de rendimiento) del compuesto del título. Pureza de HPLC a 254 nm:
 98%. Tiempo de retención: 3.05 min (Método F). LCMS: 1147.4 MH⁺.

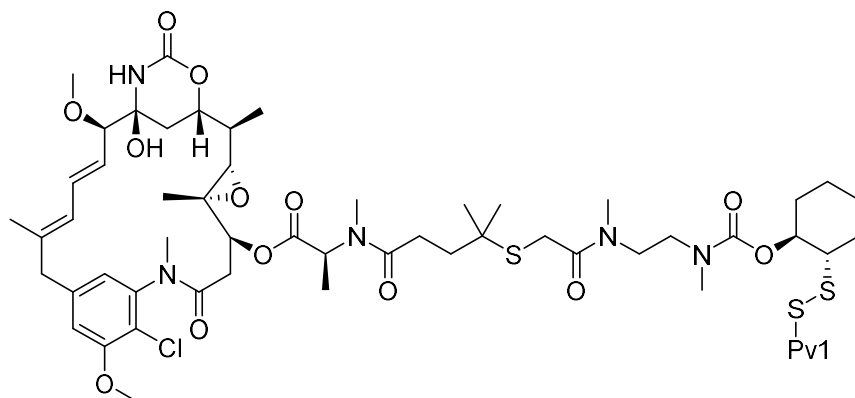
15

Paso 2. Síntesis del Compuesto 14

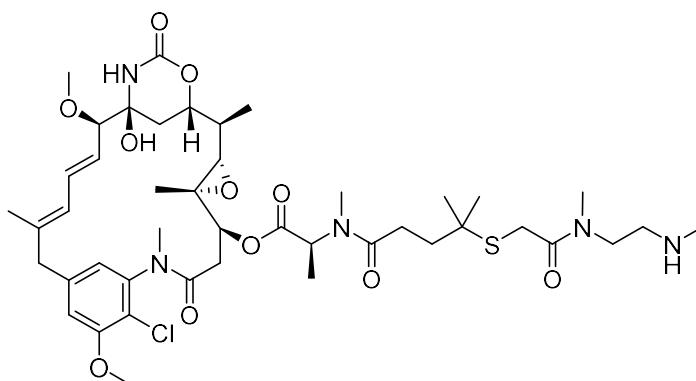
Una solución de (1⁴S,1⁶S,3²S,3³S,2R,4S,10E,12E,14R)-8⁶-cloro-1⁴-hidroxi-8⁵,14-dimetoxi-
 3³,2,7,10-tetrametil-1²,6-dioxo-7-aza-1(6,4)-oxazinana-3(2,3)-oxirana-8(1,3)-
 bencenacicotetradecafano-10,12-dien-4-il (S)-9,9,13,14-tetrametil-1,6,12-trioxo-1-(((1S,2S)-
 20 2-(piridin-2-ildisulfaneil)ciclohexil)oxi)-8-tia-2,5,13-triazapentadecan-15-oato (17 mg, 0.015
 mmol) y péptido Pv1 (47 mg, 0.013 mmol) se disolvieron en DMF (0.34 ml) y se trataron con
 trietilamina (0.007 ml). Después de 30 minutos la mezcla de reacción se cargó directamente
 en una columna RediSEP C8 (15.5 g) y se eluyó con un gradiente de acetonitrilo (35% hasta

60%) en agua con TFA (0.05%) para proporcionar 28 mg (37% de rendimiento). Pureza de HPLC a 254 nm: 99%. Tiempo de retención: 7.36 min (Método G). LCMS: 2158.0 (M+2H)/2⁺, 1439.0 (M+3H)/3⁺.

5 Ejemplo 15. Síntesis del Compuesto 15



Paso 1. (1⁴S,1⁶S,3²S,3³S,2R,4S,10E,12E,14R)-8⁶-cloro-1⁴-hidroxi-8⁵,14-dimetoxi-3³,2,7,10-tetrametil-1²,6-dioxo-7-aza-1(6,4)-oxazinana-3(2,3)-oxirana-8(1,3)-bencenacicotetradecafano-10,12-dien-4-il (S)-5,9,9,13,14-pentametil-6,12-dioxo-8-tia-2,5,13-triazapentadecan-15-oato

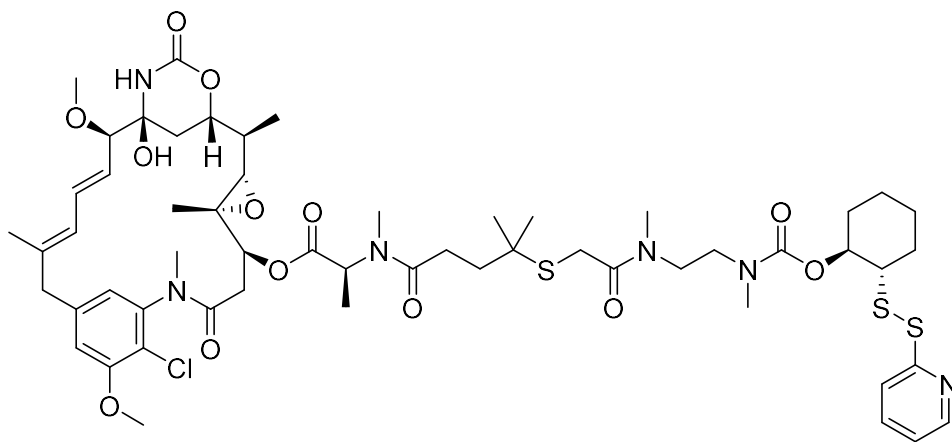


Se disolvieron 25 mg de (1⁴S,1⁶S,3²S,3³S,2R,4S,10E,12E,14R)-8⁶-cloro-1⁴-hidroxi-8⁵,14-dimetoxi-3³,2,7,10-tetrametil-1²,6-dioxo-7-aza-1(6,4)-oxazinana-3(2,3)-oxirana-8(1,3)-bencenacicotetradecafano-10,12-dien-4-il N-(4-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-2-oxoetil)tio)-4-metilpentanoil)-N-metil-L-alaninato (0.027 mmol) y 40 mg de N1-((3-metoxifenil)difenilmetil)-N1,N2-dimetiletano-1,2-diamina (0.11 mmol, 4 eq) en dioxano (1 ml). Después de 3 h, la reacción pareció completarse por LC/MS. se añadieron 0.05 ml de TFA y la mezcla se cargó

en una columna C18Aq de 15.5 g y se purificó vía 5-100% gradiente B estándar (A: agua con 0.05% TFA; B: ACN con 0.05% TFA). Las fracciones que contenían el producto se liofilizaron para proporcionar 22 mg del producto (75% de rendimiento). Pureza de HPLC a 254 nm: 98%. Tiempo de retención: 2.25 min (Método F). LCMS: 908.4 MH⁺.

5

Paso 2. (1⁴S,1⁶S,3²S,3³S,2R,4S,10E,12E,14R)-8⁶-cloro-1⁴-hidroxi-8⁵,14-dimetoxi-3³,2,7,10-tetrametil-1²,6-dioxo-7-aza-1(6,4)-oxazinana-3(2,3)-oxirana-8(1,3)-bencenacicotetradecafano-10,12-dien-4-il (S)-2,5,9,9,13,14-hexametil-1,6,12-trioxo-1-(((1S,2S)-2-(piridin-2-ildisulfaneil)ciclohexil)oxi)-8-tia-2,5,13-triazapentadecan-15-oato



10

Una solución de (1⁴S,1⁶S,3²S,3³S,2R,4S,10E,12E,14R)-8⁶-cloro-1⁴-hidroxi-8⁵,14-dimetoxi-3³,2,7,10-tetrametil-1²,6-dioxo-7-aza-1(6,4)-oxazinana-3(2,3)-oxirana-8(1,3)-bencenacicotetradecafano-10,12-dien-4-il (S)-5,9,9,13,14-pentametil-6,12-dioxo-8-tia-2,5,13-triazapentadecan-15-oato (15 mg, 0.016 mmol) en DMF (0.2 ml) se añadió a 4-nitrofenil ((1S,2S)-2-(piridin-2-ildisulfaneil)ciclohexil) carbonato sólido (6.6 mg, 0.018 mmol). HOAt y DIEA catalíticos (10 ml, 0.057 mmol) se añadieron a la solución resultante y se agitaron a temperatura ambiente durante 3 horas. La solución se neutralizó con ácido acético (10 ml) y se aplicó a una columna de fase inversa, RediSEP C18 (15.5 g) y se eluyó con un gradiente de acetonitrilo (30% hasta 95%) en agua con ácido acético (0.05%) para proporcionar 16 mg (82% de rendimiento) del producto del título. Pureza de HPLC a 254 nm: 97%. Tiempo de retención: 3.36 min (Método F). LCMS: 1175.5 MH⁺.

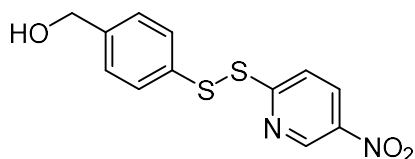
15

20

5
10

COC1=CC=C(C=C1)C2=CC(=C(C=C2)OC)N(C)C(=O)CC[C@H](OC(=O)C[C@H](C)NC(=O)CC(C)(C)SCC(=O)NCCNC(=O)OCCOC3=CC=C(C=C3)SS4CCCCC4)C[C@H](C)[C@H](OC(=O)N[C@@H]1[C@@H](C)[C@H](OC(=O)C[C@H](C)[C@H](O)[C@@H](C)[C@H]1C)C=C)C=C

15

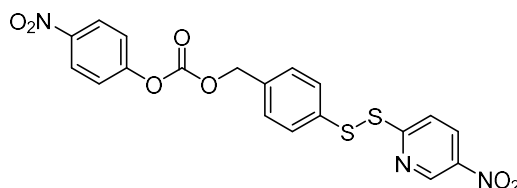


20

acetato de etilo (10% hasta 60%) en hexanos para proporcionar el producto (0.499 g, 52% de rendimiento). Pureza de HPLC a 254 nm: 90%. Tiempo de retención: 2.72 min (Método F). MS data, 295.1 (M+H)⁺. ¹HNMR(DMSO-d₆) d 9.18 (s, 1H), 8.58 (d de d, 1H), 8.02 (d, 1H), 7.56 (d, 2H), 7.34 (d, 2H), 5.24 (t, 1H) y 4.47 (d, 2H).

5

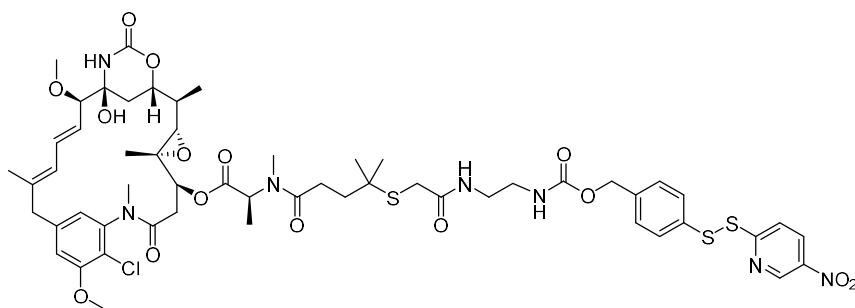
Paso 2. 4-nitrofenil (4-((5-nitropiridin-2-il)disulfaneil)bencil) carbonato



Una solución de 4-nitrofenil cloroformiato (255 mg, 1.26 mmol) en THF (5 ml) se enfrió en un baño de hielo y se trató con una solución de (4-((5-nitropiridin-2-il)disulfaneil)fenil)metanol (220 mg, 0.748 mmol), trietil amina (0.7 ml, 5.03 mmol), y 4-dimetiaminopiridina (45 mg, 0.368 mmol) en THF (5 ml) se añadió durante aproximadamente 15 minutos. El baño de hielo se removió, y la solución se agitó a temperatura ambiente durante una hora y se almacenó en un congelador durante la noche. El solvente se evaporó in vacuo, y el residuo se disolvió en DCM, se aplicó a una columna de gel de sílice RediSep (12 g) y se eluyó con un gradiente de acetato de etilo (2% hasta 100%) en hexanos. el producto se purificó adicionalmente por cromatografía de fase inversa en un cartucho RediSep C18 (50 g) eluido con un gradiente de acetonitrilo (30% hasta 95%) en agua con ácido acético (0.05%), para proporcionar el producto, 55 mg (16%). Pureza de HPLC a 254 nm: >99%. Tiempo de retención: 3.77 min (Método F). MS data, 460.7 (M+H)⁺. ¹HNMR(CDCl₃) d 9.29 (d, 1H), 8.39 (d de d, 1H), 8.28 (d de d, 2H), 7.83 (d de d, 1H), 7.55 (d de d, 2H), 7.44 (d de d), 7.36 (d de d, 2H) y 5.26 (d, 2H).

Paso 3. (14S,16S,32S,33S,2R,4S,10E,12E,14R)-86-cloro-14-hidroxi-85,14-dimetoxi-33,2,7,10-tetrametil-12,6-dioxo-7-aza-1(6,4)-oxazinana-3(2,3)-oxirana-8(1,3)-bencenacicotetradecafano-10,12-dien-4-il (S)-11,11,15,16-tetrametil-1-(4-((5-nitropiridin-2-il)disulfaneil)fenil)-3,8,14-trioxo-2-oxa-10-tia-4,7,15-triazaheptadecan-17-oato

25



Una solución de (14S,16S,32S,33S,2R,4S,10E,12E,14R)-86-cloro-14-hidroxi-85,14-dimetoxi-33,2,7,10-tetrametil-12,6-dioxo-7-aza-1(6,4)-oxazinana-3(2,3)-oxirana-8(1,3)-bencenacicotetradecafano-10,12-dien-4-il N-(4-((2-((2-aminoetil)amino)-2-oxoetil)tio)-4-metilpentanoil)-N-metil-L-alaninato (15 mg, 0.017 mmol; Ejemplo 10, Paso 2) en DMF (1 ml) se añadió a 4-nitrofenil (4-((5-nitropiridin-2-il)disulfaneil)bencil) carbonato sólido (26 mg, 0.0566 mmol). HOAt y DIEA catalíticos (10 ml, 0.057 mmol) se añadieron a la solución resultante y se agitaron a temperatura ambiente durante 3 horas. La solución se neutralizó con ácido acético (7 ml, 0.122 mmol) y se aplicó a una columna de fase inversa, RediSEP C18 (15.5 g) y se eluyó con un gradiente de acetonitrilo (30% hasta 95%) en agua con ácido acético (0.05%). La purificación adicional sobre una columna de gel de sílice, RediSep (4 g), usando un gradiente de metanol (0.2% hasta 6%) en DCM como el eluyente, proporcionó el producto del título (10.3 mg, 50% de rendimiento). Pureza de HPLC a 254 nm: >99%. Tiempo de retención: 3.16 min (Método F). MS data, 1182.3 (M+H-H₂O)⁺, 1201.3 (M+H)⁺, 1222.3 (M+Na)⁺.

Paso 4. Síntesis del Compuesto 16

Una solución de (14S,16S,32S,33S,2R,4S,10E,12E,14R)-86-cloro-14-hidroxi-85,14-dimetoxi-33,2,7,10-tetrametil-12,6-dioxo-7-aza-1(6,4)-oxazinana-3(2,3)-oxirana-8(1,3)-bencenacicotetradecafano-10,12-dien-4-il (S)-11,11,15,16-tetrametil-1-(4-((5-nitropiridin-2-il)disulfaneil)fenil)-3,8,14-trioxo-2-oxa-10-tia-4,7,15-triazaheptadecan-17-oato (10.3 mg, 0.00857 mmol) en DMF (1 ml) se trató con bicarbonato de sodio (1.8 mg, 0.0214 mmol) y agua (50 ml). La solución resultante se trató con péptido, Pv1 (31.5 mg, 0.0899 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas, luego se aplicó a una columna de fase inversa, RediSep C18 (15.5 g) y se eluyó con un gradiente de acetonitrilo (30% hasta 70%) en agua con acetato de amonio (10 mM). Las fracciones se combinaron, se congelaron y se liofilizaron para proporcionar el producto como un sólido blanco, 18.7 mg (50%). Pureza de HPLC a 254

nm: 99%. Tiempo de retención: 6.63 min (Método G). MS data, 2162.4 (M+2H)/2⁺, 1441.8 (M+3H)/3⁺, 1082.6 (M+4H)/4⁺, 1435.7 (M+3H-H₂O)/3⁺.

Ejemplo A. Ensayo de Retraso del Crecimiento

- 5 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
- 10 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 µg/ml. Se tomaron imágenes de las placas
- 15 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.

Tabla 5: Datos del Ensayo de Retraso del Crecimiento

Ejemplo	DLD-1 (IC ₅₀ , nM)	HCT116 (IC ₅₀ , nM)	FaDu (IC ₅₀ , nM)	HeLa (IC ₅₀ , nM)
R ² SH-1 (ver Tabla 2)	9.8	4.3	2.8	2.6
R ² SH-2 (ver Tabla 2)	0.45	0.20	0.13	0.02
1	60.5	21.8	10.4	7.4
2	114	21.1	15.4	8.0
3	45.1	19.3	10.1	6.9
4	11.7	2.5	1.4	0.85

5	9.4	2.7	2.3	0.95
6	8.3	3.3	5.2	1.8
7	NC*	3.4	4.6	2.0
8	9.8	3.0	3.4	1.6

NC* = No calculado

Ejemplo B: Efecto en la Polimerización de Tubulina In Vitro

Se realizó un ensayo de polimerización de tubulina basado en fluorescencia (Cytoskeleton Cat# BK011P) para cuantificar el impacto de DM4 no conjugado y Compuesto 5 en la polimerización de tubulina in vitro. El DM4 y Compuesto 5 se prepararon como soluciones madre 10 mM en DMSO y luego se diluyeron a 10X hasta 200, 50 y 5 μ M en agua destilada ultrapura para una concentración final de DMSO de 0.2 %. Los reactivos del kit se descongelaron rápidamente y luego se mantuvieron fríos en hielo para evitar la polimerización prematura. Se preparó una mezcla de reacción de tubulina en hielo mezclando tubulina de cerebro porcino purificada, GTP y amortiguador de glicerol, todo en 1X amortiguador de kit para concentraciones finales de 2 mg/ml de tubulina, GTP 1 mM y 15% glicerol 5 μ l de DM4, Compuesto 5 o control de DMSO se añadieron a una placa de reacción de media cavidad negra precalentada a 37°C por no más de 1 minuto, para calentar, pero sin permitir la evaporación. Se añadieron rápidamente 50 μ l de la mezcla de reacción de tubulina a cada cavidad y se colocaron inmediatamente en un lector de imágenes Cytation 5 precalentado (BioTek). Se realizó una lectura cinética a 360 de excitación/450 de emisión durante 2 horas a 37°C, con lecturas cada 2.5 minutos para seguir el aumento de la fluorescencia debido a la incorporación de un indicador fluorescente en los microtúbulos a medida que se produce la polimerización.

La FIG. 1 muestra un diagrama del efecto de DM4 libre y Compuesto 5 en la polimerización de β -tubulina in vitro (en términos de unidades relativas de fluorescencia) a 0.5 μ M, 5 μ M y 20 μ M.

Ejemplo C: Análisis Cinético de Unión del Conjugado

Los experimentos de unión se realizaron usando un instrumento Biacore S200. Se acondicionó un chip sensor de Serie S con estreptavidina preinmovilizada con NaCl 1 M en NaOH 50 mM. Se inmovilizó tubulina humana marcada con biotina derivada de células HeLa en el chip sensor a una concentración de 125 µg/ml en amortiguador HBS-P + a una velocidad de flujo de 10 µl/min. Unas 3000 RU (unidades de respuesta) finales de proteína se inmovilizaron directamente en el chip. Después de la inmovilización con tubulina, el chip sensor se lavó con 50% isopropanol, NaOH 50 mM y NaCl 1 M y posteriormente se dejó equilibrar en amortiguador de ensayo durante 4 horas. Se utilizó un blanco de captura de estreptavidina-biotina (referencia FC) para monitorear la unión no específica.

Para recopilar datos de unión cinética, el Compuesto 5 diluido en amortiguador de ensayo se inyectó sobre las células de flujo en concentraciones que variaron desde 100 µM a 0.048 µM y 50 µM a 0.024 µM, a una velocidad de flujo de 60 µl/minuto y una temperatura de 25°. Se dejó que el complejo se disociara durante 60 segundos. La unión del compuesto a la tubulina se controló en tiempo real para obtener velocidades de activación (K_a) y desactivación (K_{off}). La constante de afinidad (K_D) se calculó mediante cinética de estado estacionario.

La FIG. 2 representa el análisis cinético de la unión del Compuesto 5 a β -tubulina in vitro según lo determinado por resonancia de plasmón superficial Biacore. El Compuesto 5 es capaz de unirse a β -tubulina con una K_D similar a la del DM4 libre (3.55 µM) y tasas de activación/desactivación más lentas en relación con el DM4 libre.

Ejemplo D: Eficacia del Compuesto 5 en un Modelo de Cáncer Colorrectal de Ratón

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 µl. 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 0.21, 0.29, 0.35, 0.42 µmoles/kg de Compuesto 5 (equivalente a 1.1, 1.4, 1.7, o 2 mg/kg de Compuesto 5) o 0.42 µmoles/kg de DM4 no

conjugado (equivalente a 0.33 mg/kg de DM4 no conjugado). 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 con un intervalo de dos días entre la segunda y tercera dosis, 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 = $\pi/6 \times (\text{largo}) \times (\text{anchura})^2$. 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. Se utilizó el análisis de Kaplan-Meier para evaluar la tasa de supervivencia con base en la muerte o retiro del estudio.

La FIG. 3A muestra un diagrama del volumen medio de tumor en ratones desnudos portadores de tumores en flanco colorrectales HCT116 dosificados con DM4 o Compuesto 5.

La FIG. 3B muestra el porcentaje de cambio del peso corporal de ratones desnudos portadores de tumores en flanco colorrectales HCT166 dosificados con DM4 o Compuesto 5 con relación al día 0.

La FIG. 4 representa un diagrama de Kaplan-Meier de ratones desnudos portadores de tumores en flanco colorrectales HCT116 dosificados con DM4 o Compuesto 5. Los animales se retiraron del estudio debido ya sea a la muerte, tamaño del tumor que excede 2000 mm³ o debido a la pérdida de más del 20% del peso corporal. El DM4 libre indujo la muerte espontánea de la mitad del grupo de animales de DM4 durante el periodo posterior a la dosificación. Como se muestra en la FIG. 4, el Compuesto 5 suministra de manera segura cantidades de DM4 in vivo que de otro modo resultan en toxicidad sistémica y muerte cuando se dosifica como DM4 libre.

Ejemplo E: Efecto del Compuesto 6 en Metástasis en Pulmón en un Modelo de Cáncer de Pulmón de Ratón

Células de cáncer de ratón 4T1-IRFP se derivaron de carcinoma mamario de ratón y se transfectaron con proteína fluorescente casi infrarrojo (IRFP), se cultivaron como una monocapa a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% CO₂. Las células se pasaron entre uno y tres días antes de la implantación y el medio se reemplazó cada 2-3 días según fuera necesario para mantener la viabilidad celular. No se permitió que las células excedieran 80%

de confluencia. El día de la implantación, las células se tripsinizaron, se lavaron con medio completo y se sedimentaron por centrifugación a 1200 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se decantó y las células se lavaron tres veces con PBS estéril y se sedimentaron por centrifugación. Durante la centrifugación final, se determinó la viabilidad por exclusión con azul de tripán. Las células se resuspendieron en PBS estéril a una concentración final de 5×10^5 células/100 μ l. Las células se extrajeron en jeringas de tuberculina estériles de 1 cc con una aguja de calibre 27. Se eliminaron las burbujas de aire y se expulsó el exceso de mezcla de células al tubo cónico, dejando un volumen de inyección de 100 μ l en cada jeringa. Los 100 μ l de células se inyectaron directamente en la vena media de la cola de ratones *Foxn^{nu}* desnudos atímicos hembras de seis semanas de edad (Taconic Labs Cat# NCRNU-F).

Tres días después de la inyección celular, a los ratones se les administraron dosis intraperitoneales de vehículo o 2.5 mg/kg de Compuesto 6 una vez al día durante 2 días seguido de 2 días sin tratamiento, seguido de una dosis única de Compuesto 6, para un total de tres dosis totales de Compuesto 6. Once días después de la inyección, los ratones se sacrificaron y se extrajeron los pulmones para la formación de imágenes usando el generador de imágenes de animales pequeños LI-COR PEARL Trilogy para visualizar y cuantificar la metástasis pulmonar y evaluar el efecto del compuesto sobre el crecimiento tumoral.

La FIG. 5A representa la vista ventral y los pulmones extraídos de ratones desnudos inoculados con células fluorescentes 4T1-RFP por inyección en la vena de la cola y fotografiados 11 días después de la inoculación y después de 3 dosis de vehículo o Compuesto 6.

La FIG. 5B representa una gráfica de la señal fluorescente de pulmones extraídos de ratones inoculados con 4T1-RFP después de 3 dosis de vehículo o Compuesto 6.

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 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.