

CONJUGADOS DE ANTICUERPO-FÁRMACO ANTI-EGFR

CAMPO DE LA INVENCIÓN

5 La presente solicitud se relaciona con
conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC, por sus siglas en
inglés) antirreceptores del factor de crecimiento
epidérmico (EGFR, por sus siglas en inglés) novedosos que
inhiben la Bcl-xL, incluidas composiciones y métodos que
10 usan tales ADC, y métodos para elaborar tales ADC.

ANTECEDENTES

El receptor del factor de crecimiento epidérmico
15 humano (también conocido como HER-1 o Erb-B1 y denominado
en la presente descripción "EGFR") es un receptor
transmembranario de 170 kDa codificado por el protooncogén
c-erbB. (Modjtahedi et al., Br. J. Cancer 73:228-235
(1996); Herbst and Shin, Cancer 94:1593-1611 (2002)). La
20 entrada en la base de datos SwissProt P00533 proporciona
la secuencia de EGFR humano.

La unión al ligando mediante el EGFR activa la
homodimerización y/o la heterodimerización del receptor y
la autofosforilación de residuos citoplásmicos clave y
25 MUC1. El EGFR fosforilado activa complejas cascadas de
señalización secuencia abajo. Se ha registrado la

sobreexpresión de EGFR en numerosas neoplasias malignas humanas y se ha asociado con un mal pronóstico para los pacientes. (Herbst and Shin, Cancer 94:1593-1611 (2002); y Modjtahedi et al., Br. J. Cancer 73:228-235 (1996)).

5 Los conjugados anticuerpo-fármaco representan una clase de opción terapéutica que comprende un anticuerpo conjugado con un fármaco citotóxico a través de un enlazador químico. El diseño de ADC contra el EGFR ha sido un desafío, debido a la expresión cutánea del EGFR y a la toxicidad
10 cutánea conocida de los anticuerpos dirigidos al EGFR. Los anticuerpos y los conjugados anticuerpo-fármaco anti-EGFR también se describen en la patente de EE. UU. núm. 9.493.568 y en la publicación de la solicitud de patente de EE. UU. núm. 2019/0343961, que se incorporan en esta descripción en
15 su totalidad mediante referencia. Una primera generación de ADC para EGFR fue depatuxizumab mafodotina, que utiliza el enlazador de maleimidocaproil y la citotoxina de microtúbulos monometil auristatina F (MMAF). Sin embargo, los pacientes que recibieron depatux-m han experimentado efectos
20 secundarios oculares frecuentes (p. ej., queratoconjuntivitis seca, visión borrosa, dolor ocular, fotofobia, queratitis, depósitos corneales y ojos llorosos).

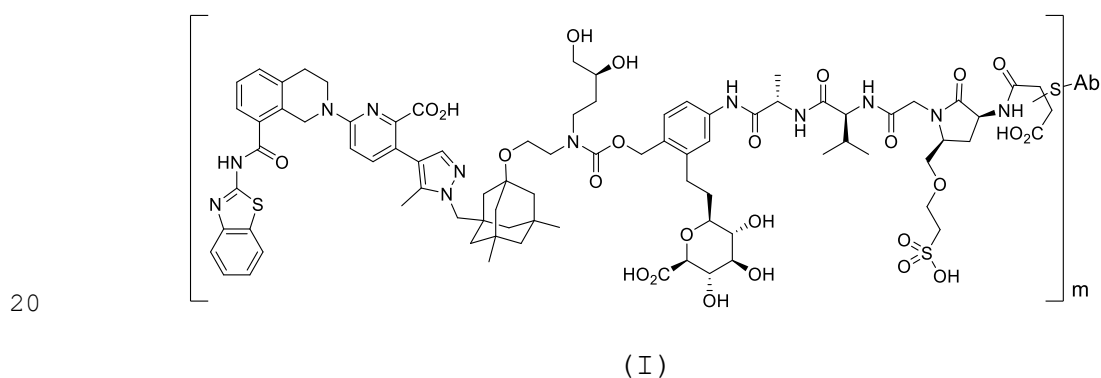
Dada la toxicidad ocular del depatux-m, un ADC de segunda generación dirigido al EGFR, losatuxizumab vedotina,
25 se conjugó con una toxina diferente. El componente de anticuerpo de este dADC, losatuxizumab, se maduró por

afinidad de manera que tenía una mayor afinidad por el EGFR (tanto silvestre como mutante) en comparación con deparux-m. Sin embargo, la frecuencia relativamente alta de las reacciones de infusión hizo necesario el cierre temprano de la prueba de fase 1 del losatuxizumab vedotina. Véase Cleary et al., Investigational New Drugs 38, 1483-1494 (2020).

Por consiguiente, existe la necesidad de desarrollar nuevos ADC anti-EGFR, y en particular ADC para EGFR que puedan administrarles selectivamente Bcl-xL a células cancerosas diana (p. ej., células que expresan EGFRvIII), representa un descubrimiento significativo.

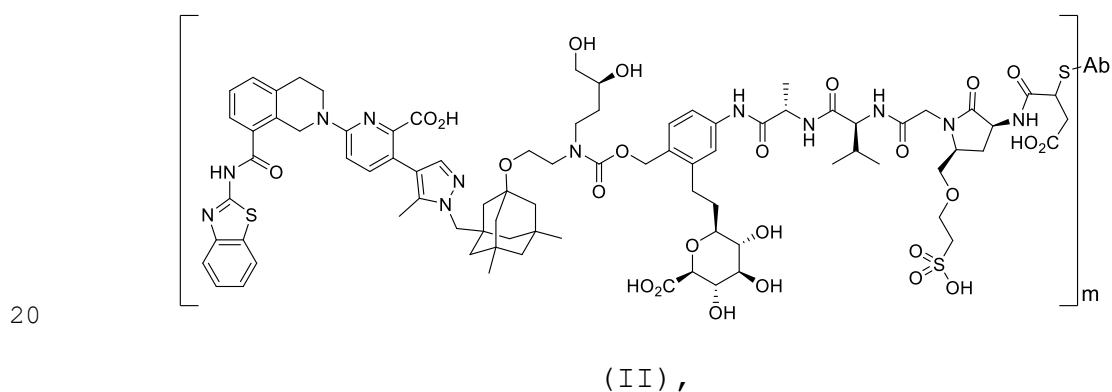
SUMARIO

Un aspecto se relaciona con un conjugado anticuerpo-fármaco antirreceptor del factor de crecimiento epidérmico humano (hEGFR) que comprende la estructura de la Fórmula (I) conjugada con un anticuerpo Ab:



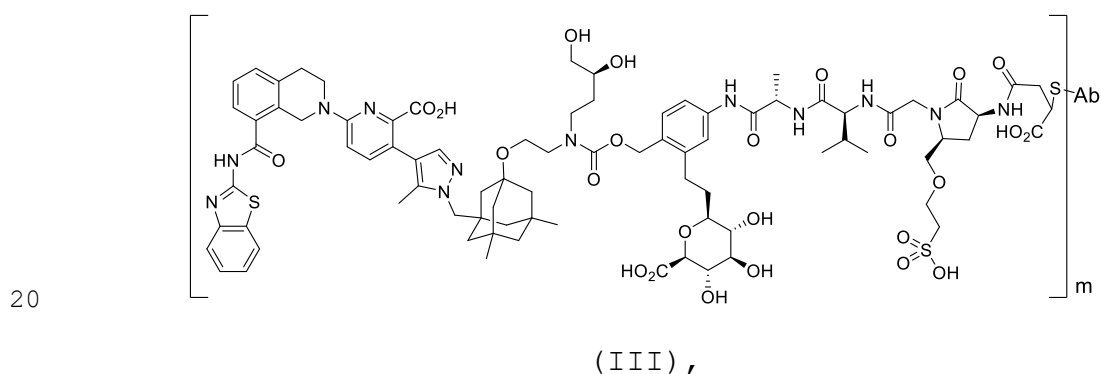
en donde Ab es un anticuerpo IgG1 anti-hEGFR que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos que se indica como la sec. con núm. de ident.: 1 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos que se indica como la sec. con núm. de ident.: 5; y en donde m es 2. En modalidades, la estructura de la Fórmula (I) se conjuga con el anticuerpo Ab a través de la C220 de la cadena pesada (es decir, C219 de la sec. con núm. de ident.: 1). En modalidades, la presente descripción proporciona métodos para usar el conjugado anticuerpo-fármaco anti-EGFR para tratar carcinomas broncopulmonares no microcíticos. En modalidades, la presente descripción proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden dicho conjugado anticuerpo-fármaco anti-hEGFR.

Otro aspecto se relaciona con un conjugado anticuerpo-fármaco antirreceptor del factor de crecimiento epidérmico humano que comprende la estructura de la Fórmula (II) conjugada con un anticuerpo Ab:



en donde Ab es un anticuerpo IgG1 antirreceptor del factor de crecimiento epidérmico humano que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos que se indica como sec. con núm. de ident.: 1 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos que se indica como sec. con núm. de ident.: 5, y en donde m es 2. En modalidades, la estructura de la Fórmula (II) se conjuga con el anticuerpo Ab a través de la C220 de la cadena pesada (es decir, C219 de la sec. con núm. de ident.: 1). En modalidades, la presente descripción proporciona métodos para usar el conjugado anticuerpo-fármaco anti-EGFR para tratar carcinomas broncopulmonares no microcíticos. En modalidades, la presente descripción proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden dicho conjugado anticuerpo-fármaco anti-hEGFR.

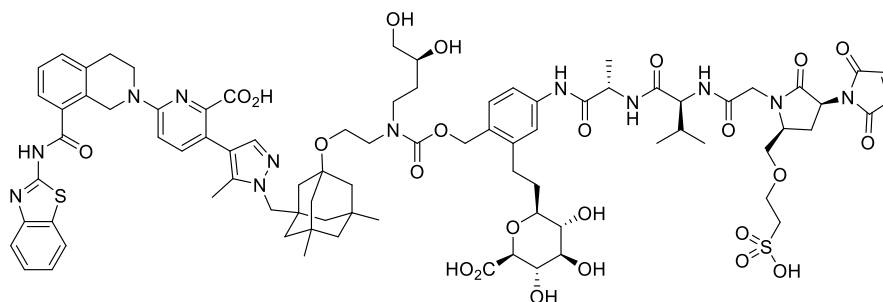
Otro aspecto se relaciona con un conjugado anticuerpo-fármaco antirreceptor del factor de crecimiento epidérmico humano que comprende la estructura de la Fórmula (III) conjugada con un anticuerpo Ab:



en donde Ab es un anticuerpo IgG1 antirreceptor del factor
 de crecimiento epidérmico humano que comprende una cadena
 pesada que comprende la secuencia de aminoácidos que se
 indica como la sec. con núm. de ident.: 1 y una cadena
 5 ligera que comprende la secuencia de aminoácidos que se
 indica como la sec. con núm. de ident.: 5; y en donde m es
 2. En modalidades, la estructura de la Fórmula (III) se
 conjuga con el anticuerpo Ab a través de la C220 de la
 cadena pesada (es decir, C219 de la sec. con núm. de
 10 ident.: 1). En modalidades, la presente descripción
 proporciona métodos para usar el conjugado anticuerpo-
 fármaco anti-EGFR para tratar carcinomas broncopulmonares
 no microcíticos. En modalidades, la presente descripción
 proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden
 15 dicho conjugado anticuerpo-fármaco anti-hEGFR.

Otro aspecto se relaciona con un método para
 producir un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) que comprende
 una etapa de conjugar un anticuerpo IgG₁ monoclonal humano
 anti-EGFR con un sintón que comprende la estructura (AAA):

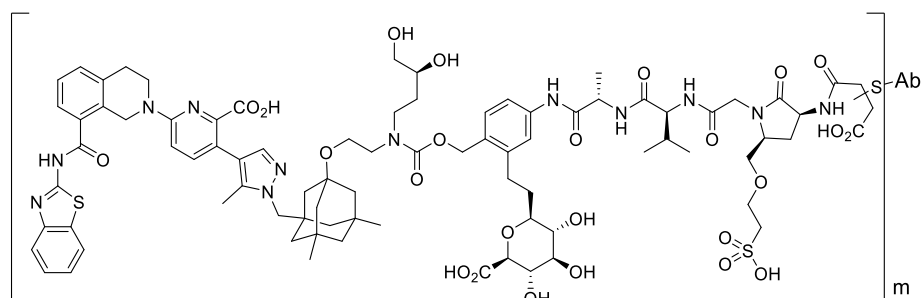
20



(IV) ,

para formar un conjugado anticuerpo-fármaco que comprende un fármaco-enlazador conjugado con el anticuerpo anti-EGFR, en donde el anticuerpo anti-EGFR comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos que se indica como sec. con núm. de ident.: 1 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos que se indica como sec. con núm. de ident.: 5. En modalidades, el fármaco-enlazador se conjuga con el anticuerpo a través de la C220 de la cadena pesada (es decir, C219 de la sec. con núm. de ident.: 1).

Otro aspecto se relaciona con un proceso para la preparación de un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) de acuerdo con la Fórmula (I):



(I),

en donde Ab es un anticuerpo IgG1 antirreceptor del factor de crecimiento epidérmico humano que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos que se indica como la sec. con núm. de ident.: 1 y una cadena ligera

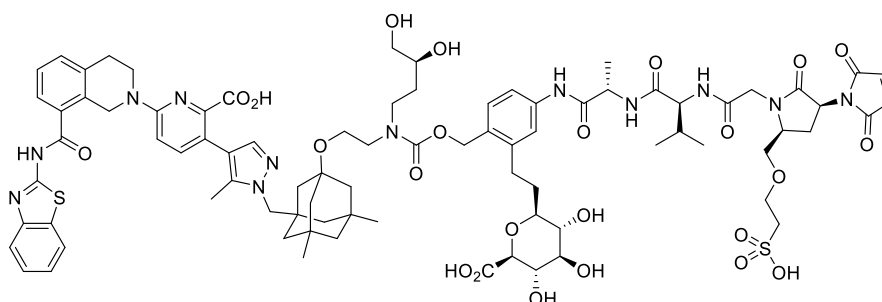
que comprende la secuencia de aminoácidos que se indica como la sec. con núm. de ident.: 5; y m es 2;

el proceso comprende:

5 tratar un anticuerpo en una solución acuosa amortiguadora con una cantidad eficaz de un agente reductor de disulfuro durante aproximadamente 16-24 horas;

añadir a la solución de anticuerpo reducida una

10 solución de dimetilacetamida que comprende un sintón que tiene la siguiente estructura:



(IV) ;

15 permitir que la reacción transcurra para formar el ADC;

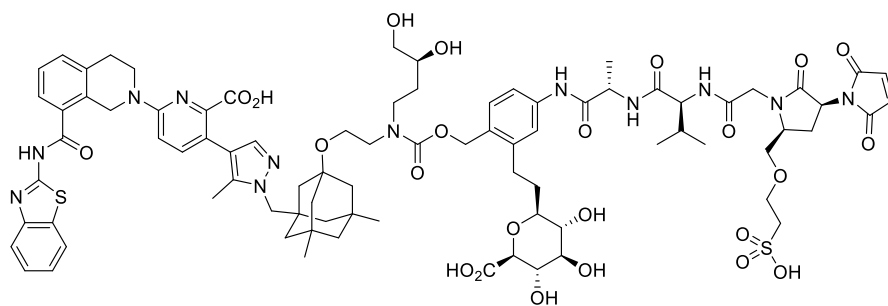
en donde la masa se desplaza por 18 ± 2 amu para cada hidrólisis de una succinimida en una

20 succinamida como se mide por espectrometría de masas de tipo electrospray; y

en donde el ADC se purifica opcionalmente por cromatografía de interacción hidrófoba (HIC, por sus siglas en inglés). En modalidades, la solución acuosa amortiguadora es una solución acuosa amortiguadora con un pH de aproximadamente 7,4. En modalidades, el anticuerpo se trata con el agente reductor de disulfuro en la solución acuosa amortiguadora a aproximadamente 4 °C durante aproximadamente 16-24 horas. En modalidades, el anticuerpo reducido se añade a la solución de dimetilacetamida que comprende el sintón y se deja que la reacción transcurra durante aproximadamente 60 minutos para formar el ADC. En modalidades, después de que se forma el ADC, la reacción se neutraliza con aproximadamente 2 equivalentes de N-acetil-L-cisteína. En modalidades, el proceso comprende además purificar con cromatografía de interacción hidrófoba (HIC). En modalidades, el proceso comprende además hidrolizar la succinimida con un tampón de pH, como un tampón con un pH de aproximadamente 8-9. En modalidades, el proceso comprende además purificar con filtración de flujo tangencial (TFF). En modalidades, el fármaco enlazador se conjuga con el anticuerpo Ab anti-EGFR a través de la C220 de la cadena pesada (es decir, C219 de la sec. con núm. de ident.: 1).

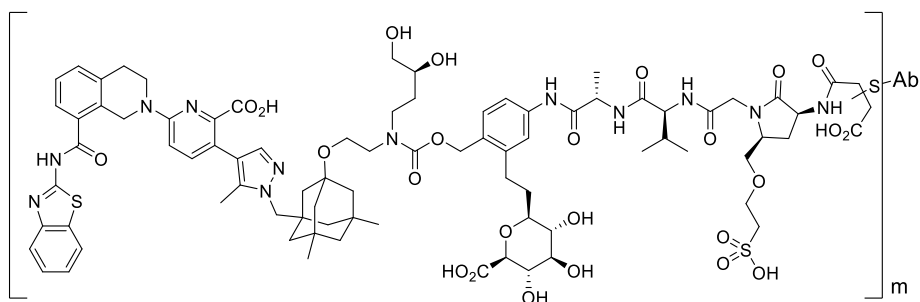
Otro aspecto se relaciona con un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) preparado mediante un método que comprende una etapa de conjugar un anticuerpo IgG₁ monoclonal humano anti-EGFR con un sintón que comprende la estructura:

5



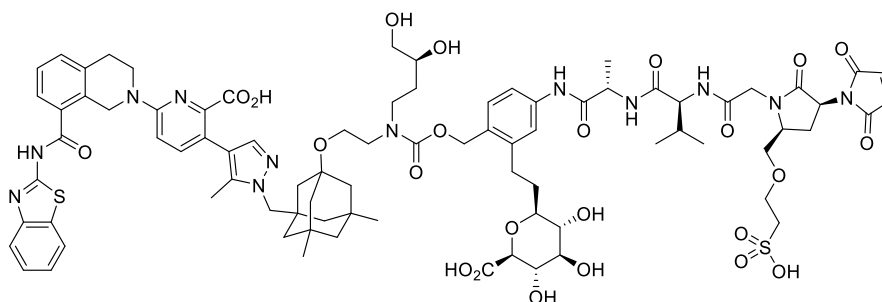
en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos que se indica como sec. con núm. de ident.: 1 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos que se indica como sec. con núm. de ident.: 5. En modalidades, el fármaco-enlazador se conjuga con el anticuerpo anti-EGFR a través de la C220 de la cadena pesada (es decir, C219 de la sec. con núm. de ident.: 1).

Otro aspecto se relaciona con un proceso para la preparación de un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) de acuerdo con la Fórmula (I):



(I),

en donde Ab es un anticuerpo IgG1 antirreceptor
 del factor de crecimiento epidérmico humano que
 comprende una cadena pesada que comprende la
 secuencia de aminoácidos que se indica como el
 núm.: 1 y una cadena ligera que comprende la
 secuencia de aminoácidos que se indica en la sec.
 con núm. de ident.: 5; y
 m es 2;
 el proceso comprende:
 tratar un anticuerpo en una solución acuosa
 amortiguadora con un pH de aproximadamente 7,4 con
 una cantidad eficaz de un agente reductor de
 disulfuro a aproximadamente 4 °C durante
 aproximadamente 16-24 horas;
 permitir que la solución de anticuerpo reducida
 se caliente a temperatura ambiente;
 añadir a la solución de anticuerpo reducida una
 solución de dimetilacetamida que comprende un
 sintón que tiene la siguiente estructura:



(IV) ;

permitir que la reacción transcurra durante
 5 aproximadamente 60 minutos para formar el ADC;
 neutralizar con aproximadamente 2 equivalentes
 de *N*-acetil-L-cisteína;
 purificar con cromatografía de interacción
 hidrófoba (HIC);
 10 purificar con filtración de flujo tangencial
 (TFF);
 hidrolizar la succinimida con un amortiguador de
 pH de aproximadamente 8-9; y
 purificar con filtración de flujo tangencial
 15 (TFF);
 en donde la masa se desplaza por 18 ± 2 amu para
 cada hidrólisis de una succinimida en una
 succinamida como se mide por espectrometría de
 masas de tipo electrospray; y
 20 en donde el ADC se purifica opcionalmente por
 cromatografía de interacción hidrófoba. En
 modalidades, el fármaco enlazador se conjuga con

el anticuerpo anti-EGFR a través de la C220 de la cadena pesada (es decir, C219 de la sec. con núm. de ident.: 1).

5

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra la unión de AM2-AAA, AM2 y MSL109 hIgG1 a A-431 (carcinoma epidermoide humano) y NCI-H1650 (carcinomas broncopulmonares no microcíticos) según lo evaluado mediante FACS.

La Figura 2 muestra que el AM2-AAA rompe los complejos BIM-Bcl-xL y favorece la activación de la caspasa y la ruptura de los complejos Bcl-xL-BIM en células (A) A-431 (carcinoma epidermoide humano) y (B) NCI-H1650 (carcinomas broncopulmonares no microcíticos) después del tratamiento con AM2-AAA, MSL109 hIgG-AAA o AM2.

La Figura 3 muestra la inhibición del crecimiento del xenoinjerto de EBC-1 (carcinoma epiermoide pulmonar humano) y H441 (adenocarcinoma pulmonar humano) después del tratamiento con AM2B-AAA, AM7-AAA, DTX y combinaciones de DTX con AM2B-AAA o AM7-AAA. Si bien el AM7 es un anticuerpo de mayor afinidad que el AM2B, el AM2B-AAA logró una eficacia similar a la del AM7-AAA en modelos de eficacia preclínica.

BREVE DESCRIPCIÓN DEL LISTADO DE SECUENCIAS

En la presente descripción se incorpora como referencia en su totalidad un listado de secuencias titulado

5 “ABV12608USO1 Sequence Listing_ST25.txt”, que comprende la sec. con núm. de ident.: 1 a la sec. con núm. de ident.: 30, que incluye las secuencias de aminoácidos descritas en la presente descripción. El listado de secuencias se presentó

junto con la presente en formato de texto ASCII a través de

10 EFS. El Listado de secuencias se creó por primera vez el 13 de enero de 2022 y tiene un tamaño de 71.052 bytes.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Diversos aspectos de la presente descripción se refieren a nuevos conjugados anticuerpo-fármaco (ADC; también denominados inmunoconjugados) anti-EGFR y a composiciones farmacéuticas de estos. En particular, la presente descripción describe nuevos ADC anti-EGFR que comprenden inhibidores de Bcl-xL, sintones útiles para sintetizar los ADC, composiciones que comprenden los ADC, métodos para elaborar los ADC y diversos métodos de uso de los ADC.

Los expertos en la técnica apreciarán que los diversos inhibidores de Bcl-xL, ADC y/o sintones de ADC descritos en la presente descripción pueden encontrarse en forma de sales y, en determinadas modalidades, en particular sales farmacéuticamente aceptables. Los compuestos de la presente descripción que poseen un grupo funcional lo suficientemente ácido, lo suficientemente básico, o ambos, pueden reaccionar con cualquiera de una serie de bases inorgánicas, y ácidos inorgánicos y orgánicos, para formar una sal. De manera alternativa, los compuestos con carga inherente, como los que tienen un nitrógeno cuaternario, pueden formar una sal con un contraión adecuado.

En la presente descripción, si se incluyen tanto diagramas estructurales como nomenclatura y si la nomenclatura no coincide con el diagrama estructural, tiene prevalencia el diagrama estructural.

Definiciones

Para que la invención pueda comprenderse más fácilmente, en primer lugar se definen ciertos términos. Además, cabe destacar que siempre que se mencione un valor o
5 rango de valores de un parámetro, también deben considerarse parte de la invención valores y rangos intermedios de los valores mencionados. Además, a menos que se defina de cualquier otra manera en la presente descripción, los términos científicos y técnicos usados en relación con la
10 presente descripción tendrán los significados que comúnmente comprenden los expertos en la técnica.

El término “anticuerpo antirreceptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)”, como se describe en esta descripción, se refiere a un anticuerpo que se une
15 específicamente al EGFR. Un anticuerpo “que se une” a un antígeno de interés, es decir, EGFR, es uno capaz de unirse a ese antígeno con suficiente afinidad de tal manera que el anticuerpo sea útil para unirse a una célula que expresa el antígeno. En modalidades, el anticuerpo se une
20 específicamente al EGFR humano (hEGFR). A continuación se describen ejemplos de anticuerpos anti-EGFR. A menos que se indique de cualquier otra manera, el término “anticuerpo anti-EGFR” se refiere a un anticuerpo que se une a un EGFR natural o a cualquier variante de EGFR, como EGFRvIII.

La secuencia de aminoácidos del EGFR humano natural se proporciona a continuación como sec. con núm. de ident.: 15, que incluye el péptido señal (residuos de aminoácidos 1-24) y los residuos de aminoácidos del dominio extracelular (ECD, residuos de aminoácidos 25-645). Un ECD natural truncado del EGFR (también denominado en la presente descripción EGFR(1-525)) corresponde a la sec. con núm. de ident.: 16 y es equivalente a los aminoácidos 1-525 de la sec. con núm. de ident.: 15. La forma madura del EGFR natural corresponde a la proteína sin el péptido señal, es decir, los residuos de aminoácidos 25 a 1210 de la sec. con núm. de ident.: 15.

La secuencia de aminoácidos del ECD del EGFR humano se proporciona a continuación como sec. con núm. de ident.: 17 e incluye la secuencia señal.

EGFRvIII es la variante de EGFR más común en tipos de cáncer humano (Kuan et al. Endocr Relat Cancer. 8(2):83-96 (2001)). Durante el proceso de amplificación de genes, se produce una eliminación de 267 aminoácidos en el dominio extracelular del EGFR con un residuo de glicina insertado en la unión de la fusión. Por lo tanto, el EGFRvIII carece de los aminoácidos 6-273 del dominio extracelular del EGFR natural e incluye la inserción de un residuo de glicina en la unión. La variante EGFRvIII de EGFR contiene una eliminación de 267 residuos de aminoácidos en el dominio extracelular donde se inserta una glicina en la unión de

la eliminación. La secuencia de aminoácidos del EGFRvIII se muestra más adelante como sec. con núm. de ident.: 18.

Los términos “unión específica” o “que se une específicamente”, como se usan en la presente descripción, con referencia a la interacción de un anticuerpo o un ADC con una segunda especie química, significan que la interacción depende de la presencia de una estructura en particular (p. ej., un determinante antigénico o epítipo) en la especie química; por ejemplo, un anticuerpo reconoce y se une a una estructura de proteína específica en lugar de a proteínas generalmente. Si un anticuerpo o ADC es específico para el epítipo “A”, la presencia de una molécula que contenga el epítipo A (o A libre, no marcado) en una reacción que contenga “A” marcado y el anticuerpo reducirá la cantidad de A marcado unido al anticuerpo o ADC.

El término “anticuerpo” se refiere a una molécula de inmunoglobulina que se une específicamente a un antígeno y comprende dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L). Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de cadena pesada (abreviada en la presente descripción HCVR o VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada está compuesta por tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de cadena ligera (abreviada en la presente descripción como LCVR o VL) y una

región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está compuesta por un dominio, CL. Las regiones VH y VL pueden subdividirse además en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada VH y VL comprende tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino hasta el extremo carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

En determinadas modalidades, un anticuerpo puede comprender una cadena pesada que tiene eliminaciones de 1-5 aminoácidos en el extremo carboxilo de la cadena pesada.

Un “anticuerpo aislado”, como se usa en esta descripción, pretende hacer referencia a un anticuerpo que sustancialmente no tiene otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (p. ej., un anticuerpo aislado que se une específicamente al EGFR sustancialmente no tiene anticuerpos que se unan específicamente a antígenos que no sean EGFR). Sin embargo, un anticuerpo aislado que se une específicamente al EGFR humano puede tener reactividad cruzada con otros antígenos, tal como moléculas del EGFR de otras especies. Asimismo, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o sustancias químicas.

El término “epítipo” se refiere a una región de un antígeno a la que se une un anticuerpo o ADC. En modalidades,

los determinantes epítomos incluyen agrupaciones de moléculas de superficie químicamente activas como aminoácidos, cadenas laterales de azúcares, grupos fosforilo o sulfonilo y, en modalidades, pueden tener características estructurales tridimensionales específicas y/o características de carga específicas. En modalidades, se dice que un anticuerpo se une específicamente a un antígeno cuando reconoce de manera preferencial su antígeno de interés en una mezcla compleja de proteínas y/o macromoléculas. En modalidades, los anticuerpos de la invención se unen a un epítomo definido por la secuencia de aminoácidos CGADSYEMEEDGVRKC (la sec. con núm. de ident.: 20) (que corresponde a los residuos de aminoácidos 287-302 de la forma madura del hEGFR).

El término “resonancia de plasmones superficiales”, como se usa en esta descripción, se refiere a un fenómeno óptico que permite analizar interacciones bioespecíficas en tiempo real mediante la detección de alteraciones en las concentraciones proteicas dentro de una matriz de biosensor, por ejemplo, mediante el uso del sistema BIAcore (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden y Piscataway, NJ). Para consultar descripciones más detalladas, véase Jönsson, U., et al. (1993) Ann. Biol. Clin. 51:19-26; Jönsson, U., et al. (1991) Biotechniques 11:620-627; Johnson, B., et al. (1995) J. Mol. Reconocimiento. 8:125-131; y Johnson, B., et al. (1991) Anal. Biochem. 198:268-277.

Se pretende que el término “ k_a ”, como se usa en esta descripción, haga referencia a la constante de asociación para la asociación de un anticuerpo al antígeno con el fin de formar el complejo anticuerpo/antígeno.

5 Se pretende que el término “ k_d ”, como se usa en esta descripción, haga referencia a la constante de disociación para la disociación de un anticuerpo del complejo anticuerpo/antígeno.

Se pretende que el término “ K_D ”, como se usa en
10 esta descripción, haga referencia a la constante de disociación en equilibrio de una interacción anticuerpo-antígeno en particular (p. ej., anticuerpo AM2 y EGFR). La K_D se calcula mediante k_a / k_d .

El término “conjugado anticuerpo-fármaco” o “ADC”
15 se refiere a una proteína de unión, como un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno de este, enlazada químicamente a uno o más fármacos químicos (también denominados en la presente descripción agentes o cargas útiles) que, opcionalmente, pueden ser agentes terapéuticos o citotóxicos.
20 En modalidades, un ADC incluye un anticuerpo, un fármaco citotóxico o terapéutico y un enlazador que permite la unión o conjugación del fármaco con el anticuerpo. En esta descripción, el ADC comprende un anticuerpo anti-EGFR conjugado mediante un enlazador con un inhibidor de Bcl-xL.

Los términos “conjugado anticuerpo-fármaco antirreceptor del factor de crecimiento epidérmico” o “conjugado anticuerpo-fármaco anti-EGFR” o “ADC anti-EGFR”, utilizados indistintamente en esta descripción, se refieren a un ADC que comprende un anticuerpo que se une específicamente al EGFR, mediante lo cual el anticuerpo se conjuga con uno o más agentes químicos. En esta descripción, un ADC anti-EGFR comprende el anticuerpo AM2 conjugado con un inhibidor de Bcl-xL.

10

Anticuerpos y conjugados anticuerpo-fármaco anti-EGFR

Los anticuerpos anti-EGFR descritos en la presente descripción proporcionan los ADC de la presente descripción con la capacidad de unirse al EGFR de manera que el fármaco citotóxico Bcl-xL unido al anticuerpo pueda administrarse en la célula que expresa EGFR.

En modalidades, la presente descripción proporciona un anticuerpo IgG1 anti-EGFR. En modalidades, el anticuerpo IgG1 anti-EGFR humanizado es AM2. El anticuerpo AM2 comprende una región variable de la cadena pesada que comprende un dominio CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos que se indica como sec. con núm. de ident.: 2, un dominio CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos que se indica como sec. con núm. de ident.: 3 y un dominio CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos que se indica como sec. con núm. de ident.: 4,

y una región variable de la cadena ligera que comprende un dominio CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos que se indica como sec. con núm. de ident.: 6; un dominio CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos que se indica como sec. con núm. de ident.: 7 y un dominio CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos que se indica como sec. con núm. de ident.: 8. El anticuerpo AM2 comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos que se indica como sec. con núm. de ident.: 22 y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos que se indica como sec. con núm. de ident.: 23. El anticuerpo AM2 comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos que se indica como sec. con núm. de ident.: 1 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos que se indica como sec. con núm. de ident.: 5.

El anticuerpo AM2 se une a una forma truncada del dominio extracelular (ECD) del EGFR que imita la conformación del EGFR activo con una mayor afinidad que el depatuxizumab (utilizado como el componente de anticuerpo del depatuxizumab mafodotina, ABT-414). A pesar de esta afinidad significativamente mayor por la forma activa del EGFR, el AM2 carece de unión cuantificable al ECD del EGFR natural completo. El anticuerpo AM2 mantiene las características de unión del anticuerpo AM1 (losatuxizumab, utilizado como el componente de anticuerpo

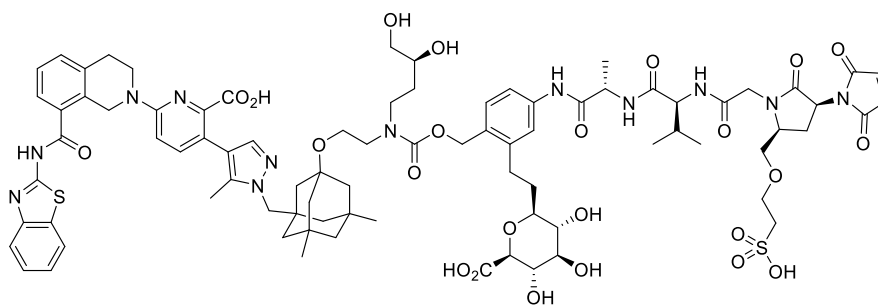
del losatuxizumab vedotina, ABBV-221), pero tiene una
 secuencia distinta para mitigar posibles problemas de
 seguridad, como las reacciones a la infusión observadas
 con el ABBV-221. El anticuerpo AM2 es del alotipo z,a, a
 5 diferencia del alotipo z, no a del losatuxizumab. El
 anticuerpo AM2 incorpora una mutación LALA, que reduce la
 interacción con los receptores Fcγ. El AM2 también
 incorpora una mutación C6v1 (LC:C214A), lo que permite la
 conjugación de sitio específico y una relación DAR
 10 controlada. En conjunto, la secuencia novedosa del AM2
 mitiga posibles problemas de seguridad, incluidos los
 observados con ADC anti-EGFR anteriores.

Pueden producirse anticuerpos mediante cualquiera
 de varias técnicas. Por ejemplo, la expresión a partir de
 15 células huésped, en donde un(os) vector(es) de expresión que
 codifica(n) las cadenas pesadas y ligeras se transfecta(n)
 en una célula huésped mediante técnicas habituales.

En modalidades, esta descripción proporciona un
 ADC anti-hEGFR que comprende un anticuerpo anti-hEGFR
 20 conjugado con un sintón, en donde el sintón es ácido 6-{8-
 [(1,3-benzotiazol-2-il)carbamoil]-3,4-dihidroisoquinolin-
 2(1H)-il}-3-[1-({3-[2-({[(2-{2-[(2S,3R,4R,5S,6S)-6-
 carboxi-3,4,5-trihidroxioxan-2-il]etil}-4-{[(2S)-2-
 {[(2S)-2-(2-{(3S,5S)-3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-
 25 1-il)-2-oxo-5-[(2-sulfoetoxi)metil]pirrolidin-1-
 il}acetamido)-3-

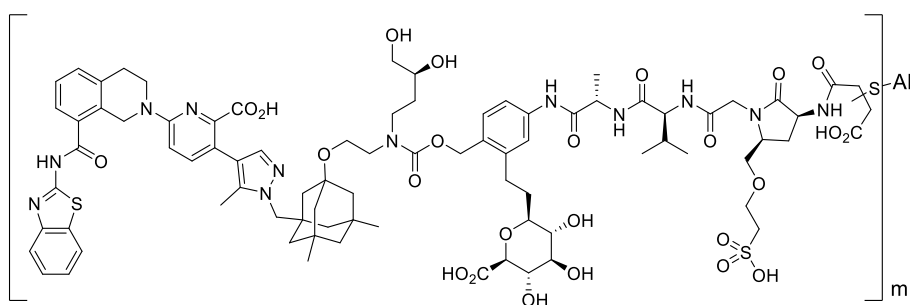
metilbutanoil]amino}propanoil]amino}fenil)metoxi]carbonil
 }[(3*S*)-3,4-dihidroxibutil]amino)etoxi]-5,7-
 dimetiladamantan-1-il}metil)-5-metil-1*H*-pirazol-4-
 il]piridin-2-carboxílico (“AAA”):

5



(IV) .

En modalidades, la presente descripción
 10 proporciona un conjugado anticuerpo-fármaco antirreceptor
 del factor de crecimiento epidérmico humano (EGFR) que
 comprende la siguiente estructura:



15

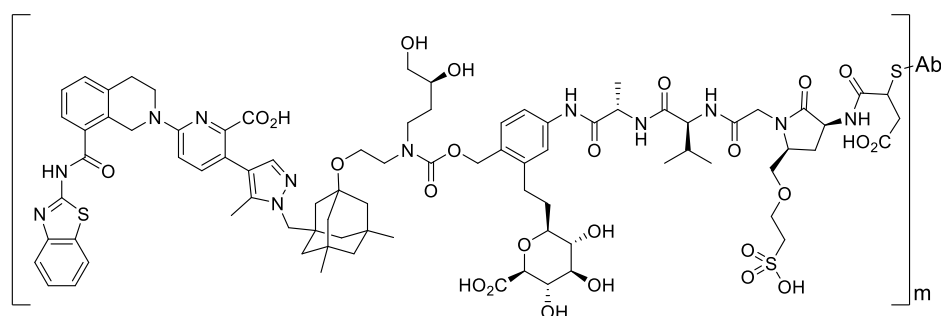
(I) ,

en donde *m* es un número entero y Ab es un anticuerpo IgG1
 anti-hEGFR. En modalidades, el anticuerpo comprende una

región variable de cadena pesada que comprende un dominio CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos que se indica como la sec. con núm. de ident.: 2, un dominio CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos que se indica como la sec. con núm. de ident.: 3 y un dominio CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos que se indica como la sec. con núm. de ident.: 4; y una región variable de cadena ligera que comprende un dominio CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos que se indica en la sec. con núm. de ident.: 6, un dominio CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos que se indica como la sec. con núm. de ident.: 7 y un dominio CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos que se indica como la sec. con núm. de ident.: 8. En modalidades, el anticuerpo Ab comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos que se indica como sec. con núm. de ident.: 22 y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos que se indica como sec. con núm. de ident.: 23. En modalidades, el anticuerpo Ab comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos que se indica como sec. con núm. de ident.: 1 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos que se indica como sec. con núm. de ident.: 5. En modalidades, m es un número entero entre 1 y 3. En modalidades, m es 2.

En modalidades, el anticuerpo se conjuga con la estructura de la Fórmula (I) a través de la C220 de la cadena pesada (es decir, C219 de la sec. con núm. de ident.: 1).

En modalidades, la presente descripción proporciona un conjugado anticuerpo-fármaco antirreceptor del factor de crecimiento epidérmico humano (EGFR) que comprende la siguiente estructura:



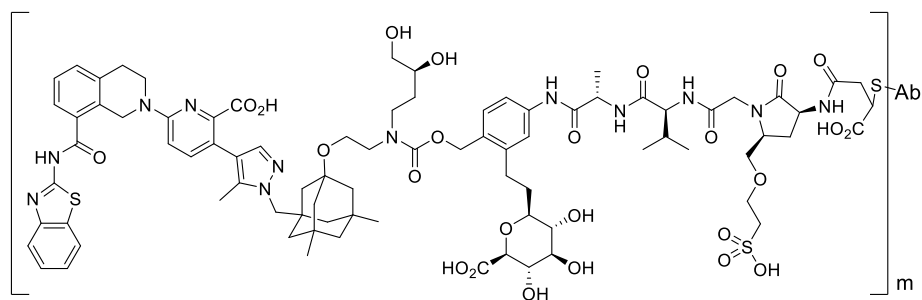
(II),

en donde m es un número entero y Ab es un anticuerpo IgG1 anti-hEGFR. En modalidades, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende un dominio CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos que se indica como la sec. con núm. de ident.: 2, un dominio CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos que se indica como la sec. con núm. de ident.: 3 y un dominio CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos que se indica como la sec. con núm. de ident.: 4; y una región variable de cadena ligera que comprende un dominio CDR1 de cadena ligera

que comprende la secuencia de aminoácidos que se indica en la sec. con núm. de ident.: 6, un dominio CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos que se indica como la sec. con núm. de ident.: 7 y un dominio CDR1
5 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos que se indica como la sec. con núm. de ident.: 8. En modalidades, el anticuerpo Ab comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos que se indica como sec. con núm. de ident.: 22
10 y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos que se indica como sec. con núm. de ident.: 23. En modalidades, el anticuerpo Ab comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos que se indica como sec. con núm. de ident.: 1 y una cadena
15 ligera que comprende la secuencia de aminoácidos que se indica como sec. con núm. de ident.: 5. En modalidades, m es un número entero entre 1 y 3. En modalidades, m es 2. En modalidades, el anticuerpo se conjuga con la estructura de la Fórmula (II) a través de la C220 de la cadena pesada
20 (es decir, C219 de la sec. con núm. de ident.: 1).

En modalidades, la presente descripción proporciona un conjugado anticuerpo-fármaco antirreceptor del factor de crecimiento epidérmico humano (EGFR) que comprende la siguiente estructura:

25



(III),

en donde m es un número entero y Ab es un anticuerpo IgG1
 5 anti-hEGFR. En modalidades, el anticuerpo comprende una
 región variable de cadena pesada que comprende un dominio
 CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de
 aminoácidos que se indica como la sec. con núm. de ident.:
 2, un dominio CDR2 de cadena pesada que comprende la
 10 secuencia de aminoácidos que se indica como la sec. con
 núm. de ident.: 3 y un dominio CDR1 de cadena pesada que
 comprende el secuencia de aminoácidos que se indica como
 la sec. con núm. de ident.: 4; y una región variable de
 cadena ligera que comprende un dominio CDR1 de cadena ligera
 15 que comprende la secuencia de aminoácidos que se indica en
 la sec. con núm. de ident.: 6, un dominio CDR2 de cadena
 ligera que comprende la secuencia de aminoácidos que se
 indica como la sec. con núm. de ident.: 7 y un dominio CDR1
 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos
 20 que se indica como la sec. con núm. de ident.: 8. En
 modalidades, el anticuerpo Ab comprende una región variable
 de la cadena pesada que comprende la secuencia de

aminoácidos que se indica como sec. con núm. de ident.: 22 y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos que se indica como sec. con núm. de ident.: 23. En modalidades, el anticuerpo Ab comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos que se indica como sec. con núm. de ident.: 1 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos que se indica como sec. con núm. de ident.: 5. En modalidades, m es un número entero entre 1 y 3. En modalidades, m es 2. En modalidades, el anticuerpo se conjuga con la estructura de la Fórmula (III) a través de la C220 de la cadena pesada (es decir, C219 de la sec. con núm. de ident.: 1).

En modalidades, los anticuerpos y conjugados anticuerpo-fármaco de la presente descripción, como el anticuerpo AM2 y el ADC AM2-AAA, se unen al EGFR(1-525) (sec. con núm. de ident.: 16) con una constante de disociación (K_D) de 1×10^{-6} M o menos, como entre 1×10^{-6} M y aproximadamente 1×10^{-10} M, o entre aproximadamente 1×10^{-6} M y aproximadamente 1×10^{-7} M, según lo determinado por resonancia de plasmones superficiales.

En modalidades, los anticuerpos de la presente descripción, como el anticuerpo AM2 y el ADC AM2-AAA, se unen al EGFRvIII (sec. con núm. de ident.: 18) con una K_D de aproximadamente 6×10^{-9} M o menos, o de aproximadamente $5,5 \times 10^{-9}$ M o menos, o de $5,0 \times 10^{-9}$ M o menos, según lo determinado por resonancia de plasmones superficiales.

Métodos de uso

Una modalidad se relaciona con un método para tratar carcinomas broncopulmonares no microcíticos, que comprende administrarle a un sujeto que tiene carcinomas
5 broncopulmonares no microcíticos un ADC anti-EGFR como se describe en la presente descripción, en una cantidad eficaz para proporcionar un beneficio terapéutico.

Ejemplos

10 Los siguientes ejemplos proporcionan métodos de síntesis para el inhibidor de Bcl-X_L (Ejemplo 1.1.17) y el sintón (AAA, Ejemplo 1). Pueden encontrarse métodos para sintetizar inhibidores de bcl-xL y sintones como AAA, por ejemplo, en la publicación de la solicitud de patente de
15 EE. UU. n.º 2019/0343961 (AbbVie, Inc.), que se incorpora en esta descripción en su totalidad mediante referencia.

Los ejemplos se nombraron mediante el uso de ACD/Name versión 2012 (Build 56084, 5 de abril de 2012, Advanced Chemistry Development Inc., Toronto, Ontario),
20 ACD/Name versión 2014 (Build 66687, 25 de octubre de 2013, Advanced Chemistry Development Inc., Toronto, Ontario), ACD/Name versión 2019.1.1 (Build 110555, 18 de julio de 2019, Advanced Chemistry Development Inc., Toronto, Ontario), ChemDraw® ver. 9.0.7 (CambridgeSoft, Cambridge,
25 MA), ChemDraw® Ultra ver. 12.0 (CambridgeSoft, Cambridge, MA), o ChemDraw® Professional ver. 15.0.0.106. Los

inhibidores de bcl-xL y los intermedios de sintones se nombraron con ACD/Name versión 2012 (Build 56084, 5 de abril de 2012, Advanced Chemistry Development Inc., Toronto, Ontario), ACD/Name versión 2014 (Build 66687, 25 de octubre de 2013, Advanced Chemistry Development Inc., Toronto, Ontario), ACD/Name versión 2019.1.1 (Build 110555, 18 de julio de 2019, Advanced Chemistry Development Inc., Toronto, Ontario), ChemDraw® ver. 9.0.7 (CambridgeSoft, Cambridge, MA), ChemDraw® Ultra ver. 12.0 (CambridgeSoft, Cambridge, MA), o ChemDraw® Professional Ver. 15.0.0.106.

Las siguientes son abreviaturas que pueden utilizarse en esta descripción:

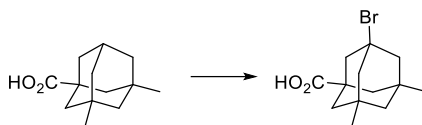
Abreviatura	Definición	Abreviatura	Definición
FACS	clasificación de células activada por fluorescencia	HIC	cromatografía de interacción hidrófoba
HEPES	Tampón de ácido <i>N</i> -2 hidroxietilpiperacín- <i>N</i> -etanosulfónico	HPLC	cromatografía de líquidos de alta resolución
DAR	relación de fármaco con respecto a anticuerpo	MS	espectrometría de masa
DMA	dimetilacetamida	PBS	solución salina tamponada con fosfato
DMSO	dimetilsulfóxido	NSCLC	carcinoma broncopulmonar no microcítico
FBS	suero bovino fetal	SEC	cromatografía de exclusión por tamaño
TCEP	(tris(2-carboxietil) fosfina)	q	cuarteto
ml	mililitro	min	minuto
NMR	resonancia magnética nuclear	ml	mililitro

Abreviatura	Definición	Abreviatura	Definición
LC/MS o LCMS o LC-MS	cromatografía de líquidos-espectrometría de masas	µl	microlitro
s	singulete	L	litro
br s	singulete amplio	g	gramo
d	duplete o doblete	mg	miligramo
m	multiplete	mmol	milimoles
t	triplete	dd	doblete de dobletes
td	triplete de dobletes	br t	triplete amplio
br d	doblete amplio	mM	milimolar
br m	multiplete amplio	ppm	partes por millón
M	molaridad (moles/litro)	DCI	ionización química por desorción
N	normalidad (equivalente/litro)	p/p	porcentaje en peso
APCI	ionización química a presión atmosférica	mm	milímetro
ESI	ionización por electronebulización	MHz	megahercio
m/z	masa dividida por el número de carga	µm	micrómetro
psi	libras por pulgada cuadrada	BIM	Proteína 11 similar a bcl-2
v/v	porcentaje en volumen	DPBS	solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco
SCID	inmunodeficiencia combinada grave		
TMP	presión transmembranaria		

Ejemplo 1: 6-{8-[(1,3-benzotiazol-2-il)carbamoil]-3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il}-3-[1-({3-[2-({[(2-{2-[(2S,3R,4R,5S,6S)-6-carboxi-3,4,5-trihidroxioxan-2-il]etil}-4-{[(2S)-2-{[(2S)-2-(2-{(3S,5S)-3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-2-oxo-5-[(2-sulfoetoxi)metil]pirrolidin-1-il}acetamido)-3-

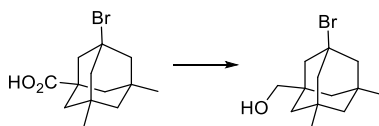
metilbutanoil]amino}propanoil]amino}fenil)metoxi]carbonil
}[(3*S*)-3,4-dihidroxiutil]amino)etoxi]-5,7-
dimetiladamantan-1-il}metil)-5-metil-1*H*-pirazol-4-
il]piridin-2-carboxílico (sintón AAA)

5



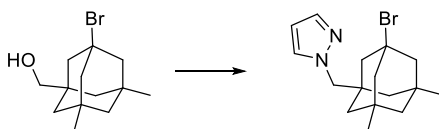
Ejemplo 1.1.1: ácido 3-bromo-5.7-dimetiladamantano-1-
carboxílico

10 En un matraz de fondo redondo de 50 ml a 0 °C,
se añadió bromo (16 ml). Se añadió polvo de hierro (7 g)
y la mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 30 minutos.
Se añadió ácido 3,5-dimetiladamantano-1-carboxílico (12
g). La mezcla se calentó a temperatura ambiente y se agitó
15 durante 3 días. Una mezcla de hielo y HCl concentrado se
vertió en la mezcla de reacción. La suspensión resultante
se trató dos veces con Na₂SO₃ (50 g en 200 ml de agua) y
se extrajo tres veces con diclorometano. Las fracciones
orgánicas combinadas se lavaron con 1 N de HCl acuoso, se
20 secaron con sulfato de sodio, se filtraron, y se
concentraron para obtener el compuesto del título.



Ejemplo 1.1.2: (3-bromo-5,7-dimetiladamantan-1-il)metanol

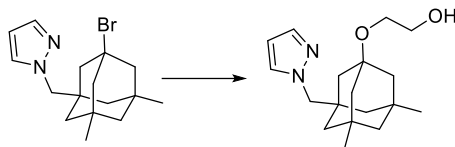
A una solución del Ejemplo 1.1.1 (15,4 g) en tetrahidrofurano (200 mL) se le añadió BH_3 (1 M en tetrahidrofurano, 150 mL) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Después, la mezcla de reacción se neutralizó cuidadosamente mediante la adición de metanol gota a gota. A continuación, la mezcla se concentró al vacío y el residuo se repartió entre acetato de etilo (500 mL) y 2 N de HCl acuoso (100 mL). La fase acuosa se extrajo adicionalmente dos veces con acetato de etilo, y los extractos orgánicos combinados se lavaron con agua y salmuera, se secaron con sulfato de sodio, y se filtraron. El filtrado se concentró para obtener el compuesto del título.



Ejemplo 1.1.3: 1-[(3-bromo-5,7-dimetiladamantan-1-il)metil]-1H-pirazol

A una solución del Ejemplo 1.1.2 (8,0 g) en tolueno (60 mL) se le añadió 1H-pirazol (1,55 g) y cianometiltributilfosforano (2,0 g) y la mezcla se agitó a 90 °C durante la noche. La mezcla de reacción se concentró, y el residuo se purificó por cromatografía en columna con

gel de sílice (heptano:acetato de etilo 10:1) para obtener el compuesto del título. MS (ESI) m/z 324,2 (M+H)⁺.

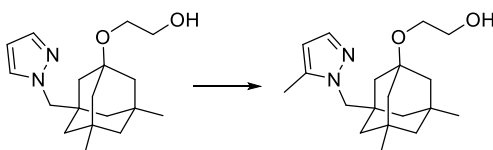


5

Ejemplo 1.1.4: 2-({3,5-dimetil-7-[(1H-pirazol-1-il)metil]adamantan-1-il}oxi)etan-1-ol

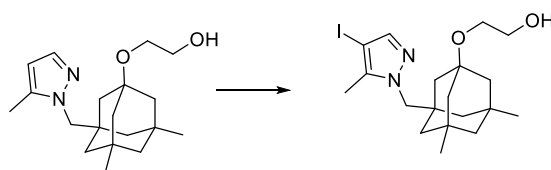
A una solución del Ejemplo 1.1.3 (4,0 g) en etano-1,2-diol (12 ml) se añadió trietilamina (3 ml). La
10 mezcla se agitó a 150 °C en condiciones de microondas (Biotage® Initiator) durante 45 minutos. La mezcla se vertió en agua (100 ml) y se extrajo tres veces con acetato de etilo. Los extractos orgánicos combinados se lavaron con agua y salmuera, se secaron con sulfato de sodio, y se
15 filtraron. La concentración del filtrado dio lugar a un residuo que se purificó por cromatografía con gel de sílice, eluyendo con acetato de etilo al 20 % en heptano, seguido de metanol al 5 % en diclorometano, para obtener el compuesto del título. MS (ESI) m/z 305,2 (M+H)⁺.

20



Ejemplo 1.1.5: 2-({3,5-dimetil-7-[(5-metil-1*H*-pirazol-1-il)metil]adamantan-1-il}oxi)etan-1-ol

A una solución enfriada (-78 °C) del Ejemplo 1.1.4 (6,05 g) en tetrahidrofurano (100 mL) se le añadió *n*-butil-litio (40 mL, 2,5 M en hexano) y la mezcla se agitó a -78 °C durante 1,5 horas. Se añadió yodometano (10 mL) con una jeringa y la mezcla se agitó a -78 °C durante 3 horas. Después, la mezcla de reacción se neutralizó con NH₄Cl acuoso y se extrajo dos veces con acetato de etilo, y los extractos orgánicos combinados se lavaron con agua y salmuera. Después del secado con sulfato de sodio, la solución se filtró y se concentró y el residuo se purificó por cromatografía en columna con gel de sílice, eluyendo con metanol al 5 % en diclorometano, para obtener el compuesto del título. MS (ESI) *m/z* 319,5 (M+H)⁺.



Ejemplo 1.1.6: 2-({3-[(4-yodo-5-metil-1*H*-pirazol-1-il)metil]-5,7-dimetiladamantan-1-il}oxi)etan-1-ol

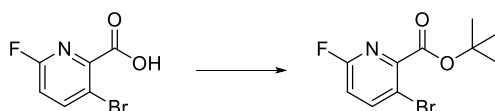
A una solución del Ejemplo 1.1.5 (3,5 g) en *N,N*-dimetilformamida (30 mL) se le añadió *N*-yodosuccinimida (3,2 g) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 horas. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de

etilo (600 ml) y se lavó con NaHSO₃ acuoso al 10 % en p/p, agua y salmuera. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía con gel de sílice, eluyendo con acetato de etilo al 20 % en diclorometano, para obtener el compuesto del título. MS (ESI) *m/z* 445,3 (M+H)⁺.



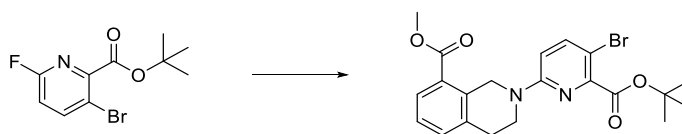
10 Ejemplo 1.1.7: ácido 3-bromo-6-fluoropiridina-2-carboxílico

Se añadió una suspensión de ácido 6-amino-3-bromopiridin-2-carboxílico (25 g) en diclorometano/cloroformo (400 mL) 1:1 a tetrafluoroborato de nitrosonio (18,2 g) en diclorometano (100 mL) a 5 °C durante 1 hora. La mezcla resultante se agitó durante 30 minutos más, a continuación se calentó a 35 °C y se agitó durante la noche. La reacción se enfrió a temperatura ambiente, y después se ajustó el pH 4 con solución acuosa de NaH₂PO₄. La solución resultante se extrajo tres veces con diclorometano y los extractos combinados se lavaron con salmuera, se secaron con sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron para proporcionar el compuesto del título.



Ejemplo 1.1.8: 3-bromo-6-fluoropiridina-2-carboxilato de
terc-butilo

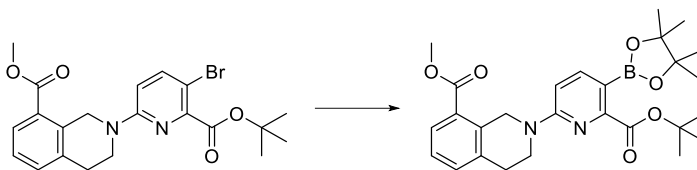
Se añadió cloruro de *para*-toluensulfonilo (27,6 g) a una solución del Ejemplo 1.1.7 (14,5 g) y piridina (26,7 mL) en diclorometano (100 mL) y *terc*-butanol (80 mL) a 0 °C. La reacción se agitó durante 15 minutos, y a continuación se calentó a temperatura ambiente, y se agitó durante la noche. La solución se concentró y se repartió entre acetato de etilo y solución acuosa saturada de Na₂CO₃. Las fases se separaron, y la fase acuosa se extrajo con acetato de etilo. Las fases orgánicas se combinaron, se aclararon con solución acuosa de Na₂CO₃ y salmuera, se secaron con sulfato de sodio, se filtraron, y se concentraron para proporcionar el compuesto del título.



Ejemplo 1.1.9: 2-[5-bromo-6-(terc-butoxicarbonil)piridin-2-il]-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-8-carboxilato de metilo

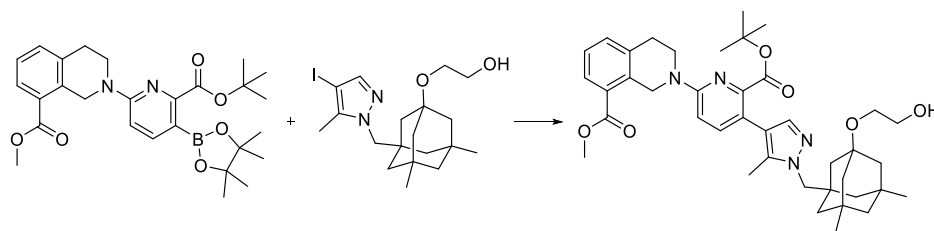
A una solución de clorhidrato de 1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-8-carboxilato de metilo (12,37 g) y el Ejemplo 1.1.8 (15 g) en sulfóxido de dimetilo (100 mL) se le añadió *N,N*-diisopropiletilamina (12 mL) y la mezcla se agitó a 50 °C durante 24 horas. Después, la mezcla se

diluyó con acetato de etilo (500 ml) y se lavó con agua y salmuera. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía con gel de sílice, eluyendo con acetato de etilo al 20 % en hexano, para obtener el compuesto del título. MS (ESI) m/z 448,4 (M+H)⁺.



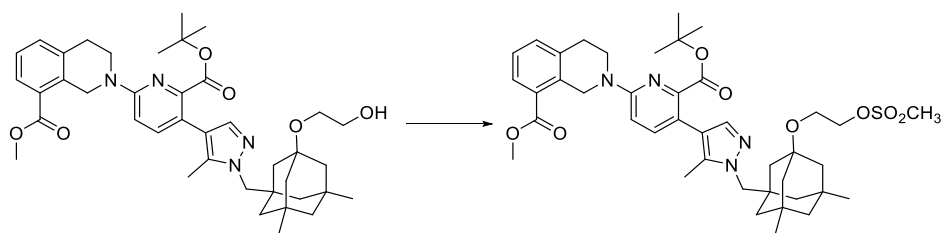
Ejemplo 1.1.10: 2-[6-(*terc*-butoxicarbonil)-5-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)piridin-2-il]-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-8-carboxilato de metilo

A una solución del Ejemplo 1.1.9 (2,25 g) y [1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno]dicloropaladio(II) (205 mg) en acetonitrilo (30 ml) se añadió trietilamina (3 ml) y pinacolborano (2 ml), y la mezcla se agitó a reflujo durante 3 horas. La mezcla se diluyó con acetato de etilo (200 ml) y se lavó con agua y salmuera. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio, se filtró y se concentró a presión reducida. La purificación del residuo por cromatografía con gel de sílice, eluyendo con acetato de etilo al 20 % en hexano, proporcionó el compuesto del título.



Ejemplo 1.1.11: 2-[6-(*terc*-butoxicarbonil)-5-(1-{[3-(2-hidroxietoxi)-5,7-dimetiladamantan-1-il]metil}-5-metil-1*H*-pirazol-4-il)piridin-2-il]-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-8-carboxilato de metilo

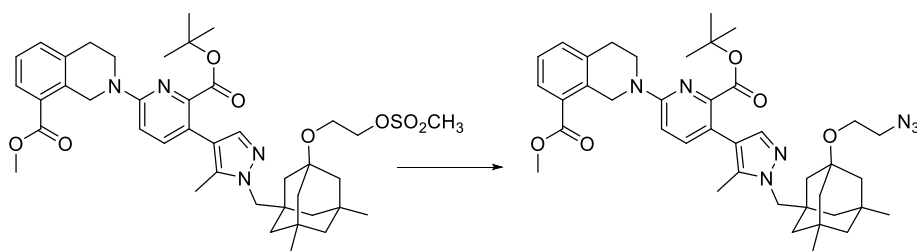
A una solución del Ejemplo 1.1.10 (2,25 g) en tetrahidrofurano (30 ml) y agua (10 ml) se añadió el Ejemplo 1.1.6 (2,0 g), 1,3,5,7-tetrametil-6-fenil-2,4,8-trioxa-6-fosfaadamantano (329 mg), tris(dibencilidenoacetona)dipaladio(0) (206 mg) y fosfato de potasio tribásico (4,78 g). La mezcla se calentó a reflujo durante la noche, se enfrió y se diluyó con acetato de etilo (500 mL). La mezcla resultante se lavó con agua y salmuera y la fase orgánica se secó con sulfato de sodio, se filtró y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía rápida con gel de sílice, eluyendo con acetato de etilo al 20 % en heptanos seguido de metanol al 5 % en diclorometano, para proporcionar el compuesto del título.



Ejemplo 1.1.12: 2-[6-(*tert*-butoxicarbonil)-5-{1-[(3-{2-
 [(metanosulfonil)oxi]etoxi}-5,7-dimetiladamantan-1-
 5 il)metil]-5-metil-1*H*-pirazol-4-il}piridin-2-il]-1,2,3,4-
 tetrahidroisoquinolin-8-carboxilato de metilo

A una solución en frío del Ejemplo 1.1.11 (3,32 g) en diclorometano (100 ml) en un baño de hielo se añadió secuencialmente trietilamina (3 ml) y cloruro de metansulfonilo (1,1 g). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 horas, se diluyó con acetato de etilo y se lavó con agua y salmuera. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio, se filtró, y se concentró para proporcionar el compuesto del título.

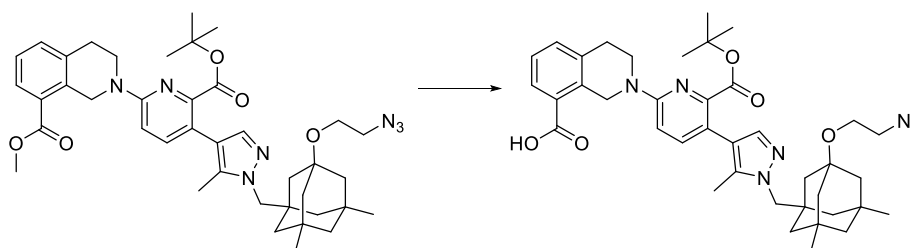
15



Ejemplo 1.1.13: 2-[5-(1-{[3-(2-azidoetoxi)-5,7-
 dimetiladamantan-1-il]metil}-5-metil-1*H*-pirazol-4-il)-6-

(terc-butoxicarbonil)piridin-2-il]-1,2,3,4-
tetrahidroisoquinolin-8-carboxilato de metilo

A una solución del Ejemplo 1.1.12 (16,5 g) en *N,N*-dimetilformamida (120 mL) se le añadió azida de sodio (4,22 g). La mezcla se calentó a 80 °C durante 3 horas, se enfrió, se diluyó con acetato de etilo y se lavó con agua y salmuera. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio, se filtró, y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía rápida con gel de sílice, eluyendo con acetato de etilo al 20 % en heptanos, para proporcionar el compuesto del título.

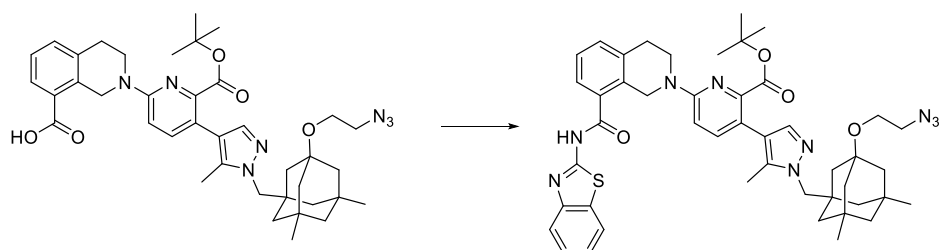


15 Ejemplo 1.1.14: ácido 2-[5-(1-{[3-(2-azidoetoxi)-5,7-
dimetiladamantan-1-il)metil]-5-metil-1H-pirazol-4-il)-6-
(terc-butoxicarbonil)piridin-2-il]-1,2,3,4-
tetrahidroisoquinolin-8-carboxílico

A una solución del Ejemplo 1.1.13 (10 g) en una mezcla de tetrahidrofurano (60 ml), metanol (30 ml) y agua (30 ml) se añadió hidróxido de litio monohidrato (1,2 g). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche y se neutralizó con HCl acuoso al 2 %. La mezcla resultante se

concentró y el residuo se disolvió en acetato de etilo (800 mL) y se lavó con salmuera. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio, se filtró, y se concentró para proporcionar el compuesto del título.

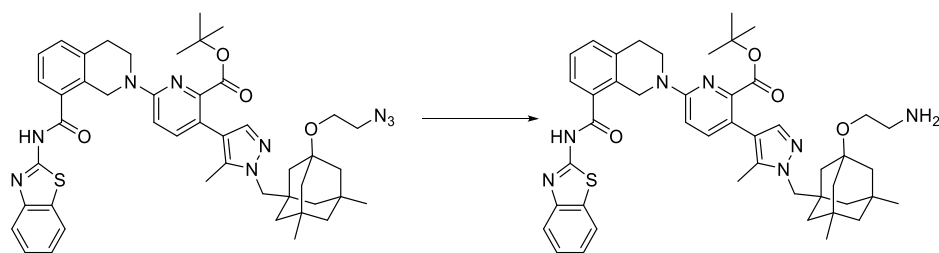
5



Ejemplo 1.1.15: 3-(1-{[3-(2-azidoetoxi)-5,7-
dimetiladamantan-1-il]metil}-5-metil-1H-pirazol-4-il)-6-{8-
10 [(1,3-benzotiazol-2-il)carbamoil]-3,4-dihidroisoquinolin-
2(1H)-il}piridin-2-carboxilato de terc-butilo

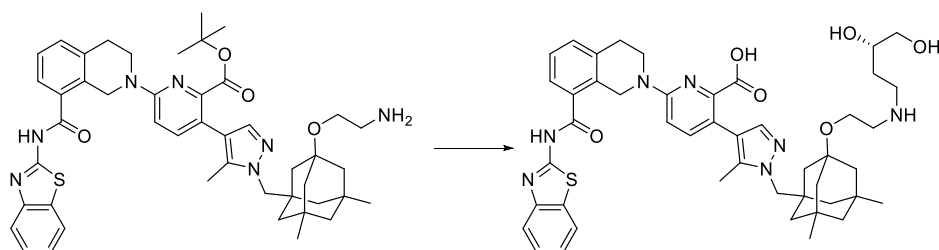
Una mezcla del Ejemplo 1.1.14 (10 g), benzo[d]tiazol-2-amina (3,24 g), hexafluorofosfato de fluoro-*N,N,N',N'*-tetrametilformamidinio (5,69 g) y *N,N*-diisopropiletilamina (5,57 g) en *N,N*-dimetilformamida (20 mL) se calentó a 60 °C durante 3 horas, se enfrió y se diluyó con acetato de etilo. La mezcla resultante se lavó con agua y salmuera. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio, se filtró, y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía rápida con gel de sílice, eluyendo con acetato de etilo al 20 % en diclorometano para obtener el compuesto del título.

15
20



Ejemplo 1.1.16: 3-(1-{[3-(2-aminoetoxi)-5,7-
dimetiladamantan-1-il]metil}-5-metil-1H-pirazol-4-il)-6-{8-
5 [(1,3-benzotiazol-2-il)carbamoil]-3,4-dihidroisoquinolin-
2(1H)-il}piridin-2-carboxilato de terc-butilo

A una solución del Ejemplo 1.1.15 (2,0 g) en tetrahidrofurano (30 ml) se añadió Pd/C (10 %, 200 mg). La mezcla se agitó en una atmósfera de hidrógeno (18 psi)
10 durante la noche. El material insoluble se retiró por filtración y el filtrado se concentró para proporcionar el compuesto del título.

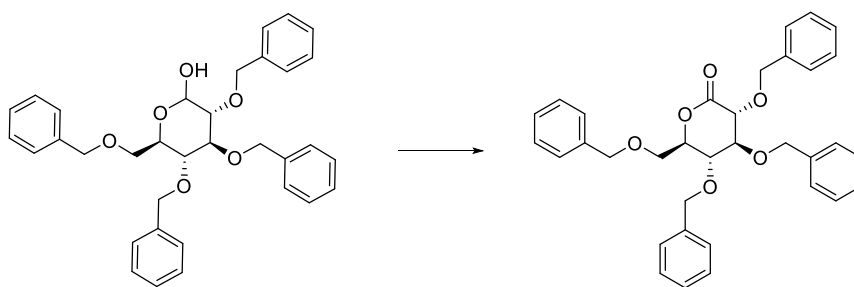


15

Ejemplo 1.1.17: ácido 6-{8-[(1,3-benzotiazol-2-
il)carbamoil]-3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il}-3-(1-{[3-(2-
{[(3S)-3,4-dihidroxibutil]amino}etoxi)-5,7-

dimetiladamantan-1-il]metil}-5-metil-1*H*-pirazol-4-
il)piridin-2-carboxílico

A una solución del Ejemplo 1.1.16 (213 mg) en diclorometano (2 mL) se le añadió (*S*)-2-(2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)acetaldehído (42 mg). Después de agitar a temperatura ambiente durante 30 minutos, se añadió triacetoxiborohidruro de sodio (144 mg). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se añadió ácido trifluoroacético (2 ml) y se continuó la agitación durante la noche. La mezcla de reacción se concentró y el residuo se purificó por HPLC en fase inversa mediante el uso de un sistema Gilson (columna de 250 × 50 mm Luna ® C18 Phenomenex®), eluyendo con acetonitrilo al 5-85 % en agua que contenía ácido trifluoroacético al 0,1 % en v/v (100 mL/minuto). Las fracciones deseadas se combinaron y se liofilizaron para proporcionar el compuesto del título. ¹H NMR (400 MHz, dimetilsulfóxido-*d*₆) δ ppm 12,86 (s, 1H), 8,22 (d, 2H), 8,05 – 8,01 (m, 1H), 7,79 (d, 1H), 7,61 (d, 1H), 7,53 – 7,41 (m, 3H), 7,36 (td, 2H), 7,28 (s, 1H), 6,95 (d, 1H), 4,95 (s, 2H), 3,88 (t, 2H), 3,82 (s, 2H), 3,26 – 2,94 (m, 7H), 2,10 (s, 3H), 1,84 – 1,75 (m, 1H), 1,52–1,63 (m, 1H), 1,45 – 1,23 (m, 6H), 1,19 – 0,96 (m, 7H), 0,86 (s, 6H); MS (ESI) *m/z* 834,3 (M+H)⁺.

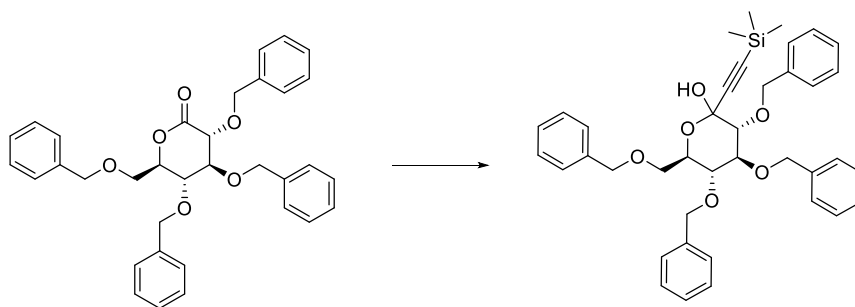


Ejemplo 1.2.1 (3*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-3,4,5-tris(benziloxi)-6-[(benziloxi)metil]oxan-2-ona

5 A una mezcla de (3*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-3,4,5-tris(benziloxi)-6-[(benziloxi)metil]oxan-2-ol (75 g) en sulfóxido de dimetilo (400 ml) a 0 °C se añadió anhídrido acético (225 ml). La mezcla se agitó durante 16 horas a temperatura ambiente antes de enfriarla a 0 °C. Se añadió

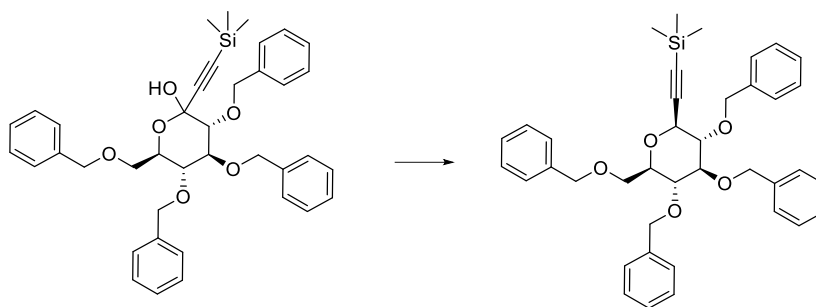
10 un gran volumen de agua y la agitación se detuvo, lo que permitió que la mezcla de reacción se sedimentara durante 3 horas (la lactona en bruto se fue al fondo del matraz). El sobrenadante se retiró y la mezcla en bruto se diluyó con acetato de etilo y se lavó 3 veces con agua, se neutralizó

15 con una mezcla acuosa saturada de NaHCO₃ y se lavó nuevamente dos veces con agua. A continuación, la fase orgánica se secó con sulfato de magnesio, se filtró y se concentró para obtener el compuesto del título. MS (ESI) *m/z* 561 (M+Na)⁺.



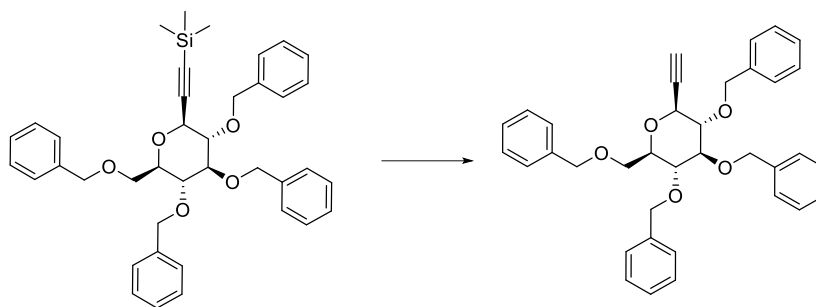
Ejemplo 1.2.2: (3*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-3,4,5-tris(benziloxi)-6-
((benziloxi)metil)-2-((trimetilsilil)etinil)tetrahidro-
 5 2H-piran-2-ol

A una mezcla de etiniltrimetilsilano (18,23 g) en tetrahidrofurano (400 mL) en una atmósfera de nitrógeno y enfriada en un baño de hielo seco/acetona (temp. interna de -65 °C) se le añadió gota a gota butil litio 2,5 M en hexano
 10 (55,7 mL), manteniendo la temperatura por debajo de -60 °C. La mezcla se agitó en un baño frío durante 40 minutos, seguido de un baño con agua helada (la temperatura interna se elevó hasta 0,4 °C) durante 40 minutos, y finalmente se enfrió nuevamente a -75 °C. Se añadió gota a gota una mezcla del
 15 Ejemplo 1.2.1 (50 g) en tetrahidrofurano (50 ml), manteniendo la temperatura interna por debajo de -70 °C. La mezcla se agitó en un baño de hielo seco/acetona durante 3 horas más. La reacción se neutralizó con NaHCO₃ acuoso saturado (250 mL). Se dejó que la mezcla se calentara a temperatura
 20 ambiente, se extrajo con acetato de etilo (3 x 300 mL), se secó con MgSO₄, se filtró y se concentró al vacío para obtener el compuesto del título. MS (ESI) *m/z* 659 (M+Na)⁺.



Ejemplo 1.2.3 trimetil({ (2*S*, 3*S*, 4*R*, 5*R*, 6*R*)-3, 4, 5-
tris(benziloxi)-6-[(benziloxi)metil]oxan-2-il}etinil)silano

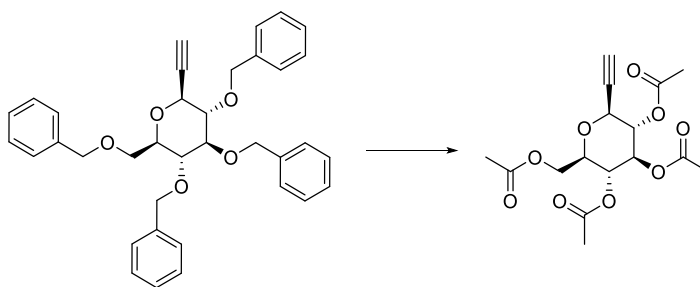
5 A una mezcla del Ejemplo 1.2.2 (60 g) en
 acetonitrilo (450 ml) y diclorometano (150 ml) a -15 °C en
 un baño de hielo y sal se añadió gota a gota trietilsilano
 (81 ml), seguido de la adición de complejo de trifluoruro
 de boro y éter dietílico (40,6 ml) a una velocidad de tal
 10 manera que la temperatura interna no superó los -10 °C. A
 continuación, la mezcla se agitó a una temperatura de -
 15 °C a -10 °C durante 2 horas. La reacción se neutralizó
 con NaHCO₃ acuoso saturado (275 mL) y se agitó durante 1
 hora a temperatura ambiente. A continuación, la mezcla se
 15 extrajo con acetato de etilo (3 x 550 mL). Los extractos
 combinados se secaron con MgSO₄, se filtraron, y se
 concentraron. El residuo se purificó por cromatografía
 rápida eluyendo con un gradiente de acetato de etilo/éter
 de petróleo de 0 % a 7 % para obtener el compuesto del
 20 título. MS (ESI) *m/z* 643 (M+Na)⁺.



Ejemplo 1.2.4: (2*R*,3*R*,4*R*,5*S*,6*S*)-3,4,5-tris(benziloxi)-2-[(benziloxi)metil]-6-etiniloxano

5 A una mezcla del Ejemplo 1.2.3 (80 g) en diclorometano (200 ml) y metanol (1000 ml) se añadió NaOH 1 N (258 ml) acuoso. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas y a continuación se concentró. Después, el residuo se repartió entre agua y diclorometano.

10 Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera, se secaron con Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron para obtener el compuesto del título. MS (ESI) *m/z* 571 (M+Na)⁺.



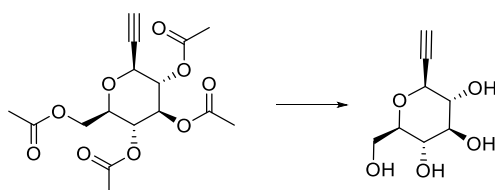
15

Ejemplo 1.2.5: triacetato de (2*R*,3*R*,4*R*,5*S*,6*S*)-2-[(acetiloxi)metil]-6-etiniloxan-3,4,5-triilo

A una mezcla del Ejemplo 1.2.4 (66 g) en anhídrido acético (500 ml) enfriada con un baño de agua helada se

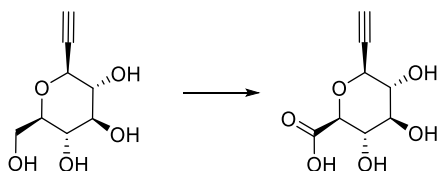
añadió gota a gota complejo de trifluoruro de boro y éter dietílico (152 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas, se enfrió con un baño de agua helada y se neutralizó con NaHCO₃ acuoso saturado. La mezcla
 5 se extrajo con acetato de etilo (3 × 500 mL), se secó con Na₂SO₄, se filtró y se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía rápida eluyendo con un gradiente de acetato de etilo/éter de petróleo de 0 % a 30 % para obtener el compuesto del título. MS (ESI) *m/z* 357 (M+H)⁺.

10



Ejemplo 1.2.6: (2*S*,3*R*,4*R*,5*S*,6*R*)-2-etinil-6-(hidroximetil)oxan-3,4,5-triol

15 A una mezcla del Ejemplo 1.2.5 (25 g) en metanol (440 ml) se añadió metanolato de sodio (2,1 g). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas y después se neutralizó con HCl 4 M en dioxano. La mezcla se concentró y el residuo se adsorbió en gel de sílice y se
 20 depositó en una columna de gel de sílice. Se hizo pasar un gradiente de acetato de etilo/éter de petróleo de 0 % a 100 % y a continuación de metanol/acetato de etilo de 0 % a 12 % por la columna para obtener el compuesto del título. MS (ESI) *m/z* 211 (M+Na)⁺.

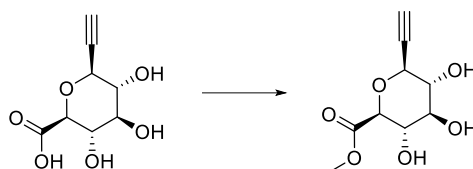


Ejemplo 1.2.7: ácido (2*S*,3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-6-etinil-3,4,5-trihidroxioxan-2-carboxílico

5 En un matraz de fondo redondo de tres bocas se
añadió el Ejemplo 1.2.6 (6,00 g), KBr (0,30 g), bromuro de
tetrabutylamonio (0,41 g) y 60 mL de NaHCO₃ acuoso saturado.
Se añadió TEMPO ((2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-il)oxilo,
0,15 g) en diclorometano (60 ml). La mezcla se agitó
10 vigorosamente y se enfrió en un baño de hielo y sal a una
temperatura interna de -2 °C. Se añadió gota a gota una mezcla
de salmuera (12 mL), NaHCO₃ acuoso saturado (24 mL) y 10 %
en peso de NaOCl (154 mL) acuoso de manera que la temperatura
interna se mantuvo por debajo de 2 °C. El pH de la mezcla de
15 reacción se mantuvo en el intervalo de 8,2-8,4 con la adición
de Na₂CO₃ sólido. Después de un total de 6 horas, la mezcla
de reacción se enfrió a una temperatura interna de 3 °C y se
añadió gota a gota etanol (~20 ml). La mezcla se agitó durante
~30 minutos. La mezcla se transfirió a un embudo de
20 decantación y la fase de diclorometano se desechó. El pH de
la fase acuosa se ajustó a 2-3 con HCl acuoso 1 M. Después,
la fase acuosa se concentró a sequedad para obtener un sólido.
Al sólido seco se añadió metanol (100 ml y la suspensión se
agitó durante ~30 minutos. La mezcla se filtró sobre una capa

de tierra de diatomeas y el residuo del embudo se lavó con ~100 ml de metanol. El filtrado se concentró a presión reducida para obtener el compuesto del título.

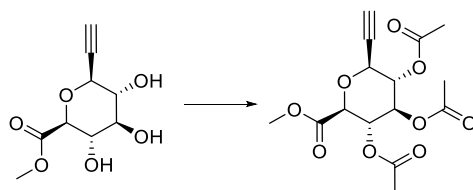
5



Ejemplo 1.2.8: (2*S*,3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-6-etinil-3,4,5-trihidroxioxan-2-carboxilato de metilo

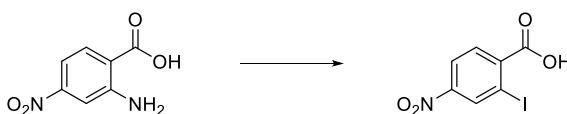
En un matraz de fondo redondo de tres bocas de
 10 500 mL se añadió una suspensión del Ejemplo 1.2.7 (6,45 g) en metanol (96 mL) y la mezcla se enfrió en un baño de hielo y sal con temperatura interna de -1 °C. Se añadió cuidadosamente cloruro de tionilo sin disolvente (2,79 mL). La temperatura interna siguió aumentando
 15 durante la adición pero no superó los 10 °C. Se dejó que la reacción se calentara lentamente hasta 15-20 °C durante 2,5 horas. Después de 2,5 horas, la reacción se concentró para obtener el compuesto del título.

20



Ejemplo 1.2.9: (2*S*,3*S*,4*R*,5*S*,6*S*)-3,4,5-tris(acetiloxi)-6-etiniloxan-2-carboxilato de metilo

Al Ejemplo 1.2.8 (6,9 g) en forma de una mezcla en *N,N*-dimetilformamida (75 ml) se añadió 4-(dimetilamino)piridina (0,17 g) y anhídrido acético (36,1 ml). La suspensión se enfrió en un baño de hielo y se añadió piridina (18,04 ml) con una jeringa durante 15 minutos. Se dejó que la reacción se calentara a temperatura ambiente durante la noche. Se añadió anhídrido acético (12 ml) y piridina (6 ml) adicional y se continuó la agitación durante 6 horas más. La reacción se enfrió en un baño de hielo y se añadieron 250 ml de mezcla de NaHCO₃ acuoso saturado y se agitó durante 1 hora. Se añadió agua (100 mL) y la mezcla se extrajo con acetato de etilo. El extracto orgánico se lavó dos veces con mezcla de CuSO₄ saturado, se secó, se filtró, y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía rápida, eluyendo con acetato de etilo/éter de petróleo al 50 % para obtener el compuesto del título. ¹H NMR (500 MHz, metanol-*d*₄) δ ppm 5,29 (t, 1H), 5,08 (td, 2H), 4,48 (dd, 1H), 4,23 (d, 1H), 3,71 (s, 3H), 3,04 (d, 1H), 2,03 (s, 3H), 1,99 (s, 3H), 1,98 (s, 4H).



Ejemplo 1.2.10: ácido 2-yodo-4-nitrobenzoico

En un matraz de 3 L completamente encamisado equipado con un agitador mecánico, una sonda de temperatura y un embudo de adición en una atmósfera de nitrógeno se añadió

5 ácido 2-amino-4-nitrobenzoico (69,1 g, Combi-Blocks) y ácido sulfúrico, 1,5 M acuoso (696 mL). La suspensión resultante se enfrió a una temperatura interna de 0 °C y se añadió gota a gota una mezcla de nitrito de sodio (28,8 g) en agua (250 mL) durante 43 minutos manteniendo la temperatura por

10 debajo de 1 °C. La reacción se agitó a 0 °C durante 1 hora. Se añadió gota a gota una mezcla de yoduro de potasio (107 g) en agua (250 mL) durante 44 minutos manteniendo la temperatura interna por debajo de 1 °C. (Inicialmente la adición fue exotérmica y hubo producción de gas). La reacción

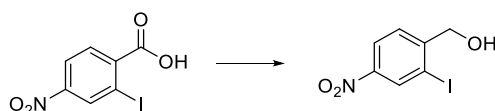
15 se agitó a 0 °C durante 1 hora. La temperatura se elevó a 20 ° C y a continuación se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción se volvió una suspensión. La mezcla de reacción se filtró, y el sólido adquirido se lavó con agua. El sólido húmedo (~108 g) se

20 agitó en sulfito de sodio al 10 % (350 ml, se usaron ~200 ml de agua para lavar el sólido) durante 30 minutos. La suspensión se acidificó con ácido clorhídrico concentrado (35 ml) y el sólido se adquirió mediante filtración y se lavó con agua. El sólido se suspendió en agua (1 L) y se filtró

25 nuevamente y se dejó que el sólido se secase en el embudo durante la noche. A continuación, se secó el sólido en una

estufa de vacío durante 2 horas a 60 °C. El sólido resultante se trituró con diclorometano (500 mL) y la suspensión se filtró y se lavó con diclorometano adicional. El sólido se secó al aire para obtener el compuesto del título.

5



Ejemplo 1.2.11: (2-yodo-4-nitrofenil)metanol

En un matraz de 3 bocas de 3 L secado con llama
10 se añadió el Ejemplo 1.2.10 (51,9 g) y tetrahidrofurano (700 mL). La mezcla se enfrió en un baño de hielo hasta los 0,5 °C y se añadió gota a gota complejo de borano-tetrahidrofurano (443 mL, 1 M en tetrahidrofurano) (producción de gas) durante 50 minutos, alcanzando una
15 temperatura interna final de 1,3 °C. La mezcla de reacción se agitó durante 15 minutos y se retiró el baño de hielo. Se dejó que la reacción alcanzara la temperatura ambiente durante 30 minutos. Se instaló una manta calefactora, y la reacción se calentó hasta una temperatura interna de
20 65,5 °C durante 3 horas, y después se dejó enfriar a temperatura ambiente al tiempo que se agitó durante la noche. La mezcla de reacción se enfrió en un baño de hielo hasta 0 °C y se neutralizó mediante la adición gota a gota de metanol (400 ml). Después de un breve periodo de
25 incubación, la temperatura se elevó rápidamente a 2,5 °C

con producción de gas. Después de añadidos los primeros 100 mL durante ~30 minutos, la adición ya no fue exotérmica y la producción de gas se detuvo. El baño de hielo se retiró y la mezcla se agitó a temperatura ambiente en una atmósfera de nitrógeno durante la noche. La mezcla se concentró hasta obtener un sólido, se disolvió en diclorometano/metanol y se adsorbió en gel de sílice (~150 g). El residuo se depositó en un tapón de gel de sílice (3000 ml) y eluyó con diclorometano para obtener el compuesto del título.

10

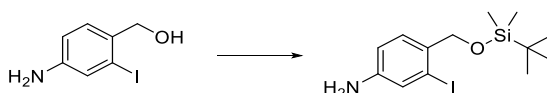


Ejemplo 1.2.12: (4-amino-2-yodofenil)metanol

En un matraz de 5 L equipado con un agitador mecánico, una manta calefactora controlada por una sonda de temperatura JKEM y un condensador se añadió el Ejemplo 1.2.11 (98,83 g) y etanol (2 L). La reacción se agitó rápidamente, y se añadió hierro (99 g), seguido de una mezcla de cloruro de amonio (20,84 g) en agua (500 ml). La reacción se calentó durante el transcurso de 20 minutos hasta alcanzar una temperatura interna de 80,3 °C, donde comenzó a reflujo vigoroso. La manta se retiró hasta que mermó el reflujo. A continuación, la mezcla se calentó a 80 °C durante 1,5 horas. La reacción se filtró en caliente a través de un filtro de membrana, y el residuo de hierro se lavó con acetato de etilo

/metanol al 50 % caliente (800 ml). El eluyente se pasó a través de una capa de tierra de diatomeas, y el filtrado se concentró. El residuo se repartió entre salmuera al 50 % (1500 ml) y acetato de etilo (1500 ml). Las fases se separaron y la fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (400 mL × 3). Las fases orgánicas combinadas se secaron con sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron para obtener el compuesto del título, que se utilizó sin purificar.

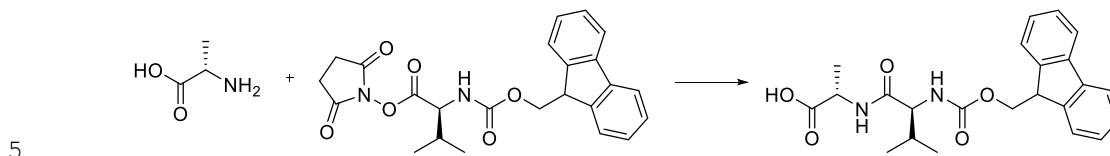
10



Ejemplo 1.2.13: 4-({[*terc*-butil(dimetil)silil]oxi}metil)-3-yodoanilina

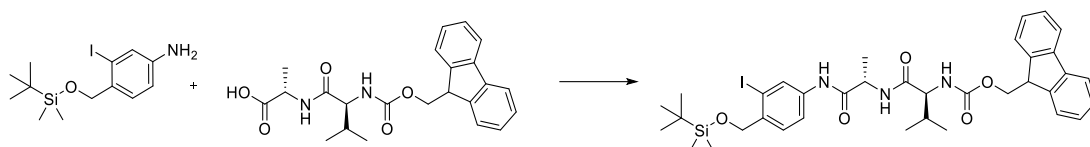
En un matraz de 5 L con un agitador mecánico se añadió el Ejemplo 1.2.12 (88 g) y diclorometano (2 L). La suspensión se enfrió en un baño de hielo hasta una temperatura interna de 2,5 °C y se le añadió en porciones *terc*-butilclorodimetilsilano (53,3 g) durante 8 minutos. Después de 10 minutos, a la reacción fría se le añadió en porciones 1*H*-imidazol (33,7 g). La reacción se agitó durante 90 minutos al tiempo que la temperatura interna se elevó a 15 °C. La mezcla de reacción se diluyó con agua (3 L) y diclorometano (1 L). Las fases se separaron, y la fase orgánica se secó con sulfato de sodio, se filtró, y se concentró hasta obtener un aceite. El residuo se purificó

por cromatografía con gel de sílice (1600 g de gel de sílice), eluyendo con un gradiente de acetato de etilo de 0-25 % en heptano, para obtener el compuesto del título.



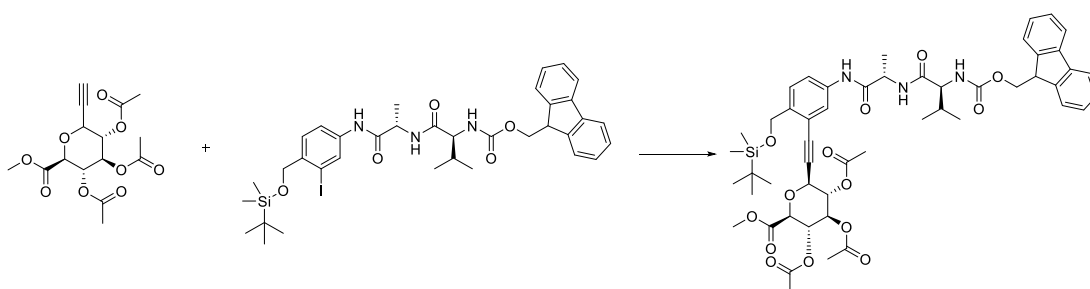
Ejemplo 1.2.14: ácido (2S)-2-{[(2S)-2-({[(9H-fluoren-9-il)metoxi]carbonil}amino)-3-metilbutanoil]amino}propanoico

A una mezcla de {(2RS)-1-[(2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi]-3-metil-1-oxobutan-2-il}carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo (6,5 g) en dimetoxietano (40 mL) se le añadió ácido (2S)-2-aminopropanoico (1,393 g) y bicarbonato de sodio (1,314 g) en agua (40 mL). Se añadió tetrahidrofurano (20 ml) para favorecer la solubilidad. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. Se añadió ácido cítrico acuoso (15 %, 75 mL) y la mezcla se extrajo con 2-propanol al 10 % en acetato de etilo (2 x 100 mL). Se formó un precipitado en la fase orgánica. Las fases orgánicas combinadas se lavaron con agua (2 x 150 mL). La fase orgánica se concentró a presión reducida y después se trituró con éter dietílico (80 ml). Después de una breve sonicación, el compuesto del título se adquirió mediante filtración y se secó al aire. MS (ESI) m/z 411 (M+H)⁺.



Ejemplo 1.2.15: (9H-fluoren-9-il)metil [(2S)-1-({(2S)-1-
[4-({[terc-butil(dimetil)silil]oxi}metil)-3-yodoanilino]-
1-oxopropan-2-il}amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il]carbamato

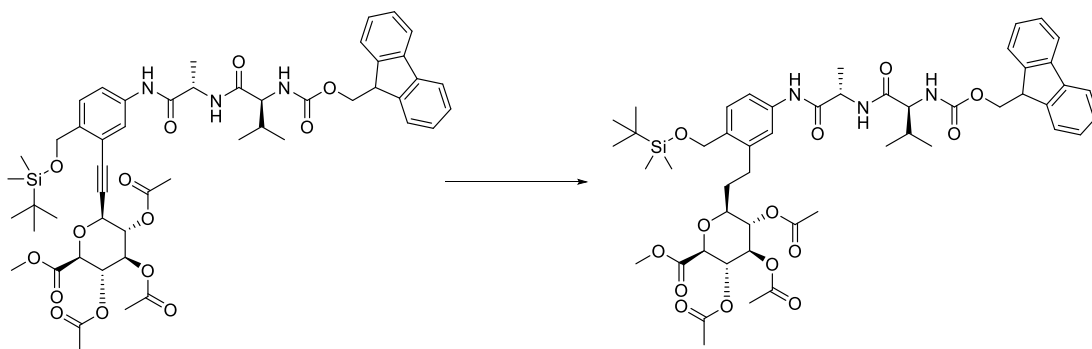
A una mezcla del Ejemplo 1.2.13 (5,44 g) y del
Ejemplo 1.2.14 (6,15 g) en una mezcla de diclorometano
(70 mL) y metanol (35,0 mL) se le añadió 2-etoxiquinolin-
1(2H)-carboxilato de etilo (4,08 g) y la mezcla de reacción
se agitó durante la noche. La mezcla de reacción se
concentró y el residuo se depositó en gel de sílice,
eluyendo con un gradiente de acetato de etilo de 10 % a
95 % en heptano seguido de metanol al 5 % en diclorometano.
Las fracciones que contenían el producto se concentraron y
el residuo se disolvió en metanol al 0,2 % en diclorometano
(50 mL) y se depositó en gel de sílice eluyendo con un
gradiente de metanol de 0,2 % a 2 % en diclorometano. Las
fracciones que contenían el producto se adquirieron para
obtener el compuesto del título. MS (ESI) m/z 756,0 (M+H)⁺.



Ejemplo 1.2.16: (2*S*,3*S*,4*R*,5*S*,6*S*)-3,4,5-tris(acetiloxi)-6-
{[2-({[terc-butil(dimetil)silil]oxi}metil)-5-{[(2*S*)-2-
{[(2*S*)-2-({[(9*H*-fluoren-9-il)metoxi]carbonil}amino)-3-
metilbutanoil]amino}propanoil]amino}fenil]etinil}oxan-2-

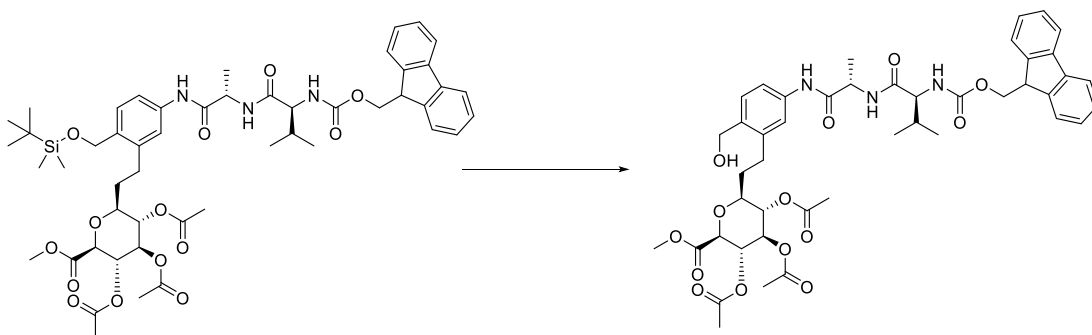
5 carboxilato de metilo

Una mezcla del Ejemplo 1.2.9 (4,500 g), del
Ejemplo 1.2.15 (6,62 g), yoduro de cobre(I) (0,083 g) y
dicloruro de bis(trifenilfosfina)paladio(II) (0,308 g) se
combinó en un vial y se desgasificó. Se añadió *N,N*-
10 dimetilformamida (45 mL) y *N*-etil-*N*-(propan-2-il)propan-2-
amina (4,55 mL) y el reactor se lavó con nitrógeno y se
agitó a temperatura ambiente durante la noche. La reacción
se repartió entre agua (100 ml) y acetato de etilo (250 ml).
Las fases se separaron y la fase orgánica se secó con
15 sulfato de magnesio, se filtró, y se concentró. El residuo
se purificó por cromatografía con gel de sílice, eluyendo
con un gradiente de acetato de etilo de 5 % a 95 % en
heptano. Las fracciones que contenían el producto se
recolectaron y se concentraron. El residuo se purificó por
20 cromatografía con gel de sílice, eluyendo con un gradiente
de metanol de 0,25 % a 2,5 % en diclorometano, para obtener
el compuesto del título. MS (ESI) *m/z* 970,4 (*M*+*H*)⁺.



Ejemplo 1.2.17: (2*S*,3*S*,4*R*,5*S*,6*S*)-3,4,5-tris(acetiloxi)-6-
{2-[2-({[terc-butil(dimetil)silil]oxi}metil)-5-{[(2*S*)-2-
5 {[(2*S*)-2-({[(9*H*-fluoren-9-il)metoxi]carbonil}amino)-3-
metilbutanoil]amino}propanoil]amino}fenil]etil}oxan-2-
carboxilato de metilo

Se añadió el Ejemplo 1.2.16 (4,7 g) y
tetrahidrofurano (95 ml) a Pt/C al 5 % (2,42 g, húmedo) en
10 una botella a presión de 50 ml y se agitó durante 90
minutos a temperatura ambiente a 50 psi de hidrógeno. La
mezcla de reacción se filtró y se concentró para obtener
el compuesto del título. MS (ESI) m/z 974,6 (M+H)⁺.



15

Ejemplo 1.2.18: (2S,3S,4R,5S,6S)-3,4,5-tris(acetiloxi)-6-

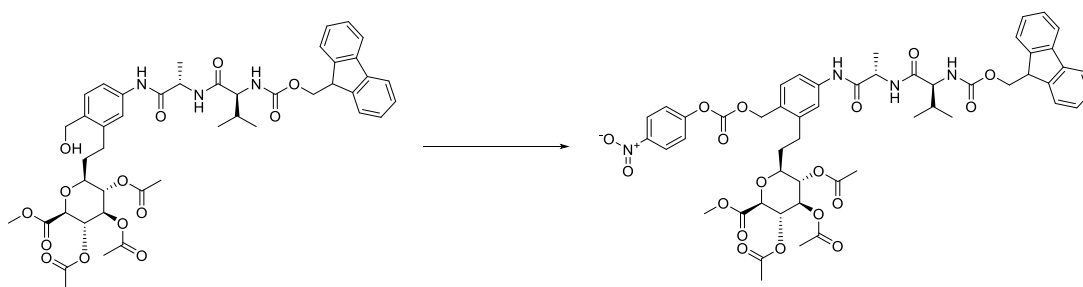
{2-[5-{[(2S)-2-{[(2S)-2-({[(9H-fluoren-9-

il)metoxi]carbonil}amino)-3-

metilbutanoil]amino}propanoil]amino}-2-

5 (hidroximetil)fenil]etil}oxan-2-carboxilato de metilo

Una mezcla del Ejemplo 1.2.17 (5,4 g) en tetrahidrofurano (7 ml), agua (7 ml) y ácido acético glacial (21 ml) se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo (200 mL) y
10 se lavó con agua (100 mL), NaHCO₃ acuoso saturado (100 mL) y salmuera (100 mL). La fracción orgánica se secó con sulfato de magnesio, se filtró y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía con gel de sílice, eluyendo con un gradiente de metanol de 0,5 % a 5 % en diclorometano, para
15 obtener el compuesto del título. MS (ESI) *m/z* 860,4 (M+H)⁺.



Ejemplo 1.2.19: (2S,3S,4R,5S,6S)-3,4,5-tris(acetiloxi)-6-

20 {2-[5-{[(2S)-2-{[(2S)-2-({[(9H-fluoren-9-

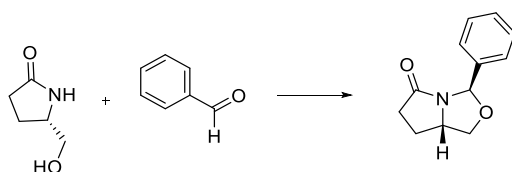
il)metoxi]carbonil}amino)-3-

metilbutanoil]amino}propanoil]amino}-2-({[(4-

nitrofenoxi)carbonil]oxi}metil)fenil]etil}oxan-2-
carboxilato de metilo

A una mezcla del Ejemplo 1.2.18 (4,00 g) y
carbonato de bis(4-nitrofenil) (2,83 g) en acetonitrilo
5 (80 ml) se añadió *N*-etil-*N*-(propan-2-il)propan-2-amina
(1,22 ml) a temperatura ambiente. Después de agitar
durante la noche, la reacción se concentró, se disolvió en
diclorometano (250 mL) y se lavó con una mezcla de NaHCO₃
acuoso saturado (4 x 150 mL). La fase orgánica se secó con
10 sulfato de magnesio, se filtró, y se concentró. La espuma
resultante se purificó por cromatografía con gel de sílice,
eluyendo con un gradiente de acetato de etilo de 5 % a
75 % en hexanos para obtener el compuesto del título. MS
(ESI) *m/z* 1025,5 (M+H)⁺.

15

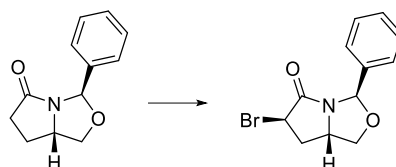


Ejemplo 1.3.1: (3*R*,7*aS*)-3-feniltetrahidro-3*H*,5*H*-
pirrolo[1,2-*c*][1,3]oxazol-5-ona

20 Una mezcla de (5*S*)-5-(hidroximetil)pirrolidin-2-
ona (25 g), benzaldehído (25,5 g) y ácido *para*-
toluensulfónico monohidrato (0,50 g) en tolueno (300 mL) se
calentó a reflujo con una trampa Dean-Stark con un tubo de
secado durante 16 horas. La mezcla de reacción se enfrió a

temperatura ambiente y el disolvente se decantó de los materiales insolubles. La fase orgánica decantada se lavó con una mezcla de bicarbonato de sodio acuoso saturado (dos veces) y salmuera (una vez). La fase orgánica se secó con sulfato de sodio, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía rápida con gel de sílice, eluyendo con 35/65 de heptano/acetato de etilo para obtener el compuesto del título. MS (DCI) m/z 204,0 (M+H)⁺.

10

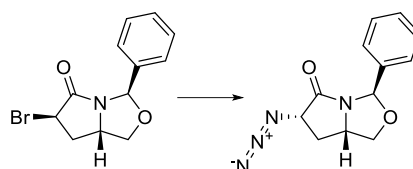


Ejemplo 1.3.2: (3*R*,6*R*,7*aS*)-6-bromo-3-feniltetrahydro-3*H*,5*H*-pirrolo[1,2-*c*][1,3]oxazol-5-ona

A una mezcla fría (-77 °C) del Ejemplo 1.3.1 (44,6 g) en tetrahidrofurano (670 ml) se añadió gota a gota bis(trimetilsilil)amida de litio (1,0 M en hexanos, 250 ml) durante 40 minutos, manteniendo la temperatura de la mezcla de reacción por debajo de -73 °C. La reacción se agitó a -77 °C durante 2 horas y se añadió gota a gota bromo (12,5 ml) durante 20 minutos, manteniendo la temperatura de la mezcla de reacción por debajo de -64 °C. La reacción se agitó a -77 °C durante 75 minutos y se neutralizó mediante la adición de tiosulfato de sodio acuoso al 10 % frío (150 ml) a la reacción a -77 °C. La mezcla se calentó

a temperatura ambiente y se repartió entre cloruro de amonio acuoso semisaturado y acetato de etilo. Las fases se separaron y la fase orgánica se lavó con agua y salmuera, se secó con sulfato de sodio, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía con gel de sílice, eluyendo con gradientes de 80/20, 75/25 y 70/30 de heptano/acetato de etilo para obtener el compuesto del título. MS (DCI) m/z 299,0 y 301,0 ($M+NH_3+H$)⁺.

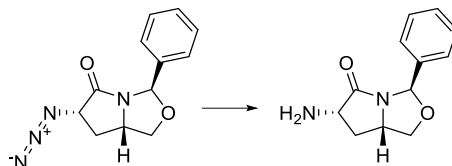
10



Ejemplo 1.3.3: (3*R*,6*S*,7*aS*)-6-azido-3-feniltetrahydro-3*H*,5*H*-pirrolo[1,2-*c*][1,3]oxazol-5-ona

A una mezcla del Ejemplo 1.3.2 (19,3 g) en *N,N*-dimetilformamida (100 mL) se le añadió azida de sodio (13,5 g). La reacción se calentó a 60 °C durante 2,5 horas. La reacción se enfrió a temperatura ambiente y se neutralizó mediante la adición de agua (500 ml) y acetato de etilo (200 ml). Las fases se separaron y la fase orgánica se lavó con salmuera. Las fases acuosas combinadas se retroextrajeron con acetato de etilo (50 ml). Las fases orgánicas combinadas se secaron con sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía con gel de sílice, eluyendo

con 78/22 de heptano/acetato de etilo para obtener el compuesto del título. MS (DCI) m/z 262,0 ($M+NH_3+H$)⁺.



5

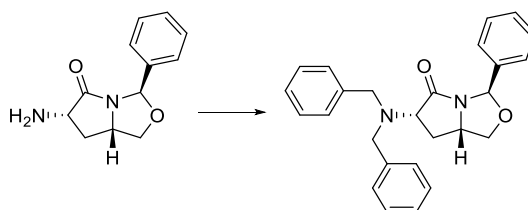
Ejemplo 1.3.4: (3*R*,6*S*,7*aS*)-6-amino-3-feniltetrahidro-3*H*,5*H*-pirrolo[1,2-*c*][1,3]oxazol-5-ona

A una mezcla del Ejemplo 1.3.3 (13,5 g) en tetrahidrofurano (500 ml) y agua (50 ml) se añadió

10 trifenilfosfina anclada en polímero (55 g, núm. 366455 del catálogo de Aldrich, carga - 3 mmol/g). La mezcla de reacción se agitó mecánicamente durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se filtró a través de tierra de diatomeas, eluyendo con acetato de

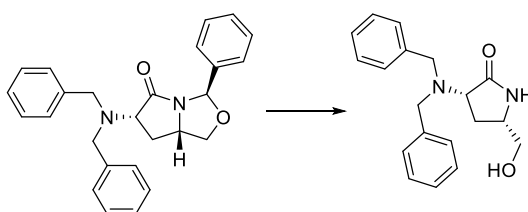
15 etilo y tolueno. La mezcla se concentró a presión reducida, se disolvió en diclorometano (100 mL), se secó con sulfato de sodio y a continuación se filtró y se concentró para obtener el compuesto del título, que se utilizó en la siguiente etapa sin purificar. MS (DCI) m/z 219,0 ($M+H$)⁺.

20



Ejemplo 1.3.5: (3R,6S,7aS)-6-(dibenzilamino)-3-feniltetrahidro-3H,5H-pirrolo[1,2-c][1,3]oxazol-5-ona

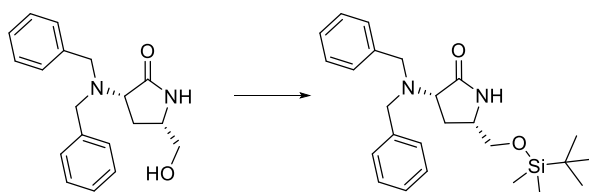
A una mezcla del Ejemplo 1.3.4 (11,3 g) en *N,N*-dimetilformamida (100 mL) se le añadió carbonato de potasio (7,0 g), yoduro de potasio (4,2 g) y bromuro de bencilo (14,5 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche y se neutralizó mediante la adición de agua y acetato de etilo. Las fases se separaron y la fase orgánica se lavó con salmuera. Las fases acuosas combinadas se retroextrajeron con acetato de etilo. Las fases orgánicas combinadas se secaron con sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía con gel de sílice, eluyendo con un gradiente de acetato de etilo de 10 a 15 % en heptano para obtener un sólido que se trituroó con heptano para obtener el compuesto del título. MS (DCI) m/z 399,1 (M+H)⁺.



Ejemplo 1.3.6: (3S,5S)-3-(dibenzilamino)-5-(hidroximetil)pirrolidin-2-ona

A una mezcla del Ejemplo 1.3.5 (13 g) en tetrahidrofurano (130 mL) se le añadió ácido *para*-

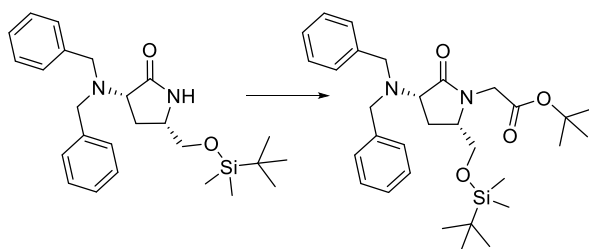
toluensulfónico monohidrato (12,4 g) y agua (50 mL) y la reacción se calentó a 65 °C durante 6 días. La reacción se enfrió a temperatura ambiente y se neutralizó mediante la adición de bicarbonato de sodio acuoso saturado y acetato de etilo. Las fases se separaron y la fase orgánica se lavó con salmuera. Las fases acuosas combinadas se retroextrajeron con acetato de etilo. Las fases orgánicas combinadas se secaron con sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron a presión reducida. Los sólidos cerosos se trituraron con heptano (150 mL) para obtener el compuesto del título. MS (DCI) m/z 311,1 (M+H)⁺.



Ejemplo 1.3.7: (3S,5S)-5-({[terc-butyl(dimetil)silil]oxi}metil)-3-(dibenzilamino)pirrolidin-2-ona

A una mezcla del Ejemplo 1.3.6 (9,3 g) y 1H-imidazol (2,2 g) en *N,N*-dimetilformamida se le añadió *terc*-butilclorodimetilsilano (11,2 mL, 50 % en peso en tolueno) y la mezcla de reacción se agitó durante la noche. La mezcla de reacción se neutralizó mediante la adición de agua y éter dietílico. Las fases se separaron y la fase orgánica se lavó con salmuera. Las fases acuosas combinadas

se retroextrajeron con éter dietílico. Las fases orgánicas combinadas se secaron con sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía con gel de sílice, eluyendo con acetato de etilo al 35 % en heptano, para obtener el compuesto del título. MS (DCI) m/z 425.1 (M+H)⁺.

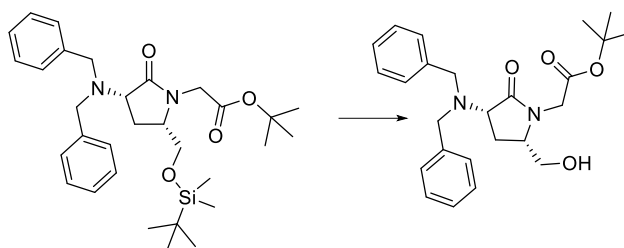


10 Ejemplo 1.3.8: [(3*S*,5*S*)-5-({[terc-butyl(dimetil)silil]oxi}metil)-3-(dibenzilamino)-2-oxopirrolidin-1-il]acetate de terc-butilo

A una mezcla fría (0 °C) del Ejemplo 1.3.7 (4,5 g) en tetrahydrofurano (45 ml) se añadió hidruro de sodio al 95 % (320 mg) en dos porciones. La mezcla fría se agitó durante 40 minutos y se añadió 2-bromoacetato de terc-butilo (3,2 mL). La mezcla de reacción se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante la noche. La reacción se neutralizó mediante la adición de agua y acetato de etilo. Las fases se separaron y la fase orgánica se lavó con salmuera. Las fases acuosas combinadas se retroextrajeron con acetato de etilo. Las fases orgánicas combinadas se secaron con sulfato de sodio, se filtraron y

se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía con gel de sílice, eluyendo con un gradiente de acetato de etilo de 5-12 % en heptano, para obtener el compuesto del título. MS (DCI) m/z 539,2 (M+H)⁺.

5

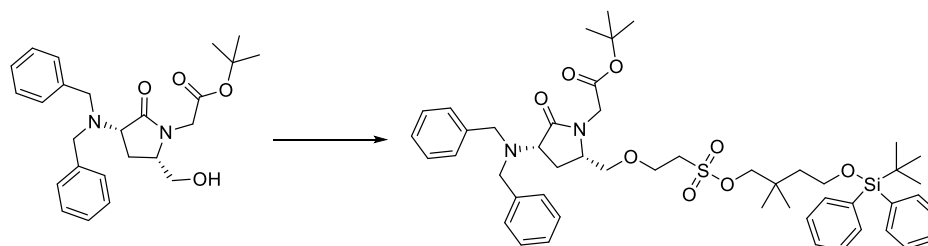


Ejemplo 1.3.9: [(3S,5S)-3-(dibenzilamino)-5-(hidroximetil)-2-oxopirrolidin-1-il]acetato de *terc*-butilo

10 A una mezcla del Ejemplo 1.3.8 (5,3 g) en tetrahidrofurano (25 mL) se le añadió fluoruro de tetrabutilamonio (11 mL, 1,0 M en 95/5 de tetrahidrofurano/agua). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante una hora y a continuación se

15 neutralizó mediante la adición de cloruro de amonio acuoso saturado, agua y acetato de etilo. Las fases se separaron y la fase orgánica se lavó con salmuera. Las fases acuosas combinadas se retroextrajeron con acetato de etilo. Las

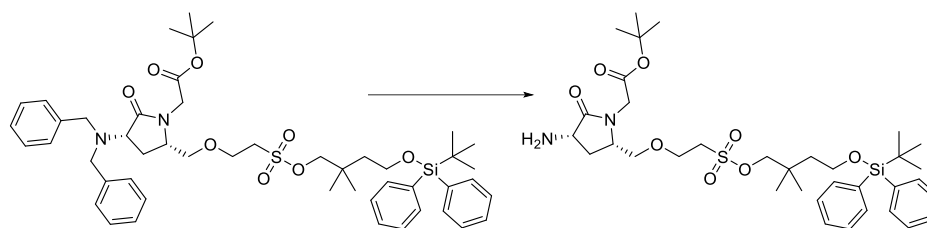
20 fases orgánicas combinadas se secaron con sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía con gel de sílice, eluyendo con acetato de etilo al 35 % en heptano, para obtener el compuesto del título. MS (DCI) m/z 425,1 (M+H)⁺.



Ejemplo 1.3.10: [(3*S*,5*S*)-3-(dibenzilamino)-2-oxo-5-
(8,8,13,13-tetrametil-5,5-dioxo-12,12-difenil-2,6,11-

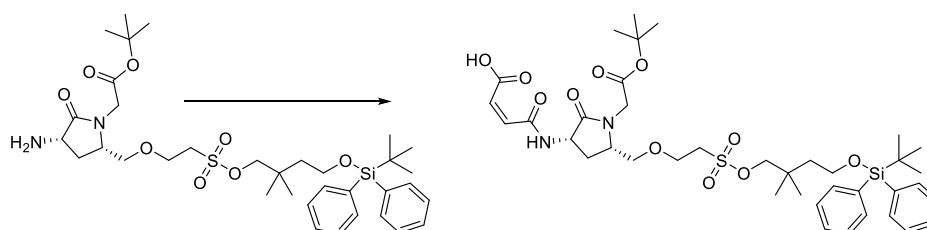
5 trioxa-5λ⁶-tia-12-silatetradecan-1-il)pirrolidin-1-il] de
terc-butilo

A una mezcla del Ejemplo 1.3.9 (4,7 g) en sulfóxido de dimetilo (14 mL) se le añadió una mezcla de etensulfonato de 4-((terc-butildifenilsilil)oxi)-2,2-dimetilbutilo
 10 (14,5 g) en sulfóxido de dimetilo (14 mL). Se añadió carbonato de potasio (2,6 g) y agua (28 µl) y la mezcla de reacción se calentó a 60 °C en una atmósfera de nitrógeno durante un día. La reacción se enfrió a temperatura ambiente y después se neutralizó mediante la adición de salmuera, agua
 15 y éter dietílico. Las fases se separaron y la fase orgánica se lavó con salmuera. Las fases acuosas combinadas se retroextrajeron con éter dietílico. Las fases orgánicas combinadas se secaron con sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó
 20 por cromatografía con gel de sílice, eluyendo con un gradiente de acetato de etilo de 15-25 % en heptano para obtener el compuesto del título. MS (ESI+) *m/z* 871,2 (M+H)⁺.



Ejemplo 1.3.11: [(3*S*,5*S*)-3-amino-2-oxo-5-(8,8,13,13-
tetrametil-5,5-dioxo-12,12-difenil-2,6,11-trioxa-5λ⁶-tia-
5 12-silatetradecan-1-il)pirrolidin-1-il] de terc-butilo

El Ejemplo 1.3.10 (873 mg) se disolvió en acetato de etilo (5 mL) y metanol (15 mL) y se añadió hidróxido de paladio sobre carbono, 20 % en peso (180 mg). La mezcla de reacción se agitó en una atmósfera de hidrógeno (30 psi) a
10 temperatura ambiente durante 30 horas, después a 50 °C durante una hora. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, se filtró y se concentró para obtener el compuesto del título. MS (ESI+) *m/z* 691,0 (M+H)⁺.



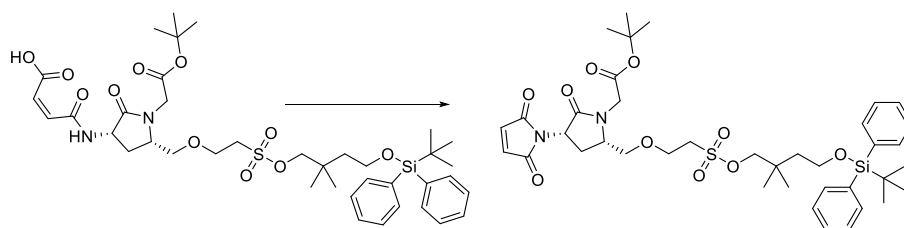
15

Ejemplo 1.3.12: ácido (2*Z*)-4-{[(3*S*,5*S*)-1-(2-terc-butoxi-2-
oxoetil)-2-oxo-5-(8,8,13,13-tetrametil-5,5-dioxo-12,12-

difenil-2,6,11-trioxa-5λ⁶-tia-12-silatetradecan-1-il)pirrolidin-3-il]amino}-4-oxobut-2-enoico

Se disolvió anhídrido maleico (100 mg) en diclorometano (0,90 mL) y se añadió gota a gota una mezcla
5 del Ejemplo 1.3.11 (650 mg) en diclorometano (0,90 mL) seguido de calentamiento a 40 °C durante 2 horas. La mezcla de reacción se purificó directamente por cromatografía con gel de sílice, eluyendo con un gradiente de metanol de 1,0-2,5 % en diclorometano que contenía ácido acético al
10 0,2 %. Después de concentrar las fracciones que tenían el producto, se añadió tolueno (10 mL) y la mezcla se concentró nuevamente para obtener el compuesto del título. MS (ESI-) *m/z* 787,3 (M-H)⁻.

15

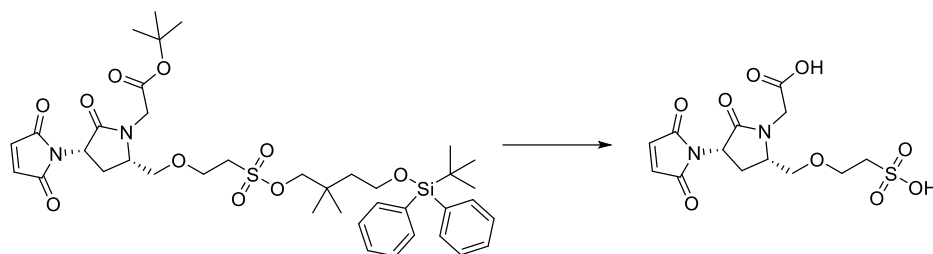


Ejemplo 1.3.13: [(3*S*,5*S*)-3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)-2-oxo-5-(8,8,13,13-tetrametil-5,5-dioxo-12,12-difenil-2,6,11-trioxa-5λ⁶-tia-12-silatetradecan-1-il)pirrolidin-1-il]acetato de terc-butilo

20

El Ejemplo 1.3.12 (560 mg) se suspendió en tolueno (7 mL) y se añadió trietilamina (220 µL) y sulfato de sodio (525 mg). La reacción se calentó a reflujo en una

atmósfera de nitrógeno durante 6 horas y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla se filtró, y se aclararon los sólidos con acetato de etilo. El eluyente se concentró a presión reducida y el
 5 residuo se purificó por cromatografía con gel de sílice, eluyendo con 45/55 de heptano/acetato de etilo para obtener el compuesto del título.

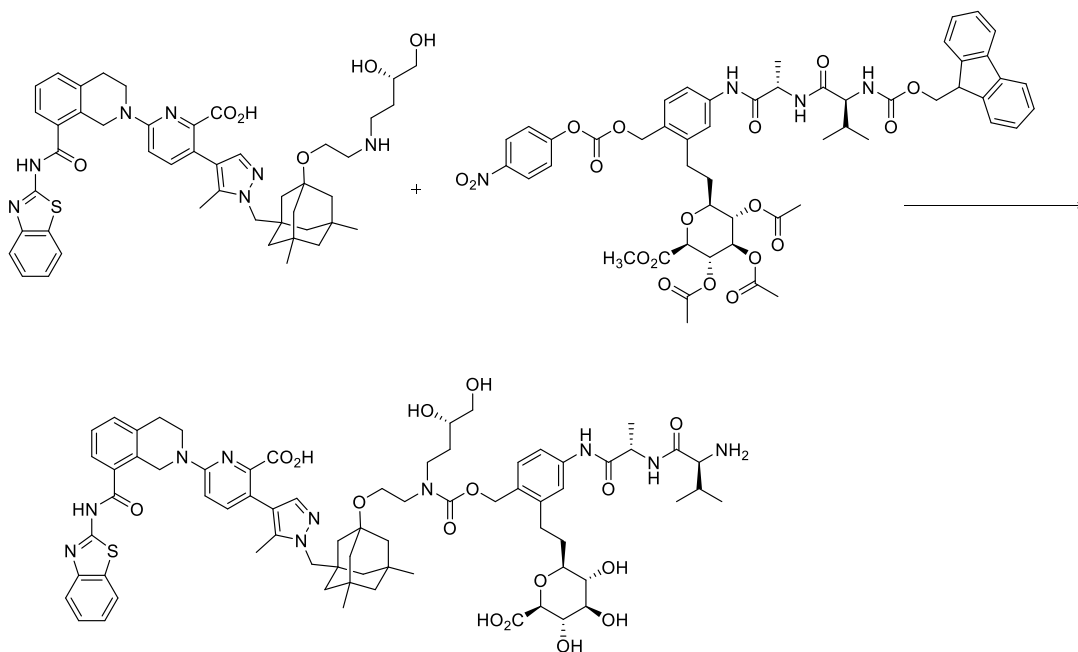


10

Ejemplo 1.3.14: ácido {(3*S*,5*S*)-3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)-2-oxo-5-[(2-sulfoetoxi)metil]pirrolidin-1-il}acético

El Ejemplo 1.3.13 (1,2 g) se disolvió en ácido
 15 trifluoroacético (15 ml) y se calentó a 65-70 °C en una atmósfera de nitrógeno durante la noche. El ácido trifluoroacético se retiró a presión reducida. El residuo se disolvió en acetonitrilo (2,5 ml) y se purificó por cromatografía de líquidos a alta presión en fase inversa
 20 preparativa en una columna Luna® C18(2) AXIA™ Phenomenex® (250 x 50 mm, tamaño de partícula de 10 μ) usando un gradiente de acetonitrilo de 5-75 % que contenía ácido trifluoroacético

al 0,1 % en agua (70 ml/minuto) durante 30 minutos, para obtener el compuesto del título. MS (ESI-) m/z 375,2 (M-H)⁻.

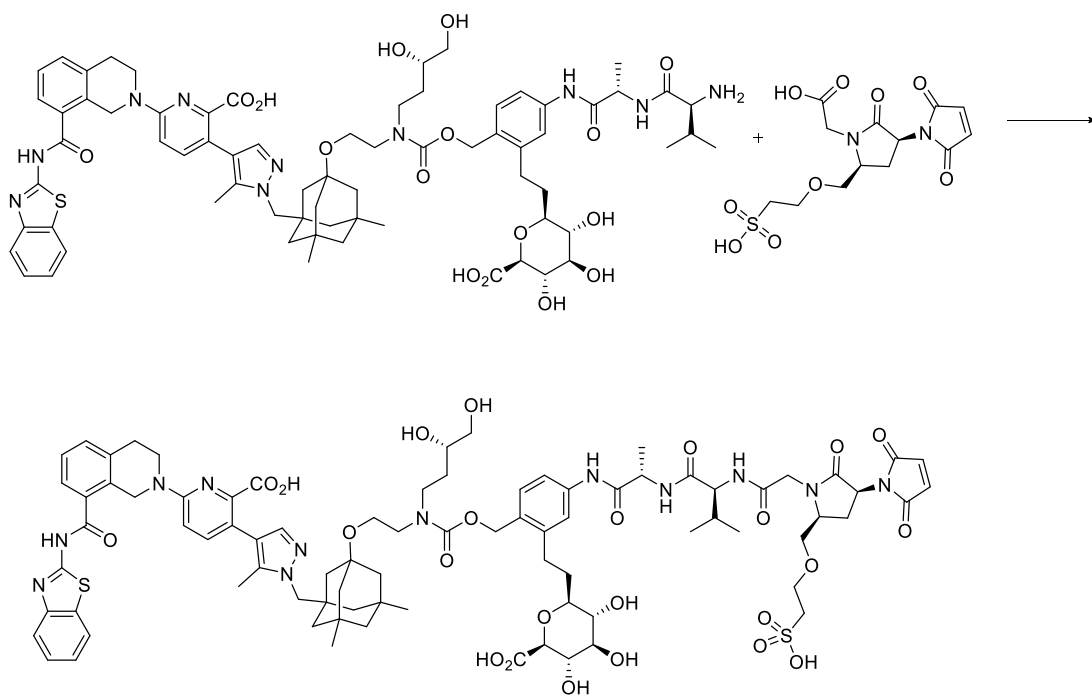


5

Ejemplo 1.4.1: ácido 3-[1-({3-[2-({[(4-{[(2S)-2-{[(2S)-2-amino-3-metilbutanoil]amino}propanoil]amino}-2-{2-[(2S,3R,4R,5S,6S)-6-carboxi-3,4,5-trihidroxioxan-2-il]etil}fenil)metoxi]carbonil}[(3S)-3,4-
 10 dihidroxibutil]amino)etoxi]-5,7-dimetiladamantan-1-il}metil)-5-metil-1H-pirazol-4-il]-6-{8-[(1,3-benzotiazol-2-il)carbamoil]-3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il}piridin-2-carboxílico

En un reactor de tamaño adecuado se añadió el
 15 Ejemplo 1.1.17 (5,17 g), el Ejemplo 1.2.19 (6,99 g), *N,N*-dimetilformamida (50 mL) y *N,N*-diisopropiletilamina (7,6 mL). Después de que se disolvieron los sólidos, se

añadió hidrato de 1-hidroxibenzotriazol (1,21 g) en el reactor, y el avance de la reacción se controló mediante HPLC (C18 Ascentis® Express®, 4,6 x 150 mm, 2,7 µm, caudal de 1,5 mL/minuto, eluyendo con un gradiente de acetonitrilo de 40 a 100 % en HClO₄ al 0,05 % en agua durante 18 minutos). Después de que se determinó que el acoplamiento estaba completo, se añadió tetrahidrofurano (62 mL) en el reactor y la mezcla de reacción se enfrió a 0 °C. Se añadió metóxido de litio (62 mL, solución de 1,0 M en metanol) durante 1 hora y se dejó que la mezcla de reacción se calentara a temperatura ambiente. El avance de la reacción se controló mediante HPLC (C18 Ascentis® Express®, 4,6 x 150 mm, 2,7 µm, caudal de 1,5 mL/minuto, eluyendo con un gradiente de acetonitrilo de 40 a 100 % en HClO₄ al 0,05 % en agua durante 18 minutos) y después de que se determinó que la hidrólisis estaba completa, se añadió acetonitrilo (110 mL) en el reactor durante 2 horas. Se dejó que la suspensión se agitara durante 2 horas más y se aislaron los sólidos mediante filtración al vacío, seguido de un lavado de la torta de filtración con acetonitrilo (2 x 10 mL). El residuo se purificó por cromatografía en fase inversa (Luna® C18 Phenomenex®, 50 x 250 mm, 10 µm, caudal de 80 mL/minuto, 25 mM de acetato de amonio/acetonitrilo, 64/36 mediante elución isocrática) y las fracciones deseadas se liofilizaron para obtener el compuesto del título en forma de sal de acetato. MS (ESI) m/z 1357,5 (M+H)⁺.



Ejemplo 1: 6-{8-[(1,3-benzotiazol-2-il)carbamoil]-3,4-
 dihidroisoquinolin-2(1H)-il}-3-[1-({3-[2-({[(2-{2-
 5 [(2*S*,3*R*,4*R*,5*S*,6*S*)-6-carboxi-3,4,5-trihidroxioxan-2-
 il]etil}-4-{[(2*S*)-2-{[(2*S*)-2-(2-{(3*S*,5*S*)-3-(2,5-dioxo-
 2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)-2-oxo-5-[(2-
 sulfoetoxi)metil]pirrolidin-1-il}acetamido)-3-
 metilbutanoil]amino}propanoil]amino}fenil)metoxi]carbonil
 10 }[(3*S*)-3,4-dihidroxibutil]amino)etoxi]-5,7-
 dimetiladamantan-1-il}metil)-5-metil-1*H*-pirazol-4-
 il]piridin-2-carboxílico (sintón AAA)

El Ejemplo 1.3.14 (17,7 mg) se disolvió en *N,N*-
 dimetilformamida (0,14 mL) y se añadió hexafluorofosfato de
 15 *O*-(7-azabenzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio
 (16,9 mg) y *N,N*-diisopropiletilamina (18,5 µl). La mezcla
 se agitó durante 3 minutos a temperatura ambiente y a

continuación se añadió a una mezcla del Ejemplo 1.4.1 (52,0 mg) y *N,N*-diisopropiletilamina (24,7 µL) en *N,N*-dimetilformamida (0,2 mL). Después de 1 hora, la reacción se diluyó con *N,N*-dimetilformamida/agua 1/1 (1,0 ml) y se
5 purificó por HPLC en fase inversa (columna de 250 × 50 mm Luna® C18 Phenomenex®), eluyendo con acetonitrilo de 5-75 % en ácido trifluoroacético/agua al 0,1 % (100 ml/minuto) para proporcionar el compuesto del título. ¹H NMR (500 MHz, dimetilsulfóxido-*d*₆) δ ppm 9,86 (br d, 1H), 8,17 (br d, 1H),
10 8,04 (m, 2H), 7,78 (d, 1H), 7,61 (d, 1H), 7,51 (br d, 1H), 7,49-7,39 (m, 4H), 7,36 (m, 2H), 7,29 (s, 1H), 7,21 (d, 1H), 7,07 (s, 2H), 6,95 (d, 1H), 5,00 (s, 2H), 4,96 (s, 2H), 4,64 (t, 1H), 4,36 (m, 1H), 4,19 (m, 1H), 4,16 (d, 1H), 4,01 (d, 1H), 3,88 (br t, 2H), 3,82 (br m, 3H), 3,75 (br m, 1H), 3,64
15 (t, 2H), 3,54 (d, 2H), 3,47 (m, 4H), 3,43 (br m, 4H), 3,23 (br m, 5H), 3,13 (t, 1H), 3,10 (br m, 1H), 3,01 (br m, 2H), 2,93 (t, 1H), 2,83-2,68 (m, 3H), 2,37 (m, 1H), 2,08 (s, 3H), 1,99 (br m, 2H), 1,85 (m, 1H), 1,55 (br m, 1H), 1,37 (br m, 1H), 1,28 (br m, 6H), 1,10 (br m, 7H), 0,93 (br m, 1H),
20 0,88-0,69 (m, 12H); MS (ESI) *m/z* 1713,6 (M-H)⁻.

Ejemplo 2: Preparación del anticuerpo AM2

La secuencia de aminoácidos de la región VH para el AM2 se proporciona en la sec. con núm. de ident.: 22.
25 La secuencia de aminoácidos de la región VL para el AM2 se proporciona en la sec. con núm. de ident.: 23. La cadena

pesada del AM2 se proporciona como la sec. con núm. de ident.: 1 y la cadena ligera se proporciona como la sec. con núm. de ident.: 5.

Las secuencias de ácidos nucleicos completas de las cadenas pesadas y ligeras del AM2 se expresaron mediante transfección transitoria de vectores de expresión que codificaban las cadenas pesadas y ligeras del AM2 en células HEK293. La secuencia de aminoácidos de la secuencia líder utilizada para la expresión de la cadena pesada fue MEFGLSWLFLVAILKGVQC (sec. con núm. de ident.: 25) mientras que la secuencia de aminoácidos utilizada para la expresión de la cadena ligera fue MDMRVPAQLLGLLLWFPGSRC (sec. con núm. de ident.: 26). El AM2, con una cadena pesada de sec. con núm. de ident.: 1 y una cadena ligera de sec. con núm. de ident.: 5, se purificó posteriormente para realizar una evaluación funcional posterior.

En relación con al anticuerpo anti-EGFR AM2B, que comprende una cadena pesada de la sec. con núm. de ident.: 21 y una cadena ligera de la sec. con núm. de ident.: 24, las mutaciones de aminoácidos en el AM2 representan (1) cambios en el alotipo de la IgG humana de un alotipo z, no a un alotipo z,a; (2) una mutación C6v1 (LC:C214A), que permite la conjugación específica del sitio, y (3) una mutación LALA (dos sustituciones de leucina a alanina, 1234A, 1235A).

Ejemplo 3: Conjugación del sintón AAA con el anticuerpo AM2 para EGFR

Se preparó una solución 10 mM de ácido 2-(difenilfosfino)benzoico (DPPBA, Sigma Aldrich) en dimetilacetamida (DMA). Se añadieron 2,42 equivalentes de DPPBA a una solución de anticuerpo AM2 para EGFR equilibrado previamente a 4 °C (~ 10 mg/mL, formulado en 1× de solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS), pH de 7,4 con 2 mM de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)). La mezcla de reacción se mezcló suavemente y se incubó a 4 °C durante 16-24 horas. 3,7 equivalentes de 10 mM de sintón AAA (ácido (6-{8-[(1,3-benzotiazol-2-il)carbamoil]-3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il}-3-[1-({3-[2-({[(2-{2-[(2S,3R,4R,5S,6S)-6-carboxi-3,4,5-trihidroxioxan-2-il]etil}-4-{[(2S)-2-{[(2S)-2-(2-{(3S,5S)-3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-2-oxo-5-[(2-sulfoetoxi)metil]pirrolidin-1-il}acetamido)-3-metilbutanoil]amino}propanoil]amino}fenil)metoxi]carbonil}[(3S)-3,4-dihidroxibutil]amino)etoxi]-5,7-dimetiladamantan-1-il}metil)-5-metil-1H-pirazol-4-il]piridin-2-carboxílico (véase la publicación de la solicitud de patente de los EE. UU. núm. 2019/0343961) (disuelto en DMA) se añadió a la solución de anticuerpo reducida y se mezcló suavemente. La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente durante 60 minutos y posteriormente se neutralizó con 2 equivalentes de N-acetil-L-cisteína (NAC, Sigma Aldrich A-8199-10G). El

conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) se purificó mediante cromatografía de interacción hidrófoba (HIC).

Ejemplo 4: Los ADC dirigidos a EGFR inhiben el crecimiento de células cancerosas *in vitro*

Las líneas celulares de NSCLC, EBC-1 y NCI-H441 (denominadas H441 en adelante) se obtuvieron de JCRB y ATCC, respectivamente. Las células se mantuvieron en cultivo en monocapa durante un máximo de 3 pases de acuerdo con las recomendaciones del proveedor. Se inyectó subcutáneamente una suspensión de 5×10^6 células en medio de cultivo mezcladas con Matrigel (1:1, volumen:volumen) en el flanco derecho de ratones hembra SCID/beige. El tratamiento se inició cuando los tamaños de los tumores del flanco alcanzaron aproximadamente 200 mm³.

	Cadena pesada de anticuerpo (sec. con núm. de ident.)	Cadena ligera de anticuerpo (sec. con núm. de ident.)	Sintón	Promedio DAR	Método DAR
AM2B-AAA	21	24	AAA	2	HIC
AM7-AAA	9	11	AAA	2	HIC

La DAR promedio representa la cantidad promedio de fármacos acoplados a los anticuerpos para la composición.

La Figura 3 muestra que el AM2B-AAA y el AM7-AAA inhibieron el crecimiento de NSCLC humano desarrollado como xenoinjertos en ratones inmunodeprimidos. Se observó una inhibición moderada del crecimiento después de la

administración de los ADC como agente único. La durabilidad de la inhibición causada por docetaxel (DTX) aumentó después de la coadministración tanto con AM2B-AAA como con AM7-AAA. La actividad de los ADC se comparó con la de un anticuerpo IgG no dirigido (AB095) (un anticuerpo IgG1 humano que reconoce el toxoide tetánico; Véase Larrick et al, 1992, Immunological Reviews 69-85).

Las **Figuras 3A y 3B** muestran cambios en el volumen tumoral después del tratamiento del adenocarcinoma papilar, H441.

Las **Figuras 3C y 3D** muestran cambios en el volumen tumoral después del tratamiento del carcinoma epidermoide, EBC-1.

Cada punto de la curva representa la media de volumen de 8 tumores.

Las barras de error ilustran el error típico de la media.

Ejemplo 5: Análisis FACS AM2-AAA inhibe Bcl-xL en células que sobreexpresan EGFR

Para analizar la unión del AM2-AAA a la superficie celular del EGFR natural sobreexpresado y a formas mutadas del EGFR, incluidas las mutaciones activadoras encontradas en NSCLC (mutEGFR), las células tumorales con EGFR natural (A431) y mutEGFR (NCI-H1650)

sobreexpresados se evaluaron mediante clasificación de células activada por fluorescencia (FACS).

Las células se recolectaron de matraces al llegar a aproximadamente $1,5 \times 10^6$ células/mL. Las células se lavaron una vez con PBS/FBS al 1 % (tampón de FACS) y a continuación se resuspendieron al llegar a $2,5 \times 10^6$ células/mL con tampón de FACS. Se añadieron 50 μ L de células a una placa de 96 pocillos de fondo redondo. Se añadieron 50 μ L de una concentración 2x de mAb/ADC (las concentraciones finales se indican en las figuras) a los pocillos y la placa se incubó a 4 °C durante una hora. Las células se lavaron dos veces con tampón FACS y se resuspendieron en 50 μ L de una dilución 1:100 de Ab secundario (AlexaFluor 488, Invitrogen, 11013) diluido en tampón FACS. La placa se incubó a 4 °C durante una hora y se lavó dos veces con tampón de FACS. Las células se resuspendieron en 100 μ L de PBS/formaldehído al 1 % y se analizaron en un citómetro de flujo Becton Dickinson FACSCanto II. Los datos se analizaron usando un software de análisis para citometría de flujo WinList.

	Cadena pesada de anticuerpo (sec. con núm. de ident.)	Cadena ligera de anticuerpo (sec. con núm. de ident.)	Sintón	Promedio DAR	Método DAR
AM2	1	5	--	--	--
AM2-AAA	1	5	AAA	2	HIC
MSL109 hIgG	29	30	--	--	--

Se demostró que el AM2-AAA y el AM2 se unen a ambas líneas celulares con una afinidad aparente similar, lo que indica que el fármaco-enlazador no repercute en las propiedades de unión del Ab. No se observó unión con un control de no unión MSL109 hIgG (**Figura 1**). El anticuerpo monoclonal contra la glicoproteína H del CMV (MSL109) es un control no dirigido que tiene una cadena pesada que se indica como sec. con núm. de ident.: 29 y una cadena ligera que se indica como sec. con núm. de ident.: 30.

10

Ejemplo 6: Ensayo de ruptura del complejo BIM-Bcl-xL

Para evaluar si el tratamiento de células con AM2-AAA inhibía la Bcl-xL de una manera dependiente del EGFR, se evaluó la ruptura de los complejos Bcl-xL-BIM en las líneas celulares que expresan EGFR natural y mutEGFR.

Las células se sembraron en placas, 50 x 10³ células/pocillo, en placas de 96 pocillos en medio de cultivo RPMI-1640 (GibcoInvitrogen, 22400-089) complementado con suero fetal bovino al 10 % en la mañana. Por la tarde, se añadieron los tratamientos en medio nuevo a los pocillos por triplicado. Veinticuatro horas después, las células se lisaron con HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, tampón CHAPS al 1 % y los complejos Bcl-xL/BIM en los lisados de proteínas se capturaron en placas (MesoScale Diagnostics LLC, L15SA-1) previamente recubiertas con anticuerpo de captura anti-Bcl-xL (sistemas de I+D, anti-Bcl-xL 840768 biotinilado, kit

25

DYC894-2). Las placas se lavaron con PBS y se añadió anticuerpo de detección anti-BIM (Cell Signalling, 2933) a los pocillos durante una hora a temperatura ambiente. A continuación, las placas se lavaron con PBS y se añadió anticuerpo contra las inmunoglobulinas de conejo marcado con Sulfo (MesoScale Diagnostics LLC, R32AB-1) a los pocillos y, a continuación, se incubaron a temperatura ambiente durante una hora. Las placas se lavaron y se añadió tampón de lectura de MSD (MesoScale Diagnostics LLC, R92TC-2) a los pocillos y las placas se leyeron con el instrumento de MesoScale Diagnostics LLC (Sector S 600). Los datos se representaron como porcentaje restante del complejo BIM/BCL-xL. **(Figura 2)**

Ejemplo 7: Ensayo de caspasa

15

	Cadena pesada de anticuerpo (sec. con núm. de ident.)	Cadena ligera de anticuerpo (sec. con núm. de ident.)	Sintón	Promedio DAR	Método DAR
AM2	1	5	--	--	--
AM2-AAA	1	5	AAA	2	HIC
MSL109 hIgG-AAA	29	30	AAA	1,6	MS

Se sembraron en placas células A431 a razón de 50 000 células por pocillo en placas de 96 pocillos (Costar, 3610) en medio de crecimiento. Después de 24 horas en cultivo a 37 °C, los ADC se añadieron a los pocillos y se incubaron a 37 °C en una incubadora de CO₂ durante 24

horas Después de la incubación, se añadieron 100 µL de reactivo para ensayo Caspase-Glo 3/7 (Promega, G8093) a cada pocillo y se agitó durante 10 minutos. Después, las placas se incubaron a 37 °C durante 20 minutos. La actividad de la caspasa 3/7 se evaluó con un lector de placas de luminiscencia Victor (Perkin Elmer).

Mientras que un ADC (MSL109 hIgG-AAA) o AM2 no dirigido no logró romper los complejos Bcl-xL-BIM, el tratamiento con AM2-AAA dio como resultado una ruptura eficaz del complejo en ambas líneas celulares. Estos resultados indican que la carga útil AAA se administró específicamente a través del AM2-AAA a células que expresan EGFR (véase la **Figura 2**) e inhibió la actividad de la Bcl-xL.

La capacidad del AM2-AAA para favorecer la activación de las caspasas, una consecuencia resultante de la inhibición de Bcl-xL, también se evaluó en las células A-431. El AM2-AAA, pero no el AM2 o el MSL109 hIgG-AAA no dirigidos provocaron la activación de las caspasas, lo que respalda la actividad del mecanismo dependiente del EGFR del ADC dirigido.

Ejemplo 8: Estudio de toxicidad

	Cadena pesada de anticuerpo (sec. con núm. de ident.)	Cadena ligera de anticuerpo (sec. con núm. de ident.)	Sintón	Promedio DAR	Método DAR
AM2B-AAA	21	24	AAA	1,97	HIC

AM2-AAA	1	5	AAA	2	MS
---------	---	---	-----	---	----

Estudio A: Estudio de toxicidad de cuatro semanas de dos dosis intravenosas (una vez cada tres semanas) de AM2B-AAA en monos cynomolgus

5 Se administraron dos administraciones intravenosas de AM2B-AAA a monos cynomolgus macho y hembra en cuatro grupos: control (0 mg / kg / dosis), dosis A (baja; X mg/kg/dosis), dosis B (media; 3X mg/kg/dosis), y dosis C (alto; 6X mg/kg/dosis). La administración de AM2B-
10 AAA tuvo resultados adversos en las arterias de múltiples órganos con la dosis alta (dosis C). Se observó inflamación arterial (de mínima a moderada) con la dosis C, con tinción inmunohistoquímica positiva para IgG humana y complemento, compatible con enfermedad por inmunocomplejos posterior a
15 la administración de proteína exógena. Esto se interpretó como posterior a la formación y depósito de inmunocomplejos con fijación del complemento, como lo demostró la inmunohistoquímica. Los resultados no adversos atribuidos al AB2B-AAA incluyeron un aumento de la matriz glomerular
20 en los riñones con todas las diferentes dosis.

Los cambios notables relacionados con los ítems de la prueba que se consideraron no adversos debido a la baja magnitud y la ausencia de efectos funcionales incluyeron para los riñones [aumento, matriz glomerular
25 (mínimo a leve) a ≥dosis A); dilatación, túbulos (mínimo) a

≥dosis B]. Masa de RBC (disminución; mínimo a ≥dosis B);
recuento de plaquetas (disminución; leve a moderada a ≥dosis
B); respuesta inflamatoria de fase aguda caracterizada por
globulina (aumento mínimo en la dosis A y dosis B; aumento
5 leve a moderado a la dosis C), CRP (aumento leve en la dosis
C), albúmina (disminución mínima a leve a ≥dosis B) y
fibrinógeno (aumento mínimo a ≥dosis B).

Estudio B: Una semana cinco (dos dosis; Q3W)
estudio de toxicidad exploratoria intravenosa de AM2-AAA
10 en monos cynomolgus

Se administraron dos dosis intravenosas de AM2-AAA
a monos del género Macaca machos y hembras con 0 mg/kg/dosis
(control), Dosis 1 (6X mg/kg/dosis, donde X es lo mismo que
en el Estudio A) y Dosis 2 (15X mg/kg/dosis). No se detectó
15 ningún resultado de enfermedad por inmunocomplejos.

Los resultados renales consistieron en aumentos
leves a moderados en la matriz glomerular acompañados de
aumentos leves en el nitrógeno ureico con ≥Dosis 1. Los
resultados hematológicos relacionados con el punto de la
20 prueba incluyeron disminuciones leves a moderadas en la
masa eritrocitaria, disminuciones no adversas de
reticulocitos y disminuciones moderadas a importantes de
trombocitos con ≥Dosis 1 (consideradas adversas solo con
la Dosis 2). Otros cambios relacionados con el punto de la
25 prueba que se consideraron no adversos incluyeron
disminución leve a moderada del número de linfocitos en el

timo con $\geq$ Dosis 1, aumento mínimo a leve de la actividad de la AST con $\geq$ Dosis 1, aumento de la bilirrubina con la Dosis 1, disminución leve a moderada del calcio con $\geq$ Dosis 1 y disminución mínima a leve de la albúmina con $\geq$ Dosis 1.

5

Ejemplo 9: Análisis de unión Biacore del AM2 y del AM2-AAA

Se realizó un análisis Biacore para comparar la afinidad del anticuerpo AM2 y del ADC AM2-AAA por tres formas de EGFR recombinante, específicamente el dominio extracelular (ECD) del EGFR natural (EGFR(h)(1-645)), del EGFRvIII (EGFR(h)(1-29)-G-(298-645)) y de un EGFR natural truncado 1-525 (EGFR1(h)(1-525)). El AM2 incluye las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera del AM2 según se proporciona en las sec. con núm. de ident.: 1 y 5, respectivamente, y se preparó de acuerdo con métodos habituales. El AM2-AAA comprende el anticuerpo AM2 con las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera proporcionadas en las sec. con núm. de ident.: 1 y 5, respectivamente, conjugadas con el sintón AAA (DAR promedio de 2).

La cinética de unión para el AM2 y el AM2-AAA para dominios extracelulares (ECD) del EGFR solubles recombinantes se determinó mediante mediciones a partir de resonancia de plasmones superficiales realizadas con un instrumento Biacore T200 (GE Healthcare) a 25 °C con un método de ensayo de captura anti-Fc. Los ECD solubles

recombinantes para las tres isoformas de EGFR se expresaron a partir de células HEK293 transfectadas transitoriamente como proteínas secretadas con una etiqueta myc y de histidina en el extremo C-terminal y se purificaron
5 mediante Ni-IMAC (cromatografía de afinidad por metales inmovilizados) y SEC. En particular, el ECD del EGFR sometido a prueba incluyó los aminoácidos 1-645 del EGFR fusionados a una etiqueta myc y de histidina [(EGFR (1-645)-LESRGPF-Myc-NMHTG-6His (“LESRGPF” (sec. con núm. de
10 ident.: 27))]. La variante EGFRvIII también se fusionó a una etiqueta myc y de histidina (EGFR(h) (1-29)-G-(298-645)-LESRGPF-Myc-NMHTG-6His), al igual que el ECD EGFR 1-525 [EGFR1(h) (1-525)]-LESRGPF-Myc-NMHTG-6His (“LESRGPF” (sec. con núm. de ident.: 28))]. Todas las ECDs se expresaron con
15 la secuencia de señal MRPSGTAGAALLALLAALCPASRA, que se escindió durante la secreción.

La preparación del chip y las mediciones de la cinética de unión se realizaron en el tampón de ensayo HBS-EP+ (Hepes 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, Tween
20 20 al 0,05 %). Para la preparación del chip de captura anti-Fc, aproximadamente 2000 RU de anticuerpo policlonal caprino contra el Fc de las inmunoglobulinas humanas (Thermo Fisher Scientific Inc., cat. 31125), diluidos a
25 25 µg/mL en acetato de sodio 10 mM (pH de 4,5) se inmovilizaron directamente a través de un chip biosensor CM5 con un kit de acoplamiento de amina habitual de acuerdo

con las instrucciones y los procedimientos del fabricante (GE Healthcare). Los restos sin reaccionar en la superficie del biosensor se bloquearon con etanolamina. Para las mediciones de cinética de unión, cada ciclo de ensayo consistió de las siguientes etapas: (1) captura del anticuerpo de prueba solo en la superficie de la prueba: (2) inyección de analitos (ECD de EGFR o tampón solo) en tanto la referencia como la superficie de prueba (240 μ l a 80 μ l/min), después de lo cual la disociación se monitoreó durante 900 segundos a 80 μ l/min; (3) regeneración de la superficie de captura mediante 10 mM de glicina-HCl, inyecciones de pH 1,5 sobre la superficie de referencia y de prueba.

Para las determinaciones cinéticas, los analitos se aleatorizaron en 3 series de dilución a partir de la dosis máxima de 3 μ M. Durante el ensayo, se tuvieron como referencia todas las determinaciones contra la superficie de captura sola (es decir, sin anticuerpo de prueba capturado) y se usaron inyecciones de tampón solo como referencia secundaria. Los datos se procesaron y se ajustaron globalmente a un modelo de unión 1:1 mediante el uso del software de evaluación Biacore T200 para determinar las constantes de velocidad de la cinética de unión, k_a ($M^{-1}s^{-1}$) y k_d (s^{-1}), y la constante de disociación en equilibrio K_D (M). Los resultados del análisis Biacore se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1: Cinética de unión del anticuerpo AM2 y del ADC

AM2-AAA

	EGFRvIII (hEGFR de2-7) [EGFR(H) (1-29)-G-(298-645)]			EGFRs1-501 (EGFR(1-525)) [EGFR1(h) (1-525)]			hEGFR WT [EGFR(1-645)]		
	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
AM2	3,3x10 ⁴	1,7x10 ⁻⁴	5,0x10 ⁻⁹	2,8x10 ³	1,2x10 ⁻³	4,2x10 ⁻⁷	No se observa unión (con la dosis máxima de 3 µM)		
AM2-AAA	3,5x10 ⁴	1,7x10 ⁻⁴	4,9x10 ⁻⁹	2,9x10 ³	1,2x10 ⁻³	4,0x10 ⁻⁷	No se observa unión (con la dosis máxima de 3 µM)		

5 Si bien se han ilustrado y descrito diversas modalidades específicas, se apreciará que pueden realizarse diversos cambios sin apartarse del espíritu y alcance de la descripción.

10 Tabla 2. Tabla de secuencias

Sec. con núm. de ident.	Clon	Región de la proteína	Región V
1	Cadena pesada del AM2		EVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVS <u>GYSISNDFAWN</u> WIRQPPGKGLEWMG <u>YISYKGNTRYQPSLKS</u> RITISR DTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVT <u>ASRGFPW</u> WGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP KS <u>CD</u> KTHTCPPCPAPE <u>AA</u> GGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR <u>DEL</u> TKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV LDSGTSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK
2	AM2	CDR1 de HC	<u>GYSISNDFAWN</u>

Sec. con núm. de ident.	Clon	Región de la proteína	Región V
3	AM2	HC CDR2	<u>YISYKGNTRYQPSLKS</u>
4	AM2	CDR3 de HC	<u>ASRGFPW</u>
5	Cadena ligera del AM2		DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITC <u>HSSQDINSNIG</u> WLQQ KPGKSFKGLIY <u>HGTNLDD</u> GVPSRFSGSGSGTDYTLTIS SLQPEDFATYYC <u>VQYAQFPWT</u> FGGGTKLEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEA
6	AM2	CDR1 de LC	<u>HSSQDINSNIG</u>
7	AM2	CDR2 de LC	<u>HGTNLDD</u>
8	AM2	CDR3 de LC	<u>VQYAQFPWT</u>
9	Cadena pesada del AM7		EVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVS <u>GYSISNDFAWN</u> WIRQLPGKGLEWMG <u>YISYKGNTRYQPSLKS</u> RITISR DTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVT <u>ASRGLPY</u> WGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEVP KSCDKHTCPCPAPEAAGGPSVFLEFPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV LSDGSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK
2	AM7	CDR1 de HC	<u>GYSISNDFAWN</u>
3	AM7	HC CDR2	<u>YISYKGNTRYQPSLKS</u>
10	AM7	CDR3 de HC	<u>ASRGLPY</u>
11	Cadena ligera del AM7		DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITC <u>HSSQDITYNIG</u> WL QQKPGKSFKGLIY <u>HGANLDD</u> GVPSRFSGSGSGTDYT LTISSLQPEDFATYYC <u>VQYDEFPWT</u> FGGGTKLEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEA
12	AM7	CDR1 de LC	<u>HSSQDITYNIG</u>
13	AM7	CDR2 de LC	<u>HGANLDD</u>
14	AM7	CDR3 de LC	<u>VQYDEFPWT</u>
15	EGFR humano natural		MRPSGTAGAALLALLAALCPASRALEEKVKCQGTSNKL TQLGTFEDHFLSLQRMFNCEVVLGNLEITYVQRNYDL SFLKTIQEVAGYVLIALNTVERIPLENLQIRGNMYE NSYALAVLSNYDANKTGLKELPMRNLQEILHGAVRFSN

Sec. con número de ident.	Clon	Región de la proteína	Región V
			NPALCNVESIQWRDIVSSDFLSNMSMDFQNHGSCQKC DPSCPNGSCWGAGEENCQKLTKIICAQQCSGRCRGKSP SDCCHNQCAAGCTGPRESCLVCRKFRDEATCKDTCPP LMLYNPTTYQMDVNPEGKYSFGATCVKKCPRNYVVDH GSCVRACGADSYEMEEDGVRKCKCEGPCRKVCNGIGI GEFKDSLSINATNIKHFKNCTSIISGDLHILPVAFRGDS FTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLH AFENLEIIRGRKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEI SDGDVLIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNR GENSCKATGQVCHALCSPEGCGWPEPRDCVSCRNVSRG RECVDKCNLLEGEPRFVENSECIQCHPECLPQAMNIT CTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVW KYADAGHVCHLCHPNCTYGTGPGLEGCPNGPKIPSI ATGMVGALLLLLVVALGIGLFMRRRHIVRKRTRLRLQ ERELVEPLTPSGEAPNQALLRILKETEFKKIKVLGSGA FGTVYKGLWIPEGEKVKIPVAIKELREATSPKANKEIL DEAYVMASVDNPHVCRLLGICLTSTVQLITQLMPFGCL LDYVREHKDNIGSQYLLNWCQVIAKGMNYLEDRLVHR DLAARNVLVKTPQHVKITDFGLAKLLGAEKEYHAEGG KVPIKWMALLESILHRIYTHQSDVWSYGVTVWELMTFGS KPYDGIPASEISSILEKGERLPQPPICTIDVYMIMVKC WMIDADSRPKFRELIIEFSKMARDPQRYLVIQGDERRH LPSPTDSNFYRALMDEEDMDDVDDADEYLIPOQGFSS PSTSRTPLLSLSATSNNSTVACIDRNLQSCPIKEDS FLQRYSSDPTGALTEDSIDDTFLPVPEYINQSVPRPA GSVQNPVYHNQPLNPAPSRDPHYQDPHSTAVGNPEYLN TVQPTCVNSTFDSPAHWAGKSHQISLDNPDYQQDFFP KEAKPNGIFKGSTAENAEYLRVAPQSSEFIGA
16	ECD natural truncado del EGFR (EGFR (1- 525))		MRPSGTAGAALLALLAALCPASRALEEKVKCQGTSN KLTQLGTFEDHFLSLQRMFNCEVVLGNLEITYVQR NYDLSFLKTIQEVAGYVLIALNTVERIPLNQLIIR GNMYENSYALAVLSNYDANKTGLKELPMRNLQEIL HGAVRFSNNPALCNVESIQWRDIVSSDFLSNMSMDF QNHGSCQKCDPSCPNGSCWGAGEENCQKLTKIICA QQCSGRCRGKSPSDCCHNQCAAGCTGPRESCLVCR KFRDEATCKDTCPPMLYNPTTYQMDVNPEGKYSFG ATCVKKCPRNYVVDHSGSCVRACGADSYEMEEDGVR KCKKCEGPCRKVCNGIGIGIEFKDSLSINATNIKHFK NCTSIISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILK TVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRKQ HGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVLIISGNKN LCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQ VCHALCSPEGCGWPEPRDCVS
17	ECD del EGFR humano		MRPSGTAGAA LLALLAALCP ASRALEEKKV CQGTSNKLTQ LGTFEDHFLS LQRMFNCEV VLGNLEITYV QRNYDLSFLK TIQEVAGYVL IALNTVERIP LENLQIIRGN MYEENSYALA VLSNYDANKT GLKELPMRNL QEILHGAVRF SNNPALCNVE SIQWRDIVSS DFLSNMSMDF QNHGSCQKC DPSCPNGSCW GAGEENCQKL TKIICAQQCS GRCRGKSPSD CCHNQCAAGC TGPRESCLV CRKFRDEATC KDTCPPMLLY NPTTYQMDVN PEGKYSFGAT CVKKCPRNYV VTDHGSCVRACGADSYEMEE DGVRKCKKCEGPCRKVCNGI GIEFKDSLS INATNIKHFK NCTSIISGDLH ILPVAFRGDS FTHTPPLDPQ ELDILKTVKE ITGFLLIQAW

Sec. con número de ident.	Clon	Región de la proteína	Región V
			PENRTDLHAF ENLEIIRGRT KQHGFSLAV VSLNITSLGL RSLKEISDGD VIISGNKNLC YANTINWKKL FGTSGQKTKI ISNRGENSCK ATGQVCHALC SPEGCWGPEP RDCVSCRNV RGRECVDKCN LLEGEPRFV ENSECIQCHP ECLPQAMNIT CTGRGPDNCI QCAHYIDGPH CVKTCFAGVM GENNTLVWKY ADAGHVCHLC HPNCTYGCTG PGLEGCTNG PKIPS
18	EGFRvIII		MRPSGTAGAALLALLAALCPASRA LEEKKGNYVVT DHG SCVRACGADSYEMEEDGVRKCK KCEGPCRKVC NGIGIG EFKDSLSINATNIKHFKNCT SISGDLHILPVA FRGDSF THTPPLDPQELDILKTVKEITG FLLIQAWPENRTDLHA FENLEIIRGRTKQHGFSLAVVSLNITSLGLRSLKEIS DGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRG ENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGR ECVDKCNLLEGEPRFVENSECIQCHPECLPQAMNITC TGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCFAGVMGENNTLVWK YADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCTNGPKIPSIA TGMVGALLLLLVVALGIGLFMRRRHIVRKRTLRLRLQE RELVEPLTPSGEAPNQALLRILKETEFKKIKVLGSGAF GTVYKGLWIPEGEKVKIPVAIKELREATSPKANKEILD EAYVMASVDNPHVCRLLGICLTSTVQLITQLMPFGCLL DYVREHKDNIGSQYLLNWCQIAKGMNYLEDRLVHRD LAARNVLVKTPQHVKITDFGLAKLLGAEEKEYHAEGGK VPIKWMALLESILHRIYTHQSDVWSYGVTVWELMTFGSK PYDGIPASEISSILEKGERLPQPPICTIDVYMIMVCKW MIDADSRLPKFRELIIEFSKMARDPQRYLVIQGDERMHL PSPTDSNFYRALMDEEDMDDVDADEYLIPQQGFFSSP STSRTPLLSSLSATSNNSTVACIDRNLQSCPIKEDSF LQRYSSDPTGALTEDSIDDTFLPVPEYINQSVKPRPAG SVQNPVYHNQPLNPAPSRDPHYQDPHSTAVGNPEYLN VQPTCVNSTFDSPAHWAKGSHQISLDNPDYQQDFFPK EAKPNGIFKGSTAENAEYLRVAPQSSEFIGA
19	EGFRvIII ECD		LEEKKGNYVVT DHGSCVRACGADSYEMEEDGVRKCK KCEGPCRKVC NGIGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCT SISGDLHILPVA FRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVK EITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGF SLAVVSLNITSLGLRSLKEIS DGDVIISGNKNLCY ANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCH ALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLE GEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNC IQCAHYIDGPHCVKTCFAGVMGENNTLVWKYADAGH VCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCTNGP
20	Epítipo de unión (residuos de aminoácidos 287-302 de la forma madura del hEGFR)		CGADSYEMEEDGVRKC
21	Cadena pesada del AM2B		EVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVS GYSISNDFAWN IRQPPGKGLEWMG YISYKGNTRYQPSLKS RITISRDT SKNQFFLKLNSTAAADTATYYCVT ASRGFPW WGQGT

Sec. con núm. de ident.	Clon	Región de la proteína	Región V
			VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSP GK
2	AM2B / AM2 HC CDR1	CDR1	<u>GYSISNDFAWN</u>
3	AM2B / AM2 HC CDR2	CDR2	<u>YISYKGNTRYQPSLKS</u>
4	AM2B / AM2 HC CDR3	CDR3	<u>ASRGFPW</u>
22	AM2 / AM2B VH		EVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVS GYSISNDFAWN WI RQPPGKGLEWWMG YISYKGNTRYQPSLKS RITISRDTSK NQFFLKLNSVTAADTATYYCVTA ASRGFPW WGQGTLVTV SS
23	AM2 / AM2B VL		DIQMTQSPSSMSVSVGDRVITITC HSSQDINSNIG WLQQ KPGKSEFKGLIY HGTNLDD GVPSRFSGSGSGTDYTLTIS SLQPEDFATYYC VQYAQFPWT FGGGTKLEIK
24	Cadena ligera del AM2B		DIQMTQSPSSMSVSVGDRVITITC HSSQDINSNIG WLQQ KPGKSEFKGLIY HGTNLDD GVPSRFSGSGSGTDYTLTIS SLQPEDFATYYC VQYAQFPWT FGGGTKLEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
6	AM2B / AM2 LCDR1	CDR1	HSSQDINSNIG
7	AM2B / AM2 LCDR2	CDR2	HGTNLDD
8	AM2B / AM2 LCDR3	CDR3	VQYAQFPWT
29	Cadena pesada de MSL109 hIgG1	Cadena pesada	EEQVLESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSPYSVFVWR QAPGKGLEWVSSINSDSTYKYYADSVKGRFTISRDAE NSIFLQMNSLRAEDTAVYYCARDRSYYAFSSGSLSDYY YGLDVWGQGTIVIVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSL SPGK
30	Cadena ligera de MSL109	Cadena ligera	DIVMTQSPLSLSVTPGEPASISCRSSQSLLTNGNYNL DWYVQKPGQSPQLLIYLASNRASGVPDFSGSGSGTDF TLKISRVEDVGVYYCMQALQIPRTFGQGTKVEIKRT

Sec. con número de ident.	Clon	Región de la proteína	Región V
			VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC